

**PEDRO HENRIQUE JUSTINO OLIVEIRA
LIMIRIO**

**EFEITO LOCAL DA ASSOCIAÇÃO DE
DOXICICLINA E ALENDRONATO NO
REPARO ÓSSEO**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção do Título
de Mestre em Clínica Odontológica.

UBERLÂNDIA, 2015

PEDRO HENRIQUE JUSTINO OLIVEIRA LIMIRIO

EFEITO LOCAL DA ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E ALENDRONATO NO REPARO ÓSSEO

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientador (a): Profa. Dra. Paula Dechichi

Co-Orientador: Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura

Prof. Dr. Geraldo Batista Melo

Prof. Dr. Antônio Wilson de Almeida

Prof. Dra. Paula Dechichi

UBERLÂNDIA, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

L734e Limirio, Pedro Henrique Justino Oliveira, 1989-
2015 Efeito local da associação de doxiciclina e alendronato no reparo
ósseo / Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio. - 2015.
30 f. : il.

Orientadora: Paula Dechichi.

Coorientador: **Geraldo Batista de Melo**.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Doxiciclina - Teses. 3. Densitometria
óssea – Teses. I. Dechichi, Paula. II. **Melo, Geraldo Batista de,**
1952-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia. IV. Título.

Dedicatória

Aos meus Pais, Pedro e Eliane,

Obrigado por toda a dedicação, todos os ensinamentos, todos os esforços e todo amor que sempre deram a mim. Obrigado pela paciência e compreensão com minhas ausências, obrigado por acreditarem nos meus sonhos e não medirem esforços para as realizações, obrigado por acreditarem em mim. Amo vocês!

Ao meu irmão João Pedro,

Mesmo estando distante sinto sua torcida constante por mim, muito obrigado pelo carinho, cumplicidade e irmandade. Amo você!

À minha namorada Camila,

Obrigado por todo amor e companheirismo, por me apoiar nos momentos mais difíceis com conselhos sabeis e pela paciência que sempre teve comigo. Sua presença e cumplicidade são muito importantes na minha vida. Te amo muito!

À minha Família,

Muito obrigado por todos os momentos que passamos juntos, por me apoiarem e torcerem por mim.

Agradecimentos

À Professora Dra. Paula Dechichi,

Professora se estou aqui hoje foi porque à senhora acreditou em mim e abriu as portas para que eu pudesse desenvolver meu trabalho. Muito obrigado por todo aprendizado, por todas as oportunidades, por toda amizade e por toda orientação tanto profissional quanto pessoal. Admiro muito a profissional que à senhora é. Obrigado pela orientação tão cuidadosa na execução desse trabalho e de outros que desenvolvemos, pela confiança depositada e no acolhimento pessoal que a senhora realizou, à senhora faz parte da minha história e a quem eu sempre serei grato. Muito obrigado!!!

Ao Departamento CTBMF,

Em especial aos Professores Jonas Dantas Batista, Lair Mambrini Furtado e Flaviana Soares Rocha, por ter aberto a porta desse mundo de pesquisa e docência, vocês foram os precursores desse processo. Obrigado por todo apoio, todos ensinamentos e todas as palavras de amizade. Tenho vocês como exemplo e me espelho em vocês como profissionais.

Ao Professor Dr. Geraldo Batista de Melo,

Obrigado por todos os conhecimentos transmitidos durante esse tempo. Você foi essencial para o meu desenvolvimento e para que eu me tornasse um profissional melhor.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
2 PROPOSIÇÃO.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4 RESULTADOS.....	17
5 DISCUSSÃO.....	23
6 CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	25
ANEXO.....	30

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito local de doxiciclina 10% e alendronato 1% associado ao poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) no reparo ósseo. Trinta ratos foram divididos em três grupos, como se segue: Grupo controle (GC), Grupo Drogas (GD) e Grupo Veículo-PLGA (GV). Em todos os animais, foram criados defeitos ósseos nos fêmures direitos preenchidos com: apenas coágulo de sangue (GC); gel PLGA, doxiciclina 10% e alendronato 1% (GD); ou veículo-PLGA (GV). Os animais foram sacrificados sete ou 15 dias após a cirurgia e foram analisados os seguintes parâmetros: radiodensidade óssea (HU), porcentagem de matriz óssea e o número de osteoclastos. Aos sete dias, os resultados mostraram maior radiodensidade em GD ($177,75 \pm 76,5$) comparando ao GC ($80,37 \pm 27,4$), mas não houve diferença em comparação com GV ($147,1 \pm 41,5$); não houve diferença estatística na porcentagem de matriz óssea em GC ($25,6 \pm 4,8$), VG ($27,8 \pm 4$) e GD ($18,9 \pm 7,8$); e ocorreu decréscimo na quantidade de osteoclastos em GD ($4,6 \pm 1,9$) comparando com GC ($26,7 \pm 7,4$) e GV ($17,3 \pm 2,7$). Em 15 dias, GD ($405,1 \pm 63,1$) apresentou maior radiodensidade em relação ao GC ($213,2 \pm 60,9$) e GV ($283,4 \pm 85,8$); houve aumento significativo na porcentagem de matriz óssea em GD ($31,5 \pm 4,2$) comparando com GC (23 ± 4), mas nenhuma diferença em comparação com GV ($25,1 \pm 2,9$). Houve decréscimo na quantidade de osteoclastos em GD ($20,7 \pm 4,7$) e GV ($29,5 \pm 5,4$) comparando com GC ($40 \pm 9,4$). Os resultados sugerem que a associação de doxiciclina 10% e alendronato 1% com PLGA acelera a reparação óssea.

Palavras chaves: Doxiciclina, Alendronato, Reparação óssea.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the local effect of 10% doxycycline and 1% alendronate combined with poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA) on bone repair. Thirty rats were divided into three groups, as follow: Control Group (CG), Drug Group (DG) and Vehicle-PLGA Group (VG). Bone defect was created in the right femur and filled with: blood clot (CG); PLGA gel, 10% doxycycline and 1% alendronate (DG); or vehicle-PLGA (VG). The animals were euthanized seven or fifteen days after surgery. Bone radiodensity, bone matrix and number of osteoclasts were quantified. At seven days, the findings showed increased density in DG (177.75 ± 76.5) compared with CG (80.37 ± 27.4), but no difference compared with VG (147.1 ± 41.5); no statistical difference in bone neoformation CG (25.6 ± 4.8), VG (27.8 ± 4) and DG (18.9 ± 7.8); and decrease osteoclasts in DG (4.6 ± 1.9) compared with CG (26.7 ± 7.4) and VG (17.3 ± 2.7). At fifteen days, DG (405.1 ± 63.1) presented higher density than CG (213.2 ± 60.9) and VG (283.4 ± 85.8); there was a significant increase in bone neoformation in DG (31.5 ± 4.2) compared with CG (23 ± 4), but no difference compared with VG (25.1 ± 2.9). There was decrease number of osteoclasts in DG (20.7 ± 4.7) and VG (29.5 ± 5.4) compared with CG (40 ± 9.4). The results suggest that the 10% doxycycline combination with 1% alendronate in PLGA accelerated bone repair.

Keywords: Doxycycline, Alendronate, Bone Repair.

1 - INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Reparo tecidual é um fenômeno que ocorre para reconstituir áreas desorganizadas ou destruídas por trauma aos tecidos, envolvendo células e inúmeros mediadores químicos. É sempre um desafio otimizar e acelerar o processo de reparo para restabelecer a fisiologia tecidual. A complexa resposta de um tecido vivo à agressão, onde houve destruição dos componentes teciduais, é denominada reparação; esta pode ocorrer por regeneração ou por cicatrização. No processo de regeneração ocorre a reconstituição da parte danificada ou perdida, resultando em estruturas com a mesma arquitetura e função teciduais originais. A cicatrização é a reparação da região lesada por tecido que não restaura completamente a arquitetura ou função da parte danificada (Schmidt-Bleek et al. 2012).

