

Sérgio Antonucci Amaral

Avaliação do ranelato de estrôncio no reparo de defeitos ósseos intrabucais em ratos

2014

Sérgio Antonucci Amaral

Avaliação do ranelato de estrôncio no reparo de defeitos ósseos intrabucais em ratos

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2014**

Sérgio Antonucci Amaral

AVALIAÇÃO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS INTRABUCAIS EM RATOS

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Otávio de Miranda Cota

Co-Orientadora: Prof. Dra. Gerluza Aparecida Borges

Faculdade de Odontologia – UFMG
Belo Horizonte
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

A485a	Amaral, Sérgio Antonucci.
2014	Avaliação do ranelato de estrôncio no reparo de defeitos
T	ósseos intrabucais em ratos / Sérgio Antonucci Amaral. – 2014.
	88 f. : il.
	Orientador: Luís Otávio de Miranda Cota
	Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.
	1. Reabsorção óssea. 2. Preparações farmacêuticas. I. Cota, Luís Otávio de Miranda. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.
	BLACK D047

**DEDICO E OFEREÇO ESTE TRABALHO A MINHA FAMÍLIA,
SÉRGIO, ROSANGELA E GENNARO, E A MINHA NOIVA CARINA POR
TODO O APOIO E INCENTIVO ÀS MINHAS ESCOLHAS E DECISÕES.**

AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida, família e amigos;

À minha família pelo suporte e carinho durante todo o curso;

À minha noiva Carina pela cumplicidade, ajuda incondicional e companheirismo durante esses dois anos;

À professora Gerluza por ter me recebido de braços abertos no seu laboratório e por nunca medir esforços em me ajudar. Fica aqui meu eterno agradecimento.

Ao orientador Luis pela oportunidade, pelos ensinamentos e grande ajuda para realização e conclusão deste trabalho;

Ao professor Fernando pela oportunidade de poder fazer parte do grupo de Periodontia desta escola e pelo comprometimento com o curso.

Ao amigo Bernardo pela amizade e companheirismo, uma pessoa sempre disposta a ajudar quem precise;

À amiga Jú pela construção de uma verdadeira amizade durante este período;

Aos amigos de Mestrado e Doutorado, pela companhia das aulas e dicas dadas para esta pesquisa;

Aos amigos do Labode pelas dicas, compartilhamento de dificuldades, ensinamentos, festas e alegrias de um ambiente tão bom de trabalhar;

Ao aluno de iniciação Igor Reis por ser tão prestativo, por ter me orientado nos procedimentos cirúrgicos e laboratoriais;

À técnica Betinha pelo cuidado e responsabilidade com os animais;

Ao professor Alfredo Goes pela doação dos animais e estrutura do biotério para que esse estudo pudesse ser realizado;

À FAPEMIG pelo apoio financeiro;

À todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

“A disciplina é a ponte entre metas e realizações”

(Jim Rohn)

RESUMO

Objetivos: O tratamento de defeitos ósseos intrabucais tem sido um desafio na área odontológica e a pesquisa de novas drogas para otimizar os resultados cirúrgicos regenerativos é de extrema importância. Este estudo experimental em modelo animal teve como objetivo avaliar o efeito do Ranelato de Estrôncio (RSr) administrado via oral, no reparo de defeitos ósseos intrabucais em ratos.

Metodologia: Foram utilizados 20 ratos Lewis, divididos em 4 grupos, sendo 2 grupos controles e 2 grupos testes, sacrificados em 14 e 42 dias. Ambos os grupos passaram pelo procedimento cirúrgico, para criação de um defeito ósseo padronizado na região dos alvéolos distais do 1 molar superior. Os grupos testes receberam uma dose diária de 625 mg/kg de RSr via oral e os grupos controle receberam placebo. Fragmentos dos maxilares operados foram processados para análise histológica e morfometria da neoformação óssea. **Resultados:** No período

de 14 dias, os resultados histológicos apontaram padrões de cicatrização semelhantes entre os grupos comparados. Entretanto aos 42 dias, o grupo teste apresentou aspectos sugestivos de melhor organização tecidual, compatível com um nível de maturação óssea levemente avançada. A avaliação histomorfométrica revelou maior taxa de deposição óssea no grupo tratado 14 dias quando comparado ao controle de mesmo período ($p < 0,05$). Os animais acompanhados por 42 dias não mostraram diferença estatística nos parâmetros histomorfométricos avaliados.

Conclusão: O RSr parece acelerar o processo de neoformação óssea. Estes resultados abrem perspectivas favoráveis para aplicação do RSr como uma terapia coadjuvante onde a aceleração do reparo ósseo pode antecipar o restabelecimento funcional dos pacientes.

Palavra passe: Reparo ósseo; Ranelato de estrôncio; Defeito ósseo intrabucal

ABSTRACT

Evaluation of strontium ranelate in repair of intrabuccal bone defects in rats

Objectives : Treatment of intrabuccal bone defects has been a challenge in the dental field and researches to discover new drugs to optimize regenerative surgical outcomes are extremely important. This experimental study in animal model aimed to evaluate the effect of RSr orally administered in repair of intrabuccal bone defects in rats. **Methodology**: Twenty Lewis rats were divided into 4 groups; 2 control groups and 2 test groups, followed for 14 and 42 days. Both groups were submitted to the surgical procedure to create a standardized bone defect in the alveolar distal roots region of the first molar. The test groups received a daily dose of 625 mg / kg orally RSr and control groups received placebo. Fragments of the maxillary operated were processed for histology and morphometry of bone formation. **Results**: In 14 days the histological results showed similar patterns of healing in the two groups. However, after 42 days the test group seemed to have better bone organization, compatible with a discrete advanced stage of bone maturation .Histomorphometric evaluation revealed a higher rate of bone deposition in the 14 days treated group when compared to the control group ($p < 0.05$). The animals followed for 42 days showed no statistical difference in histomorphometric parameters evaluated. **Conclusion**: The RSr seems to accelerate the process of bone formation. These results open up favorable prospects for application of RSR as an adjuvant therapy where the acceleration of bone repair can anticipate the functional rehabilitation of patients.

Keywords: Bone repair; Strontium ranelate; Intrabuccal bone defect

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Análise topográfica do crânio, alvéolo e 1° molares superiores.

Figura 02 – Imagem do crânio de rato dissecado.

Figura 03 – Procedimento cirúrgico.

Figura 04 – Finalização do procedimento cirúrgico.

Figura 05 – Exames radiográficos de crânio de rato.

Figura 06 – Preparo da peça para histologia.

Figura 07 – Método de análise morfométrica pelo software Image Jey.

Figura 08 - Quadro de resultados do software Image Jey.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	Literatura consultada.....	15
2.1	Regeneração Óssea.....	15
2.2	Ranelato de Estrôncio.....	17
3	Objetivo.....	19
3.1	Objetivo geral.....	19
3.2	Objetivos específicos.....	19
4	Hipóteses.....	20
5	Considerações metodológicas	20
5.1	Desenho de estudo.....	20
5.2	Modelo experimental.....	20
5.2.1	Animais.....	20
5.2.2	Amostragem.....	21
5.2.3	Criação do defeito ósseo.....	22
5.2.4	Administração da droga.....	26
5.3	Métodos de avaliação histológica e morfométrica.....	27
6	Resultados.....	31
7	Artigo Científico.....	34
8	Considerações finais.....	61
9	Referências.....	62
10	Fotomicrografias.....	69
11	Anexos.....	86

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um dos poucos órgãos que mantém o potencial de regeneração na vida adulta, uma vez que possui propriedades consideráveis de reparação. A expressão dessa característica única se aplica para remodelação periódica do esqueleto, consolidação de fraturas e reabilitação de defeitos ósseos (GIANNOUDIS et al., 2007).

A reconstrução óssea é fundamental para a reabilitação funcional e estética na área odontológica, especialmente na correção de perdas por traumas ou mudanças atróficas do processo alveolar (CHIAPASCO et al., 2013; KANG et al., 2012). Algumas técnicas são conhecidas para o tratamento de defeitos ósseos associados à doença periodontal, implantes dentários ou até mesmo em fraturas esqueléticas, consistindo na substituição do tecido perdido por partículas de osso ou compostos sintéticos para o preenchimento adequado dos defeitos (THYLIN et al., 2002).

Atualmente, os enxertos ósseos autógenos são considerados padrão ouro em material de enxertia (ALAM et al., 2009). Apesar das vantagens que essa modalidade terapêutica oferece, alguns pontos desfavoráveis podem ser levantados como a necessidade de um segundo sítio cirúrgico e a existência de áreas doadoras viáveis. Tais desvantagens incentivaram a procura de outras formas de tratamento, dentre elas, a utilização de biomateriais.

Para que os biomateriais possam ser usados como uma boa alternativa aos enxertos ósseos, devem apresentar determinadas características, como biocompatibilidade e biodegradação. Além disso, idealmente, esses compostos devem estimular a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, promovendo a reparação óssea por osteoindução (CHESMEL et al., 1998).

O Ranelato de Estrôncio (RSr) é um novo composto que têm sido usado no tratamento da osteoporose pós - menopausa com o objetivo de reduzir o risco de fraturas vertebrais e de pelve na mulher (MEUNIER et al., 2004; SEEMAN et al., 2006; REGINSTER et al., 2005). O mecanismo de ação celular e molecular desta droga sobre o osso ainda permanece pouco compreendido. Alguns estudos *in vitro* sugerem que este fármaco pode promover a proliferação e diferenciação de osteoblastos (CANALIS et al., 1996; BONNELYE et al., 2008), outros demonstraram que RSr pode aumentar a diferenciação osteogênica de células da medula óssea (MEUNIER et al., 2004; CHOUDHARY et al. 2007). Existem evidências que esta droga tem modo duplo de ação, agindo concomitantemente na inibição da atividade osteoclástica e estimulando a replicação e maturação osteoblástica (MARIE, et al., 2011).

Embora o RSr seja vastamente pesquisado e utilizado em diferentes segmentos da medicina (MEUNIER et al., 2004; REGINSTER et al., 2005; KAUFMAN et al., 2013) as pesquisas na área odontológica ainda são escassas (LI et al., 2012).

Dado a importância da regeneração óssea nas diferentes áreas da odontologia, faz-se necessário o conhecimento do efeito do RSr nos processos de reparo e remodelação óssea bucais. A aplicação desta droga como uma nova estratégia terapêutica, pode trazer grandes benefícios nas áreas de periodontia, implantodontia e buco-maxilo facial.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Regeneração Óssea

O tecido ósseo pode ser dividido em três componentes: matriz orgânica (osteóide), minerais e células. A matriz osteóide é constituída em 90% por colágeno tipo I, sendo que os 10% restantes são compostos por outras proteínas ósseas como a osteocalcina, osteonectina e osteopontina (DESSAUER, 1997; ENDRES et al., 2001).

Esse tecido sofre constante remodelação para garantia da homeostase do esqueleto como um todo. O processo de remodelação óssea é regulado por diversos fatores locais e/ou sistêmicos, incluindo estímulo elétrico, força mecânica, hormônios (PTH, hormônios da tireóide, estrógeno, andrógenos, cortisol, calcitonina, hormônio do crescimento), fatores do crescimento (IGF-1) e citocinas. Em um ciclo de remodelação típico, a reabsorção óssea leva de 7 a 10 dias e a formação de 2 a 3 meses. Aproximadamente 25% do osso esponjoso é renovado a cada ano, ao passo que apenas 3% do osso cortical é trocado nesse mesmo período (WATTS et al., 1999).

Uma vez que um defeito ósseo é instalado e a regeneração óssea endógena não é suficiente para o seu reparo, se faz necessário a realização de técnicas de enxertia para a reabilitação. As técnicas de enxertia podem ser classificadas como osteogênicas, osteocondutoras e osteoindutoras.

A osteogênese ocorre quando osteoblastos ou células precursoras de osteoblastos são transplantados com o material de enxerto para dentro do defeito, onde podem estabelecer novos centros de formação óssea (LINDHE, 2010). Enxertos ósseos

autógeno do íliaco e de osso medular são exemplos de transplantes com propriedades osteogênicas.

A osteocondução ocorre quando o material de enxerto não vital serve como um arcabouço para o crescimento de células precursoras dos osteoblastos para o interior do defeito. Osso cortical autógeno ou osso alógeno de bancos de tecidos podem ser citados como exemplo de materiais de enxerto com propriedades osteocondutoras (LINDHE, 2010).

A osteoindução envolve a formação de um novo tecido ósseo pela diferenciação local das células mesenquimais em osteoblastos sobre a influência de um ou de mais agentes indutores (LINDHE, 2010).

Estudos comprovam que frequentemente ocorre o envolvimento dos três mecanismos de formação óssea e todo material substituto ósseo possui ao menos um desses três modos de ação (LYNCH et al., 1999; DINATO et al., 2001).

2.2 Ranelato de estrôncio

Inúmeras substâncias têm sido estudadas na tentativa de melhorar a qualidade do tecido ósseo, diminuindo os processos de reabsorção e estimulando a sua formação. Entre estas, o estrôncio tem demonstrado resultados promissores, alterando o balanço fisiológico do tecido ósseo no sentido de bloquear a ação dos osteoclastos e estimular a ação e diferenciação dos osteoblastos (DAHL et al., 2001; MARIE et al., 2001; FONSECA et al., 2008). Esse elemento tem sido amplamente estudado na forma de cloreto ou de ranelato, sendo este último o mais utilizado, por via sistêmica, na prevenção da osteoporose.

A capacidade de penetração do estrôncio nas células via canais de cálcio, bem como a sua união a determinados sítios de ligação intracelulares, tais como o retículo endoplasmático, foi demonstrado em pesquisas anteriores, sendo que tal característica é capaz de afetar a homeostasia intracelular do cálcio e os processos de mineralização óssea (CABRERA et al., 1999). Estudos que avaliam a farmacocinética do estrôncio e do cálcio têm sido realizados em conjunto. De fato, em trabalhos anteriores, foi sugerido que os dois elementos não só partilham algumas características químicas e físicas em comum como também exibem envolvimento semelhantes em um grande número de processos biológicos (SEILER et al., 1994).

Os estudos *in vitro* apontam a utilização do R_{Sr} como um possível modulador do metabolismo ósseo. Os achados sugerem a atividade anabólica da droga, capaz de induzir o aumento dos níveis de osteocalcina e fosfatase alcalina, favorecendo assim, o aumento de deposição mineral por células osteoblásticas (BARON et al., 2002; CHOUDHARY et al. 2007; BONNELYE et al., 2008).

Algumas pesquisas *in vivo* foram realizadas no intuito de avaliar na prática as características vantajosas que o estrôncio apresenta em relação ao reparo de tecido ósseo. No estudo de Peng e colaboradores em 2010 foi verificado a existência da ação anabólica do RSr em ossos normais e osteoporóticos; o mecanismo anabólico se mostrou associado à uma maior diferenciação osteoblástica das células indiferenciadas da medula óssea.

Li e colaboradores em 2012 estudou o efeito do RSr na osteointegração de implantes de titânio em ratas osteoporóticas. Os resultados demonstraram que o RSr pôde melhorar os parâmetros de osseointegração de implantes de titânio. Sendo assim, existe um direcionamento na literatura para realização de novas pesquisas para avaliar a ação do RSr no tecido ósseo.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do RSr administrado via sistêmica no reparo de defeitos ósseos intrabucais de dimensões padronizadas, criados em maxilares superiores de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos da aplicação do RSr na quantidade de formação óssea, após 14 e 42 dias dos procedimentos cirúrgicos.

- b) Avaliar os efeitos da aplicação do RSr na maturação óssea, após 14 e 42 dias dos procedimentos cirúrgicos.

4 HIPÓTESES

- a) O RSr aumenta a quantidade de neoformação óssea nos grupos experimentais (RSr).
- b) O RSr melhora a qualidade óssea recém formada nos grupos experimentais (RSr).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho de estudo

Ensaio experimental em modelo animal.

5.2 Modelo experimental

5.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos *Rattus norvegicus albinus*: Lewis (n= 20) com dez semanas de vida, pesando entre 280 e 310g, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.2.2 Amostragem

A amostra foi dividida em grupos com cinco animais cada, que foram alocados da seguinte maneira:

1. Grupo C14 – controle 14 dias.
2. Grupo T14 – controle 42 dias.
3. Grupo C42 – experimental 14 dias.
4. Grupo T42 – experimental 42 dias.

