

ANA CAROLINA DOS PASSOS

**AVALIAÇÃO DO ESTRÔNCIO APLICADO LOCALMENTE
NO SÍTIO REPARACIONAL APÓS A EXODONTIA DE
INCISIVOS SUPERIORES DE RATOS
ORQUIECTOMIZADOS. ANÁLISES CONFOCAL,
IMUNOISTOQUÍMICA E MICROTOMOGRÁFICA**

**ARAÇATUBA - SP
2023**

ANA CAROLINA DOS PASSOS

**AVALIAÇÃO DO ESTRÔNCIO APLICADO LOCALMENTE
NO SÍTIO REPARACIONAL APÓS A EXODONTIA DE
INCISIVOS SUPERIORES DE RATOS
ORQUIECTOMIZADOS. ANÁLISES CONFOCAL,
IMUNOISTOQUÍMICA E MICROTOMOGRÁFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista (Unesp), como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta
Okamoto.

**ARAÇATUBA - SP
2023**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Titular Alberto Carlos Botazzo Delbeme do vice-diretor Prof. Titular Luciano Tavares Angelo Cintra.

À instituição de fomento PIBIC/CNPQ pelo auxílio de processo n144053/2020-9, oportunidade e apoio na elaboração e desenvolvimentos desse trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, Cosmo e Luzia, que se esforçaram e criaram eu e meus 3 irmãos honrosamente, acompanham-me diariamente, e me ensinaram os principais valores da vida. Aos meus irmãos, em especial ao Robson, que esteve ao meu lado em todos os momentos da graduação e não mediu esforços para me apoiar emocionalmente e financeiramente. Ao meu namorado Rafael, que desde o primeiro dia de aula me incentiva a estudar e me dedicar na profissão. Vocês foram essenciais nessa fase e sem eles nada disso seria possível. Todo apoio e amor deles me trouxeram até aqui.

À minha orientadora Roberta Okamoto por se dedicar em me ensinar com tanto carinho ao longo desses sete anos. Por ser exemplo de pessoa ética, cuidadosa e dedicada a tudo que se propõe a realizar. Professora, sua orientação foi essencial para meu crescimento profissional, senso crítico de pesquisas e processo de formação durante o curso. Neste âmbito, também estendo meus agradecimentos ao grupo LSMT, que a partir do meu ingresso na instituição, me incentivam e me acompanham desde o meu primeiro projeto de iniciação científica – Obrigada, pela amizade, trabalho em grupo e conhecimento adquirido. Foi uma honra trabalhar com pessoas competentes e que admiro.

Aos meus amigos: Carolina, Isabela, Leonardo e Vitor Hugo. Vocês foram meus primeiros companheiros de profissão, aprendi odontologia sendo parceira de vocês. Dividir essa jornada tornou tudo mais leve e especial. Obrigada pela união e amizade, contem sempre comigo.

À toda equipe e Unidade Auxiliar CAOÉ, não imaginei que aprenderia tanto. O CAOÉ é um lugar especial na minha trajetória e coração. Fui acolhida por todos, que me ensinaram muito sobre a profissão e vida. Aprendi que o quão necessário os estudos, atualizações e ter um atendimento humanizado, independente da área que

pretendo seguir. E que é preciso também, compreender e respeitar fielmente as demandas fisiologias.

À Professora Letícia Theodoro, por ser exemplo de liderança, diálogo e respeito. Estendo também a ela, meus agradecimentos e admiração pela formação, orientação, ética e forma com que conduz seus trabalhos, vida e pesquisas. Agradeço também ao Professor Gabriel Mulinari por dispor a compor a banca, e por ser uma pessoa extremamente querida, admirável e prestativa.

Ao corpo docente e técnicos administrativos da Universidade, que se empenham todos os dias e têm muito carinho pelo que fazem. Obrigada por toda a bagagem que acrescentaram em minha formação pessoal e profissional através dos trabalhos e orientações desenvolvidas.

A persistência é o caminho do êxito.
Charles Chapin

PASSOS, A. C. **Avaliação do estrôncio aplicado localmente no sítio reparacional após a exodontia de incisivos superiores de ratos orquiectomizados. análises confocal, imunoistoquímica e microtomográfica.** 2023. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica multifatorial, caracterizada pela perda óssea progressiva, acarretada pelo processo de desequilíbrio ou ainda acompanhada pelo desacoplamento da atividade de remodelação óssea. O ranelato de estrôncio é um medicamento que pertence ao grupo de agentes anabólicos favorecendo a neoformação óssea e suprimindo a reabsorção óssea. A sua ação como um modulador seletivo de estrógeno sugere um possível efeito local sobre o metabolismo do tecido ósseo. Tornando-se necessário, a realização de estudos que buscam a otimização do processo de reparo ósseo alveolar para tratamentos reabilitadores através do fármaco. **Objetivo:** Avaliou-se o reparo ósseo alveolar após a exodontia em ratos orquiectomizados, bem como o possível efeito positivo da medicação anabólica local sobre o osso comprometido pela deficiência de esteróides gonadais. **Material e Métodos:** Foram utilizados 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), divididos em grupos experimentais: ORQ – animais que passaram pela cirurgia de orquiectomia sem o tratamento medicamentoso. ORQ/RE - grupo de animais que foram submetidos à orquiectomia bilateral e tratados com ranelato de estrôncio local. Após 30 dias, todos os animais foram submetidos à cirurgia de exodontia do incisivo superior direito. A eutanásia de todos os animais ocorreu 60 dias após a cirurgia de exodontia. Posteriormente, foi realizada análise imunoistoquímica e foram utilizados anticorpos para TRAP, OC, OPG, WNT e RANKL, onde avaliou-se as características ósseas no alvéolo em reparo. As análises microtomográfica e de microscopia confocal, por sua vez, são relevantes, pois nos traz dados sobre as características ósseas locais e de precipitação de cálcio na matriz orgânica local. Assim, concluímos a partir dos resultados imunoistoquímicos, microtomográficos e confocais que o ranelato de estrôncio local possui efeito positivo no reparo ósseo pós exodôntico em ratos orquiectomizados, visto que o mesmo promoveu um mecanismo compensatório para a atividade

osteoblástica. Os resultados demonstram a importância da utilização de biomateriais com propriedades que se assemelham ao comportamento biológico para auxiliar no reparo e reabilitação de pacientes.

Palavras-chave: Osteoporose. Estrôncio. Exodontia.

PASSOS, A. C. **Evaluation of strontium applied locally at the reparational site after exodontia of upper incisors of orchietomized rats. confocal, immunohistochemical and microtomographic analyses.** 2023. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Osteoporosis is a multifactorial systemic skeletal disease, characterized by progressive bone loss, caused by the imbalance process or accompanied by the uncoupling of bone remodeling activity. Strontium ranelate is a medication that belongs to the group of anabolic agents that promote bone formation and suppress bone resorption. Its action as a selective estrogen modulator suggests a possible local effect on bone tissue metabolism. It becomes necessary to carry out studies that seek to optimize the alveolar bone repair process for rehabilitative treatments using the drug. **Objective:** Alveolar bone repair after tooth extraction in orchietomized rats was evaluated, as well as the possible positive effect of local anabolic medication on bone compromised by gonadal steroid deficiency. **Material and Methods:** 24 Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) were used, divided into experimental groups: ORQ – animals that underwent orchietomy surgery without drug treatment. ORQ/RE - group of animals that underwent bilateral orchietomy and treated with local strontium ranelate. After 30 days, all animals underwent right upper incisor extraction surgery. All animals were euthanized 60 days after tooth extraction surgery. Subsequently, immunohistochemical analysis was performed and antibodies to TRAP, OC, OPG, WNT and RANKL were used, where the bone characteristics in the socket undergoing repair were evaluated. Microtomographic and confocal microscopy analyses, in turn, are relevant, as they provide us with data on local bone characteristics and calcium precipitation in the local organic matrix. Thus, we conclude from the immunohistochemical, microtomographic and confocal results that local strontium ranelate has a positive effect on post-exodontic bone repair in orchietomized rats, as it promoted a compensatory mechanism for osteoblastic activity. The results demonstrate the importance of using biomaterials with properties that resemble biological behavior to assist in the repair and rehabilitation of patients.