Basicamente, o processo de reparo tecidual envolve as seguintes etapas: inflamação e coagulação sanguínea; formação de tecido de granulação e; maturação e remodelação tecidual. Os eventos iniciais do processo de reparo são caracterizados pela formação do coágulo sanguíneo, com a presença de plaquetas carregadas de fatores de crescimento, além de células inflamatórias. Rapidamente, inicia-se a formação de uma rede de fibrina, que auxilia a migração das células circundantes e desenvolve-se um infiltrado inflamatório. Gradualmente, ocorre invasão de fibroblastos que têm origem a partir da diferenciação das células mesenquimais, bem como proliferação de capilares sanguíneos, originados a partir de células endoteliais, caracterizando a formação do tecido de granulação. Com o passar do tempo, o tecido de granulação origina um tecido conjuntivo fibroso, ainda não totalmente maduro e que sofrerá processo de maturação e remodelação, com reorganização das fibras colágenas (Consolaro, 2009).

Embora o reparo do tecido ósseo apresente uma sequência de eventos semelhante, por ser um conjunto cuja matriz extracelular é mineralizada, ele apresenta algumas particularidades em seu desenvolvimento. Quando o osso é lesionado, ocorre rompimento do periôsteo, de vasos sanguíneos, destruição de matriz, da medula óssea e morte de células ósseas. No local da lesão, ocorre

hemorragia e formação de coágulo, estabelecendo um espaço hipóxico ($\text{PO}_2 = 5$ a 10mmHg) e acidótico ($\text{pH} 4$ a 6); constituído de eritrócitos, fibrina, adjacentes a células ósseas, mesenquimais e plaquetas, que liberam mediadores químicos, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) (Lynch et al., 2008).

Na região da lesão óssea, encontra-se um tecido necrótico que estimula intensa resposta inflamatória, caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma, aparecimento de leucócitos e células mesenquimais. No início do reparo, os macrófagos removem restos celulares e matriz alterada. Em seguida, ocorre resposta proliferativa intensa do periôsteo e do endósteo, com neoformação de tecido conjuntivo e também de novos capilares, caracterizando a formação de tecido de granulação. A neovascularização é característica do processo, sendo que novos vasos sanguíneos podem ser identificados no tecido de granulação. Com o decorrer do tempo, os osteoblastos sintetizam matriz orgânica, rica em colágeno tipo I, a qual sofrerá mineralização, posteriormente (Schmidt-Bleek et al. 2012).

A extensão e a atividade do reparo ósseo dependem da quimiotaxia e ativação de macrófagos e posterior proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (Schmidt-Bleek et al. 2012). As células osteoprogenitoras, apesar de serem encontradas na medula óssea, têm sua localização específica na porção do estroma, sendo células mesenquimais não-hematopoiéticas, mas de linhagem osteogênica (Bianco et al. 2011). Uma vez diferenciado, os osteoblastos, são responsáveis por produzir matriz orgânica e controlarem o processo de mineralização óssea. Inicialmente, os osteoblastos sintetizam matriz não mineralizada, que inclui inúmeros osteócitos e fibrilas colágenas dispostas sem organização definida, caracterizando o tecido ósseo imaturo. Os osteócitos ocupam lacunas no interior desta matriz óssea, desempenhando função importante na manutenção da matriz óssea (Schmidt-Bleek et al. 2012).

O processo de reparo ósseo continua substituindo tecido ósseo imaturo por maduro. Este apresenta organização das fibrilas colágenas em lamelas ou

camadas, menor número de osteócitos incluídos na matriz mineralizada e maior conteúdo mineral, evoluindo para a formação do osso maduro (lamelar). Neste momento, os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, possuem um papel importante. Esses são células multinucleadas, que se localizam na superfície da matriz, sendo ativos no processo de remodelação óssea (Katchburian & Arana, 2004; Ross, 2012).

Após a formação do tecido ósseo maduro, o osso mantém um processo combinado e constante de formação e reabsorção por toda a vida. Esta remodelação é determinada pela carga genética e se mostra dependente da regulação e influências endócrinas, bioquímicas e ambientais (Dimitriou et al., 2005). Mesmo no adulto, o tecido ósseo é metabolicamente ativo e a manutenção da matriz é resultado do balanço de atividades de síntese e reabsorção, que refletem as atividades antagonistas de osteoblastos e osteoclastos (Batista et al., 2014).

O reparo ósseo é influenciado por vários fatores tais como o tipo de osso (cortical ou trabecular), local e severidade da lesão ou dano ao tecido ósseo, presença de infecção, fixação durante o reparo, idade, estado de saúde geral e nutricional dos indivíduos (Batista et al., 2014). Assim, a lesão do tecido ósseo por trauma ou por procedimentos cirúrgicos passa por uma fase inflamatória inicial, seguida de reparo e remodelação (Shapiro, 2008).

Normalmente, o tecido ósseo sofre regeneração, reconstituindo morfologia e função originais, necessárias para várias condições clínicas de perda óssea. A regeneração do tecido ósseo lesionado ou excisado representa uma sequência complexa de eventos que começam com recrutamento, adesão e proliferação de células progenitoras, seguido por diferenciação de células em fenótipos apropriadas, capazes de restaurar o tecido danificado (Yaffe et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que vários fatores e medicamentos exibem propriedades que podem estimular a osteogênese, tais como a proteína morfogenética óssea 2 (Alonso et al., 2010), o fator de crescimento de fibroblasto básico (HAYASHI et al, 2007), o plasma rico em plaquetas (Choo et al., 2013), fator de crescimento transformante-beta 1 (Hong et al., 2000), fator de

crescimento endotelial vascular (VEGF) (Minagawa et al., 2014), bisfosfonatos (Kim et al., 2009) e tetraciclinas (Buduneli et al., 2007).

Investigações recentes mostraram que uma variedade de diferentes classes de medicamentos, os bisfosfonatos, tetraciclinas e associação entre eles, têm estimulado a osteogênese em perda óssea alveolar (Buduneli et al., 2007; Ozdemir et al., 2012; Yaffe et al., 2004), em reparação de defeitos ósseos (Yaffe et al., 2003) e em cultura de células (Im et al., 2004; Kim et al., 2009). Buduneli et al. (2007) sugeriu que o alendronato e/ou doxiciclina pode inibir a expressão metaloproteinases da matriz-8 (MMP-8) de forma significativa, e sua administração combinada pode proporcionar efeitos benéficos na reparação óssea.

Estudos indicam que os bisfosfonatos têm efeito anabólico em osteoblastos, aumentando a proliferação e maturação e também inibindo a apoptose, estimulando assim a osteogênese (Kim et al., 2009). Os bisfosfonatos são inibidores da atividade osteoclastica bem conhecidos sendo amplamente utilizados no tratamento de osteoporose. A ação farmacológica do alendronato depende da sua interferência com a via do mevalonato, reduzindo a prenilação de proteínas de ligação que são essenciais para a atividade e sobrevivência dos osteoclastos. Consequentemente, o alendronato interfere com a estabilidade da borda em escova dos osteoclastos, estimulando a apoptose, o que reduz a reabsorção e a remodelação óssea, e promove um balanço positivo no tecido ósseo (Kim et al., 2009).

A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro, usado no tratamento de processos infecciosos, inclusive na doença periodontal, devido a sua capacidade em inibir a síntese proteica bacteriana (Borderie et al., 2001). Contudo, novos efeitos da tetraciclina têm sido estudados, como por exemplo, a capacidade de bloquear metaloproteinases de matriz (Ramamurthy et al., 2002), inibição da liberação de citocinas (Kirkwood et al., 2003), redução da reabsorção óssea, tratamento de doenças degenerativas do sistema nervoso central (Wang et al., 2005), redução de radicais livres e tratamento de neoplasias (Saikali & Singh, 2003).

Tetraciclinas semi-sintéticas, tais como a doxiciclina em conjunto com a cirurgia periodontal, mostraram aumento na velocidade de reparação das lesões, aumentando mediadores osteogénicos, e reduzindo a atividade das colagenases, incluindo os tipos I, III e IV (Yagan et al., 2014). Holmes et al. (2004) demonstraram que a doxiciclina pode regular *in vitro* negativamente a osteoclastogênese de células mononucleares de sangue periférico humano, estimuladas com o receptor ativador de NF- κ B do ligante (RANKL) e fator de estimulação de colónias de macrófagos (M-CSF). Esta evidência sugere que a acumulação de doxiciclina pode suprimir a reabsorção óssea por meio da inibição não só da atividade enzimática dos osteoclastos (isto é, a inibição das metaloproteinases de matriz), mas também a sua diferenciação induzida por RANKL (Franco et al., 2011). Administração local de doxiciclina sub-antimicrobianas ou sistêmica tem sido extensivamente estudada para minimizar a ruptura de tecido do hospedeiro (Muthukuru & Sun, 2013).

