

CLARA CECILIA REYES OCHOA

**HIDROXIAPATITA, POLICAPROLACTONA E ALENDRONATO EM
DEFEITOS ÓSSEOS EXPERIMENTAIS NO OLECRANO DE COELHOS**

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
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R457h
2013

Reyes Ochoa, Clara Cecilia, 1985-

Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato em defeitos
ósseos experimentais no olecrano de coelhos / Clara Cecilia
Reyes Ochoa. – Viçosa, MG, 2013.

xi, 43 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.31-43.

1. Coelho. 2. Ossos - Regeneração. 3. Materiais
biomédicos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.089671

CLARA CECILIA REYES OCHOA

**HIDROXIAPATITA, POLICAPROLACTONA E ALENDRONATO EM
DEFEITOS ÓSSEOS EXPERIMENTAIS NO OLECRANO DE COELHOS**

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*.

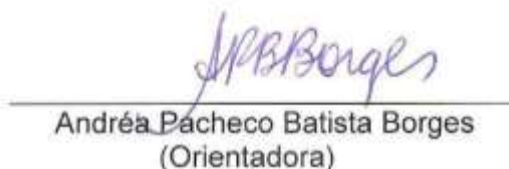
APROVADA: 12 de abril de 2013.


Sheila Maria de Castro M. Bicalho


João Moreira da Costa Neto


Emily Correna Carlo Reis


Fabricio Luciani Valente


Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A minha avó Ana, *in memoriam*.

Aos meus pais Néstor e Doris, por serem meus anjos.

Aos meus irmãos Gabriel e Ana, amigos verdadeiros.

A toda minha família por entender minha ausência em muitos momentos.

Ao Mono, Katy, Sami, Ponki, Samuel, Aparicio, Coni, Shana, Luna e Marie por serem fonte de inspiração para esta maravilhosa profissão.

A todos meus anjinhos de quatro patas.

AGRADECIMIENTOS

A,

Deus por ser minha espada, escudo e lança.

Meus pais pelo exemplo, confiança, ajuda, compreensão e sobre tudo, amor.

Meus irmãos pela compreensão, apoio, ajuda e horas de loucuras e risos.

Meus tios e primos pela união, respeito, carinho e espera sempre com os braços abertos.

Meus amigos Paula, Lina, Rafael, Víctor, Cindy, Carolina, Karen, José, Juan, Adriana, Fernely, Edna, Blanca, Katy, Yorlenis e toda a comunidade hispânica de Viçosa, pela amizade e momentos de família.

Gabriel Tafur, por sua disponibilidade, ajuda e amizade.

Os professores Joaquín e Marlene, por seus conselhos, apoio e força humana.

A professora Andreia, pela oportunidade, ensinamentos e paciência.

Fabricio e Emily, pelos conselhos, tempo, ensinamentos, mas sobre tudo pela força espiritual.

Margaret, por fazer me sentir em família, pelos conselhos e o carinho, que não tem preço.

Eliza, Luciana, Leticia, Hanna e Camila, por me mostrar o Brasil, pela amizade e eternas horas.

Carmen, Rosi, Bet, Abel, Rogerio, Geraldo, Andrea, Adan, Luciano, Claudio e funcionários em geral, por sua ajuda em algum momento.

Todas as pessoas que de um ou outro modo contribuíram para a realização do experimento ou para me manter em pé durante a tormenta.

Os coelhos do experimento minhas desculpas e eterna gratidão.

SUMÁRIO

Lista de figuras	v
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Resumo	viii
Abstract	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
3. Material e métodos.....	10
4. Resultados e discussão.....	15
Conclusão	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimento cirúrgico para a realização do defeito experimental no olecrano de coelho. A. defeito ósseo no olecrano direito de coelho (seta preta). B. defeito ósseo preenchido com compósito (seta preta).....11
- Figura 2.** Representação da análise radiográfica. Esquema da radiografia mediolateral do defeito ósseo, com a divisão em quadrantes em transparência em sobreposição para divisão dos quadrantes13
- Figura 3.** Radiografias mediolaterais do olécrano de coelho submetido a realização de defeito na cortical lateral e implantação ou não de compósitos, no dia da cirurgia. A. (PCL+HA+ALO). B. grupo (PCL+HA). C. grupo (PCL). D. grupo controle. Setas brancas indicam pontos de radiopacidade semelhante à do osso adjacente17
- Figura 4.** Radiografias mediolaterais do olécrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação ou não de compósitos, aos 8 dias. A. (PCL+HA+ ALO). B. grupo (PCL+HA). C. grupo (PCL). D. grupo controle18
- Figura 5.** Radiografias mediolaterais do olécrano de coelho submetido a realização de defeito na cortical lateral e implantação ou não de compósitos, aos 45 dias. A. (PCL+HA+ALO). B. grupo (PCL+HA). C. grupo (PCL). D. grupo controle19
- Figura 6.** Radiografias mediolaterais do olécrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação ou não de compósitos, aos 90 dias. A. (PCL+ HA+ALO). B. grupo (PCL+HA). C. grupo (PCL). D. grupo controle20
- Figura 7** Região do defeito realizado no olécrano de coelho, onde foi implantado o compósito HA+PCL+ALO. A. 8 dias após cirurgia. Biomaterial (a), osso recém-formado (b), matriz provisória (c) e borda do defeito (d).....22
- Figura 8.** Região do defeito realizado no olecrano de coelho, onde foi implantado o compósito HA+PCL. A. 8 dias após cirurgia, (a) Biomaterial. (b) Osso recém-formado. Matriz provisória (Seta branca).B. 45 dias após cirurgia. Interface de osseointegração (Seta preta).....24
- Figura 9.** Região do defeito realizado no olécrano de coelho, onde foi implantado o compósito HA+PCL+ALO. B. 45 dias após a cirurgia. Biomaterial (a), interface de osseointegração (Seta negra) e formação óssea (Cabeça negra).....25
- Figura 10.** Região do defeito realizado no olécrano de coelho, onde foi implantado o compósito HA+PCL+ALO. 90 dias após cirurgia. Biomaterial (Seta branca), tecido ósseo ao redor do biomaterial (a).27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvio padrão das diferenças dos valores de circunferência (cm) dos membros, após a realização de defeitos ósseos experimentais no olécrano de coelhos e a implantação ou não de biomaterial 17

Tabela 2. Porcentagem de quadrantes que apresentam delimitação das bordas do defeito e porcentagem de diminuição de tamanho dos defeitos em radiografias realizadas aos 8, 45 e 90 dias após a realização de defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos e implantação ou não de compósito ou polímero 21

Tabela 3. Medianas para variável osso segundo o tratamento e a data de avaliação histomorfométrica 29

Tabela 4. Médias e desvio padrão para variável biomaterial segundo o tratamento e a data de avaliação histomorfométrica 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HA: Hidroxiapatita

PCL: policaprolactona

ALO: Alendronato

PM: peso molecular

HAP: hidroxiapatita sintética

ATCC: linha celular MG-63 obtida da American Type Culture Collection

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

RESUMO

REYES OCHOA, Clara Cecilia, M Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato em defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Coorientador: Ricardo Junqueira Del Carlo.

A perda óssea, tanto na Medicina quanto na Veterinária, é um problema, que tem levado pesquisadores à procura de biomateriais, para favorecer a regeneração óssea. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade, a osseointegração e a biodegradação de compósitos de hidroxiapatita (HA), policaprolactona (PCL) e alendronato (ALO) e o polímero policaprolactona (PCL) em defeitos ósseos circulares de 5 mm de diâmetro realizados no olecrano direito de coelhos. Foram utilizados 36 coelhos da raça Nova Zelândia, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, de igual número. Os compósitos foram fabricados com diferentes proporções, sendo que o compósito um foi composto por 49,5% de hidroxiapatita, 49,5% de policaprolactona e 1% de alendronato (grupo PCL+HA+ALO) e o compósito dois foi de 50% de hidroxiapatita e 50% de policaprolactona (grupo PCL+HA). Um grupo recebeu o compósito um, outro recebeu o compósito dois, um terceiro grupo foi tratado apenas com o polímero de policaprolactona (grupo PCL) e um grupo não recebeu tratamento, sendo utilizado como controle. A avaliação foi feita por meio de análise clínica nos dias 2, 4 e 8 pós-cirurgia onde foram avaliados os parâmetros claudicação, sensibilidade dolorosa, deiscência e infecção. Para avaliar edema, foi medida a circunferência do membro nos dias 1, 2, 4 e 8 pós-operatórios. Foram feitas radiografias antes, imediatamente após a cirurgia e no dia da coleta de material para exame histopatológico e histomorfométrico, nas datas 8, 45 e 90 pós-operatórias, com três animais por grupo para cada data. Não houve diferença para os parâmetros claudicação, dor, infecção e deiscência entre os grupos. Na análise clínica foi observada diferença na variável edema entre o dia 1 e 8 em todos os grupos. Radiograficamente, no lugar do defeito foi observado aos 8 dias nos grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA pontos de radiopacidade semelhante a do osso adjacente e nos grupos PCL e controle radiopacidade menor a do osso

adjacente. Aos 45 dias os grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA apresentaram melhor resultado por terem maior porcentagem de quadrantes com pontos de radiopacidade semelhante a do osso adjacente e bordas de difícil delimitação em comparação aos grupos PCL e controle. Aos 90 dias, a radiopacidade foi observada em 100% dos quadrantes para os grupos PCL+HA+ALO, PCL+HA e PCL e só em 83.3% para o grupo controle. Histologicamente, observou-se que os animais do grupo controle apresentaram as bordas do defeito facilmente identificáveis, com início de formação de osso trabecular partindo dele, osso esse organizado, seguido por um grande número de trabéculas ósseas, o grupo PCL, aos oito dias, formação de osso trabecular na periferia do defeito, já nos grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA a formação foi observada tanto no centro quanto na periferia do defeito. Os biomateriais que compuseram os grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA demonstraram contato direto com o tecido ósseo aos 45 e 90 dias. Concluiu-se que os compósitos PCL+HA+ALO, PCL+HA e o polímero PCL são biocompatíveis. Acredita-se que ocorreu neoformação óssea à medida que os biomateriais foram degradados, uma vez que houve crescimento ósseo dentro do defeito, onde anteriormente era preenchido por biomaterial. Além dos compósitos PCL+HA+ALO e PCL+HA demonstrarem integração ao tecido ósseo.

ABSTRACT

REYES OCHOA, Clara Cecilia, M Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2013. **Composite of hidroxiapatite, polycaprolactone and alendronato in ulna bone defects in experimental rabbits.** Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-adviser: Ricardo Junqueira Del Carlo.

Bone loss is a problem, both in medicine and in veterinary medicine, which has led to researchers in the search for biomaterials to promote bone regeneration. This study aimed to evaluate the biocompatibility, osseointegration and biodegradation of the composites of hydroxyapatite (HA), polycaprolactone (PCL) and alendronate (ALO) and the polymer polycaprolactone (PCL) in circular bone defects of 5 mm diameter made in the right olecranon of rabbits. The study included 36 New Zealand rabbits that were randomly divided into four groups of equal numbers. The composites were manufactured with different proportions, composite one was composed by 49.5% hydroxyapatite, 49.5% polycaprolactone, 1% alendronate (PCL + HA + ALO), and composite two was composed by 50% hydroxyapatite, 50% polycaprolactone (PCL + HA) and polymer polycaprolactone (PCL group). Each group received a composition above and one group received no treatment and was used as control. The evaluation was made by clinical examination on days 2, 4 and 8 after surgery and lameness, pain, infection and dehiscence parameters were evaluated. To assess edema the circumference of the member was measured on days 1, 2, 4 and 8 post-operatively. Radiographs were taken before, immediately after surgery and the day of euthanasia. The dates 8, 45 and 90 postoperative were evaluated, with three animals per group for each date. In the last three dates olecranon was collected for histologic and morphometric analysis. There was no difference in the lameness, pain, infection and dehiscence parameters between groups. In clinical analysis, differences were observed between the variable edema of the limb circumference values on day 1 and 8 in all groups. The X-Rays shown similar radiopacity 8 days after surgery at the in the PCL+HA+ALO e PCL+HA and a smaller one at the groups PCL e .45 after surgery the groups PCL+HA+ALO e PCL+HA Showed a high percent of similar radiopacity 90 days after surgery the radiopacity showed was 100% for PCL+HA+ALO, PCL+HA e PCL groups and 83.3% for control group. Histologically, the control group

showed edges of the defect easily identifiable beginning of trabecular bone formation, this organized bone, followed by a large number of trabecular bone, the group PCL, after eight days, trabecular bone formation in the vicinity of the defect, since the groups PCL + + ALO HA and PCL + HA formation was observed both in the center and the periphery of the defect. The biomaterials used has direct contact with the tissue proving biocompatibility and also it might occur a bone formation as biomaterials have been degraded, since it was within the bone defect.