Keywords: Osteoporosis. Strontium. Exodontics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento Experimental Proposto	18
Figura 2 - Análise imunoistoquímica com avaliação da demarcação de proteínas em área dos grupos ORQ e ORQ/RE em um aumento de 20x	24
Figura 3 - Análise de Dinâmica Óssea dos animais referente aos grupos: ORQ e ORQRE – machos	30
Figura 4 - Análise de Aposição Mineral Diária dos animais referente aos grupos: ORQ e ORQ/RE – machos	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Demarcação imunoistoquímica da proteína OC para os grupos ORQ E ORQ/RE	25
Gráfico 2 - Demarcação imunoistoquímica da proteína OPG para os grupos ORQ E ORQ/RE	25
Gráfico 3 - Demarcação imunoistoquímica da proteína RANKL para os grupos ORQ E ORQ/RE	26
Gráfico 4 - Demarcação imunoistoquímica da proteína TRAP para os grupos ORQ E ORQ/RE	26
Gráfico 5 - Demarcação imunoistoquímica da proteína WNT para os grupos ORQ E ORQ/RE	27
Gráfico 6 - Percentual de Volume Ósseo (Bv.Tv): Neste parâmetro, a média dos resultados foi de 59,69 para o grupo ORQ e de 50,48 para o grupo ORQ/RE	28
Gráfico 7 - Espessura Trabecular (Tb.Th): Neste parâmetro, a média dos resultados foi de 1,21 para o grupo ORQ e de 0,14 para o grupo ORQ/RE	28
Gráfico 8 - Número de Trabéculas (Tb.N): Neste parâmetro, a média dos resultados foram de 0,49 para o grupo ORQ e de 2,78 para o grupo ORQ/RE	29
Gráfico 9 - Separação de Trabéculas (Tb.Sp): Neste parâmetro, a média dos resultados foi de 0,76 para o grupo ORQ e de 0,42 para o grupo ORQ/RE	29
Gráfico 10 - Dinâmica Óssea dos animais referente aos grupos: ORQ (representados por: OR C e OR A) e ORQ/RE (representados por ORRE C e ORRE A)	30
Gráfico 11 - Taxa de Aposição Mineral Diária dos animais referente aos grupos: ORQ e ORQ/RE – machos	31

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Análise imunoistoquímica dos grupos ORQ e ORQ/RE mediante as proteínas OC, WNT, TRAP, RANK-L e OPG

27

LISTA DE ABREVIATURAS

CAOE	Centro de Assistência Odontológica à Pessoa com Deficiência (Centrinho Unesp)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
LSMT	Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados - UNESP
MAR	Marcação de aposição mineral diária através da análise de microscopia confocal
OC	Osteocalcina - Proteína de matriz óssea produzida pelos osteoblastos
OPG E RANKL	Proteínas reguladoras das atividades celulares na remodelação do tecido ósseo
OPG	Osteoprotegerina, proteína sintetizada pelos osteoblastos, age como receptor competitivo ligando-se ao receptor RANKL
ORQ	Animais submetidos à orquiectomia bilateral sem tratamento medicamentoso
ORQRE ou ORQ/RE	Animais submetidos à orquiectomia bilateral e tratados com ranelato de estrôncio local
RANKL	Proteína plasmática do receptor RANK
TRAP	Enzima liberada pelos osteoclastos no processo de reabsorção óssea
WNT	Via de sinalização proteica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Cirurgia	18
3.1.2 Orquiectomia	18
3.1.2 Técnica para Extração Dental.....	18
3.2 Tratamento com Ranelato de Estrôncio Local	19
3.3 Injeção de Fluorocromos.....	19
3.4 Eutanásia e Coleta das Amostras	20
3.5 Análises	20
3.5.1 Análise Imunoistoquímica	20
3.5.2 Avaliação Microtomográfica (Micro-Ct)	21
3.5.3 Microscopia Confocal – Dinâmica Óssea Alveolar	22
4 RESULTADOS	24
4.1 Resultados Análise Imunoistoquímica.....	24
4.2 Escores Aplicados para a Análise Imunoistoquímica	25
4.3 Resultados Análise Microtomográfica (Micro-Ct).....	28
4.4 Resultados Análise de Dinâmica Óssea	30
4.5 Resultados Análise de Aposição Mineral Diária	31
5 DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica multifatorial, caracterizada pela perda óssea progressiva, acarretada pelo processo de desequilíbrio ou ainda acompanhada pelo desacoplamento da atividade de remodelação óssea. Como consequência, observa-se a deterioração da microarquitetura óssea decorrendo em fraturas (HARVEY; DENNISON; COOPER, 2010).

Esta alteração sistêmica é classicamente reconhecida como um problema de saúde pública muito discutido em mulheres, já que um terço das mulheres com mais de 50 anos, podem ser afetadas com riscos iminentes de sofrer algum tipo de fratura pela depleção no fornecimento de estrógeno na fase pós-menopausa, além da associação desta situação sistêmica com doenças cardiovasculares (DRAKE; KHOSLA; 2012; KHOSLA; AMIN; ORWOLL, 2008).

Entretanto, sua significância em estudos desta modificação sistêmica e possível dimorfismo sexual, ainda é pouco relatado, sendo que atualmente, a osteoporose acomete cerca de um quinto da população masculina. A osteoporose nos homens, geralmente é ocasionada pela redução da produção de testosterona, ocorrendo com maior incidência nos indivíduos com idade superior a 50 anos, onde estes sofreram o processo de aromatização perdendo a efetividade de estrógeno. De acordo com Kaufman, Lapauw e Goemaere (2014), os efeitos deste hormônio são necessários para a manutenção eficaz da remodelação óssea e há evidências de que os níveis de estradiol biodisponível podem limitar a perda óssea relacionada com a idade em homens (VANDERSHUEREN *et al.*, 2004).

O fármaco optado foi desenvolvido para o tratamento da osteoporose pós-menopausa (BRENNAN *et al.*, 2009), estimulando a neoformação e suprimindo a reabsorção óssea (MARIE *et al.*, 2001). Para Hurtel-Lemaire *et al.* (2009), o medicamento atua através da ativação do receptor sensível de cálcio e ocasionando aumento da OPG e diminuição do RANKL. Sugere-se que ocorra desacoplamento do processo de remodelação óssea agindo positivamente na arquitetura e força do osso. Alguns estudos experimentais demonstraram que o ranelato de estrôncio preveniu perda óssea em ratos orquiectomizados, aumentando a massa óssea em animais osteopênicos e a resistência óssea em animais normais (MARIE *et al.*, 2005; TELLA; GALLAGHER, 2014).

Contudo, seu uso sistêmico leva a alterações nos hábitos intestinais e está associado a um ligeiro aumento do risco tromboembólico, principalmente em idosos. Em consequência, sua indicação está restrita a osteoporose grave em homens e mulheres pós-menopáusicas com alto risco de fratura que não podem ser tratados com outros medicamentos (TARANTINO *et al.*, 2017).

Como justificativa, observa-se notável envelhecimento da população e aumento da expectativa de vida, com isso, cresce o número de pacientes que procuram por tratamentos reabilitadores em busca de melhora na qualidade de vida. No entanto, grande parte desta população apresenta condições sistêmicas desfavoráveis, tais como a osteoporose que atinge 7,7% do gênero masculino na faixa etária de 50 a 69 anos (SAMBROOK; COOPER, 2006). Por isso, torna-se necessário, a realização de estudos que busquem a otimização do processo de reparo ósseo alveolar através de vias osteoblásticas locais. Posto isso, este projeto teve como proposta avaliar o efeito local do reparo ósseo alveolar em condições sistêmicas que predispõe a osteoporose no gênero masculino, descrevendo as alterações fisiológicas que possui peculiaridade das respostas do tecido ósseo relevantes ao planejamento cirúrgico do paciente.

