

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E
AMBIENTAIS**

Adriana Duarte de Almeida

**MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOTOMIA PARA INSERÇÃO DE *SCAFFOLD*
NA PREVENÇÃO DE OSTEONECROSE MAXILO - MANDIBULAR *in vivo***

Sorocaba/SP

2017

Adriana Duarte de Almeida

**MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOTOMIA PARA INSERÇÃO DE SCAFFOLD
NA PREVENÇÃO DE OSTEONECROSE MAXILO - MANDIBULAR *in vivo***

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Grotto

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud

Sorocaba/SP

2017

Adriana Duarte de Almeida

**MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOTOMIA PARA INSERÇÃO DE *SCAFFOLD*
NA PREVENÇÃO DE OSTEONECROSE MAXILO - MANDIBULAR *in vivo***

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Raquel de Mendonça Rosa Castro
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Paulo Vitor Marques Simas
Universidade de Sorocaba

AGRADECIMENTOS

É difícil encontrar palavras para agradecer a todas as pessoas especiais em minha vida, as quais me compreenderam e ofereceram seu apoio. A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram neste período, saibam que se sou o que eu sei, então dentro de mim tem uma parte de cada um que me ensinou...

Somos anjos de uma única asa e só podemos voar quando abraçados uns aos outros.

À Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

Ao meu pai João e minha mãe Ana Roza, e aos meus irmãos.

Aos meus filhos, Suellen e Felipe, que trazem tanta luz e gosto para minha vida, um amor especial. Vocês são a lição mais profunda que vivi de ética, dignidade e amor...

Ao amigo e companheiro Adilson, que com muito carinho e apoio me ajudou para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu genro André, por estar sempre pronto a me ouvir, esclarecer minhas dúvidas nesse meu caminhar.

À Uniso por ter me acolhido durante a graduação e por possibilitar a realização do mestrado.

À minha querida orientadora professora Dra. Denise Grotto, cuja sabedoria e responsabilidade são admiráveis. Obrigada pelo apoio, incentivo a enfrentar obstáculos que pareciam intransponíveis, dedicação, pelo tempo despendido, compreensão, carinho e amizade ao longo de tantos meses. Sou extremamente grata por sua compreensão e disponibilidade.

Ao meu co-orientador professor Dr. Marco Vinícius Chaud, pela presteza de seus conhecimentos, valiosos esclarecimentos, por colocar à disposição seus equipamentos.

À Coordenação do Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais, na pessoa do professor Dr. Daniel Bertolli, empenho e profissionalismo o tornam admirável.

Às estimadas companheiras Thaisa B. Pickler, Liliane C. F. S. Borges, Fernanda G. Leite, Fábila J. M. Viroel, Márcia A. Rebello, pela disposição e dividirem suas experiências na realização deste projeto, sou imensamente grata.

À minha família e amigos, meu muito obrigada pela compreensão quanto ao afastamento e ausência em momentos especiais.

“O tempo muito me ensinou:
Ensinou a amar a vida,
Não desistir de lutar,
Renascer na derrota,
Renunciar às palavras e pensamentos
negativos,
Acreditar nos valores humanos,
E a ser OTIMISTA.
Aprendi que mais vale tentar do que
recuar...
Antes acreditar do que duvidar,
Que o que vale na vida,
Não é o ponto de partida e sim a nossa
caminhada.”

(Cora Coralina)

RESUMO

Os *scaffolds* são arcabouços ou suportes de estruturas tridimensionais que desempenham um papel importante durante a regeneração dos tecidos. Os *scaffolds* permitem a penetração de células e nutrientes nos tecidos, bem como a fixação, migração, diferenciação, proliferação e crescimento das células, além da remoção de resíduos metabólicos. A osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos é uma doença que apresenta lesão agressiva que pode evoluir rapidamente e resultar em sequelas funcionais, estéticas e psicológicas importante para os pacientes. Assim, este estudo objetiva avaliar a implantação de *scaffolds* a base de quitosana, hidroxiapatita e alginato de sódio na prevenção da osteonecrose maxilar induzida por bisfosfonato. O estudo experimental foi realizado com 48 ratos machos Wistar. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=24, de acordo com o tempo de eutanásia). Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos (n=6): I - Controle (salina + exodontia); II – Ácido Zoledrônico (AZ) 0,6 mg/kg + exodontia; III – AZ + exodontia + *scaffold* quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita (Ch/NaAlg/Hap) 1:1:0,2; IV - AZ + exodontia + *scaffold* Ch/NaAlg/Hap 1:1:0,6. Após eutanásia (15 ou 30 dias após última administração de ácido zoledrônico), as maxilas foram avaliadas quanto às alterações alveolares e clínicas, por meio de exames radiográficos e histológicos. O sangue foi avaliado para parâmetros hematológicos e bioquímicos (funções hepática e renal, e cálcio), utilizando kits comerciais. Análise de variância de uma via (ANOVA) e teste de Chi-quadrado foram aplicados, e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Na evolução de massa corpórea, não houve diferença estatística entre os subgrupos nos dois tempos de eutanásia, demonstrando que a exodontia e a inserção dos *scaffolds* não interferiam no consumo de alimento. As imagens radiológicas não foram conclusivas. Entretanto, com a avaliação histopatológica, observou-se significativa osteonecrose no grupo tratado com AZ. A implantação dos *scaffolds*, apesar do processo inflamatório, da presença de colônias bacterianas e da osteomielite, conseguiu prevenir a osteonecrose. No tempo de eutanásia de 30 dias, em 50% dos animais do grupo *scaffold* 0,2 ocorreu osteogênese. Com relação à análise hematológica, no grupo com eutanásia de 15 dias, um aumento no número de hemácias e plaquetas foi observado no subgrupo II quando comparado ao outros

subgrupos. A concentração da hemoglobina e do hematócrito diminuíram no subgrupo IV comparado ao grupo II. A atividade das transaminases hepáticas e de creatinina aumentaram significativamente no subgrupo II quando comparado ao controle. A concentração de cálcio aumentou no subgrupo IV comparado ao II. No grupo com eutanásia de 30 dias, nenhuma diferença entre os grupos foi observada para nenhum parâmetro. Concluiu-se que o AZ induziu osteonecrose no grupo que recebeu apenas o medicamento. Os *scaffolds* (0,2 e 0,6) foram eficazes, pois foram capazes de prevenir este processo nos respectivos grupos. Todavia, os *scaffolds* não foram capazes de reduzir processo inflamatório e não apresentaram característica antimicrobiana. Por outro lado, os *scaffolds* se mostraram seguros quando se avalia a função hepática e renal. Alguns parâmetros hematológicos sofreram alterações pelos *scaffold*, as quais retornaram à normalidade com o tempo.

Palavras-chave: Ácido Zoledrônico; Osteonecrose; *Scaffold*; Regeneração Óssea.

ABSTRACT

Scaffolds are platforms or supports of three-dimensional structures that play an important role during tissue regeneration. Scaffolds allow the penetration of cells and nutrients in tissues, as well as cells fixation, migration, differentiation, proliferation and, besides the removal of metabolic waste products. Bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis is a pathology with aggressive injury of rapid evolution, which can result in functional, aesthetic and psychological sequelae that are important for patients. Thus, this study aims to establish an experimental model of osteotomy for scaffold insertion, and to evaluate the application of a scaffold made with chitosan and hydroxyapatite in the prevention of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. The experimental study was carried out with 48 male Wistar rats. Animals were randomly divided in two groups (n=24, according to the euthanasia time: 15 or 30 days after the last AZ administration). Each group was divided in four subgroups (n=6): I – Control (saline + teeth extraction); II – Zoledronic acid (ZA) 0.6 mg/kg + teeth extraction; III – ZA + teeth extraction + scaffold chitosan/sodium alginate/hydroxyapatite (Ch/NaAlg/Hap) 1:1:0.2; IV - ZA + teeth extraction + scaffold Ch/NaAlg/Hap 1:1:0.6. After euthanasia, jaws were evaluated for alveolar and clinical alterations, by radiographic and histological exams. Blood was evaluated for hematological and biochemical parameters (hepatic and renal functions, and calcium levels) using commercial kits. One way Analysis of variance (ANOVA) and Chi-square test were applied, and p values < 0.05 were considered significant. In the evolution of body mass, there was no statistical difference among the subgroups in the two euthanasia times, showing that the teeth extraction and the insertion of the scaffolds did not affect the food consumption. The radiological images were not conclusive. However the histopathological evaluation showed significant osteonecrosis in the group treated with ZA. Scaffold's implantations, despite the inflammatory process the bacterial colonies and the osteomyelitis, were able to prevent the osteonecrosis. At the 30-day euthanasia, 50% of the subgroup III had osteogenesis. Regarding hematological analysis, in the 15-day euthanasia, an increase in the number of red blood cells and platelets was observed in the subgroup II when compared to the other subgroups. Hemoglobin and hematocrit concentrations decreased in subgroup IV compared to subgroup II. The activity of hepatic transaminases increased significantly in subgroup II when compared to

control. The creatinine concentration increased significantly in subgroup II compared to control. Calcium concentration increased in subgroup IV compared to II. In the 30-day euthanasia group, no difference among the groups was observed for any parameter. It was concluded that AZ induced osteonecrosis in the group receiving the drug alone. Scaffolds (0.2 and 0.6) were effective to prevent this process in the respective groups. However, scaffolds were not able to reduce the inflammatory process and did not present an antimicrobial characteristic. On the other hand, scaffolds were safe when assessing liver and kidney function. Some hematological parameters were altered by the scaffold, which returned to normal concentrations over time.

Keywords: Zoledronic acid; Osteonecrosis; Scaffold; Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de células do tecido ósseo.....	20
Figura 2. Esquema do processo de remodelação óssea em que a estrutura óssea é dissolvida e digerida pelos osteoclastos, e os osteoblastos são encarregados da formação óssea	21
Figura 3. Estrutura química do pirofosfato (em A) e estrutura química geral dos bisfosfonatos (em B)	22
Figura 4. Representação da rede cristalina de uma célula unitária de hidroxiapatita	29
Figura 5. Representação das estruturas de quitina e quitosana pelas unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (em A) e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose (em B). O “n” é o grau de polimerização da estrutura.....	31
Figura 6. Produção de quitina e quitosana a partir de exoesqueleto de crustáceos e fungos, e seus empregos	32
Figura 7. Conformação da cadeia estrutural do alginato, em que M corresponde ao polissacarídeo ácido β -D-manurônico e G corresponde ao ácido α -L-gulurônico.....	34
Figura 8. Diagrama esquemático da divisão dos animais, sendo: SF o soro fisiológico; AZ o ácido zoledrônico; AZ + scaffolds 0,2 e AZ + scaffolds 0,6. Proporção de hidroxiapatita 0,2 e 0,6.....	39
Figura 9. Ácido zoledrônico (Zometa®)	40
Figura 10. Administração do medicamento por via intraperitoneal.....	40
Figura 11. Abertura da cavidade oral, realizada com elásticos ancorados nos dentes incisivos	41
Figura 12. Instrumentais utilizados no procedimento	42
Figura 13. Elemento dental retirado, em A, e scaffold utilizado, em B	43
Figura 14. Inflamação periorbital característica na exposição ao ácido zoledrônico	44
Figura 15. Equipamento de Raio-X	45
Figura 16. Cilindro do feixe para tomada de radiografias periapicais.....	46
Figura 17. Equipamento de hematologia automatizado Sysmex XS-1000i.....	49
Figura 18. Equipamento automatizado COBAS C111 Roche®	49

Figura 19. Evolução da massa corpórea, em gramas (g), nos grupos de Tempo 1 (19A) e Tempo 2 (19B) de eutanásia	54
Figura 20. Imagens radiológicas da maxila de ratos controle (em A), tratados com ácido zoledrônico (em B), ácido zoledrônico + scaffold quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6 (C e D, respectivamente), no Tempo 1 de eutanásia	57
Figura 21. Imagens radiológicas da maxila de ratos controle (em A), tratados com ácido zoledrônico (em B), ácido zoledrônico + scaffold quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6 (C e D, respectivamente), no Tempo 2 de eutanásia	58
Figura 22. Parâmetros histológicos estratificados por escores (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = acentuado)	61
Figura 23. Imagens histopatológicas da maxila de ratos, com coloração hematoxilina e eosina, no Tempo 1 de eutanásia	62
Figura 24. Parâmetros histológicos estratificados por escores (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = acentuado)	66
Figura 25. Imagens histopatológicas da maxila de ratos, com coloração hematoxilina e eosina, no Tempo 2 de eutanásia	67
Figura 26. Imagens histopatológicas da maxila de ratos, representativas da coloração tricômico de Masson.	68
Figura 27. Função hepática representada pelas enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), no grupo de Tempo 1 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções	73
Figura 28. Função hepática representada pelas enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), no grupo de Tempo 2 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções	75
Figura 29. Função renal no grupo de Tempo 1 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente.....	76
Figura 30. Função renal no grupo de Tempo 2 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente.....	77
Figura 31. Concentração sérica de cálcio no Tempo 1 (A) e no Tempo 2 (B) de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química de alguns bisfosfonatos	23
Tabela 2. Distribuição dos animais, em porcentagem (%) segundo presença (+) ausência (-) de reepitelização, tecido conjuntivo fibroso, osteonecrose, resto radicular, osteogênese, colônias bacterianas, infiltrado inflamatório nos ratos no T1 de eutanásia	60
Tabela 3. Distribuição dos animais, em porcentagem (%) segundo presença (+) ausência (-) de reepitelização, tecido conjuntivo fibroso, osteonecrose, resto radicular, osteogênese, colônias bacterianas, infiltrado inflamatório nos ratos no T2 de eutanásia	65
Tabela 4. Parâmetros hematológicos no grupo de Tempo 1 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente, e AZ representa o grupo Ácido Zoledrônico	69
Tabela 5. Parâmetros hematológicos no grupo de Tempo 2 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente, e AZ representa o grupo Ácido Zoledrônico	72

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ALT – Alanina transaminase
ANOVA – Análise de variância
ATN – Necrose tubular aguda
AST – Aspartato transaminase
AZ – Ácido zoledrônico
BF – Bisfosfonato
BFs – Bisfosfonatos
Ca – Cálcio
Ch – Quitosana
G – Gulurônico
Hap – Hidroxiapatita
HCl - Ácido clorídrico
HCT – Hematocrit
HGB – Hemoglobina
IP – Intraperitoneal
M – Manurônico
MCH – Mean corpuscular hemoglobin
MCHC – Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV – Mean corpuscular volume
NaAg – Alginato de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
NH₂ – Grupo amino
NHCOCH₃ – Grupamento acetil
O – Oxigênio
OH – Grupamento hidroxila
ONM – Osteonecrose maxilar
ONMAB – Osteonecrose dos maxilares associada à terapia dos bisfosfonatos
P – Fósforo
P–C–P – Fósforo–carbono–fósforo
PLTs – Platelets
RBC – Red blood cells
T1 – Tempo 1

T2 – Tempo 2

WBC – White blood cells

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDAS LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem
μL – Microlitros
dL – Decilitros
fL - Fentolitros
g – Gramas
kg – Quilogramas
L – Litros
m – Massa
mg – Miligrama
mL – Mililitros
pg – Pictogramas
s – Segundos
UI – Unidades internacionais
® – Marca registrada
< – Menor que
> – Maior que

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Tecido Ósseo	19
2.2 Bisfosfonatos: Estrutura Molecular e Mecanismo de Ação	21
2.3 Bisfosfonatos – Indicações Clínicas	24
2.4 Osteonecrose Maxilar Associada à Terapia dos Bisfosfonatos	25
2.5 Biomateriais – <i>Scaffolds</i>	26
2.5.1 Hidroxiapatita	28
2.5.2 Quitosana.....	30
2.5.3 Alginato	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 Geral:	36
3.2 Específicos:.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Produção dos <i>Scaffolds</i>	37
4.2 Aspectos éticos	37
4.3 Manutenção e manipulação dos animais	38
4.4 Delineamento experimental.....	38
4.5 Procedimento cirúrgico odontológico (exodontia e osteotomia).....	41
4.6 Avaliação Clínica.....	43
4.7 Eutanásia	44
4.8 Obtenção de imagens radiológicas	45
4.9 Processamento das amostras para análise histológica	46
4.9.1 Técnica de coloração de hematoxilina e eosina	47
4.9.2 Técnica de coloração de tricrômico de Masson.....	47
4.10 Parâmetros hematológicos.....	48
4.11 Parâmetros bioquímicos.....	49
4.12 Análise estatística	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Controle da massa corpórea e avaliação clínica	53
5.2 Imagens radiológicas	56
5.3 Análises histopatológicas	59
5.4 Análises hematológicas.....	68

5.5 Análises bioquímicas	72
5.6 Limitações e pontos fortes do estudo	80
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIAS	83
8. ANEXOS.....	92
ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Aniamais.....	92
ANEXO 2 – Certificados de apresentação de trabalhos em congressos	93

1 APRESENTAÇÃO

Os bisfosfonatos são medicamentos empregados para inibir a reabsorção óssea em pacientes com osteoporose, doença de Paget, câncer metastático, mieloma múltiplo, além de reverter a hipercalcemia da malignidade dos tumores, promovendo a apoptose dos osteoclastos, além de outras funções que visam à inibição da reabsorção óssea. Entretanto, esta classe de medicamentos pode trazer complicações aos pacientes que a utilizam, como osteonecrose devida à exposição do osso da maxila ou mandíbula em paciente que é ou já foi submetido a algum tipo de tratamento com bisfosfonatos.

A osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos é uma doença que apresenta lesão agressiva que pode evoluir rapidamente e resultar em sequelas funcionais, estéticas e psicológicas importante para os pacientes. Estes aspectos são particularmente preocupantes, pois a literatura ainda permanece sob um contexto de incertezas no que se refere a abordagens terapêuticas e preventivas para esta doença.

O termo biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação destas, que pode ser utilizado para reparar ou substituir, parcial ou totalmente, qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Os biomateriais não devem ser tóxicos, nem produzir substâncias tóxicas, e devem ser compatíveis com os tecidos do corpo. Os *scaffolds* são arcabouços ou suportes tridimensionais temporários e biodegradáveis, com papel crítico na criação de um novo tecido, quer seja *in vivo* ou *in vitro*. Os *scaffolds* têm como funções principais promover a migração e adesão celular e fornecer fatores bioquímicos, para permitir a difusão de nutrientes vitais às células, além de exercer influências mecânica e biológica para modificar o comportamento da fase celular.

Diante do exposto, este trabalho foi conduzido no intuito principal de padronizar um modelo experimental de osteotomia induzida por bisfosfonato em ratos Wistar para inserção de *scaffold*. Estes *scaffolds* à base de quitosana e hidroxiapatita, previamente desenvolvidos e avaliados *in vitro*, foram aplicados no modelo experimental para avaliação da prevenção de osteonecrose maxilo-mandibular. Fundamentado nesta aplicação, o estudo foi conduzido baseado nas perguntas: Em situações de degeneração do tecido ósseo, os *scaffolds* estudados

poderiam minimizar os efeitos inflamatórios decorrentes da exposição ao bisfosfonato? Estes *scaffolds* poderiam ser utilizados na prevenção da regeneração óssea? E em caso positivo, eles seriam seguros para os demais tecidos/sistemas do organismo, como sistema hepático e renal?

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido Ósseo

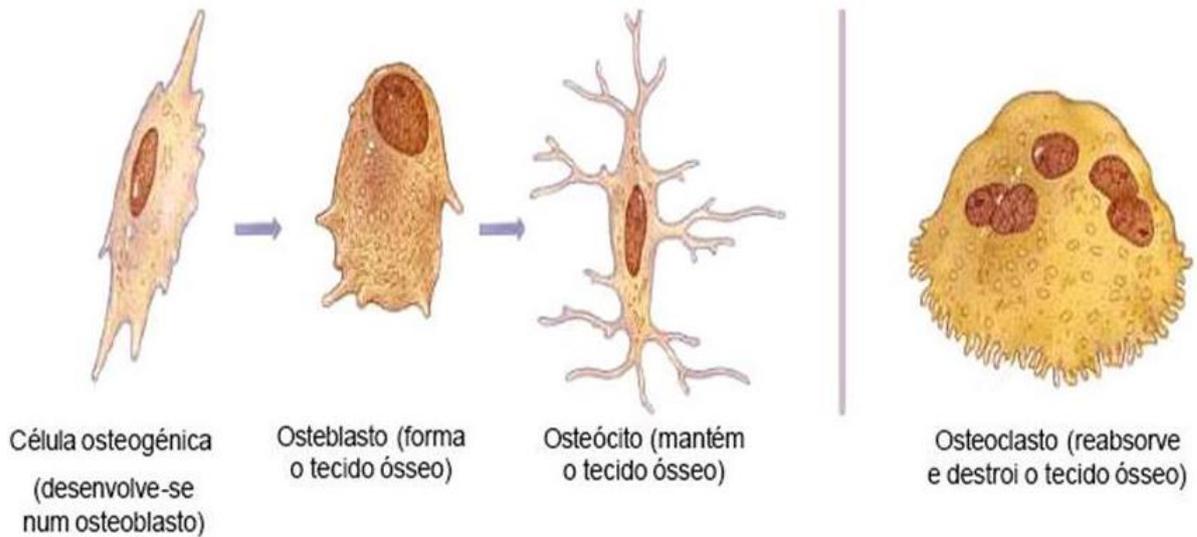
O tecido ósseo é um tecido rígido e tem como função suporte, proteção e locomoção. Os principais reguladores da massa óssea do adulto são os hormônios, a ingestão de cálcio e a atividade física (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Ele pode se apresentar, macroscopicamente, como ossos compactos, formados por partes sem cavidades, e ossos esponjosos, formados por partes com muitas cavidades intercomunicantes que acomodam a medula óssea. As superfícies internas e externas dos ossos são revestidas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e o perióstio, cujas principais funções são a nutrição deste tecido (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Histologicamente, existem dois tipos de tecido ósseo, chamados de primário e secundário. O tecido primário (ou imaturo) se apresenta de forma amorfa, as fibras colágenas não são organizadas e o tecido tem menor quantidade de cristais de hidroxiapatita. E o secundário (maduro ou lamelar) apresenta as fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas e concêntricas em torno dos canais de Harvers, podendo formar o osso compacto ou o esponjoso (COTRAN; KUMAR, 2005).

O tecido ósseo é composto por três diferentes tipos de células com associação a matriz óssea: os osteoblastos, os osteócitos e osteoclastos, como mostra a figura 1.

Os osteoblastos (originados das células osteogênicas) são células encontradas nos ossos em formação; são ricas em retículo endoplasmático rugoso, e produzem a matriz extracelular dos ossos (MARKS; ODGREN, 2002). O colágeno tipo I é a principal proteína na matriz óssea, representando cerca de 90% da matriz orgânica (GEHRON, 2002).

Os osteócitos são células menores alojadas no interior da matriz extracelular calcificada e possuem citoplasmas em cujas extremidades ocorrem a difusão de metabólitos que os nutrem, e é devido a essa atividade que o tecido ósseo se mantém vivo (MOHAMED, 2008). Já os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas resultantes da fusão de macrófagos e são responsáveis pela reabsorção óssea (SODEK; MCKEE, 2000; KATCHBURIAN; CERRI, 2002).

Figura 1. Tipos de células do tecido ósseo

Fonte: TORMENA, 2009

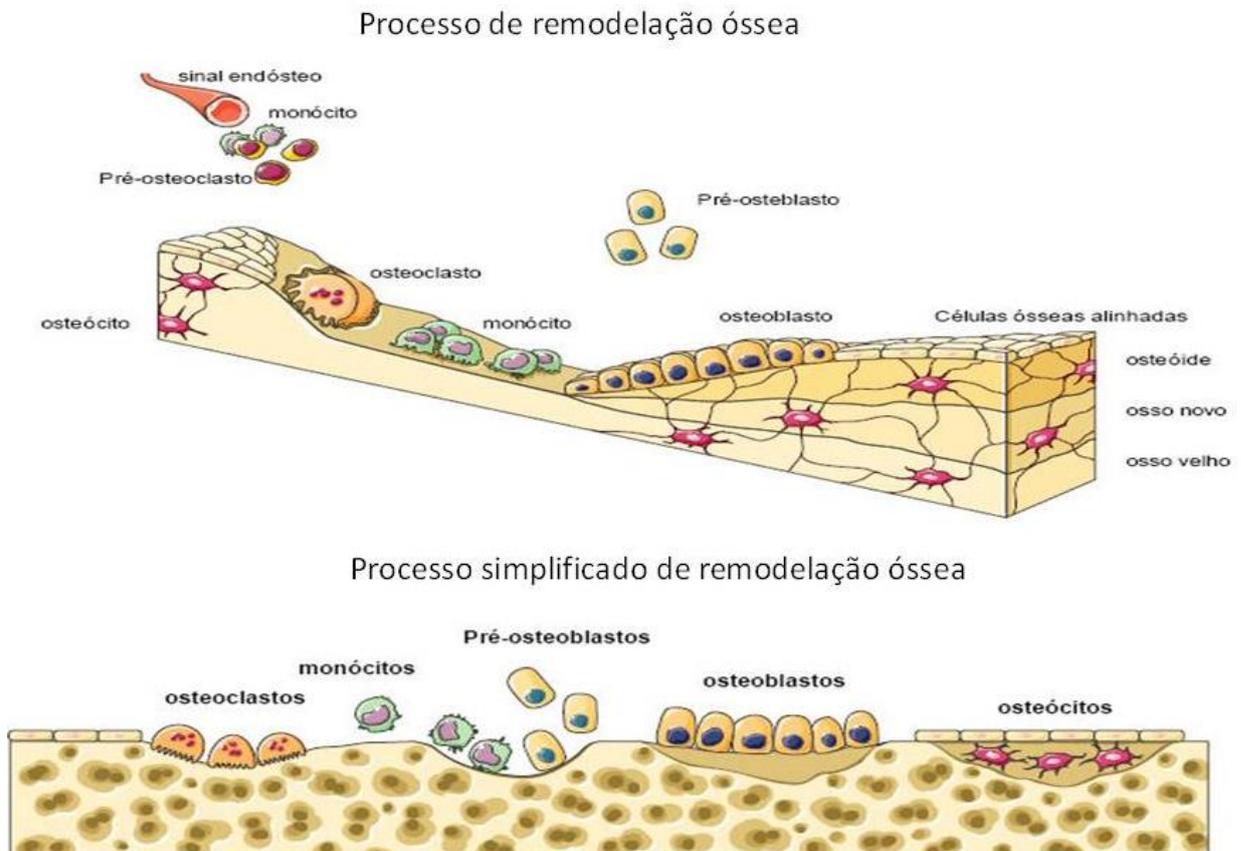
Este tecido está em constante remodelação – ou remodelamento por meio da reabsorção e da formação de novo tecido ósseo (Figura 2). Para isso, a formação de novo osso parte dos processos acoplados, respectivamente, por duas células diferentes: os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, e os osteoblastos, encarregados da formação óssea. O crescimento dos ossos consiste na formação de tecido ósseo novo, associado à reabsorção parcial de tecido já formado; assim os ossos conseguem manter sua forma enquanto crescem (SILVA *et al.*, 2007). Já no período de reabsorção, a estrutura óssea é dissolvida e digerida pelos ácidos e enzimas proteolíticas produzidos pelos osteoclastos, para remoção do osso envelhecido (RUIMERMAN, 2005).