1. INTRODUÇÃO

Doenças e lesões ósseas são condições que afetam diretamente a qualidade de vida de pessoas e animais, e ainda hoje a magnitude desses problemas tem levado pesquisadores a buscarem material que possa substituir, facilitar ou estimular o reparo de forma cada vez mais adequada para o tecido ósseo lesionado ou perdido (SUGAWARA, 2006; SUGAWARA *et al.*, 2008; CHOW, 2009; STUART *et al.*, 2013).

O tecido ósseo possui capacidade regenerativa e é capaz de restabelecer sua estrutura óssea arquitetônica. No entanto, sua capacidade de reparação é limitada em casos de grande perda de tecido ósseo (PINHEIRO E GERBI, 2006). A perda de tecido ósseo é um problema grave tanto na medicina quanto na medicina veterinária, sendo resultado, por exemplo, da excisão cirúrgica de neoplasias e de traumas crânio-maxilo-faciais e em ossos longos (AJDUKOVIC *et al.*, 2005).

A importância das afeções do tecido ósseo no âmbito médico e odontológico é tão grande que as estatísticas mostram que só no Brasil, foram realizados 17.866 transplantes de tecido ósseo para reparo de defeitos durante o terceiro trimestre de 2012, (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2012). Em traumatologia, as fraturas cominutivas são um grande problema devido à perda do tecido ósseo e dificuldade de regeneração, podendo levar à união retardada ou a não união. Grande parte dessas fraturas decorre de acidentes automobilísticos, tanto em animais quanto em humanos, além de quedas e agressões físicas (BOER *et al.*, 2003).

Devido a que enxertos autógenos e alógenos possuem fatores como baixa disponibilidade, morbidade associada ao local doador e a possibilidade de transmissão de doenças (MYGIND *et al.*, 2007) . Assim sendo, substitutos ósseos com propriedades adequadas são fonte constante de pesquisas, buscando o reparo de tecidos lesionados (TABATA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os biomateriais podem servir como um suporte para a formação óssea (DAVIES *et al.*, 2010).

Portanto, este estudo, teve como objetivo avaliar os efeitos da hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato por meio da análise clínica, radiográfica, histológica e histomorfométrica em defeitos ósseos experimentais no olecrano direito de coelhos. O objetivo da associação hidroxiapatita - policaprolactona é de unir a bioatividade da primeira, com as propriedades mecânicas da última. Espera-se que, ao acrescentar o alendronato ao compósito, a regeneração óssea seja favorecida, tendo em vista as características de alendronato de promover a proliferação óssea. Espera-se, ainda, que a associação da HA, PCL e ALO, seja biocompatível, biodegradável se integre ao osso e acelere o processo de reparação óssea.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As perdas ósseas constituem um problema de saúde. O tecido ósseo possui capacidade regenerativa e é capaz de restabelecer sua estrutura óssea arquitetônica. No entanto, sua capacidade de reparação tem limites (PINHERO E GERBI 2006).

Com tal intuito, o de recuperar e/ou manter volume e qualidade óssea em regiões que perderam suas conformações anatômicas, têm procurado desenvolver ou aperfeiçoar materiais biocompatíveis, os quais favorecem o reparo dos defeitos ósseos (SUGAWARA 2006; SUGAWARA *et al.*, 2008).

O termo substituto ósseo refere-se aos produtos destinados à regeneração do tecido ósseo, incluindo o biomaterial utilizado com essa finalidade (YUAN *et al.*, 2005). Por isso, os biomateriais utilizados como substitutos do tecido ósseo devem possuir características peculiares. Eles devem ser biocompatíveis e biodegradáveis (CHEN *et al.*, 2009). Além disso, precisam proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (PRECHEUR, 2007). Esses biomateriais ainda devem possuir habilidade de integração com o organismo (VUNJAK-NOVAKOVIC e KAPLAN, 2006).

O biomaterial quando inserido em meio vivo, substituindo ou complementando um tecido do organismo, desempenha as funções desse, sem efeito nocivo ao hospedeiro (HAYEK e NEWSELY, 1963). O biomaterial empregado pode ser classificado como permanente ou temporário. O material permanente é utilizado com o objetivo de substituir um tecido lesado por tempo indeterminado. Dessa forma, é produzido de modo a manter as suas características mecânicas e físico-químicas (TÖRMÄLÄ *et al.*, 1998). Esse tipo de dispositivo é comumente empregado como, por exemplo, prótese substituindo articulações danificadas, válvulas cardíacas, lentes intraoculares dentre outras utilizações. Por outro lado, existem situações onde se necessita de um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo

regenerativo. Nesse caso, uma alternativa é o biomaterial temporário (ARNALDO e SANTO, 2007).

O biomaterial deve apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos, apresentando uma propriedade importante: a biocompatibilidade (SILVA *et al.*, 2011). Deve, também, 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).

São características desejáveis de um biomaterial ter uma taxa de reabsorção conhecida e coincidente com a formação do novo tecido desejado e uma superfície adequada para a fixação, diferenciação e proliferação de células para favorecer a formação dos tecidos no local do implante (NAIR e LAURENCIN. 2007).

Já a biofuncionalidade do biomaterial está relacionada com as características mecânicas e físicas que o dispositivo implantado deve ter para cumprir a função desejada durante o tempo necessário, que pode ser longo em caso de implante permanente, ou bem mais curto em caso de implante temporário (FONSECA, 2007).

A Hidroxiapatita (HA) é o componente mineral natural do osso, podendo ser obtida para uso como biomaterial de uma fonte natural, como é o coral, ou sintética e, tem sido amplamente adotada como biomaterial para regeneração do tecido ósseo (BORGES *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2007).

A HA pertence a um grupo chamado de biocerâmicas, que têm recebido atenção desde que sua área de superfície foi relatada como benéfica para formação de ligações com tecidos do hospedeiro (KIEN-SENG *et al.*, 2011).

A HA tem sido amplamente adotada como biomaterial para reparação óssea e regeneração do tecido ósseo, por sua biocompatibilidade, por sua osteocondutividade alta, por não possuir imunogenicidade e não ser inflamatória (BORGES *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007). São diversos os estudos com esse biomaterial, como por exemplo, Vital *et al.*

(2006) observaram que, a regeneração óssea dos animais tratados com HA ocorreu mais cedo do que nos animais do grupo não tratado.

Uma de suas características mais importantes é provavelmente a osteocondutividade, ou seja, funciona como arcabouço para o crescimento ósseo (TRUESSON *et al.*, 2010), entretanto, não apresenta a propriedade de osteoindução (CARLO *et al.*, 2007).

A HA feita a partir de produtos sintéticos HAP tem importantes vantagens devido à sua composição uniforme, elevada biocompatibilidade, segurança geral e o facto de a sua microestrutura ser completamente controlável, incluindo a porosidade e tamanho de poros (SHIGERU *et al.*, 1989; ONO *et al.*, 2000). Ela é utilizada na correção de defeitos ósseos no homem e em várias espécies animais, com bons resultados, de modo que é indicada como alternativa para a enxertia óssea na rotina clínica (REZENDE *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2001; LEGEROS, 2002; VITAL *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2007).

A forma de degradação da HA é mais uma de suas vantagens ocorrendo de forma semelhante à degradação natural do tecido ósseo, por osteoclastos, sugerindo a possibilidade de completa degradação durante o remodelamento normal do osso, o que seria ideal (BORGES *et al.*, 2000; VACCARO *et al.*, 2003).

Dentre suas várias indicações de uso, destaca-se o reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas, oftalmológicas e ortopédicas, como o aumento de rebordo alveolar, a regeneração guiada de tecidos ósseos, a reconstrução bucomaxilofacial; o reparo e substituição de paredes orbitais e a substituição do globo ocular (PINTO *et al.*, 2007). Diversos estudos clínicos e experimentais demonstraram a eficácia da HA na regeneração de defeitos ósseos (BORGES *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2005; VITAL *et al.*, 2006; SAIKIA *et al.*, 2008; BANSAL *et al.*, 2009; GARRIDO *et al.*, 2010).

A policaprolactona (PCL) é um polímero sintético, biocompatível, biodegradável, semicristalino, pertencente à família dos poliésteres poli- α -hidroxil (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Esse polímero possui duas propriedades muito importantes do ponto de vista tecnológico. Boa solubilidade e baixo ponto de

fusão (59-64 °C). Através da solubilidade, pode-se prever se o polímero é capaz de formar filmes pela possibilidade de interação desses com moléculas do solvente, característica importante para a preparação de compósito. O baixo ponto de fusão é uma característica que permite que o polímero seja moldado (BATHISTA e da SILVA, 2003). A biocompatibilidade da PCL tem estimulado sua aplicação na área biomédica (OKADA, 2002) devido à capacidade de desempenhar uma resposta apropriada numa determinada aplicação com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos.

A PCL tem alto grau de cristalinidade e hidrofobicidade (RENTSCH *et al.*, 2010), características que fazem com que ela seja de alta resistência e tempo longo de degradação, portanto, está indicada para implante de longa duração (PUPPI, 2010), cristalinidade essa, que não permite ampla elasticidade (LIPIK *et al.*, 2010). Tem-se observado grande número de investigações do polímero para a engenharia de tecidos, tanto em tecidos moles como em duros, como por exemplo, como matriz para o crescimento vascular e reparação óssea (OKADA, 2002; WANG *et al.*, 2010).

A PCL apresenta propriedades valiosas tais como reabsorção gradual após implantação e resistência mecânica desejável (CHANG *et al.*, 2009).

Pode-se inferir que a degradação da PCL compreende três etapas: a primeira etapa consiste na quebra da cadeia polimérica por hidrólise, que ocorre nas ligações ésteres num processo que não envolve enzimas. Na segunda etapa, formam-se cadeias curtas de oligômeros, o que resulta numa perda de massa molecular da PCL e, a terceira etapa implica na fagocitose da PCL pelos macrófagos (SALGADO 2011). Estudos de degradação usando PCL *in vitro* (solução salina) e *in vivo* (coelho) relataram que a degradação hidrolítica em ambas foram semelhante (LAM *et al.*, 2008).

Vários pesquisadores (SCHANTZ *et al.*, 2003; LAM *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2008; HUTMACHER *et al.*, 2008), analisaram a biocompatibilidade tanto a curto prazo como a longo prazo de matrizes de PCL usando diferentes modelos animais; concluindo haver formação de osso novo no centro das matrizes PCL/sítios do defeito.

Wang *et al.* (2010), relataram que a PCL é eficientemente colonizada por fibroblastos em cultura de células, indicando um potencial de integração com o tecido fibrovascular. Segundo Makarov *et al.* (2010) compósitos contendo PCL apresentaram apoio para a fixação e proliferação de células endoteliais e osteoblásticas.

Com tais vantagens e alguns problemas como sua fragilidade, as cerâmicas como, por exemplo, a hidroxiapatita, são muito utilizadas na formação de compósitos. Em geral, seu desenvolvimento tem por finalidade melhorar as características individuais dos biomateriais ao produzir tais associações (WAN *et al.*, 2009; LIU e WEBSTER, 2010). Por isso, pesquisadores como Xiufeng *et al.* (2009), sugeriram a incorporação de substâncias inorgânicas hidrofílicas como a PCL associada à HA, observando melhora na hidrofiliabilidade do compósito. Kim *et al.* (2004) demonstraram que a associação de HA com PCL possui boas características mecânica e de bioatividade.

