



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba**

**FERNANDA COSTA YOGUI**

**Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratas  
com deficiência de estrogênio tratadas com ranelato de estrôncio –  
Análise imunoistoquímica, microtomográfica e por microscopia  
confocal**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Odontologia  
de Araçatuba da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –  
UNESP, como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Bacharel em  
Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Roberta Okamoto

**Araçatuba – SP**

**2017**

# *Dedicat6ria*

**A minha amada e maravilhosa *Família***

**À minha mãe *Helena***

Minha melhor amiga, meu maior exemplo de amor, cuidado, carinho e sabedoria. A senhora sempre me ajudou, me apoiou e me conduziu pelo melhor caminho para que os meus sonhos se tornassem realidade. A senhora sempre acreditou cegamente no meu potencial, por muitas vezes mais do que eu mesma acreditava que seria possível. A senhora nunca me deixou desistir, mesmo quando tudo parecia impossível. Toda a minha vida você foi o pilar que me ajudou a crescer e evoluir, e sou imensamente grata. Mãe, eu não teria chegado até aqui sem você. Dedico a você tudo o que hoje sou e conquistei. Obrigada por todos os conselhos, pelas belas palavras de sabedoria, pelas orações e por ser essa pessoa maravilhosa.

**Ao meu pai *Luis Carlos*,**

Meu exemplo de honestidade, bondade, persistência e fé. O senhor sempre acreditou no meu potencial e me apoiou nas minhas decisões sem medir esforços para me ajudar. Lembro-me de todas as vezes que o senhor e a mãe me levaram para fazer as provas de vestibulares, até mesmo fora do estado de São Paulo, e também me acompanharam em muitos congressos durante o meu curso de graduação, sempre torcendo por mim, a companhia e apoio de vocês foram extremamente importantes para mim em todos esses momentos. Não consigo expressar em palavras toda a gratidão que tenho por ter sido sempre meu porto-seguro e esta pessoa alegre que contagia à todos. Muito obrigada pai, espero um dia poder retribuir, ao menos um pouco, toda a sua dedicação e apoio.

**Aos meus irmãos *Mauricio, Diego, Luis Vinicius e Amanda***

Sou grandemente privilegiada em ter vocês como irmãos, vocês são incríveis! Vocês são muito mais que irmãos, são meus amigos, companheiros e cúmplices. Sei que sempre se orgulharam de mim, mas na verdade, eu sempre tive profundo orgulho de vocês. Todos os momentos que passamos juntos são alto-astrol, vocês

---

*Fernanda Costa Yogui*

tem o dom da alegria e a esparramam por onde passam. Muito obrigada por estarem sempre perto. Dedico a vocês todas as minhas alegrias.

*“O amor é a única coisa que cresce à medida que se reparte.”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

*Agradecimentos*

*Especiais*

### **À Deus**

Agradeço por ter iluminado o meu caminho durante toda esta jornada. Pela força, apoio, conforto, sabedoria e discernimento dados a mim, principalmente nos momentos mais difíceis.

### **À querida professora, orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Roberta Okamoto**

Meu mais belo exemplo de humildade, dedicação, integridade, competência e elegância. A senhora me concedeu a honra de conviver com a senhora, de poder conhecer como é o mundo da pesquisa, como é o trabalho em laboratório, como é a iniciação científica desde o meu primeiro ano da graduação. Sou profundamente grata não só pelos ensinamentos teóricos, científicos e técnicos, mas pelas conversas, conselhos, orientações, preocupações, risadas e por todos os momentos que tivemos juntas. A senhora é uma professora excelente, uma pesquisadora admirável e acima de tudo, uma pessoa maravilhosa.

### **Aos professores membros da Banca Examinadora**

**Prof Dr Fellippo Ramos Verri**, há pessoas que marcam a nossa vida, despertam algo especial em nós, abrem nossos olhos e transformam nossa maneira de ver o mundo. O senhor foi uma dessas pessoas! Tenho imensa admiração e respeito pelo senhor. Obrigada por ter me orientado na disciplina de Prótese Removível, Reabilitação Oral e no curso de atualização em Implantodontia, e por se disponibilizar a compor a banca.

