



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba



**Breno dos Reis Fernandes**

**Análise microtomográfica e imunoistoquímica do osso peri-  
implantar em dimorfismo sexual com implantes funcionalizados  
com estrôncio**

Araçatuba  
2020



**Breno dos Reis Fernandes**

**Análise microtomográfica e imunoistoquímica do osso peri-  
implantar em dimorfismo sexual com implantes funcionalizados  
com estrôncio**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FOA - UNESP, para a obtenção do título de em “Mestre em Odontologia” – Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador:  
Profa. Dra. Roberta Okamoto  
Coorientador:  
Prof. Associado Paulo Noronha Lisboa Filho

Araçatuba

2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F363a

Fernandes, Breno dos Reis.  
Análise microtomográfica e imunoistoquímica do osso peri-implantar em dimorfismo sexual com implantes funcionalizados com estrôncio / Breno dos Reis Fernandes. – Araçatuba, 2020  
55 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Osteoporose 2. Osseointegração 3. Estrôncio  
4. Interface osso-implante I T.

Black D7  
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550



Fernandes BDR. Análise microtomográfica e imunoistoquímica do osso peri-implantar em dimorfismo sexual com implantes funcionalizados com estrôncio [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

## RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo caracterizar a influência de esteróides gonadais e o dimorfismo sexual na microarquitetura do tecido ósseo formado ao redor de implantes funcionalizados por estrôncio e instalados na tíbia de ratos e ratas que foram divididos em 4 grupos experimentais. Os grupos SHAM F e SHAM M foram os grupos controle, submetidos a cirurgia fictícia, nas fêmeas e machos. O grupo OVX foram as fêmeas submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral e os ORQ foram os machos submetidos à orquiectomia. Após 30 dias das cirurgias para remoção das gônadas ou cirurgias fictícias, os animais foram submetidos à instalação dos implantes nas tíbias, cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. A eutanásia foi realizada aos 60 dias após a instalação dos implantes. Os ossos tibiais foram coletados e processados laboratorialmente para a análise tridimensional através da avaliação microtomográfica (Micro-Ct), também foi realizada uma análise imunoistoquímica, com objetivo de analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea, remodelação e mineralização. Concluiu-se que a funcionalização com estrôncio na superfície dos implantes interferiu no processo de reparo perimplantar, resultando em tecido ósseo com diferentes características microarquiteturais, de acordo com o gênero.

**Palavras-chave:** Osteoporose. Osseointegração. Estrôncio. Interface osso implante.

Fernandes BDR. Microtomographic and immunohistochemical analysis of peri-implant bone in sexual dimorphism with strontium functionalized implants. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

## **ABSTRACT**

The present work aims to characterize the influence of gonadal steroids and sexual dimorphism on the microarchitecture of bone tissue formed around strontium functionalized implants and installed in the tibia of rats and mice that were divided into 4 experimental groups. The SHAM F and SHAM M groups were the control groups, applying the fictitious surgery, in the latter and males. The OVX group were as submitted to bilateral ovariectomy surgery and the ORQ were the males related to the orchiectomy. After 30 days of surgery to remove the gonads or fictitious surgeries, the animals were infected by installing the implants in the tibiae, each animal completes 2 implants, 1 in each tibial metaphysis. Euthanasia performed 60 days after the implant installation. Tibial bones were collected and processed in the laboratory for a three-dimensional analysis through microtomographic evaluation (Micro-Ct), an immunohistochemical analysis was also carried out, with the objective of analyzing cellular responses regarding the process of bone resorption, remodeling and mineralization. It was concluded that strontium functionalization on the surface of the implants interfered in the process of perimplant repair, termination in bone tissue with different microarchitectural characteristics, according to gender.

**Keywords:** Osteoporosis. Osseointegration. Strontium. Bone implant interface.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho experimental do estudo.....	21
Figura 2 - (a): tricotomia na metáfise tibial e antissepsia com polivinilpirrolidona; (b-c): acesso e exposição da metáfise tibial; (d): leito receptor do implante; (e): Implante de titânio .....	24
Figura 3 - Porcentagem de volume ósseo (BV/TV) entre os grupos .....	29
Figura 4 - Número de trabécula entre os grupos .....	30
Figura 5 - Superfície de interseção óssea, entre os grupos .....	31
Figura 6 - Espessura de trabécula entre os grupos .....	32
Figura 7 - Espaço das trabéculas entre os grupos.....	33
Figura 8 - Porosidade total entre os grupos. ....	34
Figura 9 - Imunomarcacão para proteína WNT. ....	35
Figura 10 - Imunomarcacão para proteína OCN. ....	36
Figura 11 - Imunomarcacão para proteína OPG. ....	37
Figura 12 - Imunomarcacão para proteína RANKL.....	38
Figura 13 - Imunomarcacão para proteína TRAP. ....	39

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais referente a avaliação periimplantar mediante as análises por micro ct e imunohistoquímica. ....	21
--	----



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

LbL	Layer by Layer	LayerbyLayer
MicroCt	Microtomografica	Microtomographic
ORQ	Orquiectomia	Orchiectomy
OVX	Ovariectomia	Ovariectomy
SHAM	Grupo Controle	Control group
Sr	Estrôncio	Strontium
OPG	Osteoprotegerina	Osteoprotegerin

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
2 PROPOSIÇÃO .....	18
3 MATERIAL E MÉTODO .....	20
3.1 Desenho Experimental .....	20
3.1.1 Preparação do espécime .....	20
3.2 Procedimento cirúrgico .....	22
3.2.1 Orquiectomia bilateral .....	22
3.2.2 <i>Ovariectomia bilateral</i> .....	22
3.2.3 Tratamento Medicamentoso com Sr na superfície dos implantes .....	23
3.2.4 <i>Cirurgia para Instalação dos implantes</i> .....	23
3.2.5 <i>Eutanásia e coleta das amostras</i> .....	25
3.3 Avaliação microtomográfica (Micro-Ct).....	25
3.4 Avaliação Imunoistoquímica .....	26
3.5 Análise estatística .....	27
4 RESULTADO.....	30
4.1 Porcentagem de volume ósseo (BV/TV) .....	30
4.2 Número de trabécula (Tb.N) .....	31
4.3 Superfície de interseção óssea (IS) .....	32
4.4 Espessura de trabécula (Tb.Th) .....	32
4.5 Espaço das trabéculas (Tb.S) .....	33
4.6 Porosidade óssea (Po) .....	34
5 (IMUNOISTOQUÍMICA).....	35
5.1 Wnt.....	36
5.2 Osteocalcina .....	37
5.3 Osteoprotegerina .....	37
5.4 RANKL .....	38
5.5 TRAP .....	39
6 DISCUSSÃO .....	42
7 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS .....	48
ANEXOS.....	52

# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica multifatorial, caracterizada pela perda óssea progressiva, acarretada pelo processo de desequilíbrio da atividade de remodelação óssea, como consequência observa-se deterioração da microarquitetura óssea decorrendo em fraturas locais como o fêmur, rádio e coluna lombar e essas fraturas estão freqüentemente associadas ao aumento da morbidade e mortalidade [1]. Embora a maioria das pesquisas sobre osteoporose no passado tenha se concentrado nas mulheres, a osteoporose também está se tornando um problema cada vez mais importante nos homens. Um em cada oito homens com mais de 50 anos terá uma fratura relacionada com a osteoporose [2], e prevê-se que este número aumente com uma população masculina em envelhecimento [3]. Embora as fraturas por fragilidade nos homens ocorram em média 10 anos mais tarde em comparação com as das mulheres, a maioria das fraturas clínicas resultam em maior morbidade e mortalidade [4].

A perda óssea relacionada à idade geralmente ocorre em homens com mais de 70 anos devido a uma combinação de deficiências nutricionais e hormonais, a diminuição da absorção intestinal de cálcio e a alta prevalência de insuficiência e deficiência de vitamina D, observada em homens idosos, contribuem para níveis séricos elevados de hormônio paratireoide (PTH) e perda óssea [5,6]. Os níveis de testosterona e estradiol livres ou biodisponíveis diminuem com a idade devido ao aumento dos níveis séricos de globulina de ligação a hormônios sexuais (SHBG) e à falha do eixo hipotálamo-hipófise-testicular para compensar, embora evidências cumulativas apoiem um papel dominante do estrogênio na manutenção da massa óssea em homens, a testosterona também contribui [7]. Por outro lado, 85% dos casos de osteoporose secundária em homens são explicados pelo uso de glicocorticóides, hipogonadismo e ingestão excessiva de álcool, esses fatores estão presentes na maioria dos homens mais jovens com osteoporose e podem estar superpostos à osteoporose primária [8].