2 OBJETIVO

Avaliou-se o reparo ósseo alveolar após a exodontia em ratos orquiectomizados, bem como o possível efeito positivo da medicação anabólica local sobre o osso comprometido pela deficiência de esteroides gonadais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

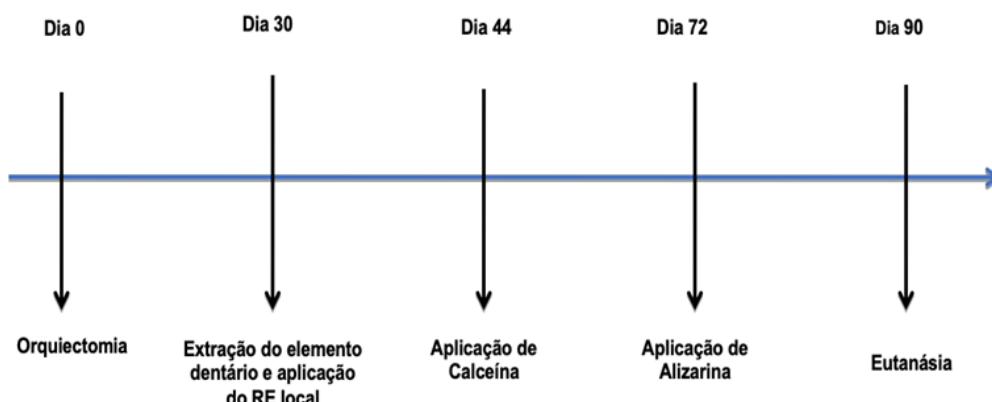
Com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal nº de processo: 00335-2018, para o desenvolvimento do experimento, utilizou-se 24 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com peso médio de 300 gramas provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Estes animais foram orquiectomizados e como consequência, tornaram-se osteopênicos, sendo predispostos à osteoporose, assim como, apresentados em literatura para caracterização da osteopenia de ratos (SEIFI *et al.*, 2015). Avaliou-se o reparo alveolar pós exodôntico, sendo divididos nos seguintes grupos experimentais: (ORQ e ORQ/RE).

Decorre-se que o grupo ORQ, são ratos submetidos à orquiectomia bilateral sem tratamento medicamentoso e ORQ/RE - grupo de animais submetidos à orquiectomia bilateral tratados com ranelato de estrôncio local.

A linha do tempo apresenta os procedimentos experimentais realizados, sendo: A indução da osteoporose nos animais através da cirurgia de orquiectomia, ambas bilaterais (ORQ) contabilizada no dia 0. Após o período de 30 dias, foi realizada a exodontia do incisivo direito onde os animais receberam o ranelato de estrôncio local através de uma esponja de fibrina embebida com a solução do medicamento. 14 dias após a extração dentária e 42 dias, injetaram-se os fluorocromos respectivos para o período. Sendo ser visualizada na figura 1.

Figura 1 – Delineamento experimental proposto



Fonte: Autora, 2023

3.1 Cirurgia

3.1.2 Orquiectomia

Os animais submetidos à cirurgia de orquiectomia foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de Cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e, a seguir, imobilizados sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito dorsal, onde realizou-se 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 – Jhonson&Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) e seccionados. Os testículos e os epidídimos são removidos e o escroto suturado com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson&Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Os animais do grupo SHAM passam pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos testículos e dos epidídimos sem suas respectivas remoções (PETROIANU *et al.*, 2010).

3.1.2 Técnica para Extração Dental

Os ratos foram sedados por infiltração intramuscular de Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Cetamina na dosagem indicada pelo fabricante e realizada a

antisepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rio Química, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) em seguida, realizada a exodontia do incisivo superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim. Efetivou-se a sutura da mucosa gengival com fio de poliglactina 910 (Vicryl 4.0 – Jhonson&Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). No grupo ranelato de estrôncio local (ORQ/RE), após a exodontia, realizado o tamponamento com gaze estéril, o fármaco é administrado através de uma esponja de fibrina sendo introduzida ao terço médio do alvéolo em reparação através de uma cureta odontológica.

3.2 Tratamento com Ranelato de Estrôncio Local

A administração do ranelato de estrôncio local no alvéolo em reparação foi realizada, a partir de uma esponja de fibrina hemostática (Hemospon – Maquira), embebida e homogeneizada em uma solução de soro fisiológico associado ao fármaco, sendo a concentração: 1g de RE em 15ml de solução fisiológica. Inicialmente, a esponja é cortada em 0,5 x 0,5 x 0,5 cm (metade) e em sua totalmente, é introduzida nesta solução e embebida por 30 segundos, sendo posteriormente inserida no alvéolo.

3.3 Injeção de Fluorocromos

No dia 44 após as cirurgias de orquiectomia, foram administrados 20mg/kg de calceína por via intramuscular nos grupos, e no dia 72 foram se administrados 20mg/kg de alizarina vermelha respectivamente. Os fluorocromos foram diluídos em 1,5ml de água deionizada, com agitador magnético. Os animais submetidos à eutanásia 18 dias depois da aplicação da alizarina vermelha. O objetivo pelo qual de se realizar esta metodologia está em nas propriedades químicas encontradas nos fluorocromos. Os fluorocromos são componentes químicos com propriedades que se ligam ao cálcio no momento de sua precipitação na matriz orgânica. Assim, as marcações pelos fluorocromos representaram a quantidade da precipitação de cálcio o que nos permite a mensuração da neoformação óssea. Respeitando a cronologia de aplicação e depósito, a calceína (verde), foi a primeira a ser injetada, onde os

fluorocromos verdes representam o osso velho. Já a alizarina, o segundo fluorocromo que foi injetado, portanto, representa-se o osso marcado em fluorocromos vermelhos, condizendo a matriz óssea depositada recentemente. Desta forma, quanto maior a prevalência de fluorescência vermelha, maior é a formação de osso novo. Essa dinâmica nos permitiu observar as duas situações no mesmo corte, portanto, observar a neoformação óssea sendo possível calcular a taxa de deposição mineral diária.

3.4 Eutanásia e Coleta das Amostras

Os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica aos 60 dias após a exodontia. Retirou-se as áreas da região da cirurgia experimental para a realização das análises. Logo após a eutanásia, os animais dos grupos do reparo alveolar pós-exodôntico, tiveram suas maxilas removidas e separadas ao meio. As peças foram fixadas em formol e lavadas em água corrente. Foram mantidas em EDTA (10%) para descalcificação e posterior processamento histotécnico. Parte das amostras, após a fixação, foram lavadas em água corrente e mantidas em álcool 70. Na sequência foram escaneadas em microtomógrafo computadorizado. Estas mesmas amostras, ao final da análise microtomográfica, foram submetidas à desidratação, inclusão em metilmetacrilato para posterior análise em microscopia confocal.

3.5 Análises

Neste trabalho serão apresentados os dados qualitativos referentes às análises realizadas.

3.5.1 Análise Imunoistoquímica

Após a descalcificação dos tecidos alveolares e confecção das lâminas histológicas que estavam incluídas em parafina, para as reações de imunoistoquímica, inibiu-se a atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica

com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados 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 ranelato de estrôncio é descrito na literatura por apresentar efeito na via Wnt, utilizamos também anticorpos que marcam esta via (Beta catenina/Wnt), para avaliarmos se essa medicação interfere na produção dessas proteínas durante o reparo ósseo. Após a incubação do anticorpo primário, utilizou-se o polímero universal imunoperoxidase para secções de ratos, contra anticorpos policlonais produzidos em cabra (Histofine, Nichirei, Chuo-ku, Tokyo, Japão). O cromógeno empreendido foi a diaminobenzidina (Dako). Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliado 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 alveolar. A análise realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores atribuídos representando: 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.