**Prof<sup>a</sup> Dra Mariza Akemi Matsumoto**, a senhora é uma pessoa encantadora e de coração imenso. Ao se tornar professora da Disciplina de histologia e embriologia, veio para somar e tornar o ambiente ainda mais agradável. Obrigada por participar como membro da banca.

### **Aos meus Familiares**

Agradeço imensamente aos meus avôs **Valdeci, Miguel, Elzira e Seiko (in memoriam)** pela constante preocupação e amor sem medidas. Aos meus tios

**Ademir, Fátima, Luciene e Mário** que estão sempre presentes e não medem esforços para me ajudar.

**Ao meu namorado *Rodrigo***

Meu exemplo de determinação e coragem. Obrigada pelo incentivo, pela força, pela paciência, pelo companheirismo, confiança e principalmente pelo amor. Sou muito feliz por ter você ao meu lado.

**Aos *Amigos de Estágio***

Com vocês aprendi o que é uma equipe de verdade, nosso trabalho coletivo foi fundamental no meu aprendizado.

**Letícia Pitol, Ana Claudia Ervolino, Naara Monteiro, Maria Isabela Gandolfo, Jaqueline Hassumi, Karen Lumi, Danila Oliveira, Elisa Furquim, Paula Frigério e Jaqueline Silva**, as mais belas e carismáticas meninas da imumo. Agradeço muito a vocês por toda amizade, apoio, parceria, confiança, brincadeiras e risadas em todos esses anos. Levarei comigo todas as boas lembranças do estágio de IC, das confraternizações, festas, das viagens para congressos, da companhia e torcida nas apresentações.

Aos amigos da pós-graduação da Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-Facial e do nosso grupo de pesquisa, **Juliana Zorzi, André Fabris, Igor Puttini, Fábio Batista, Gustavo Momesmo, Gabriel Mulinari e Pedro Henrique**, sou muito grata por toda atenção, assistência e paciência.

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

# *Agradecimientos*

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. **Wilson Roberto Poi** e do vice-diretor Prof. **João Eduardo Gomes Filho**.

À **Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe-UNESP)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica (processos Nº 2013/11277-3 e 2016/03790-0)

Aos meus eternos e admirados **professores** efetivos e substitutos que sempre se mostraram dispostos a não só nos ensinar a teoria, mas também a prática. Muito obrigada.

Aos meus amigos da **14ª turma do curso noturno de Odontologia**, meus sinceros agradecimentos. Sentirei falta da energia boa dessa turma, das festas, confraternizações, churrascos e festas juninas. Foram 6 anos longos, com muitos momentos bons, alguns momentos difíceis, e assim, mais um ciclo das nossas vida chega ao fim para que comecem outros ainda melhores e mais prósperos.

Meu agradecimento especial ao **Departamento de Ciências Básicas**, no qual está a **Disciplina de Histologia e Embriologia**, representada pelos docentes Prof. Dr Cláudio Aparecido Casatti, Prof. Dr. Edilson Ervolino, Prof<sup>a</sup>. Dra. Alaíde Gonçalves e Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariza Akemi Matsumoto, e a **Disciplina de Anatomia**, a qual tenho profunda admiração e respeito, composta pelos metres Prof. Dr José Américo de Oliveira, Prof. Dr Roelf Justino Cruz Rizzolo, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Prof<sup>a</sup>. Dra. Roberta Okamoto. Obrigada pelo acolhimento e convívio.

Aos professores da **Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-Facial**, Prof. Dr. Idelmo Rangel, Prof. Dr. Osvaldo Magro, Prof. Dra. Alessandra Aranega, Prof. Dra. Ana Paula Bassi, Prof. Dra. Daniela Ponzoni e Prof. Dr. Leonardo Faverani, por serem excelentes docentes e por abrirem as portas e nos receberem com alegria quando precisávamos estar no departamento e laboratório da disciplina.