O ranelato de estrôncio é um fármaco desenvolvido para o tratamento da osteoporose que consiste em dois átomos de Sr estáveis associada à uma porção orgânica <sup>1</sup>(ácido ranélico). Sua atuação consiste em estimular a neoformação óssea e suprimir a reabsorção óssea [9,10]. Com relação ao seu mecanismo de ação, ainda existem dúvidas [11]. Hurler et al. [12], acredita que o medicamento atua através da ativação do receptor sensível de cálcio e ocasiona aumento da OPG (osteoprotegerina) e diminuição do RANKL. Acredita-se que ocorra desacoplamento do processo de remodelação óssea agindo positivamente na arquitetura e força do osso. Foram observados em alguns estudos experimentais que o ranelato de estrôncio preveniu perda óssea em ratas ovariectomizadas, aumentou a massa óssea em animais osteopênicos e a resistência óssea em animais normais [13,14]. A aplicação do estrôncio também poderia ser uma opção para o tratamento da osteoporose a fim de reduzir o risco de fraturas vertebrais e não vertebrais. Ao contrário de outros medicamentos utilizados na terapia da osteoporose, o estrôncio mostra um duplo efeito no metabolismo ósseo, atenuando a reabsorção celular e melhorando simultaneamente a formação de novos tecidos ósseos [15].

Recentemente, o ranelato de estrôncio administrado como fármaco anti-osteoporose foi retirado do mercado brasileiro, em função de uma série de alterações adversas na função cardiovascular dos pacientes [16]. No entanto, seus efeitos benéficos sobre o metabolismo do tecido ósseo são incontestáveis. Uma vez que este fármaco apresenta um efeito local sobre as células ósseas, atuando positivamente sobre a atividade osteoblástica e negativamente sobre a atividade osteoclástica, uma possível aplicação pode ser realizada de forma local, estimulando o efeito direto do fármaco sobre o tecido ósseo [17].

Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a microarquitetura do tecido ósseo perimplantar na presença do estrôncio, utilizado localmente na superfície dos implantes, avaliando as interferências dos esteroides gonadais sobre estas respostas.

---

<sup>1</sup> A norma utilizada foi da [Clinical Oral Investigations](#) (Anexo B)



**PROPOSIÇÃO**

## **2 PROPOSIÇÃO**

O presente trabalho tem por objetivo caracterizar a influência de esteroides gonadais e do dimorfismo sexual na microarquitetura do tecido ósseo formado ao redor de implantes funcionalizados por estrôncio e instalados na tíbia de ratos e ratas.



# **MATERIAL E MÉTODO**

## **3 MATERIAL E MÉTODO**

### **3.1 Desenho Experimental**

#### *3.1.1 Preparação do espécime*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (00335-2018) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP). Um total de 24 ratos randomizados sendo 12 fêmeas adultas e 12 machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), de três meses de idade, pesando aproximadamente 250g foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas, ambiente climatizado, alimentados com ração seca balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) e água ad libitum até a eutanásia (Fig.1)

Os animais foram divididos em 4 grupos (SHAM F, OVX, SHAM M, ORQ), sendo que 12 ratas foram divididas em 2 grupos, sendo 6 ratas para o grupo SHAM F = submetidas à cirurgia fictícia e receberão implantes funcionalizados com estrôncio; 6 ratas para o grupo OVX = submetidas à ovariectomia bilateral e receberam implantes funcionalizados com estrôncio, e 12 ratos foram divididos em 2 grupos, sendo 6 ratos para o grupo SHAM M = submetidos à cirurgia fictícia e receberam implantes funcionalizados com estrôncio; 6 ratos para o grupo ORQ = submetidos à orquiectomia bilateral e receberam implantes funcionalizados com estrôncio (TABELA 1). Na sequência cronológica o dia 0 faz referência ao dia das cirurgias de ovariectomia nas fêmeas e orquiectomia nos machos e cirurgias fictícias. Após 30 dias os animais foram submetidos à instalação dos implantes nas tíbias, cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. A eutanásia foi realizada aos 60 dias após a instalação dos implantes, os animais foram eutanasiados por meio de dose letal de anestésico (150 mg/kg; Tiopental Cristália Ltda.; Itapira, SP).

**Tabela 1** Distribuição dos grupos experimentais referente a avaliação periimplantar mediante as análises por micro ct e imunohistoquímica, cada animal recebeu 2 implantes, um em cada metáfise tibial, o material foi randomizado para posterior análises

**Avaliação Periimplantar**

	NÚMERO DE ANIMAIS	NÚMERO DE IMPLANTES
SHAM M	6	12
SHAM F	6	12
ORQ	6	12
OVX	6	12

Número de animais: 24  
Número de implantes: 48



**Fig.1** Desenho experimental do estudo

## **3.2 Procedimento cirúrgico**

### *3.2.1 Orquiectomia bilateral*

Os ratos dos grupos orquiectomizados (ORQ) foram anestesiados com 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e posteriormente foram imobilizados em posição decúbito dorsal sobre prancha cirúrgica. Foi realizado uma incisão mediana anterior no escroto, abertura da túnica vaginal e exteriorização dos testículos. Em seguida, os funículos espermáticos foram ligados com fio de (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) e seccionados. Os testículos e os epidídimos foram removidos e o escroto suturado com fio de Poliglactina 910 4.0. Os ratos do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos testículos e dos epidídimos sem suas respectivas remoções.

### *3.2.2 Ovariectomia bilateral*

As ratas dos grupos ovariectomizados (OVX) foram anestesiadas com 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e imobilizadas sob prancha cirúrgica onde foi realizado uma incisão de 1cm nos flancos e divulsão por planos do tecido subcutâneo e do peritônio afim acessar à cavidade abdominal. Em seguida foi localizado e laqueado os ovários e os cornos uterinos com fio de Poliglactina 910 4.0 para remoção dos ovários. Por fim, foi feita a sutura por planos com fio de Poliglactina 910 4.0. As ratas do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, porém, foi realizado apenas a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção, com intuito de submeter os animais deste grupo ao mesmo estresse cirúrgico dos demais grupos.

### *3.2.3 Tratamento Medicamentoso com Sr (estrôncio) na superfície dos implantes*

A administração de estrôncio local foi realizada a partir de materiais desenvolvidos no Grupo de Materiais Avançados da Faculdade de Ciências de Bauru/UNESP, sob a coordenação do Prof. Paulo Noronha Lisboa Filho e associado à Divisão de Saúde do Centro para o Desenvolvimento de Materiais Funcionais (CDMF)/CEPID/FAPESP. A realização da administração do medicamento foi feita a partir de implantes que tiveram a sua superfície funcionalizada com Estrôncio pela técnica de deposição por LayerbyLayer(LbL), que consiste na imersão de um substrato sólido (geralmente com certo desequilíbrio de cargas em sua superfície) por um determinado intervalo de tempo numa solução aquosa contendo o material a ser depositado (18). A técnica LbL tem como vantagens a simplicidade dos materiais envolvidos para a formação de multicamadas, o substrato pode ser de qualquer geometria e o solvente comumente empregado é a água.

### *3.2.4 Cirurgia para Instalação dos implantes*

Após 30 dias dos procedimentos cirúrgicos iniciais os animais foram submetidos à instalação dos implantes nas tíbias. Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda Osasco, São Paulo, Brasil) e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e hemostasia do campo operatório.