A policaprolactona (PCL) que tem sido estudada como matriz para a hidroxiapatita, possibilitando a fabricação de implantes para fixação ortopédica reabsorvíveis, como placas e parafusos (JAYABALAN. 2009) e matrizes para a regeneração do tecido ósseo (ASEFNEJAD *et al.*, 2011). A biocompatibilidade favorável da PCL com os tecidos moles e duros tem incentivado os estudos do uso do polímero no campo da engenharia de tecidos (WANG *et al.*, 2010).

A associação de HA com PCL foi utilizada por Zhao *et al.* (2008), para manter a osteocondução pelo qual o material serve de suporte para a formação do tecido ósseo novo. Além disso, a PCL pode servir como uma camada protetora na fase inicial após implantação *in vivo* sob algumas condições de suporte de carga. Estes autores fizeram ensaios de compressão para investigar a influência da PCL sobre as propriedades mecânicas da HA, mostrando que a dureza do compósito HA/PCL é significativamente melhor quando comparada com a da HA sozinha. Assim, sugeriram que esse compósito pode ser utilizado como substituo ósseo e em sistemas de liberação de drogas.

De forma análoga, medicamentos também são utilizados em associação com a matriz de polímeros e cerâmicas. Um desses medicamentos é o

alendronato (ALO) substância do grupo dos bifosfonatos, amplamente utilizada no tratamento de doenças caracterizadas pela reabsorção óssea (NOBRE *et al.*, 2008). Os bifosfonatos são medicamentos anticatabólicos ou antirreabsortivos que aumentam a massa óssea e reduzem a incidência de fraturas na osteoporose ao inibir a reabsorção óssea (GUAÑABENS e PARES, 2012). Os efeitos do ALO sobre o tecido ósseo podem, em parte, derivar de sua forte afinidade pelo mesmo, possibilitando uma interação direta com osteoblastos, aumentando a formação óssea, e com os osteoclastos diminuindo a reabsorção do osso, através de uma variedade de ciclos bioquímicos (KIM *et al.*, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2009; INOUE *et al.*, 2010; PANZAVOLTA *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

O alendronato (ALO) é um medicamento do grupo dos bifosfonatos, análogos dos pirofosfatos orgânicos, que têm uma grande afinidade pelos cristais de HA (PÉRES *et al.*, 2009). Estas substâncias apresentam em comum, dois grupos fosfóricos em sua estrutura molecular, possuindo grande afinidade pela matriz óssea e capacidade de inibir sua reabsorção (RIBEIRO e VOLPATO, 2005). Ao inibir a ação da farnesil pirofosfato sintetase, o ALO interfere na manutenção da função e viabilidade dos osteoclastos, levando a menor atividade de reabsorção dos osteoclastos e acelerando sua apoptose (BURGOS, 2011; GUERRA *et al.*, 2011).

O alendronato (ALO) é um fármaco que tem provado ser capaz de inibir a reabsorção óssea ao inibir os osteoclastos e também induzir a mineralização do osso recém-formado pelos osteoblastos (INOUE *et al.*, 2010; PANZAVOLTA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Xiong *et al.* (2009) observaram que o uso de alendronato aumentou significativamente o número de células semelhantes a osteoblastos (linha celular MG-63 obtida da American Type Culture Collection (ATCC), constituída por células osteoblásticas procedentes de um osteossarcoma humano) com relação ao controle. Observaram, também, que a fosfatase alcalina, a expressão gênica da proteína morfogênica óssea tipo 2, o colágeno tipo 1 e a osteocalcina aumentaram. Concluíram que, além de inibir a reabsorção óssea

pelos osteoclastos, ele também promoveu a proliferação e maturação de osteoblastos.

Álvarez e Curiel (2010), em seu trabalho sobre o tratamento da osteoporose com bisfosfonatos, afirmam que tem um efeito positivo sobre a massa óssea e os níveis de diminuição de marcadores da remodelação óssea.

Fernandes *et al.* (2004) relataram que a aplicação local do alendronato com hidroxiapatita não interferiu na reparação óssea. Autores como Rodriguez *et al.* (2009) e Agholme *et al.* (2012) demonstraram que a associação de alendronato com hidroxiapatita acelerou o processo de reparação óssea. Rentsch *et al.* (2010), utilizando a associação PCL e ALO, relataram maior afinidade pela superfície óssea, em comparação com a utilização da PCL sozinha, diminuindo assim a reabsorção e aumentando a formação de osso.

Toker *et al.* (2012), relataram que o ALO aumenta a formação de osso novo em defeito ósseo craniano no rato, sugerindo que a inibição da atividade osteoclástica permite um aumento da taxa de aposição óssea.

Assim, Fernandes *et al.* (2004) analisaram a associação do ALO com a HA pura granular na reparação de defeitos ósseos. Estes autores observaram neoformação óssea, maturação e remodelação, concluindo que essa associação é bioativa, osteocondutora, com excelentes propriedades mecânicas e com características antirreabsortivas.

Em um estudo *in vitro* com a associação da PCL, HA e ALO, como potencial de utilização para a reparação óssea, foi observada elevada formação de tecido ósseo, podendo ser utilizada no reparo ósseo (CHEN *et al.*, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesse experimento, foram utilizados dois compósitos e um polímero. O compósito foi fabricado com uma mistura de hidroxiapatita sintética HAP-91 (HA)¹, policaprolactona (PCL) e alendronato (ALO). O compósito I foi formado por 49,5% de HA, 49,5% de PCL e 1% de ALO e o compósito II foi constituído por 50% de HA e 50% de PCL. O polímero utilizado foi a PCL.

As normas de conduta para o uso de animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV foram seguidas rigorosamente. O projeto foi encaminhado para Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa e aprovado sob o protocolo número 309-2011.

Para este projeto foram utilizados 36 coelhos da raça Nova Zelândia, esqueleticamente maduros à confirmação por imagem radiográfica, pesando entre 2,5 e 3 kg, separados em quatro grupos de nove animais. Os animais receberam ivermectina, na dose de 0,4 mg/kg pela via subcutânea, foram alojados em gaiolas individuais recebendo ração uma vez no dia e água *ad libitum* e tiveram um período de três meses para aclimatação ao novo ambiente.

Antes da cirurgia os animais receberam, enrofloxacina² 10 mg/kg pela via intramuscular, em seguida foram sedados com acepromazina³ na dose de 0,25 mg/kg pela via subcutânea e anestesiados com associação de tiletamina-zolazepam⁴, na dose de 28 mg/kg, pela via intramuscular. O membro torácico direito, desde a região proximal da diáfise do úmero até o carpo, foi tricotomizado e desengordurado com éter. Após serem posicionados em decúbito lateral esquerdo, foi realizado bloqueio anestésico do plexo braquial com 1,5 ml de lidocaína⁵ 2%. O preparo do campo operatório foi feito com povidine tópico, sendo isolado com faixa esterilizada e delimitado com panos de campo apropriados.

¹ HAP91®- JHS Laboratorio Quimico.Sabará-MG.Br

² Flotril 2.5% ®- intervet. Cruzeiro – Sp.Br

³ Acepran®- vetnil. Louveira-Sp.Br

⁴ Zoletil®- virbac .São Paulo- Sp.Br

⁵ Xylestesin®- cristalia. São Paulo- Sp.Br

Foi realizada incisão curva de pele de aproximadamente 3 cm de comprimento na superfície lateral da articulação úmero rádio-ulnar e o afastamento das fâscias musculares. Uma incisão reta de aproximadamente 3 cm de comprimento foi realizada na bolsa tricipital, expondo, assim, a superfície lateral do olecrano. Com o auxílio de um trépano manual de 5 mm de diâmetro, uma falha óssea foi realizada na cortical lateral do olecrano direito (Figura. 1A), de cada animal. A diluição de 250 mg dos compósitos, que estavam em pó, foi realizada em 1ml de solução salina 0,9%, no momento da cirurgia, de acordo com cada tratamento. A finalidade de tal diluição foi a de se obter um material de consistência pastosa capaz de ser introduzido de modo a preencher o defeito realizado na cortical do olecrano e permanecer no mesmo (Figura. 1B). Os animais do grupo HA+PCL+ALO receberam o compósito I, os animais do grupo HA+PCL receberam o compósito II, os animais do grupo PCL receberam o biomaterial PCL, e os animais do grupo controle não receberam tratamento no lugar do defeito, apenas solução salina 0.9%.

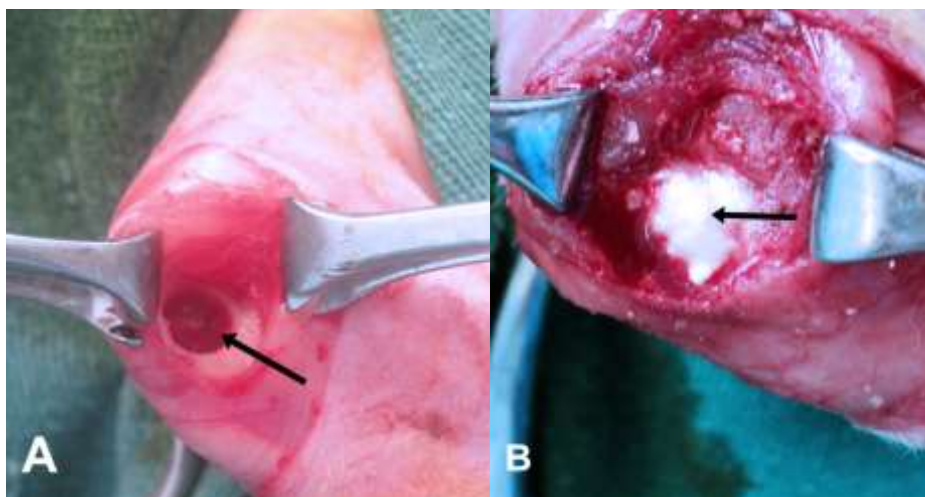


Figura 1. Procedimento cirúrgico para a realização do defeito experimental no olecrano de coelho. A. defeito ósseo no olecrano direito de coelho (seta preta). B. defeito ósseo preenchido com compósito (seta preta).

A bolsa tricipital, o tendão do músculo tríceps braquial e parte lateral da cabeça do músculo tríceps braquial foram aproximados em um só plano com sutura em padrão simples contínuo e em seguida a pele com o mesmo padrão,

ambos utilizando fio de náilon (4-0)⁶. No pós-operatório, os animais receberam duas doses de morfina⁷ (1mg/kg) via subcutânea com intervalo de 12 horas entre aplicações. Os animais foram avaliados clinicamente quanto claudicação, sensibilidade dolorosa, deiscência e infecção, nos dias dois, quatro e oito após cirurgia. E quanto edema no dia da cirurgia e nos dias dois, quatro e oito após cirurgia.

O grau de claudicação foi avaliado de acordo com o apoio da extremidade do membro. Para tal, cada animal foi retirado da gaiola e deixado no chão da coelheira por 5 minutos, durante cada período de observação, sendo aplicado os escores: 0 - sem claudicação, 1 - apoio com claudicação, 2 - ausência completa de apoio. A ferida cirúrgica foi avaliada quanto à sensibilidade dolorosa, deiscência e infecção. A sensibilidade dolorosa foi avaliada mediante a reação do animal ao toque da ferida cirúrgica e flexão e extensão da articulação umeroradioulnar, atribuindo-se os escores: 0 - quando não existiu qualquer manifestação do animal, 1 - reação de dor sem retração do membro e 2 - retração do membro associada à vocalização ou tentativa de fuga. A deiscência da sutura foi avaliada em presente ou ausente assim como a infecção da ferida cirúrgica, pela presença ou não de secreção purulenta no sítio cirúrgico, seguindo o modelo proposto por Carlo *et al.* (2010).