3.5.2 Avaliação Microtomográfica (Micro-Ct)

Para a análise tridimensional, nos animais pertencentes ao processamento para tecidos calcificados, após a eutanásia dos mesmos aos 60 dias e exodontia, os alvéolos foram removidos, reduzidos e armazenados em álcool 70%, e sendo primeiramente submetidos à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras são 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) realizou-se a reconstrução das imagens para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada nos planos transversal, longitudinal e sagital. Em seguida, utilizando o software CT Analyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) em toda a extensão do alvéolo reparacional correspondente ao incisivo superior direito. O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (*threshold*) sendo utilizado na análise de 25-90 tons de cinza, que possibilitou a obtenção do volume de osso formado no alvéolo em reparo. Também houve avaliação dos parâmetros que caracterizam o trabeculado ósseo, como 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 CT Analyser (ZACCHETTI *et al.*, 2014).

3.5.3 Microscopia Confocal – Dinâmica Óssea Alveolar

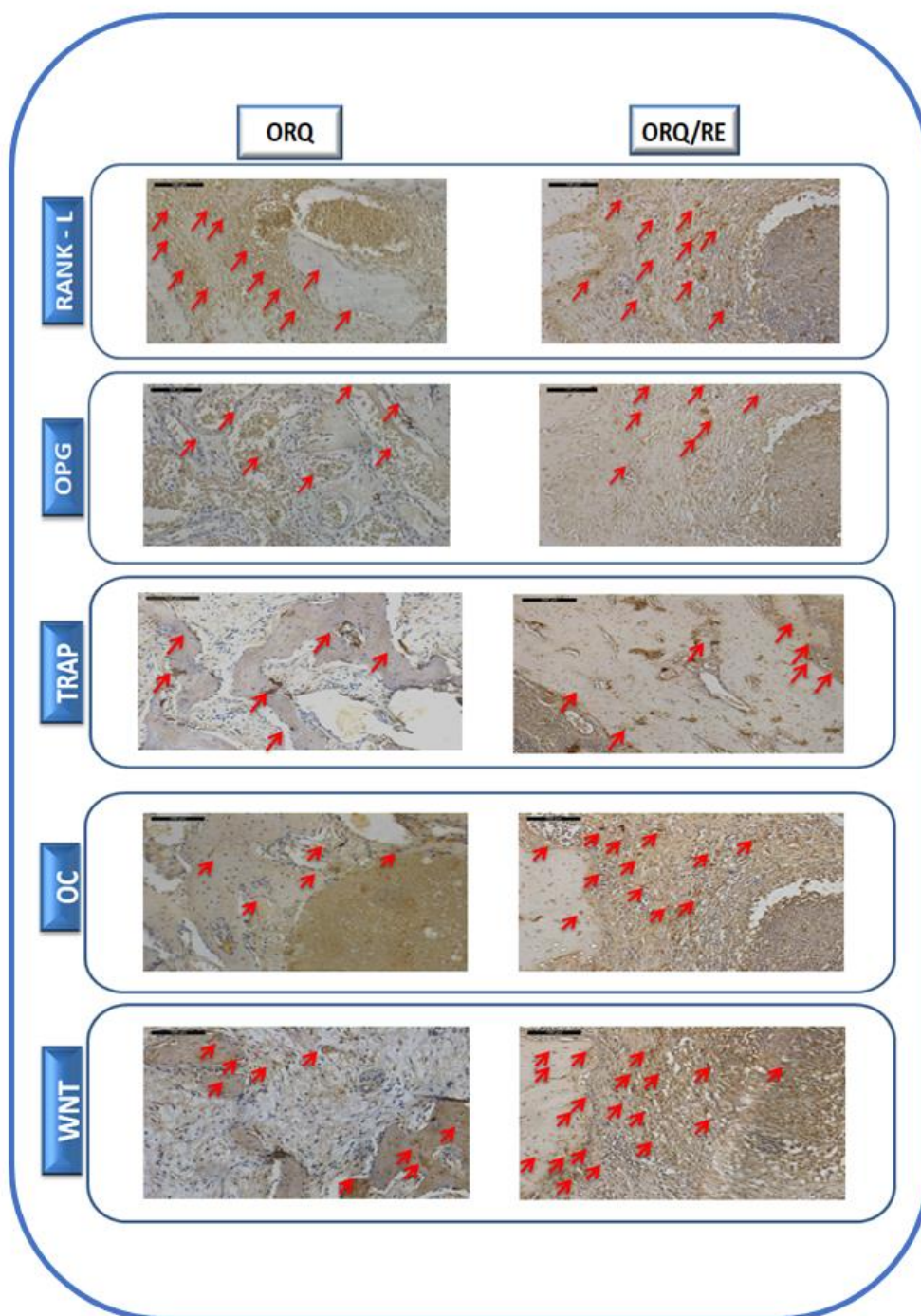
Os cortes montados em lâmina e levados a análise de microscópio confocal reproduziram imagens em diferentes secções na região alveolar sendo que a espessura precisa e definida para que assim, os cortes obtidos e operados por meio do z-stack passem a ter melhor ajuste das imagens representando a melhor secção de cada animal dos grupos experimentais. As imagens começaram desde início da fluorescência representando o começo da calcificação (precipitação de cálcio na matriz orgânica). Estas imagens possuem a dimensão de 1x1 mm² e correspondem a secções óticas de 512 por 512 pixels. Secções de 2µm foram escaneadas por 2,5min. Assim, 28 cortes foram obtidos para cada 56µm de varredura. Utilizou-se filtros de barreira BP 530/30 nm e 590 LP, combinados com a ativação “double dochroic” 488/568 nm, e o fotomultiplicador ajustado em 534 para calceína e 357 para alizarina. Os códigos 534 e 357 nm representaram os filtros que permitiram visualizar os fluorocromos. Um dos filtros possibilita a visualização da calceína (filtro azul) e o outro da alizarina (filtro verde). Ocorreu a reconstrução das imagens através da pilha de software que está instalado para manipular o microscópio confocal Leica CTR 4000 CS SPE. A região alveolar apresentou duas sobreposições de fluorocromos (calceína e alizarina) e cada sobreposição

representa uma sobreposição de cálcio que se precipitou em cada um dos períodos o que mostra a conversão de osso velho para osso novo. As imagens foram salvas no formato TIFF e transportadas para o software ImageJ. Usando a ferramenta “color threshold”, padronizou-se de acordo com a tonalidade, a saturação, e o brilho para revelar primariamente os fluorocromos. Primeiro, a calceína será destacada, e a ferramenta “measure” foi usada para prover a área em μm^2 . Os mesmos procedimentos foram feitos para a alizarina, obtendo dados da dinâmica do osso alveolar. O *turnover* ósseo, nessa abordagem metodológica, representa a diferença entre osso velho (verde) e osso novo (vermelho).

4 RESULTADOS

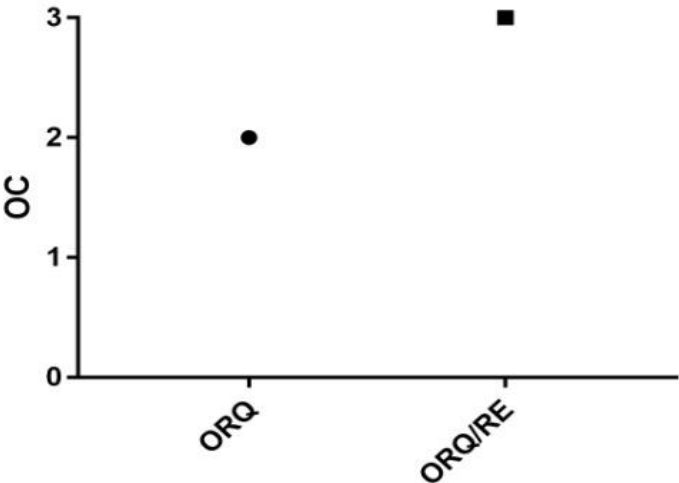
4.1 Resultados Análise Imunoistoquímica

Figura 2 - Análise imunoistoquímica com avaliação da demarcação de proteínas em área dos grupos ORQ e ORQ/RE em um aumento de 20x