Os osteoblastos são responsáveis não só pela formação da matriz óssea, mas também pela sua mineralização, que se dá por cristais de fosfato de cálcio (Ca-P), sob a forma de hidroxiapatita, que assenta numa organizada matriz colagénica (fase orgânica), fazem a deposição dos osteócitos e mineralizam-os, para a formação de um novo osso. Quando os osteoblastos param de sintetizar a parte orgânica do osso, transformam-se em células que revestem a nova superfície óssea. Essas células de revestimento ficam altamente aderidas na matriz óssea através da rede de canaliculos (RUIMERMAN, 2005).

A revigoração do reparo neste tecido está condicionada a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e tamanho do sítio lesionado. Em

regiões em que a morfologia e o tamanho do defeito são grandes e críticas para que ocorra o reparo, o mecanismo regenerativo fica limitado e, há formação de cicatriz fibrosa (KIM *et al.*, 2006).

Figura 2. Esquema do processo de remodelação óssea em que a estrutura óssea é dissolvida e digerida pelos osteoclastos, e os osteoblastos são encarregados da formação óssea



Fonte: TORMENA, 2009

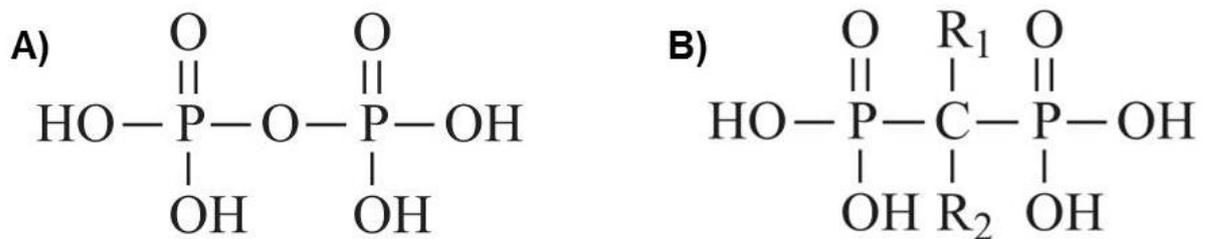
2.2 Bisfosfonatos: Estrutura Molecular e Mecanismo de Ação

Os bisfosfonatos (BFs) são análogos sintéticos do pirofosfato inorgânico (Figura 3), em que o átomo oxigênio central é substituído pelo carbono. Os BFs apresentam uma estrutura química P-C-P (fósforo-carbono-fósforo) (Figura 3), que é responsável por sua ligação à matriz óssea e confere resistência à hidrólise das

fosfatases. Os BFs se ligam fortemente à hidroxiapatita da superfície óssea e agem preferencialmente em sítios de grande formação e remodelação óssea. Os BFs podem inibir a precipitação dos fosfatos de cálcio, causar regressão da transformação da fase amorfa da hidroxiapatita para a fase cristalina e inibição da dissolução (CARVALHO *et al.*, 2010).

A estrutura química geral apresenta duas cadeias nomeadas genericamente de R1 e R2. A primeira cadeia R1 é curta, e é responsável pelas propriedades químicas e farmacocinéticas dos BFs, além de conferir, em conjunto com os grupamentos fosfatos, grande afinidade ao tecido ósseo. Já a cadeia R2 é longa e determina a potência antirreabsortiva e o mecanismo de ação farmacológico do BF (BRAUN; LACONO, 2005).

Figura 3. Estrutura química do pirofosfato (em A) e estrutura química geral dos bisfosfonatos (em B)



Fonte: Adaptado de FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005

Os BFs podem ser divididos em dois subgrupos: com ou sem nitrogênio presente na estrutura química, conforme demonstrado na Tabela 1. Os metabólitos dos compostos não nitrogenados etidronato e clodronato são tóxicos aos osteoclastos, levando-os à morte, com conseqüente a diminuição do processo de reabsorção óssea. Por outro lado, os compostos nitrogenados, mais recentes e potentes, como por exemplo, o pamidronato, ibandronato, alendronato e zoledronato, inibem a diferenciação dos osteoclastos e induzem os osteoblastos a produzir o agente inibidor dos osteoclastos, ocorrendo a diminuição da reabsorção óssea. O metabolismo ósseo é dependente dos processos de reabsorção e deposição, assim a remodelação óssea é prejudicada. Entretanto o tecido ósseo

permanece mineralizando e podendo se tornar frágil, quebrável e menos flexível (RUGGIERO; WOO, 2008).

Essas substâncias são grandes inibidoras da reabsorção óssea conduzida pelos osteoclastos (MARTINS *et al.*, 2009). e são efetivas no aumento da apoptose e na redução da atividade dos osteoclastos (GEGLER *et al.*, 2006).

Tabela 1. Estrutura química de alguns bisfosfonatos

Bisfosfonato	R1	R2
Não-nitrogenados		
Clodronato	Cl	Cl
Etidronato	OH	CH ₃
Nitrogenados		
Pamidronato	OH	(CH ₂) ₂ NH ₂
Alendronato	OH	(CH ₂) ₃ NH ₂
Neridronato	OH	(CH ₂) ₅ NH ₂
Olpadronato	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂
Ibandronato	OH	(CH ₂) ₂ N(CH ₃)(CH ₂) ₄ CH ₃
Risedronato	OH	CH ₂ -3-piridina
Zoledronato	OH	CH ₂ -imidazol

Fonte: Adaptado de FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005

Todos os BFs possuem propriedades físico-químicas e farmacocinéticas semelhantes. Os BFs possuem pouca absorção gastrointestinal devido a sua baixa afinidade lipídica. Aproximadamente 50% dos BFs são retidos pelos ossos, e os BFs circulantes desaparecem do plasma rapidamente, e são excretados pelos rins na sua forma inalterada, não sendo metabolizados pelo fígado (FLEISH, 1991; BERRUTI *et al.*, 2001). A meia vida plasmática dos BFs pode chegar a aproximadamente 10 anos, e seu uso prolongado pode resultar em acúmulo substancial nos ossos (RUGGIERO; WOO, 2008).

Os BFs tem a capacidade de inibir a reabsorção óssea, ou seja, inibir o processo pelo qual a estrutura óssea é dissolvida e digerida pelos ácidos e enzimas produzidos pelos osteoclastos. Uma vez que o BF é assimilado pelo osteoclasto, este fica incapacitado e a reabsorção diminui (PAPAPOULOS, 2008).

Os BFs se ligam fortemente à hidroxiapatita da superfície óssea e agem preferencialmente em sítios de grande formação e remodelação óssea. Os BFs podem inibir a precipitação dos fosfatos de cálcio, causar regressão da transformação da fase amorfa da hidroxiapatita para a fase cristalina e inibição da dissolução (CARVALHO *et al.*, 2010).

2.3 Bisfosfonatos – Indicações Clínicas

Desde 1960, os BFs são os medicamentos mais prescritos nos tratamentos de doenças ósseas, tanto benignas quanto malignas, como segue (BROWN; ROBBINS, 1999; GREEN, 2000):

- Tratamento da hipercalcemia (induzida por tumor);
- Tratamento da dor óssea;
- Redução de complicações esqueléticas em pacientes com metástases ósseas ou mieloma múltiplo;
- Tratamento de doença de Paget óssea;
- Tratamento da osteoporose;
- Prevenção da perda óssea causada por tratamento com glicocorticoides;
- Aumento da densidade óssea na fibrodisplasia;
- Alívio dos sintomas da osteogênese imperfeita.

Os BFs são comercializados como dois tipos de administração, por via oral e parenteral. A via oral é prescrita para o tratamento da osteoporose, doença de Paget, alívio dos sintomas da osteogênese imperfeita. Os BFs administrados por via parenteral são utilizados na hipercalcemia, mieloma múltiplo, tumores sólidos com metástase óssea e prevenção da perda óssea (SCARPA *et al.*, 2010).

Os BFs mais utilizados são o etidronato, clodronato, alendronato, risedronato, ibandronato, pamidronato e ácido zoledrônico (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005). Embora os BFs tenham grande e importante aplicação clínica, muitos também são os efeitos adversos reportados, tais como efeito tipo gripal, astenia, anemia, sintomatologia gastrointestinal, dispneia, cefaleia, ansiedade, conjuntivite, visão turva, anorexia, edema, elevação dos níveis de creatinina, insuficiência renal e úlceras esofágicas (MIGLIORATI *et al.*, 2005; GEGLER *et al.*, 2006).

As complicações orais resultantes do tratamento com BFS vêm sendo um assunto de grande desafio para clínicos e pesquisadores. Entre elas merece

destaque a osteonecrose maxilar, um efeito adverso de grande significância declarado em pacientes que utilizaram BFs (MARX, 2003; MIGLIORATI, 2003; WOOD *et al.*, 2002). A maioria dos pacientes que reportam este efeito adverso eram portadores de mieloma múltiplo ou de neoplasias com metástases, em geral de mama, próstata e pulmão, que foram tratados com BF intravenoso (RUGGIERO *et al.*, 2004; WOOD *et al.*, 2002; MARX *et al.*, 2007).

2.4 Osteonecrose Maxilar Associada à Terapia dos Bisfosfonatos

Em 2003, foram relatados os primeiros casos de osteonecrose dos maxilares associada à terapia dos bisfosfonatos (ONMAB), tornando este o primordial entre os efeitos colaterais possíveis desta classe de medicamentos e também um importante assunto a ser discutido (MARX *et al.*, 2003).

A Associação Americana de Cirurgiões Maxilofaciais e Orais definiu três características necessárias para que uma lesão óssea seja diagnosticada como ONMAB: paciente está ou foi submetido à terapia com BFs; exposição de osso necrótico nos maxilares persistindo por mais de oito semanas e nenhuma história de irradiação sobre os maxilares (AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS, 2007).

A ONMAB foi constatada por Marx (2003) e por Ruggiero *et al.* (2004) principalmente na mandíbula. Os BFs agrupam-se na estrutura óssea, degradando-se lentamente. A mandíbula apresenta um elevado *turnover* e uma grande tendência em acumular o fósforo, devido as suas características anatômicas e fisiológicas, especificamente, menor vascularização, bem como o caráter terminal da artéria mandibular, o que justifica a lesão preferencial nesse local (BOYDE, 2006; CARVALHO *et al.*, 2008). Assim, a necrose óssea seria a incapacidade do tecido ósseo se reparar e remodelar diante a quadros inflamatórios decorrentes de estresse fisiológico (mastigação), trauma iatrogênico (prótese mal adaptada), procedimentos cirúrgicos ou infecções odontogênicas (MARX, 2003; MARTINS *et al.*, 2009; BOZENA; HRVOJE; MARIJANA, 2011). Os pacientes com ONMAB podem ser classificados clinicamente em três estágios com a finalidade de estabelecer um tratamento satisfatório para as variadas formas de osteonecrose. O Estágio 1 se caracteriza pela exposição e necrose óssea assintomática; no Estágio 2, há exposição e necrose óssea associada à dor e infecção; já no Estágio 3 observa-se o

tecido ósseo necrótico e exposto em pacientes com dor, infecção, fratura patológica, fístula extraoral e extensa osteólise (RUGGIERO *et al.*, 2009).

A osteonecrose da maxila ou mandíbula pode ser diagnosticada por radiografias. Entretanto, a osteonecrose menos avançada ou que abrange pequenas áreas de exposição óssea (< 1 cm) podem ser, muitas vezes, indetectáveis em radiografias panorâmicas, mas em tomografias podem mostrar sinais de destruição óssea (VAN POZNAK; ESTILO, 2006).

Após a osteonecrose ser diagnosticada, existe limitação na melhor conduta terapêutica. A permanência ou a interrupção do fármaco por um tempo ainda é uma dúvida não esclarecida. Entretanto, devido à longa meia-vida do BF no osso, a sua interrupção parece ser de pouco proveito em curto prazo (RINCON *et al.*, 2007). O tratamento ainda não é consensual, não são completamente eficazes, e variam de acordo com a gravidade do caso. Em casos assintomáticos, podem-se utilizar soluções antimicrobianas, além de rigoroso controle clínico e radiográfico, e uso de antibióticos sistêmicos. Quando há presença de sintomas, a solução consiste em curetagem, debridamento, irrigação constante com solução antimicrobiana e manutenção de antibioticoterapia (MARTINS *et al.*, 2009). Muitos clínicos defendem a ideia de que qualquer intervenção cirúrgica, embora limitada, pode aumentar mais as áreas de osso exposto ou necrosado. Além disso, a intervenção cirúrgica pode ser uma via de penetração de novos microrganismos (COSSIO *et al.*, 2008).

Mesmo a doença estando controlada, os pacientes têm uma pobre qualidade de vida em função das complicações bucais (como dor, infecção, fístula). Assim, uma vez que os tratamentos convencionais para osteonecrose induzida por bisfosfonatos não são totalmente eficazes, e são paliativos, o estudo de biomateriais que pudessem estimular o crescimento ósseo, agindo assim na cicatrização dos tecidos e na reparação óssea, seriam de grande importância para melhorar a qualidade de vida aos pacientes.

2.5 Biomateriais – Scaffolds

A engenharia de tecidos, campo interdisciplinar que integra tecnologia e ciência, tem utilizado muitos biomateriais para manter, reparar ou melhorar as funções teciduais. Os biomateriais podem ser definidos como qualquer substância, ou combinação de substâncias, que possa ser utilizada por qualquer que seja o período de tempo, aumentando, substituindo ou controlando parcial ou totalmente

qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Mais do que ser simplesmente compatível com as células hospedeiras e servir como papel estrutural, os biomateriais podem direcionar células através de sinais do microambiente (HUBBELL, 1995; DAVIS *et al.*, 2005).

Dentre os biomateriais, os *scaffolds* – arcabouços ou suportes de estruturas tridimensionais – desempenham um papel importante durante a regeneração dos tecidos. Os *scaffolds* permitem a penetração de células e nutrientes, bem como a fixação, migração, diferenciação, proliferação e crescimento das células, além da remoção de resíduos metabólicos (SHIN, JO, MIKOS, 2003).

Segundo Thompson *et al.* (1995) e Lu; Mikos (1996), alguns requisitos que os *scaffolds* devem possuir são:

- Ser biocompatível, ou seja, o material do *scaffold* e os seus produtos de degradação não podem provocar uma resposta do sistema imune nos organismos ou ser metabolizado em substâncias tóxicas;
- Ter propriedades mecânicas adequadas, ou seja, o *scaffold* deve possuir uma resistência mecânica suficiente para suportar tensões existentes no ambiente onde é implantado;
- Ter uma degradação controlada, já que os tecidos biológicos têm diferentes taxas de regeneração. A taxa de degradação do *scaffold* tem que ser ajustada ao tecido a reparar, tendo sempre em conta que as propriedades mecânicas deste também diminuem com a degradação;
- Ter tamanho e morfologia dos poros apropriados, e poros altamente interconectados. O tamanho e a estrutura dos poros são fatores com grande importância no transporte de nutrientes para células transplantadas e regeneradas. Não há consenso sobre o tamanho dos poros ideal para o crescimento ótimo das células, mas se aceita que o tamanho depende do tecido a reparar/substituir. No caso da regeneração óssea, por exemplo, Seitz *et al.* (2009) defendem que o crescimento máximo do tecido é atingido com poros de tamanhos variando de 200-450 μm . Além disso, a interconectividade entre os poros é altamente desejável quando em comparação com os poros isolados, uma vez que uma estrutura de poros interligados aumenta as taxas de difusão e facilita a vascularização, melhorando assim, o transporte de nutrientes e oxigênio e a remoção de resíduos.
- Ter propriedades químicas da superfície apropriadas para adesão. Cada célula necessita de diferente substrato para se proliferar e se diferenciar. Logo a

proliferação tem um papel fundamental na adesão celular, sendo comum que os *scaffolds* recebam tratamentos superficiais para melhorar esta característica;

- Ser de fácil esterilização, pois antes de poder ser implantado no organismo, o *scaffold* deverá ser esterilizado, e devem permanecer inalterados;
- Ser de fácil processamento em variadas formas tridimensionais. Muitas vezes, os *scaffolds* são aplicados em locais de formatos irregulares e complexos; logo os *scaffolds* devem ser de fácil e versátil fabricação.

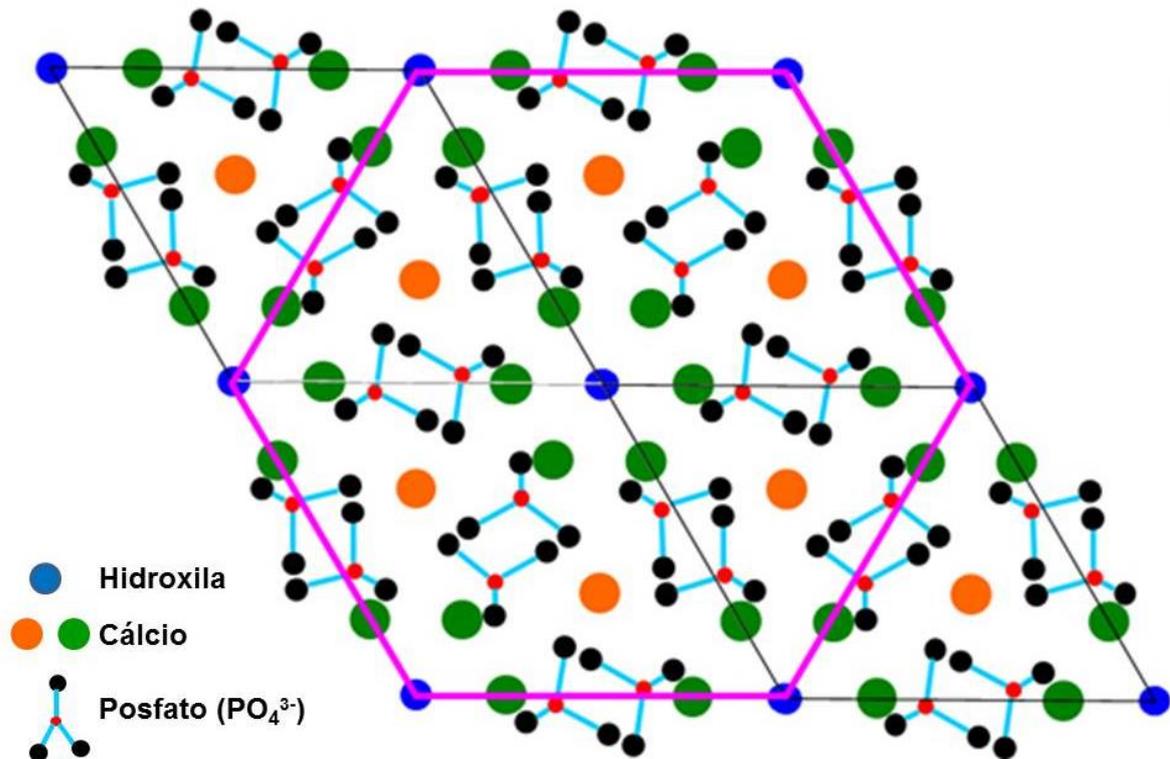
Ao simular a composição química e estrutura natural dos ossos, os *scaffolds* são muito aceitáveis na obtenção de novos biomateriais para reparação e regeneração óssea, com propriedades físico-químicas e bioatividade adequadas. Abaixo estão sumarizados os principais compostos utilizados na produção de *scaffolds*.

2.5.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita refere-se ao mineral apatita (fosfato de cálcio cristalino) e ao grupamento hidroxila (OH). A apatita é um fosfato de cálcio constituído de três elementos químicos principais, o cálcio (Ca), o fósforo (P) e o oxigênio (O). A hidroxiapatita possui a fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ELLIOT, 1994). A Figura 4 ilustra o arranjo de uma célula unitária da hidroxiapatita. É organizada em uma estrutura hexagonal, e sua célula unitária é formada por 10 íons de Ca, localizados em dois sítios. Um dos sítios, o Ca está representado em verde, com seis íons organizados em triângulos; e no outro sítio o Ca está representado em laranja, com quatro íons organizados em colunas (a figura permite somente a identificação de um cálcio devido ao plano da figura).

A hidroxiapatita é um constituinte mineral natural encontrado nos ossos, representando de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (FOOK, 2010). É um material com ótima característica de biocompatibilidade devido à semelhança com os constituintes minerais dos ossos e dentes humanos. A capacidade de osteointegração da hidroxiapatita proporciona o crescimento ósseo, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses (BILLOTTE, 2006).

Figura 4. Representação da rede cristalina de uma célula unitária de hidroxiapatita



Fonte: Adaptada e traduzida de <http://www.iupui.edu/~bbml/boneintro.shtml>. Acesso em 16 de outubro de 2016

Já a capacidade de bioatividade estabelece ligações químicas entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo, permitindo a proliferação dos osteoblastos e fibroblastos. A estrutura da hidroxiapatita permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com muita facilidade, obtendo assim reserva de cálcio e fósforo (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A degradação é mais uma vantagem da hidroxiapatita, ocorrendo de forma semelhante à degradação natural do tecido ósseo, por osteoclastos. Em se tratando de *scaffold* produzido com hidroxiapatita, a degradação ocorre a medida que o tecido ósseo é formado no interior dos poros do *scaffold* (OLSSON; PIPPI; TOGNOLI, 2008). Diversos estudos clínicos e experimentais demonstraram a eficácia da hidroxiapatita na regeneração de defeitos ósseos (OCHOA, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2012; VITAL *et al.*, 2006).

Ochoa (2013) avaliou a hidroxiapatita e a policaprolactona em defeitos ósseos induzidos por alendronato no olecrano de coelhos. O autor obteve resultados satisfatórios, pois os compósitos mostraram-se eficientes no reparo de defeitos

ósseos de coelhos, além de apresentar biocompatibilidade, degradação adequada e capacidade de integrar o osso.

Já Azevedo *et al.* (2012) avaliaram diferentes proporções de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo de coelhos através de estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. Os resultados obtidos nesse experimento permitiram que os autores certificassem que as quatro concentrações utilizadas do material mostraram-se biocompatíveis, pois nenhum animal apresentou rejeição aos enxertos.

Outro estudo verificou compósito de hidroxiapatita sintética e carbono, e compósito de hidroxiapatita sintética, carbono e fosfato biácido de sódio, ambos na forma sólida, como substituto ósseo em coelhos adultos. Os autores concluíram que ambos os tipos de hidroxiapatita mostraram-se biocompatíveis, por não ter havido, em nenhum dos animais, qualquer indício de rejeição do implante ou de reação inflamatória (VITAL *et al.*, 2006).