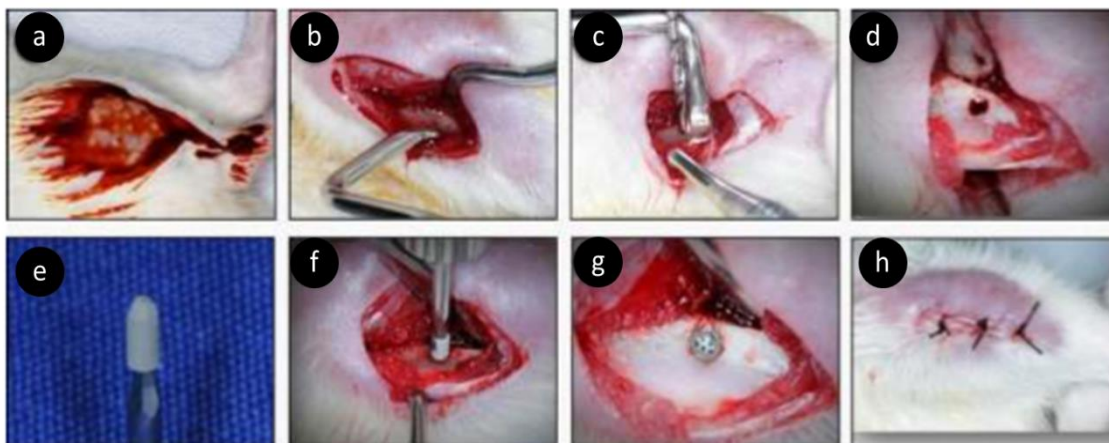
Após a sedação dos animais foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, antissepsia da região a ser incisada, com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico. Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) realizou-se uma incisão de

aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial e o tecido mole foi divulsionado em espessura total, afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes.

Foram instalados 48 implantes de titânio comercialmente puro grau IV com superfície tratada por duplo ataque ácido (ácidos nítrico, fluorídrico e sulfúrico), com diâmetro de 2x4 mm esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,3mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação abundante com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0mm, com travamento e estabilidade inicial.

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. A sutura dos tecidos foi em planos utilizando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais superficial (Figura 2).

Cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) no pós-operatório imediato. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água ad libitum.



**Fig. 2** (a): tricotomia na metáfise tibial e antissepsia com polivinilpirrolidona; (b-c): acesso e exposição da metáfise tibial; (d): leito receptor do implante; (e): Implante de titânio com superfície tratada por duplo ataque ácido; (f): Instalação do implante com chave digital; (g) implante em posição (h): sutura por planos

### 3.2.5 Eutanásia e coleta das amostras

Os animais foram eutanasiados por meio de dose letal de anestésico (150 mg/kg; Tiopental Cristália Ltda.; Itapira, SP). Posteriormente as tíbias foram removidas e de forma randomizadas encaminhadas para posterior análises de micro ct ou imunohistoquímica.

## 3.3 Avaliação microtomográfica (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional, nos animais pertencentes ao processamento para tecidos calcificados, após a eutanásia dos mesmos aos 60 dias após a instalação dos implantes, as amostras foram removidas, reduzidas e armazenadas em álcool 70%, foram primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo computadorizado (SkyScan 1176 BrukerMicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9  $\mu\text{m}$  de espessura (50Kv e 500 $\mu$ ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para

todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003- 11SkyScan, 2012 BrukerMicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida uma área ao redor do implante (ROI) delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante e, em toda a extensão. Esta área foi definida como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- ROI 4,5mm x 3,2mm) (figura 6A e 6B). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise será de 25-90 tons de cinza, que possibilitará a obtenção do volume de osso formado ao redor dos implantes. Também foram avaliados parâmetros que caracterizam o trabeculado ósseo, como porcentagem de volume ósseo (BV/TV), superfície de interseção óssea (IS), porosidade óssea (Po), espessura do trabeculado ósseo (Tb.th), número (Tb. N) e separação (Tb. S) entre as trabéculas ósseas. Vale destacar que as imagens obtidas a partir da microtomografia computadorizada também foram utilizadas para caracterizar a densidade óssea mineral em cada um dos grupos experimentais, utilizando o software CTAnalyser.

### **3.4 Avaliação Imunoistoquímica**

As tíbias dos animais eutanasiados foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas em xilol. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberam cortes de 6 µm de espessura, para serem montadas em lâminas histológicas.

Após a descalcificação dos tecidos peri-implantares, e confecção das lâminas histológicas que estavam incluídas em parafina, para as reações de imunoistoquímica a atividade da peroxidase endógena será inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passarão pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0).



Os anticorpos primários a serem utilizados serão contra fosfatase resistente ao tartarado (TRAP), osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear kapa B ligante (RANKL), osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL) e mineralização (osteocalcina). Tendo em vista que o estrôncio é descrito na literatura por apresentar efeito na via Wnt, utilizaremos também anticorpos que marcam esta via (Beta catenina/Wnt), para avaliarmos se essa medicação interfere na produção dessas proteínas durante a reparo ósseo ao redor dos implantes. Após a incubação do anticorpo primário, será utilizado o polímero universal imunoperoxidase para secções de ratos, contra anticorpos policlonais produzidos em cabra (Histofine, Nichirei, Chuo-ku, Tokyo, Japão). O cromógeno a ser utilizado é a diaminobenzidina (Dako). Para cada um dos anticorpos utilizados, será avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo perimplantar. A análise será realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representarão: ausência de marcação (0); marcação leve (1), marcação moderada (2) e marcação intensa (3), sendo consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos.

### **3.5 Análise estatística**

Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade e homocedasticidade (teste Shapiro-Wilk,  $P < 0,05$ ) o qual foi utilizado para avaliar a distribuição das amostras, que foram paramétricas. Após a confirmação da distribuição normal destas, o teste Anova One Way seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, quando necessário. Os testes foram realizados por meio do programa GraphPad Prism versão 7.01 para Windows. Para todos os dados, um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ) foi considerado significativo.