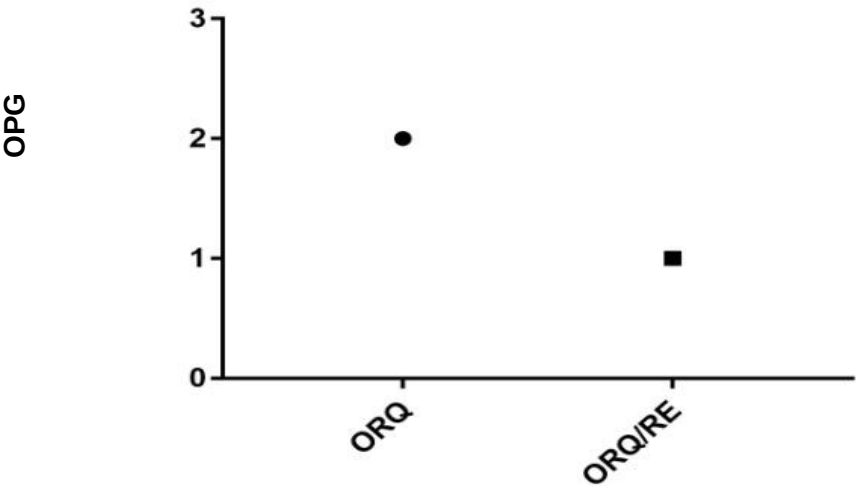
4.2 Escores Aplicados para a Análise Imunoistoquímica

Gráfico 1 - Demarcação imunoistoquímica da proteína OC para os grupos ORQ E ORQ/RE



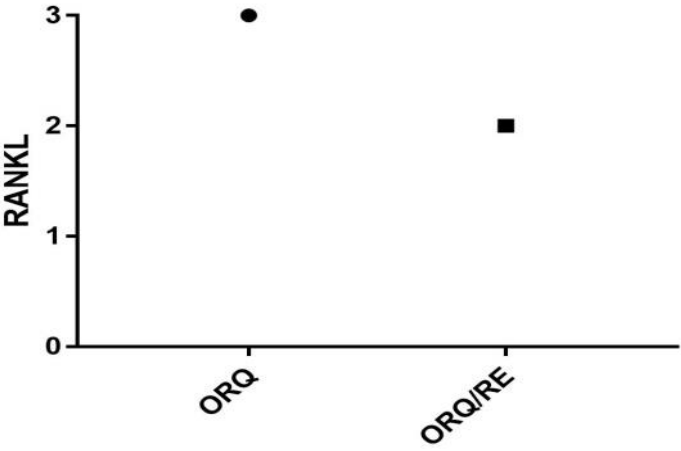
Fonte: Autora, 2023

Gráfico 2 - Demarcação imunoistoquímica da proteína OPG para os grupos ORQ E ORQ/RE



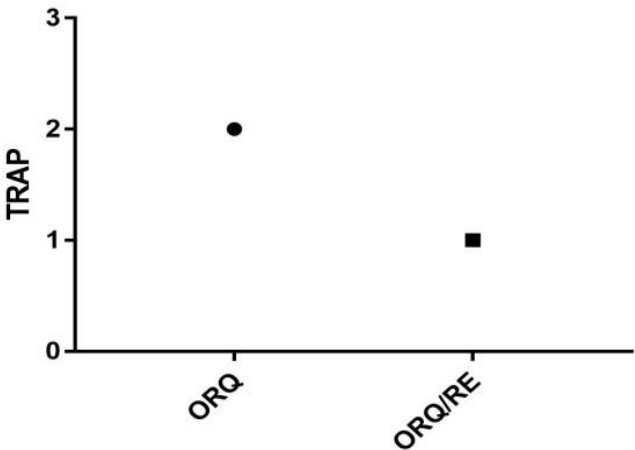
Fonte: Autora, 2023

Gráfico 3 - Demarcação imunoistoquímica da proteína RANKL para os grupos ORQ E ORQ/RE



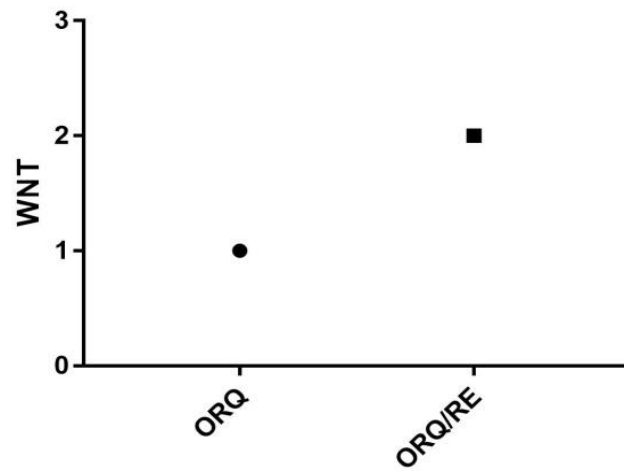
Fonte: Autora, 2023

Gráfico 4 - Demarcação imunoistoquímica da proteína TRAP para os grupos ORQ E ORQ/RE



Fonte: Autora, 2023

Gráfico 5 - Demarcação imunoistoquímica da proteína WNT para os grupos ORQ E ORQ/RE



Fonte: Autora, 2023

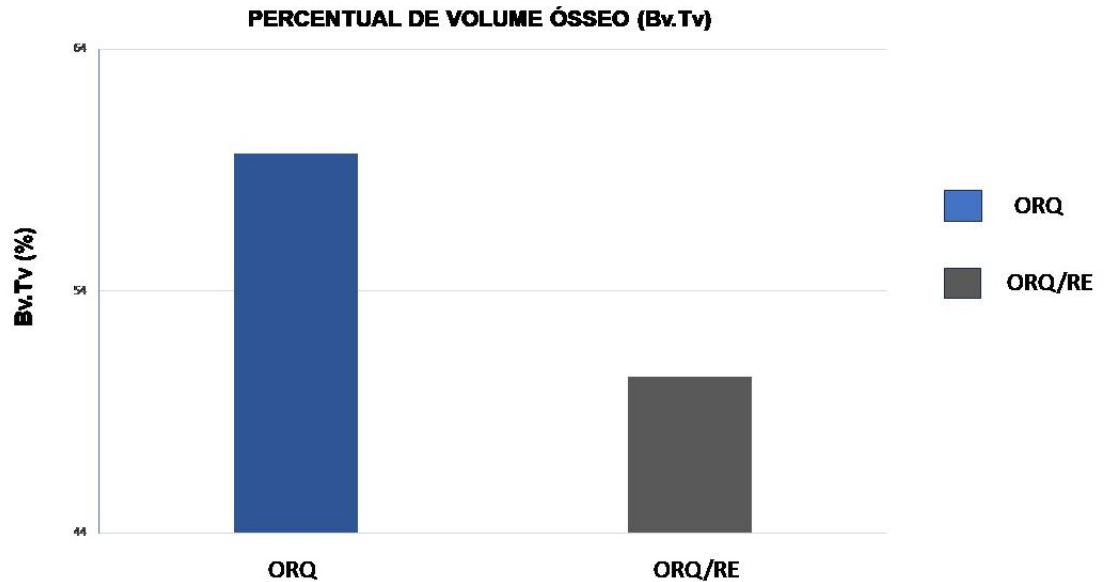
Tabela 1 - Análise imunoistoquímica dos grupos ORQ e ORQ/RE mediante as proteínas OC, WNT, TRAP, RANK-L e OPG

Tabela de Atribuição de Escores Imunomarcção					
	OC	OPG	RANK-L	TRAP	WNT
ORQ	2	2	3	2	2
ORQ/RE	3	1	2	1	1