O presente estudo investigou a hipótese de que a associação das propriedades anabolizantes do alendronato com as anti-proteolíticas, collagenolíticas, antibióticas da doxiciclina possam promover aceleração do reparo ósseo. A hipótese nula testada foi que o efeito local do gel de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) com doxiciclina 10% e alendronato 1% não altera a reparação de defeitos ósseos experimentais em ratos aos 7 e 15 dias.

2 - PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação entre doxiciclina e alendronato em gel de PLGA no reparo ósseo, por meio de análise da radiodensidade, neoformação óssea e quantidade de osteoclastos na região do defeito ósseo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 30 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com 250 a 300g e cerca de três meses de idade, clinicamente sadios.

Os animais foram adquiridos e mantidos no Biotério da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) com ração balanceada, água potável *ad libitum* e monitorados quanto ao estado geral. Toda a pesquisa foi realizada nas instalações da UFU. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética na utilização de animais (CEUA UFU 046/13) e seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos iguais: Grupo Controle (GC), Grupo de Drogas (GD), Grupo Veículo (GV) e sacrificados após sete ou 15 dias (Quadro 1).

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais e período de avaliação.

Grupos	Períodos	7 dias	15 dias
Controle (n=10)		5	5
Droga (n=10)		5	5
Veículo (n=10)		5	5

Procedimentos cirúrgicos

Os animais dos três grupos foram submetidos à cirurgia para confecção de lesões em osso similar ao estudo de Guimarães *et al.* (2006), com algumas modificações. Previamente ao ato cirúrgico, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal, contendo 0,025 ml/100g de cloridrato de xilazina 2% e 0,05 ml/100g de cloridrato de quetamina 10%. Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região coxofemoral direita. Logo após, foi realizada a antisepsia da região com solução de álcool iodado 0,5% (Laborquim, Laborquim® Ltda, Araxá-MG/Brasil). A área a ser operada foi limitada com campo cirúrgico fenestrado de tecido não tecido (TNT) esterilizado, adaptado para o procedimento.

Com o animal posicionado em decúbito lateral, foi obtido acesso cirúrgico à região lateral do fêmur direito por meio de incisão contínua longitudinal de pele e tecido subcutâneo, com dois cm de extensão, utilizando lâmina de aço inox nº 15 (Figura 1-A) (BD Lâmina – Curitiba – PR/Brasil) montada em cabo para bisturi nº3 (Golgran®, Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA São Paulo – SP).

Após a incisão da fáscia muscular (Figura 1-B), a musculatura da região foi divulsionada com auxílio de uma tesoura cirúrgica romba curva (Golgran®, Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA São Paulo – SP) e pinça anatômica 14 cm (Golgran®, Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico LTDA São Paulo – SP) até a exposição do periosteio, que foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser exposta, permitindo acesso direto à diáfise do fêmur (Figura 1-C).

O fêmur direito foi então delimitado em três porções (superior, mediana e inferior), com o objetivo de padronizar a área a ser operada, sendo a região mediana o local de eleição para a realização do estudo. Na face lateral do fêmur foi realizado o defeito ósseo com broca esférica nº 8 (KG®, KG Sorensen, São Paulo-SP) acoplada em motor elétrico (Beltec Indústria e Comércio de Equipamentos Odontológicos LTDA, Araraquara – SP/Brasil) com 1000 rpm, associado à irrigação abundante, com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Figura 1-D) (Laboratório Sanobiol Ltda., São Paulo-SP/Brasil).

O parâmetro de profundidade da perfuração foi o rompimento da cortical óssea do ponto de eleição sem tocar a cortical do lado oposto. A broca foi lavada e esterilizada a cada animal e substituída a cada cinco lesões realizadas, devido à diminuição do poder de corte (Figura 1-E).

As lesões foram preenchidas com coágulo sanguíneo (grupo controle), associação da doxiciclina a 10% e alendronato a 1% em PLGA (grupo droga) e somente com o veículo-PLGA (grupo veículo). O volume da droga e veículo foi aproximadamente 10 µl, suficiente para o preenchimento da loja cirúrgica (Figura 1-F). Em seguida, foi realizada sutura por planos com fio cirúrgico monofilamentado de nylon, estéril, não absorvível 4-0 (Figura 1-G.H) (Shalon®, Shalon Fios Cirúrgicos Ltda. São Luiz de Montes Belos – GO/Brasil). Para

analgesia, com o animal ainda sobre efeito da anestesia, foi administrado paracetamol (50mg/kg por via intraperitoneal). No período pós-operatório foi administrado paracetamol gotas (80mg/kg, por via oral), durante quatro dias.

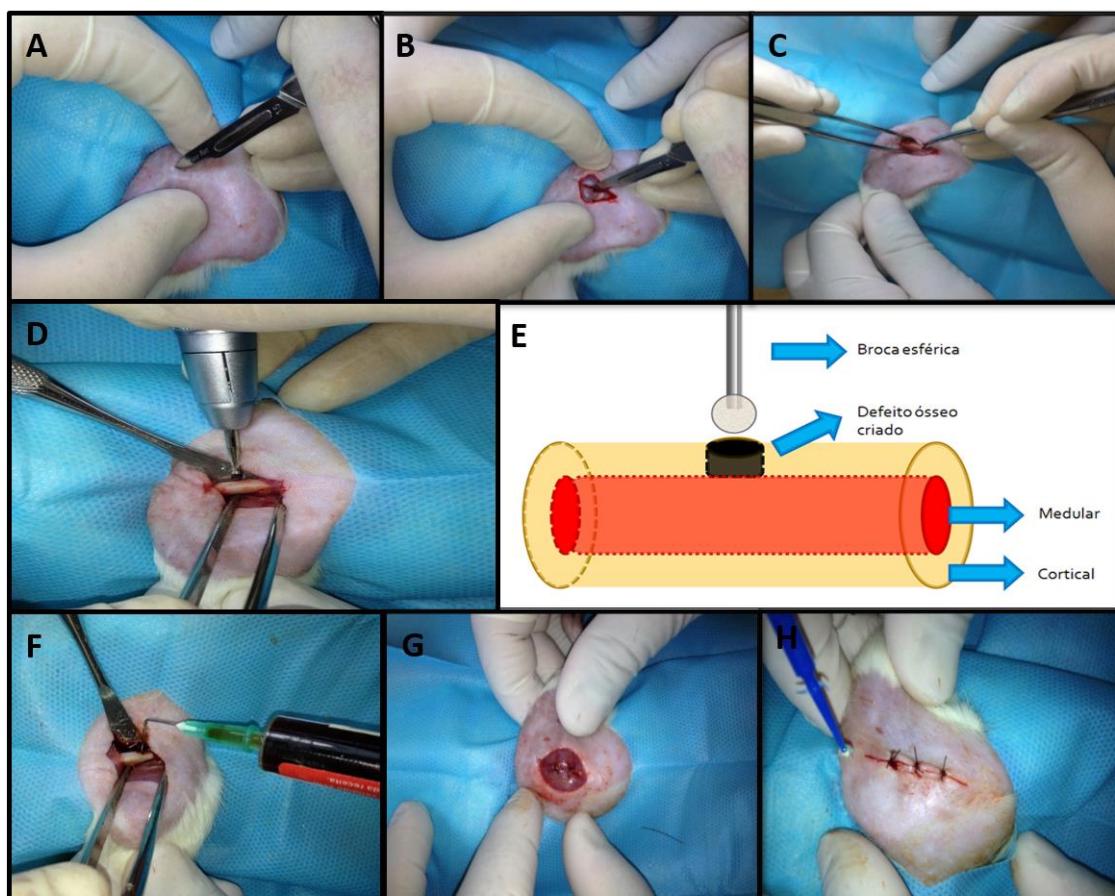


Figura 1. Imagens mostrando a sequência cirúrgica. A - Local da incisão na região lateral do fêmur. B - Incisão da fáscia muscular. C - Divulsão da musculatura e descolamento do periósteo expondo à diáfise. D – Região mediana para realização do defeito ósseo. E – Modelo esquemático mostrando o procedimento de confecção das lesões ósseas na cortical do fêmur. F – Aplicação da droga dentro do defeito ósseo. G – Sutura da fáscia muscular. H – Sutura da pele com pontos simples.