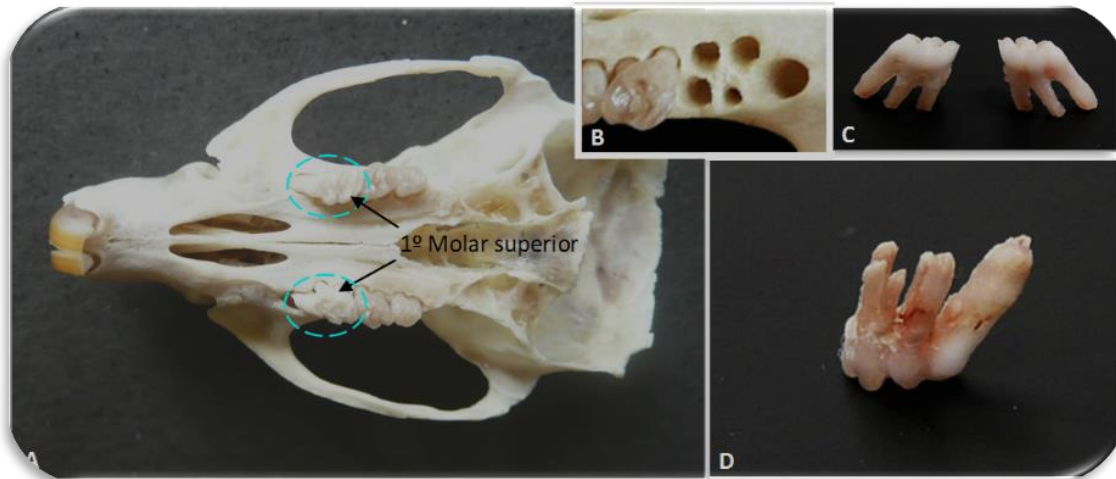
Os animais foram acondicionados em biotério apropriado com controle de temperatura e luminosidade. Os ratos tinham acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório, exceto no período após os procedimentos cirúrgicos de extração dos primeiros molares e criação do defeito ósseo, quando os animais permaneceram por 05 dias em dieta pastosa e água. Importante ressaltar que durante o período operatório o alimento pastoso e a água eram renovados a cada 24 horas e os animais foram acondicionados um por gaiola. De acordo com as normas da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA), os animais receberam analgésicos, antiinflamatórios profiláticos e antibióticos na fase pós-operatória. Este projeto foi previamente aprovado pelo CEUA, sob número 303/2013 (Anexo).

5.2.3 Criação do defeito ósseo

O modelo de alvéolo dental após exodontias tem sido um modelo de estudo bastante utilizado em pesquisas para avaliação de fatores que possam acelerar ou retardar o processo de reparo ósseo (KANYAMA et al., 2003; TEÓFILO et al., 2004). Entretanto, embora representem um modelo viável para análise da reconstituição óssea, essas cavidades mínimas, geradas pela exodontia dos molares de ratos, apresentam algumas limitações, como a variação do tamanho do alvéolo e a presença dos septos interradiculares. Alvéolos dentários íntegros são modelos passíveis de variações inclusive da quantidade de resíduos remanescentes do ligamento periodontal, os quais podem interferir na interpretação dos resultados. Modelos de defeitos ósseos mais amplos e padronizados têm sido tradicionalmente criados em tíbias, fêmures e calota craniana de ratos e coelhos (LEE et al., 2010; PURICELLI et al., 2010).

O procedimento cirúrgico e a criação dos defeitos ósseos foram baseados no protocolo estabelecido por COSTA-FILHO L.B. et al., em 2012.

Figura 01 - Análise topográfica do crânio, alvéolo e 1° molares superiores.



(A) Avaliação das coroas dos 1° molares. (B) Visualização dos alvéolos dos 1° molares. (C) 1° molares superiores. (D) Imagem ampliada do 1° molar superior.

Figura 02 - Imagem do crânio de rato dissecado.



(A) Defeito ósseo padronizado em crânio dissecado (seta amarela)

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de uma combinação de sedativo e relaxante muscular, cloridrato de xilazina 2% (0,1 ml/100g peso corporal) e a base anestésica, cloridrato de Ketamina 10% (0,1ml/100g).

Previamente à cirurgia, os animais receberam uma dose de antiinflamatório de uso veterinário, Flunixinina/ meglumina (Banamine injetável pet), 1,1 mg/kg. Após posicionamento dos animais na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, foram extraídos por via alveolar, os primeiros molares superiores direitos, utilizando-se um instrumento de Holleback para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação e remoção dos dentes. Após confirmação da integridade dos dentes removidos, o defeito ósseo padronizado foi criado com o auxílio de uma broca diamantada cilíndrica 2094, acoplada a um contra ângulo Kavo/ micromotor Driller para implantes, sob irrigação com solução salina estéril. Foram removidos os septos interradiculares das raízes distais. O septo da raiz mesial foi sempre preservado. Os defeitos ósseos obtidos tinham dimensão de aproximadamente 2,5 mm de diâmetro X 2,5 mm de profundidade (FIG 03).

As bordas da mucosa sobre o sítio operado foram suturadas com fio de nylon, Biosut 6,0, por meio da técnica de colchoeiro modificada (FIG 04). Os animais receberam 3 doses subcutâneas do antibiótico oxitetraciclina (Terramicina Solução injetável), 10mg/Kg, uma a cada 24 horas. Os animais foram sacrificados após 14 e 42 dias. As suturas foram removidas no 14º dia após o procedimento cirúrgico.

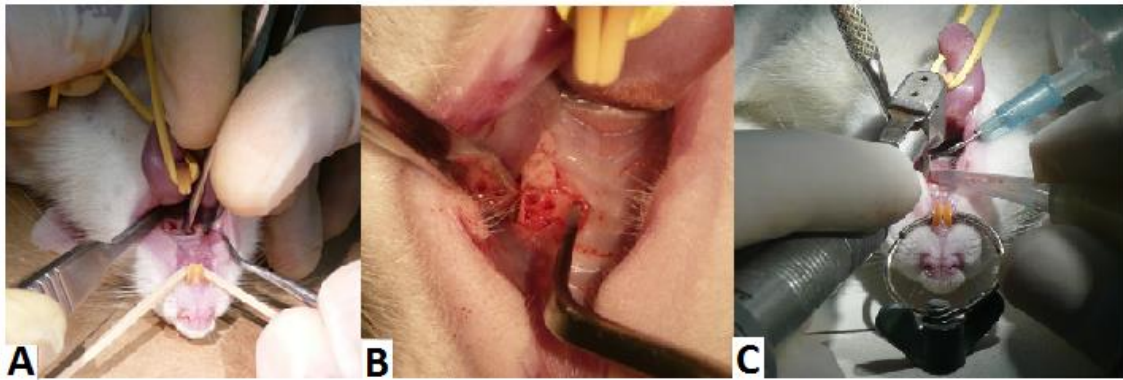


Figura 03 – Procedimento cirúrgico. (A) Animal posicionado em decúbito dorsal e luxação do 1º molar com pinça dente de rato. (B) Visualização dos alvéolos das raízes distais. (C) Criação do defeito sob irrigação.

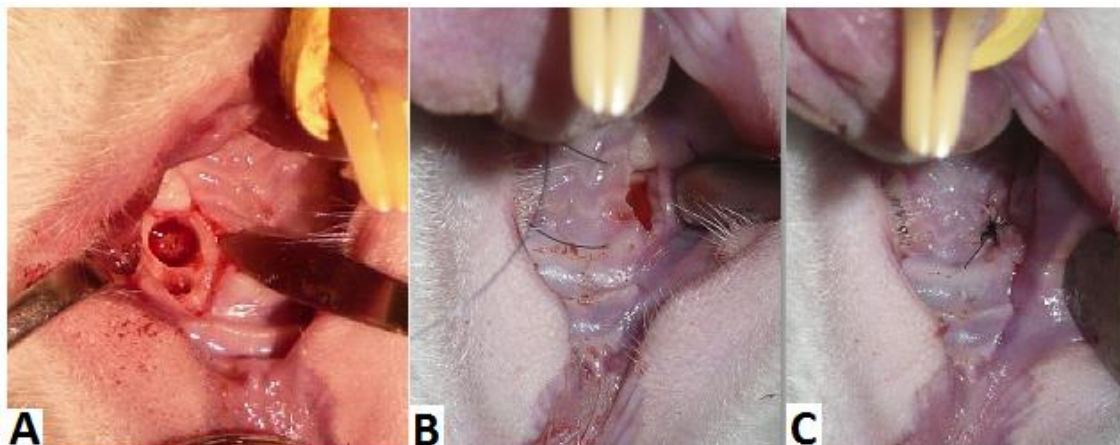
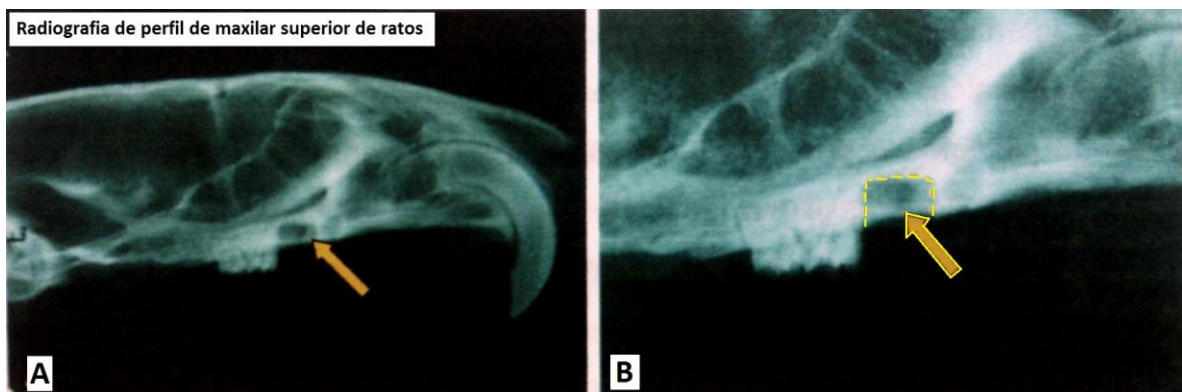


Figura 04 – Finalização do procedimento cirúrgico. (A) Conferencia da remoção das raízes, ausência de perfuração e planificação da parede de fundo e avaliação do defeito sendo preenchido por coágulo. (B) Posicionamento da sutura e reposicionamento das bordas gengivais. (C) Aspecto final após a síntese da ferida.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram monitorados até o final do efeito anestésico e a fim de minimizar os possíveis traumas sobre as áreas operadas,

foram mantidos isolados, ficando um em cada gaiola até a data de sacrifício. Receberam dieta pastosa (Mucilon) por 05 dias. A água foi renovada e as gaiolas limpas, com detergente, álcool e hipoclorito de sódio também diariamente. No período pós-operatório não foram utilizadas maravalhas, para evitar sua introdução na cavidade oral dos ratos.

Figura 05 – Exames radiográficos de crânio de rato



(A) Imagem radiográfica evidenciando o defeito ósseo na área dos alvéolos das raízes distais do 1º molar (seta). (B) Imagem ampliada do defeito ósseo (linha tracejada e seta).

5.2.4 Administração do ranelato de estrôncio

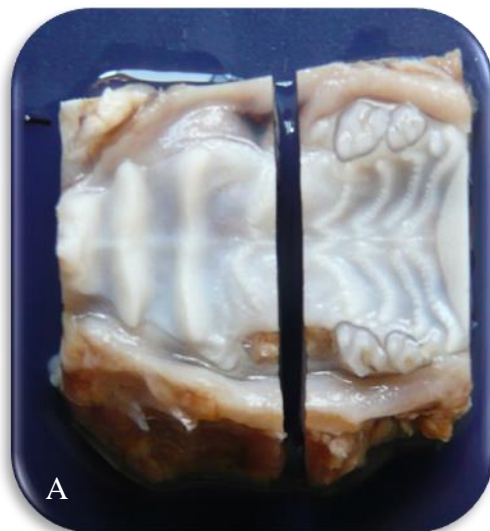
Após o procedimento cirúrgico, 625 mg/ kg de RSr (Protos) foi adicionado a 2 gramas de alimento pastoso, 7 dias por semana. Esta dose é equivalente à dose clínica em humanos de 2g/ dia (MARIE et al. 1993; AMMANN et al. 2004). Os animais do grupo controle receberam também, a mesma quantidade de alimento pastoso; 2 gramas/dia.

5.3 Métodos de avaliação histológica e morfométrica

Os animais foram sacrificados após 2 e 6 semanas dos procedimentos. O período de 14 dias foi selecionado por representar o período inicial de regeneração óssea alveolar. Aos 42 dias, estudos sugerem que o processo de reparo ósseo está completo (BRANDAO, 2002; ZIED et al.,2005), apresentando rede de trabéculas ósseas espessas e espaços medulares reduzidos (MENDES et al, 2008). Após o sacrifício, os animais tiveram suas cabeças dissecadas, removendo-se a pele e o tecido muscular. As maxilas imediatamente foram fixadas por imersão em formalina neutra tamponada (FTN) 10%, a temperatura ambiente, por 72 horas.

Após a fixação as maxilas foram desmineralizadas em solução desmineralizadora Planck Richol's produzida pela mistura de cloreto de alumínio, ácido fórmico e ácido clorídrico. Após 48 horas as peças foram submersas em solução EDTA e então aparadas e seccionadas em plano frontal. Um corte preliminar na área central do defeito permitiu a padronização da área de microtomia e conseqüentemente, a uniformidade da região a ser avaliada em todos os grupos. O corte foi realizado 1mm da face mesial da coroa do 2º molar (FIG 06).

Figura 06 – Peça sendo preparada para histologia



(A) Imagem mostrando o corte a 1 mm da face mesial do 2 molar.

As peças foram imersas em água corrente por uma noite para retirada do excesso de Planck e então foram processadas para histologia, conforme protocolo de rotina a seguir:

- a. Desidratação em uma série crescente de álcoois (70%, 80% II, 90%, 95%, absoluto I, absoluto II, absoluto III, absoluto IV), por 30 minutos em cada banho;
- b. Diafanização em três banhos de xilol, durante 30 minutos em cada banho;
- c. Infiltração em três banhos de parafina a 58°C, durante 40 minutos cada;
- d. Inclusão em parafina histológica, em moldes pré-definidos para microtomia em plano frontal.

Cerca de 110 cortes seriados de 6 micrometros de espessura de cada amostra foram montados em 13 lâminas histológicas sequenciais, previamente tratadas com

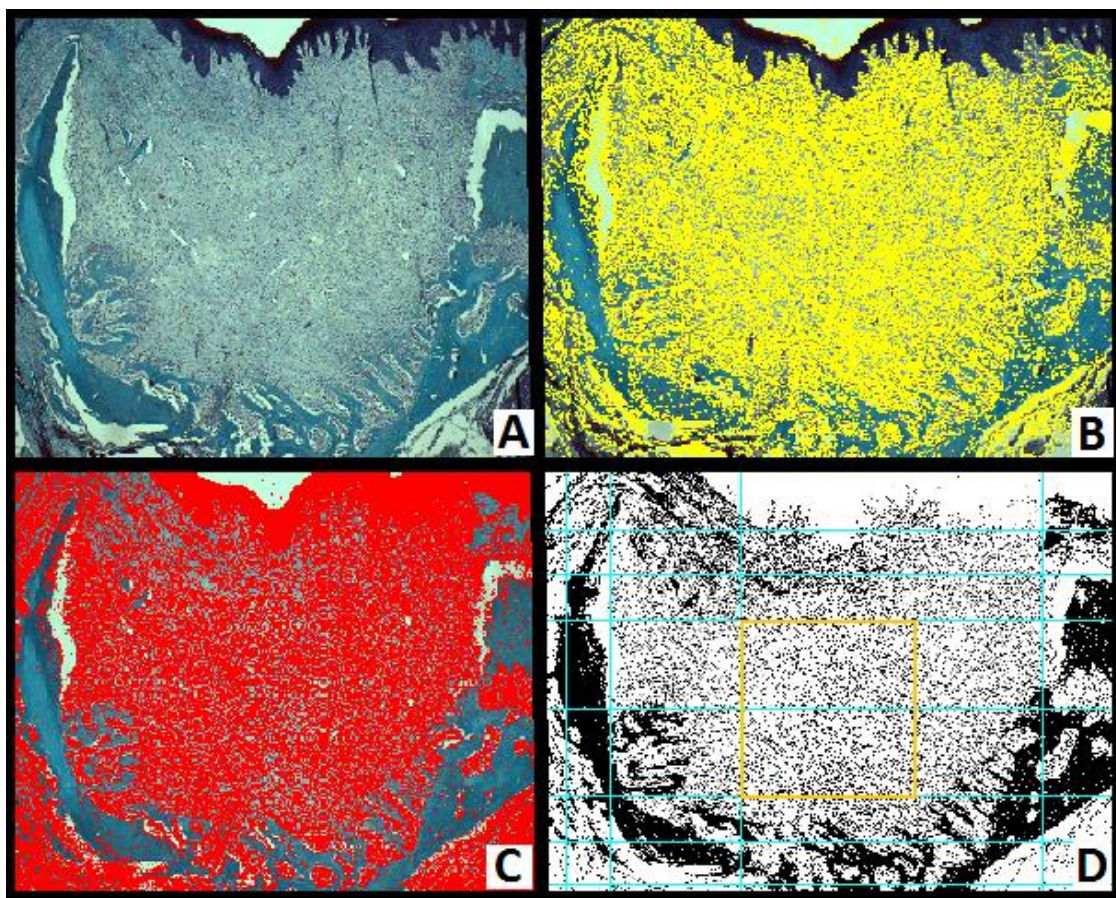
silano 2%. As laminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Gômori para avaliação histológica e análises morfométricas.