Fonte: Autora, 2023

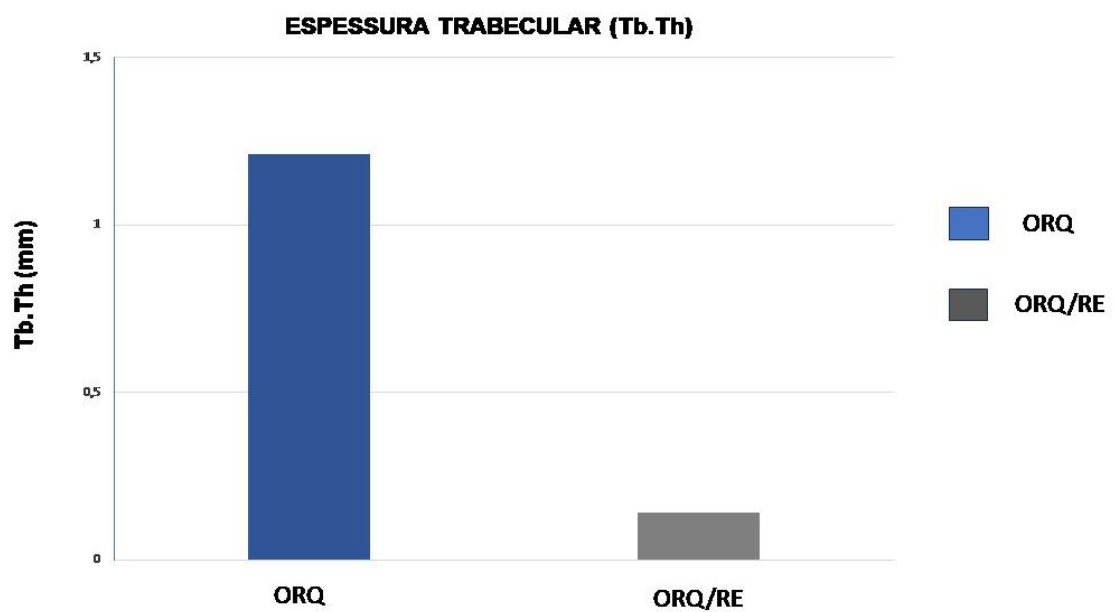
4.3 Resultados Análise Microtomográfica (Micro-Ct)

Gráfico 6 - Percentual de Volume Ósseo (Bv.Tv): Neste parâmetro, a média dos resultados foi de 59,69% para o grupo ORQ e de 50,48% para o grupo ORQ/RE



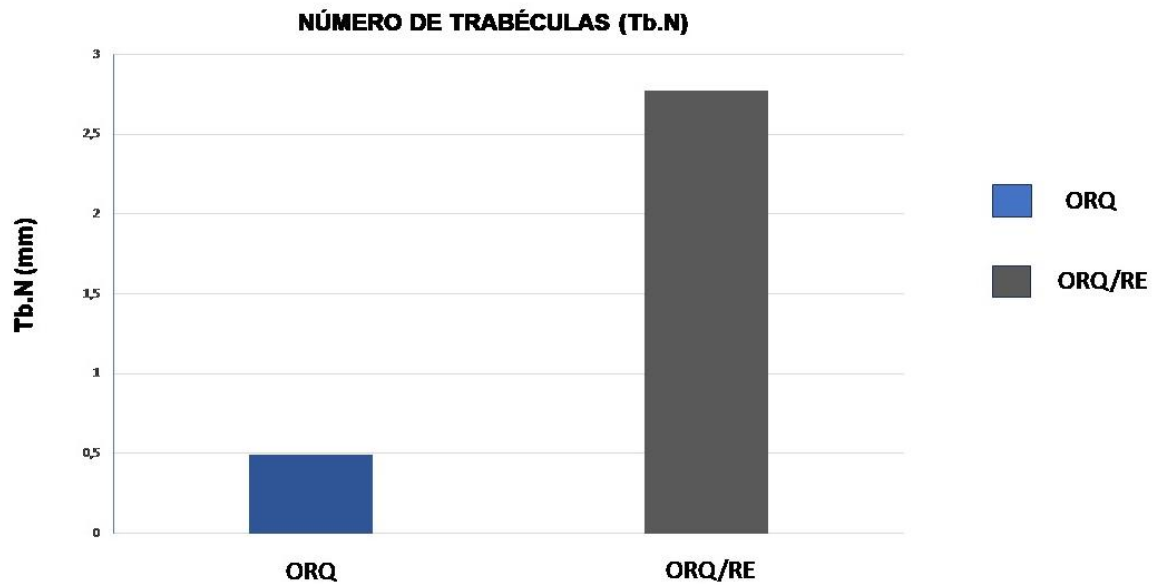
Fonte: Autora, 2023

Gráfico 7 - Espessura Trabecular (Tb.Th): Neste parâmetro, a média dos resultados foi de 1,21mm para o grupo ORQ e de 0,14mm para o grupo ORQ/RE



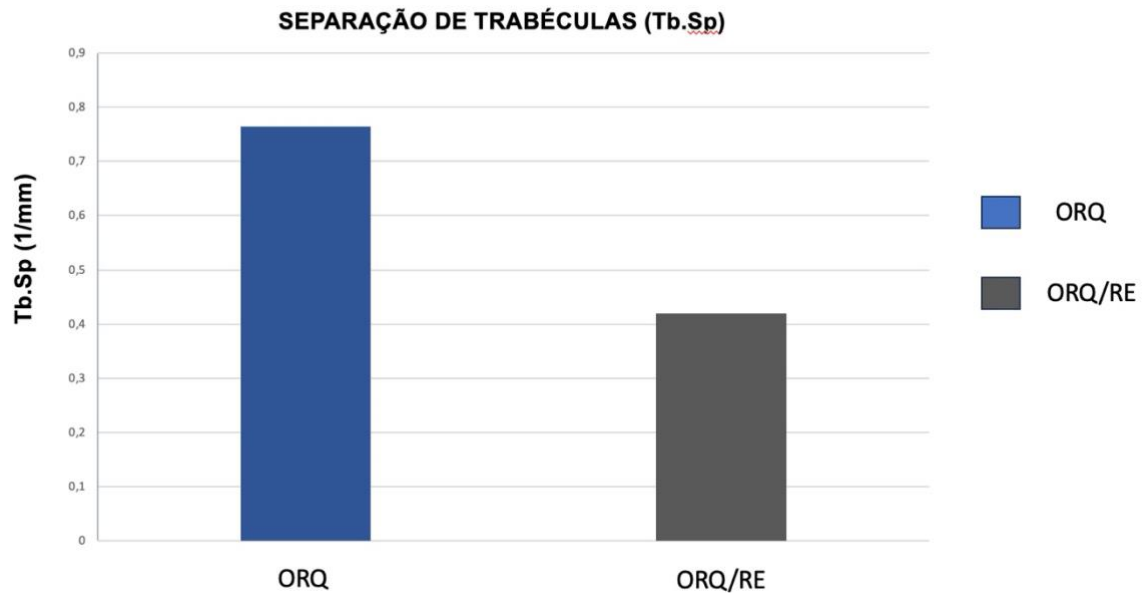
Fonte: Autora, 2023

Gráfico 8 - Número de Trabéculas (Tb.N): Neste parâmetro, a média dos resultados foram de 0,49mm para o grupo ORQ e de 2,78mm para o grupo ORQ/RE



Fonte: Autora, 2023

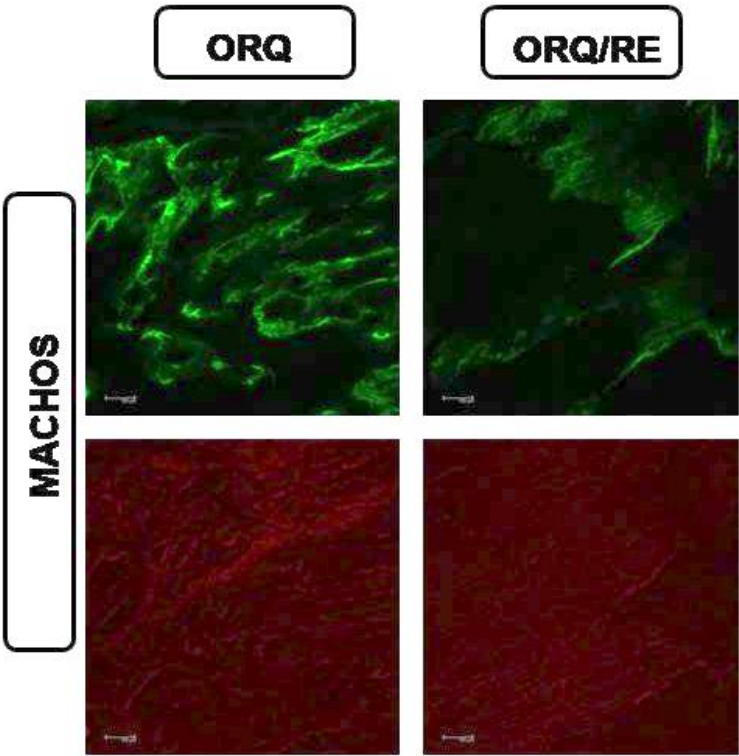
Gráfico 9 - Separação de Trabéculas (Tb.Sp): Neste parâmetro, a média dos resultados foi de 0,76mm para o grupo ORQ e de 0,42mm para o grupo ORQ/RE