A avaliação estatística para as variáveis claudicação, sensibilidade dolorosa, deiscência da sutura e infecção, consistiu na comparação entre os dias dois, quatro e oito pós-cirurgia em relação ao tempo e entre os grupos em cada uma das datas. Utilizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$. Para avaliar a presença de edema, mediu-se a circunferência da articulação umeroradioulnar utilizando-se uma fita métrica. Esse procedimento foi realizado nos dias um (dia da cirurgia), dois, quatro e oito após a cirurgia. A avaliação estatística consistiu na comparação dos dados entre os tempos de observação de cada grupo utilizando-se o teste de Tukey. Para a comparação entre os grupos em cada data, utilizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

⁶ Shalon®- São Luis de Montes Belos.GO. Br

⁷ Dimorf®- cristalina. São Paulo- Sp. Br

Imediatamente após a cirurgia e nos dias oito, 45 e 90 pós-cirúrgico foram realizadas duas radiografias do membro, a primeira na posição mediolateral, com articulação umeroradioulnar flexionada e a segunda com o feixe de raios X incidindo de forma tangencial ao olecrano. Nesta última projeção radiográfica, o animal foi posicionado em decúbito dorsal com o úmero paralelo a mesa e articulação umeroradioulnar em total flexão. As radiografias foram analisadas observando a radiopacidade do defeito em comparação com a radiopacidade do osso adjacente e a delimitação das bordas do defeito. Foram confeccionados esquemas em folhas transparentes que foram sobrepostas às radiografias permitindo melhor definição das amostras (Figura 2). Esses esquemas tiveram como resultado a definição de quatro quadrantes, permitindo um melhor análise de cada quadrante, caracterizando se a radiopacidade em menor, semelhante e maior a do osso adjacente e a margem podia ser facilmente delimitada ou não, ou seja, se o limite do defeito podia ser distinguido. A radiografia mediolateral de cada membro obtido no pós-operatório imediato foi sobreposta a radiografia correspondente aos oito, 45 e 90 dias.

As radiografias tangenciais ao olecrano foram utilizadas para observação de deposição de tecido ósseo na superfície periosteal. A técnica radiográfica foi padronizada para a distância de um metro da fonte de emissão dos raios X ao filme radiográfico, com 45 Kv, 100 mA e 0,09 segundos para a projeção tangencial e 45 Kv, 100 mA e 0,07 segundos para a projeção mediolateral.

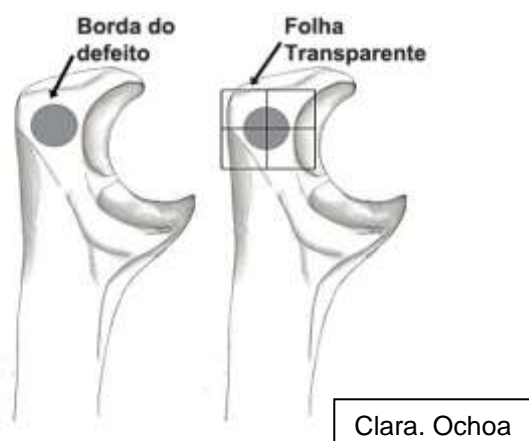


Figura 2. Representação da análise radiográfica. Esquema da radiografia mediolateral do defeito ósseo, com a divisão em quadrantes em transparência em sobreposição para divisão dos quadrantes.

Aos oito, 45 e 90 dias após a cirurgia, três animais de cada grupo foram eutanasiados para a coleta do olecrano, que foi dissecado e separado da ulna com o auxílio de uma serra manual. Em seguida, foi coletado o fragmento do defeito ósseo que foi então, fixado em formol 10% e processado segundo técnicas histológicas de rotina, sendo descalcificado em solução de ácido fórmico e citrato de sódio, desidratado em soluções crescentes de álcool, diafanizado em xilol e incluído em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação e corados em hematoxilina e eosina. As lâminas foram fotografadas no aumento de 100x por câmera Olympus SC20 acoplada a um microscópio ótico Olympus CX31 e software AnalySIS getIT versão 5.1. Foram fotografados três campos do defeito.

As imagens foram analisadas no programa ImageJ versão 1.45s e os seguintes parâmetros foram obtidos por planimetria por contagem de pontos: biomaterial e osso. Para tal, uma grade de 9 colunas e 7 linhas foi sobreposta a cada imagem totalizando 63 pontos de interseção. Foram contabilizados os pontos coincidentes com cada parâmetro em cada campo de observação. Os valores obtidos foram somados e convertidos para porcentagem dividindo-os pelo número total de pontos contabilizados.

Para as variáveis obtidas na análise histomorfométrica (biomaterial e osso), que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, utilizou-se ANOVA 2-Way, sendo consideradas variáveis independentes o tratamento (PCL+HA+ALO; PCL+HA; PCL e Controle) e o momento da coleta (8, 45 e 90 dias). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado quando as premissas da ANOVA não se cumpriram. Em caso de $p < 0,005$, o teste de Holm-Sidak foi utilizado como *post-hoc*. 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. Exame clínico

O parâmetro dor não foi observado em nenhum animal dos grupos PCL+HA+ALO e controle. Já nos grupo PCL+HA e PCL, um animal de cada grupo apresentou dor ambos em grau 1, no primeiro dia após a cirurgia, não sendo observada diferença com $p>0,05$ entre os grupos. Esse resultado foi similar ao encontrado por Carlo *et al.* (2010), que trabalhando com compósito de hidroxiapatita e polihidroxibutirato em defeitos ósseos provocados no olecrano de coelhos, não observaram a presença de dor.

Nos grupos PCL+HA+ALO e controle observou-se deiscência da ferida em um animal de cada grupo. Já no grupo PCL+HA, três animais apresentaram deiscência da ferida e no grupo PCL não foi observado esse parâmetro. Não houve diferença com $p>0,05$ entre os grupos. A deiscência pode ser interpretada como possível incompatibilidade de um material, mas como não houve diferença entre os grupos tratados e o controle, acredita-se que a sua presença foi em consequência da interferência daqueles animais, por condições individuais do comportamento, mesmo com toda a padronização do experimento, como sugerido por Fontes (2009) e Carlo *et al.* (2010). Não foi observada a presença de infecção em nenhum animal durante o experimento.

Foi observada claudicação nos quatro primeiros dias após a cirurgia, predominantemente de grau 1, de forma semelhante nos grupos PCL+HA+ALO, PCL e controle com três observações grau 1 e uma observação grau 2 em cada um deles. Seis animais do grupo PCL+HA apresentaram claudicação grau 1 e em um animal observou-se grau 2. Esse animal apresentou claudicação nas diferentes datas, observação justificada pela presença de fratura na região do olecrano onde foi realizado o defeito. Resultados similares foram relatados por Carlo *et al.* (2010), que também relataram fratura de olecrano em um animal. A análise estatística revelou não haver diferença para esse parâmetro ($p>0,05$), portanto, sugere-se que a sua presença se deva a uma variação na técnica, com a realização do defeito muito

próximo a margem caudal do olecrano o que levou a fratura na região do olecrano onde foi realizado o defeito e não aos tratamentos.

Como não foram observadas diferenças significativas para as variáveis dor, deiscência, infecção e claudicação entre os grupos, acredita-se que os sinais clínicos observados ocorreram devido ao próprio ato cirúrgico e não devido aos compósitos ou ao polímero utilizado.

Para a variável edema, existiu diferença significativa entre os valores de circunferência do membro no dia 1 e 8 dentro de todos os grupos (Tabela 1), indicando a existência de edema na primeira semana pós-cirurgia, possivelmente devido a manipulação dos tecidos no ato cirúrgico. Imediatamente após o trauma, ocorre a formação de um hematoma. A lesão inicia uma resposta inflamatória levando ao recrutamento de células que são necessárias para o processo de cicatrização (GERSTENFELD *et al.*, 2003). Junto com o edema não ocorreu manifestação como, fístulas ou exsudados purulentos, sugerindo-se, assim, a biocompatibilidade destes produtos.

Tabela 1. Medias e desvio padrão das diferenças dos valores de circunferência (cm) dos membros, após a realização de defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos e a implantação ou não de biomaterial

Grupos Dias	PCL+HA+ALO	PCL+HÁ	PCL	Controle
1	8,83 ± 0,61 B	8,72 ± 0,36 C	8,55 ± 0,68 B	8,61 ± 0,48 B
2	9,05 ± 0,60 AB	8,82 ± 0,41 BC	8,83 ± 0,55 AB	8,84 ± 0,46 AB
4	9,25 ± 0,52 AB	9,38 ± 0,33 AB	9,11 ± 0,33 AB	9,83 ± 0,75 AB
8	9,83 ± 0,55 A	9,71 ± 0,65 A	9,88 ± 0,48 A	9,55 ± 0,63 A

* Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem pelo teste de Kruskal- Wallis com $p < 0,05$.

Observou-se que todos os animais apresentaram evolução clínica satisfatória, sem alterações que pudessem ser atribuídas aos biomateriais utilizados. Não ocorreu manifestação que demonstrasse reações locais associadas à rejeição do implante, tais como, fístulas ou exsudados purulentos, sugerindo-se, assim, a biocompatibilidade destes produtos, esse resultado foi similar aos resultados relatados por Azevedo *et al.* (2012), que trabalhando com hidroxiapatita na regeneração de tecido ósseo em coelhos, nenhum animal apresentou sinais de rejeição aos enxertos, comprovando a característica de biocompatibilidade

3.2. Análise radiográfica

As radiografias obtidas no pós-operatório imediato se caracterizaram nos grupos tratados PCL+HA+ALO e PCL+HA com bordas do defeito delimitadas e radiopacidade semelhante a do osso adjacente em vários pontos dos quadrantes, devido à utilização de compósitos que possuem um elemento radiopaco. Os pontos radiopacos foram justificados pela presença da HA no compósito, a qual possui alto PM, como o visto por Borges *et al.* (2000), Vital *et al.* (2006), Duarte *et al.* (2006) e Carlo *et al.* (2010) ao utilizar a HA (Figura 3A e B). Nos grupos PCL e controle, observou-se a borda do defeito bem delimitada e radiopacidade menor do que a do osso adjacente, uma vez que os tecidos de preenchimento do defeito, provavelmente, não possuem elementos químicos radiopacos (Figura 3C e D). Segundo Fehlberg (2001), em todo processo de reparação óssea, desenvolve-se, inicialmente, tecido conjuntivo no foco da lesão, cuja radiopacidade é insuficiente para ser perceptível ao exame radiográfico, pelo fato de os constituintes químicos do tecido neoformado serem de baixo número atômico.

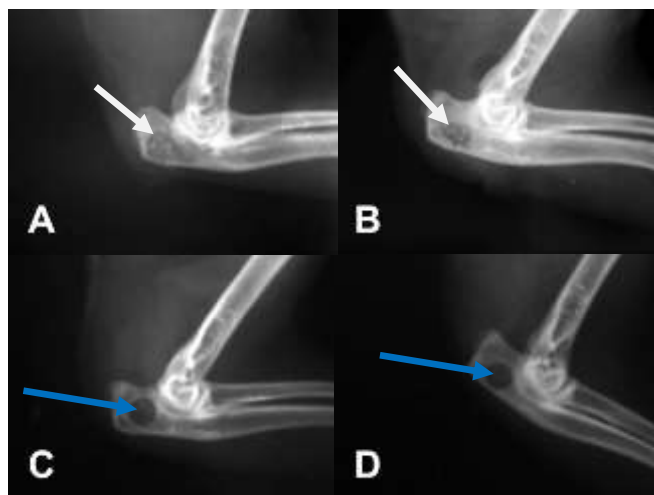


Figura 3. Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido a realização de defeito na cortical lateral e implantação ou não de compósitos, no dia da cirurgia. A- PCL+HA+ALO, B- grupo PCL+HA, C- grupo PCL, D- grupo controle. Setas brancas indicam pontos de radiopacidade semelhante a do osso adjacente. Setas azuis indicam região de radiopacidade menor a do osso adjacente.