Obtenção dos espécimes e processamento histológico

Os animais foram sacrificados nos intervalos de sete e 15 dias após a cirurgia, por meio de injeção intraperitoneal, contendo 0,025 ml/100g de

cloridrato de xilazina 2% e 0,05 ml/100g de cloridrato de quetamina 10%, seguido por deslocamento cervical, de acordo com os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais (lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008). Em seguida, foi realizada incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente, ao longo do fêmur operado. A musculatura foi divulsionada, sem o comprometimento da região do defeito ósseo realizado, e o fêmur foi desarticulado na junção coxofemoral e no joelho. As epífises foram removidas com auxílio de disco diamantado (KG Sorensen. Cotia – SP/Brasil).

Os espécimes obtidos foram colocados em potes plásticos previamente identificados, contendo solução de formalina a 10% tamponada e fixados por 48 horas. Após a fixação, foram conservados em solução Tampão fosfato para análise de densitometria óptica óssea. Posteriormente, os espécimes foram desmineralizados em EDTA 10%, as diáfises foram seccionadas ao meio, longitudinalmente, e processados para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de 5 μ m obtidos foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histológica qualitativa, e Tricrômico de Mallory para análise histomorfométrica.

Densitometria Óptica Óssea (DO)

A fim de avaliar a reparação óssea nas áreas osteotomizadas, foi utilizada densitometria óptica óssea por meio de tomografia computadorizada volumétrica de feixe cônico. As diáfises dos fêmures foram estabilizadas em dispositivo padrão (placa de cera vermelha), posicionadas de forma perpendicular à placa de cera (Figura 2-A).

Todos as diáfises foram submetidas ao exame tomográfico simultaneamente, utilizando o aparelho GX CB-500® (Figura 2-B) (Gendex, Dentsply International, EUA).

As imagens tomográficas foram obtidas em formato digital e transferidas para o computador. A resolução das imagens foi 635ppi, sendo o tamanho de 900x641dpi. Os escaneamentos foram realizados com 0.125 de voxel, com sete mA e 120 kVp, tempo de exposição de 8.9 - 23s e distância focal de 71.4 cm entre objeto e aparelho. A densitometria óptica óssea foi avaliada usando o programa ImageTool® versão 3.0 (UTHSCSA, Texas, EUA). O programa

ICATVision, carrega as imagens desejadas; na janela látero-superior esquerdo a imagem gerada está em vista axial, e nas janelas látero-superior direito e látero-inferior esquerdo estão em vista lateral e frontal, respectivamente.

Nas janelas do programa, uma diáfise foi selecionada e a região de interesse (ROI) do defeito ósseo foi delimitada utilizando linhas de cortes verticais e horizontais. O programa gerou um valor médio dos tons de cinza (8-bit) mostrando a densidade expressa na escala de Hounsfield (HU). Dois quadrados medindo $0,1 \text{ mm}^2$ foram marcados na região cortical e medular para servir como referência de valores de densidade máxima e mínimo obtidos na mesma imagem (Figura 2-C). Além disso, o sangue, o medicamento e o veículo-PLGA foram colocados em tubos de eppendorf, e submetidos ao escaneamento para obter o valor individual na escala de Hounsfield de cada material.

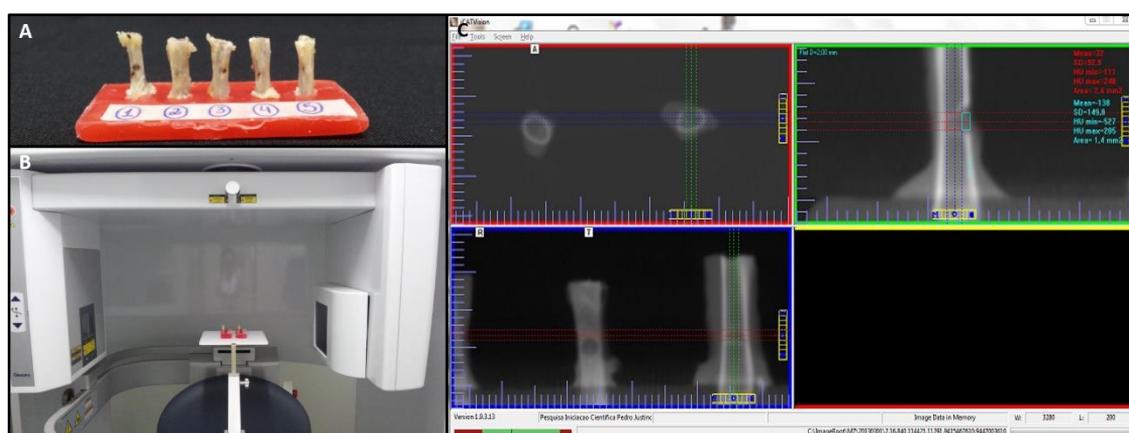


Figura 2. Imagens mostrando o processo para obtenção dos dados da densitometria óptica óssea. A – Grupos de fêmures (diáfises) posicionados para tomografia. B – Fêmures estabilizados no tomógrafo para escaneamento. C – Sequência de análise para obtenção dos dados na escala de Hounsfield.

Análise Histomorfométrica

Nos cortes corados em Tricrômico de Mallory foi quantificada a área de matriz óssea neoformada na região do defeito realizado. Inicialmente, as imagens histológicas foram digitalizadas utilizando câmera microscópica digital (Leica ICC50, Leica Microsystems. Heerbrugg, Switzerland), acoplada ao

microscópio (Figura 3-A) (Leica DM500, Leica Microsystems. Heerbrugg, Switzerland). Em seguida, o software editor de imagens Adobe Photoshop CS6 Version: 13.0 x32 (Adobe®, Adobe System Inc., San Jose, CA/EUA) foi utilizado para unir as imagens de cada defeito ósseo e remover toda área de tecido mole (Figura 3-B). Através do software gráfico HL Image 2005 ++ (Western Vision Software, Utah/EUA), as imagens de cada corte histológico editadas foram transformadas em imagens binárias. Em seguida, a região de cada defeito foi delimitada com a ferramenta *drawn* e calculada a porcentagem de matriz óssea com a ferramenta *measurement* (Figura 3-C).

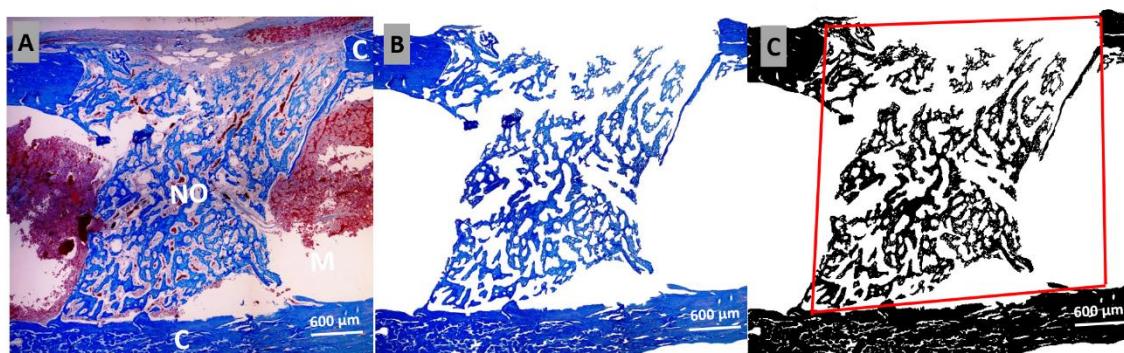


Figura 3. A - Fotomicrografia de corte histológico longitudinal de fêmur mostrando a cortical (C), medula (M) e neoformação óssea (NO). B – Imagem após a remoção do tecido mole. C – Imagem binária da mesma fotomicrografia com a delimitação da área total do defeito ósseo (linha vermelha). Tricrômico de Mallory.

Todos os osteoclastos presentes na ROI foram contados por dois examinadores em estudo cego. O critério morfológico para identificação dos osteoclastos foi: células que apresentavam dois ou mais núcleos e próximas à superfície de reabsorção óssea (Chaichanasakul, 2014). Quaisquer divergências entre os dois examinadores foram resolvidas por um terceiro examinador. A confiabilidade inter-avaliador de extração de dados foi calculada pela determinação da porcentagem de concordância e o coeficiente de correlação (*kappa*, o nível de 5% de significância).