No critério de avaliação dos animais acompanhados por 14 dias alguns aspectos histológicos foram considerados motivo de exclusão da amostra, sendo estes a presença de corpos estranhos como pelos, maravalha ou qualquer outra imagem que sugerisse alteração do padrão de reparo tecidual. Os mesmos aspectos foram encontrados em animais dos grupos C14 e T14 (Anexo- Imagem 01). Para os grupos de 42 dias os animais que apresentaram a presença de sequestro ósseo envolvendo a parede vestibular do defeito também foram excluídos. Isto porque, devido ao maior tempo dado para avaliação destes grupos, alguns animais apresentaram alteração da resposta de reparo com evidências de invasão epitelial e presença de fragmento ósseo isolado no sítio de cicatrização (Anexo- Imagem 02). A ocorrência deste fato muito provavelmente se relaciona a necessidade de ampliação do defeito devido à divergência entre as raízes do primeiro molar em alguns animais. A diminuição da espessura da parede vestibular a torna mais frágil e de difícil vascularização, aumentando assim, os riscos de um sequestro ósseo.

Para análise morfométrica foram selecionados 3 cortes histológicos, sendo: corte 1 correspondendo ao centro do defeito; corte 3 correspondendo a extremidade distal do defeito; corte 2 correspondendo ao ponto intermediário aos cortes 1 e 3. Os cortes então foram corados com Tricômico de Gômori para quantificação da deposição óssea por morfometria. Imagens capturadas com a objetiva de 4X, pela câmera Q-color 3 acoplada ao microscópio de luz Olympus BX-41, foram avaliadas com o Software para análises morfométricas Image Jey. Este software permitiu a leitura precisa das áreas coradas em verde pelo Tricômico de Gômori (colágeno I)

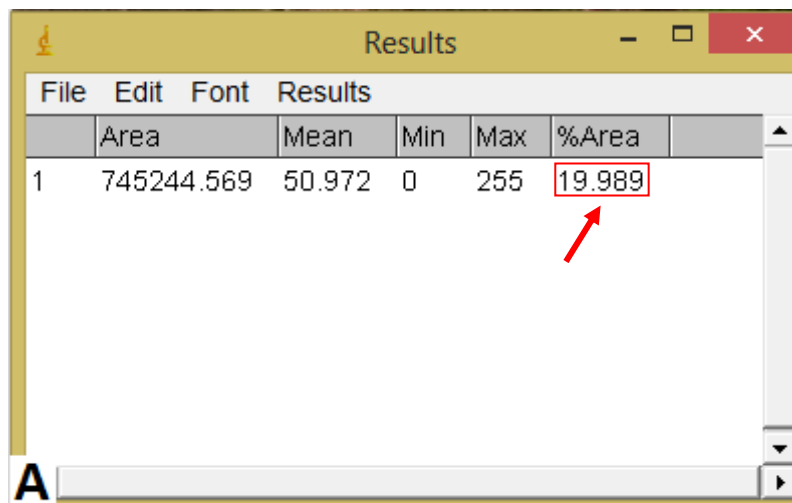
correspondentes a neoformação óssea, fornecendo assim o percentual de neoformação relativo à área avaliada (FIG 07 e 08).

Figura 07 – Análise morfométrica sendo realizada pelo software Image Jey



(A) Imagem original corada com Tricrômico de Gomori. (B) Seleção das áreas a serem excluídas da leitura (amarelo). (C) Seleção das áreas a serem excluídas da leitura (vermelho). (D) Definição da área de leitura após a separação dos canais de cores e seleção do canal de cor com o maior contraste de estruturas ósseas e deposição de colágeno. Quadrado em amarelo identificando a área a ser lida pelo software.

Figura 08 - Quadro de resultados do software Image Jey



	Area	Mean	Min	Max	%Area
1	745244.569	50.972	0	255	19.989

(A) Imagem evidenciando a leitura do percentual de colágeno em relação a área total de leitura.(seta vermelha)

6 RESULTADOS

A avaliação histológica revelou um padrão de cicatrização tecidual bastante semelhante entre os grupos controle e teste, no período de 14 dias. Em ambos os grupos, a ferida cirúrgica mostrou-se completamente fechada, recoberta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e tecido conjuntivo subjacente apresentando aspecto histológico saudável, livre de infiltrado inflamatório. (Anexo Imagem 03). Células inflamatórias esparsas entremeadas por um tecido conjuntivo em fase proliferativa com fibroblastos e uma rede de delicadas fibras colágenas preenchem a maior parte do defeito. Aos 14 dias, a neoformação óssea pôde ser observada especialmente no terço apical e médio do defeito em ambos os grupos (Anexo-Imagem 04).

Os achados histológicos também mostraram a proliferação osteoblástica em regiões de trabéculas ósseas neoformadas. Tais aspectos ocorreram em ambos os grupos (T14 e C14), mas foram mais evidentes em animais tratados. No grupo T14 a área de preenchimento do defeito por deposição óssea foi significativamente maior ($p < 0,05$) (Anexo- Tabela 1; Imagem 04 e 05).

Embora não tenha sido escopo deste trabalho avaliar a proliferação osteoclástica, ficou evidente aos 14 dias, em ambos os grupos, o típico processo de remodelamento ósseo. As imagens revelam a atividade simultânea de osteoclastos em processo de reabsorção das paredes ósseas e dos osteoblastos em processo de síntese ou deposição de matriz colágena (Anexo Imagem 06). Aparentemente, nos 3 pontos de avaliação histológica, nenhum sinal de desequilíbrio entre as células, osteoclastos e osteoblastos, pôde ser observado em favor do grupo controle ou tratado no período de 14 dias.

No período de 42 dias, os sítios operados apresentavam-se, em ambos os grupos, recobertos por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A área dos defeitos revelou-se, preenchida por tecido ósseo caracterizado por trabéculas ósseas espessas, fusionadas e com poucos espaços medulares na área central. A presença de osteócitos irregulares incluídos na matriz óssea neoformada na área central do defeito revelava a natureza ainda imatura do tecido ósseo nessa região. Entretanto, junto às paredes laterais (paredes remanescentes do defeito), o osso neoformado já apresentava um aspecto mais lamelar, organizado em camadas paralelas (Anexo Imagem 07 e 08). Histologicamente, notou-se uma melhor organização da matriz óssea com alguns osteócitos já esboçando organização em sistema de Havers, nas amostras dos animais tratados, do grupo T42 (Anexo Imagem 08).

Um achado comum nas amostras de 42 dias, independente do tratamento com RSr, foi a deposição de tecido ósseo externamente à área do defeito, fato provavelmente relacionado à resposta ao trauma mecânico causado durante a confecção do defeito (Anexo Imagem 07)

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na comparação quantitativa da neoformação óssea entre os grupos C42 e T42 ($p>0,05$) (Anexo Tabela1).

7 ARTIGO CIENTIFICO

Avaliação do ranelato de estrôncio no reparo de defeitos ósseos intrabucais em ratos

RESUMO

Objetivos: O tratamento de defeitos ósseos intrabucais tem sido um desafio na área odontológica e a pesquisa de novas drogas para otimizar os resultados cirúrgicos regenerativos é de extrema importância. Este estudo experimental em modelo animal teve como objetivo avaliar o efeito do Ranelato de Estrôncio (RSr) administrado via oral, no reparo de defeitos ósseos intrabucais em ratos.

Metodologia: Foram utilizados 20 ratos Lewis, divididos em 4 grupos, sendo 2 grupos controles e 2 grupos testes, acompanhados por 14 e 42 dias. Ambos os grupos passaram pelo procedimento cirúrgico, para criação de um defeito ósseo padronizado na região dos alvéolos distais do 1 molar superior. Os grupos testes receberam uma dose diária de 625 mg/kg de RSr via oral e os grupos controle receberam placebo. Fragmentos dos maxilares operados foram processados para análise histológica e morfometria da neoformação óssea. **Resultados:** No período de 14 dias, os resultados histológicos apontaram padrões de cicatrização semelhantes entre os grupos comparados. Entretanto aos 42 dias, o grupo teste apresentou aspectos sugestivos de melhor organização tecidual, compatível com um nível de maturação óssea levemente avançada. A avaliação histomorfométrica revelou maior taxa de deposição óssea no grupo tratado 14 dias quando comparado ao controle de mesmo período ($p < 0,05$). Os animais acompanhados por 42 dias não mostraram diferença estatística nos parâmetros histomorfométricos avaliados.

Conclusão: O RSr parece acelerar o processo de neoformação óssea. Estes resultados abrem perspectivas favoráveis para aplicação do RS como uma terapia coadjuvante onde a aceleração do reparo ósseo pode antecipar o restabelecimento funcional dos pacientes.

Palavras-chave: Defeito ósseo intrabucal; Mineralização óssea; Ranelato de estrôncio; Reparo ósseo

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um dos poucos órgãos que mantém o potencial de regeneração na vida adulta, uma vez que possui propriedades consideráveis de reparação. A expressão dessa característica única se aplica para remodelação periódica do esqueleto, consolidação de fraturas e reparação de defeitos ósseos (GIANNOUDIS et al., 2007)

A reconstrução óssea é fundamental para a reabilitação funcional e estética na área odontológica, especialmente na correção de perdas por traumas ou mudanças atróficas do processo alveolar (CHIAPASCO et al., 2012; KANG et al., 2012). Técnicas atuais para o tratamento de defeitos ósseos associados à doença periodontal, implantes dentários ou até mesmo em fraturas esqueléticas, consistem na substituição do tecido perdido por partículas de osso ou compostos sintéticos para o preenchimento adequado dos defeitos (THYLIN et al., 2002).

Atualmente, os enxertos ósseos autógenos são considerados padrão ouro em material de enxertia (ALAM et al., 2009). Apesar das vantagens que essa modalidade terapêutica oferece, alguns pontos desfavoráveis podem ser levantados: como a necessidade de um segundo sítio cirúrgico e a baixa disponibilidade de áreas doadoras viáveis. Tais desvantagens incentivaram a procura de outras formas de tratamento como a utilização de biomateriais.

Além dos biomateriais, as terapias ósseas contam também com a administração de moléculas osteogênicas ou drogas que favoreçam a deposição óssea. Nesse sentido, diversos fatores têm sido propostos como as BMPs (CICCIÙ et al., 2014), o PDGF (TSUCHIYA et al., 2014), o ácido hialurônico (MLADENOVIC et al., 2014) e outros. Estes são alguns fatores de crescimento, que em geral são aplicados diretamente nos sítios de interesse; inúmeras outras drogas também têm sido

utilizadas, sistemicamente, para estímulo do metabolismo ósseo. Dentre essas drogas clinicamente utilizadas, o Ranelato de Estrôncio (RSr) têm merecido especial atenção dos pesquisadores.

O RSr é um novo composto que têm sido usado no tratamento de osteoporose pós - menopausa com o objetivo de reduzir o risco de fraturas vertebrais e de pelve na mulher (MEUNIER et al., 2004; SEEMAN et al., 2006; REGINSTER et al., 2005). O mecanismo de ação celular e molecular desse material sobre o osso ainda permanece pouco compreendido. Alguns estudos *in vitro* sugerem que este fármaco pode promover a proliferação e diferenciação de osteoblastos (CANALIS et al., 1996; BONNELYE et al., 2008) e aumentar a diferenciação osteogênica de células da medula óssea (CHOUDHARY et al. 2007; PENG et al., 2009). Existem evidencias que esta droga tem modo duplo de ação, agindo concomitantemente na inibição da atividade osteoclástica e estimulando a replicação e maturação osteoblástica (MARIE et al., 2011). Embora o RSr seja vastamente pesquisado e utilizado em diferentes segmentos da medicina (MEUNIER et al., 2004; REGINSTER et al., 2005; KAUFMAN et al., 2013) as pesquisas na área odontológica ainda são escassas (LI et al., 2012).

Dado a importancia da regeneração óssea na odontologia, o conhecimento dos possíveis efeitos do RSr nos processos de reparo e remodelação ósseos bucais merecem investigação. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do RSr, administrado via oral, no reparo de defeitos ósseos intrabucais de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelo experimental

Neste modelo de estudo animal foram utilizados 20 ratos machos Lewis (*Rattus norvegicus albinus*), com 10 semanas de vida, pesando entre 280g e 310g, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos, Tratados (T14 e T42) e Controles (C14 e C42), os quais foram sacrificados em 14 e 42 dias após os procedimentos cirúrgicos. Os animais foram acondicionados em biotério apropriado com controle de temperatura e luminosidade. Os ratos tiveram acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório, exceto no período de 5 dias após os procedimentos cirúrgicos, quando permaneceram somente em dieta pastosa e água. Importante ressaltar que durante o período pós-operatório os animais foram acondicionados um por gaiola.

Este projeto foi previamente aprovado pelo CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais /Universidade Federal de Minas Gerais.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de uma combinação de sedativo e relaxante muscular, cloridrato de xilazina 2% (0,1 ml/100g peso corporal) e a base anestésica, cloridrato de Ketamina 10% (0,1ml/100g). Previamente à cirurgia, os animais receberam uma dose de antiinflamatório de uso veterinário, Flunixinina/ meglumina (Banamine injetável pet), 1,1 mg/kg. Os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica em decúbito dorsal, a exodontia do primeiro molar superior direito foi realizada por via alveolar. Com o auxílio de uma broca diamantada cilíndrica 2094, o defeito ósseo padronizado (2,5 mm de diâmetro X 2,5 mm de profundidade) foi criado sob irrigação com solução salina estéril. Foram removidos os septos interradiculares das raízes distais. O septo da raiz mesial foi sempre preservado.

Após confirmação da integridade das paredes do defeito, as bordas da mucosa sobre o sítio operado foram suturadas. Os animais receberam por 3 dias, doses subcutâneas de antibiótico oxitetraciclina (Terramicina Solução injetável), 10mg/Kg, uma a cada 24 horas. Durante todo o período pós-operatório não foram utilizadas maravalhas como forração das gaiolas, para evitar resíduos intrabuciais que pudessem contaminar ou danificar o sítio das lesões. As suturas foram removidas no 14º dia após o procedimento cirúrgico. Os animais foram sacrificados após 14 e 42 dias.

Administração do Ranelato de Estrôncio

O esquema de administração medicamentosa foi iniciado logo após o procedimento cirúrgico. Os animais tratados receberam 625 mg/ kg de RSr (Protos®, Laboratório Servier do Brasil, RJ) adicionado a 2 gramas de alimento pastoso, 7 dias por semana, dose a qual se assemelha à utilizada em humanos de 2g/ dia (MARIE et al., 1993; AMMANN et al., 2004). Os grupos controles também receberam a mesma quantidade de alimento pastoso; 2 gramas/dia.