Aos oito dias após a cirurgia os aspectos radiográficos dos defeitos de todos os grupos foram semelhantes aos do pós-operatório imediato, ou seja,

sem alterações na radiopacidade ou na delimitação das bordas do defeito e ausência de reação periosteal (Figura 4). Em um animal do grupo PCL+HA foi diagnosticada fratura do olecrano.

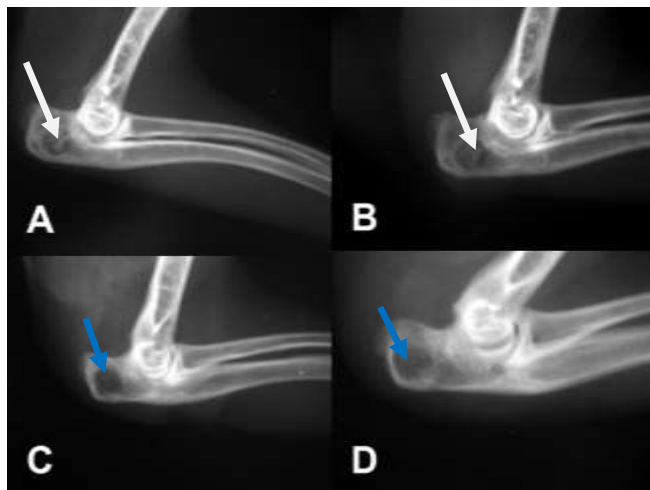


Figura 4. Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação ou não de compósitos, aos 8 dias. A- PCL+HA+ ALO, B- grupo PCL+HA, C- grupo PCL, D- grupo controle. Setas brancas indicam pontos de radiopacidade semelhante a do osso adjacente. Setas azuis indicam região de radiopacidade menor a do osso adjacente.

No grupo PCL+HA+ALO e aos 45 dias, encontrou-se em 75% dos quadrantes radiopacidade semelhante a do osso adjacente (Tabela 2) com bordas de difícil delimitação (Figura 5A), sugerindo um possível crescimento ósseo. No grupo PCL+HA aos 45 dias, O defeito estava parcialmente preenchido por tecido radiopaco, sugerindo a formação de tecido ósseo, observou-se radiopacidade semelhante a do osso adjacente em 75% dos quadrantes (Tabela 2), com bordas de difícil delimitação (Figura 5B). Em apenas um animal observou-se reação periosteal (animal desse grupo) provavelmente em consequência da presença de fratura do olecrano diagnosticada na data de oito dias. Carlo *et al.* (2010) também diagnosticaram fratura de olecrano em coelho, sugerindo que essa reação periosteal poderia ser apenas a ativação do periósteo para a formação de tecido ósseo, sem indicio de reação inflamatória ou neoplasia.

O grupo PCL, aos 45 dias, não revelou aumento evidente da radiopacidade na região do defeito, com bordas de fácil delimitação (Figura

5C). No grupo controle aos 45 dias, foram evidentes as bordas do defeito, com radiopacidade menor a do osso adjacente (Figura 5D) como o visto por Carlo *et al.*(2010) que observaram radiopacidade menor que a do osso adjacente na maioria dos quadrantes. Esses achados sugerem que, nessa data de observação, os grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA apresentaram melhor resultado por terem maior porcentagem de quadrantes com radiopacidade semelhante a do osso adjacente e bordas de difícil delimitação em comparação aos grupos PCL e controle. Azevedo *et al.* (2012), Vital *et al.*(2006) e Miranda *et al.*(2005), descreveram na hidroxiapatita característica para favorecer o processo de cicatrização óssea mais rápida.

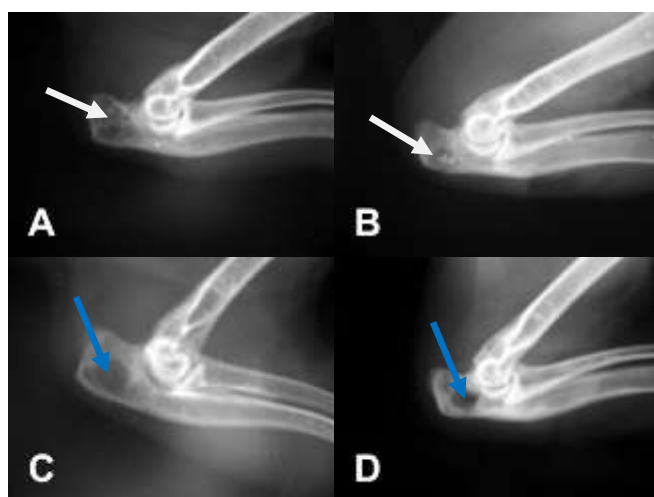


Figura 5. Radiografias mediolaterais do olécrano de coelho submetido a realização de defeito na cortical lateral e implantação ou não de compósitos, aos 45 dias. A. PCL+HA+ALO. B. grupo PCL+HA. C. grupo PCL. D. grupo controle. Setas brancas indicam radiopacidade semelhante a do osso adjacente. Setas azuis indicam região de radiopacidade menor a do osso adjacente.

Nos grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA aos 90 dias, notou-se radiopacidade semelhante a do osso adjacente em 100% dos quadrantes (Tabela 2) com bordas que não podiam ser delimitadas (Figura 6A e B). No grupo PCL aos 90 dias, pôde-se notar aumento da radiopacidade no lugar do defeito. O aumento de radiopacidade do defeito deve-se, provavelmente, a formação óssea que ocorreu no local. Neste grupo as bordas do defeito foram dificilmente delimitadas (Figura 6C), diferentemente de Schantz *et al.* (2003) que, com a utilização da PCL, em defeitos de 15 mm em calvarias de coelhos, relataram bordas facilmente delimitadas devido a menor radiopacidade no lugar

do defeito Isto pode ter ocorrido pelo menor tamanho do defeito do presente trabalho o que poderia ter influenciado em uma melhor resposta. No grupo controle ainda foram observados pontos com radiopacidade menor a do osso adjacente e bordas de fácil delimitação (Figura 6D).

Tabela 2. Porcentagem de quadrantes que apresentam pontos de radiopacidade semelhante a do osso adjacente em radiografias realizadas aos 8, 45 e 90 dias após a realização de defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos e implantação ou não de compósito ou polímero.

Grupos	Dias	% de quadrantes
Controle	8	0
	45	25
	90	83.3
PCL	8	0
	45	16.6
	90	100
PCL+ HA	8	50
	45	75
	90	100
PCL+ HA+ ALO	8	33
	45	75
	90	100



Figura 6. Radiografias mediolaterais do olecrano de coelho submetido à realização de defeito na cortical lateral e implantação ou não de compósitos, aos 90 dias. A. PCL+ HA+ALO. B. grupo PCL+HA. C. grupo PCL. D. grupo controle. Seta branca indica borde do defeito de fácil delimitação.

4.3. Análise histológica e histomorfométrica

No oitavo dia do pós-cirúrgico, os animais do grupo controle apresentaram as bordas do defeito facilmente identificáveis, com início de formação de osso trabecular partindo dele, osso esse organizado, seguido por um grande número de trabéculas ósseas novas e muitas hemácias,

entremeadas por tecido conjuntivo denso vascularizado, resultados similares a Carlo *et al.* (2010) e descritos como um processo normal de reparação óssea. O início de formação de trabéculas ósseas foi caracterizado por trabéculas finas, rodeado por um grande número de osteoblastos ativos que se dispunham ordenadamente ao redor das trabéculas; concordando com Fernandes *et al.* (2004) e Vital *et al.* (2006), onde descreveram as trabéculas bem delimitadas, com aspecto imaturo e presença de osteócitos volumosos situados no interior de amplas lacunas. No grupo PCL, foi visível observações muito semelhantes a do grupo controle, com formação de osso trabecular partindo das bordas do defeito, seguido de intensa formação de trabéculas novas, osteoblastos ativos e hemácias evidenciando grande aporte sanguíneo para a área, o que é um fator importante nos processos de reparação óssea. Vários autores relataram pouca participação da PCL nas atividades de reparação óssea, devido à ausência de integração com o tecido ósseo (SAWYER *et al.*, 2009; XIUFENG *et al.*, 2009; ERDEMLI *et al.*, 2010; WOODRUFF e HUTMACHER, 2010). Foi também observada a presença do polímero nas amostras, contudo, sem um contato direto com o tecido ósseo, achados similares aos de Rentsch *et al.* (2009) que não relataram ligação direta da PCL com o tecido ósseo.

No grupo PCL+HA+ALO e PCL+HA, aos oito dias de pós-operatório, observaram-se as bordas do defeito facilmente identificáveis, partindo delas trabéculas ósseas que se mostravam imaturas e delicadas, por vezes se anastomosavam, sendo circundadas por osteoblastos grandes e volumosos. Entre as trabéculas, observava-se a presença de amplos espaços medulares, eritrócitos e plaquetas. Foi observada a presença de biomaterial envolto ao tecido recém-formado perto das bordas do defeito (Figura 7). Nestas amostras observou-se também formação de trabéculas novas no centro do defeito. Boer *et al.* (2003) utilizando HA, relataram resultados similares com formação de trabéculas ósseas no centro do defeito. Nesse experimento, como no grupo PCL não apresentou trabéculas no centro do defeito, pode-se inferir que os resultados encontrados nos grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA, sejam em consequência da presença da hidroxiapatita.

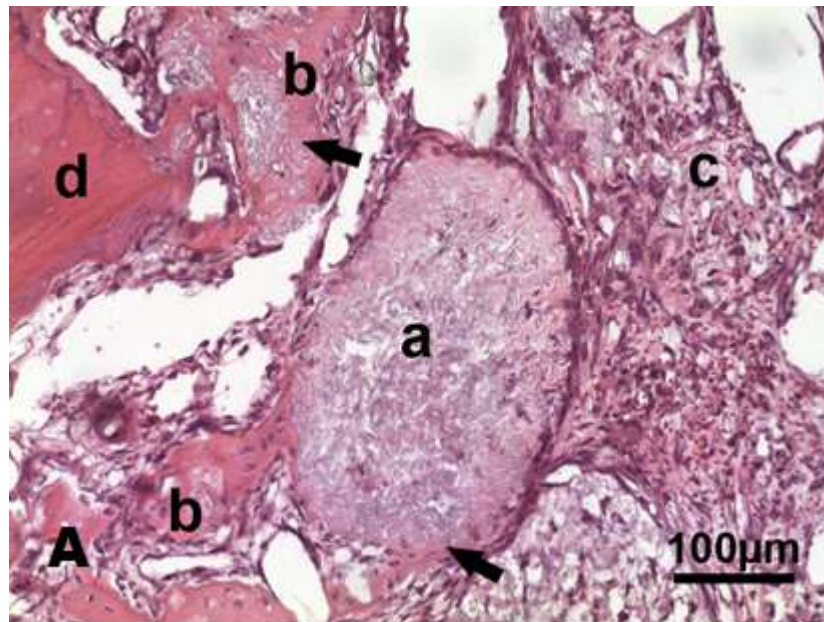


Figura 7 Região do defeito realizado no olecrano de coelho, onde foi implantado o compósito HA+PCL+ALO. A. 8 dias após cirurgia. Biomaterial (a), osso recém-formado (b), matriz provisória (c) e borda do defeito (d).

Aos 45 dias no grupo controle, uma quantidade maior de tecido ósseo foi observada, com trabéculas evidentemente mais organizadas e osteoblastos ativos. A borda do defeito ainda podia ser delimitada. Neovascularização e trabéculas novas partindo da borda do defeito, foram vistas em um processo de reparação similar ao observado por Davies e Baldan (1997) e Walsh *et al.* (2003).