Às minhas eternas amigas **Clara Possarle, Natália Bachiega e Larissa Campos**, que tanto me deram forças e permitiram que a minha morada aqui em

## *Agradecimentos*

---

Araçatuba fosse alegre e agradável, mesmo em meio a tantas dificuldades e desafios. Os conselhos, o apoio e a alegria de vocês sempre motivaram a minha busca por novos ideais, dentro e fora da faculdade. Meus agradecimentos especiais à vocês por todos os bons momentos que passamos juntas.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela ajuda e por fazerem funcionar os diversos setores da nossa faculdade. Muito obrigada!

Agradeço a todos que torceram por mim, de longe ou de perto e que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste sonho.

*Epígrafe*

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

*Resumo*

YOGUI, F. C. **Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com deficiência de estrogênio tratadas com ranelato de estrôncio – Análise imunoistoquímica, microtomográfica e por microscopia confocal** 2017. 78p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

## RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar o processo de reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com deficiência de estrogênio tratadas com ranelato de estrôncio por meio das análises histológica, imunoistoquímica, microtomográfica e por microscopia confocal. Trinta e seis (36) ratas, adultas, foram divididas em três grupos experimentais: 12 ratas controle (SHAM), 12 ratas ovariectomizadas (OVX) e 12 ratas ovariectomizadas e tratadas com ranelato de estrôncio (Ran-Sr). No dia 0 foi realizada a cirurgia de ovariectomia, após 30 dias foi dado o início ao tratamento medicamentoso com o ranelato de estrôncio por meio de gavagem diariamente, decorrido 30 dias de medicação foi realizada a cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda. A eutanásia foi realizada aos 42 e 60 dias após a instalação dos implantes para realização das análises histológica do processo de reparo peri-implantar; análise imunoistoquímica direcionada para os imunomarcadores: RUNX2, ALP, OPN e OCN; análise microtomográfica (micro-CT), para os parâmetros de BV/TV, BV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Po(Tot); e análise por microscopia confocal para determinar a ELCOI (extensão linear de contato osso/implante) e AON (área óssea neoformada). Os dados quantitativos da micro-CT e microscopia confocal (ELCOI e AON) passaram pela análise de homocedasticidade (teste de Shapiro-Wilk), para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Os dados paramétricos foram comparados pelo teste ONE WAY ANOVA e pós-teste Tukey, adotou-se o nível de significância  $p < 0,05$ . Na análise histológica observa-se maior grau de corticalização e maturação do tecido ósseo peri-implantar nos grupos SHAM e Ran-Sr, o grupo OVX apresentou pequena formação óssea e grande quantidade de tecido adiposo. Pela imunoistoquímica, a proteína RUNX2 teve marcação moderada para SHAM e Ran-Sr e intensa para OVX. A ALP apresentou imunomarcação intensa em SHAM, moderada em Ran-Sr e

leve em OVX. Para OPN, os grupos SHAM e Ran-Sr tiveram marcações moderadas e o grupo OVX, leve. A OCN apresentou marcação moderada para SHAM e leve para OVX e Ran-Sr. Na análise de micro-CT do tecido ósseo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nos parâmetros analisados. Na análise por microscopia confocal, ELCOI e AON apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos, na qual o grupo Ran-Sr apresentou o maior ELCOI e o grupo SHAM a maior AON, o grupo OVX apresentou os menores valores tanto para a ELCOI como para a AON. Com os resultados apresentados, pode-se concluir que o ranelato de estrôncio melhora a osseointegração e a qualidade do tecido ósseo neoformado ao redor de implantes em ratas com deficiência de estrógeno.