Análise Histológica Qualitativa

O estudo das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica (microscópio óptico modelo BX50 Olympus®, Olympus Imaging America Inc. Shinjuku-ku, Tóquio/Japão), visando o estudo do processo de reparo ósseo por meio de análise descritiva. Dos espécimes corados em HE, 180 imagens histológicas da ROI foram analisadas em cada grupo, de cada período. As imagens foram obtidas usando o microscópio Leica® DM2500 M (Leica Microsystems®, Buffalo Grove, Illinois, EUA).

Análise estatística

A análise foi realizada por meio do software de estatística GraphPad Prism (versão 5.0 para Windows, San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e Two-Way Anova seguido pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $\alpha < 0,05$.

4 - RESULTADOS

Após a cirurgia, todos os animais apresentaram comportamento normal, não houve perda de peso e a reparação do defeito evoluiu sem quaisquer sinais de infecção.

Densitometria Óptica Óssea (DO)

A tomografia computadorizada mostrou que não houve diferença significativa na radiodensidade (HU) de referência do osso cortical (Figura 4-A) e medular dos fêmures entre os grupos, nos dois períodos experimentais (Figura 4-B). Em sete dias, a análise da ROI mostrou aumento de radiodensidade no GD ($177,75 \pm 76,5$) em comparação com o GC ($80,37 \pm 27,4$). Não houve diferença entre GV ($147,1 \pm 41,5$) e GD, bem como entre GV e GC. Após 15 dias, GD ($405,1 \pm 63,1$) apresentou maior radiodensidade em relação à GC ($213,2 \pm 60,9$), mas não houve diferença de radiodensidade entre GV ($283,4 \pm 85,8$) em relação à GD e GC (Figura 4-D).

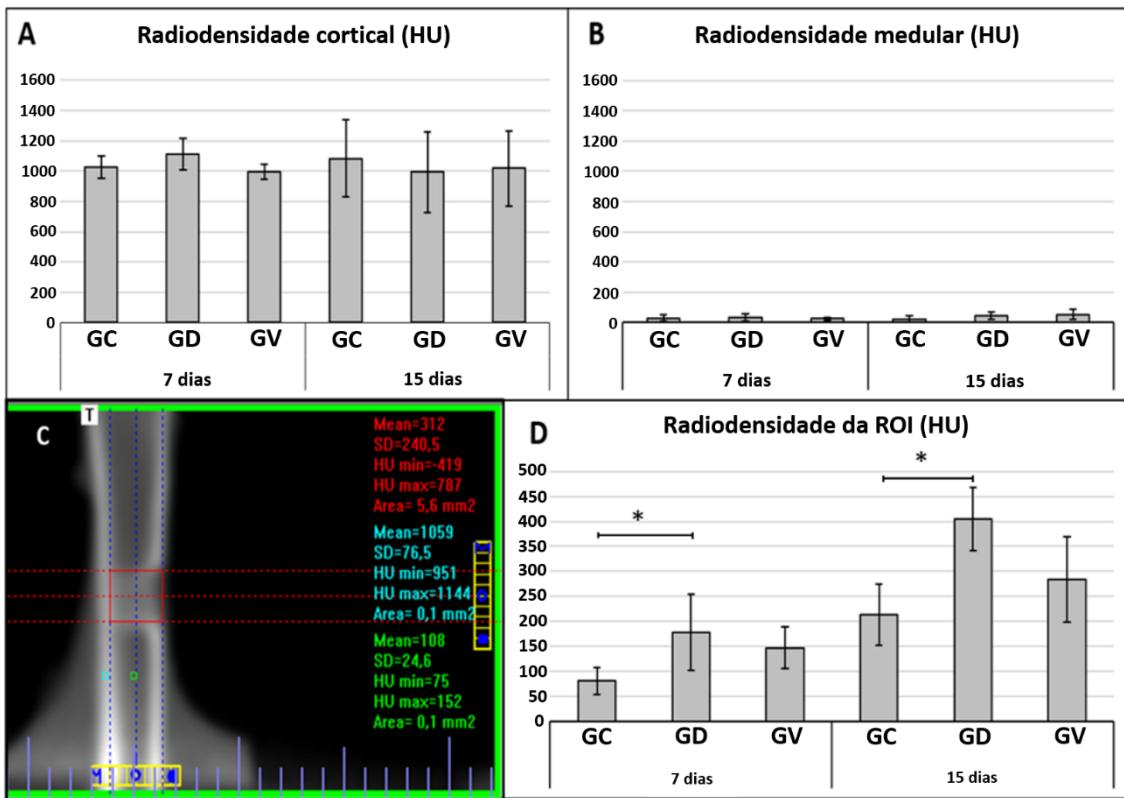


Figura 4. Referências da radiodensidade óssea nas áreas cortical (A) e medular (B). Imagem tomográfica computadorizada demonstrando a delimitação da região de interesse (ROI) (C). Radiodensidade óssea em ROI de todos os grupos avaliados expressos na escala de Hounsfield (HU) (D). (* P <0,05)

Análise Histomorfométrica

A análise histomorfométrica aos sete dias não mostrou diferença estatística na porcentagem de matriz óssea entre os grupos GC ($25,6 \pm 4,8$), GV ($27,8 \pm 4$) e GD ($18,9 \pm 7,8$). No período de 15 dias houve aumento significativo na porcentagem de matriz óssea em GD ($31,5 \pm 4,2$) quando comparado com GC (23 ± 4), mas não houve diferença significativa entre GV ($25,1 \pm 2,9$) e GD, bem como entre GV e GC (Figura 5).

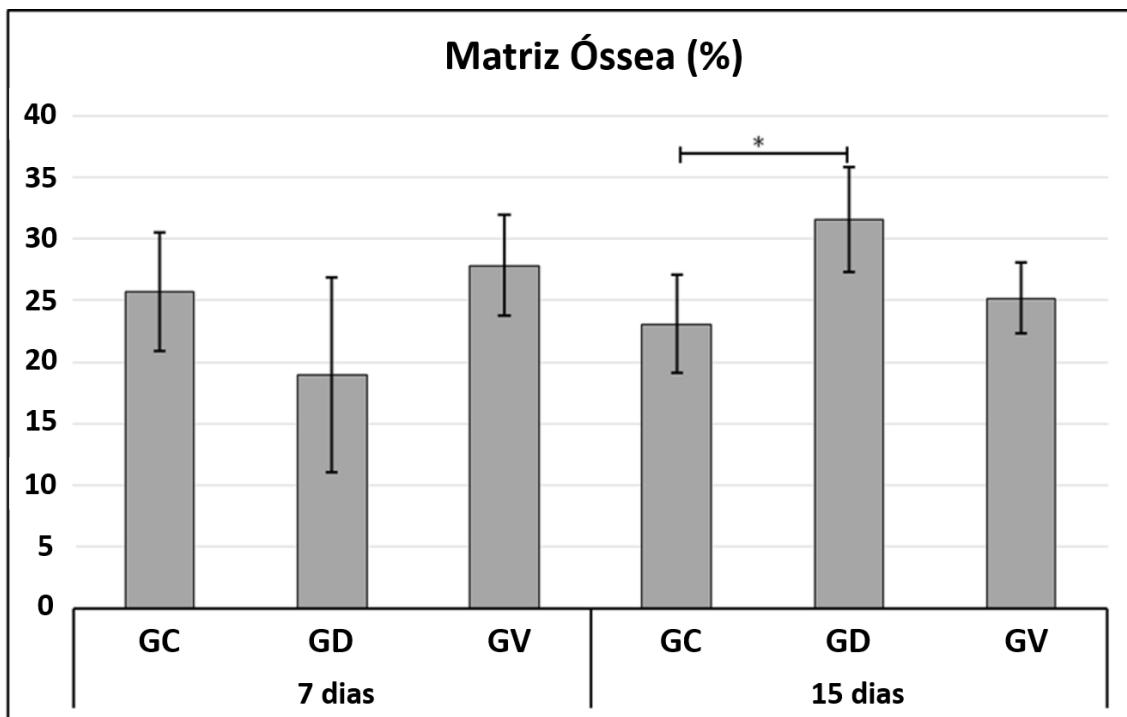


Figura 5. Porcentagem de matriz óssea em GC (Grupo Controle), GD (Grupo Drogado) e GV (Grupo Veículo) aos sete e 15 dias. (* P <0,05)

A quantidade de osteoclastos em GD ($4,6 \pm 1,9$) diminuiu em comparação com o GC ($26,7 \pm 7,4$) e GV ($17,3 \pm 2,7$) em sete dias. Houve um aumento da quantidade de osteoclastos entre GC ($40 \pm 9,4$) em comparação com GD ($20,7 \pm 4,7$) e GV ($29,5 \pm 5,4$) em 15 dias (Figura 7). O nível de concordância foi de kappa = 0,89 entre os examinadores em relação a quantidade de osteoclastos.