Fonte: Autora, 2023

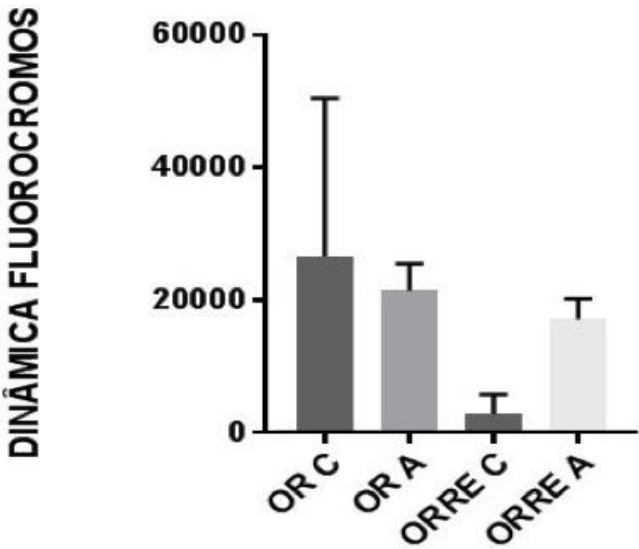
4.4 Resultados Análise de Dinâmica Óssea

Figura 3 - Análise de Dinâmica Óssea dos animais referente aos grupos: ORQ e ORQRE - machos



Fonte: Autora, 2023

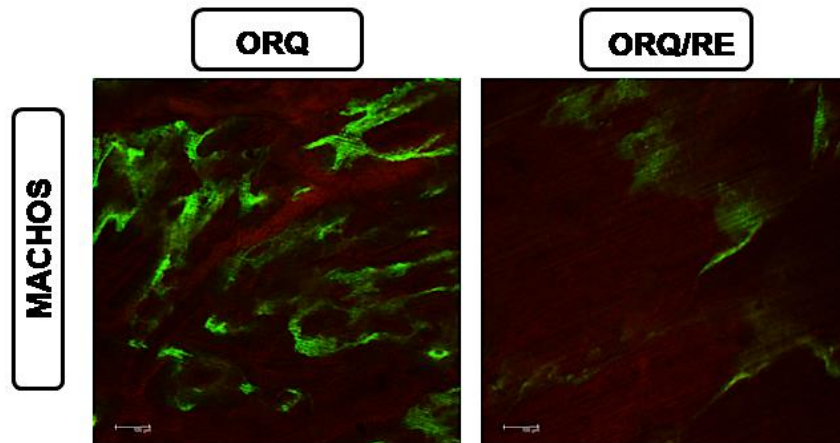
Gráfico 10 - Dinâmica Óssea dos animais referente aos grupos: ORQ (representados por: OR C e OR A) e ORQ/RE (representados por ORRE C e ORRE A)



Fonte: Autora, 2023

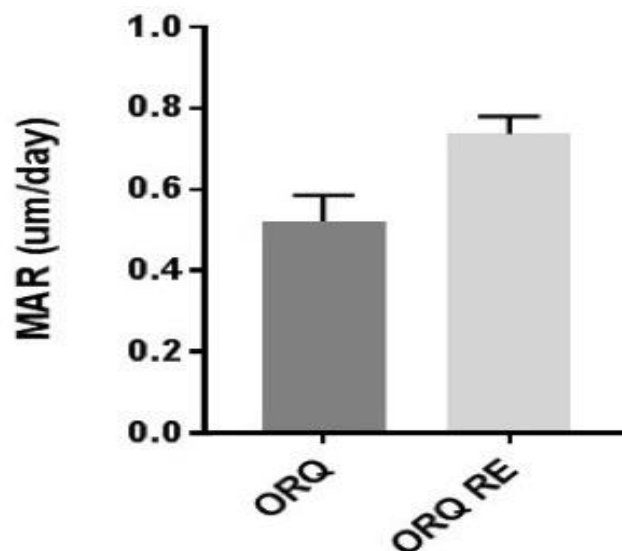
4.5 Resultados Análise de Aposição Mineral Diária

Figura 4 - Análise de Aposição Mineral Diária dos animais referente aos grupos: ORQ e ORQ/RE - machos



Fonte: Autora, 2023

Gráfico 11 - Taxa de Aposição Mineral Diária dos animais referente aos grupos: ORQ e ORQ/RE – machos



Fonte: Autora, 2023

5 DISCUSSÃO

Segundo Luvizuto *et al.* (2010) e Ramalho-Ferreira *et al.* (2017) a osteoporose ainda é motivo de discussão na literatura, no tocante de reparo alveolar e remodelação óssea, visto que está associada no atraso do processo de cicatrização alveolar. Em contrapartida, necessita-se adquirir estudos para se obter respostas de como reproduzir um tecido mineralizado de boa qualidade, visando suportar forças mecânicas e fisiológicas para quadros de reabilitações realizadas no âmbito odontológico, além da melhora na qualidade de vida do paciente (ELSUBEIHI; HEERSCH, 2002; VON WOWERN; KOLLERUP, 1992).

Sabe-se também que a utilização sistêmica do ranelato de estrôncio possui diversos efeitos colaterais insatisfatórios descritos na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2019), porém poucos estudos abordam os resultados positivos na melhora da qualidade do reparo ósseo alveolar e formação óssea local. Mediante os aspectos abordados, o intuito deste estudo foi avaliar a ação tópica do ranelato, inibindo os efeitos colaterais sistêmicos e otimizando resultados promissores na melhora nas características da reparação do osso alveolar.

No presente estudo, vários aspectos devem ser levados em consideração quanto às características de imunomarcação observadas, como a relação aos valores obtidos pelas análises executadas e a avaliação do alvéolo em reparação preenchido funcionalizado com o biomaterial.

Na comparação entre o alvéolo reparacional de ratos orquiectomizados que receberam ou não o ranelato de estrôncio local, foram avaliadas as proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo, como os novos membros dos fatores de necrose tumoral, OPG e RANKL. Ambas as proteínas apresentam um padrão de marcação semelhante, no entanto, por ser um “decoy receptor”, a osteoprotegerina apresenta um padrão de marcação menos marcante, quando comparado a RANKL. Ambos se apresentam marcados em células semelhantes a osteoblastos. A avaliação comparativa do padrão de marcação dessas duas proteínas sinaliza um padrão de resposta onde há predomínio de reabsorção (representado por maior escore para RANKL) ou predomínio de formação óssea (representado por maior escore para OPG).

Observa-se então que as proteínas RANKL e OPG que o grupo ORQ para a proteína RANKL apresenta áreas de imunomarcacão intensa, enquanto ORQ/RE se apresenta de forma moderada. Em contrapartida, a proteína OPG para o grupo ORQ se apresenta de forma moderada e no grupo ORQ/RE se apresenta de forma leve.

A TRAP é uma enzima presente no lisossomo de osteoclastos em atividade de reabsorção. Portanto, marca osteoclastos em atividade de reabsorção, podendo estar avaliada em conjunto com OPG e RANKL (proteínas ligadas a via de reabsorção óssea), se apresentando de forma moderada no grupo não tratado ORQ e possuindo uma marcação leve para o grupo ORQ/RE.