2.5.2 Quitosana

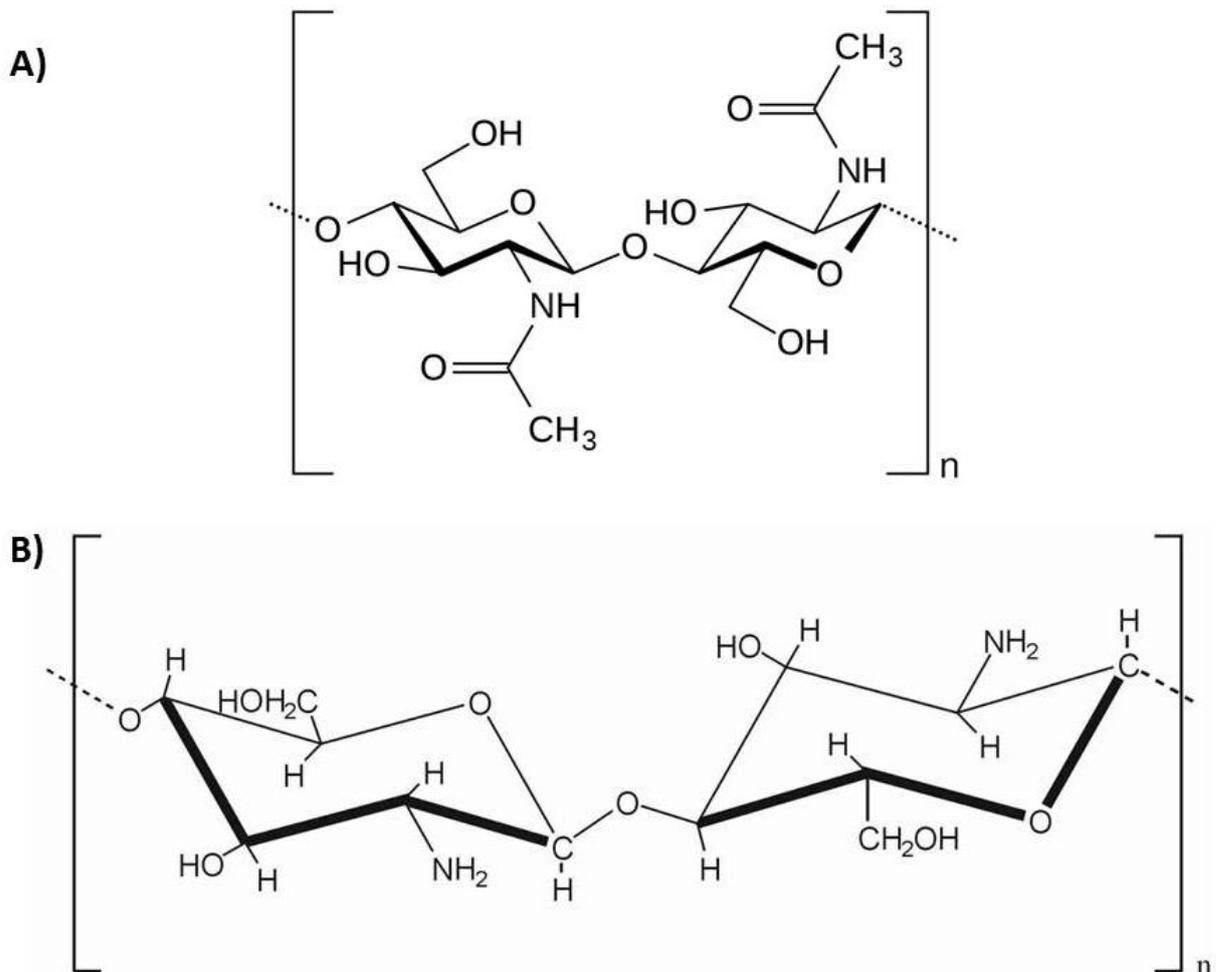
Dentre os biomateriais de origem natural utilizados para a produção de scaffolds se encontram a quitosana. A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina (é a forma desacetilada da quitina). Ambas a quitina e a quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis, cujas propriedades vêm sendo exploradas para aplicações na área alimentícia, biotecnologia, ciência dos materiais, produtos farmacêuticos, agricultura, proteção ambiental, e também na engenharia de tecidos (ROBERTS, 1992; THARANATHAN, 2007).

Tanto a estrutura da quitina quanto da quitosana são constituídas por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Entretanto, na quitosana há o predomínio do segundo tipo de unidade (Figura 5). A quantidade das duas unidades na quitosana é variada pelo tratamento alcalino que é dado no material (YOUNES; RINAUDO, 2015; RAVI, 2000).

A quitosana possui uma estrutura molecular similar à fibra vegetal celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais, em que os grupos hidroxila (OH) estão dispostos na estrutura geral da celulose e grupos amino (NH₂) na quitosana (KEAN; THANOU, 2010).

As principais fontes da quitina/quitosana são as carapaças de crustáceos (camarão, caranguejo e lagosta), sendo encontrado também no exoesqueleto de insetos e parede celular de alguns fungos. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e comumente rejeitados pela indústria pesqueira, que as consideram muitas vezes como poluentes (RAVI, 2000).

Figura 5. Representação das estruturas de quitina e quitosana pelas unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (em A) e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (em B). O “n” é o grau de polimerização da estrutura

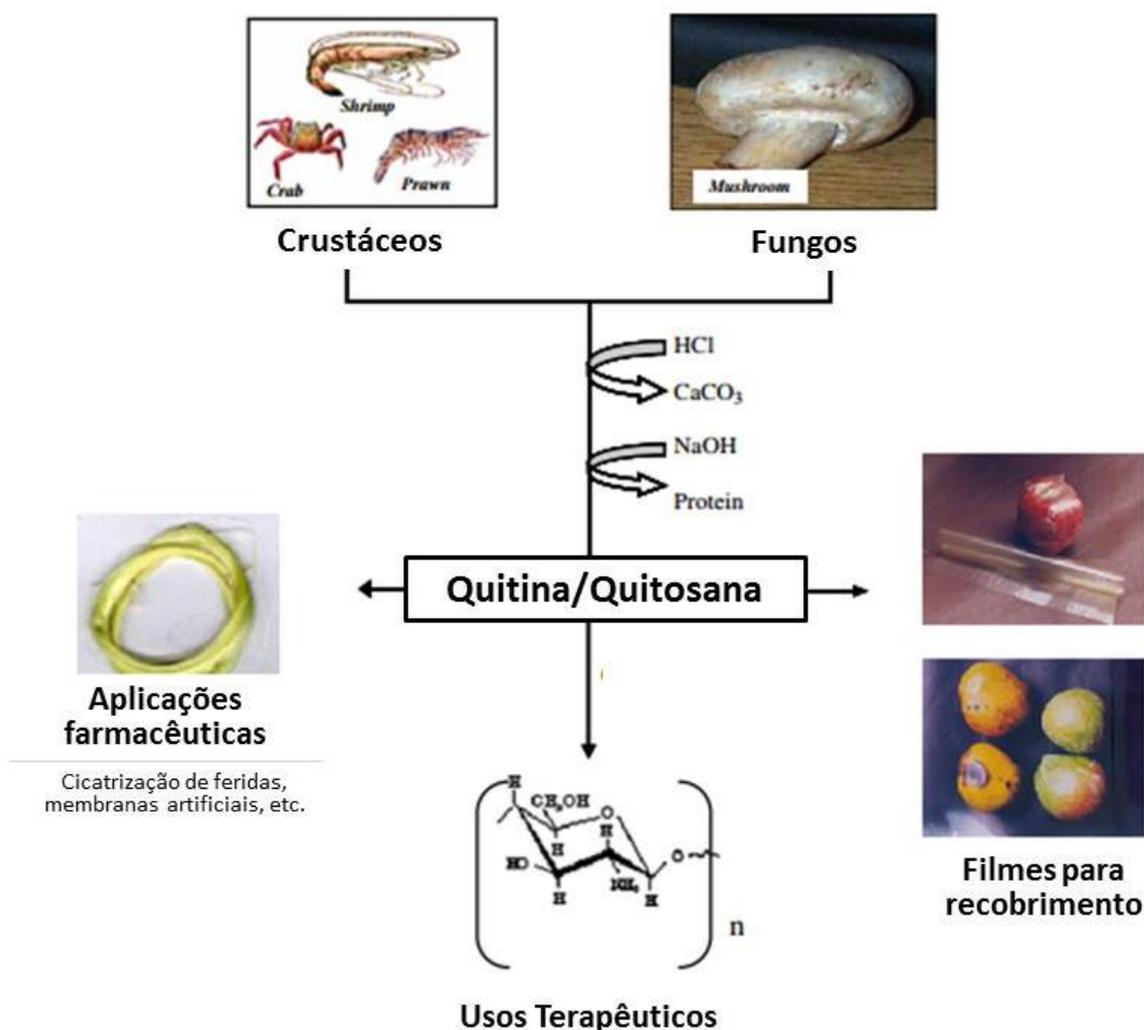


Fonte: Adaptado de BATISTTI; CAMPANA, 2008

A quitina é separada de outros componentes do exoesqueleto dos crustáceos e fungos por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteinização das carapaças com soluções diluídas de hidróxido de sódio

(NaOH) e ácido clorídrico (HCl). Após, segue-se com a descoloração. A quitina obtida, contendo grupamentos acetil (NHCOCH_3), é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo assim a quitosana, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6. Produção de quitina e quitosana a partir de exoesqueleto de crustáceos e fungos, e seus empregos



Fonte: Traduzido e adaptado de HARISH; THARANATHAN, 2007

A quitina/quitosana tem um custo econômico baixo, pela sua abundância na natureza e por ser extraída de fontes renováveis. Sua extração contribui ainda com a redução do impacto ambiental, devido a sua grande exploração em aplicações diversificadas, diminuindo o acúmulo dos resíduos rejeitados (RAVI KUMAR, 2000).

A quitosana é muito utilizada na engenharia de tecidos devido à facilidade de obtenção de estrutura porosa, à possibilidade de formação de géis, à boa associação com outros materiais (como hidroxiapatita, cerâmica, gelatina) ao fato de ser biorreabsorvível, possuir atividade antibacteriana além de apresentar superfície hidrofílica, característica muitas vezes ausente em muitos polímeros sintéticos. A quitosana é utilizada na fabricação de muitos *scaffolds* para obter um efeito potencializado no reparo do tecido ósseo (SEOL, *et al.* 2004; DASH *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2012; YOUNES, RINAUDO, 2015).

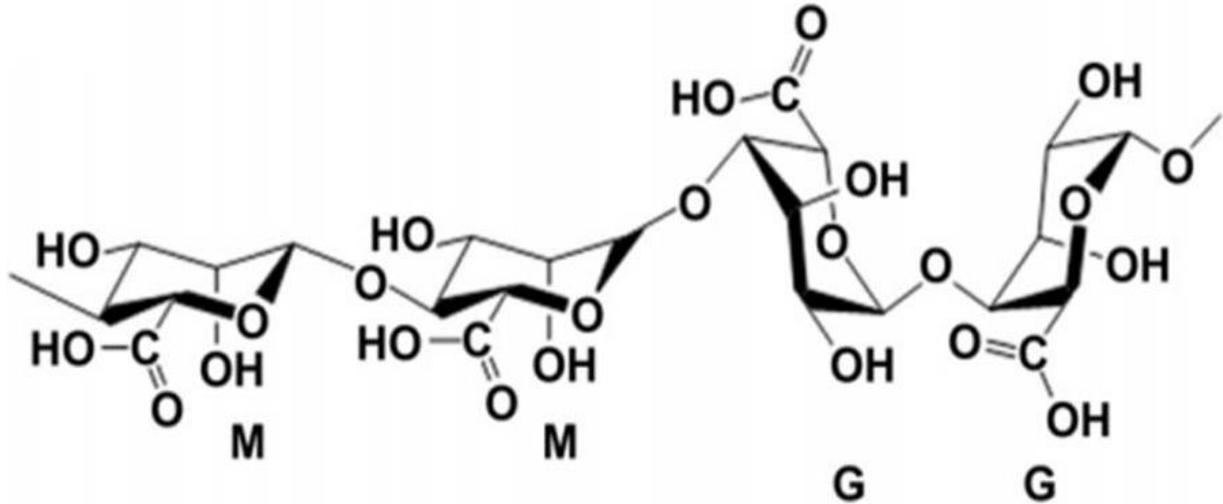
Miranda *et al.* (2012) avaliaram um *scaffold* a base de quitosana e gelatina *in vivo*. Entretanto, neste *scaffold* foram implantadas células-tronco mesenquimais de matriz óssea. Os animais tiveram seus molares extraídos, e na cavidade da extração a estrutura (*scaffold* + células) foi implantada. Os autores observaram que o *scaffold* auxiliou na regeneração epitelial, vascular e óssea e acelerou processo de maturação do tecido ósseo.

2.5.3 Alginato

O alginato é um biopolímero linear constituído dos polissacarídeos ácido α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4 (VENKATESAN *et al.*, 2015). A proporção de cada polissacarídeo varia, bem como o grau de polimerização, o que faz com que o alginato se diversifique extensamente. Desta forma, o material pode apresentar sequências alternadas de resíduos manurônicos (M) / gulurônicos (G), e blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G (Figura 7). A composição química e a sequência dos resíduos M e G dependem da qual fonte o alginato foi extraído (PAWAR, EDGAR, 2012).

O alginato é um componente importante das algas pardas (*Laminaria* sp., *Macrocystis* sp., *Lessonia* sp., dentre outras) e também é um exopolissacarídeo produzido por bactérias (como a *Pseudomonas aeruginosa*) (PAWAR, EDGAR, 2012; VENKATESAN *et al.*, 2015).

Figura 7. Conformação da cadeia estrutural do alginato, em que M corresponde ao polissacarídeo ácido β -D-manurônico e G corresponde ao ácido α -L-gulurônico



Fonte: PAWAR; EDGAR, 2012

Esse biopolímero tem sido muito utilizado na indústria de alimentos, cosméticos e medicamentos por oferecer vantagens como biocompatibilidade, hidrofiliabilidade e biodegradabilidade em condições biológicas normais (SANKALIA *et al.* 2007, SAETHER *et al.*, 2008). Na biomedicina, a utilização do alginato tem se dado no tratamento de feridas (BOATENG *et al.*, 2008) e, em especial, na bioengenharia de tecidos, com boa propriedade de formação de scaffold para tratamento de perda ou falha de órgãos (VENKATESAN *et al.*, 2015).

O alginato tem capacidade de formar géis pelo método de geleificação ionotrópica, cujas características dependem da proporção M/G e do número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. Os géis são formados na presença de cátions divalentes, como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , e de resíduos gulurônicos. A interação entre o alginato (blocos gulurônicos) e os cátions divalentes se dá pelo modelo denominado “caixa de ovos”, em que os cátions são quelados pelo alginato, formando os hidrogéis (LEE; MOONEY, 2012; PAWAR, EDGAR, 2012). As características do gel podem ser resumidas em sua porosidade e resistência mecânica necessária ao processo.

Tanto o alginato como a quitosana e a hidroxiapatita têm sido utilizados em combinação entre eles e ainda com outros materiais. O alginato com a quitosana]

sana, por exemplo, formam um complexo que confere maior resistência mecânica ao gel devido à forte interação entre as cadeias poliméricas (HAMMAN, 2010). Vários trabalhos reproduzindo essa combinação já foram reportados (REBELO, 2015; SANTOS, 2015; FREITAS, 2007), sempre no intuito de melhorar as características físico-químicas dos bioprodutos, bem como aprimorar sua biocompatibilidade para aplicação médica.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar a implantação de *scaffolds* a base de quitosana, alginato de sódio e hidroxiapatita na prevenção da osteonecrose maxilo-mandibular induzida por bisfosfonato.

3.2 Específicos:

- Estabelecer um modelo experimental de osteotomia;
- Induzir a degeneração em tecido ósseo utilizando o modelo de osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonato em ratos;
- Avaliar a eficácia do uso do *scaffold* na prevenção da regeneração do tecido ósseo através da análise radiológica e histopatológica;
- Avaliar a segurança do uso do *scaffold* através de marcadores bioquímicos, hepáticos, renais e hematológico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção dos *Scaffolds*

Este estudo foi concebido a partir da dissertação de mestrado da aluna Márcia de Araújo Rebelo, cujo objetivo foi desenvolver *scaffolds* e avaliar suas propriedades físico-químicas e biológicas *in vitro* (REBELO, 2015). Uma vez que o estudo revelou resultados promissores para uma possível aplicação dos *scaffolds* para regeneração óssea, partiu-se para o estudo *in vivo*. Assim, dois *scaffolds* desenvolvidos foram escolhidos, com base nas suas melhores propriedades físico-químicas: *scaffolds* contendo quitosana/alginato de sódio /hidroxiapatita (Ch/NaAlg/Hap) nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6.

Assim, as dispersões aquosas contendo quitosana (Ch) (4% m/v) e alginato de sódio (NaAlg) (4% m/v) foram obtidas, separadamente, sob agitação mecânica (7.200 rpm, 10 min) usando elemento dispersor 25G (Ultra Turrax IKA - T-25D, Staufen, Germany). A hidroxiapatita (Hap) foi padronizada em tamis (mesh 60) e adicionada lentamente à dispersão aquosa de NaAlg sob agitação mecânica (7.200 rpm, 10 min.). A dispersão de Ch foi adicionada à mistura de NaAlg/Hap, nas mesmas condições, até completa homogeneização. A Hap foi incorporada na formulação nas razões (m/m) de 1:1:0,2 e 1:1:0,6 (Ch:NaAlg:Hap).

Para obtenção dos *scaffolds* cerca de 3 g de cada formulação foi transferida para molde cilíndrico com capacidade volumétrica para 7 cm³, congeladas a -80 °C (Ultra-freezer Cold Lab, Piracicaba, Brasil) e liofilizadas (Thermo Fisher Scientific – modulyoD 115, Massachusetts, USA) (pressão inicial 999 mbar - pressão final aproximada de 53 mbar). As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo a luz. Dois dias antes da implantação dos *scaffolds*, eles foram expostos à radiação ultravioleta por 2 horas, para esterilização contra bactérias ou fungos, que possam levar a infecções graves nos animais.

4.2 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi apresentada à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Uniso) para análise, segundo a Lei Nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008, e foi aprovada sob Protocolo número 055/2015 (Anexo 1). Todos os experimentos foram

realizados de acordo com as diretrizes internacionais - *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)* (KILKENNY *et al.*, 2010).

4.3 Manutenção e manipulação dos animais

Durante o período de estudos, os animais foram mantidos em isoladores microambientais, de tamanho 33,7x48,3x25,3 cm (Alesco[®]), acomodados sobre estantes ventiladas. Na permanência dos animais no biotério, o ambiente foi controlado com ciclo alternado de claro e escuro, a cada 12 horas, e a temperatura local foi mantida em $22 \pm 2^{\circ}$ C. A umidade foi mantida em $50 \pm 5\%$, e a troca de ar era controlada automaticamente pelo sistema Alesco *VentiLife*[®] (o ar dos isoladores microambientais é filtrado e lançado para fora da sala).

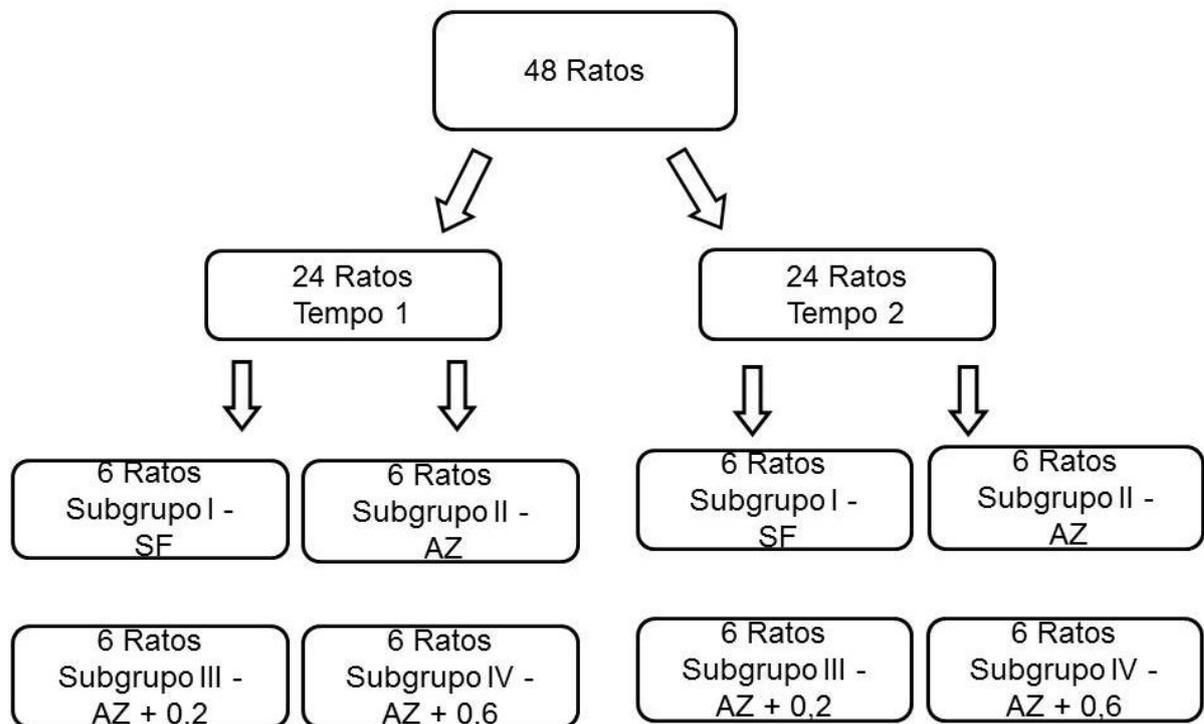
Os animais receberam dieta padrão comercial e água filtrada *ad libitum*. Como enriquecimento ambiental, tubos de papelão foram colocados em todos os isoladores, conforme necessidade. As caixas foram limpas três vezes na semana. A identificação dos grupos foi feita nos isoladores (plaquinhas de identificação) e nos animais, através de numeração na cauda.

4.4 Delineamento experimental

O conjunto dos animais foi composto por 48 ratos machos da linhagem Wistar, com cerca de 45 ± 2 dias e peso entre 200-240g. Os animais foram adquiridos do laboratório Anilab (Animais de Laboratório, Criação e Comércio LTDA - Paulínia/SP), e foram mantidos no biotério de experimentação animal do Laboratório de Pesquisa Toxicológica (Lapetox-Uniso). Após sua chegada, os animais foram aclimatados por uma semana, antes do início do experimento.

Os animais foram divididos aleatoriamente (utilizou-se tabela de números aleatórios para esta divisão) em 2 grupos ($n=24$ cada grupo), classificados em Tempo 1 e Tempo 2, como mostra a Figura 8.

Figura 8. Diagrama esquemático da divisão dos animais, sendo: SF o soro fisiológico; AZ o ácido zoledrônico; AZ + scaffolds 0,2 e AZ + scaffolds 0,6. Proporção de hidroxiapatita 0,2 e 0,6



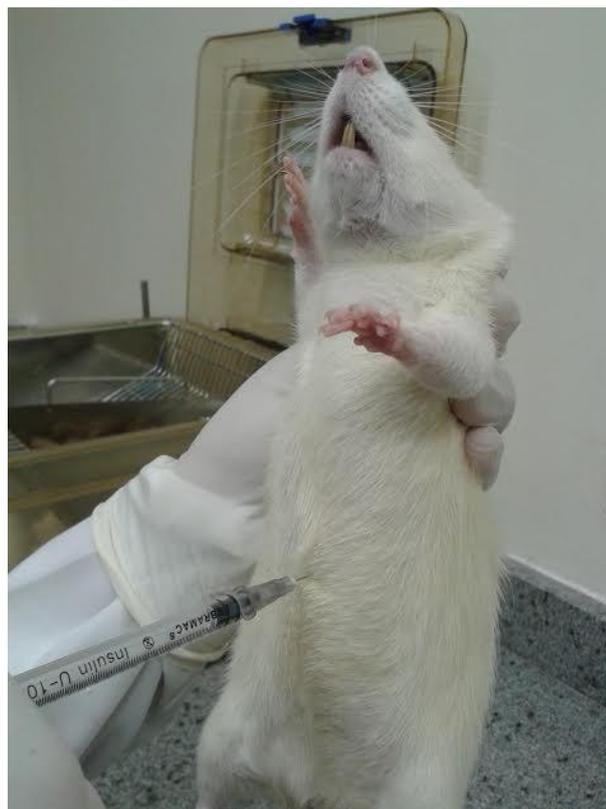
Fonte: Elaboração própria.

O subgrupo I, chamado de controle, recebeu apenas solução fisiológica. Os subgrupos II, III e IV receberam AZ (Zometa[®], Novartis AG, Basileia, Suíça) (Figura 9). Antes da administração do fármaco, os animais foram pesados em balança digital eletrônica. A massa corpórea foi registrada para cálculo da dose (0,6 mg/Kg). O ácido zoledrônico foi administrado três vezes, em intervalos de 28 dias, nos tempos zero, 28 e 56 dias, segundo as recomendações do fabricante.

Figura 9. Ácido zoledrônico (Zometa®)

Fonte: Elaboração própria

O ácido zoledrônico foi administrado por via intraperitoneal (IP) com seringa hipodérmica (1 mL) e agulha 13x4,4 mm (Figura 10).