Métodos de avaliação histológica e morfométrica

Os ratos foram sacrificados após 14 e 42 dias dos procedimentos cirúrgicos. Após o sacrifício, os animais tiveram suas cabeças dissecadas, removendo-se a pele e o tecido muscular. As maxilas imediatamente foram fixadas por imersão em formalina neutra tamponada (FTN) 10%, por 72 horas e então desmineralizadas em uma mistura de ácido fórmico, ácido clorídrico e cloreto de alumínio (solução Planck Richol's). Um corte preliminar na área central do defeito permitiu a padronização da área de microtomia e conseqüentemente, a uniformidade da região a ser avaliada em todos os grupos. O corte foi realizado 1mm da face mesial da coroa do 2º molar. Após a desmineralização, as amostras foram processadas para histologia, conforme protocolo de rotina.

Cerca de 110 cortes seriados de 6 micrometros de espessura de cada amostra foram montados em 13 lâminas histológicas sequenciais, previamente tratadas com silano 2%. As lâminas foram então coradas em Tricômico de Gômori para as análises.

A presença de pêlos, resíduos de maravalha, alimentos ou quaisquer corpos estranhos na área do defeito foram considerados critérios de exclusão das amostras,

especialmente aos 14 dias, fase em que a epitelização recente e frágil da mucosa pode permitir a invasão de partículas estranhas na área da ferida. Além destes critérios, também foram desconsideradas amostras com imagens de sequestros ósseos, especialmente visíveis aos 42 dias em animais cuja remodelação óssea culminou no rompimento de uma das paredes (vestibular ou palatina) dos defeitos. Para análise morfométrica foram selecionados 3 cortes histológicos, sendo: corte 1 correspondendo ao centro do defeito; corte 3 correspondendo a extremidade distal do defeito; corte 2 correspondendo ao ponto intermediário aos cortes 1 e 3. As imagens capturadas com a objetiva de 4X, pela câmera Q-color 3 acoplada ao microscópio de luz (Olympus BX-41, New York, USA) foram avaliadas com o Software Image Jey (National Institutes of Health, USA) para análises morfométricas. Este software permitiu a leitura precisa das áreas coradas em verde pelo Tricrômico de Gomori (colágeno tipo I) correspondentes à neoformação óssea, fornecendo assim o percentual de neoformação relativo à área total avaliada.

Análise estatística

Os dados foram testados para normalidade e homocedasticidade através dos testes de Liliefors and Bartlett, respectivamente. Os grupos foram comparados através do teste One-way ANOVA com correção de Bonferroni. Todos os dados foram analisados por meio do programa estatístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS versão 17, IBM, Chicago, IL). Diferenças entre os grupos foram consideradas significantes para uma probabilidade de significância inferior a 5%.

RESULTADOS

A avaliação histológica revelou um padrão de cicatrização tecidual bastante semelhante entre os grupos controle e teste, no período de 14 dias. Em ambos os grupos, a ferida cirúrgica mostrou-se completamente fechada, recoberta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e tecido conjuntivo subjacente apresentando aspecto histológico saudável, livre de infiltrado inflamatório. Aos 14 dias, a neoformação óssea pôde ser observada especialmente no terço apical e médio do defeito em ambos os grupos (Figura 1).

Os achados histológicos também mostraram a proliferação osteoblástica em regiões de trabéculas ósseas neoformadas. Tais aspectos ocorreram em ambos os grupos (T14 e C14), mas foram mais evidentes em animais tratados (Figura 1). No grupo T14 a área de preenchimento do defeito por deposição óssea foi significativamente maior ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Embora não tenha sido escopo deste trabalho avaliar a proliferação osteoclástica, ficou evidente aos 14 dias, em ambos os grupos, o típico processo de remodelamento ósseo. Os cortes revelaram a atividade simultânea de osteoclastos em processo de reabsorção das paredes ósseas e dos osteoblastos em processo de síntese ou deposição de matriz colágena. Aparentemente, nos 3 pontos de avaliação histológica, nenhum sinal de desequilíbrio entre as células, osteoclastos e osteoblastos, pôde ser observado em favor do grupo controle ou tratado no período de 14 dias.

No período de 42 dias, os sítios operados apresentavam-se, em ambos os grupos, recobertos por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. A área dos defeitos revelou-se, preenchida por tecido ósseo caracterizado por trabéculas ósseas espessas, fusionadas e com poucos espaços medulares na área central.

Histologicamente, notou-se uma melhor organização da matriz óssea com alguns osteócitos já esboçando organização em sistema de Havers, nas amostras dos animais tratados (T42) (Figura 2).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na comparação quantitativa da neoformação óssea entre os grupos C42 e T42 ($p > 0,05$) (Tabela1).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram um efeito favorável da utilização do Rsr sobre o metabolismo ósseo durante a cicatrização de defeitos ósseos intrabucais. A deposição óssea precoce em regiões de defeitos ósseos odontológicos é de extrema importância para o completo e rápido retorno das funções mastigatória, estética e fonética. Assim, o Rsr pode ser uma droga promissora em terapias de regeneração óssea.

Inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados no intuito de testar novas estratégias osteogênicas e terapias ósseas. Análises de reparo ósseo *in vivo* são em sua maioria realizadas após a criação de defeitos ósseos em modelos animais (CHESMEI et al., 1998; TSUCHIYA et al., 2014) e tradicionalmente os defeitos são criados em tíbias, fêmures e calota craniana (LEE et al., 2010; PURICELLI et al., 2010). Entretanto, para pesquisas odontológicas o ideal seria a utilização de um modelo de defeito ósseo que tenha características semelhantes ao reparo ósseo do complexo buco-maxilo-facial. Nesse sentido, os alvéolos dentais pós exodontias tem sido um modelo de estudo bastante utilizado para avaliação de fatores que possam acelerar ou retardar o processo de reparo ósseo (KANYAMA et al., 2003; TEÓFILO et al., 2004). Embora este seja um modelo viável para análise da reconstituição óssea em pequenas cavidades, algumas desvantagens podem ser citadas, como a variação do tamanho do alvéolo, a presença dos septos interradiculares e diferentes quantidades remanescentes do ligamento periodontal, os quais podem interferir na interpretação dos resultados.

No intuito de controlar essas variáveis, utilizou-se neste trabalho um defeito intrabucal padronizado em ratos, o qual agregou os benefícios das técnicas de padronização dos defeitos extraorais (tíbia, calota craniana e fêmures) às

características encontradas no meio bucal humano, como microbiota, condições de umidade e traumas da mastigação.

Considerando a possibilidade de novas estratégias terapêuticas para melhoria dos resultados de regeneração óssea, algumas drogas têm sido estudadas. O RSr tem se destacado devido a sua ação dupla, favorecendo o metabolismo ósseo através da inibição osteoclástica e estimulação osteoblástica (MEUNIER et al., 2004; SEEMAN et al., 2006; REGINSTER et al., 2005). Por esse motivo, o RSr foi escolhido para ser testado como indutor de neoformação óssea neste trabalho. Até o presente momento, de acordo com nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avalia o efeito desta droga em defeitos intrabucais.

O período de 14 dias foi selecionado para visualização da deposição óssea, isto por que representa a fase inicial da deposição mineral nas laterais e fundo do defeito, portanto qualquer indução óssea pode ser melhor percebida nesse período. Aos 42 dias, estudos anteriores de cunho similar utilizando alvéolos pós-extração como modelo, sugeriram que o processo de reparo ósseo está completo (BRANDAO et al., 2002; ZIED et al., 2005). Nossos resultados mostraram que após 42 dias, apesar do defeito ósseo ter sido preenchido por osso com poucos espaços medulares, nota-se na borda superficial do osso neoformado células osteogênicas ainda em atividade, indicando a não conclusão do reparo ósseo. Além disso, observou-se na maior parte do osso neoformado um aspecto ainda imaturo em ambos os grupos. As discrepâncias entre esses dados e os resultados da literatura possivelmente decorrem do modelo de reparo ósseo avaliado, os quais tradicionalmente são alvéolos dentários pós exodontia.

Estudos anteriores (in vitro) revelaram que o RSr tem propriedades osteoindutoras, apresentando redução da contagem de células osteoclásticas e aumento da

diferenciação de osteoblastos (CANALIS et al., 1996; BARON et al., 2002; BONEELYE et al., 2008; PENG et al., 2009). No presente trabalho, não foi possível identificar uma diferença evidente no equilíbrio dessas células, uma vez que não foram utilizadas técnicas de marcação celular específicas. Estudos futuros devem ser conduzidos neste sentido para confirmação destes achados.

Nossos resultados histomorfométricos, revelaram um maior percentual de matriz óssea neoformada (colágeno I corado por Tricrômico de Gomori) por área total avaliada no grupo C14 durante o reparo do defeito. Estes resultados entram em concordância com os achados na literatura. Estudos prévios relatam que o uso sistêmico do estrôncio em animais e em pacientes na forma de ranelato, mostra-se efetivo na melhoria da qualidade do tecido ósseo, aumentando sua resistência e reduzindo o risco de fraturas. (BUEHLER et al., 2001; DELANNOY et al., 2002; AMMANN et al., 2004; REGINSTER et al., 2009; KAUFMAN et al., 2013; CIANFEROTTI et al., 2013).

Alguns estudos apresentam resultados divergentes quando comparados aos encontrados nesse trabalho (RODRÍGUEZ et al., 2012; CHAVASSIEUX et al., 2014). Esses achados podem destoar devido a diferenças metodológicas, como tipo de defeito, período avaliado e métodos de avaliação. No presente estudo utilizou-se um novo modelo de defeito ósseo, que propicia a avaliação da neoformação óssea em um processo de reparo, enquanto nos estudos divergentes a avaliação foi realizada em um tecido ósseo já formado e que estava em processo de osteoporose.

Outro achado importante desse trabalho foi a presença de uma melhor organização da matriz óssea no grupo T42 quando comparado ao C42, sinalizando uma possível vantagem no estágio de maturação óssea, apesar dos testes estatísticos não terem indicado diferença significativa.

Os resultados encontrados nesse estudo tem grande importância perante os dados já encontrados na literatura, pois reforçam a vantagem do uso do RSr em situações de alterações fisiológicas no metabolismo ósseo. Desta forma, a aplicação do RSr como uma nova estratégia terapêutica, pode trazer grandes benefícios em diferentes áreas da odontologia, como na periodontia, implantodontia e cirurgia buco-maxilo facial.

É válido ressaltar que mais estudos são necessários para melhor compreensão da ação molecular e celular desta droga no tecido ósseo, abrindo perspectivas para a criação de diferentes tipos de defeitos, diferentes vias de administração do RSr e avaliação de marcadores específicos do metabolismo ósseo.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o RSr tem influência no reparo de defeitos ósseos intrabuciais em modelo animal, acelerando o processo de neoformação e maturação óssea. Esses resultados sugerem um possível benefício na utilização do RSr via oral para acelerar o reparo ósseo intrabucal.

REFERENCIAS

1. ALAM S, UEKI K, NAKAGAWA K; Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: An immune histochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; v. 107, p. 22-29, 2009.
2. AMMANN P, SHEN V, ROBIN B, MAURAS Y, BONJOUR J.P, RIZZOLI R; Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *Journal of Bone and Mineral Research*; v. 19, p. 2012–2020, 2004.
3. BARON R, TSOUDEROS Y; In vitro effects of strontium ranelate on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol*; v. 450, p. 11–17, 2002.
4. BONNELYE E, CHABADEL A, SALTEL F; Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*; v. 42, p. 129–138, 2008.
5. BRANDAO A. C; Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMP'S. *Brazilian Dental Journal*; Ribeirão Preto, v.13, n. 3, p. 147-152, 2002.
6. BUEHLER J, CHAPPUIS P, SAFFAR JL, TSOUDEROS Y, VIGNERY A; Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*, v. 29, p. 176–179, 2001.
7. CANALIS E, HOTT M, DELOFFRE P; The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*, v. 18, p. 517–523, 1996.

8. CHAVASSIEUX P, MEUNIER PJ, ROUX JP, PORTERO-MUZY N, PIERRE M, CHAPURLAT R; Bone histomorphometry of transiliac paired bone biopsies after 6 or 12 months of treatment with oral strontium ranelate in 387 osteoporotic women: randomized comparison to alendronate. *J Bone Miner Res*, v. 29, p. 618-28, 2014.
9. CHESMEL et al.; Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, v. 56(7), p. 857-65, 1998.
10. CHIAPASCO M. et al.; The role of pericranium grafts in the reduction of postoperative dehiscences and bone resorption after reconstruction of severely deficient edentulous ridges with autogenous on lay bone grafts. *Clinical Oral implants Resersh*, v. 24(6), p. 679-87, 2013.
11. CHOUDHARY S, HALBOUT P, ALANDER C, et al.; Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. *J Bone Miner Res* , v. 22, p. 1002–1010, 2007.
12. CIANFEROTTI L, D'ASTA F, BRANDI ML; A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, v. 5(3), p. 127-39, 2013.
13. CICCÌ M, SCOTT A, CICCÌ D, TANDON R, MAIORANA C; Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promote and stabilize hard and soft tissue healing for large mandibular new bone reconstruction defects. *J Craniofac Surg*, v. 25(3), p. 860-2, 2014.

14. DELANNOY P, BAZOT D, MARIE PJ; Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. *Metabolism*, v. 51, p. 906–911, 2002.
15. GIANNOUDIS PV; EINHORN TA; MARSH D; Fracture healing the diamond concept. *Injury*, v. 38 (suppl 4), p. S3-S6, 2007.
16. KANG, T et al.; A modified ridge expansion technique in the maxilla. *Compendium of continuing education in dentistry, Davie*, v.33, n.4, p. 250-252,254,256, 2012.
17. KANYAMA M. et al.; Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Archives of Oral Biology, Elsevier LTd. Exeter*. v.48, p.723-730, 2003.
18. KAUFMAN JM, AUDRAN M, BIANCHI G, BRAGA V, DIAZ-CURIEL M, FRANCIS RM, GOEMAERE S, JOSSE R, PALACIOS S, RINGE JD, FELSENBERG D, BOONEN S. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab*, v, 98(2), p. 592-601, 2013.
19. LEE J. A et al.; Effects of fibronectin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects. *Journals Periodontol & Implant Science, Seoul*. v. 40, p. 211-219, 2010.
20. LI Y, LI X, SONG G, CHEN K, YIN G, HU J; Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res*, v. 23(9), p. 1038-4, 2012.
21. MARIE PJ, FELSENBERG D; BRANDI ML; How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int*, v. 22, p. 1659-1667, 2011.

22. MARIE, P.J., HOTT, M., MODROWSKI, D., DE POLLAK, C., GUILLEMAIN, J., DELOFFRE, P. & TSOUDEROS, Y.; An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 8, p. 607–615, 1993.
23. MEUNIER PJ, ROUX C, SEEMAN E, et al.; The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, n. 350, p. 459–468, 2004.
24. MLADENOVIC Z, SAUREL AS, BERENBAUM F, JACQUES C; Potential Role of Hyaluronic Acid on Bone in Osteoarthritis: Matrix Metalloproteinases, Aggrecanases, and RANKL Expression are Partially Prevented by Hyaluronic Acid in Interleukin 1-stimulated Osteoblasts; *J Rheumatol*, n. 41(5), p. 945-54, 2014.
25. NKENKE E, RADESPIEL-TRÖGER M, WILTFANG J, SCHULTZE-MOSGAU S, WINKLER G, NEUKAM FW; Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study.; *Clin Oral Implants Res*, n. 13(5), p. 514-21, 2002.
26. PENG S, ZHOU G, LUK K.D.K et al.; Strontium promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/ MAPK signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*, n. 23, p. 165–174, 2009.
27. PURICELLI E. et al.; Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft. *Head & Face Medice*, Porto Alegre, v.6, p.1-8, 2010.
28. REGINSTER JY, SEEMAN E, DE VERNEJOU MC, et al.; Strontium ranelate reduces the risk of vertebral fractures in postmenopausal women with

- osteoporosis: treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab*, n. 90, p. 2816–2822, 2005.
29. REGINSTER JY, BRUYÈRE O, SAWICKI A, ROCES-VARELA A, FARDELLONE P, ROBERTS A, DEVOGELAER JP.; Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. *Bone*, n. 45(6), p. 1059-64, 2009.
30. RODRÍGUEZ J, ESCUDERO ND, MANDALUNIS PM ; Effect of strontium ranelate on bone remodeling. *Acta Odontol Latinoam*, n. 25(2), p. 208-13, 2012.
31. SEEMAN E, VELLAS B, BENHAMOU C, et al.; Strontium ranelate reduces the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older. *J Bone Miner Res*, n. 21, p. 1113–1120, 2006.
32. TEÓFILO J.M; BRENTGANI L.G; LAMANO CARVALHO T.L; Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Archives of oral biology*, v.49, p. 755-762, 2004.
33. THYLIN MR, MCCONNELL JC, SCHMID MJ, RECKLING RR, OJHA J, BHATTACHARYYA I, MARX DB, REINHARDT RA; EFFECTS of simvastatin gels on murine calvarial bone. ,n. 73(10), p. 1141-8, 2002.
34. TSUCHIYA N, SATO S, KIGAMI R, KAWANO E, TAKANE M, ARAI Y, ITO K, OGISO B.; Effect of a chitosan sponge impregnated with platelet-derived growth factor on bone augmentation beyond the skeletal envelope in rat calvaria. *J Oral Sci*, n. 56(1), p. 23-8, 2014.
35. ZIED I C et al; Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de

peroxido de hidrogênio. Revista odontológica de Araçatuba. v.26, n.1, p. 9-13, 2005.