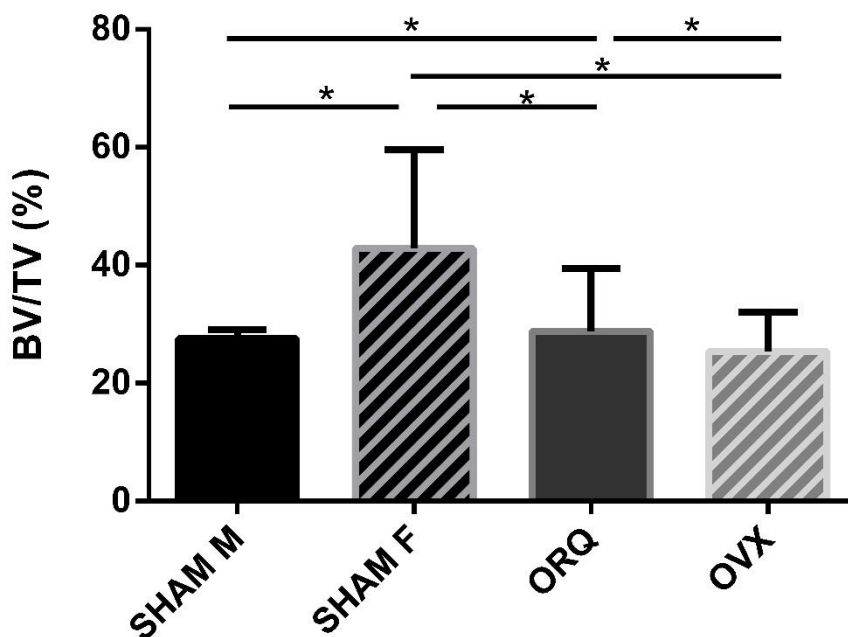
**RESULTADO**

## 4 RESULTADOS

### (MicroCT)

#### 4.1 Porcentagem de volume ósseo (BV/TV)

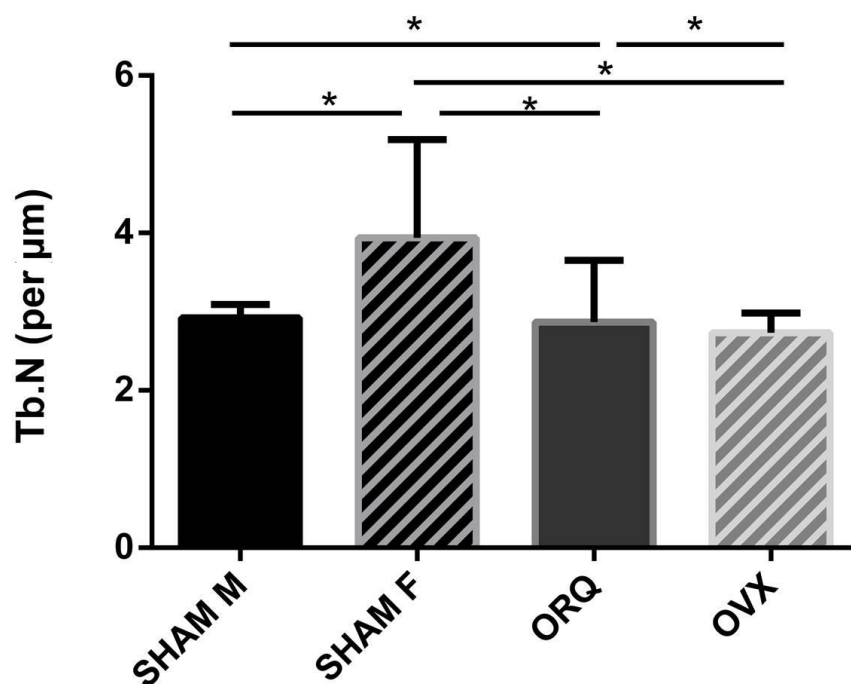
Na comparação entre machos e fêmeas, pode-se observar uma melhora nas características da microarquitetura do osso periimplantar nas fêmeas (média 52,07mm<sup>2</sup>) em relação aos machos (média 27,9 mm<sup>2</sup>), mostrando que a incorporação de estrôncio à superfície do implante levou a uma melhora no percentual de tecido ósseo superior em fêmeas do que em machos. Vale destacar que para este parâmetro, quando na ausência de esteroides gonadais, há uma inversão nos resultados e observamos um melhor desempenho do estrôncio funcionalizante sobre os machos orquiectomizados (média 35 mm<sup>2</sup>) do que nas fêmeas ovariectomizadas (média 27 mm<sup>2</sup>). Foi observada diferença estatística dos valores nos machos orquiectomizados em relação às fêmeas ovariectomizadas (Figura 3).



**Fig. 3** Porcentagem de volume ósseo (BV/TV) entre os grupos SHAM M, SHAM F, ORQ, OVX. Diferença estatística  $p < 0,05$  (\*).

## 4.2 Número de trabécula (Tb.N)

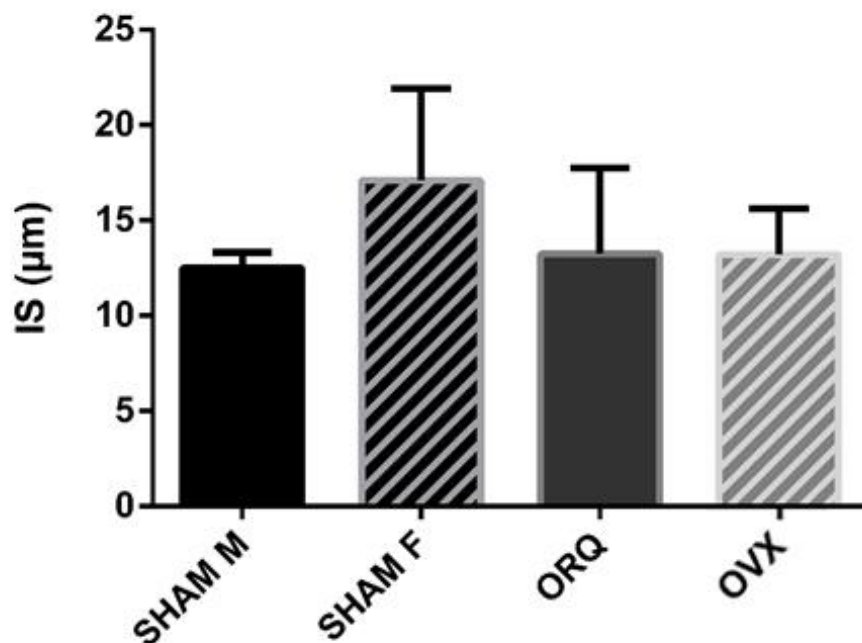
Quanto ao número de trabéculas, o padrão de resposta foi muito semelhante ao percentual de tecido ósseo, mostrando que a melhora observada nas fêmeas (média 4,5 mm) em relação aos machos (média 2,9 mm) bem como dos orquiectomizados (média 3,3 mm) em relação às ovariectomizadas (média 2,8 mm) no parâmetro BV/TV ocorreu em função do aumento do número de trabéculas ósseas (Figura 4).



**Fig. 4** Número de trabécula entre os grupos SHAM M, SHAM F, ORQ, OVX. Diferença estatística  $p < 0,05$  (\*).

### 4.3 Superfície de intersecção óssea (IS)

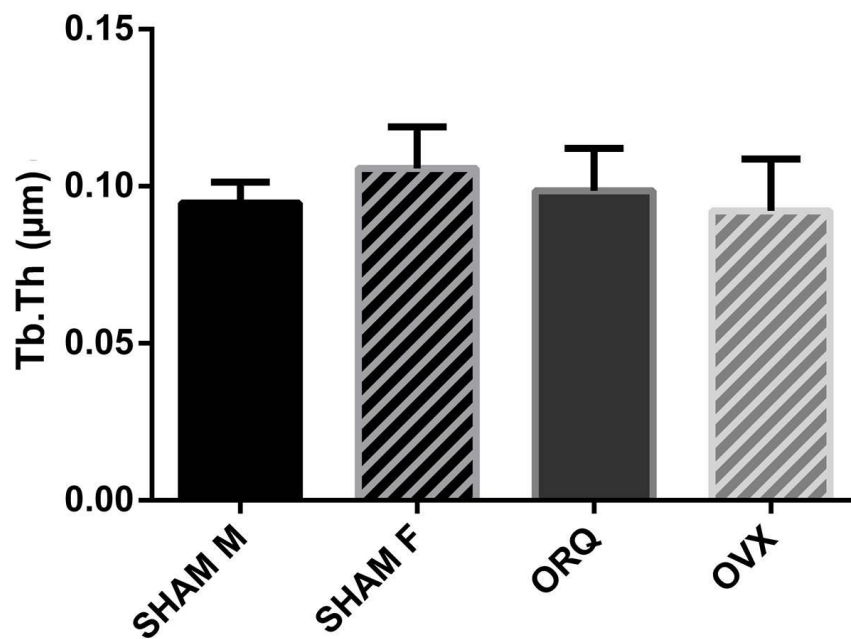
Quanto a superfície de intersecção, apesar de não serem observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, foi possível visualizar maiores valores numéricos para as fêmeas (média 18,98%) em comparação aos machos (média 12,5%) e mais uma vez, uma melhora dos orquiectomizados (média 15%) em comparação às ovariectomizadas (média 14%) (Figura 5).



**Fig. 5** Superfície de intersecção óssea, entre os grupos SHAM M, SHAM F, ORQ, OVX. Não havendo diferença estatística entre os grupos.

### 4.4 Espessura de trabécula (Tb.Th)

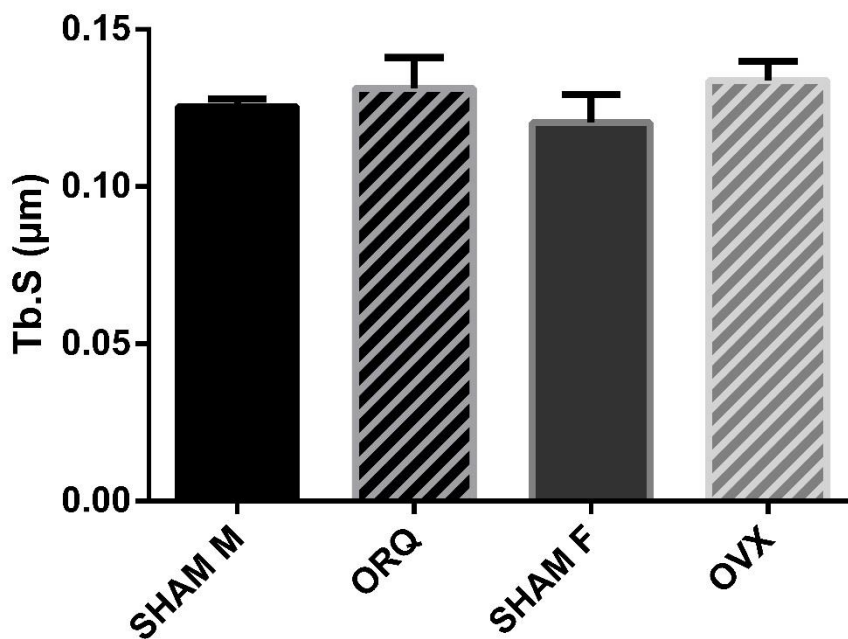
Espessura de trabécula entre os grupos experimentais não mostraram diferenças estatísticas. SHAM M (média 0,09 mm), SHAM F (média 0,11 mm), ORQ (média 0,09 mm), OVX (média 0,08 mm) (Figura 6).