Figura 10. Administração do medicamento por via intraperitoneal

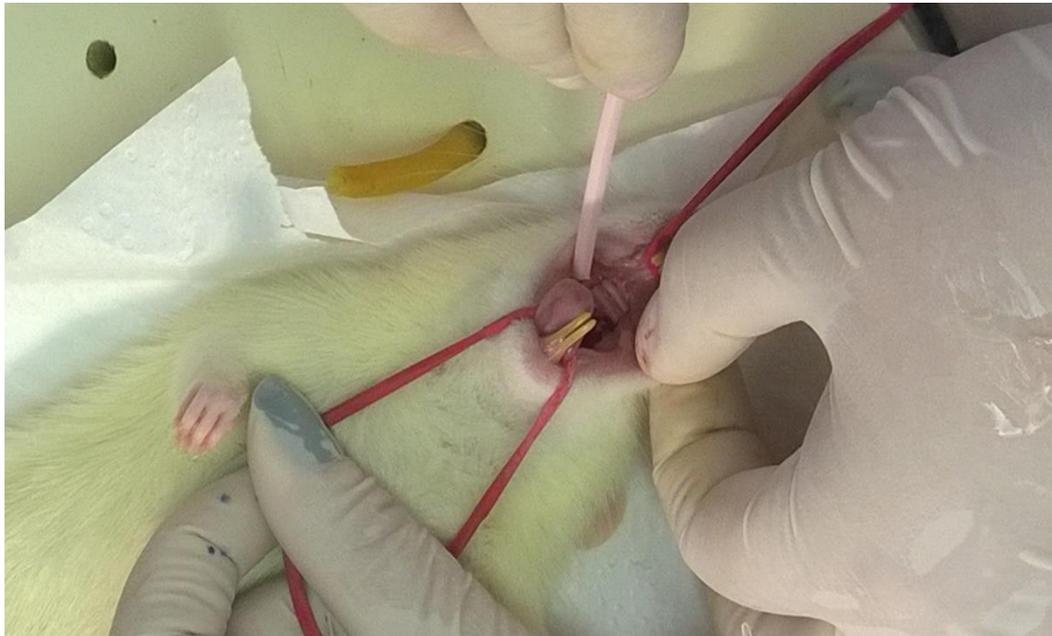
Fonte: Elaboração própria

4. 5 Procedimento cirúrgico odontológico (exodontia e osteotomia)

Todos os animais foram submetidos à exodontia dos molares superiores do lado esquerdo. A exodontia dos molares da maxila (segundo e terceiro molar) foi realizada sete dias após a segunda administração do AZ, ou seja, no 35º dia de permanência dos animais no biotério.

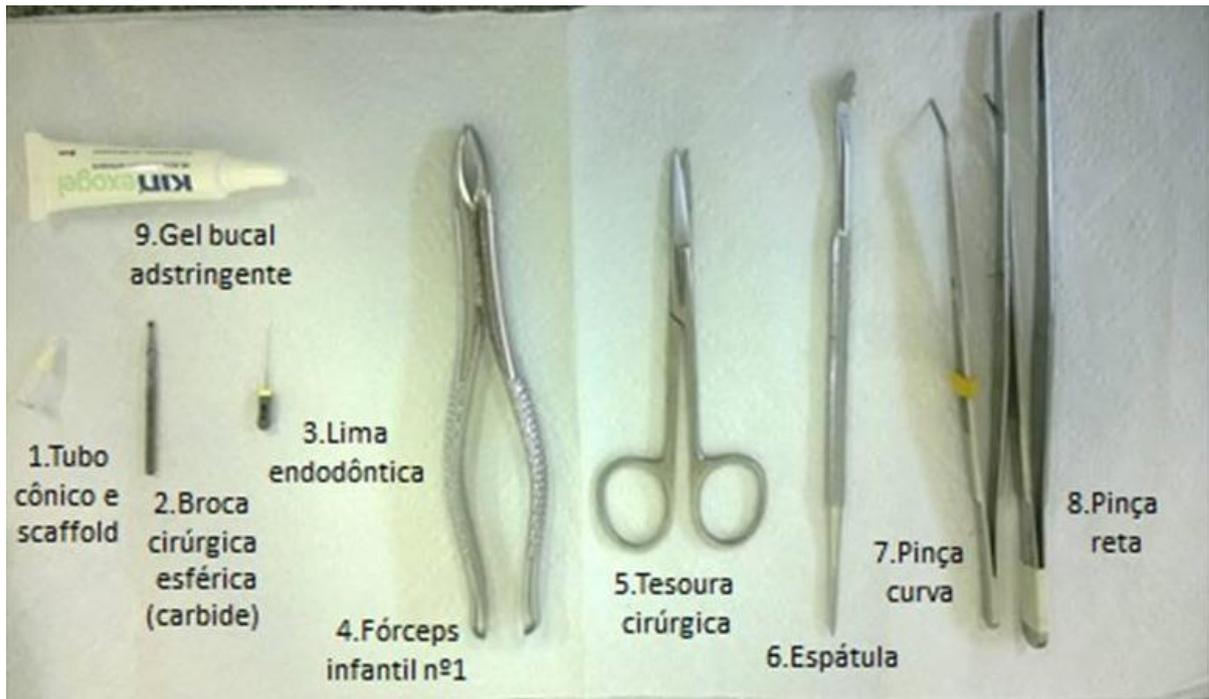
Para este procedimento cirúrgico, todas as bancadas foram higienizadas com álcool 70%, e cada animal foi anestesiado com xilazina (10 mg/Kg) e quetamina (90 mg/Kg), intramuscular. Após anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma superfície de madeira revestida com material impermeável e sanitizada com álcool 70%. A abertura da boca foi mantida com elásticos ancorados nos dentes incisivos superiores e inferiores (Figura 11).

Figura 11. Abertura da cavidade oral, realizada com elásticos ancorados nos dentes incisivos



Fonte: Elaboração própria

Os molares foram descolados com esculpador *hollemback* (3s), luxados e removidos com fórceps infantil número 1, com ponta ativa adaptada. Alguns dos instrumentos utilizados no procedimento estão apresentados na Figura 12.

Figura 12. Instrumentais utilizados no procedimento

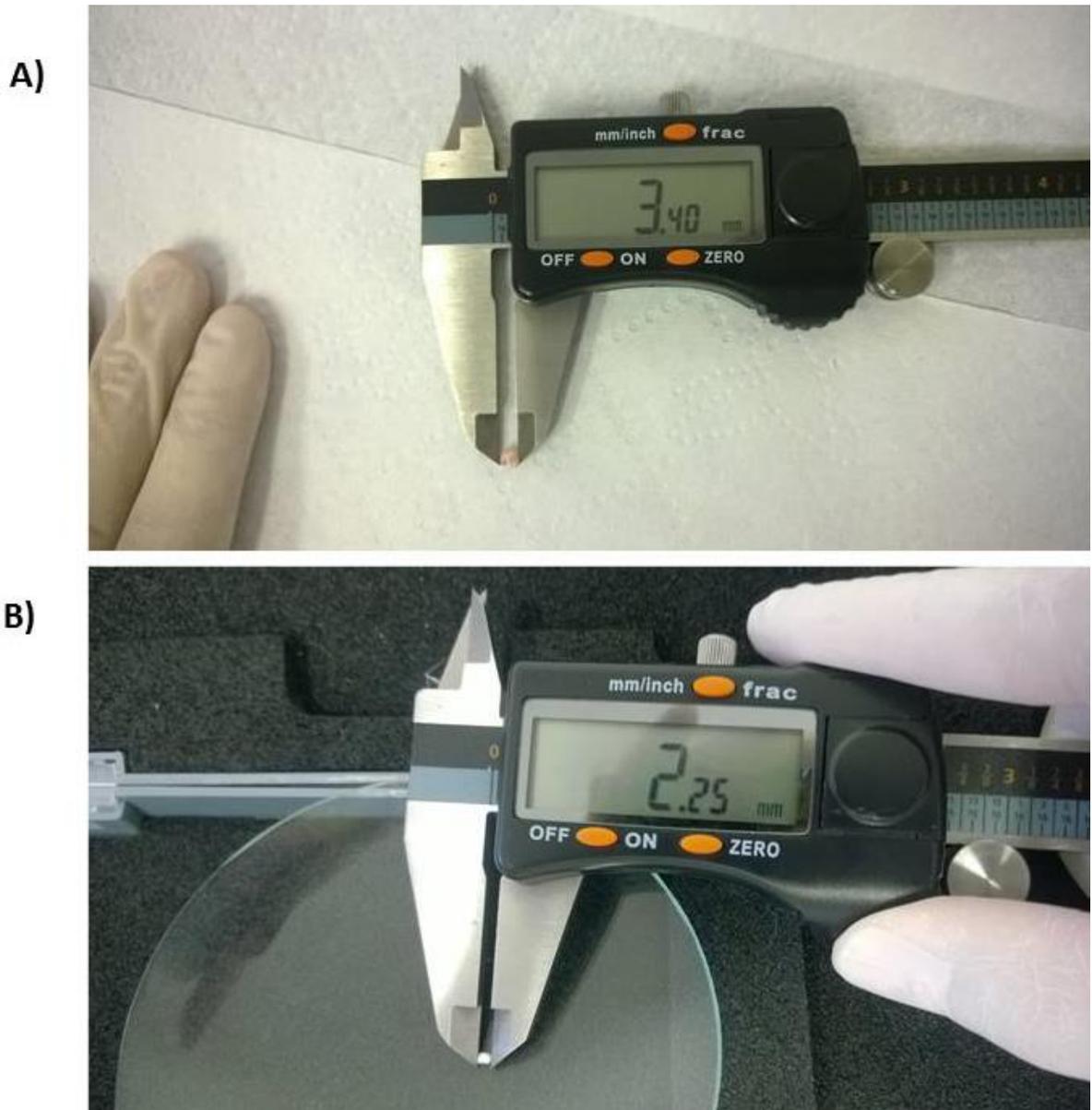
Fonte: Elaboração própria

Inicialmente, o *scaffold* seria inserido na cavidade resultante da extração dos molares. Entretanto, tendo em vista as dimensões dentárias, a loja cirúrgica formada foi pequena e pouco profunda, incompatível com a inserção do *scaffold*. O tamanho do dente foi compatível com o tamanho do *scaffold* produzido (Figura 13), porém a cavidade não foi profunda o suficiente. Diante disso, houve a necessidade de se realizar um desgaste ósseo, denominado de osteotomia, ao lado da cavidade cirúrgica. A osteotomia foi feita com a broca cirúrgica esférica (Carbide), e na cavidade local foi inserido o respectivo *scaffold*.

No alvéolo cirúrgico foi realizada compressão local com gaze para estabilização do coágulo, sem necessidade de sutura. Entretanto, para a fixação do *scaffold* no osso, utilizou-se gel bucal bioadesivo adstringente (Kin[®] exogel).

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em sala a $25 \pm 2^\circ$ C, e ao acordarem foram transferidos para seus respectivos isoladores. Para analgesia pós-operatória, dipirona sódica (Dipirona sódica 500 mg/mL, Medley, Campinas, São Paulo) em gotas foi administrada (dose de 2-5 gotas por animal, de acordo com a bula do medicamento). Para isso, como cada caixa contava com 6 animais, 20 gotas (média de 3 gotas por rato) foram colocadas em 300 mL de água (média de consumo de 50 mL por animal), no próprio bebedouro dos animais, por 5 dias.

Figura 13. Elemento dental retirado, em A, e scaffold utilizado, em B

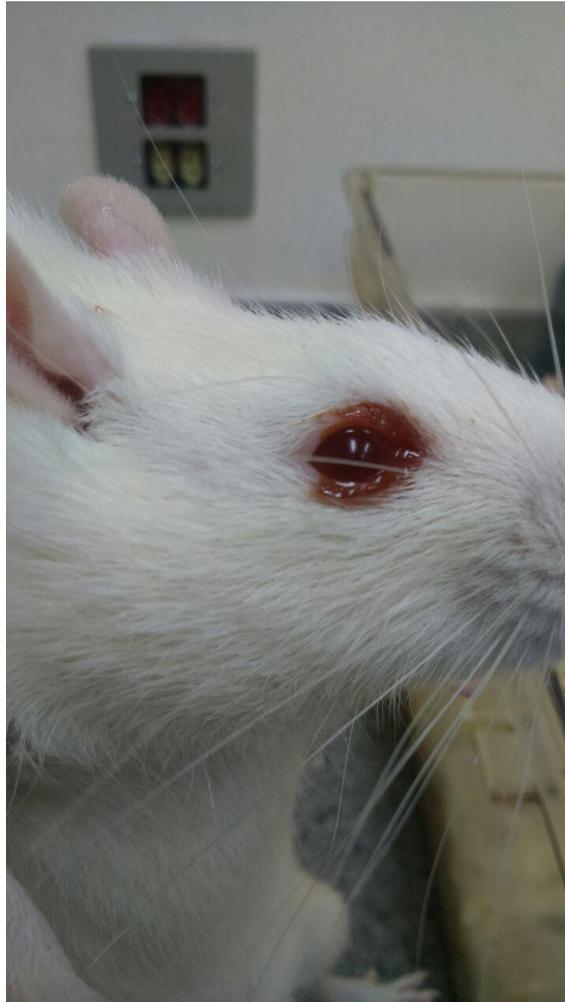


Fonte: Elaboração própria

4.6 Avaliação Clínica

Durante o período de tratamento, os animais foram observados em relação ao comportamento, consumo de ração e água, perda e ganho da massa corpórea e outros sinais clínicos, tais como aparecimento de inflamação periorbital (conjuntivite) sinal característico na administração de ácido zoledrônico (Figura 14).

Figura 14. Inflamação periorbital característica na exposição ao ácido zoledrônico



Fonte: Elaboração própria

4.7 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia em dois momentos distintos: 15 dias (Tempo 1) e 30 dias após a última administração de ácido zoledrônico (Tempo 2), ou seja, no dia 71^o e no dia 86^o, respectivamente.

Estes períodos (Tempo 1 e 2) representam 36 e 51 dias, respectivamente, a partir do momento pós-operatório, tempo suficiente para que ocorresse o reparo tecidual nos animais submetidos à exodontia. O reparo alveolar em ratos ocorre, em média, com 28 dias (VERONESE *et al.*, 2005).

A eutanásia foi realizada por meio de anestesia profunda, pela associação de sobredose de xilazina e quetamina. As amostras de sangue periférico (cerca de 4 mL) foram coletadas por punção venosa hepática. O sangue foi distribuído em tubos com anticoagulante Heparina e em tubos secos. Os tubos secos foram centrifugados

a 3000 rpm, o soro foi separado e congelado à -80° C. As amostras dos tubos contendo heparina foram analisadas para os parâmetros hematológicos. Após, uma alíquota foi separada em microtubo e o restante foi centrifugado (a 3000 rpm e a 4° C) para obtenção de plasma. Tanto as alíquotas de sangue total quanto de plasma foram armazenadas à -80° C, até posterior análise.

4.8 Obtenção de imagens radiológicas

Para a obtenção das imagens radiológicas, utilizou-se o equipamento de Raio-X *Timex 70E Coluna móvel-GNATUS* (Figura 15).

Figura 15. Equipamento de Raio-X



Fonte: Elaboração própria

Foram obtidas imagens radiográficas referentes ao osso de maxila dissecado após a eutanásia, para verificar a presença de alterações ósseas, indicativa de necrose óssea. O cilindro dos feixes de raios-x foi posicionado em um ângulo de 90° (Figura 16) e o tempo de exposição radiológica foi de 0,6 s.

Figura 16. Cilindro do feixe para tomada de radiografias periapicais



Fonte: Elaboração própria

4.9 Processamento das amostras para análise histológica

Os ossos da maxila foram dissecados após a eutanásia, e processados de forma rotineira para análise histológica.

A fixação foi feita em formalina tamponada 10% durante quatro dias. Após este passo, as amostras foram lavadas overnight em água corrente para retirada do excesso de formol.

As maxilas foram inicialmente armazenadas em álcool 70% até serem enviadas para processamento e posterior análise histopatológica no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP, do Departamento de Clínica Veterinária em Botucatu - SP, pelo Prof. Ass. Dr. Alexandre Hataka.

No laboratório as amostras foram mantidas em solução de ácido nítrico P.A. a 10% durante cinco a sete dias para que ocorresse a descalcificação das amostras. Posteriormente, foram desidratadas em álcool 70%, 80% e absolutos P.A. I, II e III, 60 minutos em cada.

A seguir, foram diafanizadas em xilol absoluto (Padrão anidro) I, II e III, 50 minutos em cada, para finalmente serem incluídas em parafina histológica I e II, 60 minutos em cada.

Posteriormente, as amostras foram emblocadas e os cortes histológicos foram realizados em micrótomo semi-automático com quatro micrometros de espessura.

Os cortes foram colhidos em lâminas histológicas e coradas pelas técnicas de hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson, os cortes foram cobertos com resina histológica e lamínula de vidro.

A análise das alterações morfológicas das amostras foi realizada nos tempos pré-estabelecidos na forma de escores em: ausente (0), leve (1), moderada (2) ou acentuada (3). E foram considerados os seguintes aspectos: reepitelização do local da exodontia, tecido conjuntivo fibroso, osteonecrose, restos radiculares, restos do *scaffold*, osteogênese, presença de colônias microbianas e tipo de infiltrado inflamatório.

As colorações foram feitas de acordo como os protocolos estabelecidos no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu – SP, conforme segue.

4.9.1 Técnica de coloração de hematoxilina e eosina

1. Desparafinizar, hidratar, água destilada.
2. Hematoxilina de Harris – 5 a 10 minutos.
3. Lavar em água corrente.
4. Diferenciador (álcool ácido clorídrico) – uma mergulhada.
5. Lavar em água amoniacal para azulcer os núcleos – uma mergulhada.
6. Álcool absoluto – só passar.
7. Eosina + floxina – 1 minuto.
8. Não lavar, desidratar e montar.

4.9.2 Técnica de coloração de tricrômico de Masson

1. Desparafinizar, hidratar, água destilada.
2. Bouin 1 hora na estufa a 60°C, depois esfriar e lavar até sair o Bouin, água destilada.
3. Hematoxilina de Weight – 5 minutos. Preparar na hora de usar.
4. Lavar em água corrente – 5 minutos, água destilada.
5. Fucsina+Ponceau – 10 minutos.
6. Lavar em água corrente – 1 minuto.

7. Ácido fosfomolibdico – 5 minutos ou até clarear (1 a 5 minutos).
8. Lavar em água corrente, água destilada.
9. Azul de anilina – 15 minutos.
10. Lavar para tirar o excesso.
11. Ácido acético – 1 minuto.
12. Sem lavar, desidratar e montar.

Como resultados, tem-se: núcleo preto, músculo vermelho e colágeno azul (com azul anilina) ou verde (com light green).

4.10 Parâmetros hematológicos

Para o perfil hematológico foram avaliados os números de hemácias (do inglês *red Blood cells* - RBC), glóbulos brancos (*white blood cless* – WBC), plaquetas (*platelets* - PLTs), concentrações de hemoglobina (*hemoglobin* - HGB), hematócrito (*hematocrit* - HCT), volume corpuscular médio (*mean corpuscular volume* - MCV), hemoglobina corpuscular média (*mean corpuscular hemoglobin* - MCH) e concentração hemoglobina corpuscular média (*mean corpuscular hemoglobin concentration* - MCHC). Além disso, foi realizado o diferencial da série branco, com contagem de neutrófilo, linfócito, monócito e eosinófilo.

Amostras de sangue total (cerca de 20 μ L) foram inseridas no equipamento automatizado Sysmex XS-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) (Figura 17). De acordo com o manual guia do equipamento, as RBC e as PLTs foram contadas em um canal específico do equipamento, utilizando uma metodologia de detecção de impedância combinado com a tecnologia de focagem hidrodinâmica. As WBC foram contadas utilizando citometria de fluxo fluorescente. As concentrações de HGB foram medidas fotometricamente pelo equipamento. O HCT foi obtido pelas alturas de impulso produzido por todas as hemácias que passam através do orifício do aparelho, que é proporcional ao volume da célula.

Figura 17. Equipamento de hematologia automatizado Sysmex XS-1000i



Fonte: Elaboração própria

4.11 Parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas foram feitas no soro dos ratos, utilizando kits comerciais da Roche Diagnóstica® e equipamento automatizado COBAS C111 Roche® (figura 18).

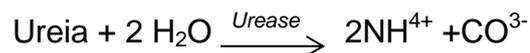
Figura 18. Equipamento automatizado COBAS C111 Roche®



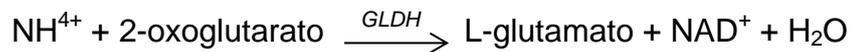
Fonte: Elaboração própria

Os parâmetros analisados foram ureia, creatinina, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e cálcio, conforme metodologias especificadas pelo próprio fabricante, contidas no protocolo de cada kit comercial.

Para a determinação da ureia, o teste é cinético, com as enzimas urease e glutamato desidrogenase. A ureia presente nas amostras de soro é hidrolisada pela urease (enzima contida no kit comercial Roche®), dando origem à amônia e ao carbonato, conforme reação abaixo:

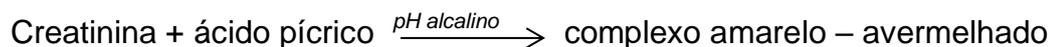


Em um segundo momento, o reagente 2-oxoglutarato (também presente no kit) reage com a amônia na presença da glutamato desidrogenase (GLDH) e da coenzima NADH, dando origem ao L-glutamato. Nesta reação, dois mols de NADH são oxidados a NAD⁺ por cada mol de ureia hidrolisada.



A taxa de diminuição da concentração de NADH é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra e é medida por fotometria no comprimento de onda 340 nm.

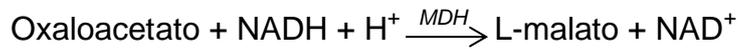
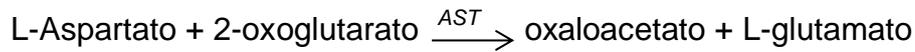
Os testes automatizados estabelecidos na rotina do laboratório para creatinina incluem o método de Jaffé com picrato alcalino, em diversas modificações, os testes enzimáticos. O ensaio que representa o kit comercial para creatinina (Roche®) é o colorimétrico cinético, e baseia-se no método de Jaffé. Numa solução alcalina, a creatinina da amostra forma um complexo amarelo-avermelhado com picrato (presente no kit), conforme reação abaixo



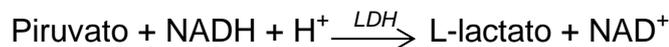
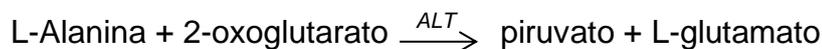
O complexo amarelo - avermelhado é avaliado por fotometria, nos comprimentos de onda de excitação/emissão 512/583 nm.

Para avaliação das transaminases AST e ALT, o método estabelecido pelo kit comercial é cinético. A AST presente na amostra catalisa a transferência de um

grupo amino entre L-aspartato e 2-oxoglutarato (presentes no kit comercial), formando oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato reage então com NADH, na presença de malato desidrogenase (MDH), também presente no kit, formando NAD⁺, conforme reações abaixo.

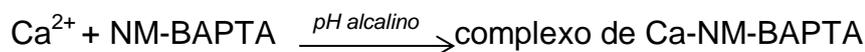


Da mesma forma, a ALT presente na amostra catalisa a reação entre L-alanina e 2-oxoglutarato, (presentes no kit comercial). O piruvato formado é reduzido por NADH em uma reação catalisada por lactato desidrogenase (LDH), formando L-lactato e NAD⁺, conforme reações a seguir.



A taxa de consumo de NADH é medida no comprimento de onda a 340 nm, a qual é diretamente proporcional à atividade catalítica de ambas as transaminases, ou seja, quanto maior o consumo do NADH, maior a atividade da AST e ALT, dependendo de cada substrato.

Para a quantificação da concentração do cálcio no soro, os íons de cálcio reagem com um quelante presente no kit comercial (o 5-nitro-5-metil-BAPTA) em condições alcalinas formam um complexo. Este complexo reage com o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) formando um complexo Ca-EDTA, e alterando a absorvância. Esta alteração da absorvância, medida em 340/378 nm, é diretamente proporcional à concentração de cálcio, e é medida fotometricamente.