**Palavras-chave:** Osteoporose. Estrôncio. Osseointegração.

*Abstract*

YOGUI, F. C. **Evaluation of bone repair at the bone/implant interface in estrogen deficient rats treated with strontium ranelate – Immunohistochemical, microtomographic and confocal microscopy analysis** 2017. 78p. End of course paper (Bachelor degree) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2017.

### **ABSTRACT**

The purpose of this study is to evaluate the bone repair process at the bone/implant interface in estrogen deficient rats treated with strontium ranelate by using histological, immunohistochemical, microtomographic and confocal microscopy analysis. Thirty six (36) adult rats were divided into three experimental groups: 12 sham rats (SHAM), 12 ovariectomized rats (OVX) and 12 ovariectomized rats treated with strontium ranelate (Ran-Sr). On day 0, ovariectomy surgery was performed, after 30 days the daily drug treatment with strontium ranelate by gavage was started. After 30 days of medication, the implant surgery was performed on the right and left tibias. The euthanasia occurred 42 and 60 days after the implants were installed, in order to perform the histological analysis of the peri-implant bone repair process; immunohistochemical analysis directed to immunomarkers: RUNX2, ALP, OPN and OCN; microtomographic analysis (micro-CT), for the parameters of BV/TV, BV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp and Po(Tot); and confocal microscopy evaluation, to determine BIC (bone/implant contact) and NBA (neoformed bone area). Quantitative data from micro-CT and confocal microscopy (BIC and NBA) were subjected to homoscedasticity analysis (Shapiro-Wilk test) to distinguish parametric and non-parametric data. The parametric data was compared by ONE WAY ANOVA test and Tukey post-test, and the significance level was set at  $p < 0.05$ . In the histological analysis was observed a higher degree of corticalization and maturation of the peri-implant bone tissue in the SHAM and Ran-Sr groups, the OVX group presented small bone formation and big amount of adipose tissue. By immunohistochemical, the RUNX2 protein had moderate labeling for SHAM and Ran-Sr and intense for OVX. ALP showed intense immunostaining in SHAM, moderate in Ran-Sr and light in OVX. For OPN, the SHAM and Ran-Sr groups had moderate labeling and the OVX group, light. OCN showed moderate SHAM labeling and light for OVX and Ran-Sr. In the

micro-CT analysis of the bone tissue, was not observed statistics difference among the groups for the analyzed parameters. In the analysis by confocal microscopy, BIC and NBA presented statistically significant difference among all groups, in which the Ran-Sr group presented the highest BIC and SHAM group the highest BNA, the OVX group presented the lowest values for BIC and NBA. It can be concluded from the results presented that strontium ranelate improves osseointegration and quality of neoformed bone tissue around implants in estrogen deficient rats.

**Keywords:** Osteoporosis. Strontium. Osseointegration.

*Lista de*  
*Figuras*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sequência cirúrgica de ovariectomia 42  
Em a: anestesia com aplicação intramuscular; b: tricotomia e antissepsia na região de flanco; c-d: incisão no flanco; e-f: divulsão por planos anatômicos; g: localização do ovário; h: laqueadura o chifre uterino e remoção do ovário; i: sutura por planos anatômicos.
- Figura 2 - Tratamento medicamentoso com ranelato de estrôncio 43  
Em a: ranelato de estrôncio disponível comercialmente; b: agulha de gavagem para ratos; c: gavagem com ranelato de estrôncio em rata.
- Figura 3 - Sequência cirúrgica de instalação de implante 44  
Em 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, diâmetro de 2 mm e altura de 4,0 mm; f-g: Instalação do implante com chave digital; h: sutura por planos.
- Figura 4 - Delineamento Experimental 45  
No dia 0: realizou-se a cirurgia de ovariectomia (grupos OVX e Ran-Sr) e cirurgia fictícia (SHAM); Dia 30: início do tratamento medicamentoso com ranelato de estrôncio (Ran-Sr); Dia 60: cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda das ratas de todos os grupos; Dia 102: eutanásia de N=6 animais por grupo para a análise de imunistoquímica (42 dias após a instalação dos implantes), e aplicação do fluorocromo alizarina nos demais animais (N=6/grupo); Dia 120: eutanásia do restante dos animais para análise de micro-CT e microscopia confocal (60 dias após a instalação dos implantes).
- Figura 5 - Reconstrução tridimensional por microtomografia computadorizada dos grupos SHAM, OVX e Ran-Sr pelo software CTVox 49  
Reconstrução 3D das tíbias com os implantes osseointegrados realizada pelo software CTVox nos grupos experimentais a:SHAM; b: OVX; c: Ran-Sr.