**Fig. 6** Espessura de trabécula entre os grupos SHAM M, SHAM F, ORQ, OVX. Não havendo diferença estatística entre os grupos

#### 4.5 Espaço das trabéculas (Tb.Sp)

Separação entre as trabéculas não se altera entre os grupos, não mostaram diferenças estatísticas. SHAM M (média 0,12 mm), SHAM F (média 0,11 mm), ORQ (0,13 mm), OVX (0,13 mm) (Figura 7).

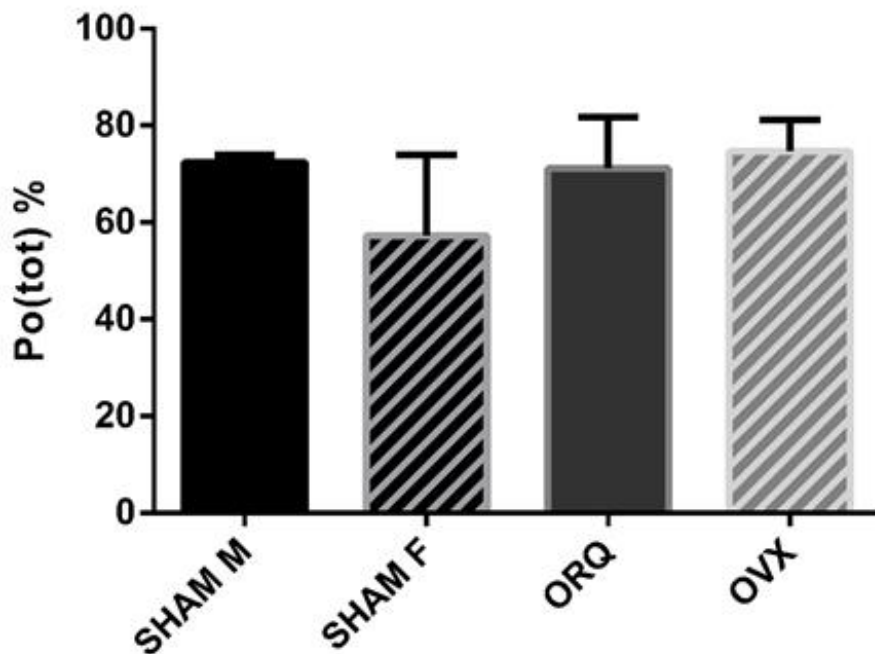


**Fig. 7** Espaço das trabéculas entre os grupos SHAM M, SHAM F, ORQ, OVX. Não havendo diferença estatística entre os grupos

#### 4.6 Porosidade óssea (Po)

A porosidade total mostrou que o tecido ósseo periimplantar nas ratas ovariectomizadas mostrou-se com maiores valores (média 78%), significativamente maior que os demais grupos e em contrapartida, as fêmeas mostraram o menor valor dentre os grupos (média 47,96%). Quanto aos valores da porosidade total, em ordem decrescente, temos a sequência: ovx (OVX média 78%), machos (SHAM M média 72,1%), orq (ORQ média 64,5%), fêmeas (SHAM F médiana 47,96%) (Figura 8)





**Fig. 8** Porosidade total entre os grupos SHAM M, SHAM F, ORQ, OVX. Não havendo diferença estatística entre os grupos

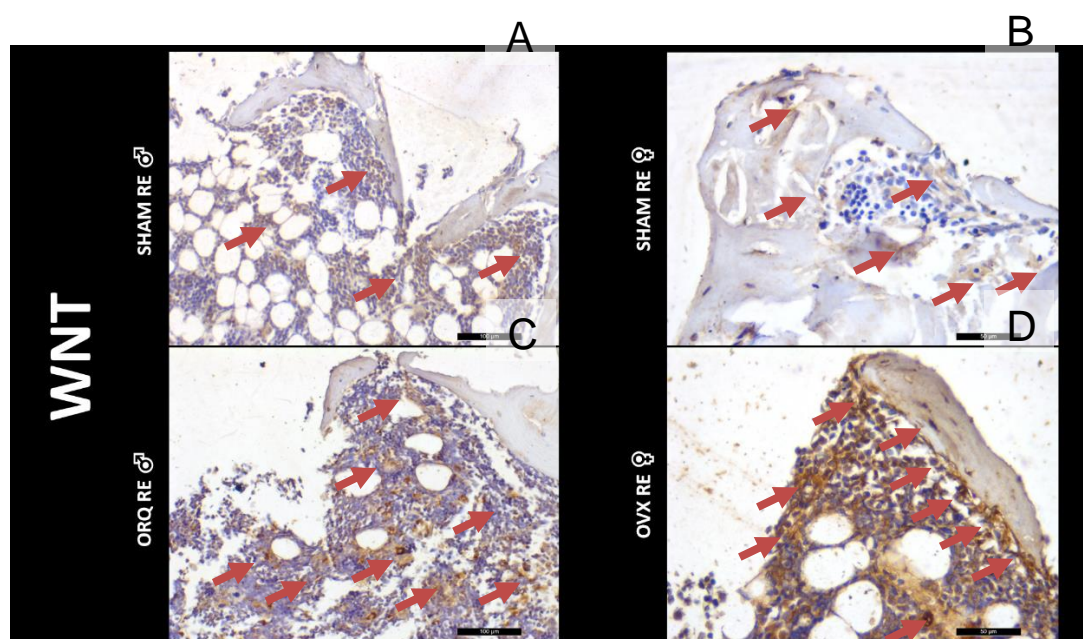
## **5 (IMUNOISTOQUÍMICA)**

Foram avaliadas proteínas da matriz extracelular relacionadas a formação (wnt) (Figura 9) e mineralização óssea (osteocalcina) (Figura 10), bem como os novos membros do fator de necrose tumoral (OPG e RANKL) (Figura 11 e 12) e a proteína trap (Figura 13) a fim de avaliar a reabsorção óssea e a ativação das unidades multicelulares básicas.

As avaliações foram realizadas com o objetivo de caracterizar o tecido ósseo formado junto às espiras do implante, formadas na região medular da tibia. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina que marcou na cor marrom acastanhado as células e a região da matriz mineralizada ou não, onde as proteínas foram detectadas.