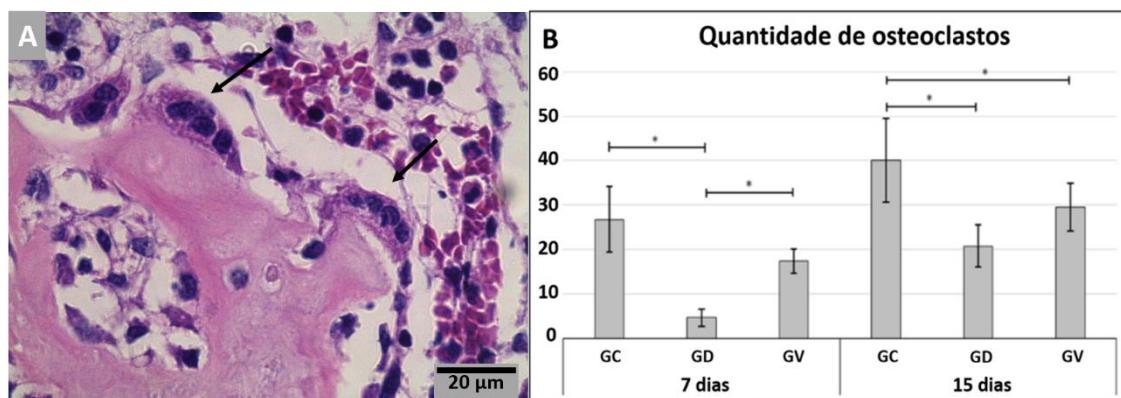


Figura 6. A – Morfologia dos osteoclastos. B - Quantidade de osteoclastos em CG (Grupo Controle), GV (Grupo Veículo) e GD (Grupo Drogado) no período de sete e 15 dias. (* P <0,05)

Análise Histológica Qualitativa

Nos dois períodos experimentais, a análise histológica mostrou reparo ósseo semelhante nos grupos controle e veículo. No período de 7 dias em GC e GV, a região do defeito (cortical e medular) estava quase totalmente preenchida por tecido ósseo primário, delimitando cavidades, com tecido medular incipiente e vasos sanguíneos de luz ampla. O periósteo mostrou-se bastante celularizado, com muitas células fusiformes entre fibras colágenas. Adjacente ao periósteo foi observado tecido de granulação e blastema ósseo, caracterizado por intensa proliferação e diferenciação mesenquimal.

No grupo droga, em 7 dias a região central da lesão mostrou-se quase totalmente ocupada por coágulo sanguíneo, com amplas áreas de rede de fibrina. Na periferia, observou-se presença de infiltrado inflamatório crônico, com células gigantes multinucleadas e vasos dilatados, com muitos leucócitos. Próximo ao infiltrado havia áreas de tecido de granulação e poucas trabéculas de tecido ósseo do tipo primário. O periósteo mostrou-se muito celularizado com poucas fibras colágenas entre as células (Figura 7).

No período de 15 dias, os grupos GC e GV apresentaram toda a região do defeito (cortical e medular) ocupada por tecido ósseo do tipo primário com trabéculas delgadas e amplos espaços entre elas, preenchidos por medula óssea. No grupo GD o tecido ósseo neoformado apresentou aspecto histológico semelhante aos grupos GC e GV, porém a neoformação ocupou maior extensão do canal medular e as trabéculas apresentaram-se mais espessas, principalmente, em comparação ao GC (Figura 8).

Análise Histológica: 7 Dias

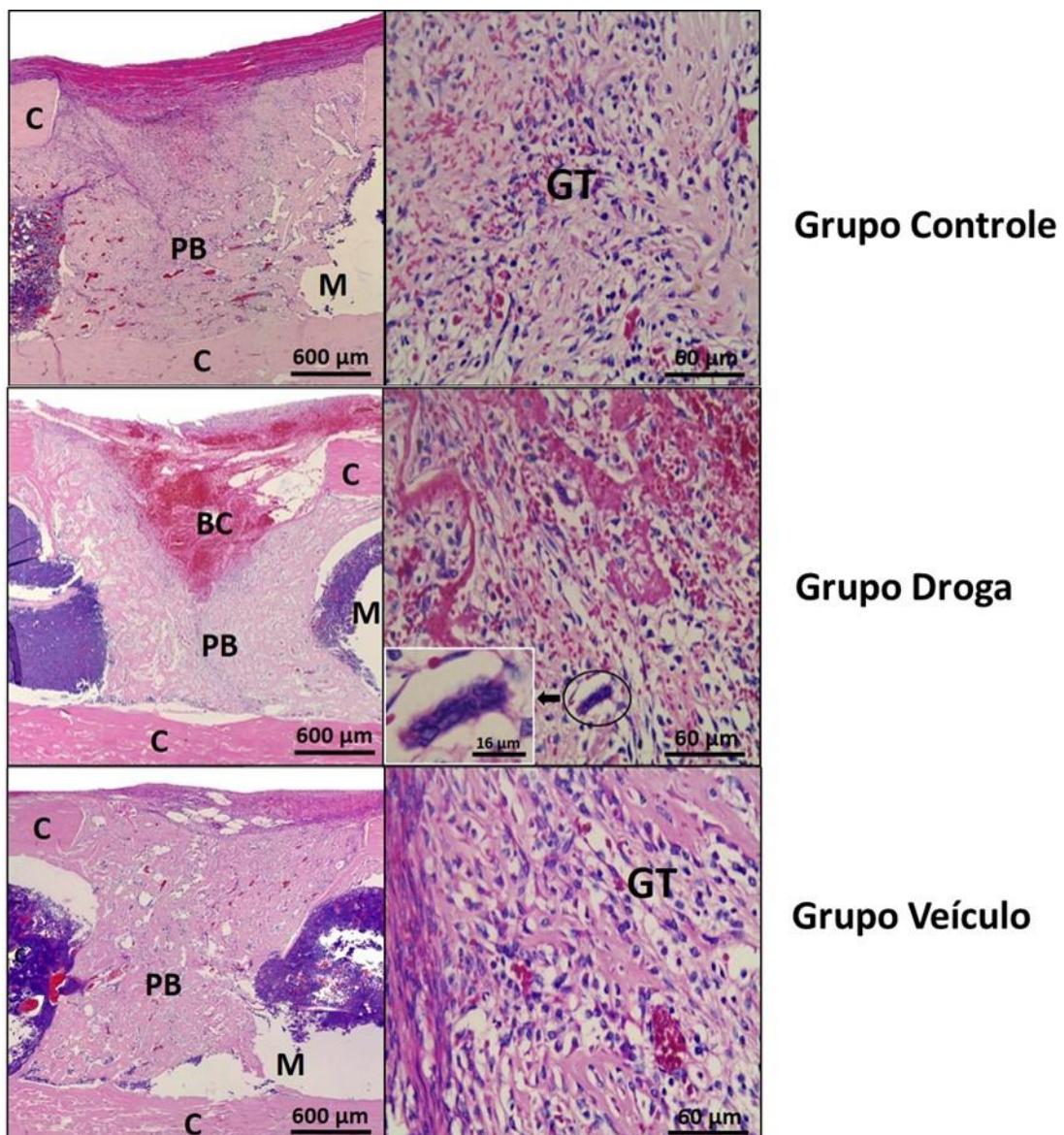


Figura 7. Fotomicrografia de secção longitudinal de fêmur em todos os grupos no período de 7 dias. Cortical (C); Tecido medular (M); Neoformação óssea (PB); Tecido de granulação (GT); Osso trabecular (TB); Coágulo sanguíneo (BC); Células gigantes (seta). Hematoxilina e eosina.