- Figura 6 - Fotomicrografias do aspecto histológico do tecido ósseo peri-implantar aos 42 dias após a instalação dos implantes 52
- Cortes histológicos mostrando as espiras após a remoção de implante nos animais representativos dos grupos SHAM (a e d), OVX (b e e) , e Ran-Sr (c e f). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Coloração Hematoxilina e Eosina- HE. Aumento original 12,5x (a-c) e 40x (d-f).
- Figura 7 - Imunomarcção para RUNX2 no tecido ósseo peri-implantar 54
- Imagens representativas das imunomarcções para RUNX2 nos grupos SHAM (a, d), OVX (b, e), e Ran-Sr (c, f). Marcação moderada (a, c, d, f) e imunomarcção intensa (b, e). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Símbolos: setas vermelhas: células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original 25x (a-c) e 40x (d-f). Barra de escala: 100µm (a-c) e 50µm (d-f).
- Figura 8 - Imunomarcção para ALP no tecido ósseo peri-implantar 55
- Fotomicrografias das imunomarcções para ALP nos grupos SHAM (a, d), OVX (b, e), e Ran-Sr (c, f). Marcação intensa (a, d), moderada (c, f) e leve (b, e). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Símbolos: setas vermelhas: células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original 25x (a-c) e 40x (d-f). Barra de escala: 100µm (a-c) e 50µm (d-f).
- Figura 9 - Imunomarcção para OPN no tecido ósseo peri-implantar 56
- Fotomicrografias das imunomarcções para OPN nos grupos SHAM (a), OVX (b) e Ran-Sr (c). Imunomarcção moderada (a,c) e leve (b). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Símbolos: setas vermelhas: células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original 25x (a-c). Barra de escala: 100µm (a-c) e 50µm (d-f).
- Figura 10 - Imunomarcção para OCN no tecido ósseo peri-implantar 57
- Fotomicrografias das imunomarcções para OCN nos grupos SHAM

(a), OVX (b) e Ran-Sr (c). Imunomarcacão moderada (a) e leve (b, c). O período de avaliao  42 dias após a instalao dos implantes. Símbolos: setas vermelhas: células imunomarcadas. Contra-colorao: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original 25x (a-c). Barra de escala: 100 µm (a-c).

Figura 11 - Imagens do osso peri-implantar obtidas pela microscopia confocal 62  
Área óssea peri-implantar marcada pelo vermelho de alizarina aos 42 dias após a instalao do implante. Eutanásia: 60 dias após a instalao dos implantes. Grupo SHAM (a); OVX (b); Ran-Sr (c). Aumento original 10x (a-c). Barra de escala: 100 µm (a-c).

*Lista de  
Tabelas*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escores das imunomarcações para as proteína RUNX2, ALP, OPN e OCN nos grupos experimentais SHAM, OVX e Ran-Sr 57  
Escores da imunomarcações: 1- marcação leve; 2- modera; 3- intensa.  
Período de avaliação: 42 dias após a instalação dos implantes.