4.12 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Os testes estatísticos análise de variância (ANOVA) de fator único – seguida do teste estatístico de Tukey – e Chi-quadrado foram utilizados para verificar diferenças entre os protocolos de tratamento. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os resultados foram analisados com o auxílio dos programas Statística[®] 8.0 e GraphPad Prism[®] 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

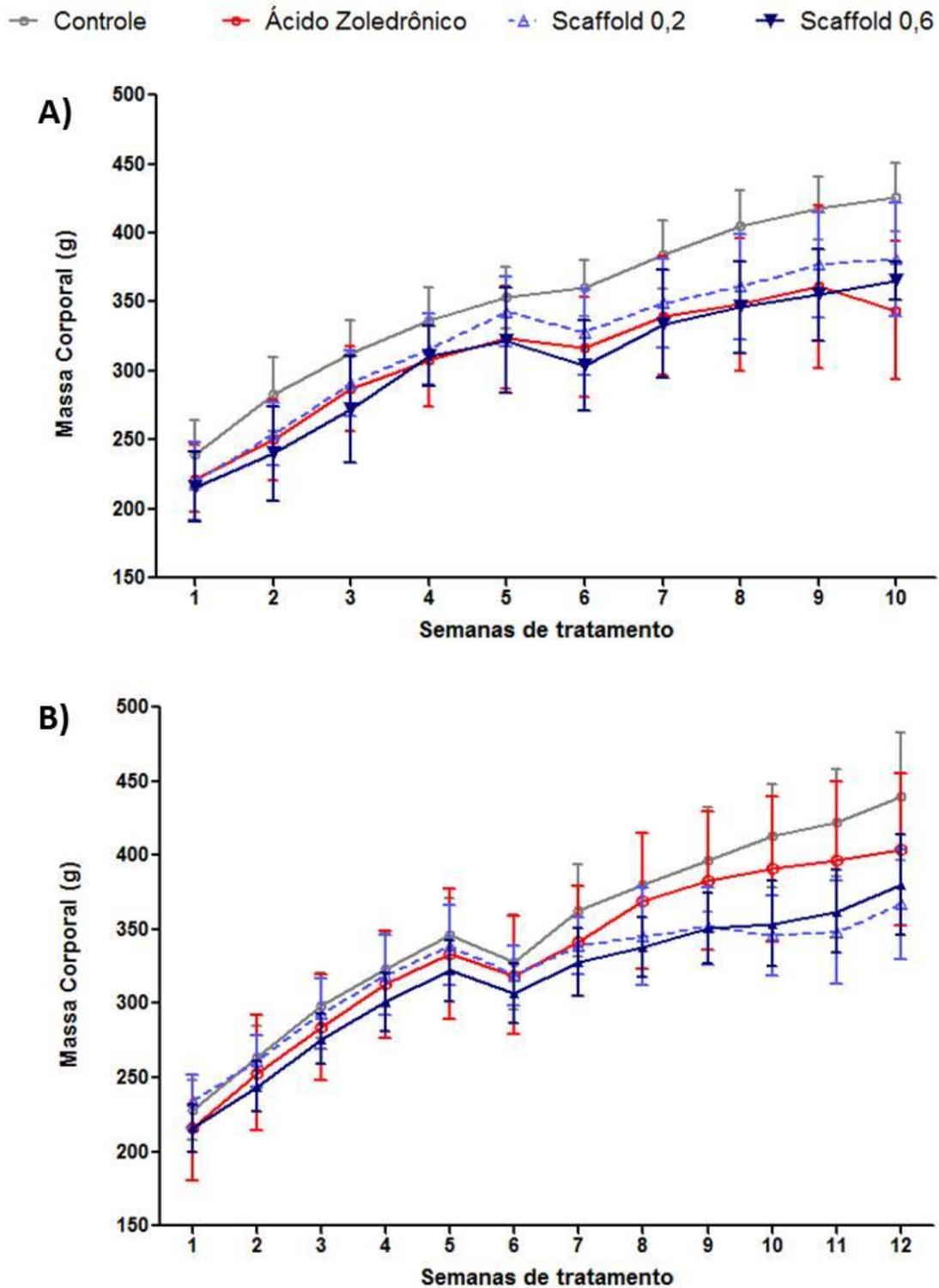
5.1 Controle da massa corpórea e avaliação clínica

Semanalmente, a verificação da massa corpórea foi realizada em todos os grupos de animais. A figura 19 mostra a evolução do ganho de massa no grupo de Tempo 1 (19A), ou seja, com a eutanásia realizada 15 dias após a última aplicação de AZ, e no grupo de Tempo 2 (19B), com a eutanásia realizada 30 dias após a última aplicação de AZ.

Não houve diferença estatística entre os grupos na evolução do ganho de massa corpórea no Tempo 1. Apesar de o grupo controle numericamente apresentar uma maior massa corpórea comparada ao grupo AZ ou mesmo ao grupo *scaffold* 0,6, essa diferença não foi estatisticamente comprovada. Além disso, houve um declínio no ganho de massa corpórea em todos os grupos na semana em que ocorreu a exodontia, e principalmente nos grupos que estavam em tratamento com o ácido zoledrônico. Devido à exodontia e osteotomia, os animais comeram menos, apesar de estarem sob analgesia. Entretanto, passada essa semana, o ganho de massa corpórea ocorreu normalmente em todos os grupos.

Os resultados de ganho de massa do Tempo 2 foram bastantes semelhantes aos do Tempo 1. Assim, embora o peso dos ratos do grupo controle seja numericamente maior, quando realizada análise estatística esta diferença não é significativa. O declínio na massa corpórea também aconteceu na semana em que houve a exodontia em todos os grupos, e passada essa semana o ganho de peso ocorreu normalmente.

Figura 19. Evolução da massa corpórea, em gramas (g), nos grupos de Tempo 1 (19A) e Tempo 2 (19B) de eutanásia



Fonte: Elaboração própria. *Scaffolds* 0,2 e 0,6 representam a formulação do *scaffold*, quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente. Sem diferença estatística ($p > 0,05$ - ANOVA seguida do teste Tukey)

Pinheiro *et al.* (2008) também analisaram a massa corpórea de animais em estudo com implantes de Hap em falhas ósseas em fêmur de ratos submetidos ao tabagismo passivo. Os autores observaram que os dois grupos ganharam massa ao longo do experimento, principalmente o grupo controle. Vale ressaltar que nesse estudo de Pinheiro e colaboradores, as massas corpóreas decaíram no grupo com implante de Hap quando ocorreu o procedimento cirúrgico para o implante, mas no decorrer dos meses se estabilizou, semelhante aos nossos achados.

Outro estudo com um material feito de nanotubos de carbono foi testado em camundongos. Os autores observaram que após 24 horas da administração dos nanotubos os animais tiveram perda de 4,78% do peso em relação a 2,4% de perda do grupo controle. A perda de peso ocorreu pelo desenvolvimento de granulomas intestinais, fibrose e estresse oxidativo, independentemente do nanotubo de carbono e da quantidade de impureza contida nele (DAVIES *et al.*, 2009).

Esses estudos comparativos aos nossos achados demonstram que a avaliação da massa corpórea, apesar de simples, é um parâmetro importante quando novos produtos são aplicados *in vivo*, e que as formulações de quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita nas duas proporções testadas foram bem assimiladas, não influenciando no ganho de peso corpóreo.

Com relação à avaliação clínica dos animais, um dos principais achados foi a inflamação periorbital. Essa característica é típica no tratamento com AZ. O risco de efeitos colaterais oculares pode ser maior com tratamento intravenoso (PASSOS; ALMEIDA, 2006). A inflamação periorbital foi observada em 50% dos animais (3 animais em cada 6) tratados com ácido zoledrônico, considerando todos os grupos que receberam o medicamento (II, III e IV). Os ratos do grupo controle não apresentaram inflamação periorbital, e ambos os *scaffolds* não influenciaram na melhora dessa característica clínica.

Estudo similar estudou o complexo maxilo-mandibular de ratos Wistar, tratados com AZ por 86 dias na dose de 0,6 mg/kg (BORGES, 2013). A autora observou a inflamação periorbital em 58,3% dos animais tratados com AZ. No nosso estudo a porcentagem foi de 50,0 % dos animais, comprovando que a inflamação periorbital é um efeito colateral dos BFs.

Devido à escassez de estudos com animais para se comparar a inflamação periorbital encontrada, estudos com humanos foram utilizados. Entre os casos

relatados na literatura, a inflamação orbitária é mais comum em pacientes tratados com BF intravenoso do que via oral (SKREPENEK *et al.*, 2010). Também é mais frequente em doentes tratados com zoledronato (KAUR *et al.* 2011). De quatro doentes estudados por Pirbhaia *et al.* (2015), por exemplo, dois pacientes estavam tomando zoledronato intravenoso, um pamidronato intravenoso e um alendronato oral. Os quatro casos clínicos ocorreram dentro de poucos dias (4 dias) de tratamento com estas substâncias.

5.2 Imagens radiológicas

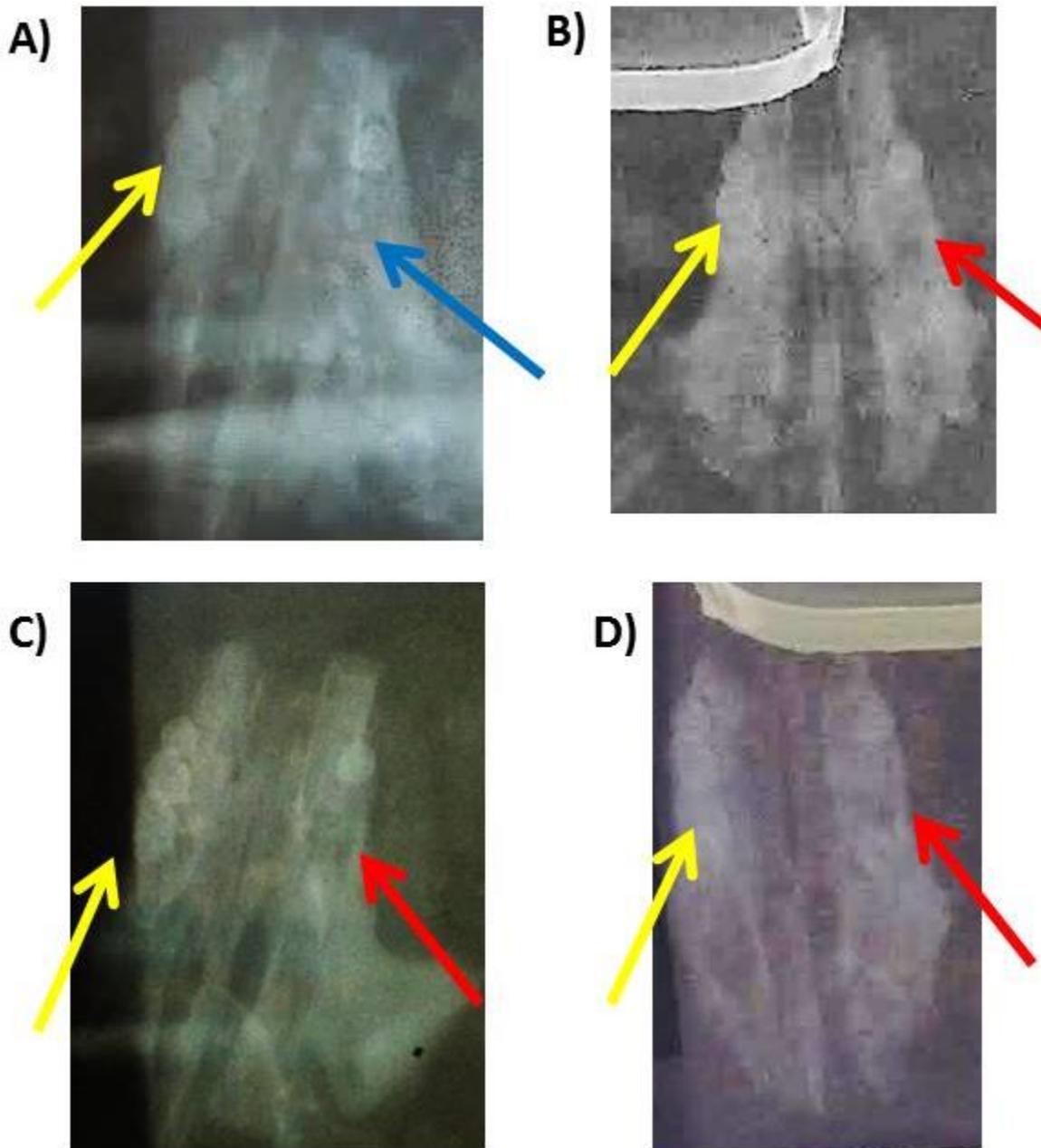
As imagens radiográficas obtidas dos animais submetidos ao tratamento com ácido zoledrônico associado ao procedimento cirúrgico estão representadas nas Figuras 21 e 22 (Tempo 1 e 2, respectivamente). Uma discreta esclerose óssea foi observada nos grupos AZ e AZ + *scaffolds* quando comparadas aos animais controle.

Nas setas vermelhas é possível observar uma mancha um pouco mais escura, sugestiva da necrose do tecido ósseo. Vale ressaltar que as imagens não são conclusivas, e o aspecto radiográfico deve ser complementado com as análises histopatológicas.

Imagens radiográficas são tomadas para verificar a presença dos elementos dentais e algum processo que indicasse a presença de necrose (SOUZA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2011).

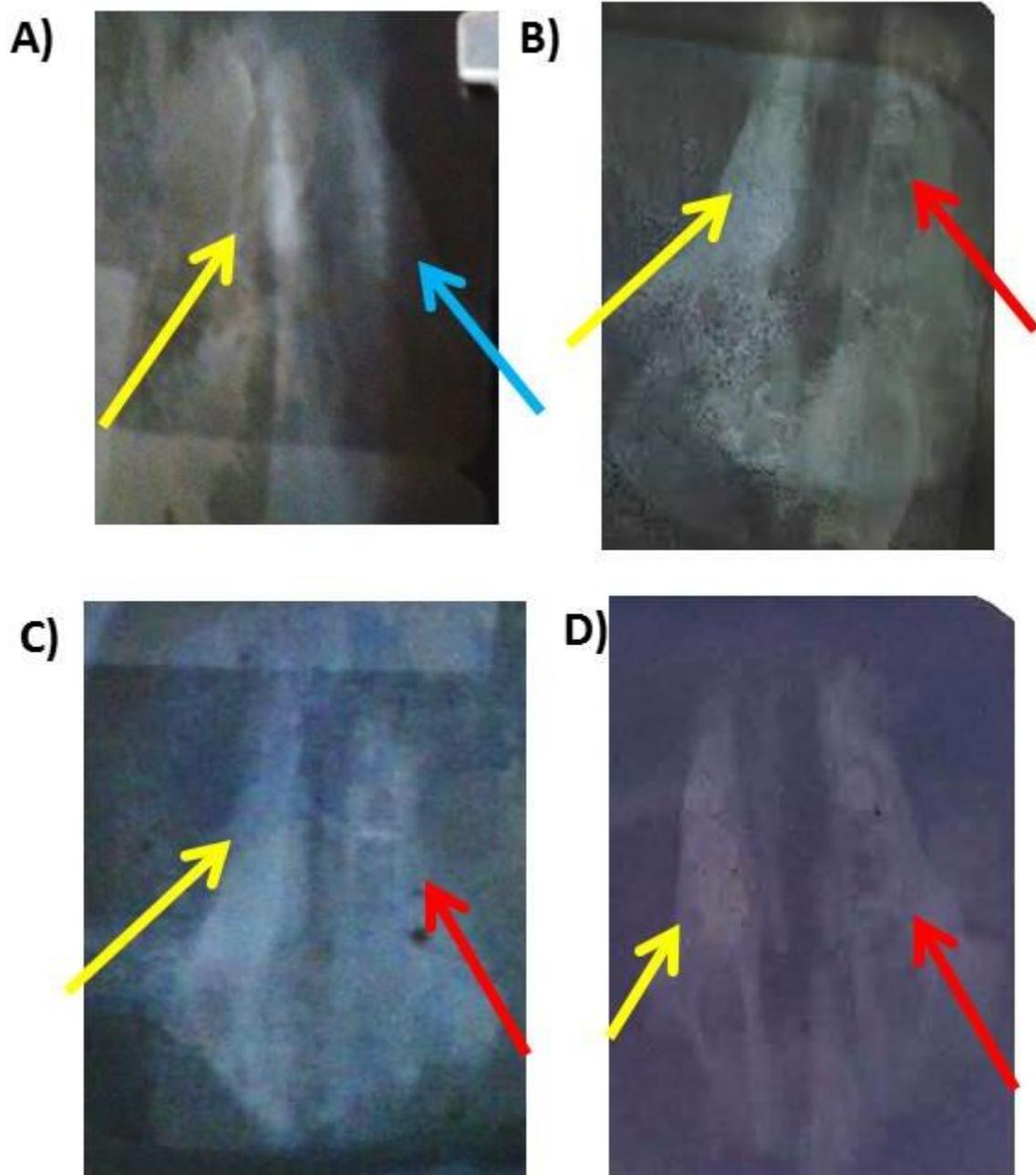
As imagens radiológicas, entretanto, não registraram alterações que poderiam ser facilmente visualizadas. Embora a necrose óssea possa ser diagnosticada por imagem radiológica (TREISTER *et al.*, 2009), nem sempre esse exame é conclusivo, principalmente quando tratamos de uma pequena peça - maxila do animal . Muitas vezes, quando alterações ósseas são observadas nos exames radiográficos o quadro de osteonecrose já está em estágio muito avançado (GEGLER *et al.*, 2006).

Figura 20. Imagens radiológicas da maxila de ratos controle (em A), tratados com ácido zoledrônico (em B), ácido zoledrônico + scaffold quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6 (C e D, respectivamente), no Tempo 1 de eutanásia



Fonte: Elaboração própria. As setas amarelas indicam o lado da maxila sem exodontia; a seta azul indica o lado na maxila após exodontia e com regeneração; as setas vermelhas indicam o lado da maxila após exodontia e com discreta esclerose óssea

Figura 21. Imagens radiológicas da maxila de ratos controle (em A), tratados com ácido zoledrônico (em B), ácido zoledrônico + scaffold quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6 (C e D, respectivamente), no Tempo 2 de eutanásia



Fonte: Elaboração própria. As setas amarelas indicam o lado da maxila sem exodontia; a seta azul indica o lado na maxila após exodontia e com regeneração; as setas vermelhas indicam o lado da maxila após exodontia e com discreta esclerose óssea

Mesmo com as imagens inconclusivas, a radiografia é um exame complementar muito utilizado em humanos, de fácil acesso e baixo custo, que pode

auxiliar no planejamento do tratamento da osteonecrose, o que justifica a solicitação desse exame com mais frequência na prática clínica.

Um biovidro de composição 60% SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅ foi avaliado no tratamento de defeitos no osso rádio de cães. As avaliações radiográficas pós-operatórias permitiram o acompanhamento da regeneração óssea e da evolução de reabsorção da matriz porosa do biovidro durante os 90 dias subsequentes à sua implantação nos defeitos ósseos (ALVES *et al.*, 2015). No entanto, o osso avaliado no estudo era maior, e assim mais fácil de o defeito ósseo ser distinguido.

Exames radiográficos também foram utilizados para avaliar a utilização da hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis catus*). Radiografias das regiões operadas foram realizadas após a cirurgia e aos 8, 21, 30 e 50 dias de pós-operatório, objetivando-se avaliar o processo de reparação dos alvéolos e a reabsorção do osso alveolar (SILVA *et al.*, 2012). Os autores apontaram que a hidroxiapatita sintética foi biocompatível no osso alveolar dos felinos, e promoveu um adiantamento no processo de reparação óssea aos oito dias de pós-operatório e um atraso aos 30 dias, salientando a necessidade de um período mais prolongado de avaliações.

5.3 Análises histopatológicas

As análises histopatológicas do T1 de eutanásia estão apresentadas na Tabela 2. Os resultados estão representados somente como ausência e presença dos parâmetros histológicos.

Foi possível observar uma reepitelização significativa ($p < 0,05$) no grupo controle quando comparado aos demais. A presença de tecido conjuntivo fibroso foi detectada em todos os grupos; entretanto houve diferença estatística entre o grupo AZ (que apresentou maior deposição de tecido conjuntivo fibroso) e o *scaffold* 0,6.

A osteonecrose não foi detectada nos grupos controle e *scaffold* 0,6. Apesar de ter sido reportada no grupo *scaffold* 0,2, a osteonecrose não foi estatisticamente diferente do grupo controle ($p > 0,05$). Já no grupo AZ, a osteonecrose foi estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). Este foi um fato positivo, pois mostra que a osteonecrose ocorreu somente no grupo tratado com o AZ, ao contrário da imagem radiológica, que inconclusivamente, havia demonstrado a osteonecrose em todos os grupos tratados com AZ. Assim, os *scaffolds* conseguiram

prevenir a osteonecrose induzida pelo AZ. Os *scaffolds*, entretanto, não conseguiram prevenir o processo inflamatório alveolar e a osteomielite.

Tabela 2. Distribuição dos animais, em porcentagem (%) segundo presença (+) ausência (-) de reepitelização, tecido conjuntivo fibroso, osteonecrose, resto radicular, osteogênese, colônias bacterianas, infiltrado inflamatório nos ratos no T1 de eutanásia

	Controle		AZ		Scaffold 0,2		Scaffold 0,6	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Reepitelização	67	33	0	100	20	80	0	100
Tecido conjuntivo fibroso	80	20	100	0	40	60	20	80
Osteonecrose	0	100	70	30	20	80	0	100
Resto radicular	0	100	0	100	0	100	30	70
Osteogênese	0	100	0	100	0	100	0	100
Colônias bacterianas	85	15	100	0	100	0	100	0
Infiltrado inflamatório	100	0	100	0	100	0	100	0

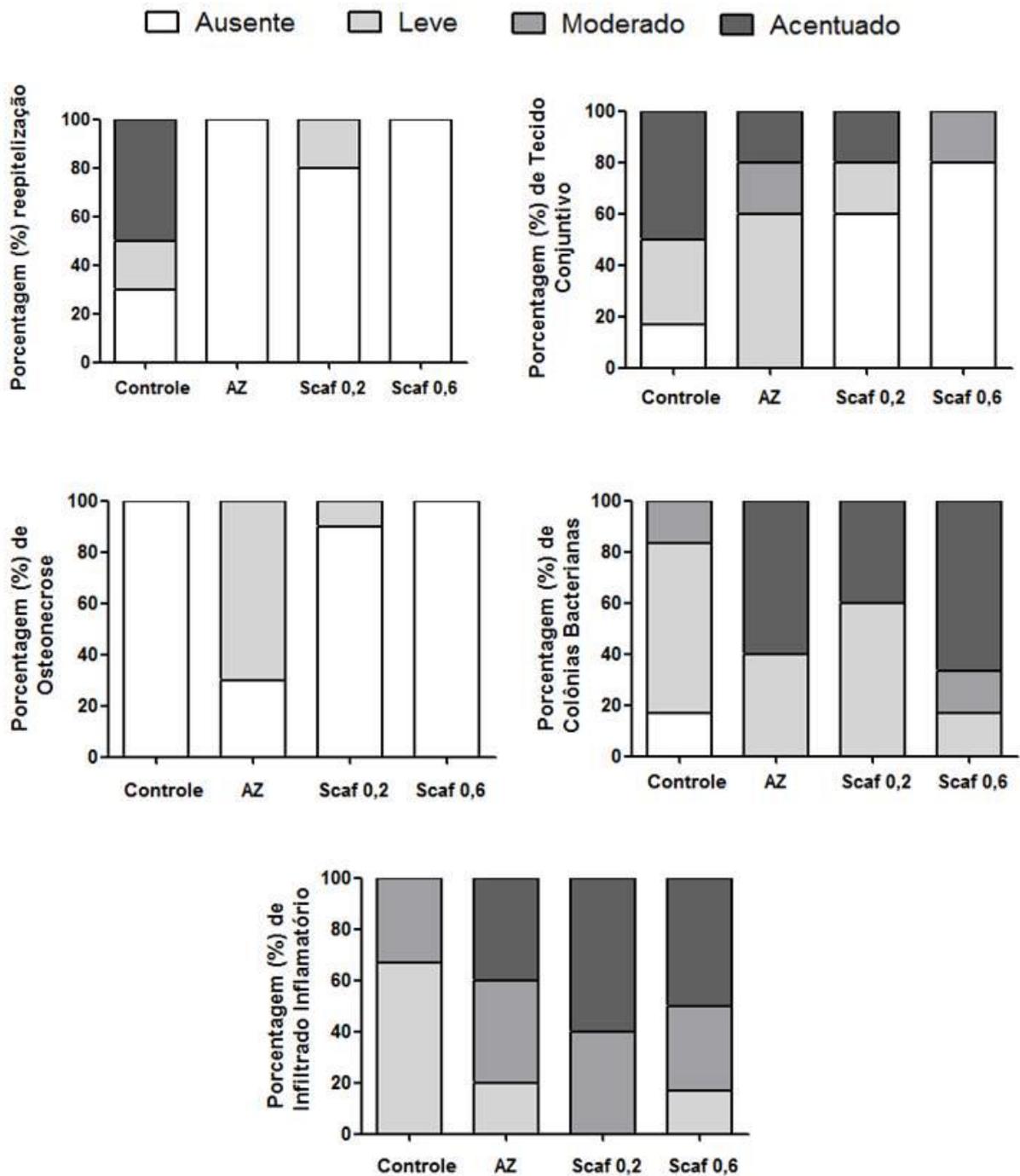
Fonte: Elaboração própria

A osteogênese, característica importante no processo de regeneração, não ocorreu em nenhum grupo, nem mesmo no controle. A presença de colônias bacterianas e o processo inflamatório foram reportados em todos os grupos, até mesmo no grupo controle.

Os parâmetros histológicos foram quantificados por escores (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = acentuado). Assim, em cada parâmetro uma diferença estatística foi observada, este foi estratificado conforme a Figura 22. A maioria dos animais teve uma reepitelização acentuada no grupo controle, assim como presença leve e acentuada de tecido conjuntivo fibroso. A osteonecrose ocorreu na grande maioria dos animais recebendo AZ, e foi classificada como leve. Apesar de uma pequena porcentagem de animais ter apresentado osteonecrose leve no grupo *scaffold* 0,2 + AZ, este parâmetro não foi estatisticamente diferente do controle.

Com relação as colônias bacterianas e a presença de infiltrado inflamatório, a maioria obteve escore moderado à acentuado, exceto o controle, que foi de leve à moderado.