No grupo PCL aos 45 dias, as observações foram semelhantes as do grupo controle, evidenciando neovascularização, trabéculas novas partindo da borda do defeito e tecido ósseo mais organizado. Isso demonstra que a formação de osso novo no grupo PCL é comparável com processo normal de reparação óssea, concordando com Lam *et al.* (2008), que revelaram em suas amostras *in vivo*, em defeitos no osso craniano de coelhos, com a utilização de PCL, uma formação de tecido ósseo, sem reações adversas dos tecidos hospedeiros. Já Erdemli *et al.* (2010) com a implantação da PCL fabricada na forma de discos de 5 mm, na região proximal do úmero de coelhos, aos 50 dias, observaram ausência da atividade das células ósseas, sugerindo em seus

resultados que tal fato é influenciado pela forma de processamento da PCL e fabricação do implante.

Nos grupos HA+PCL+ALO e PCL+HA (Figura 8A e B) aos 45 dias, as observações foram semelhantes, com formação óssea, diferenciação de osso trabecular em osso lamelar, no entanto, ainda foi encontrado osso trabecular não remodelado. Notou-se formação de trabéculas que se continuava na interface compósito e tecido ósseo, sugestivo de osseointegração, representada pela figura 9 no grupo HA+PCL+ALO. Nos grupos HA+PCL+ALO e HA+PCL aos 45 dias, observou-se maior formação óssea ao redor dos compósitos, fato comprovado pelos resultados radiográficos.

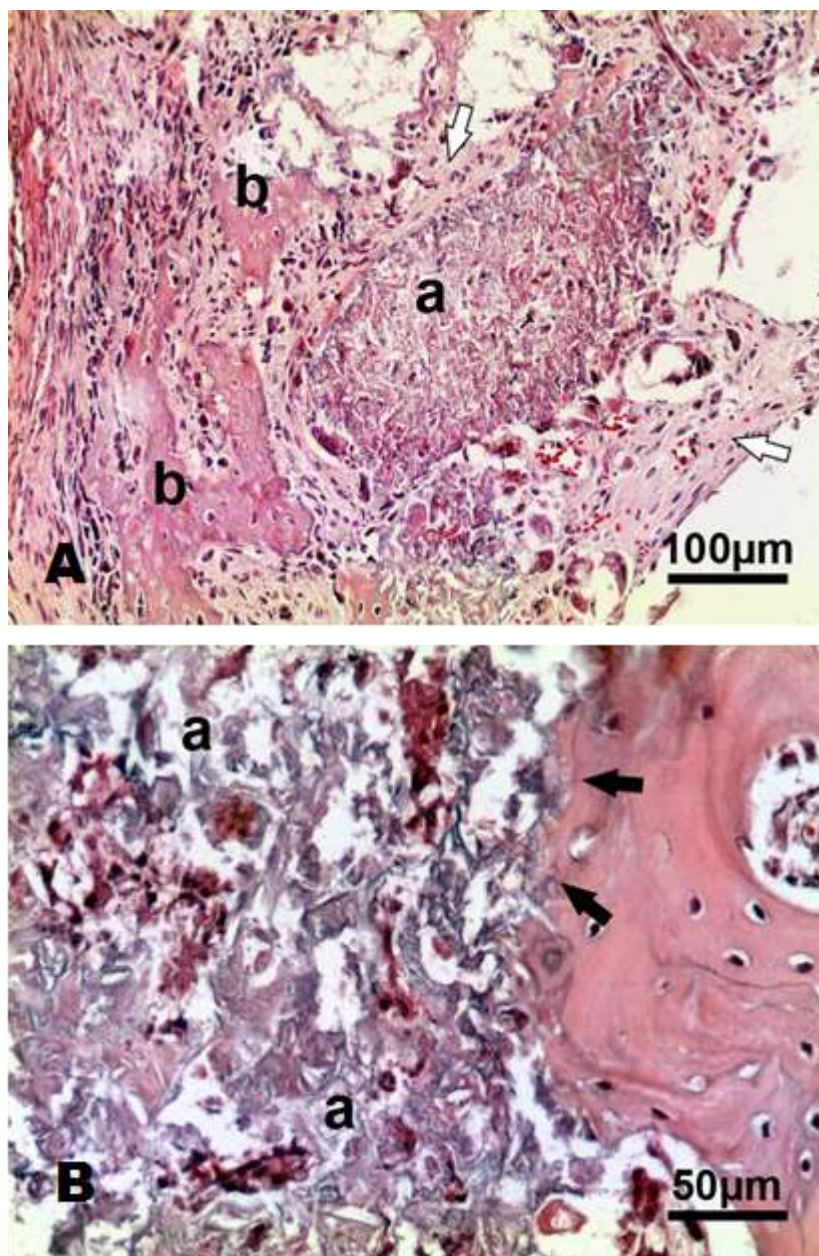


Figura 8. Região do defeito realizado no olecrano de coelho, onde foi implantado o compósito HA+PCL. A. 8 dias após cirurgia, (a) Biomaterial. (b) Osso recém-formado. (Seta branca) Matriz provisória. B. 45 dias após cirurgia. Interface de osseointegração (Seta preta).

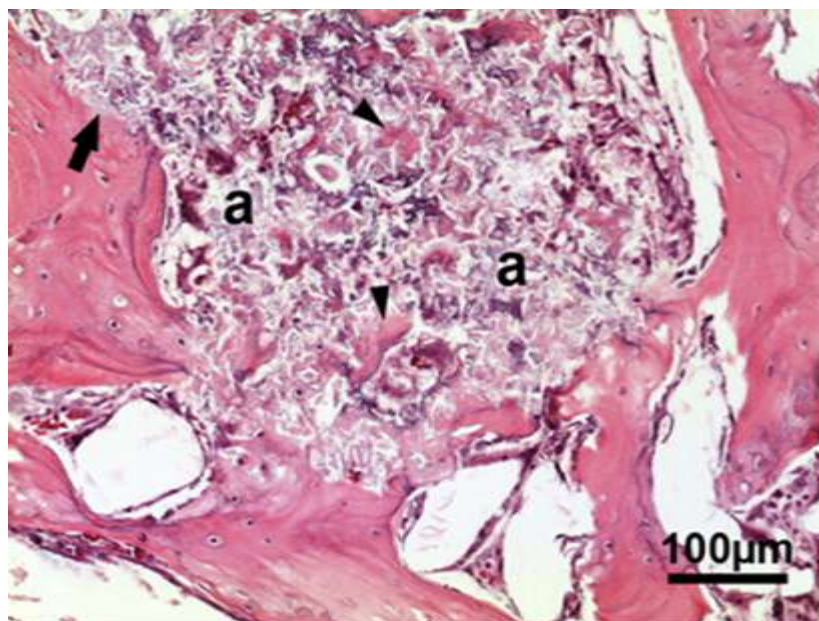


Figura 9. Região do defeito realizado no olecrano de coelho, onde foi implantado o compósito HA+PCL+ALO. 45 dias após a cirurgia. Biomaterial (a), interface de osseointegração (Seta preta) e formação óssea (Cabeça da seta preta).

No dia 90 no grupo controle, a cortical lateral tinha sido restabelecida quase em sua totalidade, junto com a maturidade do osso trabecular adjacente. A periferia do defeito foi preenchida por osso lamelar e apenas o centro apresentou osso trabecular associado a medula óssea. No grupo PCL, as bordas do defeito tinham sido reestabelecidas, sendo o defeito preenchido por tecido ósseo lamelar e parcialmente trabecular. Estes resultados diferem de Schantz *et al.* (2003) com a utilização de PCL. Entretanto, os tamanhos dos defeitos foram diferentes, onde os autores utilizaram um defeito de tamanho crítico. Nessa pesquisa, como o diâmetro do defeito foi menor, acredita-se o maior preenchimento de tecido ósseo foi em consequência desse fato. As observações vistas com a utilização da PCL demonstraram que é compatível com ambiente fisiológico, uma vez que o tecido ósseo pode ser regenerado na sua presença, resultados similares a Okada (2002), Schantz *et al.* (2003), Sun *et al.* (2006), Hutmacher e Woodruff (2008), Xiufeng *et al.* (2009) e Wang *et al.* (2010).

Já no grupo PCL+HA aos 90 dias, a periferia do defeito foi totalmente preenchida por osso lamelar e apenas o centro apresentou osso trabecular. Foi observada a presença de compósito em contato direto com tecido ósseo e na

sua interface predominantemente tecido ósseo trabecular organizado. Ao comparar o grupo PCL+HA com o grupo PCL, percebeu-se que a formação de osso novo com intensa atividade de osteoblastos e a neovascularização foram mais evidentes na presença da hidroxiapatita. Segundo Jensen *et al.* (1996) e De Vicente *et al.* (2000), a hidroxiapatita funciona como um suporte para a migração de células osteoprogenitoras originadas no receptor e nos túneis vasculares, permitindo a aposição óssea. Acredita-se que no grupo PCL+HA houve uma melhor resposta na interação com o tecido ósseo em comparação com o grupo PCL ao longo do experimento, resultados similares aos de Kim *et al.* (2004).

No grupo PCL+HA+ALO, observou-se osso compacto caracterizado pela presença de grandes quantidades de trabéculas ósseas maduras e interconectadas com osso periférico, cavidades medulares de menor tamanho, além da presença de biomaterial com tecido ósseo ao redor dele (Figura 10). Neste mesmo grupo foi observada a formação de tecido ósseo na superfície periosteal, fato encontrado também por Fernandes *et al.* (2004) ao utilizar ALO. Sugere-se que este achado pode ter ocorrido pela presença do ALO.

Aos 90 dias de pós-operatório, os achados histológicos mostraram um tecido ósseo mais desenvolvido nos grupos PCL+HA+ALO, PCL+HA e PCL do que no grupo-controle.

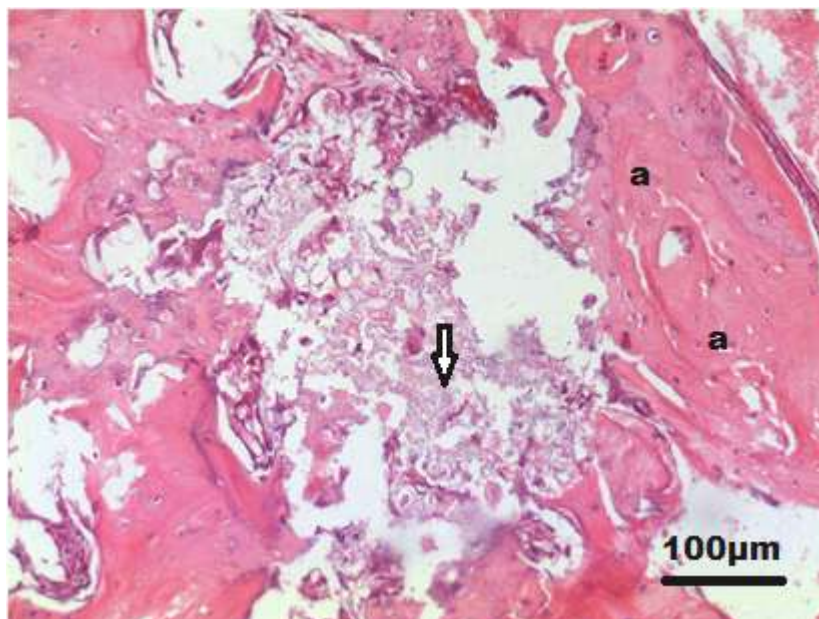


Figura 10. Região do defeito realizado no olecrano de coelho, onde foi implantado o compósito HA+PCL+ALO. 90 dias após cirurgia. Biomaterial (Seta branca), tecido ósseo ao redor do biomaterial (a).

Durante todo o período do experimento não foram vistas a presença de células gigantes, nem evidências de infecção pós-cirúrgica, sugerindo biocompatibilidade dos constituintes dos grupos PCL+HA+ALO, PCL+HA e PCL, corroborando com os dados clínicos.

Na análise histomorfométrica, pode-se observar a formação de tecido ósseo no lugar do defeito para todos os grupos nas distintas datas de avaliação, ou seja a formação de tecido ósseo logo depois a realização do defeito. Analisando os dados e comparando os grupos, não houve diferença significativas (Tabela 3).