Posteriormente, a proteína WNT é a proteína chave da via Wnt, descrita e relacionada à atividade de formação óssea a partir da sinalização parácrina entre osteócitos e osteoblastos, portanto está ligada a resposta de formação óssea, apresentando-se especialmente marcada em células da linhagem osteoblástica, apresenta-se concomitante com a proteína OC sinalizando a mineralização óssea observa-se o efeito anabólico do medicamento de maneira local, pois no grupo ORQ/RE possui marcação de maior intensidade para a expressão da área de demarcação quando comparado ao grupo não tratado.

Quando analisado os resultados do grupo ORQ/RE comparado ao grupo sistemicamente afetado pela diminuição dos hormônios gonadais, percebe-se que a resposta celular se encontra melhorada quanto ao aspecto osteoporótico quando associa-se o tratamento local com o medicamento.

Vale destacar que estes resultados são referentes à análise de imunomarcacão em que as características do osso reparacional formado na área de interesse, sendo o terço médio do alvéolo, onde foram avaliadas a partir de diferentes parâmetros que são correlacionados à qualidade e quantidade óssea caracterizando o tecido ósseo reparacional quanto às proteínas da matriz extracelular presentes “in situ”. Consideramos que a associação de estas ferramentas metodológicas foi de extrema importância para analisarmos as características do comportamento do osso reparacional formado no interior do alvéolo.

No presente estudo, vários aspectos devem ser levados em consideração quanto às características microtomográficas observadas (OLIVEIRA et al., 2019).

Com relação aos valores obtidos pelas análises executadas, a avaliação do alvéolo em reparação preenchido com ranelato de estrôncio local, mostrou para o grupo ORQ maiores valores para Percentual de Volume Ósseo (Bv.Tv), Espessura Trabecular (Tb.Th) e Separação Trabecular (Tb.Sp). Já o grupo ORQ/RE possui maiores valores para Número de Trabéculas (Tb.N). Sabe-se do possível efeito anabólico do fármaco no sítio reparacional, fator este que correlaciona-se com os dados apresentados no aumento do Número de Trabéculas (Tb.N) e na diminuição quanto a Separação Trabecular (Tb.Sp).

A aplicação de fluorocromos, por sua vez, nos traz dados importantes sobre a precipitação de cálcio na matriz orgânica local, permitindo a mensuração da neoformação óssea. Os fluorocromos possuem cores diferentes e foram injetados em períodos distintos para representar a precipitação de osso antigo (calceína – primeiro injetado, obtendo a marcação na cor verde), e após 28 dias, a aplicação de alizarina (marcação na cor vermelha – demarcando a deposição recente óssea).

Através da microscopia confocal, conseguimos a realização das análises de dinâmica do tecido ósseo, que é representada pelo *turnover* ósseo, resultado dos processos de reabsorção e neoformação. E, a análise da taxa de aposição mineral diária onde calculamos através da mensuração em comprimento de deposição dos dois fluorocromos (RAMALHO-FERREIRA *et al.*, 2015).

Considerando o terço médio alveolar como a área de interesse para análise, podemos observar que para a análise de dinâmica óssea (precipitação de calceína vs alizarina) notamos que o grupo dos animais machos ORQ apresenta maior precipitação de calceína quando comparado ao grupo ORQ/RE. Enquanto ao grupo ORQ/RE apresenta maiores índices de precipitação de alizarina comparado. Apesar de o grupo ORQ apresentar maiores taxas de precipitação para calceína, este é o único grupo que também se mantém quase que em equilíbrio estatístico com a precipitação aos índices de alizarina.

Para a taxa de aposição mineral diária (MAR) o grupo ORQ/RE apresentou os maiores valores quando comparado ao grupo que não recebeu o tratamento.

6 CONCLUSÃO

Assim, concluímos a partir dos resultados imunoistoquímicos que o ranelato de estrôncio local possui efeito positivo no reparo ósseo pós exodôntico em ratos orquiectomizados, visto que o mesmo promoveu um aumento na expressão de marcadores de formação óssea ao mesmo tempo em que promoveu uma redução na expressão de TRAP. Demonstrando assim, que a ação do fármaco ativou um mecanismo compensatório para a atividade de OC. Atividade esta, que também notamos presente aos resultados através das análises complementares de microtomografia e Microscopia confocal. Por isso, os resultados evidenciam que a manutenção óssea é fundamental para um prognóstico favorável reabilitável e, esta é a principal justificativa para a utilização de biomateriais, visando à escolha daquele que possui propriedades que mais se assemelham ao comportamento biológico do coágulo sanguíneo.

REFERÊNCIAS

- BRENNAN, T. *et al.* Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 7, p. 1291-300, 2009.
- OLIVEIRA, D. *et al.* Effect of intermittent teriparatide (PTH 1-34) on the alveolar healing process in orchietomized rats. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 5, p. 2313–2322, 2019.
- DRAKE, M. T.; KHOSLA, S. Male osteoporosis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 629-641, 2012.
- ELSUBEIHI, E. S.; HEERSCH, J. M. N. Effects of postmenopausal osteoporosis in the mandible. In: ZARB, G. *et al.* **Aging: osteoporosis and dental implants**. London: Quintessence Books, 2002. p. 207-215.
- HARVEY, N.; DENNISON, E.; COOPER, C. Osteoporosis: impact on health and economics. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 2, p. 99-105, 2010.
- HURTEL-LEMAIRE, A. S. *et al.* The Calcium - sensing Receptor Is Involved in Strontium Ranelate – induced Osteoclast Apoptosis New insights into the associated signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 1, p. 575-584, 2009.
- KAUFAN, J. M.; LAPAUW, B.; GOEMAERE, S. Current and future treatments of osteoporosis in men. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 6, p. 871-884, 2014.
- KHOLA, S.; AMIN, S.; ORWOLL, E. Osteoporosis in men. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 4, p. 441-464, 2008.
- LUVIZUTO, E. R. *et al.* Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. **Archives of Oral Biology**, v. 55 n. 1, p. 9-52, 2010.
- MARIE, P. J. *et al.* Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Calcified Tissue International**, v. 69, n. 3, p. 121-129, 2001.

MARIE, P. J. *et al.* 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. 20, n. 6, p. 1065-1074, 2005.

PETROIANU, A. *et al.* Is there a relationship between physical performance and orchiectomy? **Andrologia**, v. 425, p. 302-304, 2010.

RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Effect of antiresorpt histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. **Clinical Oral Investigations**, v.21, n.5, p.1485-1494, 2017.

RAMALHO-FERREIRA, G. *et al.* Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 3, p. 3-20, 2015.

SEIFI, M. *et al.* The effect of ovariectomy and orchiectomy on orthodontic tooth movement and root resorption in wistar rats. **Journal of Dentistry**, v. 16, n. 4, p. 302-309, 2015.

SAMBROOK, P.; COOPER, C. Osteoporosis. **The Lancet**, v. 367, n. 9527, p. 2010 – 2018, 2006.

TARANTINO, U. *et al.* Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. **Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 18, sup. 1, p. 3-36, 2018.

TELLA, S. H.; GALLAGHER, J. C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 155-170, 2014.

VANDERSHUEREN, D. *et al.* Androgens and bone. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 3, p. 389-425, 2004.

VON WOWER, N.; KOLLERUP, G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 67, n. 5, p. 656-660, 1992.

ZACCHETTI, G. *et al.* Systemic treatment with strontium ranelate accelerates the filling of a bone defect and improves the material level properties of the healing bone. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 549785, 2014.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética em Experimentação Animal - nº 00335-2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho 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 2018-0335, sob responsabilidade de Roberta Okamoto e colaboração de Juliana Zorge Coléte e Paulo Noronha Lisboa Filho foi aprovado pela CEUA em 26 de Novembro 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"**, Process FOA nº 2018-0335, under the supervision of Roberta Okamoto and collaboration of Juliana Zorge Coléte and Paulo Noronha Lisboa Filho had its the Final Report approved by the CEUA on November 26, 2021.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br