ANEXOS

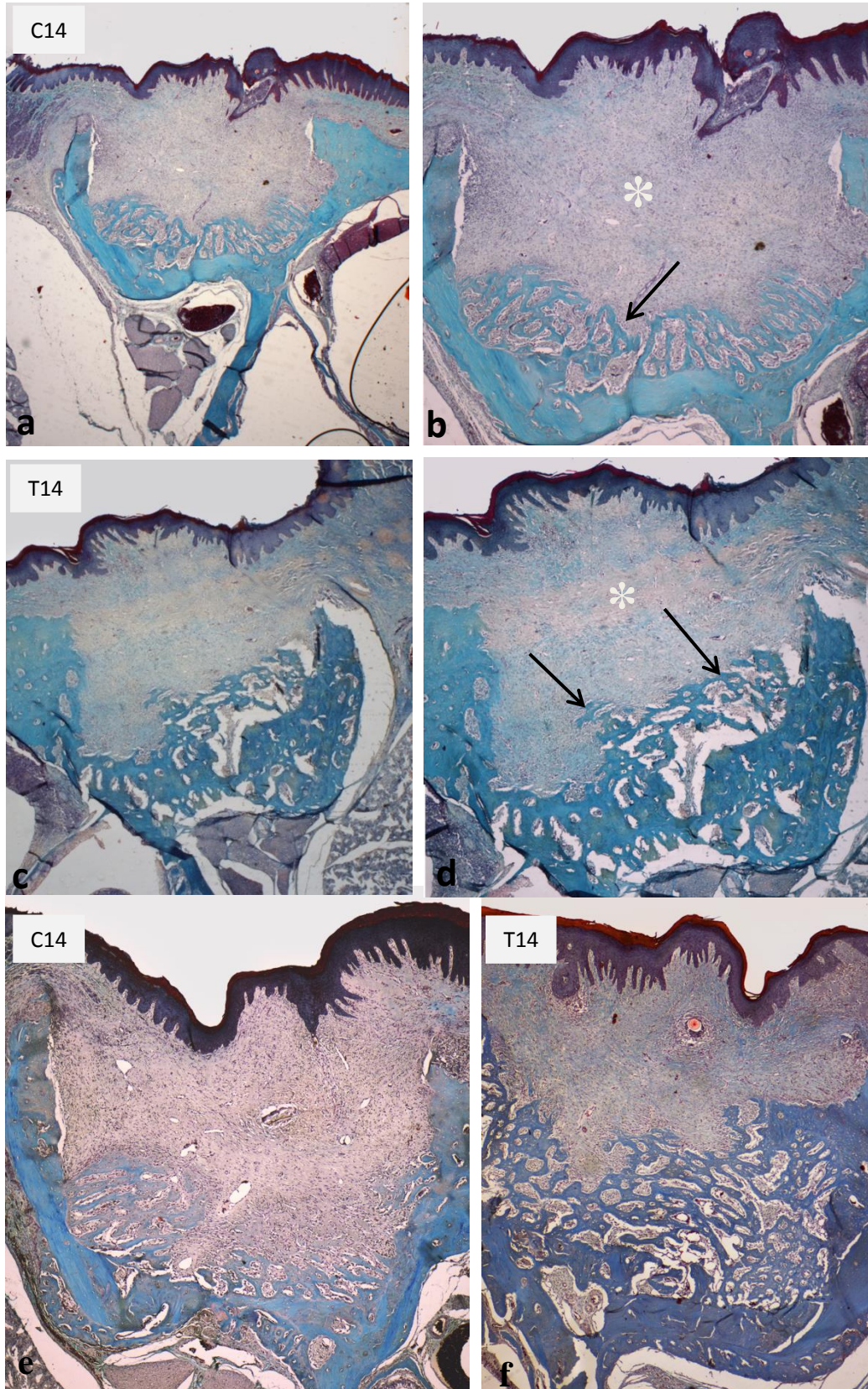
Tabela 1. Comparação entre os grupos teste (T14 e T42) e controle (C14 e C42) em relação ao percentual de formação óssea.

Grupos	Percentual de formação óssea			p*
	Média (\pm s.d)	mínimo	máximo	
C14	19.948 \pm 6.876	10.666	26.777	< 0,01**
T14	41.484 \pm 8.648	34.003	54.693	
C42	77.465 \pm 2.580	74.262	80.324	> 0,05***
T42	79.096 \pm 9.089	67.452	90.007	

*Comparações entre grupos (ANOVA com correção de Bonferroni): **C14 vs T14;

***C42 vs T42.

Figura 01



(FIG 01) Fotomicrografias ilustrativas da avaliação histológica do reparo ósseo em animais tratados e controles, após 14 dias dos procedimentos cirúrgicos. Tricrômico de Gomori.

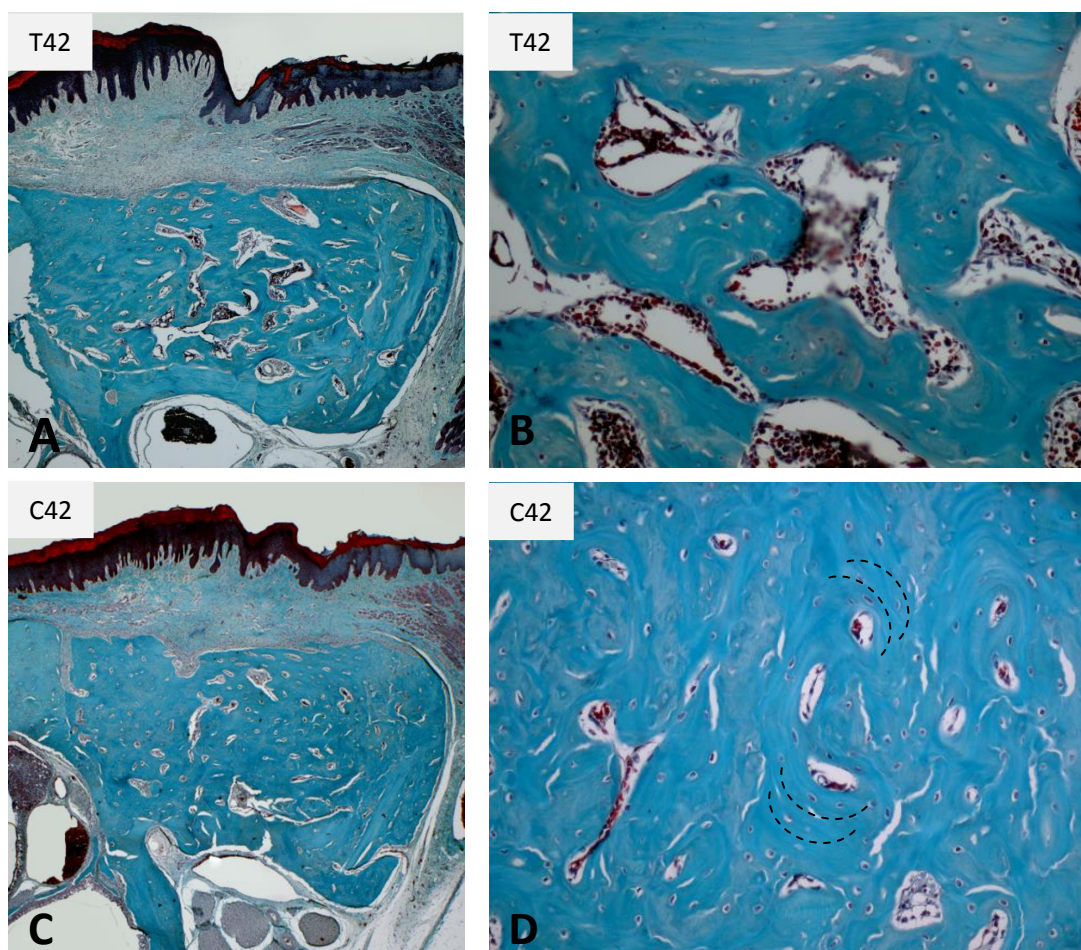
a. Visão panorâmica do defeito ósseo de um animal controle (Co). Note ferida fechada, recoberta por epitélio estratificado queratinizado. Neoformação óssea visível como trabéculas ósseas no 1/3 apical do defeito. Aumento original 2x.

b. Ampliação da imagem anterior. Note epitélio fechado; tecido conjuntivo saudável sem infiltrado inflamatório evidente (asterisco) e trabéculas ósseas (setas) coradas em verde-azul pelo Tricrômico de Gomori. Aumento original 4x.

c-d. Aspecto histológico da reparação óssea em animais tratados (Tr). (c) aumento original de 2x. (d) aumento original de 4x. Notar trabéculas ósseas no 1/3 apical e chegando ao 1/3 médio do defeito (setas).

e-f. Comparação do aspecto histológico do reparo ósseo entre dois outros animais dos grupos (e) Co-controle e (f) Tr-tratado. Notar o volume de deposição óssea superior no defeito ósseo submetido ao tratamento com de RSr (f) em relação ao animal Co-controle (e). Aumento original 4x.

Figura 02



(FIG 02) Fotomicrografias ilustrativas do reparo ósseo de animais após 42 dias do procedimento cirúrgico. Tricrômico de Gomori.

A. Visão panorâmica da área do defeito do animal controle preenchida por tecido ósseo com espaços medulares na área central. Aumento original 4x.

B. Imagem A ampliada mostrando trabéculas ósseas espessas e fusionadas; ainda com osteócitos irregulares demonstrando ainda o aspecto imaturo do tecido ósseo. Aumento original 20x

C. Visão panorâmica da área do defeito do animal tratado preenchida por tecido ósseo, de aspecto mais compacto com poucos espaços medulares na área central. Aumento original 2x.

D. Ampliação da área central do defeito da imagem C. Notar tecido ósseo ainda de aspecto imaturo com poucos espaços medulares. Alguns osteócitos esboçam a organização em sistema de Havers (linha tracejada) . Aumento original 20x.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 303 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Avaliação do ranelato de estrôncio no reparo de defeitos ósseos intrabucais em ratos”, que tem como responsável Luís Otávio de Miranda Cota, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/02/2014. Este certificado espira-se em 11/02/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 303 / 2013, related to the Project entitled “Evaluation of strontium ranelate in intrabucal bone defect repair in rats”, under the supervision of Luís Otávio de Miranda Cota, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/02/2014. This certificate expires in 11/02/2019.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 11/02/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho traz grande contribuição à literatura atual, uma vez que reforça os achados favoráveis à utilização do RSr para melhora do reparo e da manutenção óssea.

O defeito utilizado neste estudo é um modelo viável e de fácil reprodução. Sendo assim, este modelo abre perspectivas para inúmeros outros estudos que almejam avaliar marcadores de reparação óssea, outras drogas osteoindutoras e diferentes biomateriais.

9 REFERÊNCIAS

1. ALAM S, UEKI K, NAKAGAWA K; Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: An immune histochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; v. 107, p. 22-29, 2009.
2. AMMANN P, SHEN V, ROBIN B, MAURAS Y, BONJOUR J.P, RIZZOLI R; Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *Journal of Bone and Mineral Research*; v. 19, p. 2012–2020, 2004.
3. BARON R, TSOUDEROS Y; In vitro effects of strontium ranelate on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol*; v. 450, p. 11–17, 2002.
4. BONNELYE E, CHABADEL A, SALTEL F; Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*; v. 42, p. 129–138, 2008.
5. BRANDAO A. C; Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMP'S. *Brazilian dental journal*; Ribeirão Preto, v.13, n. 3, p. 147-152, 2002.
6. BUEHLER J, CHAPPUIS P, SAFFAR JL, TSOUDEROS Y, VIGNERY A; Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*, v. 29, p. 176–179, 2001.
7. CABRERA WE, SCHROOTEN I, DE BROE ME, D'HAESE PC. Strontium and bone. *J Bone Miner Res.*, v. 14(5), p. 661-8, 1999.

8. CANALIS E, HOTT M, DELOFFRE P; The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*, v. 18, p. 517–523, 1996.
9. CHAVASSIEUX P, MEUNIER PJ, ROUX JP, PORTERO-MUZY N, PIERRE M, CHAPURLAT R; Bone histomorphometry of transiliac paired bone biopsies after 6 or 12 months of treatment with oral strontium ranelate in 387 osteoporotic women: randomized comparison to alendronate. *J Bone Miner Res*, v. 29, p. 618-28, 2014.
10. CHESMEL et al.; Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, v. 56(7), p. 857-65, 1998.
11. CHIAPASCO M. et al.; The role of pericranium grafts in the reduction of postoperative dehiscences and bone resorption after reconstruction of severely deficient edentulous ridges with autogenous on lay bone grafts. *Clinical Oral implants Resersh*, v. 24(6), p. 679-87, 2013.
12. CHOUDHARY S, HALBOUT P, ALANDER C, et al.; Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. *J Bone Miner Res* , v. 22, p. 1002–1010, 2007.
13. CIANFEROTTI L, D'ASTA F, BRANDI ML; A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, v. 5(3), p. 127-39, 2013.
14. CICCÌ M, SCOTT A, CICCÌ D, TANDON R, MAIORANA C; Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promote and stabilize hard and soft

- tissue healing for large mandibular new bone reconstruction defects. *J Craniofac Surg*, v. 25(3), p. 860-2, 2014.
15. COSTA- FILHO L. B; Efeito dos biomateriais a base de quitosana e ácido hialurônico no reparo de defeito ósseo intrabucal de ratos. Dissertação de Mestrado do Programa de pós-graduação em Odontologia. Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.
 16. DAHL SG, ALLAIN P, MARIE PJ, MAURAS Y, BOIVIN G, AMMANN P, et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone*, v. 28(4), p. 446-53, 2001.
 17. DELANNOY P, BAZOT D, MARIE PJ; Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. *Metabolism*. v. 51, p. 906–911, 2002.
 18. DELANNOY P, BAZOT D, MARIE PJ; Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. *Metabolism*, v. 51, p. 906–911, 2002.
 19. DESSAUER A. Analytical requirements for biochemical bone marker. *Scand J Clin Lab Invest.*, v. 227, p. 84-9, 1997.
 20. DINATO JC. *Implantes Osseointegrados*. 1. ed., Editora Artes Médicas; p. 261-313, 2001.
 21. DOUBLIER A, FARLAY D, BALA Y, BOIVIN G. Strontium does not affect the intrinsic bone quality at tissue and BSU levels in iliac samples from *Macaca fascicularis* monkeys. *Bone.*, v. 22, n. 64, p. 18-24, 2014.
 22. ENDRES DB, RUDE RK. Mineral and bone metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz. Fundamentals of clinical Chemistry*. 5ed.;p. 795-821, 2001.