Tabela 3. Medianas para variável osso segundo o tratamento e a data de avaliação histomorfométrica

Grupo		Mediana
PCL+HA+ALO	8	0,229 a
	45	0,407 a
	90	0,476 a
PCL+HA	8	0,217 a
	45	0,444 a
	90	0,386 a
PCL	8	0,360 a
	45	0,344 a
	90	0,481 a
controle	8	0,159 a
	45	0,455 a
	90	0,434 a

As diferenças nos valores de medianas entre os grupos não tem diferença significativa.

No presente experimento não foi observado absorção dos biomateriais por ação celular como citado por Borges *et al.* (2000) ou degradação por dissolução química como citado por White e Shors (1986). Mas este fato não é suficiente para descartar a biodegradação dos biomateriais, uma vez que houve crescimento ósseo dentro do defeito ósseo, onde anteriormente era preenchido por biomaterial. Além disso, as controvérsias relacionadas à biodegradação de PCL, HA e ALO encontradas em vários experimento (BARROS *et al.*, 2006; LAM *et al.*, 2008; CARLO *et al.*, 2009; ÁLVAREZ *et al.*, 2010; ERDEMLI *et al.*, 2010; SALGADO, 2011) podem ser justificadas pela diferença das características físicas dos biomateriais.

Vários fatores provavelmente influenciam a resposta dos tecidos a PCL, HA e ALO dentre outros se destacam o tamanho do biomaterial, a estrutura física, o processo de fabricação e a via de aplicação.

Jessen *et al.*(1996), afirmam que o substituto ósseo ideal, além de outras características como osseointegração, biocompatibilidade e biofuncionalidade deve manter seu volume na fase inicial de regeneração óssea e então ser totalmente absorvido. No presente experimento, a PCL, a HA e o ALO não haviam desaparecido completamente no final do experimento (Tabela 4). Provavelmente o recorte temporal não foi suficiente para que ocorresse a degradação completa dos produtos utilizados, embora existisse diferença significativa do grupo PCL+HA+ALO e PCL. Tal fato pode estar associado ao

processamento das laminas com menor afinidade da PCL pela hematoxilina e eosina o que poderia ter levado a sua menor observação.

Tabela 4. Médias e desvio padrão para variável biomaterial segundo o tratamento e a data de avaliação histomorfométrica

Grupos	Dias	Media	Desvio padrão
PCL	8	0,01	0,01 A
	45	0,06	0,03 A
	90	0,01	0,01 A
PCL+ HAP-91	8	0,06	0,03 AB
	45	0,09	0,06 AB
	90	0,07	0,02 AB
PCL+HAP-91+ALO	8	0,14	0,08 B
	45	0,13	0,09 B
	90	0,08	0,02 B

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem pelo teste Holm-Sidak a um nível de significância $P < 0,005$

CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento e com base nos resultados obtidos pode-se chegar as seguintes conclusões:

- ❖ Os compósitos de HA+PCL+ALO; HA+PCL e o polímero PCL mostraram ser eficientes no reparo de defeitos ósseos no olecrano de coelhos.
- ❖ Os compósitos de HA+PCL+ALO; HA+PCL e o polímero PCL mostraram biocompatibilidade.
- ❖ Nos grupos HA+PCL+ALO; HA+PCL e o polímero PCL, pode-se acreditar degradação ao observar a formação de tecido ósseo no lugar do defeito, onde anteriormente era preenchido por biomaterial.
- ❖ Os grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA mostraram a capacidade de integrar ao osso.
- ❖ Os grupos PCL+HA+ALO e PCL+HA aos 45 dias, mostraram uma resposta mais evidente em comparação com o grupo PCL e controle, por terem maior porcentagem de quadrantes com radiopacidade semelhante a do osso adjacente e bordas de difícil delimitação, fato comprovado pelos resultados histopatológicos onde se observou maior formação óssea ao redor dos compósitos.

REFERENÇAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHOLME F, ANDERSSON T, TENGVALL P, ASPENBERG P. Local bisphosphonate release versus hydroxyapatite coating for stainless steel screw fixation in rat tibiae. *J Mater Sci Mater Med* . 23,743-52, 2012.
- AJDUKOVIC, Z.; NAJMAN, S.; DORDEVI, D.; SAVIC, V.; MIHAILOVIC, D.; PETROVIC, D.; IGNJATOVIC, N.; USKOKOVIC, D. Repair of bone tissue affected by osteoporosis with hydroxyapatite-poly-lactide (HAP-PLLA) with and without blood plasma. *J. Biomater. Applic*, 20,179-190, 2005.
- ÁLVAREZ, M.J.M; CURIEL, M.D. Tratamiento de la osteoporosis con bifosfonatos. Diferencias por mecanismo de acción. Datos de eficacia y seguridad a largo plazo. *Medicine*, 10, 4135-4143, 2010.
- ARNALDO R. SANTOS JR. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 17, 308-317, 2007.
- ASEFNEJAD A; BEHNAMGHADER A; KHORASANI M.T; FARSADZADEH B; Polyurethane/fluor-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Part I: morphological, physical, and mechanical characterization. *International Journal of Nanomedicine*. 6, 93–100, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. Registro Brasileiro de transplante. Janeiro- setembro, 2012. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/mensagemRestrita6.aspx?idCategoria=2>. Acessado em: 22/03/2012.
- AZEVEDO, A.S; SÁ, M.J.C; COSTA NETO, P.I; FOOK, M.V.L; PORTELA, R.A; AZEVEDO, S.S. Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo de coelhos: estudo

clínicocirúrgico, radiológico e histológico. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 49, 12-18, 2012.

BANSAL S, CHAUHAN V, SHARMA S, MAHESHWARI R, JUYAL A, RAGHUVANSHI S. Evaluation of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate mixed with bone marrow aspirate as a bone graft substitute for posterolateral spinal fusion. *Indian J Orthop* , *IJO*, 43, 234-9, 2009.

BARROS, P.P; CASSU, S.N; ZOPPI, R.A; REIS, N.S; DOTTO, P.L; MARÃO, R.E; CAPARROZ, P.G. implantes de blendas de policaprolactona e nafion® em tibia de ratos. *Rev. Ciênc. Méd.*,15, 123-130, 2006.

BATHISTA, A.L.B; DA SILVA, S.E.O. Conhecendo materiais poliméricos. Universidade Federal do Mato Grosso instituto de ciências exatas e da terra departamento de física grupo de pesquisa em novos materiais. 2003

BOER, F.C., WIPPERMANN, B.W., BLOKHUIS, F.J., PATKA, P., BAKKER, F.C AND HAARMAN, H.J.T.M. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res*, 21, 521-528, 2003.

BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NETO, P.I.N. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tibia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. *Arquivo de medicina veterinária e zootecnia*. 52, 616-620, 2000.

BURGOS E.C, Nuevos datos sobre el tratamiento con bisfosfonatos: ¿son aconsejables unas vacaciones terapéuticas?, *Reumatol Clin*. 7, 28–3, 2011.

CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.; MOREIRA,J.; FONSECA, C.; PONTES, K.S.; DUARTE, T. Avaliação do efeito osteoindutor da

hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. *Revista Ceres*, 54, 492-500, 2007.

CARLO, E.C.; BORGES, A.P.B.; POMPERMAYERI, L.G.; MARTINEZ, M.M.M; ELEOTÉRIO, R.B; NEHMEI, R.C.; MORATOI, G.O. Compósito para fabricação de implantes reabsorvíveis para osteossíntese: avaliação da biocompatibilidade em coelhos. ito para fabricação de implantes reabsorvíveis para osteossíntese: avaliação da biocompatibilidade em coelhos. *Ciência Rural*, 39, 135-140, 2009.

CARLO, E.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. *Braz. arch. biol. technol.* 53, 817-826, 2010.

CHANG K Y, CHENG L W, HO G H, HUANG Y P ; LEE Y . Fabrication and characterization of poly(gamma-glutamic acid)-graft-chondroitin sulfate/polycaprolactone porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* 5, 1937–1947, 2009.

CHEN F, LAM WM, LIN CJ, QIU GX, WU ZH, LUK KD, Biocompatibility of electrophoretical deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on roughen titanium surface. In vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 82, 183–9, 2007

CHEN, K. Y.; SHYU, P. C.; DONG, G. C.; CHEN, Y. S.; KUO, W. W.; YAO, C. H. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. *Biomaterials*, 30, 1682-1688, 2009.

CHEN J; LUO Y; HONG , L; LING, Y; PANG, J; FANG, J; WEI, K,GAO, X. Synthesis, characterization and osteoconductivity properties of bone fillers based on alendronate-loaded poly(e-caprolactone)/

- hydroxyapatite microspheres. *J Mater Sci: Mater Med.* 22, 547–555, 2011.
- CHOW LC. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J.* 28, 1-10. 2009.
- DAVIES, J.; BALDAN, N. SCAN electronmicroscopy of the bone- bioactive implant interface. *Journal of biomedical material research*, 4, 429-440,1997.
- DAVIES, J.E.; MATTA, R.; MENDES, V.C.; PERRI DE CARVALHO, P.S. Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. *Organogenesis*, 6, 161-166, 2010.
- DE VICENTE, J.C.; LÓPEZ-ARRANS, E.; LÓPEZARRANS, J.S. Tissue regeneration in bone defects adjacent to endosseous implants: an experimental pilot study. *Int. J. Period. Rest. Dent.*, 20, 41-49, 2000.
- DUARTE, T.S; BORGES, A.P.B; LAVOR, M.S.L; FILGUEIRAS, R; TSIOMIS, A.C. FÓFANO, G; ODENTHAL, M.E; PONTESL, K.C.S. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos clínicos e radiográficos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59, 114-118, 2007.
- ERDEMLI, O.; ÇAPTUG, O.; BILGILI, H.; ORHAN, D.; TEZCANER, A.; KESKIN, D. In vitro and in vivo evaluation of the effects of demineralized bone matrix or calcium sulfate addition to polycaprolactone–bioglass composites. *J Mater Sci: Mater Med*, 21, 295-308, 2010.
- FEHLBERG, A.F. Hidroxiapatita sintética na regeneração de falha óssea provocada em fratura completa de terço intermédio de tibia imobilizada pela fixação percutânea em cães. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Brasil. 2001.

- FERNANDES, R.G.; FAIG-LEITE, H.; CARVALHO, Y.R. Estudo da reparação óssea na mandíbula de coelhos sob a ação do alendronato sódico e da sua associação com a hidroxiapatita. *Rev Odontol*, 33, 123-30, 2004.
- FONSECA, F.M. Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting,. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro. Brasil. 2007.
- FONTES, E.B; hidroxiapatita sintética associada ou não à fração total de células mononucleares na regeneração de osso alveolar de cães; Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária); Universidade Federal de Santa Maria , RS, Brasil. 2009.
- FRANCO, K.L.; BORGES, A.P.B.;VILÓRIA, M.I.V. Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.*, 53, 431-436, 2001.
- GARRIDO, C.A; FONSECA, T.C; SAMPAIO, V.S. Use of the biological ceramic in filling bone defects. *Revisit Brasília de Ortopedia* .433 – 438, 2010.
- GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*,88, 873-884, 2003.
- GUAÑABENS N, PARÉS A. Osteoporosis en la cirrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol, GASTRO*. 496, 10, 2012.
- GUERRA G.M.D, IGLESIAS S.G, CARRANZA F.H, Etiopatogenia y tratamiento de la osteoporosis y fracturas del varón adulto, *Med Clin (Barc)*, 137, 2011.