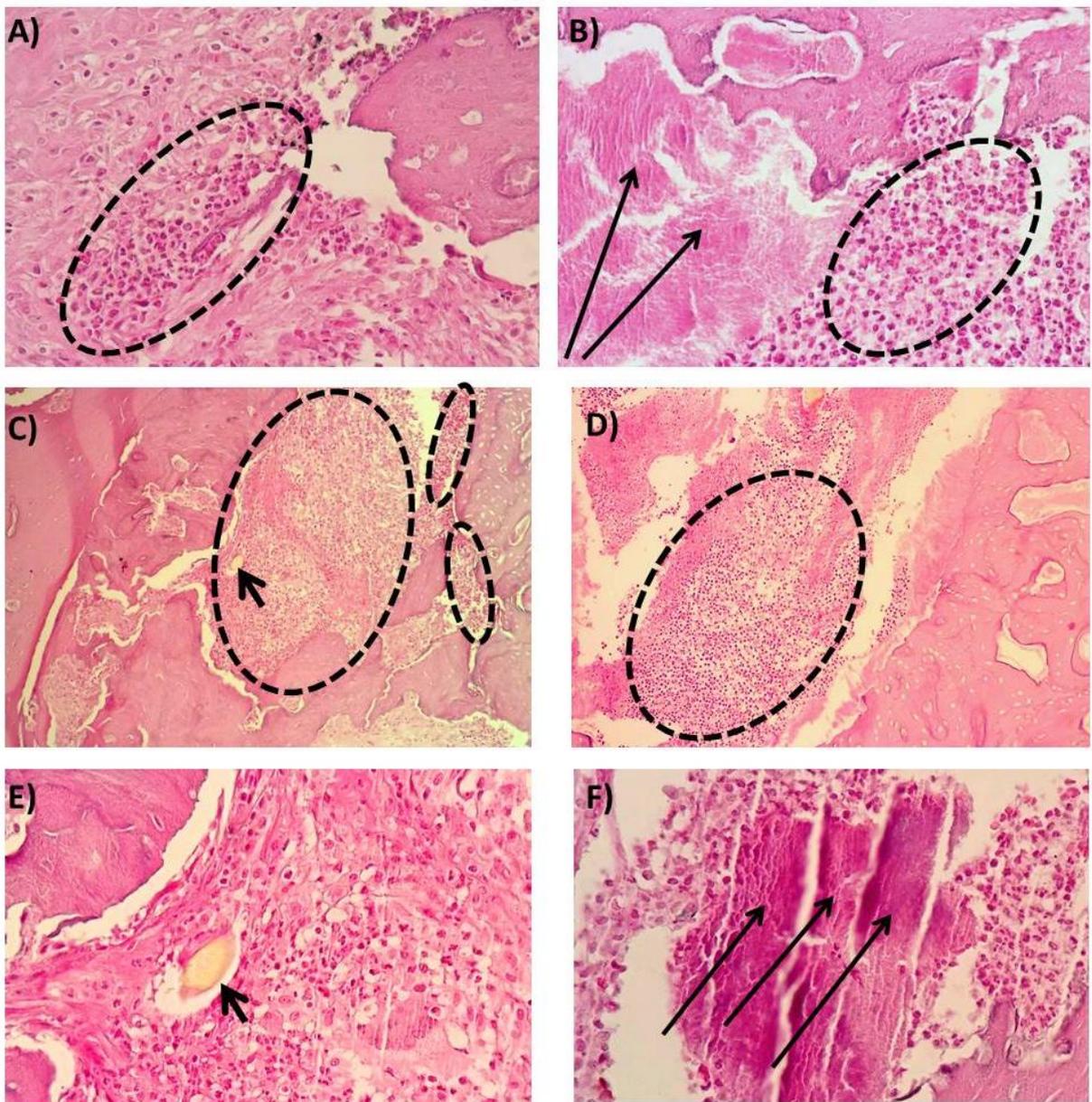
Figura 22. Parâmetros histológicos estratificados por escores (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = acentuado)



Fonte: Elaboração própria

As imagens histopatológicas representativas do T1 estão apresentadas na Figura 23.

Figura 23. Imagens histopatológicas da maxila de ratos, com coloração hematoxilina e eosina, no Tempo 1 de eutanásia



Fonte: Elaboração própria. Em A), grupo controle (aumento 100x); em B) ácido zoledrônico (aumento 100x); em C) e D) ácido zoledrônico + *scaffold* quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6 respectivamente (aumento 100x); em E) ácido zoledrônico + *scaffold* quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 (aumento 400x); em F) ácido zoledrônico (aumento 400x). Pontilhado significa processo inflamatório; setas longas presença de bactérias; seta curta, corpo estranho.

A inflamação é uma reação protetora local dos tecidos a uma agressão. A inflamação é uma reação complexa dos tecidos, dependente do *feedback* dos vasos sanguíneos e leucócitos. As proteínas plasmáticas, leucócitos circulantes e os fagócitos teciduais são as principais defesas do organismo contra invasores desconhecidos (KUMAR *et al.*, 2010).

A inflamação pode ser aguda ou crônica, dependendo do seu tempo de duração, e tem como evolução final o processo cicatricial. Assim, inflamações de início rápido e poucos dias são denominadas de agudas. Já as crônicas persistem por semanas ou meses. Esses dois tipos de inflamação podem se sobrepor (como ocorreu em nosso estudo), alteram seu sentido, aspecto histológico bem como processo cicatricial (KUMAR *et al.*, 2013).

A inflamação crônica pode ser inespecífica ou específica. A específica, também denominada de inflamação granulomatosa, que foi aquela que ocorreu em nosso estudo, se estabelece em algumas doenças infecciosas bacterianas, parasitárias e fúngicas. Ocorre ainda como resposta inflamatória à presença de materiais inertes insolúveis como talco, sílica, berílio, fios de sutura cirúrgica e também de agressões tóxicas, alérgicas, auto-ímmunes, neoplásicas ou de natureza desconhecida (MONTENEGRO; FRANCO, 1999).

O estudo histológico do presente trabalho apontou inflamação alveolar (decorrente da extração dentária) e osteomielite (decorrente da utilização do AZ) nos grupos que receberam o AZ. Considera-se que o resultado ocorreu devido ao contínuo tratamento com AZ após a exodontia. Além disso, não foi realizada a antibioticoterapia após a extração dentária, fato que explica a presença de colônias bacterianas. Inicialmente, pretendia-se avaliar se os *scaffolds* apresentavam atividade antimicrobiana, para assim poder evoluir para a cicatrização. Porém, do ponto de vista funcional e morfológico, as inflamações se caracterizaram com a presença de bactérias (inflamações supurativas), indicando que o bioproduto não possui característica antimicrobiana.

Além disso, houve predomínio de corpos estranhos (pelos e material vegetal - grânulos de ração) encontrados no local da inflamação, dificultando ainda mais a regeneração do tecido lesado. O comportamento de autolimpeza dos roedores, ou *grooming*, é um padrão de ação entre várias espécies, por isso era esperado encontrar pelos como corpos estranhos.

Devido a suspeita de que os BFs aumentam a colonização bacteriana, Kos *et al.* (2015) avaliaram a capacidade de colonização bacteriana sobre discos com Hap revestida com clodronato; pamidronato e zoledronato. Os autores observaram adesão bacteriana e a formação de biofilmes, concluindo que diversas estruturas dos BFs, tais como resíduos de fosfato, átomos de carbono, prótons, íons cloreto, ou um anel de amina poderiam servir como “ganchos” para bactérias, facilitando a adesão bacteriana e a formação de biofilme que desempenham um papel importante para promover a osteomielite.

Alguns possíveis mecanismos etiopatogênicos estão envolvidos na relação com BFs. Paparella *et al.* (2011) estudaram através de características histopatológicas 8 casos de osteonecrose de mandíbula associada com o uso de BFs. Eles encontraram o início da infecção causada por contaminação bacteriana, levando ao desenvolvimento de osteomielite. Esta interpretação corrobora a sugestão do correspondente trabalho.

Antoni (2016) propôs um estudo em que avaliou osteonecrose induzida por BF e osteorradionecrose. O autor concluiu que as patologias apresentaram muita semelhança microscópica com relação ao osso necrótico, inflamação e microorganismos. Assim, comparando com o atual trabalho, pode-se sugerir que a osteomielite estava caminhando para a osteonecrose, mas o scaffold conseguiu limitar o progresso para essa possível patologia.

Com relação às análises histopatológicas do T2 de eutanásia, os resultados estão apresentados na Tabela 3, expressos como ausência e presença dos parâmetros avaliados. Foi possível observar uma reepitelização significativa ($p < 0,05$) no grupo controle quando comparado aos demais. A presença de tecido conjuntivo fibroso foi detectada em todos os grupos, porém estava mais ausente no AZ (ao contrário do T1, que estava 100% presente).

A osteonecrose não foi detectada no grupo controle, e apesar de ter sido reportada nos grupos *scaffolds* 0,2 e 0,6, a osteonecrose não foi estatisticamente diferente do grupo controle ($p > 0,05$). Já no grupo AZ, a osteonecrose foi estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$). Entretanto, observou-se que a porcentagem de animais com osteonecrose no grupo AZ diminuiu no T2. Pode-se sugerir que com o cessar da aplicação do AZ e com o passar do tempo (30 dias após a última administração de AZ), a osteonecrose tenderia a regredir.

Um achado bastante importante foi a presença de osteogênese em 50% dos animais do grupo *scaffold* 0,2 significando um início de formação de novo osso. A presença de colônias bacterianas e o processo inflamatório foram reportados em todos os grupos, até mesmo no grupo controle.

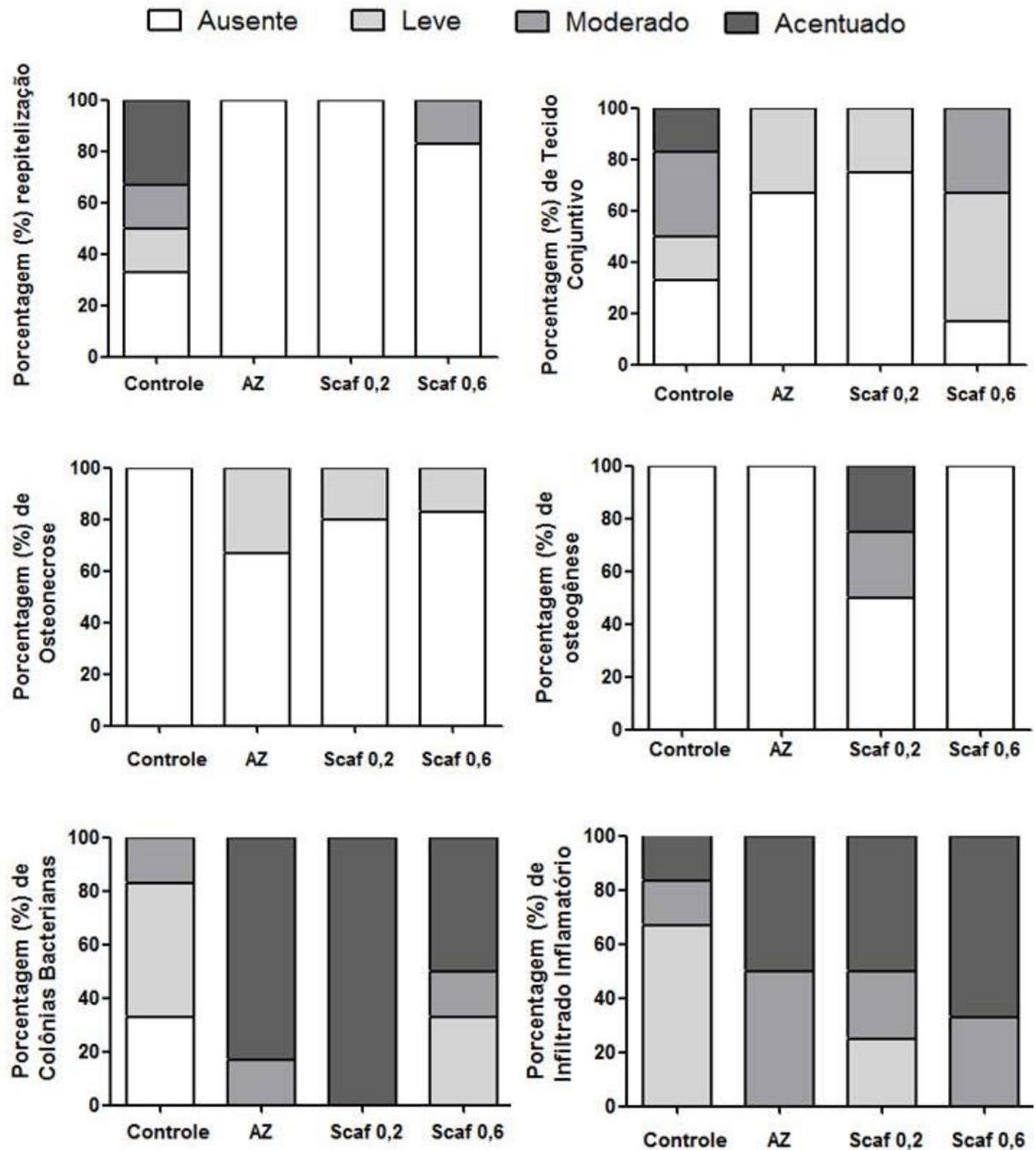
Tabela 3. Distribuição dos animais, em porcentagem (%) segundo presença (+) ausência (-) de reepitelização, tecido conjuntivo fibroso, osteonecrose, resto radicular, osteogênese, colônias bacterianas, infiltrado inflamatório nos ratos no T2 de eutanásia

	Controle		AZ		Scaffold 0,2		Scaffold 0,6	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Reepitelização	67	33	0	100	0	100	17	83
Tecido conjuntivo fibroso	67	33	33	67	25	75	83	17
Osteonecrose	0	100	33	67	25	75	17	83
Resto radicular	0	100	0	100	0	100	0	100
Osteogênese	0	100	0	100	50	50	0	100
Colônias bacterianas	67	33	100	0	100	0	100	0
Infiltrado inflamatório	100	0	100	0	100	0	100	0

Fonte: Elaboração própria

A estratificação por escore dos parâmetros histológicos está apresentada na Figura 24. A maioria dos animais teve uma reepitelização ausente, e o grupo controle presença leve, acentuada e moderada. A osteonecrose ocorreu na grande maioria dos animais recebendo AZ, e foi classificada como leve. Com relação às colônias bacterianas e a presença de infiltrado inflamatório, a maioria obteve escore acentuado, exceto o controle, que foi de leve à moderado.

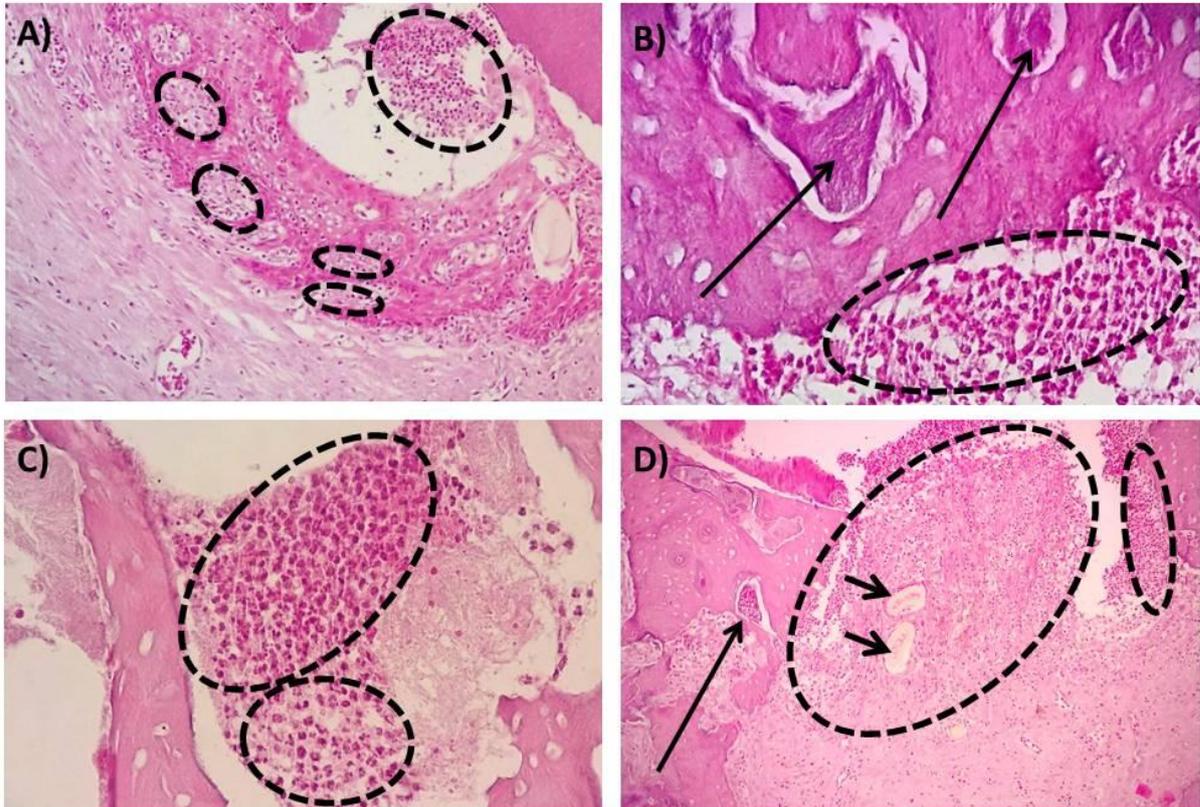
Figura 24. Parâmetros histológicos estratificados por escores (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = acentuado)



Fonte: Elaboração própria

As imagens histopatológicas representativas do T2, na coloração de hematoxilina e eosina, estão apresentadas na Figura 25.

Figura 25. Imagens histopatológicas da maxila de ratos, com coloração hematoxilina e eosina, no Tempo 2 de eutanásia

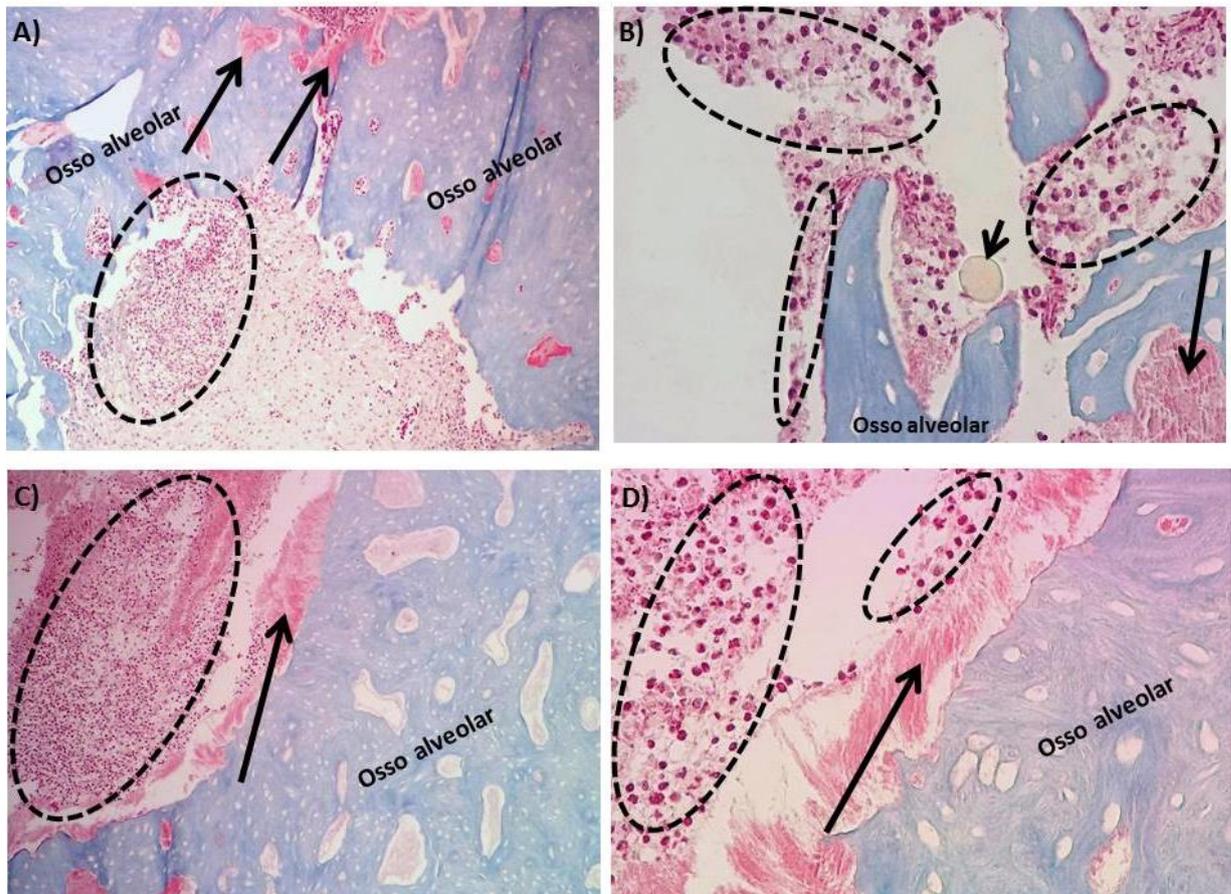


Fonte: Elaboração própria. Em A), grupo controle (aumento 100x); em B) ácido zoledrônico (aumento 400x); em C) e D) ácido zoledrônico + *scaffold* quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6 respectivamente (aumento 100x); Pontilhado significa processo inflamatório; setas longas presença de bactérias; seta curta, corpo estranho.

Além da inflamação presente em todas as lâminas, observa-se na Figura 25B a osteomielite, representada pela presença de colônias de bactérias no osso bem como o infiltrado inflamatório supurativo (abaixo). Os corpos estranhos também são observados, oriundos de pelos ou de material vegetal.

Para confirmação histopatológica, também foram feitas, de algumas lâminas, a coloração tricômico de Masson, capaz de diferenciar a matriz óssea do osso alveolar, conforme reportado na Figura 26.

Figura 26. Imagens histopatológicas da maxila de ratos, representativas da coloração tricômico de Masson.



Fonte: Elaboração própria. Em A), grupo AZ, aumento 100x; em B) grupo *scaffold* 0,2, aumento 100x; em C) grupo *scaffold* 0,6, aumento 100x; D) grupo *scaffold* 0,6, aumento 400x. Pontilhado: processo inflamatório; setas longas: presença de bactérias; seta curta: corpo estranho.

5.4 Análises hematológicas

A Tabela 4 mostra os resultados dos parâmetros hematológicos dos animais de Tempo 1, com a eutanásia realizada 15 dias após a última aplicação de ácido zoledrônico.

É possível observar um aumento no número de hemácias (RBC) no grupo tratado com o ácido zoledrônico quando comparado os outros grupos ($p = 0,047$; $0,022$ e $0,005$, relacionado respectivamente ao grupo controle, *scaffold* 0,2 e *scaffold* 0,6). Já no número de células brancas, não houve diferença significativa entre os grupos. O número de plaquetas também se mostrou aumentado no grupo tratado com o ácido zoledrônico quando comparado aos demais ($p = 0,03$), grupo *scaffold* 0,2 ($p = 0,006$) e grupo *scaffold* 0,6 ($p = 0,019$).

Tanto a concentração da hemoglobina quanto a do hematócrito mostraram-se diminuídas no Grupo *scaffold* 0,6 comparado ao grupo tratamento com ácido zoledrônico ($p = 0,039$ para hemoglobina e $p=0,048$ para hematócrito). Volume Corpuscular Médio, Hemoglobina Corpuscular Média e Concentração Hemoglobina Corpuscular Média não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Tabela 4. Parâmetros hematológicos no grupo de Tempo 1 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente, e AZ representa o grupo Ácido Zoledrônico

Parâmetros	Grupos			
	Controle	AZ	<i>Scaffold</i> 0,2	<i>Scaffold</i> 0,6
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7,7 \pm 0,4	8,6 \pm 0,9*# ^{\$}	7,5 \pm 0,4	7,3 \pm 0,3
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	9,2 \pm 1,3	7,6 \pm 2,3	9,2 \pm 1,5	8,0 \pm 1,8
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	682 \pm 76	808 \pm 105*# ^{\$}	631 \pm 99	663 \pm 78
HGB (g/dL)	14,1 \pm 0,6	15,3 \pm 1,7	14,0 \pm 0,8	13,5 \pm 0,5 ^{&}
HCT (%)	44,1 \pm 1,9	47,1 \pm 4,9	44,4 \pm 2,5	42,3 \pm 1,0 ^{&}
MCV (fL)	57,6 \pm 3,1	54,8 \pm 0,5	58,8 \pm 2,5	57,6 \pm 1,9
MCH (pg)	18,5 \pm 0,8	17,2 \pm 0,1	18,5 \pm 0,5	18,4 \pm 0,5
MCHC (g/dL)	32,0 \pm 0,5	32,4 \pm 0,3	31,6 \pm 0,6	32,0 \pm 0,6
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,86 \pm 0,3	1,0 \pm 0,3	1,5 \pm 0,5 ^{&}	1,5 \pm 0,4 ^{&}
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,6 \pm 1,1	5,5 \pm 1,7	7,0 \pm 0,9	6,2 \pm 1,4
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,7 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,04 \pm 0,02	0,07 \pm 0,04	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,03

Fonte: Elaboração própria. *Red blood cells* (RBC); *white blood cells* (WBC); *platelets* (PLT); *hemoglobin* (HGB); *hematocrit* (HCT); *mean corpuscular volume* (MCV); *mean corpuscular hemoglobin* (MCH); *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC). Estatisticamente diferente do grupo controle; #estatisticamente diferente do grupo *scaffold* 0,2; \$estatisticamente diferente do grupo *scaffold* 0,6; &estatisticamente diferente do grupo AZ. ANOVA uma via seguida de Tukey, $p < 0,05$

Dentre o diferencial das células brancas, somente os neutrófilos apresentaram-se aumentados no grupo *scaffold* 0,2 ($p = 0,028$) e no grupo *scaffold* 0,6 ($p = 0,027$) comparado ao grupo que recebeu somente ácido zoledrônico.

A hemoglobina contida nos glóbulos vermelhos é responsável pelo transporte do oxigênio no sangue, e uma diminuição na sua concentração geralmente está associada à anemia. O hematócrito se define pela relação do volume globular com o volume sanguíneo total. O resultado obtido indica a porcentagem de volume sanguíneo ocupado pelos glóbulos vermelhos (KAMOUN, 1989).