23. FONSECA J.E. Rebalancing bone turnover in favor of formation with strontium ranelate: implications for bone strength. *Reumatology*; v. 47(1), p. 17-9, 2008
24. GIANNOUDIS PV; EINHORN TA; MARSH D; Fracture healing the diamond concept. *Injury*, v. 38 (suppl 4), p. S3-S6, 2007.
25. KANG, T et al.; A modified ridge expansion technique in the maxilla. *Compendium of continuing education in dentistry, Davie*, v.33, n.4, p. 250-252,254,256, 2012.
26. KANYAMA M. et al.; Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Archives of oral biology, Elsevier Ltd. Exeter*. v.48, p.723-730, 2003.
27. KAUFMAN JM, AUDRAN M, BIANCHI G, BRAGA V, DIAZ-CURIEL M, FRANCIS RM, GOEMAERE S, JOSSE R, PALACIOS S, RINGE JD, FELSEMBERG D, BOONEN S. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab*, v, 98(2), p. 592-601, 2013.
28. LEE J. A et al.; Effects of fibronectin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects. *Journals periodontol & implant science, Seoul*. v. 40, p. 211-219, 2010.
29. LI Y, LI X, SONG G, CHEN K, YIN G, HU J; Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res*, v. 23(9), p. 1038-4, 2012.
30. LINDHE J. Formação do Osso Alveolar. In: *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

31. LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. Tissue engineering – applications in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois: Quintessência Books,. p. 297.,1999.
32. MARIE PJ, AMMANN P, BOIVIN G, REY, C. Mechanisms of action and therapeutic potencial os strontium in bone. *Calcif Tissue Int.*; v. 69(2), p. 121-9, 2001.
- 33.MARIE PJ, FELSEMBERG D; BRANDI ML; How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis.*Osteoporos Int*, v. 22, p. 1659-1667, 2011.
- 34.MARIE, P.J., HOTT, M., MODROWSKI, D., DE POLLAK, C., GUILLEMAIN, J., DELOFFRE, P. & TSOUDEROS, Y.; An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 8, p. 607–615, 1993.
- 35.MEUNIER PJ, ROUX C, SEEMAN E, et al.; The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, n. 350, p. 459–468, 2004.
- 36.MLADENOVIC Z, SAUREL AS, BERENBAUM F, JACQUES C; Potential Role of Hyaluronic Acid on Bone in Osteoarthritis: Matrix Metalloproteinases, Aggrecanases, and RANKL Expression are Partially Prevented by Hyaluronic Acid in Interleukin 1-stimulated Osteoblasts; *J Rheumatol*, n. 41(5), p. 945-54, 2014.
- 37.NKENKE E, RADESPIEL-TRÖGER M, WILTFANG J, SCHULTZE-MOSGAU S, WINKLER G, NEUKAM FW; Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study.;*Clin Oral Implants Res*, n. 13(5), p. 514-21, 2002.

38. PENG S, ZHOU G, LUK K.D.K et al.; Strontium promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/ MAPK signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*, n. 23, p. 165–174, 2009.
39. PURICELLI E. et al.; Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft. *Head & Face Medice*, Porto Alegre, v.6, p.1-8, 2010.
40. REGINSTER JY, BRUYÈRE O, SAWICKI A, ROCES-VARELA A, FARDELLONE P, ROBERTS A, DEVOGELAER JP.; Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. *Bone*, n. 45(6), p. 1059-64, 2009.
41. REGINSTER JY, SEEMAN E, DE VERNEJOU MC, et al.; Strontium ranelate reduces the risk of vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab*, n. 90, p. 2816–2822, 2005.
42. RODRÍGUEZ J, ESCUDERO ND, MANDALUNIS PM ; Effect of strontium ranelate on bone remodeling. *Acta Odontol Latinoam*, n. 25(2), p. 208-13, 2012.
43. SEEMAN E, VELLAS B, BENHAMOU C, et al.; Strontium ranelate reduces the risk of vertebral and nonvertebral fractures in women eighty years of age and older. *J Bone Miner Res*, n. 21, p. 1113–1120, 2006.
44. SEILER H, SIGEL A, SIGEL H; Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, U.S.A., p. 577–585, 1994.
45. SHIDARA K, INABA M, OKUNO S, YAMADA S, KUMEDA Y, IMANISHI Y, YAMAKAWA T, ISHIMURA E, NISHIZAWA Y; Serum Levels of TRAP5b, a New Bone Resorption Marker Unaffected by Renal Dysfunction, as a Useful

- Marker of Cortical Bone Loss in Hemodialysis Patients. *Calcif Tissue Int.*; n. 82, p. 278–287, 2008.
46. TEÓFILO J.M; BRENTGANI L.G; LAMANO CARVALHO T.L; Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Archives of oral biology*, v.49, p. 755-762, 2004.
47. THYLIN MR, MCCONNELL JC, SCHMID MJ, RECKLING RR, OJHA J, BHATTACHARYYA I, MARX DB, REINHARDT RA; EFFECTS of simvastatin gels on murine calvarial bone. ,n. 73(10), p. 1141-8, 2002.
48. TSUCHIYA N, SATO S, KIGAMI R, KAWANO E, TAKANE M, ARAI Y, ITO K, OGISO B.; Effect of a chitosan sponge impregnated with platelet-derived growth factor on bone augmentation beyond the skeletal envelope in rat calvaria. *J Oral Sci*, n. 56(1), p. 23-8, 2014.
49. UNDERWOOD EJ; Trace Elements in Humans and Animal Nutrition. Academic Press, Inc., New York, NY, U.S.A., 1977.
50. WATTS NB. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem.*; v. 45, p. 1359-68, 1999.
51. ZIED I C et al; Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. *Revista odontológica de Araçatuba*. v.26, n.1, p. 9-13, 2005.

10 FOTOMICROGRAFIAS

Imagem 01

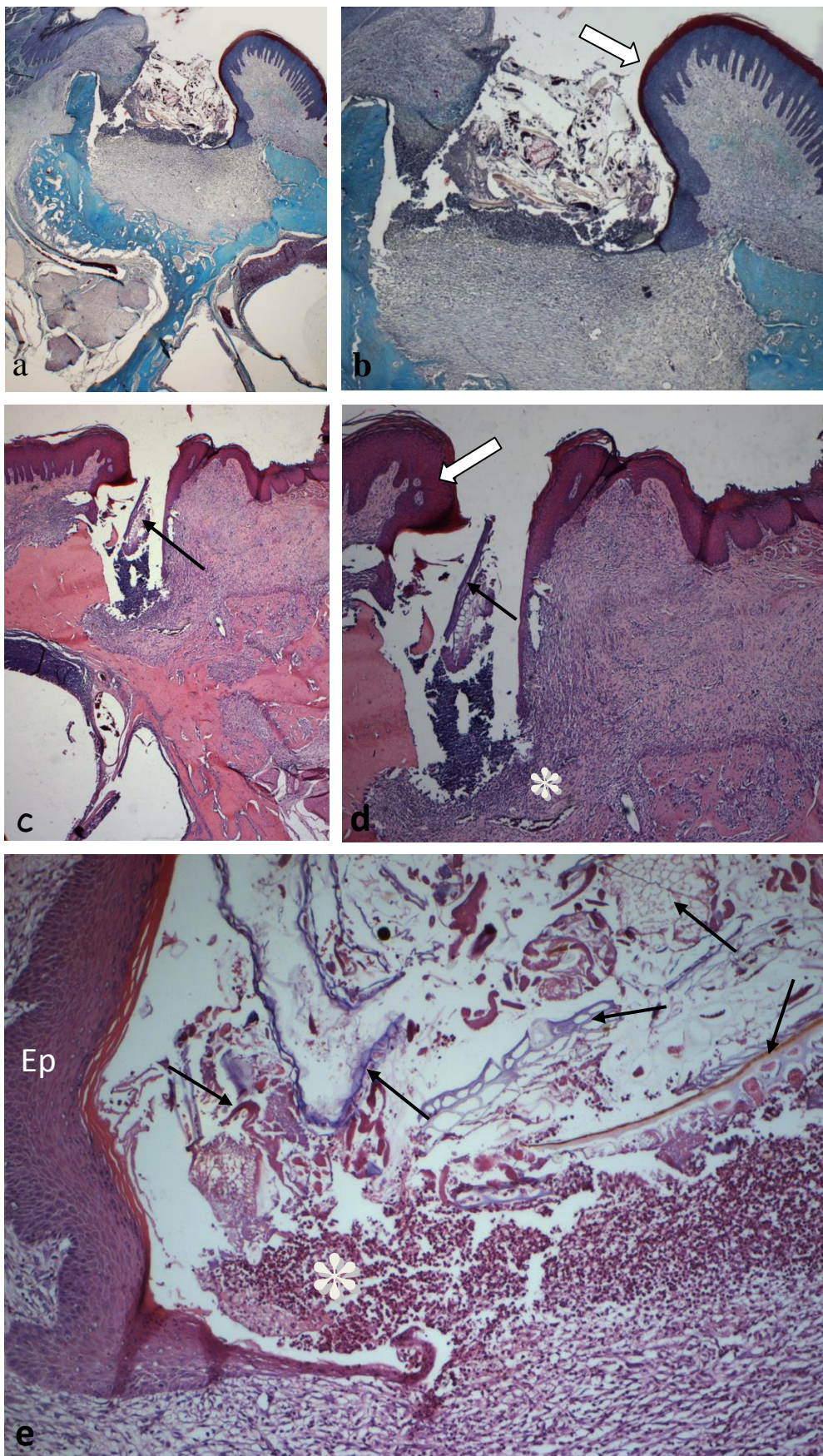


Imagem 01- Fotomicrografias ilustrativas dos critérios histológicos de exclusão de amostras referentes ao período de 14 dias. As imagens foram obtidas de uma amostra-animal controle, mas os mesmos aspectos foram encontrados em animais tratados e foram considerados para ambos os grupos, motivos de exclusão das amostras.

- a. Visão panorâmica do defeito ósseo. Note ferida aberta, invasão epitelial e presença de corpos estranhos no sitio de cicatrização epitelial. Tricrômico de Gomori. Aumento original 2x.
- b. Ampliação da imagem anterior. Seta branca = invasão epitelial. Tricrômico de Gomori. Aumento original 4x.
- c. Visão panorâmica do defeito ósseo com presença de corpos estranhos (seta preta) e invasão epitelial. Hematoxilina-Eosina. Aumento original 2x.
- d. Ampliação da imagem anterior. Seta preta = corpos estranhos; Seta branca = invasão epitelial. Hematoxilina-Eosina. Aumento original 4x.
- e. Detalhe da área subjacente à contaminação da ferida por corpos estranhos. Ep= epitélio de revestimento da mucosa oral. Setas pretas = corpos estranhos (pelos, algodão, resíduos de maravalha e ração); asterisco = infiltrado inflamatório agudo subjacente à área de contaminação.

Imagem 02

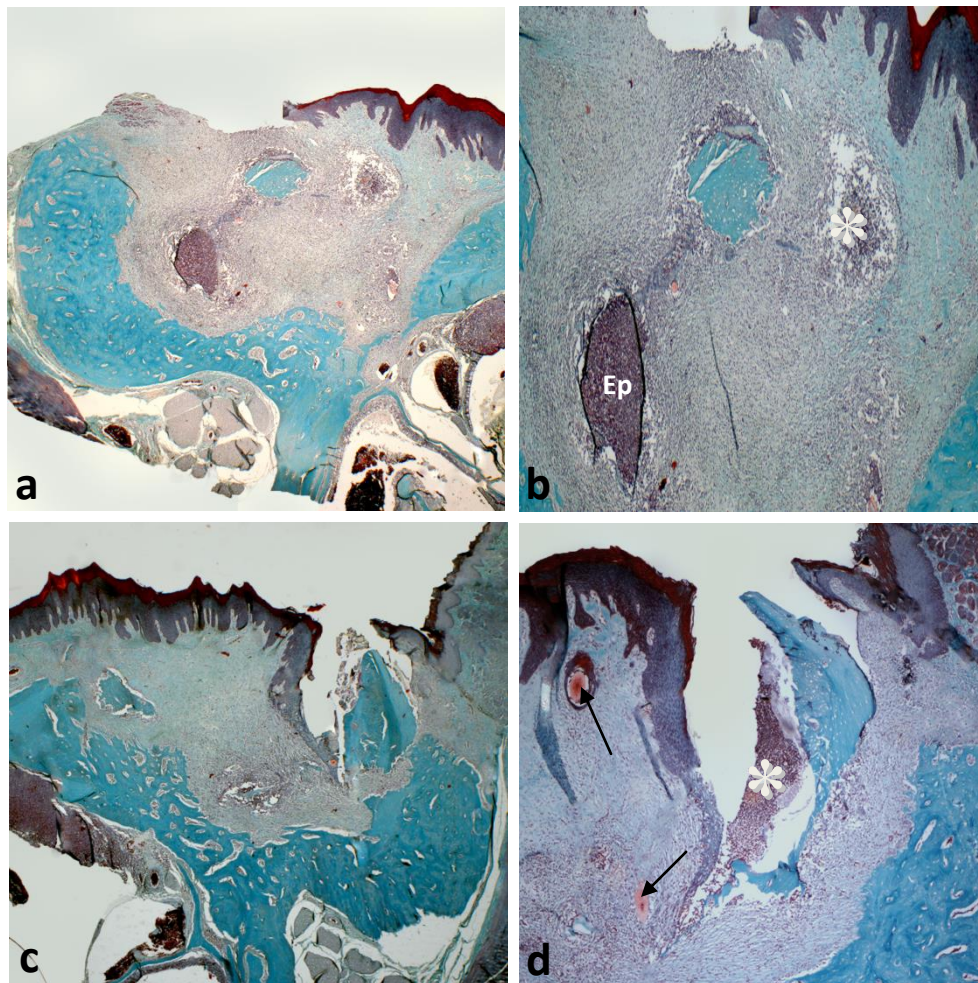


Imagem 02- Fotomicrografias ilustrativas dos critérios histológicos de exclusão de amostras, referentes ao período de 42 dias. As imagens foram obtidas de uma amostra-animal tratado, mas os mesmos aspectos foram encontrados em animais controles e foram considerados motivos de exclusão das amostras e substituição dos animais para ambos os grupos.

- a. Visão panorâmica do defeito ósseo. Note ferida aberta, evidências de invasão epitelial (ep) e presença de fragmento ósseo isolado no sítio de cicatrização. Tricrômico de Gomori. Aumento original 2x.
- b. Ampliação da imagem anterior. Ep = área de invasão epitelial. Asterisco = Infiltrado inflamatório. Tricrômico de Gomori. Aumento original 4x.
- c. Visão panorâmica do defeito ósseo com descontinuidade epitelial e fragmento ósseo sequestrado, em processo de eliminação. Tricrômico de Gomori. Aumento original 2x.
- d. Ampliação da imagem anterior. Nesta secção é possível observar corpos estranhos (pelos) incorporados no sítio da lesão e processo inflamatório junto ao fragmento ósseo. Setas = pelos. Asterisco = infiltrado inflamatório. Tricrômico de Gomori. Aumento original 4x.