Análise Histológica: 15 Dias

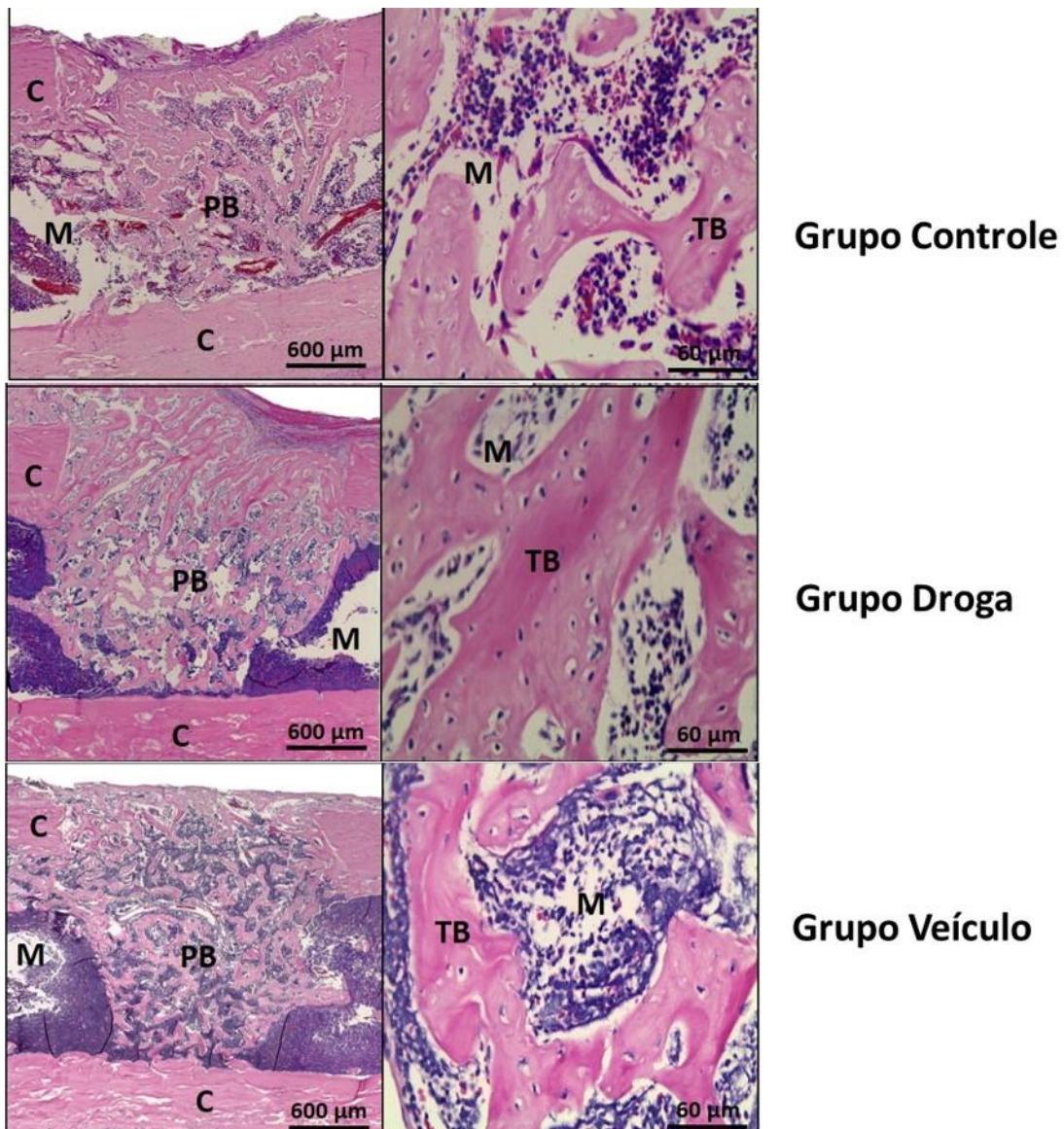


Figura 8. Fotomicrografia de secção longitudinal de fêmur em todos os grupos no período de 15 dias. Cortical (C); Tecido medular (M); Neoformação óssea (PB); Tecido de granulação (GT); Osso trabecular (TB); Coágulo sanguíneo (BC); Células gigantes (seta). Hematoxilina e eosina.

5 – DISCUSSÃO

A hipótese nula foi rejeitada. O efeito local do gel de PLGA com doxiciclina 10% e alendronato 1% alterou a reparação de defeitos ósseos experimentais em ratos aos sete e 15 dias.

Reparação óssea é um desafio para as áreas biomédicas, pois consiste em um processo complexo que envolve ação de fatores locais e sistêmicos, como produção de fatores de crescimento, hormônios e vitaminas, além de um delicado equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos (Alkan, 2002).

No presente estudo, a associação entre alendronato, doxiciclina e PLGA (GD) mostrou aumento na porcentagem de matriz óssea em 15 dias. Este resultado pode ser atribuído ao efeito anti-colagenolítico e de quimiotaxia de osteoblastos da doxiciclina, que aumenta a neoformação óssea. A doxiciclina também reduz a reabsorção óssea, por ação direta na borda em escova dos osteoclastos (Chang & Yamada, 2000). Estudos periodontais têm demonstrado que a terapia combinada com alendronato e / ou doxiciclina provoca inibição e sub-regulação de metaloproteinases de matriz, causando decréscimo na destruição óssea (Buduneli, 2007; Ozdemir, 2012).

A redução de osteoclastos observada em GD pode ser atribuída ao efeito do alendronato sobre RANKL (Mackie, 2001) e osteoclastos, interferindo na borda em escova e estimulando a apoptose, o que inibe a reabsorção (Kim et al., 2009). Além disso, além de inibir a reabsorção óssea pelos osteoclastos, os bisfosfonatos têm também efeito anabólico sobre os osteoblastos (Shanbhag, 2006). Estudos têm mostrado que vários bisfosfonatos (olpadronato, pamidronato, etidronato) induzem proliferação de osteoblastos. Im et al. (2004) investigaram os efeitos do alendronato e risedronato em culturas de células humanas primárias de osso trabecular e observaram que os bisfosfonatos promoveram proliferação e maturação de osteoblastos.

A infiltração inflamatória crônica com células gigantes multinucleadas aos sete dias encontrados em GD poderia ser atribuído ao baixo pH (3, 7) do fármaco. O tratamento com biomateriais pode ser imunogênico para alguns

tecidos, Pihlajamaki et al (2006) mostrou que o mecanismo etiológico principal foi o decréscimo local do pH e indução da imunorreatividade do hospedeiro.

Yaffe et al. (2004) utilizaram liberação local de doxiciclina com alendronato e não observaram alteração sobre perda óssea alveolar. Os autores atribuíram esse resultado à elevada concentração (10%) de doxiciclina. No entanto, os resultados do presente estudo mostraram resultados positivos com essa concentração, provavelmente devido à administração das drogas por meio do veículo-PLGA. Essa forma de administração diminui a concentração elevada da droga, ao mesmo tempo que reduz o contato entre tecido e drogas (Kashi et al., 2012). Doxiciclina a 10% tem sido utilizada em diversos agentes disponíveis comercialmente, com resultados positivos na formação óssea (Park, 2011). O alendronato, por sua vez, aplicado localmente em doses menores inibe a reabsorção óssea com indução mínima de manifestações sistémicas (Diel et al., 2007).

O veículo PLGA fornece grande variedade de vantagens, tais como tamanho de partícula menor, que facilita a penetração nas células, maior eficácia de captura das moléculas da droga, prolongando a liberação do fármaco, mínima concentração inibitória, decréscimo no número de bactérias, que permite melhor atividade antibacteriana com menor quantidade de fármaco (Kashi et al., 2012).

No presente estudo o PLGA apresentou interação com o reparo ósseo quando utilizado como material de preenchimento dos defeitos ósseos. Estudos *in vitro* mostraram que, em contato com PLGA, células osteoblásticas humanas secretam componentes da matriz extracelular tais como colágeno, fibronectina e glicoproteínas. Essa matriz orgânica é, então, utilizada para adesão dos osteoblastos, por meio de receptores conhecidos como as integrinas (El-Amin et al., 2002).