Os eritrócitos são as células vermelhas do sangue, possuem cerca de sete μm de diâmetro e forma de disco bicôncavo. É a célula responsável pelo transporte da hemoglobina. As plaquetas são células muito pequenas, incompletas, sem material nuclear, com tamanho de cerca de 3 μm , mas importantes no processo de coagulação sanguínea (LORENZI, 2015). Os leucócitos são as células brancas, que englobam granulócitos e a série linfocitária. Dentre os primeiros estão os neutrófilos, os eosinófilos, os basófilos e os monócitos. Os leucócitos atuam na defesa de organismo, bloqueando à invasão de agentes nocivos, como bactérias, vírus ou parasitas, que através da resposta imunológica. (LORENZI, 2013).

O aumento na contagem das plaquetas pode ocorrer por muitas condições clínicas, entre elas infecção, trauma ou pós-operatório (GILES, 1981). Considerando que somente o grupo tratado com AZ apresentou aumento na contagem de plaquetas, os *scaffolds* podem ter sido eficazes considerando este parâmetro.

A interação de materiais com biomoléculas funcionais como proteínas, enzimas e DNA é considerada uma pré-condição para a avaliação de citotoxicidade (GIACOMELLI, AVENA, DEPAULI, 1997). Neste estudo, houve diminuição das concentrações da HGB e do HCT no grupo do *scaffold* 0,6. A Hap vem sendo avaliada como adsorvente de metais em contaminações ambientais.

Corami *et al.* (2008) avaliaram a sorção do cádmio (Cd) em solução individual e de uma mistura multi-metálica (Cd + Pb + Zn + Cu) pela Hap, com resultados muito promissores. Os autores reconheceram a capacidade da Hap de se ligar com íons de metais pesados divalentes. Assim, poderíamos sugerir que tal diminuição da HGB e do HCT poderia ocorrer pela adsorção do Fe (que também é um íon divalente) da HGB através da Hap, já que no grupo *Scaffold* 0,6 a proporção de Hap utilizada é maior que no grupo *Scaffold* 0,2, contendo grande quantidade de cálcio.

Um único estudo semelhante a este foi encontrado, avaliando leucograma total e diferencial, número de hemácias, hemoglobina total, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, índice hematócrito, volume corpuscular médio e número de plaquetas em modelo experimental de ONMAB em atos (SILVA, 2013). Os animais receberam três administrações semanais consecutivas de AZ 0,6 mg/kg e o sangue foi coletado semanalmente, a partir do 6º dia da administração da primeira dose de AZ. O autor reportou evento anêmico tempo dependente, com diminuição da hemoglobina no grupo recebendo AZ. Em nosso estudo, não encontramos anemia resultante da administração apenas do AZ. Entretanto, é importante destacar que, apesar de a mesma dose ter sido utilizada, o espaço de tempo entre as administrações foram diferentes entre o estudo de (SILVA, 2013) e nosso estudo demonstrou aumento de células vermelhas e de plaquetas induzida pelo AZ.

A Tabela 5 mostra os resultados dos parâmetros hematológicos dos animais de Tempo 2, com a eutanásia realizada 30 dias após a última aplicação de ácido zoledrônico.

Analisando os resultados, observa-se que nenhum dos parâmetros sofreu alteração estatisticamente significativa entre os grupos. Assim, podemos sugerir que todos os parâmetros que se apresentavam alterados 15 dias após a eutanásia (Tempo 1) voltaram a sua concentração normal após 30 dias, ou seja, foi possível restaurar os parâmetros a níveis normais (semelhantes ao controle).

Soki *et al.* (2013) estudaram, em ratos machos, os efeitos do AZ no osso e nas células estaminais hematopoiéticas. O estudo revelou que não houve diferenças na contagem de glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas do sangue periférico com o tratamento do AZ. Vale ressaltar, entretanto, que nessa pesquisa não houve inserção de qualquer biomaterial, como ocorreu em nosso estudo.

Tabela 5. Parâmetros hematológicos no grupo de Tempo 2 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente, e AZ representa o grupo Ácido Zoledrônico

Parâmetros	Grupos			
	Controle	AZ	Scaffold 0,2	Scaffold 0,6
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	7,6 ± 0,7	7,3 ± 0,6	7,6 ± 0,3	7,7 ± 0,5
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	9,2 ± 2,7	9,5 ± 2,8	9,7 ± 0,8	8,2 ± 1,4
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	643 ± 50	647 ± 38	656 ± 51	634 ± 70
HGB (g/dL)	14,6 ± 0,7	13,7 ± 0,9	13,8 ± 0,6	14,1 ± 0,8
HCT (%)	46,1 ± 0,7	43,3 ± 2,8	42,7 ± 1,9	44,3 ± 2,8
MCV (fL)	58,8 ± 1,8	59,8 ± 2,3	56,1 ± 3,8	57,7 ± 1,7
MCH (pg)	18,5 ± 0,5	18,9 ± 0,6	18,2 ± 0,8	18,3 ± 0,4
MCHC (g/dL)	31,5 ± 0,4	31,7 ± 0,3	32,4 ± 0,8	31,8 ± 0,6
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,3 ± 0,8	1,7 ± 0,4	2,0 ± 1,2	1,6 ± 0,5
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6,3 ± 2,9	7,6 ± 2,4	6,2 ± 1,9	5,7 ± 0,8
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,5	0,8 ± 0,3
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,05 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,07 ± 0,05

Fonte: Elaboração própria. *Red blood cells* (RBC); *white blood cells* (WBC); *platelets* (PLT); *hemoglobin* (HGB); *hematocrit* (HCT); *mean corpuscular volume* (MCV); *mean corpuscular hemoglobin* (MCH); *mean corpuscular hemoglobin concentration* (MCHC). ANOVA uma via seguida de Tukey, $p > 0,05$

5.5 Análises bioquímicas

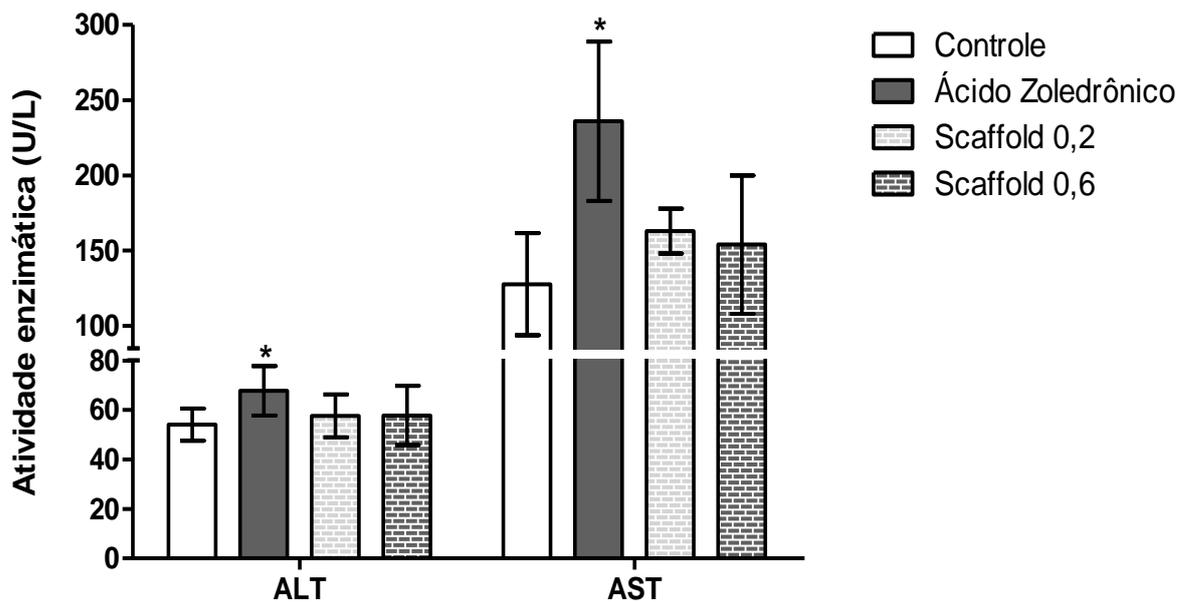
A Figura 27 mostra a avaliação da função hepática no grupo de Tempo 1 de eutanásia. Um aumento significativo tanto na ALT ($p = 0,041$) quanto na AST ($p = 0,007$) foi observado no grupo que recebeu somente o ácido zoledrônico quando comparado ao controle. Os grupos que receberam o AZ acrescido da inserção dos *scaffolds* não se mostraram diferentes do controle, resultado este promissor quando se avalia a segurança no uso de novos biomateriais. Tal achado corrobora o fato da

mistura quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita ser biocompatível, e não apresentar toxicidade hepática.

A enzima aspartato aminotransferase (AST) está amplamente distribuída pelos tecidos, principalmente pelo tecido hepático, cardíaco, muscular e renal. Assim, níveis séricos elevados são encontrados em doenças envolvendo estes tecidos, especialmente doenças hepatobiliares, e também infarto do miocárdio (NAGY, 1984; MOSS *et al.*, 1987).

A principal fonte da enzima alanina aminotransferase (ALT) é o fígado, o que fez com que passasse a ser feita a determinação da atividade da ALT para diagnóstico de doenças hepáticas (SHERWIN, 1984; MOSS *et al.*, 1987).

Figura 27. Função hepática representada pelas enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), no grupo de Tempo 1 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita nas proporções



Fonte: Elaboração própria. *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA uma via seguida de Tukey, $p < 0,05$)

Amaral (2014), em seu estudo com ratos fêmeas, fazendo uso do BF alendronato para o tratamento de osteoporose, observou um aumento significativo na atividade sérica da AST. Já a atividade de ALT não sofreu alteração pelo

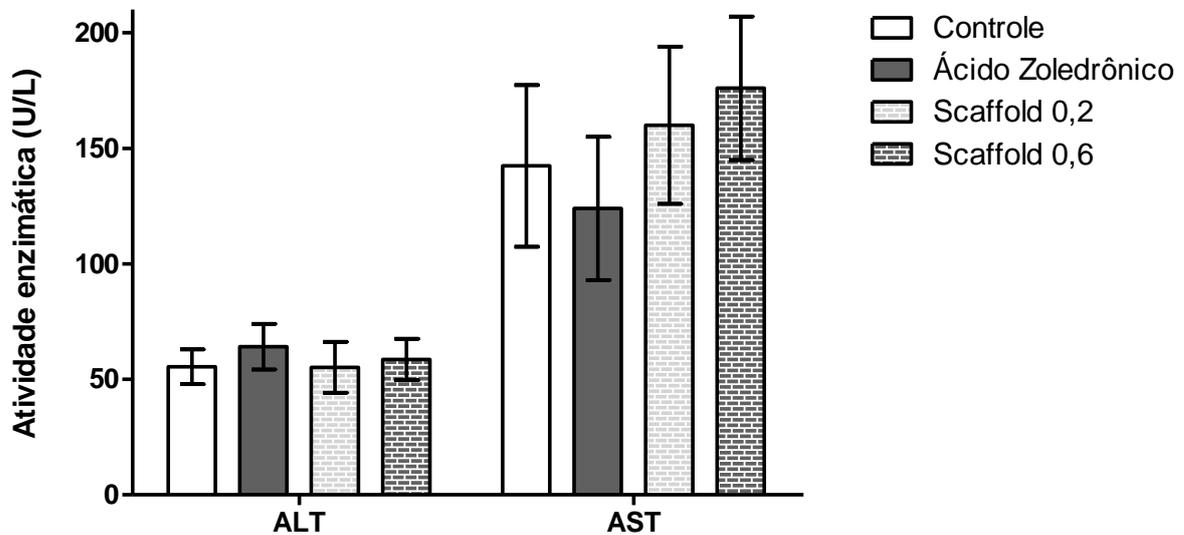
medicamento. Assim também nosso estudo demonstrou esse comportamento nos marcadores hepáticos analisados.

Polyzos *et al.* (2011) relataram doença de Paget óssea em uma mulher de 53 anos, pós menopausa, que fez uso do AZ para tratamento da doença. Os autores observaram que os níveis séricos de ALT, AST e gama-GT aumentaram um dia após a administração do AZ, indicando que AZ causa lesão hepática. Em outro estudo muito similar, Yanhui *et al.* (2013) diagnosticaram osteoporose em uma paciente chinesa com 73 anos de idade. O AZ foi utilizado na terapia e três dias após a infusão a AST, ALT e a gama-GT foram aumentados. A hepatotoxicidade induzida por AZ foi confirmada por biópsia.

Os parâmetros hematológicos e também os bioquímicos podem variar muito entre as linhagens e entre as espécies animais, e também em função do método de coleta de sangue. Melo *et al.* (2012) consideraram fundamental a determinação de valores de referência para animais de diferentes biotérios de acordo com a espécie, a dieta, a linhagem, o sexo e a idade. O estudo dos autores concluiu que é necessário que cada laboratório estabeleça seus respectivos valores de referência de acordo com a automação utilizada. Por isso todos os parâmetros são sempre comparados com nosso grupo controle.

A figura 28 também mostra a avaliação da função hepática, no grupo de Tempo 2 de eutanásia. Passados 30 dias após a última administração do ácido zoledrônico, é possível observar que a atividade das enzimas hepáticas se reestabelece no grupo que recebeu o fármaco. Isto mostra a importância de se avaliar diferentes tempos de exposição e pós-exposição, já que o organismo pode se recuperar, e alguns resultados podem nem serem percebidos.

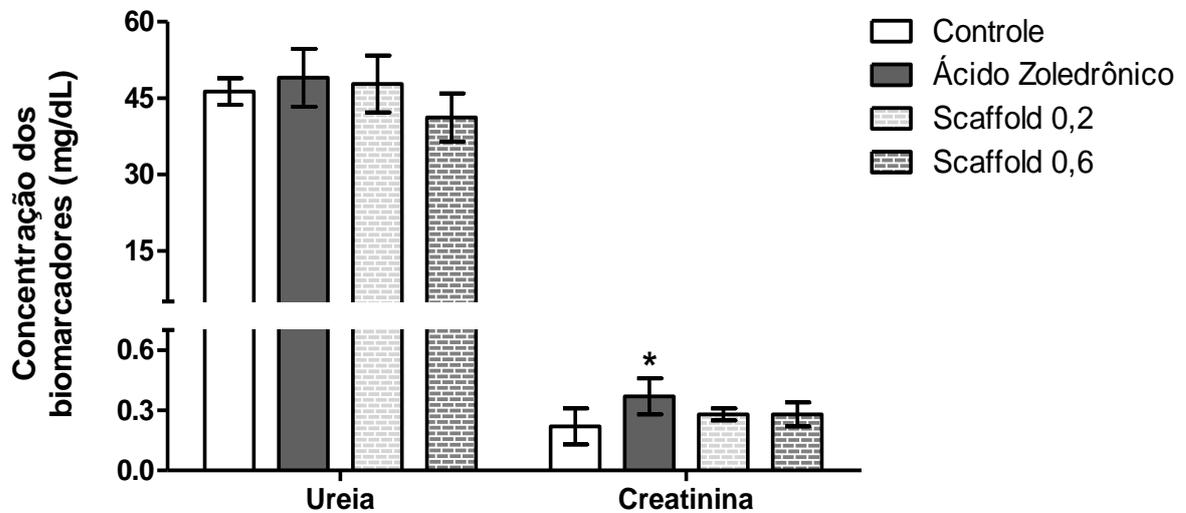
Figura 28. Função hepática representada pelas enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), no grupo de Tempo 2 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita nas proporções



Fonte: Elaboração própria. Sem diferença estatística (ANOVA uma via seguida de Tukey, $p > 0,05$). Os resultados da função renal estão apresentados nas figuras 25 e 26, de acordo com o tempo final de eutanásia (15 e 30 dias após a última administração de AZ), respectivamente

Para a análise da função renal, no Tempo 1 (Figura 29), a concentração de ureia não se alterou comparando-se todos os grupos, ou seja, nem o ácido zoledrônico nem os *scaffolds* causaram qualquer dano renal a ponto de alterar a concentração sanguínea da ureia. Por outro lado, a concentração da creatinina mostrou-se significativamente aumentada ($p = 0.017$) no grupo ácido zoledrônico comparado ao controle. Tal achado representa um possível dano renal causado pelo fármaco. Entretanto, nos grupos em que foram inseridos os *scaffolds*, a concentração de creatinina foi mantida similar ao controle, demonstrando a não toxicidade renal do biomaterial.

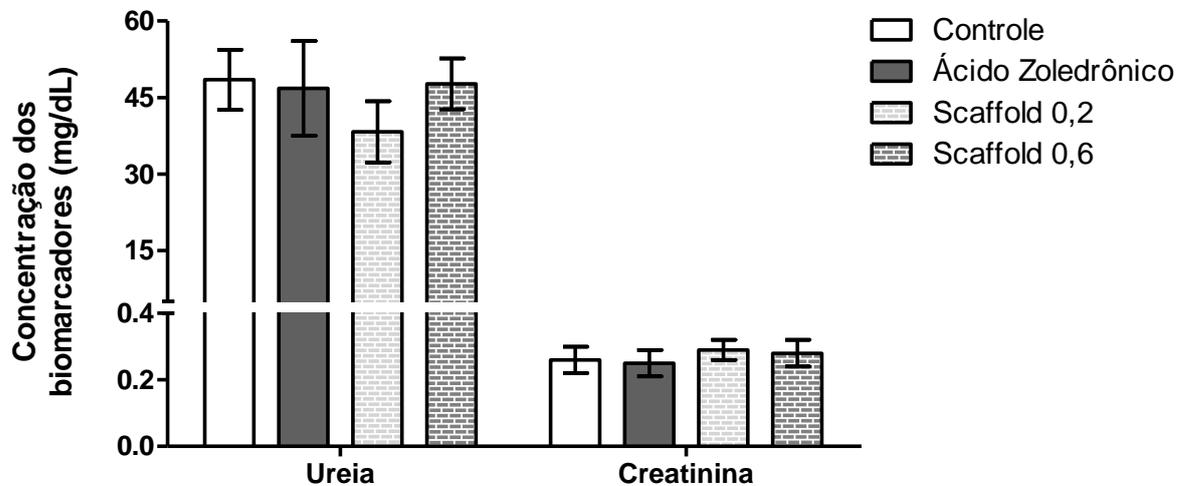
Figura 29. Função renal no grupo de Tempo 1 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente



Fonte: Elaboração própria. *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA uma via seguida de Tukey, $p < 0,05$)

Já no Tempo 2 (Figura 30), assim como ocorreu com a função hepática, a função renal não se alterou comparando-se todos os grupos, demonstrando essa alteração transitória da creatinina, tempo dependente.

Figura 30. Função renal no grupo de Tempo 2 de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginato de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente



Fonte: Elaboração própria. Sem diferença estatística (ANOVA uma via seguida de Tukey, $p > 0,05$)

A ureia é sintetizada no fígado, a partir da amônia, que é produzida por desaminação dos aminoácidos. A ureia é principalmente excretada pelos rins. A determinação do nitrogênio de ureia no sangue é o exame mais utilizado para testar função renal. O aumento na concentração de ureia no sangue são observados nos casos de perfusão renal inadequada, choque, diminuição do volume sanguíneo (causas pré-renais), nefrite crônica, necrose tubular, nefrite glomerular (causas renais) e obstrução do aparelho urinário (causas pós renais). Podem também ser observadas subidas transitórias durante períodos de ingestão proteica elevada (ROCK *et al.*, 1987).

A determinação da creatinina no soro ou no plasma constitui o método utilizado com mais frequência para avaliar a função renal. A creatinina é um produto do fosfato de creatina do metabolismo muscular, que normalmente é gerado no organismo a uma velocidade razoavelmente constante. A creatinina é filtrada pelos glomérulos e, em condições normais, não é reabsorvida pelos túbulos. Uma quantidade pequena, mas significativa, da creatinina é secretada ativamente pelos rins. Um aumento da creatinina sérica é observado quando ocorrem lesões graves nos rins (THOMAS C., THOMAS L., 2005; LAMB *et al.*, 2006; LAMB *et al.*, 2005).

Banerjee *et al.* (2003) relataram um caso de um homem com necrose tubular aguda comprovada por biópsia, após administração intravenosa de três doses de 60 mg de pamidronato durante um período de duas semanas. O pamidronato foi administrado para tratar a hipercalcemia do paciente. O nível sérico de creatinina desse paciente começou a aumentar durante o tratamento com pamidronato, corroborando nossos achados, com severa perda da função renal, imediatamente após a terapia com BFs. Esses mesmos autores também relataram que estudo com roedores, que desenvolveram necrose tubular aguda, seis dias após administração de pamidronato.

Fihn *et al.* (2003) mostraram 72 casos de insuficiência renal associada com AZ. Essa série de casos consistiu em um grupo heterogêneo de pacientes, com mieloma múltiplo, com tumores, alguns em condições benignas e outros sem diagnóstico. Do total de pacientes, 25% receberam apenas uma dose de AZ e tiveram insuficiência renal após cerca de 11 dias. A insuficiência renal evoluiu após cerca de 56 dias de uso do AZ. Dos 72 pacientes, 27 necessitaram de diálise e 18 morreram em decorrência de fatores de risco subjacentes à falência renal medicamentosa. Em resumo, os autores apoiaram a recomendação do uso de AZ em câncer metastático, mas com as precauções de regular monitoramento da função renal, hidratação adequada e interrupção do tratamento se a função renal começar a ficar comprometida.

Os efeitos renais de doses minimamente nefrotóxicas de ibandronato e zoledronato foram avaliados em ratos. A segurança renal dos BFs administrados via intravenosa depende da dose, da meia-vida do tecido renal e dos intervalos das doses. Contudo, os autores mostraram diferenças entre ibandronato e zoledronato com relação aos danos renais em doses nefrotóxicas mínimas (PFISTER *et al.*, 2003).

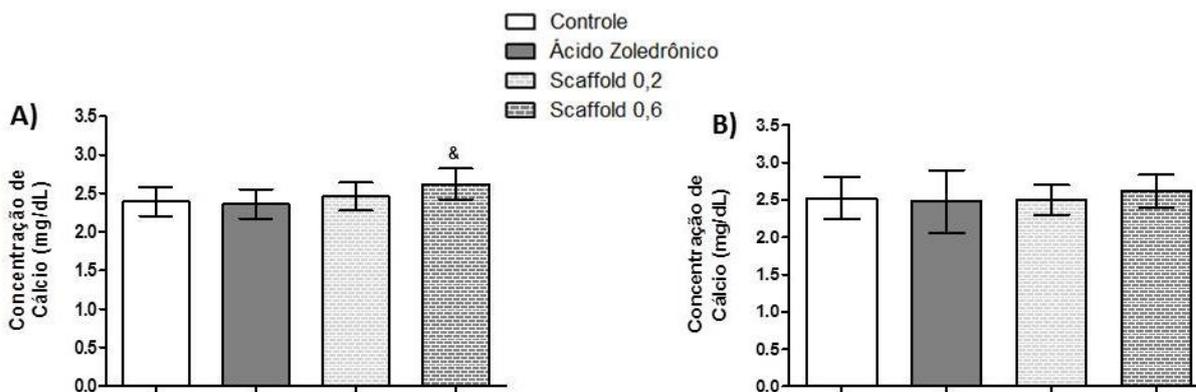
Body *et al.* (2005) revisaram dados pré-clínicos para as diferenças dos BFs no risco de insuficiência renal, através de exame histopatológico. Os autores concluíram que as razões para essas diferenças não são completamente compreendidas, mas indicam que podem ser influenciados por propriedades farmacocinéticas, tais como meia-vida do tecido, ligação as proteínas e potência intracelular. O BF é depositado em áreas de formação óssea, não é metabolizado e é eliminado inalterado por rins através da filtração glomerular e do sistema de excreção tubular. Doses elevadas de alguns BFs mostraram sobrecarregar a

eliminação renal, e o composto retido poderia danificar as células renais (BODY *et al.*, 2005).

Assim, fica evidenciado que o uso terapêutico dos BFs induz o aumento no nível sérico da creatinina, assim como ocorreu em nosso estudo.

As concentrações de cálcio sérico encontradas estão apresentadas na figura 31. Em A, observa-se a concentração de cálcio referente ao grupo de Tempo 1, e em B de Tempo 2. No Tempo 1, um aumento significativo no cálcio do grupo AZ + *scaffold* 0,6 foi encontrado, comparado ao grupo AZ. Já no Tempo 2, nenhuma alteração foi observada.

Figura 31. Concentração sérica de cálcio no Tempo 1 (A) e no Tempo 2 (B) de eutanásia. Scaffolds 0,2 e 0,6 representam a formulação do scaffold, quitosana/alginate de sódio/hidroxiapatita nas proporções 1:1:0,2 e 1:1:0,6, respectivamente



Fonte: Elaboração própria. *Estatisticamente diferente do grupo AZ (ANOVA uma via seguida de Tukey, $p < 0,05$)

Com relação ao cálcio, este é o elemento mineral mais abundante no organismo. Encontrando-se na sua maioria (99%) nos ossos, principalmente sob a forma de hidroxiapatita. Entre as funções extra-esqueléticas do cálcio tem-se o seu envolvimento na coagulação sanguínea, na condução neuromuscular, na excitabilidade do músculo esquelético e cardíaco, na ativação enzimática e na conservação da integridade e permeabilidade da membrana celular. Os níveis séricos de cálcio são controlados pelo hormônio da paratireoide (o paratormônio), pela calcitonina e pela vitamina D. Um desequilíbrio de qualquer um destes

moduladores conduz a alterações dos níveis de cálcio. O aumento do paratormônio ou da vitamina D estão normalmente associados à hipercalcemia (ENDRES, RUDE, 2006).