## 5.1 Wnt

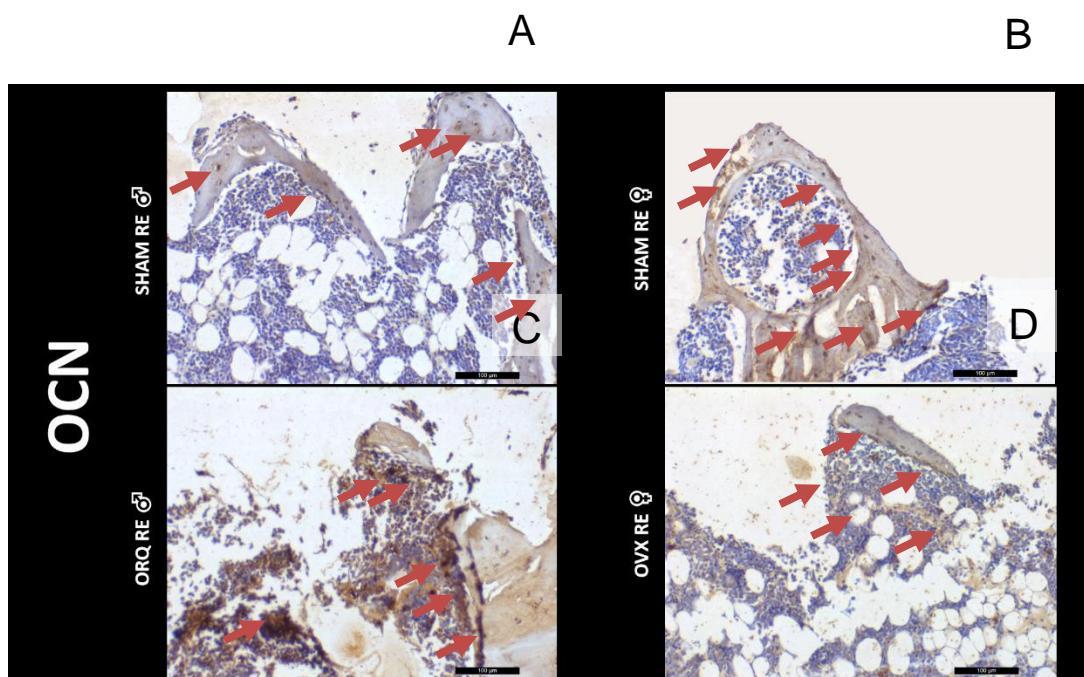
Para a avaliação da proteína Wnt (uma proteína reguladora da remodelação óssea), observou-se no grupo Sham M uma marcação de leve a moderada, presente principalmente nas células da linhagem osteoblástica localizadas na região medular e próximas ao tecido ósseo formado. Já no grupo Sham F, observou-se moderada marcação da Wnt, especialmente em osteócitos. Vale destacar que neste grupo experimental, observa-se uma maior quantidade de tecido ósseo formado junto às espiras do implante, aspecto já bem caracterizado pelas avaliações microtomográficas. Na condição de orquiectomia, observou-se uma marcação moderada para a proteína Wnt, junto às células da linhagem osteoblástica presentes na região medular. Já nas ratas ovariectomizadas, a presença da Wnt mostrou-se de forma moderada a intensa nas células da linhagem osteoblástica da região medular e nas discretas regiões de tecido ósseo neoformado, observou-se a presença da proteína Wnt também em osteócitos. Esta marcação pode estar relacionada ao efeito do estrôncio utilizado na funcionalização dos implantes, considerando-se que seu efeito anabólico sobre o tecido ósseo já foi observado tanto na sua administração sistêmica como local (Figura 9).



**Fig. 9** Imunomarcação para a proteína Wnt nos grupos Sham RE machos (A), Sham RE fêmeas (B), Orq RE (C) e OVX RE (D). As setas indicam as marcações positivas para a proteína avaliada

## 5.2 Osteocalcina

A proteína osteocalcina, marcadora da mineralização do tecido ósseo, apresentou-se marcada de forma moderada nos animais Sham M. Já nas ratas sham F, importante destacar a maior presença de tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes e uma precipitação da osteocalcina de forma intensa, mostrando um estágio mais adiantado no reparo perimplantar. Na orquiectomia, observou-se a presença da proteína osteocalcina precipitada de forma moderada sobre o tecido ósseo formado discretamente junto às espiras do implante bem como importante marcação nas células da linhagem osteoblástica presentes na região medular da tíbia. No grupo OVX, observou-se a presença da osteocalcina de forma leve na pequena área de tecido ósseo neoformado (Figura 10).

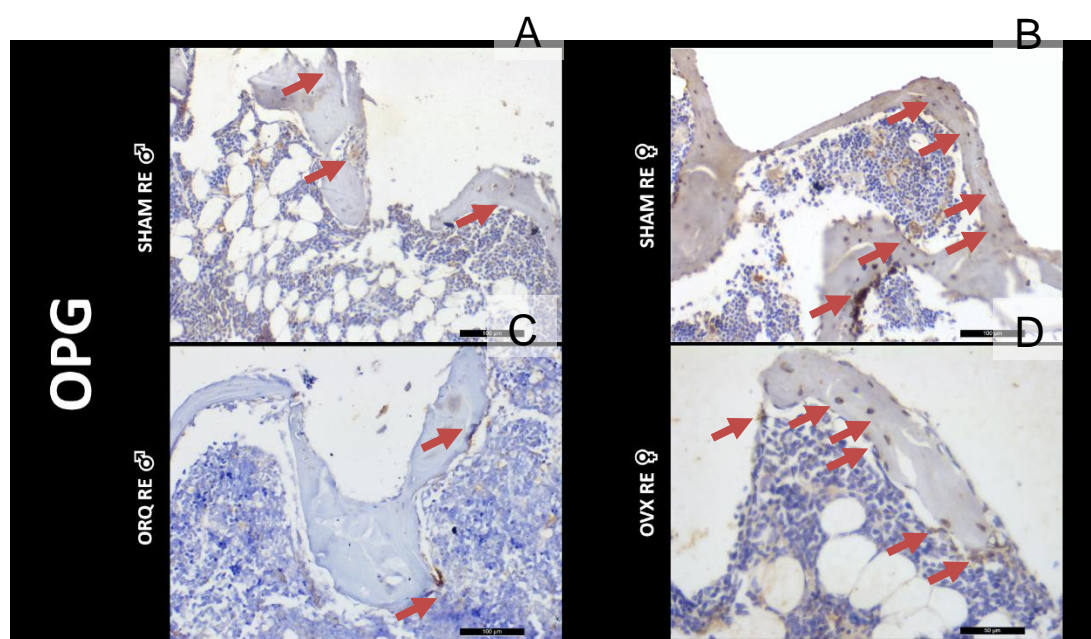


**Fig. 10** Imunomarcagem para a proteína ocn nos grupos Sham RE machos (A), Sham RE fêmeas (B). Orq RE (C) e OVX RE (D). As setas indicam as marcações positivas para a proteína avaliada

## 5.3 Osteoprotegerina

Quanto aos novos membros do Fator de Necrose Tumoral, foi analisada inicialmente a osteoprotegerina, uma proteína produzida por osteoblastos e que

atua como um receptor chamariz para a RANKL, inibindo o seu efeito de ativador da osteoclastogênese. No grupo Sham M, observou-se uma discreta presença da osteoprotegerina nas células da região medular e em alguns osteócitos nas regiões de tecido ósseo neoformado. Já no grupo Sham F, observou-se a presença moderada de osteoprotegerina nos osteócitos presentes no tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes. No grupo ORQ, observou-se também uma discreta marcação para osteoprotegerina, com algumas células marcadas positivamente na região medular da tibia. Já para o grupo OVX, observou-se a presença de forma moderada da osteoprotegerina nos osteócitos localizado nas discretas regiões onde foi observado o tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes (Figura 11).

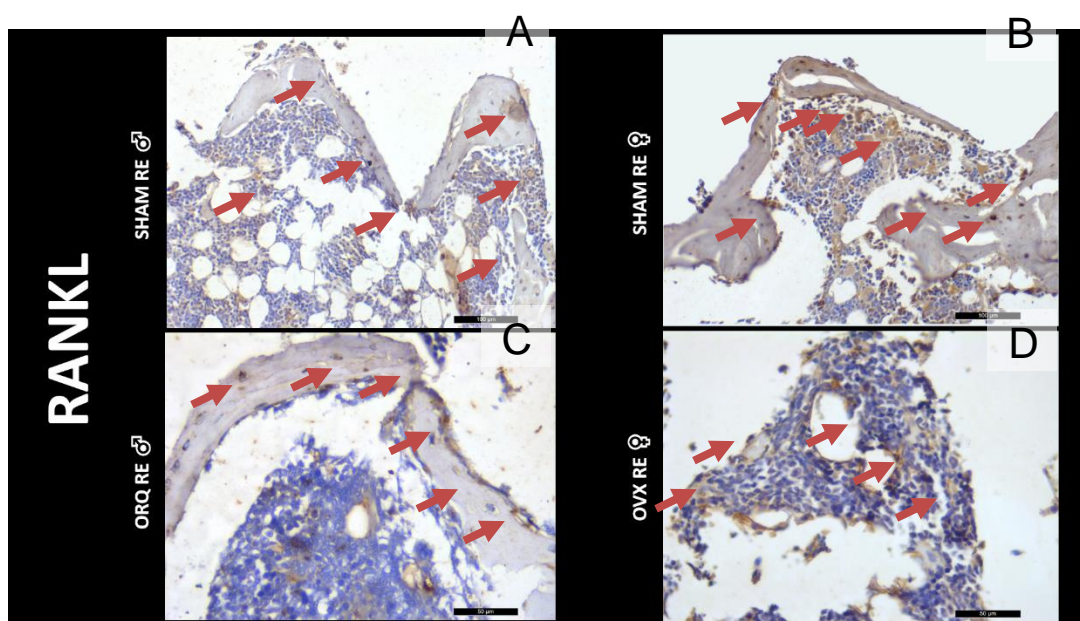


**Fig. 11** Imunomarcacão para a proteína OPG nos grupos Sham RE machos (A), Sham RE fêmeas (B). Orq RE (C) e OVX RE (D). As setas indicam as marcações positivas para a proteína avaliada