- HABIBOVIC, P; YUAN, H; VALK, C.M.V.D; MEIER, G; BLITTERSWIJK C.A.V; GROOT, K.D. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 26, 3565–3575, 2005.
- HAYEK, E; NEWSELY, H. Pentacalcium monohydroxyorthophosphate, *Inorg. Syn.* 7, 63-65, 1963.
- HUANG J, LIN YW, FU XW, BEST SM, BROOKS RA, RUSHTON N. Development of nano-sized hydroxyapatite reinforced composites for tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 18, 2151–7, 2007.
- HUTMACHER,D.W; WOODRUFF, M.A. Fabrication and characterisation of scaffolds via solid free form fabrication techniques. P.K. Chu, X. Liu. Handbook of fabrication and processing of biomaterials, CRC Press/Taylor and Francis Group, *Boca Raton.* 45–68 2008.
- INOUE Y, HISA I, SEINO S, KAJI H. Alendronate induces mineralization in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells: regulation of mineralization-related genes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*118, 719–23, 2010.
- JAYABALAN, M. Studies on poly(propylene fumarate-co-caprolactone diol) thermoset composites towards the development of biodegradable bone fixation devices. *Int. J. Biomaterials*, 2009. Disponível em:< <http://downloads.hindawi.com/journals/ijbm>>. Acessado em 22/10/2010.
- JESSEN,S.S: AABOE,M.: PINHOLT, E.M. tissue reaction and material characteris of our bone substitutes. *Int.j.oral.maxillofac. implants.* 11, 55-66, 1996.
- KIEN-SENG LEW, RADZALI OTHMAN, KUNIO ISHIKAWA; FEI-YEE YEOH. Macroporous bioceramics: A remarkable material for bone regeneration. *Journal of Biomaterials Applications* 27, 345–358, 2011.

- KIM HK, KIM JH, ABBAS AA, YOON TR. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res.* 467. 12, 3121–8. 2009.
- KIM, H.W; KNOWLES J.C; KIM H.E. Hydroxyapatite/poly(e-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery *Biomaterials*, 25,1279. 2004.
- LAM, C.X.F. HUTMACHER, D.W. SCHANTZ, J.-T. WOODRUFF, M.A. TEOH, S.H. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res Part A*, 90, 906–919, 2008.
- LAM, C.X.F; TEOH, S.H; HUTMACHER, D.W. Comparison of the degradation of polycaprolactone and polycaprolactone-(beta-tricalcium phosphate) scaffolds in alkaline medium. *Polym Int*, 56, 718–728, 2007.
- LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res.* 1, 81-98, 2002.
- LIPIK, V.T.; VENKATRAMAN, S.S.; ABADIE, M.J.M. Effect of the structure of the biodegradable triblock polymer polylactide block-(polycaprolactone-stat-polylactide)block-polylactide on its mechanical properties. *Polymer Science Ser. A*, 52, 1012-1022, 2010.
- LIU, H.; WEBSTER, T. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications. *Int. J. Nano medicine*, 5, 299–313, 2010.
- MAKAROV, C; GOTMAN, I; JIANG, X; FUCHS, S; KIRKPATRICK, C.J; GUTMANAS, E, J. In situ synthesis of calcium phosphate-polycaprolactone nanocomposites with high ceramic volume fractions. *Mater Sci: Mater Med*, 21, 1771–1779, 2010.
- MENDES FILHO, A.A. Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria-prima reciclada. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais. 2006.

- MIRANDA, E.S; CARDOSOS, F.T.S; DE MEDEIROS FILHO, J.F; BARRETO, M.D.R; TEIXEIRA, R.M.D; WANDERLEY, A.L; FERNANDES, K.E. estudo experimental comparativo no uso de enxerto ósseo orgânico e inorgânico no reparo de fraturas cirúrgicas em rádio de coelhos. *Acta ortopédica brasileira*,13, 245-248, 2005.
- MYGIND, T; STICHLER, M.; BAATRUP, A.; LI, H.; ZOU, X.; FLYVBJERG, A.; KASSEM, M.; BÜNGER, C. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 28, 1036-1047, 2007.
- NAIR,L.S. LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progr Polym Sci*, 32, 2007.
- NOBRE, M.D.P.N.; FERNANDES, R.G.; CHIN, C.M.; FAIG-LEITE, H. Ação local do alendronato sódico na reparação óssea de ratos espontaneamente hipertensos (shr). *Arq Bras Cardiol*, 90, 261-268, 2008.
- OKADA. M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progr Polym Sci*, 27, 87–133, 2002.
- OLIVEIRA, J.T.; CRAWFORD, A.; MUNDY, J.M.; MOREIRA, A.R.; GOMES, M.E.; HATTON, P.V.; REIS, R.L.. A cartilage tissue engineering approach combining starch-polycaprolactone fibre mesh scaffolds with bovine articular chondrocytes. *J Mater Sci: Mater Med*, 18, 295-302, 2007.
- OLIVEIRA, L.S.A; OLIVEIRA, C.S; MACHADO, A.L; ROSA, F.P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 1, 37-44. 2010.

- ONO, I; TATESHITA, T.; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, 21, 143-151, 2000.
- PANZAVOLTA S, TORRICELLI P, BRACCI B, FINI M, BIGI A. Functionalization of biomimetic calcium phosphate bone cements with alendronate. *J Inorg Biochem*. 104, 1099–106, 2010.
- PÉREZ, S, B; BARRERO, M.; SOSA-HENRÍQUEZ, M.; BLANCOA, A.G.; KNEZEVIC, M.; NAVARRO, J. Osteonecrosis maxilar secundaria al uso de bisfosfonatos por vía oral. Exposición de tres casos clínicos relacionados con alendronato. *Rev Méd Chile*, 137, 275-279, 2009.
- PINHEIRO ALB, GERBI ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg*. 21, 169-78, 2006.
- PINTO JGS, CIPRANDI MTO, AGUIAR RC, LIMA PVP, HERNANDEZ, PAG, SILVA JÚNIOR AN. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. *RFO UPF*,12, 79-84, 2007.
- PRECHEUR, H.V. Bone Graft Materials. *Dent. Clin. N. Am.*, 51, 729-746, 2007.
- PUPPI, D. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, 35, 403–440, 2010.
- RENTSCH, B; HOFMANN, A; BREIER, A; RENTSCH, C; SCHARNWEBER, D. embroidered and Surface Modified Polycaprolactone-Co-Lactide Scaffolds as Bone Substitute: In Vitro Characterization. *Annals of Biomedical Engineering*, 37, 2118–2128, 2009.
- RENTSCH, C.; HESS, R.; RENTSCH, B.; HOFMANN, A.; MANTHEY, S.; SCHARNWEBER, D.; BIEWENER, A.; ZWIPP, H. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-

- modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 46, 624-634, 2010.
- REZENDE, C.M.F., BORGES, A.P.B., BERNIS, W.O. et al. “Aspectos clínico-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães”. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 50, 537-545, 1998.
- RIBEIRO, A.F.; VOLPATO, N. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. *Quim. Nova*, 28, 852-858, 2005.
- RODRIGUEZ, A.I.R.; ARTONI, S.M.B; OLIVEIRA, D. Implante de biomateriais e a consolidação óssea em cadelas submetidas à ovariosalpingo-histerectomia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61, 1054-1061, 2009.
- SAIKIA KC, BHATTACHARYA TD, BHUYAN SK, TALUKDAR DJ, SAIKIA SP, JITESH P. Calcium phosphate ceramics as bone graft substitute in filling bone tumor defects. *Indian J Orthop IJO*. 42, 169-172, 2008.
- SALGADO, C.L., Characterization of chitosan and polycaprolactone membranes designed for wound repair application. *Journal of Materials Science*, 47, 659-667 2011.
- SAWYER,A.A; SONG,S.J; SUSANTO, E; CHUAN,P; LAM, C.X.F; M.A. WOODRUFF, M, A. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL–TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* 30, 2479–2488 , 2009.
- SCHANTZ,J.T; HUTMACHER,D.W; LAM, C.X.F; BRINKMANN, M; WONG,K.M; LIM, T.C. Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts – II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng*, 9, 127–139 , 2003.
- SHIGERU, K; OKU, T; TAKAGI, S. Hydraulic property of hydroxyapatite thermal decomposition product and its application as a biomaterial. *J Ceram Soc Jpn Inter Ed.*, 97, 96-101, 1989.

- SILVA, E.C.; BORGES, A.P.B.; NEVES, C.D.; CARLO, E.C.; ELEOTÉRIO, R.B.; 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 1 domésticos (*Felis catus*): estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 64, 873-880, 2012.
- SUGAWARA A, FUJIKAWA K, TAKAGI S, CHOW LC. Histological analysis of calcium phosphate bone grafts for surgically created periodontal bone defects in dogs. *Dent Mater J.* 27, 787-94, 2008
- SUGAWARA A. New generation of bone graft material. Part 1. Requirements for bone regeneration. *J Oral Implants*, 26, 55-74, 2006.
- SUN H, MEI L, SONG C, CUI X, WANG P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials.* 27, 1735–40, 2006.
- STUART B. GOODMAN A,B, ZHENYU YAO A, MICHAEL KEENEY A,B, FAN YANG. The future of biologic coatings for orthopaedic implants. *Biomaterials* . 34, 3174-3183. 2013.
- TARANTINO, D.R.D.U; CEROCCHI, I; CELO, M. Alendronato e vitamina D: quale ruolo in ortopedia e traumatologia. *Scapello.* 25, 164-70, 2010.
- TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of The Royal Society Interface.* 6, 311-324, 2009.
- TOKER A.H; OZDEMIR A. H; OZER C. H; EREN B. K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Archives of Oral Biology.* 57, 1545–1550, 2012.
- TÖRMÄLÄ, P, POHJONEN, T, ROKKANEN, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc Inst Mech Eng [H].* 212, 101-111, 1998.

- TRUEDSSON A, WANG JS, LINDBERG P, GORDH M, SUNZEL B, WARFVINGE G. Bone substitute as an on-lay graft on rat tibia. *Clin Oral Implants Res* 21, 424-9, 2010.
- 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*, 3, 227-237, 2003.
- VITAL, C.C.; BORGES, A.P.B.; FONSECA, C.C.; TSIOMIS, A.C.; CARVALHO, T.B.; FONTES, E.B.; SENA, M.P.; FÓFANO, G. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 58, 175-183, 2006.
- VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Tissue Engineering: The Next Generation. *Tissue Eng.*, 12, 3261-3263, 2006.
- WALSH, W.R.; SHEATH, P.J.C.; CAIN, S.; DEES, J.; BRUCE, W.J.M.; SUEHLA, M.J.; GILLIES, R.M. A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect. *Model. Journal of orthopaedic research*, 21, 655-661, 2003.
- WAN, Y.; XIAO, B.; DALAI, S.; CAO, X.; WU, Q. Development of polycaprolactone/chitosan blend porous scaffolds. *J Mater Sci: Mater Med*, 20, 719-724, 2009.
- WANG, Y; LAM, J; ZHANG, B; PAUL E. TOMLINS, P.E; LI, X; ALPAR, O; WERTHEIM, D.F; JONES, A.S; COOMBES, A.G.A. Biomechanical characterization of a micro/macroporous polycaprolactone tissue integrating vascular graft. *Cardiovascular Engineering and Technology*, 1, 202–215, 2010.
- WHITE, E.; SHORS, E.C. Reconstructive implant surgery and implant prosthodontics I. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dent. Clin. North Am.*, 30, 49-67, 1986.

- WOODRUFF , M.A; HUTMACHER, D.W. the return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21 st century. *Progress in polymer science*. 35, 1217-1256, 2010.
- XIONG .Y; YANG H.J; FENG J; SHI Z.L; WU L.D. effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. *Jint med res*. 37, 407-16, 2009.
- XIUFENG, X.; RONGFANG, L.; QIONGYU, H.; XIAOHONG, D. Preparation and characterization of hydroxyapatite/ polycaprolactone–chitosan composites. *J Mater Sci: Mater Med*, 20, 2375-2383, 2009.
- YUAN, P; VALK, H; MEIER G, BLITTERSWIJK C.A.V; GROOT K.D. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 26, 3565–3575. 2005.
- ZHAO ,J; GUO L.Y ; YANG X.B; WENG J. Preparação de HA porosa bioativa / PCL andaimos compósitos. *Applied Surface Science*, 255, 2942-2946. 2008.