A maior radiodensidade no grupo GD observada em 7 dias, não foi confirmada por maior neoformação óssea, provavelmente devido à radiodensidade natural das drogas e do PLGA. Esse fato foi confirmado pela tomografia computadorizada dos materiais (sangue, drogas e veículos) que mostrou maior radiodensidade das drogas e PLGA, quando comparados ao sangue. Aos 15 dias, a radiodensidade do GD foi superior aos demais,

provavelmente devido à maior quantidade de matriz óssea, essa confirmada pela análise histomorfométrica. Esse foi um método importante para fornecer dados sobre a radiodensidade em nosso estudo (Molteni, 2013).

6 - CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a associação de doxiciclina 10% e alendronato 1% em gel de PLGA acelera o reparo ósseo, em comparação com defeitos ósseos preenchidos com coágulo de sangue.

REFERÊNCIAS*

1. Alkan A, Erdem E, Gunhan O, Karasu C. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study. **Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.** 2002 Aug;60(8):898-904.
2. Alonso N, Tanikawa DY, Freitas Rda S, Canan L, Jr., Ozawa TO, Rocha DL. Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. **Tissue engineering Part C, Methods.** 2010 Oct;16(5):1183-9.
3. Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Cardoso SV, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM. Effect of low-level laser therapy on repair of the bone compromised by radiotherapy. **Lasers Med Sci.** 2014 Jun 10.
4. Bianco P, Sacchetti B, Riminucci M. Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment. **Best Pract Res Clin Haematol.** 2011 Mar;24(1):37-47.
5. Borderie D, Hernvann A, Hilliquin P, Lemarchal H, Kahan A, Ekindjian OG. Tetracyclines inhibit nitrosothiol production by cytokine-stimulated

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

- osteoarthritic synovial cells. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society.** 2001 Aug;50(8):409-14.
6. Buduneli E, Vardar-Sengul S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immunolocalization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. **Journal of periodontology.** 2007 Jan;78(1):127-34.
 7. Chaichanasakul T, Kang B, Bezouglaia O, Aghaloo TL, Tetradis S. Diverse osteoclastogenesis of bone marrow from mandible versus long bone. **Journal of periodontology.** 2014 Jun;85(6):829-36
 8. Chang CY, Yamada S. Evaluation of the regenerative effect of a 25% doxycycline-loaded biodegradable membrane for guided tissue regeneration. **Journal of periodontology.** 2000 Jul;71(7):1086-93.
 9. Choo T, Marino V, Bartold PM. Effect of PDGF-BB and beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) on bone formation around dental implants: a pilot study in sheep. **Clinical oral implants research.** 2013 Feb;24(2):158-66.
 10. Consolaro A. **Inflamação e Reparo.** 1st ed. Maringá: Ed. Dental Press; 2009.
 11. Diel IJ, Bergner R, Grotz KA. Adverse effects of bisphosphonates: current issues. **The journal of supportive oncology.** 2007 Nov-Dec;5(10):475-82.
 12. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury.** 2005 Dec;36(12):1392-404.
 13. El-Amin SF, Attawia M, Lu HH, Shah AK, Chang R, Hickok NJ, et al. Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.** 2002 Jan;20(1):20-8.
 14. Franco GC, Kajiyama M, Nakanishi T, Ohta K, Rosalen PL, Groppo FC, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. **Experimental cell research.** 2011 Jun 10;317(10):1454-64.

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

15. Hayashi K, Kubo T, Doi K, Tabata Y, Akagawa Y. Development of new drug delivery system for implant bone augmentation using a basic fibroblast growth factor-gelatin hydrogel complex. **Dental materials journal**. 2007 Mar;26(2):170-7.
16. Holmes SG, Still K, Buttle DJ, Bishop NJ, Grabowski PS. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. **Bone**. 2004 Aug;35(2):471-8.
17. Hong L, Tabata Y, Miyamoto S, Yamamoto M, Yamada K, Hashimoto N, et al. Bone regeneration at rabbit skull defects treated with transforming growth factor-beta1 incorporated into hydrogels with different levels of biodegradability. **Journal of neurosurgery**. 2000 Feb;92(2):315-25.
18. Im GI, Qureshi SA, Kenney J, Rubash HE, Shanbhag AS. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials**. 2004 Aug;25(18):4105-15.
19. Kashi TS, Eskandarion S, Esfandyari-Manesh M, Marashi SM, Samadi N, Fatemi SM, et al. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. **International journal of nanomedicine**. 2012;7:221-34.
20. Katchburian E, Arana-Chaves V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2004.
21. Kim HK, Kim JH, Abbas AA, Yoon TR. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a preliminary study. **Clinical orthopaedics and related research**. 2009 Dec;467(12):3121-8.
22. Kirkwood K, Martin T, Andreadis ST, Kim YJ. Chemically modified tetracyclines selectively inhibit IL-6 expression in osteoblasts by decreasing mRNA stability. **Biochemical pharmacology**. 2003 Nov 1;66(9):1809-19.
23. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. Platelet-Rich Plasma: A Source of Multiple Autologous Growth Factors for Bone Grafts: in **Tissue Engineering, Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics**. Illinois: Quintessence; 2008.

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

24. Mackie PS, Fisher JL, Zhou H, Choong PF. Bisphosphonates regulate cell growth and gene expression in the UMR 106-01 clonal rat osteosarcoma cell line. **British journal of cancer**. 2001 Apr 6;84(7):951-8.
25. Minagawa T, Tabata Y, Oyama A, Furukawa H, Yamao T, Yamamoto Y. Controlled release of granulocyte colony-stimulating factor enhances osteoconductive and biodegradable properties of Beta-tricalcium phosphate in a rat calvarial defect model. **International journal of biomaterials**. 2014;2014:134521.
26. Molteni R. Prospects and challenges of rendering tissue density in Hounsfield units for cone beam computed tomography. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**. 2013 Jul;116(1):105-19.
27. Muthukuru M, Sun J. Doxycycline counteracts bone morphogenic protein 2-induced osteogenic mediators. **Journal of periodontology**. 2013 May;84(5):656-65
28. Ozdemir SP, Kurtis B, Tuter G, Bozkurt S, Gultekin SE, Senguven B, et al. Effects of low-dose doxycycline and bisphosphonate clodronate on alveolar bone loss and gingival levels of matrix metalloproteinase-9 and interleukin-1beta in rats with diabetes: a histomorphometric and immunohistochemical study. **Journal of periodontology**. 2012 Sep;83(9):1172-82.
29. Park JB. Effects of doxycycline, minocycline, and tetracycline on cell proliferation, differentiation, and protein expression in osteoprecursor cells. **The Journal of craniofacial surgery**. 2011 Sep;22(5):1839-42
30. Pihlajamaki H, Bostman O, Tynninen O, Laitinen O. Long-term tissue response to bioabsorbable poly-L-lactide and metallic screws: an experimental study. **Bone**. 2006 Oct;39(4):932-7.
31. Ramamurthy NS, Rifkin BR, Greenwald RA, Xu JW, Liu Y, Turner G, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines. **Journal of periodontology**. 2002 Jul;73(7):726-34.
32. Ross MH. **Histologia Texto e Atlas**. 6th Ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 2012.

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

33. Saikali Z, Singh G. Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis. **Anti-cancer drugs**. 2003 Nov;14(10):773-8.
34. Schmidt-Bleek K, Schell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgereit F et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. **Cell Tissue Res**. 2012 Mar;347(3):567-73.
35. Shanbhag AS. Use of bisphosphonates to improve the durability of total joint replacements. The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. 2006 Apr;14(4):215-25.
36. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European cells & materials**. 2008;15:53-76.
37. Wang AL, Yu AC, Lau LT, Lee C, Wu le M, Zhu X, et al. Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. **Neurochemistry international**. 2005 Jul;47(1-2):152-8.
38. Yaffe A, Herman A, Bahar H, Binderman I. Combined local application of tetracycline and bisphosphonate reduces alveolar bone resorption in rats. **Journal of periodontology**. 2004 Jul;74(7):1038-42.
39. Yaffe A, Kollerman R, Bahar H, Binderman I. The influence of alendronate on bone formation and resorption in a rat ectopic bone development model. **Journal of periodontology**. 2003 Jan;74(1):44-50.
40. Yagan A, Kesim S, Liman N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**. 2014 Mar;85(3):478-89.

ANEXO

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).