## 5.4 RANKL

A proteína RANKL mostrou-se marcada de forma moderada no grupo Sham M, presente tanto em células da linhagem osteoblástica como também em osteócitos. No grupo Sham F, observou-se uma marcação moderada para a RANKL tanto nas células da região medular como também em osteócitos,

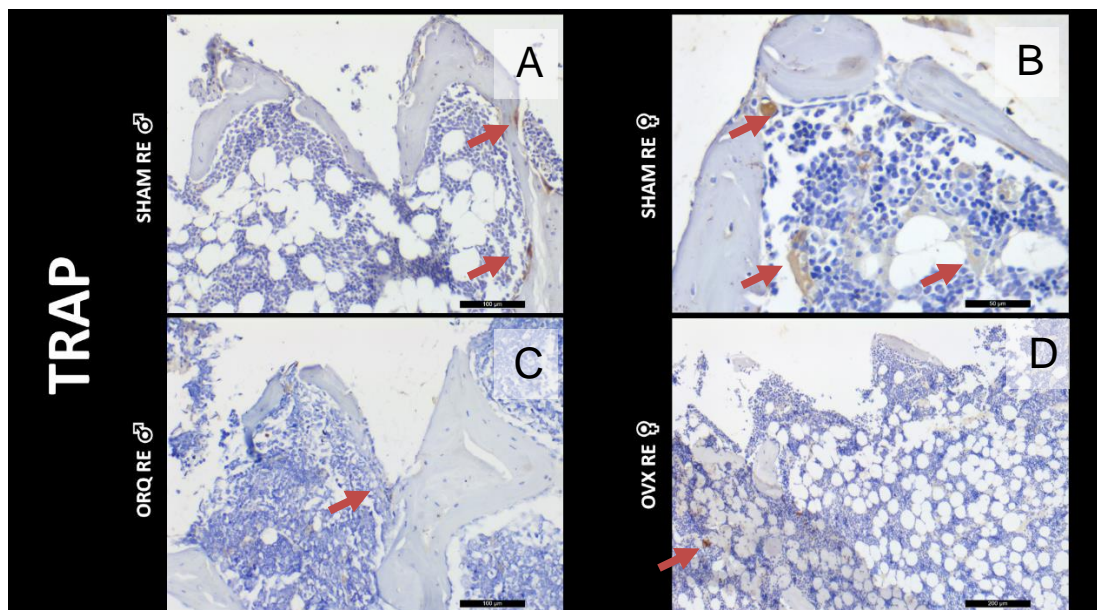
aprisionados no tecido ósseo neoformado. No grupo ORQ, observou-se uma discreta presença de RANKL nos osteócitos e no grupo OVX, notou-se uma presença moderada da RANKL junto às células da linhagem osteoblástica no tecido medular (Figura 12).



**Fig. 12** (A): Imunomarcagem para a proteína RANKL nos grupos Sham RE machos (A), Sham RE fêmeas (B). Orq RE (C) e OVX RE (D). As setas indicam as marcações positivas para a proteína avaliada

## 5.5 TRAP

A trap, que marca osteoclastos em atividade de reabsorção mostrou-se presente de forma discreta nos 4 grupos avaliados. Importante destacar que o tecido estava reativo a esta proteína, uma vez que foram observadas várias marcações de osteoclastos em atividade tanto na região cortical como na região da metáfise tibial. No entanto, junto às espiras dos implantes, o reparo perimplantar caracterizou-se por uma baixa presença da TRAP, muito provavelmente em função do efeito anabólico do estrôncio, incorporado ao implante instalado nos animais experimentais (Figura 13).



**Fig. 13** (A) Imunomarcacão para a proteina TRAP nos grupos Sham RE machos (A), Sham RE fêmeas (B). Orq RE (C) e OVX RE (D). As setas indicam as marcações positivas para a proteina avaliada

## **DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Observamos neste estudo que houve diferenças na resposta do tecido ósseo, em função da funcionalização com estrôncio, para machos e fêmeas, caracterizando o padrão de dimorfismo sexual. Houve uma melhor resposta para as fêmeas SHAM/ quando da interação com o estrôncio funcionalizando os implantes. Essa melhor resposta foi evidenciada pelo aumento no percentual de volume ósseo e número de trabéculas, estatisticamente significativo para o grupo SHAM F em relação aos demais grupos. Importante destacar que os demais grupos estão bastante semelhantes entre si.

Já, com relação às imunomarcações, observou-se uma resposta importante quanto a funcionalização com estrôncio, observada em todos os grupos avaliados, todas as proteínas de formação óssea apresentaram-se bem marcadas em todos os grupos. No entanto, nas ratas SHAM F, em função da maior quantidade de tecido ósseo formado, observa-se maior marcação para as proteínas de formação, também destaca-se a baixa presença de TRAP. Portanto é possível avaliar uma maior marcação de proteínas de formação óssea e menor marcação para proteínas de reabsorção óssea, evidenciando o efeito anabólico do estrôncio funcionalizando o implante em todos os grupos experimentais.

Resultados não publicados do nosso grupo mostram que o estrôncio administrado sistemicamente (anelato de estrôncio) tem um efeito positivo para a resposta de formação óssea. O anelato de estrôncio é um medicamento classificado como anabolizante que atua estimulando a neoformação e suprimindo a reabsorção óssea. Porém, seu uso sistêmico leva a uma pequena alteração nos hábitos intestinais e está associado a um ligeiro aumento do risco tromboembólico, principalmente em pacientes idosos. Por essas razões sua indicação está agora restrita a osteoporose grave em homens e mulheres pós-menopáusicas com alto risco de fratura que não podem ser tratados com outros medicamentos. Devido aos seus efeitos colaterais, o seu uso foi suspenso no Brasil, no qual era comercializado com nome comercial de Protus 2g [16], por esse motivo, os resultados do presente estudo são bastante importantes. Foi uma resposta menos intensa do que o sistêmico, mas sistemicamente ele não pode mais ser



administrado, restando a alternativa de utiliza-lo localmente. E dessa forma, podemos observar um resultado favorável sobre o processo de reparo periimplantar

Durante a menopausa nas mulheres ocorre a deficiência de estrógeno, com consequente desenvolvimento da osteoporose pós-menopausa. Isto ocorre devido ao fato de que, em baixas concentrações, o estrógeno modula negativamente o remodelamento ósseo, causando um aumento na reabsorção óssea osteoclástica. Este processo é decorrente do aumento da concentração plasmática de interleucina 1(IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF  $\alpha$ ) que estimulam a produção de interleucina 6 (IL-6) e fator estimulador de colônias de macrófago (M-CSF) [19]. Essa cascata favorece a ligação entre RANKL e RANK, ativando a osteoclastogênese e a reabsorção óssea.

Sendo assim, o modelo experimental animal OVX (rata submetida à ovariectomia) já está consolidado na literatura, como um indutor osteopênico por meio da deficiência de estrógeno que se estabelece após a remoção dos ovários [20,21]. Em síntese a ovariectomia causa uma deficiência de estrogênio nas ratas, levando a um aumento nas taxas de reabsorção óssea e formação óssea, com a reabsorção excedendo a formação. Como resultado, a reabsorção óssea aumenta em ratas ovariectomizadas. A perda de massa óssea é acompanhada por um aumento significativo da remodelação óssea, conforme indicado por níveis aprimorados dos marcadores de remodelação óssea de fosfatase alcalina e osteocalcina [22].

Ao contrário do que acontece com as mulheres pós-menopausa, a redução da neoformação óssea está relacionada à idade nos homens, combinado a dieta e níveis hormonais deficientes. Isso torna os agentes anabólicos uma opção de tratamento lógica para homens com osteoporose [23]. Antigamente, acreditava-se no baixo risco da osteoporose no gênero masculino, em função dos níveis de testosterona persistirem funcionais até os 70 anos de idade. Por muito tempo, a osteoporose foi considerada uma doença da mulher, porém, atualmente, também está sendo reconhecida como uma preocupação e uma questão de saúde pública para o homem [24].