Amaral (2014) ressaltou, em seu estudo com ratos fêmeas fazendo uso do alendronato para o tratamento de osteoporose, que as concentrações de cálcio e fósforo se mantiveram dentro da normalidade tanto para os animais com osteoporose induzida como para aqueles que não foram submetidos à indução. Esse resultado corrobora nosso estudo no que diz respeito ao grupo recebendo o AZ, em que os níveis de cálcio se mantiveram similares a do controle. Também não foram encontradas alterações significativas nos níveis séricos de cálcio quando o efeito do alendronato foi avaliado em ratos fêmeas com osteoporose induzida por glicocorticoide (SILVA, 2006).

No nosso estudo, as concentrações de cálcio não foram alteradas pelo medicamento utilizado, porém, poderíamos sugerir que o aumento de Ca no grupo AZ + *scaffold* 0,6 poderia ter ocorrido devido à inserção do biomaterial com maior quantidade de hidroxiapatita, liberando sistemicamente o cálcio. Por outro lado, a implantação do material foi local (na fenda da extração do dente) e não uma administração sistêmica de hidroxiapatita. Então, o aumento da concentração sérica de cálcio deve ser melhor investigada.

Apesar de o biomaterial ter tido aplicação local, é importante ressaltar todas essas variações sistêmicas, tanto no sangue total quanto no soro. O osso é um tecido bastante vascularizado, pois necessita de uma constante assimilação de elementos nutritivos e minerais ocorrendo um intercâmbio constante do Ca do plasma sanguíneo (absorvido da alimentação) e dos ossos para manter o equilíbrio da mineralização (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). Assim ocorrendo os efeitos sistêmicos, que poderiam ter absorvido os minerais do biomaterial, e transferindo os até a corrente circulatória e conseqüentemente nos sistemas hepáticos e renais.

5.6 Limitações e pontos fortes do estudo

Este trabalho tinha como propostas avaliar o *scaffold* na prevenção da osteonecrose induzida por AZ e estabelecer um modelo experimental para implantação de *scaffold* em ratos. Este modelo foi estabelecido, não somente com a exodontia, como era a proposta inicial, mas também com o desgaste ósseo local. Entretanto, o design do *scaffold* dificultou sua implantação na fissura formada

quando considerada somente na exodontia, fato que indicou a necessidade da osteotomia.

Assim, sugere-se que uma nova forma farmacêutica do biomaterial, como um pó ou um biofilme, pudesse ser estudado. Também se percebeu que somente a osteotomia seria suficiente para a implantação do *scaffold*, sem necessidade de extração dentária.

Além disso, por se tratar de um modelo com pequenos roedores, houve dificuldade no que diz respeito ao acesso visual dos últimos molares para a verificação da permanência dos *scaffolds* durante todo o experimento. É possível que os *scaffolds* tenham se desprendido antes do término do tratamento, sem terem permanecido tempo suficiente em contato com a fenda produzida. Assim, se o formato *scaffold* fosse mantido, um modelo com roedores maiores, como o coelho ou ainda com cães seria o mais indicado.

Mais ainda, este estudo não contou com a antibioticoterapia, já que objetivo também era avaliar se o *scaffold* poderia ter efeito antimicrobiano. Somado ao fato do depósito de pelos e restos de ração no local, a regeneração do tecido lesado se tornou ainda mais difícil.

Por outro lado, pesquisando mais sobre o tema, foi observada uma boa quantidade de trabalhos demonstrando a histopatologia da doença em ratos, porém escasso número de trabalhos que tivessem analisado parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos tratados com ácido zoledrônico. Tal fato, inclusive, demandou a utilização de artigos científicos com humanos para a comparação com este estudo em animais, na sessão de Discussão. À vista disso, o presente trabalho foi um dos pioneiros avaliando o quadro clínico dos animais pelo hemograma, função renal e hepática e, além disso, pelos mesmos parâmetros, permitiu a avaliar a segurança da implantação do biomaterial, quanto a sua biocompatibilidade e toxicidade.

6. CONCLUSÕES

Os principais achados do estudo foram:

- O ganho de massa corpórea ocorreu de maneira semelhante em todos os grupos, apesar do tratamento com AZ, da exodontia e da implantação dos *scaffolds*;
- Os animais submetidos à terapia com AZ apresentaram irritação periorbital, e os *scaffolds* não foram capazes de reverter esse quadro;
- As radiografias não foram conclusivas no que diz respeito à presença de osteonecrose;
- Pela análise histopatológica no T1, observou-se osteonecrose apenas no grupo tratado com AZ. A implantação dos *scaffolds*, apesar do processo inflamatório supurativo, da presença de colônias bacterianas e da osteomielite, conseguiu prevenir a osteonecrose;
- A porcentagem de animais com osteonecrose no grupo AZ diminuiu no T2. Isso significa que, com o cessar da aplicação do AZ e com o passar do tempo (30 dias após a última administração de AZ), a osteonecrose tende a regredir;
- Ainda no T2, em 50% dos animais do grupo scaffold 0,2 ocorreu osteogênese;
- O *scaffold* não demonstrou característica antimicrobiana;
- Quando se avalia o T1 - parâmetros hematológicos, o *scaffold* de concentração de hidroxiapatita 0,6 não se mostrou seguro para os parâmetros hemoglobina e hematócrito, demonstrando diminuição da concentração. Contudo, os parâmetros voltam à normalidade no T2, sugerindo uma melhora tempo-dependente;
- Com relação às funções hepática e renal, os *scaffolds* se mostraram seguros;
- O aumento de Ca pode ser devido à inserção do biomaterial com maior quantidade de hidroxiapatita, entretanto, a normalidade também foi tempo-dependente.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, E. G. L., et al. Matriz porosa do BV60S no tratamento de defeitos ósseos críticos em raios de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 67, n. 4, p. 993-1002, 2015.

AMARAL, G. G. **Fármacos isolados ou combinados no tratamento de ratas com osteoporose induzida**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, 2014.

AMERICAN ASSOCIATION OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGEONS (AAOMS). Position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **J. Oral Maxillofac. Surg**, v. 65, n. 3, p. 369-76, 2007.

ANTONI, C. C. **Estudo microscópico comparativo entre as osteonecroses e as osteomielites**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial da Universidade do Sagrado Coração, 2016.

AZEVEDO, A. S; et al. Avaliação de diferentes proporções de fosfato de cálcio na regeneração do tecido ósseo de coelhos: estudo 32 clínico cirúrgico, radiológico e histológico. **Braz J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 49, p. 12-18, 2012.

BANERJEE, D. et al. Short-Term, High-Dose Pamidronate-Induced Acute Tubular Necrosis: The Postulated Mechanisms of Bisphosphonate Nephrotoxicity **Am. J. Kidney Dis**, v. 41, n. 5, p. 1-6, 2003.

BATISTTI M. V., CAMPANA S. P. F. Obtenção e caracterização de α -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2014-2019, 2008.

BERRUTI, A.; DOGLIOTTI, L.; TUCCI, M.; TARABUZZI, R.; FONTANA, D.; ANGELI, A. Metabolic bone disease induced by prostate cancer: rationale for the use of bisphosphonates. **J Urol**, v. 166, p. 2023-31, 2001.

BILLOTTE, W. G. **Ceramic Biomaterials, The Biomedical Engineering Handbook**. 2 ed, Boca Raton: CRC Press LLC, 2006.

BOATENG, J. S., MATTHEWS, K. H., STEVENS, H. N. E, et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 2892-923, 2008.

BODY, J. J.; PFISTERB, T.; BAUSSC, F. Preclinical Perspectives on Bisphosphonate Renal Safety. **The Oncologist**, v. 10, n. 1, p. 3-7, 2005.

BORGES, L. C. F. S. **Avaliação do complexo maxilo-mandibular de ratos tratados com ácido zoledrônico**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, 2013.

BOYDE, A. Jaw bone necrosis and bisphosphonates: microanatomical questions. **Bonekey Osteovision**, v. 3, n.9, 19-23, 2006.

BOZENA, C.; HRVOJE, H.; MARIJANA, K. Prevention and treatment of osteonecrosis of the jaw. **Journal Health**, v. 03, n. 9, p. 557-559, 2011.

BRAUN, E.; LACONO, V. J. Bisphosphonates: a review of pharmacology and implications for patient management. **Perio Clin Investg**, v. 1, p. 1-20, 2005.

BROWN, D. L.; ROBBINS, R. Developments in the therapeutic applications of bisphosphonates. **J Clin Pharmacol**, v. 39, p. 651-60, 1999.

CARVALHO, A.; MENDES, R. A.; CARVALHO, D. et al. Osteonecrose da mandíbula associada a bisfosfonatos intravenosos em doentes oncologicos. **Acta Med. Port.**, v. 21, n. 5, p. 505-10, 2008.

CARVALHO, P. S. P. et al. Principais aspectos da cirurgia bucomaxilofacial no paciente sob terapia com bisfosfonatos. **RFO**, v. 15, p. 183-189, 2010.

CORAMI, A. et al. Cadmium removal from single- and multi-metal (Cd + Pb + Zn + Cu) solutions by sorption on hydroxyapatite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 317, p. 402-408, 2008.

COSSÍO et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with myeloma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, n. 1, p. 52-55, 2008.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. **Robbins patologia estrutural e funcional**, p. 1088-90, 2005.

DASH, M. et al. Chitosan – A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 981-1014, 2011.

DAVIS, M. E; HSIEH, P. C.; GRODZINSKY, A. J.; LEE, R. T. Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials. **Circ Res**, v. 97, p. 8-15, 2005.

DAVIES, S. et al. Avaliação biológica e toxicológica de nanotubos de carbono. **Scientia. Série: Ciências da Saúde**, v. 10, n. 1, p. 11-17, 2009.

ELLIOT, J. Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates. 1 ed. **Elsevier Science**, v. 404, 1994.

ENDRES, D. B.; RUDE, R. K. Mineral and Bone Metabolism. In: BURTIS C. A., ASHWOOD E. R. et al. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4 ed. St. Louis, MO: **Elsevier Saunders**, p. 1891-1965, 2006.

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

FIHN, S. D. et al. **The New England Journal of Medicine n engl j med**, v. 349, n.17, 2003.

FLEISCH, H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour induced hypercalcemic and metastatic bone disease. **Drugs**, v. 42, p. 919-44, 1991.

FOOK, A. C. B. M.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. I. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como *scaffolds* para regeneração óssea. **Revista Matéria**, v. 15, n. 3, p. 392-399, 2010.

FREITAS, F. F. **Otimização do processo de imobilização de β -galactosidade de *aspergillus oryzae* em alginate de sódio com gelatin e glutaraldeído**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, 2007.

GEGLER, A. et al. Bisfosfonatos e osteonecrose maxilar: revisão da literatura e relato de 2 casos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, p. 25-31, 2006.

GEHRON, R. P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), **Principles of bone biology**. San Diego: Academic Press, v. 1, p. 225–237, 2002.

GIACOMELLI, C. E.; AVENA, M. J.; DEPAULI, C. P. Adsorption of bovine serum albumin onto TiO₂ particles. **J Colloid Interface Sci**, v. 188, p. 387-395, 1997.

GILES, C. The platelet count and mean platelet volume. **British Journal of Haematology**, v. 48, p. 31-37, 1981.

GREEN, J. R. Anti-tumor potential of biphosphonates. **Med Klin**, v. 95, n. 2, p. 23-8, 2000.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

HAMMAM, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 117-131, 2007.

HUBBELL, J. A. Biomaterials in tissue engineering. **Biotechnology (NY)**, v. 13, n. 6, p. 565-576, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 111-128, 2004.

KAMOUN, P.; VILLE, J. P. F. **500 Exames - Manual de Exames de Laboratório**, editora Atheneu, 1989.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e embriologia oral. **Texto-atlas-correlações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KATCHBURIAN, E.; CERRI, P.S. Formação e destruição óssea. In: Cardoso, R.J.A.; Gonçalves, E. A. N. Cirurgia para implantes. São Paulo: **Artes Médicas**, p. 437-45 2002.

KAUR, H.; UY C.; KELLY, J.; MOSES, A. M. Orbital inflammatory disease in a patient treated with zoledronate. **Endocr Pract**, v. 17, n. 4, p. 101–103, 2011.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.

KIERSZENBAUM A. L.; TRES L. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**, 3 ed. Elsevier, 2012.

KILKENNY, C. et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **Plos Biol**, v. 8, n. 6, p. 1000-412, 2010.

KIM, S. S. et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p.1399-1409, 2006.

KOS, M. et al. Bisphosphonates enhance bacterial adhesion and biofilm formation on bone hydroxyapatite, **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 10, n. 1016, p. 04-18, 2015.

KUMAR V. et al. **Robbins & Cotran: Bases patológicas das doenças**. 8 ed. Elsevier, 2010.

KUMAR V. et al. **Robbins: Patologias básicas**. 9 ed. Elsevier, 2013

LAMB, E. et al. Kidney function tests. In: BURTIS C.A., ASHWOOD E.R. et al. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4 ed. St. Louis, MO: **Elsevier Saunders**, p. 797-835, 2006.

LAMB, E. J. et al. Estimating Kidney function in adults using formulae. **Ann Clin Biochem**, v. 42, p. 321-345, 2005.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LORENZI, T. F. **Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada/Therezinha F.Lorenzi**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica/Therezinha F. Lorenzi** – 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

LU, L.; MIKOS, A. G. The importance of new processing techniques in tissue engineering. **MRS Bull**, v. 21 p. 28-32, 1996.

MARKS, S. C., ODGREN, P. R. Structure and development of the skeleton. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), Principles of bone biology. San Diego: **Academic Press**, v. 1, p. 3–15, 2002.

MARTINS, M. A. T. et al. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos: importante complicação do tratamento oncológico. **Revista Brasileira de Hematologia**. v. 31, n. 1, p. 41-46, 2009.

MARX, R. E. Oral & intravenous bisphosphonate – induced osteonecrosis of the jaws. **Quintessence Publishing Co**, 2007.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. **J Oral Maxillo fac Surg**, v. 61, p. 1115-1118, 2003.

MELO, M.G.D. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe, **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 9903, 2012.

MIGLIORATI, C. A. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. **J Clin Onco**, v. 21, n.22, p. 4253-4, 2003.

MIGLIORATI, C. et al. Bisphosphonate - associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone. **Cancer July**, v. 104, 2005.

MIRANDA, S. C. C. C. et al. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan–gelatin scaffold: A potential strategy for alveolar bone regeneration. **J Biomed Mater Res Part A**, v. 100, p. 2775–2786, 2012.

MOHAMED, A. M. An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, Alizae Marny Mohamed, v. 15, n. 1, p. 4-12, 2008.

MONTENEGRO M. R.; FRANCO M. **Patologia processos gerais**, 4 ed., 1999.

MOSS, D. W., et al. **Enzymes**. In: TIETZ N.W., ed. Fundamentals of Clinical Chemistry, 3 ed. Philadelphia Philadelphia, PA: SAUNDERS W.B., p. 346-421, 1987.

NAGY, B. Muscle disease. In: KAPLAN L.A., PESCE A.J., eds **Clinical Chemistry, theory, analysis, and correlation**, p. 420-438, 1984.

OCHOA, C. C. R. **Hidroxiapatita, policaprolactona e alendronato em defeitos ósseos experimentais no olecrano de coelhos**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2013

OLSSON, D. C.; PIPPI, N. L.; TOGNOLI, G. K. Comportamento biológico de matriz scaffold acrescida de células progenitoras na reparação óssea. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2403-2412, 2008.

PAPAPOULOS, S. E. Bisphosphonates: how they work. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 22, n. 5, p. 831-47, 2008.

PAPARELLA M. L. et al. Histopathological features of osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonates. **Blackwell Publishing Ltda, Histopathology**, v. 60, p. 511–527, 2011.

PASSOS, A. F; ALMEIDA, P. J. A. Relato de caso: Esclerite associada ao uso de bisfosfonatos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 5, sep/oct, 2006.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, p. 3279-3305, 2012.

PFISTER, T. et al. The renal effects of minimally nephrotoxic doses of ibandronate and zoledronate following single and intermittent intravenous administration in rats. **Toxicology**, v. 191, p. 159 - 167, 2003.

PINHEIRO. T. C et al. Implantes de hidroxiapatita em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratos submetidos ao tabagismo passivo. **Rev Bras Ortop**, v. 43, n. 10, p. 433-41, 2008.

PIRBHAI, A. et al. Bisphosphonate- Induced Orbital Inflammation: **A Case Series and Review, Orbit**, v. 34, n. 6, p. 331-335, 2015.

POLYZOS, S. A et al. Zoledronic acid-induced transient hepatotoxicity in a patient effectively treated for Paget's disease of bone. **Osteoporos Int**, v. 22, p. 363–367, 2011.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

REBELO, M. A. **Desenvolvimento e caracterização de scaffold com potencial para aplicação na regeneração de tecido ósseo**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, 2015.

RINCON, I. H., RODRIGUEZ, I. Z., TAMBAY, M. C. *et al.* Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates. Report of fifteen cases. Therapeutic recommendations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**; 12 (4): E267-71, 2007.

ROBERTS, G. A. F. Chitin Chemistry. **The Macmillan Press**, London, p. 1-53, 1992.

ROCK, R. C. et al. **Nitrogen metabolites and renal function**. Fundamentals of Clinical Chemistry, 3 ed. Philadelphia, PA: SAUNDERS W. B., p. 346-421, 1987.

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. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 62, n. 5, p. 527-34, 2004.

RUGGIERO, S. L.; WOO, S. B. Biophosphonates-related osteonecrosis of the jaws. **Dent Clin North Am**, v. 52, n. 1, p. 111-128, 2008.

RUGGIERO, S. L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw-2009. **Australian Endodontic Journal**, v. 35, n. 3, p. 119-130, 2009.

RUIJERMAN, R. Modeling and remodeling in bone tissue. **Technische Universiteit Eindhoven**, v. 101, 2005.

SAETHER, H. V. et al. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 813-821, 2008.

SANKALIA, M. G. et al. Inversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 2, p. 215-232, 2007.

SANTOS G. G. **Microesferas e grânulos compósitos de hidroxiapatita nanoestruturada associada ao alginato para a regeneração óssea**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia Instituto de Ciências da Saúde, 2015.

SCARPA, L. C. et al. Osteonecrose nos ossos da maxila e mandíbula associada ao uso de bisfosfonato de sódio. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, p. 86-92, 2010.

SEITZ, H. et al. Different Calcium Phosphate Granules for 3-D Printing of Bone Tissue Engineering Scaffolds. **Advanced biomaterials**, v. 11, n. 5, p. B41-B46, 2009.

SEOL, Y. J.; LEE, J. Y; PARK, Y. J. et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. **Biotechnol. Lett**, v. 26, p. 1037-1041, 2004.

SHIN, H., JO, S., MIKOS, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 4353-4364, 2003.

SHERWIN, J. E. Liver function. In: KAPLAN L.A., PESCE A. J. **Clinical Chemistry**, theory, analysis, and correlation, p. 420-438, 1984.

SILVA, A. R. S. et al. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. **Rev. Odonto Cienc.**, v. 22, n. 55, p. 77-81, 2007.

SILVA, E. C. et al. Utilização experimental de hidroxiapatita sintética em alvéolos dentários de gatos domésticos (*Felis catus*): estudo clínico, radiográfico e histomorfométrico. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 64, n. 4, p. 873-880, 2012.

SILVA, P. G. B. **Avaliação das alterações sistêmicas e hematológicas experimental de osteonecrose dos maxilares induzida por ácido zoledrônico**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, 2013

SILVA, R. R. **Alendronato de sódio, Atorvastatina cálcica e Flavonóides na osteoporose induzida por glicocorticóide**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa de Minas Gerais, 2006.

SKREPNEK, G. H.; SEAL, B.; TANGIRALA, M. et al. Adverse events and intravenous versus oral bisphosphonate use in patients with osteoporosis and cancer in the **U.S. Gen Dent**, v. 58, n. 6, p. 484–492; quiz 93–94, 2010.

SODEK, J.; MCKEE, M. E. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology**, v. 24, p. 99-126, 2000.

SOKI, F. N. et al., The Effects of Zoledronic Acid in the Bone and Vasculature Support of Hematopoietic Stem Cell Niches. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, p. 67–78, 2013.

SOUZA, D. M. et al. Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográficos e morfométricos. **Cienc Odontol Bras**, São José dos Campos, v. 8, p. 77-84, 2005.

SOUZA, D. M. et al. Avaliação da perda óssea periodontal em ratos por meio de métodos radiográficos e morfométricos. **Braz J Periodontol**, Piracicaba, v. 21, 2011.

THARANATHAN, R. N; HARISH PRASHANTH, K. V. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential - an overview. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 117-131, 2007.

THOMAS, C.; THOMAS, L. Labordiagnostik von Erkrankungen der Nieren und ableitenden Hamwege. In: Thomas L., **Labor und Diagnose 6th ed. Frankfurt/Main: TH- Books**, p. 520-585, 2005.

THOMPSON, R. C.; WAKE, M. C.; YASZEMSKI, M. J.; and MIKOS, A. G. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. **Adv Polym Sci**, v. 122, p. 247-74, 1995.

TORMENA, F. V. **Um modelo de remodelamento ósseo utilizando potenciais termodinâmicos generalizados**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Métodos Numéricos em Engenharia, Universidade Federal do Paraná, 2009.

- TREISTER, N. et al. Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. **Oral Diseases**, Ottawa, v. 15, p. 88-92, 2009.
- VAN, P. C.; ESTILO, C. Osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving IV bisphosphonates. **Oncology Williston Park**, NY. v. 20. n. 9, p. 1053-1062, 2006.
- VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P.; KANG, K. H.; KIM, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. **Int J Biol Macromol**. v. 72, p. 269-81, 2015.
- VERONESE, R. M. et al. Processo de reparo em feridas de extração dental. Interferência da solução anestésica contendo articaína 4% + Adrenalina 1:100.000: Análise Histológica em ratos. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 26, n. 1, p. 65-72, Jan/jun. 2005.
- VITAL, C. C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 58, n. 2, p. 175-183, 2006.
- WOOD, J.; BONJEAN, K.; RUETZ, S.; BELLAHCENE, A.; DEVY, L.; FOIDART, J. M. et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 302, p. 1055-61, 2002.
- YANHUI, L. et al. HEPATOTOXICITY INDUCED BY ZOLEDRONIC ACID IN AN AGED WOMAN WITH PRIMARY OSTEOPOROSIS. **EXCLI Journal**, v. 12, p. 115-117, 1611-2156, 2013.
- YOUNES, I.; RINAUDO, M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. **Academic Editors**: David Harding and Hitoshi Sashiwa, 2015.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 CEUA-UNISO
 PARECER

Protocolo nº 055/2015
Interessado (a): Denise Grotto
Orientador (a): Denise Grotto
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA E DA EFICÁCIA DE SCAFFOLD A BASE DE QUITOSANA E HIDROAPATITA NA OSTEONECROSE MAXILO-MANDIBULAR IN VIVO
Título do Experimento: o mesmo

Apresentado à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

APROVADO.

APROVADO com RECOMENDAÇÃO, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

COM PENDÊNCIA, devendo o proponente readequar os itens do protocolo antes de iniciar o projeto;

REPROVADO

Manifestação do Parecerista:

•

Nome: Renata de Lima

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data 25/08/2015

* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ccua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica

ANEXO 2 – Certificados de apresentação de trabalhos em congressos





29/08 a
01/09/2016
Foz do Iguaçu

CERTIFICADO

Certificamos que o resumo intitulado

"PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE RATOS COM OSTEONECROSE INDUZIDA POR BISFOSFONATOS TRATADOS COM SCAFFOLD A BASE DE QUITOSANA E HIDROXIAPATITA"

dos autores: Fernanda Gomes Leite, Adriana Duarte de Almeida, Márcia de Araújo Rebelo, Marco Vinicius Chaud, Demise Grotto

foi apresentado no formato *immediatamente* a

XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE,

realizada no Centro de Convenções e Eventos do Bourbon Cataratas, Foz do Iguaçu, PR,
no período de 29 de agosto a 01 de setembro de 2016.



Comissão Organizadora







AAC
II Mostra de Atividades Acadêmicas
EVENTO INTERNACIONAL

Certificado

Certificamos que o trabalho **"MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOTOMIA PARA INSERÇÃO DE SCAFFOLD NA PREVENÇÃO DE OSTEONECROSE"** de autoria de **Adriana Duarte Almeida, Fernanada Gomes Leite, Marcia de Araujo Rebelo, Fabia Judice Marques Viroel, Liliane Cristine Ferreira de Souza Borges, Marco Vinícius Chaud e Denise Grotto** foi apresentado na modalidade de pôster do II Simpósio em Tecnologia, Inovação e Sustentabilidade Ambiental, realizado na Universidade de Sorocaba, entre os dias 08 e 10 de novembro de 2016.

Sorocaba, 28 de novembro de 2016



Prof. Dra. Luciane Cruz Lopes
Presidente da Comissão Organizadora da
II Mostra de Atividades Acadêmicas - AAC



Prof. Dr. Daniel Brito Gonçalves
Coordenador do II Simpósio em Tecnologia,
Inovação e Sustentabilidade



Prof. Dr. José Martins de Oliveira Junior
Pró-Reitor Acadêmico da Universidade
de Sorocaba - Uniso