*Lista de  
Gráficos*

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Parâmetro de BV obtido pela Micro-CT 58  
Valores obtidos de BV: SHAM: 0,04174mm<sup>3</sup>; OVX: 0,03938mm<sup>3</sup>; Ran-Sr: 0,04006mm<sup>3</sup>. Não houve diferença estatística entre os grupos( $p>0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.
- Gráfico 2 - Parâmetro de BV/TV obtido pela Micro-CT 58  
Valores obtidos de BV/TV: SHAM: 39,92%; OVX: 37,66%; Ran-Sr: 38,31%. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.
- Gráfico 3 - Parâmetro de Tb.Th obtido pela Micro-CT 59  
Valores obtidos de Tb.Th: SHAM: 0,0881mm; OVX: 0,07227mm; Ran-Sr: 0,0903mm. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.
- Gráfico 4 - Parâmetro de Tb.SP obtido pela Micro-CT 60  
Valores obtidos de Tb.Sp: SHAM: 0,1282mm; OVX: 0,1121mm; Ran-Sr: 0,1309mm. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.
- Gráfico 5 - Parâmetro de Tb.N obtido pela Micro-CT 60  
Valores obtidos de Tb.N: SHAM: 4,6523/mm; OVX: 5,3049/mm; Ran-Sr: 4,3477/mm. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.
- Gráfico 6 - Parâmetro de Po(Tot) obtido pela Micro-CT 61  
Valores obtidos de Po(Tot): SHAM: 60,08%; OVX: 62,34%; Ran-Sr: 61,69%. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

Gráfico 7 - Extensão linear de contato osso/implante 63

Valores obtidos da ELCOI: SHAM: 245,60 $\mu\text{m}$ ; OVX: 134,07 $\mu\text{m}$ ; Ran-Sr: 337,12 $\mu\text{m}$ . Houve diferença estatística entre os grupos: SHAM vs OVX =  $p < 0,05$ ; SHAM vs Ran-Sr =  $p < 0,005$ ; OVX vs Ran-Sr =  $p < 0,001$  (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,005$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ) . Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

Gráfico 8 - Área óssea neoformada 64

Valores obtidos da AON: SHAM: 8188,19 $\mu\text{m}^2$ ; OVX: 1281,41 $\mu\text{m}^2$ ; Ran-Sr: 7099,41 $\mu\text{m}^2$ . Houve diferença estatística entre os grupos: SHAM vs OVX =  $p < 0,0001$ ; SHAM vs Ran-Sr =  $p < 0,005$ ; OVX vs Ran-Sr =  $p < 0,0001$  (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,005$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

*Lista de*  
*Abreviaturas*

## LISTA DE ABREVIATURAS

% =	porcentagem
< =	menor
> =	maior
$\mu\text{m}$ =	micrômetro
$\mu\text{m}^2$ =	micrômetros quadrado
ALP =	fosfatase alcalina
AON =	área óssea neoformada
BV =	volume ósseo
BV/TV =	porcentagem de volume ósseo
CEUA =	Comissão de Ética no Uso de Animais
$\text{Cm}^2$ =	centímetros quadrados
EDTA =	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELCOI =	extensão linear de contato entre osso e implante
FOA =	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
g =	gramas
HE =	hematoxilina-eosina
LSMT =	laboratório para estudo de tecido mineralizado
M =	molar
mg/Kg =	miligramas por quilograma
ml/Kg =	mililitros por quilograma
ml =	mililitros
mm =	milímetros
$\text{mm}^2$ =	milímetros quadrados
$\text{mm}^3$ =	milímetros cúbicos
Nº =	número
OCN =	osteocalcina
OPN =	osteopontina
OPG =	osteoprotegerina
PBS =	tampão fosfato salino
pH =	potencial hidrogeniônico
Po(Tot) =	porosidade total

RANKL = receptor ativador do fator nuclear kappa- $\beta$  ligante  
ROI = área ao redor do implante  
RUNX2 = fator de transcrição relacionado à runt-2  
Tb.N = número de trabéculas  
Tb.Sp = separação entre trabéculas  
Tb.Th = espessura trabecular  
TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato  
UNESP = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
vs = versus  
x = vezes