Imagem 03

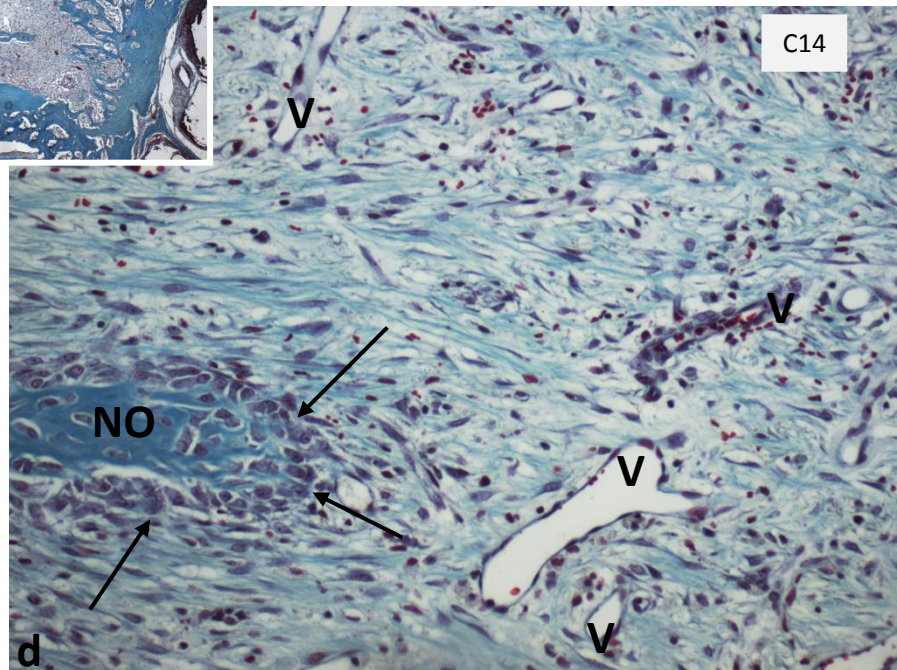
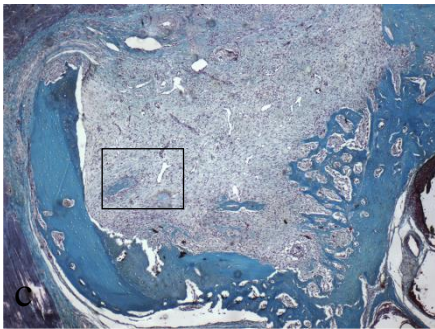
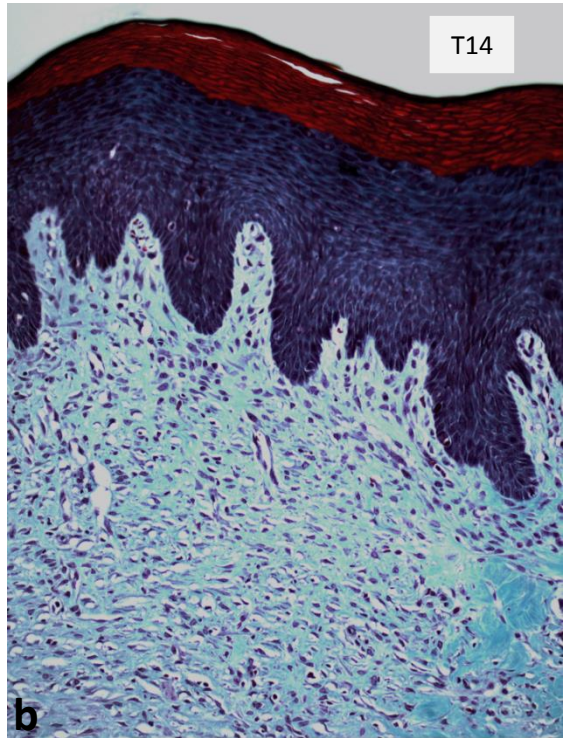
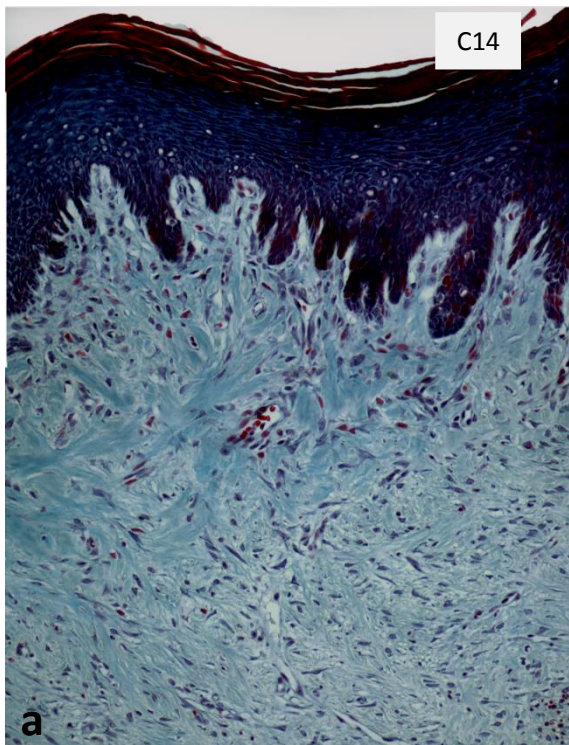


Imagem 03- Cicatrização da mucosa oral e tecido conjuntivo no sítio da lesão, em animais tratados e controles, após 14 dias dos procedimentos cirúrgicos. Tricrômico de Gomori.

a. Animais controles. b. Animais tratados. Em ambos os casos, observa-se tecido epitelial totalmente restabelecido, com aspecto estratificado pavimentoso queratinizado. O tecido conjuntivo subjacente, da lâmina própria, apresenta aspecto histológico saudável livre de infiltrado inflamatório. Aumento original 20x.

c. e d. Detalhe do aspecto histológico do tecido conjuntivo na área do defeito ósseo. Na imagem ampliada (d) é possível observar área de blastemas ósseos com osteoblastos em franca atividade osteogênica (setas) e um tecido conjuntivo muito vascularizado (V) e ricamente celular. A foto foi obtida de um animal controle, mas o mesmo aspecto foi observado em animais submetidos ao tratamento com RSr. V=vasos. NO= Neoformação óssea. Aumento original (c) 4x (d) 20x.

Imagem 04

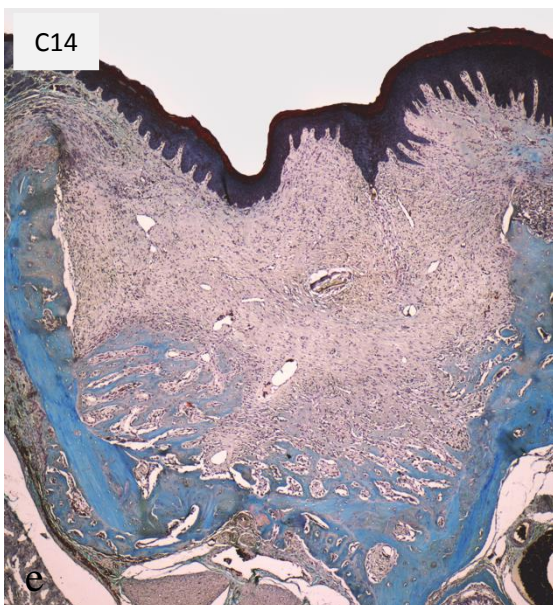
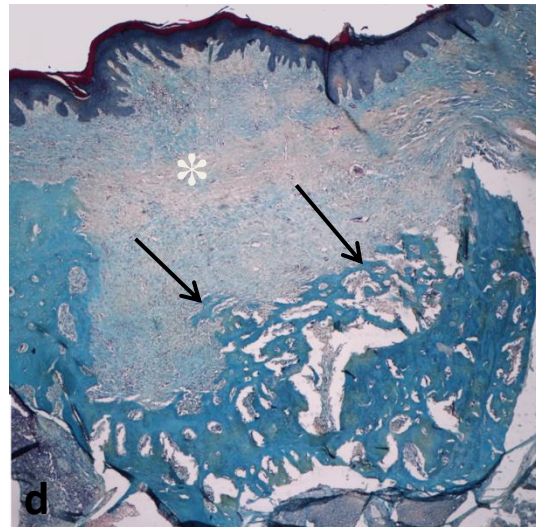
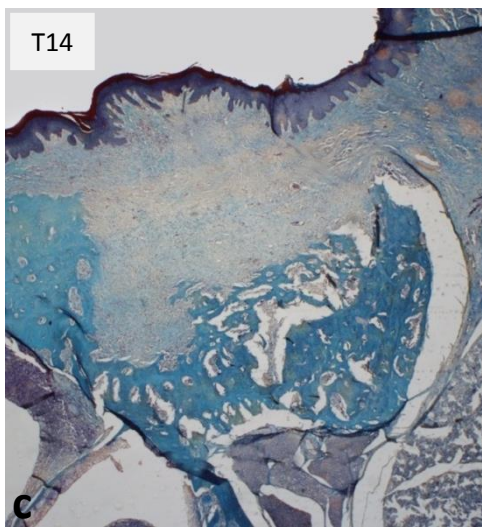
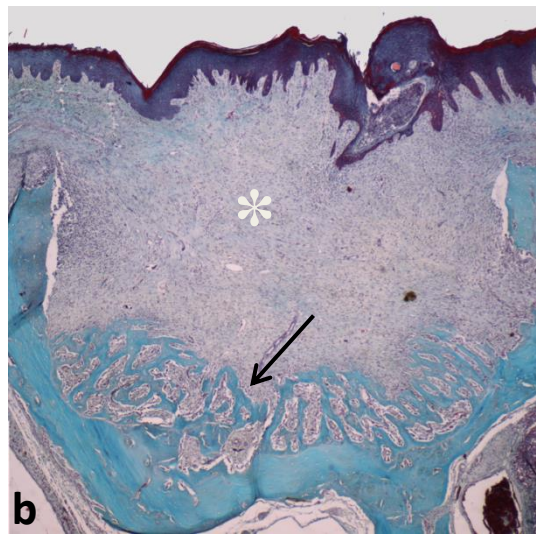
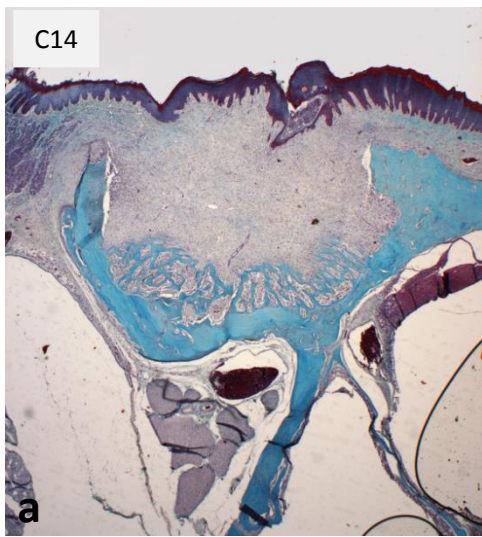


Imagem 04 - Fotomicrografias ilustrativas da avaliação histológica do reparo ósseo em animais tratados e controles, após 14 dias dos procedimentos cirúrgicos.

Tricrômico de Gomori.

- a. Visão panorâmica do defeito ósseo de um animal controle (Co). Note ferida fechada, recoberta por epitélio estratificado queratinizado. Neoformação óssea visível como trabéculas ósseas no 1/3 apical do defeito. Aumento original 2x.
- b. Ampliação da imagem anterior. Note epitélio fechado; tecido conjuntivo saudável sem infiltrado inflamatório evidente (asterisco) e trabéculas ósseas (setas) coradas em verde-azul pelo Tricrômico de Gomori. Aumento original 4x.
- c-d. Aspecto histológico da reparação óssea em animais tratados (Tr). (c) aumento original de 2x. (d) aumento original de 4x. Notar trabéculas ósseas no 1/3 apical e chegando ao 1/3 médio do defeito (setas).
- e-f. Comparação do aspecto histológico do reparo ósseo entre dois outros animais dos grupos (e) Co-controle e (f) Tr-tratado. Notar o volume de deposição óssea superior no defeito ósseo submetido ao tratamento com Rsr (f) em relação ao animal Co-controle (e). Aumento original 4x.

Imagem 05

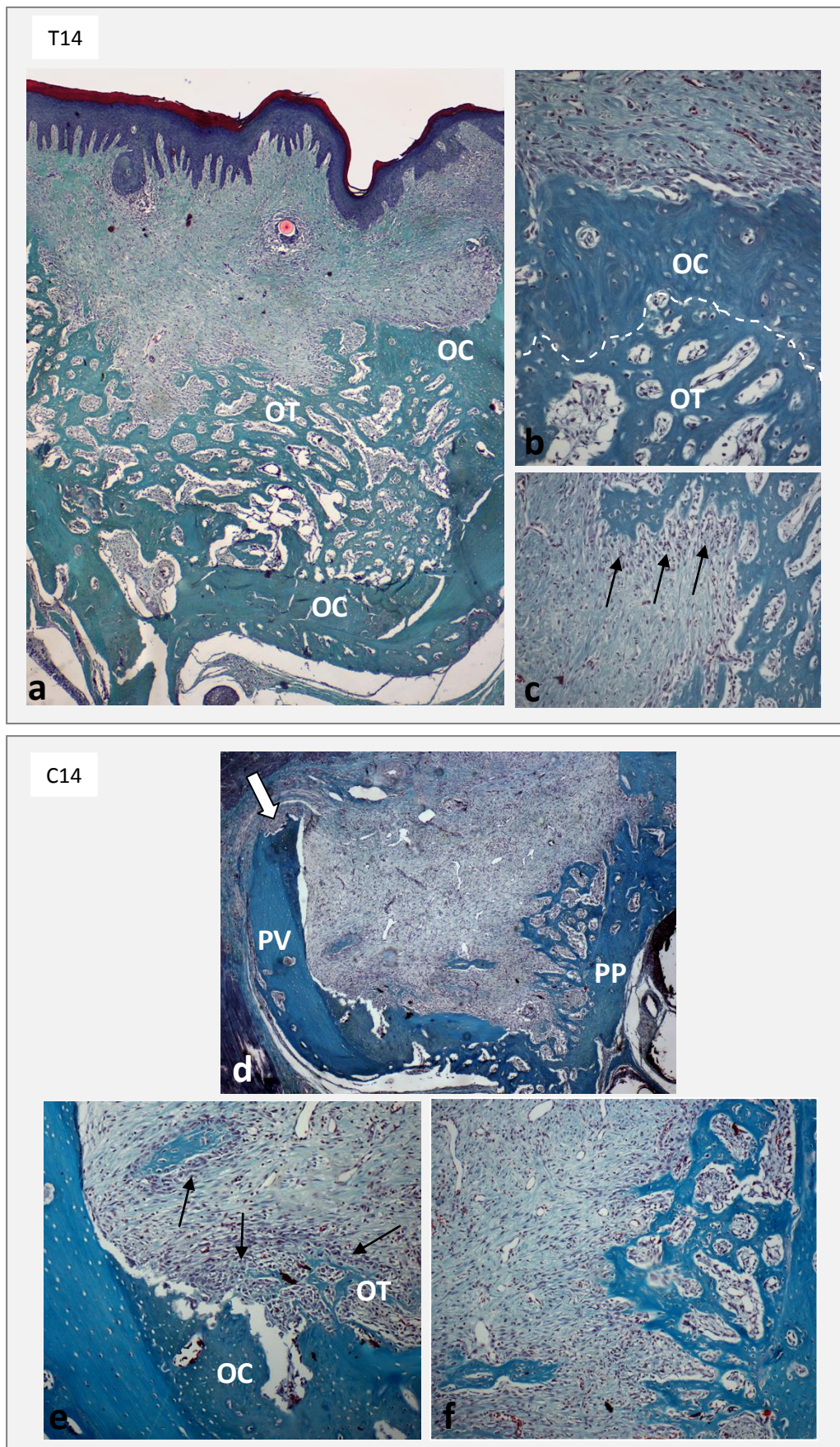


Imagem 05- Fotomicrografias ilustrativas do processo de neoformação óssea no período de 14 dias pós-cirúrgico em ambos os animais, tratados (a-c) e controles (d-f). Tricrômico de Gomori.

a-c. Aspectos histológicos do processo de neoformação óssea em animais tratados (Tr).

a. Visão panorâmica do defeito ósseo de um animal tratado, onde é possível observar nas laterais e fundo no defeito (1/3 apical) o tecido ósseo com aspecto mais compacto (OC). No centro do defeito, a deposição óssea é tipicamente trabecular (OT). Tais formações ocorrem simultaneamente no período de 14 dias. Aumento original 4x.

b. Ampliações do limite entre osso compacto e osso trabecular (linha tracejada). No osso compacto (OC) é possível observar o início de organização de lamelas de colágeno ao redor de pequenos espaços medulares. Tais aspectos ocorreram em ambos os grupos, mas foram mais evidentes em animais tratados com RSr. Aumento original 20x.

c. Detalhe do osso trabecular em formação, em uma típica ossificação intramembranosa, a partir de blastemas ósseos – ou seja, grupamentos de células mesenquimais em diferenciação osteogênica (setas). As trabéculas recém formadas apresentam aspecto imaturo. Aumento original 20x.

d-f. Aspectos histológicos do processo de neoformação óssea em animais controle (Co).

d. Visão panorâmica do defeito. Notar osso compacto no fundo do defeito e discreta deposição trabecular nas paredes laterais. A seta (branca) indica área de reabsorção da crista da parede vestibular do defeito, um achado frequente de

remodelação óssea nesse período. PV= Parede vestibular do defeito ; PP = Parede palatina do defeito. Aumento original 4X.

e. Ampliação da imagem anterior, mostrando áreas de blastemas ósseos (setas); osso compacto (OC) e osso trabecular (OT). Aumento original 10X.

f. Detalhe do osso trabecular em formação, em uma típica ossificação intramembranosa, em um defeito ósseo obtido de um animal controle. Osso compacto (OC) e osso trabecular (OT). Aumento original 20X.