No homem, a testosterona e o estrógeno são importantes para o ganho e manutenção da massa óssea [25], mas, os níveis livres ou biodisponíveis de testosterona e estradiol diminuem com a idade, devido ao aumento do nível sérico da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e falha de compensação do eixo hipotálamo/hipófise/testículo.

Diante desta problemática, e embasados na literatura científica que corrobora com os resultados deste estudo, devemos atentar para o fato que a osteoporose exerce resultados maléficos em maior quantidade no gênero feminino em relação a qualidade óssea e osseointegração de implantes comparando com gênero masculino, e que implantes funcionalizados com estrôncio apresentaram um melhor resultado no grupo saudável feminino (sem a presença da osteoporose), comparando com o gênero masculino.

Ressaltamos assim a importância de novos estudos para que se possa entender a dinâmica óssea que ocorre na osteoporose e a importância dos materiais utilizados para tratar ou funcionalizar uma superfície de implante, diminuindo dessa forma o índice de aparecimento das osteonecroses dos maxilares e melhorando a osseointegração de implantes dentários. No entanto, os resultados são bastante promissores, inclusive mostrando que as respostas são diferentes, obedecendo um padrão de dimorfismo sexual.

**CONCLUSÃO**

## **7 CONCLUSÃO**

Dentro dos limites deste estudo, é possível concluir que a funcionalização com estrôncio na superfície dos implantes interferiu no processo de reparo perimplantar, resultando em tecido ósseo com diferentes características microarquiteturais e com uma maior ativação de proteínas relacionadas ao processo de formação óssea, de acordo com o gênero e evidenciando um padrão de dimorfismo sexual para as respostas avaliadas.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

1. Harvey N, Dennison E, Cooper C (2010) Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat Rev Rheumatol* 6:99-105. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.260>
2. Cooper C, Melton LJ 3<sup>rd</sup> (1992) Epidemiology of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 3:224-229. [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(92\)90032-v](https://doi.org/10.1016/1043-2760(92)90032-v)
3. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A (2007) Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* 22:465-475. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061113>
4. Bilezikian JP (2017) Primary hyperparathyroidism. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Perreault L, Purnell J, Rebar R, Singer F, Trencze DL, Vinik A, Wilson DP (ed) *Endotext*. MDText.com, South Dartmouth. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905161>. Accessed 26 June 2019
5. Gagnon C, Li V, Ebeling PR (2008) Osteoporosis in men: its pathophysiology and the role of teriparatide in its treatment *Clin Interv Aging* 3:635-645. <https://doi.org/10.2147/cia.s3372>
6. Montero-Odasso M, Duque G (2005) Vitamin D in the aging musculoskeletal system: an authentic strength preserving hormone. *Mol Aspects Med* 26:203-219. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.01.005>
7. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S (2000) Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 106:1553-1560. <https://doi.org/10.1172/JCI10942>
8. Orwoll ES, Belknap JK, Klein RF (2001) Gender specificity in the genetic determinants of peak bone mass. *J Bone Miner Res* 16:1962-1971. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.11.1962>
9. Brennan T, Rybchyn M, Green W, Atwa S, Conigrave A, Mason R (2009) Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Br J Pharmacol* 157:1291-1300. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00305.x>

10. Marie PJ, Ammann P, Boivin G, Rey C (2001) Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int* 69:121-129.
11. Marie PJ (2006) Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Curr Opin Rheumatol* 18:S11-S15. <https://doi.org/10.1097/01.bor.0000229522.89546.7b>
12. Hurtel-Lemaire AS, Mentaverri R, Caudrillier A, Cournarie F, Wattel A, Kamel S, Terwilliger EF, Brown EM, Brazier M (2009) The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis: new insights into the associated signaling pathways. *J Biol Chem* 284:575-584. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801668200>
13. Grynepas M, Marie P (1990) Effects of low doses of strontium on bone quality and quantity in rats. *Bone* 11:313-319. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(90\)90086-e](https://doi.org/10.1016/8756-3282(90)90086-e)
14. Marie PJ, Hott M, Modrowski D, De Pollak C, Guillemain J, Deloffre P, Tsouderos Y (2005) An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner Res* 20:1065-1074. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2005.20.6.1065>
15. Aimaiti A, Wahafu T, Keremu A, Yicheng L, Li C (2019) Strontium ameliorates glucocorticoid inhibition of osteogenesis via the ERK signaling pathway. *Biol Trace Elem Res*. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-02009-6>
16. Tarantino U, Iolascon G, Cianferotti L, Masi L, Marcucci G, Giusti F, Marini F, Parri S, Feola M, Rao C, Piccirilli E, Zanetti EB, Cittadini N, Alvaro R, Moretti A, Calafiore D, Toro G, Gimigliano F, Resmini G, Brandi ML (2017) Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. *J Orthop Traumatol* 18:3-36. <https://doi.org/10.1007/s10195-017-0474-7>
17. Scardueli CR, Bizelli-Silveira C, Marcantonio RAC, Marcantonio E Jr, Stavropoulos A, Spin-Neto R (2018) Systemic administration of strontium ranelate to enhance the osseointegration of implants: systematic review of animal studies. *Int J Implant Dent* 4:21. <https://doi.org/10.1186/s40729-018-0132-8>
18. Shi Q, Qian Z, Liu D, Liu H (2017) Surface modification of dental titanium implant by layer-by-layer electrostatic self-assembly. *Front Physiol* 8:574. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00574>

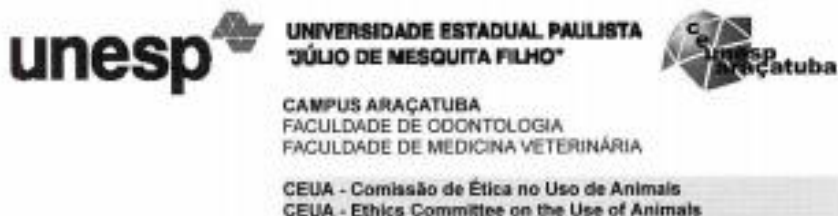
19. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, Peacock M, Miller PD, Lederman SN, Chesnut CH, Lain D, Kivitz AJ, Holloway DL, Zhang C, Peterson MC, Bekker PJ; AMG 162 Bone Loss Study Group (2006) Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 354:821-831. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044459>
20. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Grossi-Oliveira GA, Okamoto T, Okamoto R (2015) Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *J Biomed Opt* 20(3):038003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.3.038003>
21. Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia IR Jr, Okamoto R (2010) Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol* 55:52-59. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.11.001>
22. Stevenson M, Jones ML, De Nigris E, Brewer N, Davis S, Oakley J (2005) A systematic review and economic evaluation of alendronate, etidronate, risedronate, raloxifene and teriparatide for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Health Technol Assess* 9:1–160. <https://doi.org/10.3310/hta9220>
23. Gennari L, Nuti R, Bilezikian JP (2004) Aromatase activity and bone homeostasis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5898-5907. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1717>
24. Kaufman JM, Lapauw B, Goemaere S (2014) Current and future treatments of osteoporosis in men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28:871-884. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.09.002>
25. Farahmand P, Spiegel R, Ringe JD (2016) Male osteoporosis. *Z Rheumatol* 75:459-465. <https://doi.org/10.1007/s00393-016-0078-2>



**ANEXOS**

## ANEXOS

### Anexo A Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Efeito da administração de Ranelato de Estrôncio Sistêmico e local sobre o reparo ósseo de ratos osteoporóticos. Análise imunoistoquímica, molecular, histométrica, microtomográfica e por microscopia confocal", Processo FOA nº 00335-2018, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 20 de Julho de 2018.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 31 de Julho de 2021.


**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 31 de Agosto de 2021.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Effect of systemic and local strontium ranelate administration on bone repair of osteoporotic rats. Immunohistochemical, molecular, histometrical, microtomographical and for confocal microscopy analysis", Protocol FOA nº 00335-2018, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 20, 2018.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** July 31, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** August 31, 2021.

  
**Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

**Anexo B**  
**Periódico de interesse para submissão - Clinical Oral Investigations**



---

**Publisher:** Springer Berlin  
Heidelberg

**Editor-in-Chief:**  
Matthias Hannig

**Impact Factor:** 2.308

**ISSN:** 1432-6981 (Print) 1436-  
3771 (Online)

**Qualis CAPES:** A1

**Website:**

<http://www.springer.com/medicine/dentistry/journal/784?details>  
Page=plctci\_1060698