# *Sumário*

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	34
<b>2. Objetivo</b> .....	38
<b>3. Metodologia</b> .....	40
3.1 Delineamento experimental .....	41
3.1.1 Ciclo estral .....	41
3.1.2 Castração bilateral – Cirurgia de ovariectomia .....	41
3.1.3 Tratamento medicamentoso – Ranelato de estrôncio .....	42
3.1.4 Cirurgia de instalação dos implantes.....	43
3.1.5 Aplicação do fluorocromo vermelho de alizarina .....	44
3.1.6 Eutanásia e obtenção das amostras .....	44
3.1.7 Grupos experimentais .....	45
3.2 Processamento laboratorial para análise histológica e imunoistoquímica .....	46
3.2.1 Coloração de HE – Análise histológica .....	46
3.2.2 Processamento imunoistoquímico .....	47
3.3 Análise microtomográfica .....	48
3.4 Análise por microscopia confocal .....	49
3.4.1 Análise histométrica – ELCOI e AON .....	50
3.5 Análise estatística .....	50
<b>4. Resultados</b> .....	51
4.1 Análise histológica .....	52
4.2 Análise imunoistoquímica .....	53
4.2.1 RUNX2 .....	53
4.2.2 ALP .....	54
4.2.3 OPN .....	55
4.2.4 OCN .....	56
4.3 Análise microtomográfica tridimensional .....	57
4.3.1 BV e BV/TV .....	57
4.3.2 Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N .....	59
4.3.3 Po(Tot) .....	61
4.4 Análise por microscopia confocal .....	61
4.4.1 Análise histométrica - ELCOI .....	62
4.4.2 Análise histométrica - AON .....	63

<b>5. Discussão</b> .....	65
<b>6. Conclusão</b> .....	70
<b>Referências</b> .....	72
<b>Anexos</b> .....	77
ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....	78

# *Introdução*

## 1. Introdução

O sucesso da reabilitação oral com implantes dentários é obtido pela união estrutural e funcional da interface osso-implante, sem a deposição de tecido conjuntivo (BRANEMARK et al. 1985; ALBREKTSON, 1989; SCHWARZ et al. 2013). Para a adequada integração do implante dentário, a qualidade do tecido ósseo é fundamental, logo, as características da microarquitetura óssea influenciam na habilidade em suportar a transmissão e distribuição das forças fisiológicas (LEUNG et al. 2001; ISIDOR, 2006; BENHAMOU, 2006; TABATA et al. 2011) A qualidade óssea é determinada pelas propriedades estruturais e materiais. Dentre as propriedades estruturais estão a geometria óssea, relacionada à forma e tamanho do osso, e a microarquitetura, que inclui o trabeculado ósseo e porosidade cortical. As propriedades materiais incluem a composição mineral e colágena. (BENHAMOU, 2006; MARTIN et al. 2010).

Uma das principais desordens esqueléticas é a osteoporose pós-menopáusia, com alta incidência na sociedade, tendo como características a redução da massa óssea decorrendo em aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade de fratura devido à deficiência de estrógeno no organismo associada ao envelhecimento. (RIGGS et al., 2002; KRIBBS, 1990).

A porcentagem de contato entre tecido ósseo e implantes instalados na tíbia de ratas Wistar ovariectomizadas foi analisada, mostrando que a redução da massa óssea nas ratas osteoporóticas promoveu menor área de contato entre o osso e o implante, podendo ocasionar menor habilidade no suporte das próteses (YAMAZAKI et al. 1999 e OZAWA et al. 2002).

Segundo Albrektsson, 1987, durante a preparação do leito ósseo que receberá o implante osseointegrável, pode ocorrer necrose óssea, que posteriormente deverá ser substituída por um novo tecido ósseo, processo de extrema importância para a osseointegração (ALBREKTSSON et al. 1987). Em condições de osteoporose há um retardamento da osseointegração (BEPPU et al. 2011). Portanto, a condição de osteoporose e o desequilíbrio na taxa de remodelação óssea observado levam a situações clínicas que exigem maiores cuidados. Um plano de tratamento adequado deve ser executado pelo profissional, modificando a geometria do implante, utilizando diâmetro maior do implante e com

tratamento de superfície. Desta forma, a osteoporose não é uma contraindicação absoluta para a cirurgia de implantes, devendo, entretanto, ser realizada uma análise acurada da disponibilidade óssea por meio de tomografia computadorizada. (DE MEDEIROS et al. 2017; GAETTI-JARDIM et al. 2011).