Imagem 06

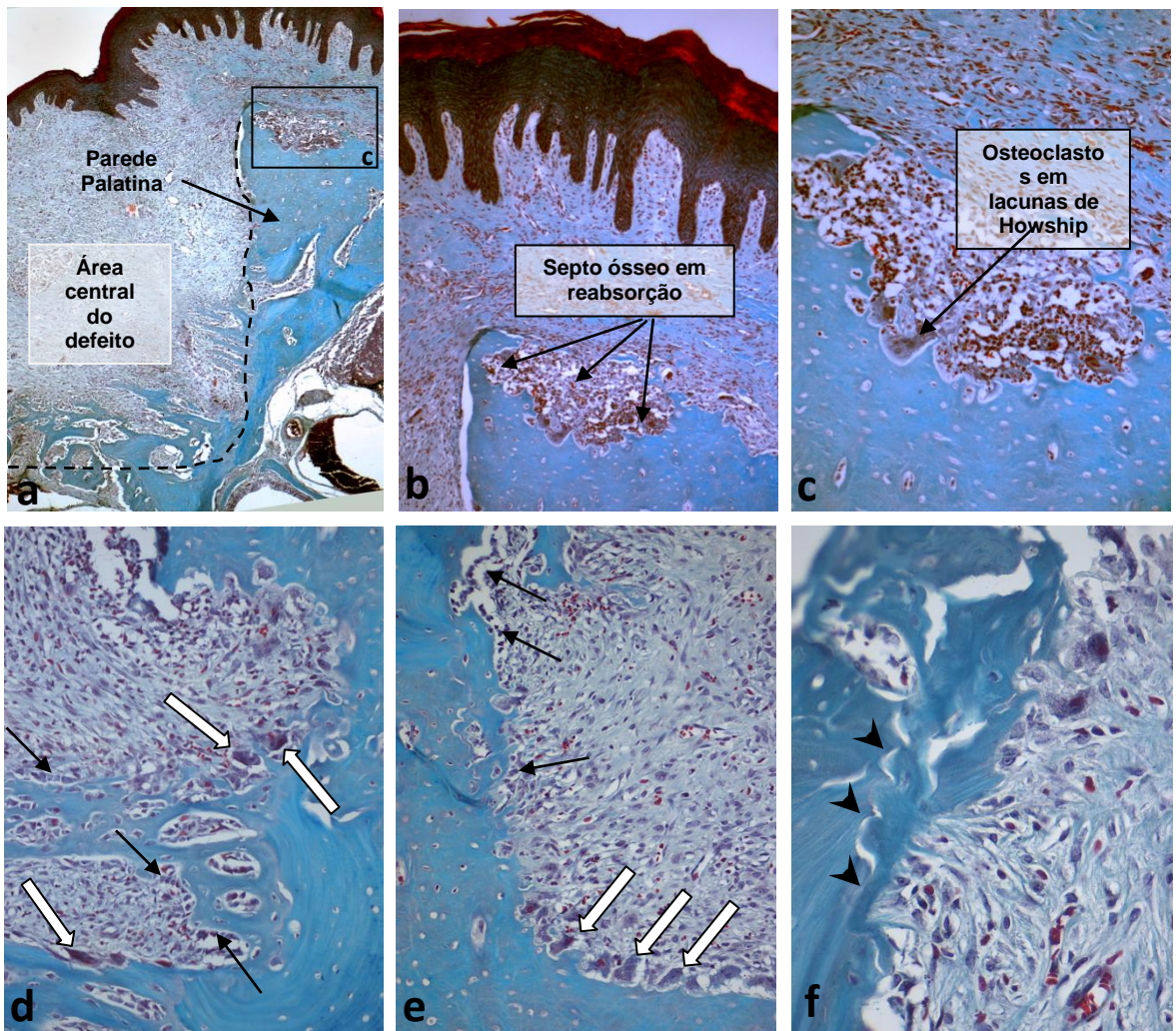


Imagem 06- Fotomicrografias ilustrativas do processo de remodelação óssea evidente no período de 14 dias pós-cirúrgico em ambos os animais, controles e tratados. Tricrômico de Gomori.

a. Visão panorâmica de parte do defeito ósseo de um animal controle. Note na parede palatina do defeito ósseo, uma evidente faixa de reabsorção óssea. Aumento original 4x.

- b. e c. Ampliações da imagem anterior. Observa-se osteoclastos ativos, gerando reentrâncias na superfície do tecido ósseo, conhecidas como lacunas de Howship. Aumento original (b) 10x e (c) 20x.
- d. e e. Aspecto histológico do 1/3 apical do defeito, onde é possível observar nitidamente o processo de remodelação óssea com atividade simultânea de osteoclastos (setas brancas) em processo de reabsorção das paredes ósseas e dos osteoblastos (setas pretas) em processo de síntese ou deposição de matriz óssea. Aumento original 20x.
- f. Contorno do tecido ósseo previamente reabsorvido , “lacunas de Howship” preenchidas por tecido ósseo neoformado (cabeça de setas). Aumento original 40x.

Imagem 07

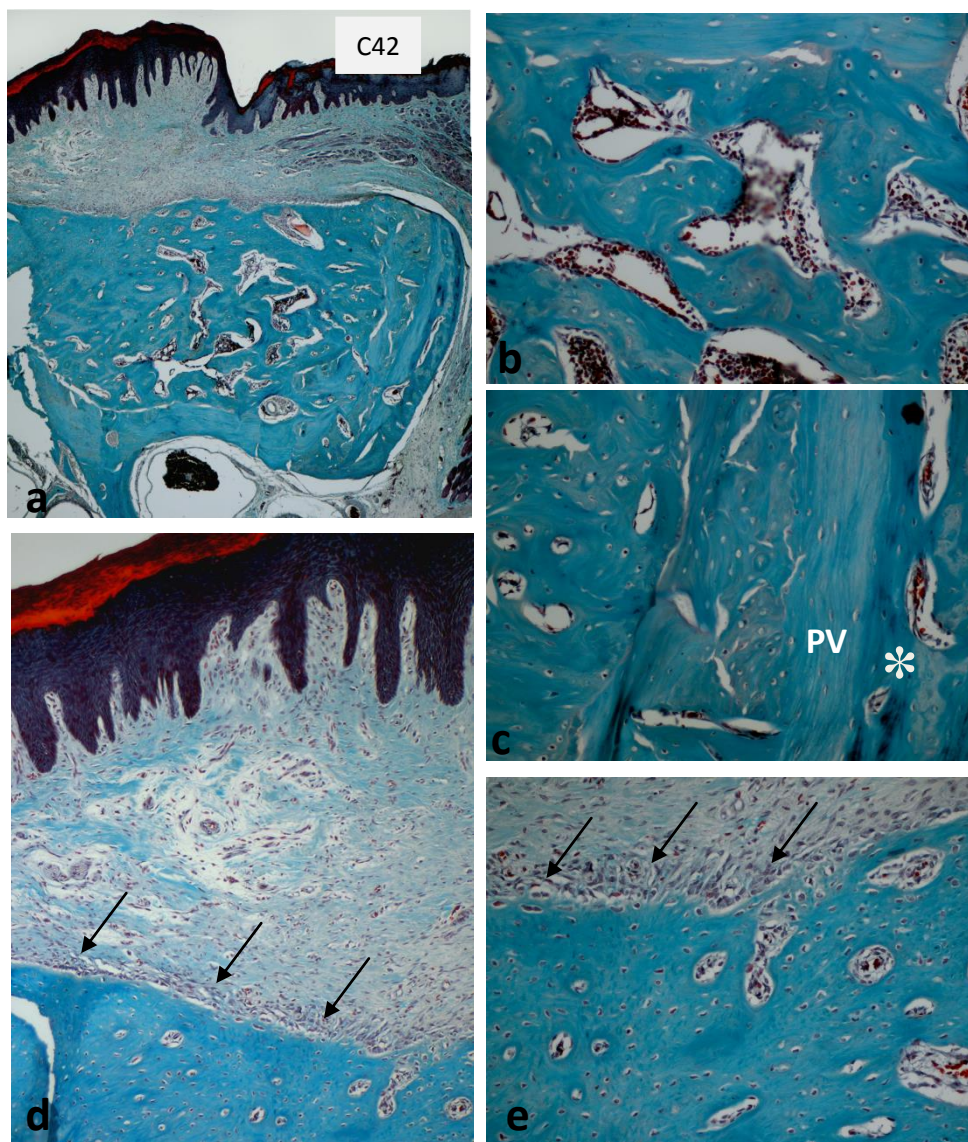


Imagem 07- Fotomicrografias ilustrativas do reparo ósseo de animais controles após 42 dias do procedimento cirúrgico. Tricrômico de Gomori.

a. Visão panorâmica da área do defeito preenchida por tecido ósseo. com poucos espaços medulares na área central. Aumento original 4x.

b. Trabéculas ósseas espessas e fusionadas; ainda com osteócitos irregulares demonstrando ainda o aspecto imaturo do tecido ósseo. Aumento original 20x.

c. Aspecto histológico do tecido ósseo neoformado junto da parede vestibular (PV) remanescente do defeito. Essa parede apresenta osso lamelar organizado em camadas paralelas. O tecido ósseo depositado junto às paredes do defeito apresentam aspecto mais compacto e menos trabecular. A deposição de tecido ósseo externamente à área do defeito (*) foi um achado comum em todas as amostras. Aumento original 20x.

d. Ampliação da área de mucosa oral. Observa-se epitélio estratificado queratinizado totalmente fechado, lâmina própria com tecido conjuntivo de aspecto histológico normal e borda superficial do osso neoformado com células osteogênicas (setas) ainda em atividade. Aumento original 10X.

e. Ampliação da borda superficial do defeito ósseo, com células osteogênicas (setas) em atividade. Aumento original 20x.

Imagem 08

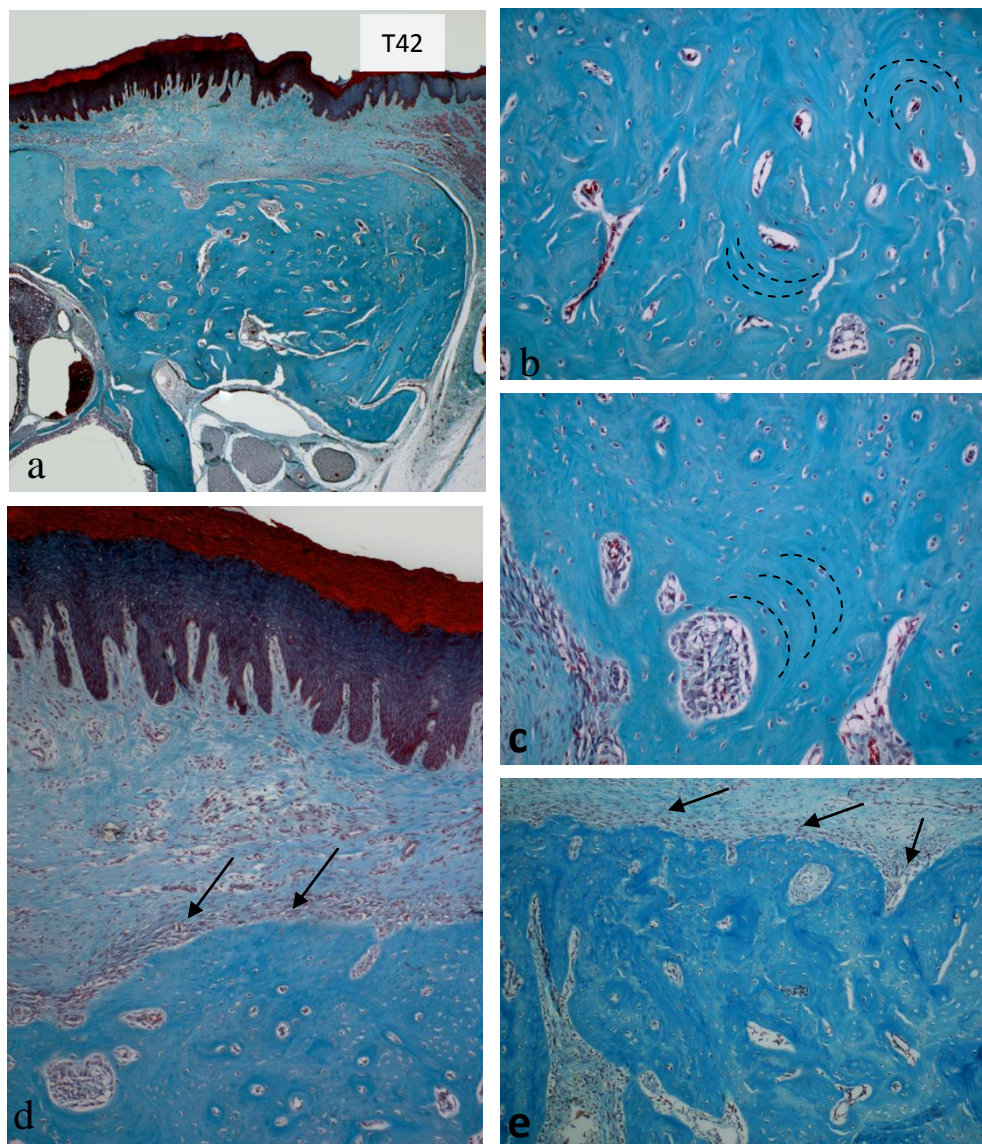


Imagem 08 - Fotomicrografias ilustrativas do reparo ósseo de animais tratados (Tr) com RSr, após 42 dias do procedimento cirúrgico. Tricrômico de Gomori.

a. Visão panorâmica da área do defeito preenchida por tecido ósseo, de aspecto mais compacto com poucos espaços medulares na área central. Aumento original 2x.

- b. Ampliação da área central do defeito. Notar tecido ósseo ainda de aspecto imaturo, poucos espaços medulares. Alguns osteócitos esboçam a organização em sistema de Havers (linha tracejada). Aumento original 20x.
- c. Aspecto histológico do tecido ósseo neoformado com poucos sinais de organização de osteócitos e lamelas circulares (linhas tracejadas) ao redor de espaços medulares. Aumento original 20x.
- d. Ampliação da área de mucosa oral. Observa-se epitélio estratificado queratinizado totalmente fechado, lâmina própria com tecido conjuntivo de aspecto histológico normal e borda superficial do osso neoformado com células osteogênicas (setas) ainda em atividade. Aumento original 10X.
- e. Ampliação da borda superficial do defeito ósseo, com células osteogênicas (setas) em atividade. Aumento original 20x.

11 ANEXOS

Tabela 1. Comparação entre os grupos teste (T14 e T42) e controle (C14 e C42) em relação ao percentual de formação óssea.

Grupos	Percentual de formação óssea			p*
	Média (\pm s.d)	mínimo	máximo	
C14	19.948 \pm 6.876	10.666	26.777	< 0,01**
T14	41.484 \pm 8.648	34.003	54.693	
C42	77.465 \pm 2.580	74.262	80.324	> 0,05***
T42	79.096 \pm 9.089	67.452	90.007	

*Comparações entre grupos (ANOVA com correção de Bonferroni): **C14 vs T14;

***C42 vs T42.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 303 / 2013, relativo ao projeto intitulado “Avaliação do ranelato de estrôncio no reparo de defeitos ósseos intrabucais em ratos”, que tem como responsável Luís Otávio de Miranda Cota, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/02/2014. Este certificado espira-se em 11/02/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 303 / 2013, related to the Project entitled “Evaluation of strontium ranelate in intrabucal bone defect repair in rats”, under the supervision of Luís Otávio de Miranda Cota, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/02/2014. This certificate expires in 11/02/2019.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 11/02/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br