O tratamento da osteoporose é prioridade para a saúde pública de acordo com a Fundação Internacional de Osteoporose 2009. Um terço das mulheres com mais de 50 anos são afetadas pela doença, com riscos iminentes de sofrer algum tipo de fratura. Em revisão, Tella e Gallagher, 2014, realizaram um levantamento sobre os tipos de tratamentos referentes à osteoporose, podendo ser através do uso de agentes farmacológicos ou não. A terapia farmacológica pode ser classificada através de agentes anti-reabsortivos e anabólicos. Os bifosfonatos, moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMS) e denosumab constituem o grupo de anti-reabsortivos. Já o paratormônio (PTH) e o ranelato de estrôncio pertencem ao grupo de agentes anabólicos, que favorecem a neoformação óssea (SIBAI et al.2011; HAMDY, 2009).

O ranelato de estrôncio é um fármaco desenvolvido para o tratamento da osteoporose pós-menopáusia (BRENNAN T et al. 2009). Consiste em dois átomos de estrôncio estável e uma porção orgânica (ácido ranélico). Sua atuação consiste em estimular a neoformação e suprimir a reabsorção óssea (MARIE P et al. 2001). Com relação ao seu mecanismo de ação, ainda existem dúvidas que vêm sendo discutidas (MARIE PJ, 2006). Hurtel et al. 2009, acredita que o medicamento atua através da ativação do receptor sensível de cálcio e ocasiona 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. 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 (GRYNPAS M et al. 1990; MARIE PJ et al. 2005). Em estudos em humanos, o tratamento com ranelato de estrôncio aumentou a densidade óssea mineral (MEUNIER et al. 2002) e diminuiu o risco de fratura vertebral (MEUNIER et al. 2004)

Um processo natural de envelhecimento ocorre na população e em decorrência disto, há um aumento na procura por tratamentos reabilitadores em clínicas odontológicas, seja para instalação de implantes dentários ou outros procedimentos envolvendo tecido ósseo. Grande parte destes pacientes apresenta

algum tipo de desordem sistêmica, bem como a osteoporose. Dentro dessa realidade, para que consigamos atingir um processo de reabilitação desejável faz-se necessário o conhecimento do tipo de interferência sistêmica que o paciente apresenta, além da terapia medicamentosa utilizada no tratamento, no intuito de se obter uma reabilitação satisfatória e com tecido ósseo de melhor qualidade. Sendo assim, foi proposto utilizar modelo animal com deficiência de estrógeno através da ovariectomia em ratas adultas (6 meses), como já preconizado na literatura (HA BJ, 2004; MUTHUSAMI S et al. 2005; OZTEKIN E et al.2006; FOLWARCZNA J et al. 2010), para avaliar o processo de reparo peri-implantar em ratas submetidas ao tratamento com ranelato de estrôncio.

*Objetivo*

## 2. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o processo de reparo ósseo na interface osso/implante em ratas com deficiência de estrógeno e tratadas com ranelato de estrôncio. Tal avaliação consistiu em avaliação histológica do processo de reparo peri-implantar; análise imunoistoquímica direcionada para os seguintes imunomarcadores: RUNX2 (fator de transcrição relacionado à runt-2), ALP (fosfatase alcalina), OPN (osteopontina) e OCN (osteocalcina), envolvidos na diferenciação das células da linhagem osteoblástica; análise microtomográfica, para os parâmetros de BV/TV (porcentagem de volume ósseo) BV (volume ósseo), Tb.Th (espessura trabecular), Tb.N (número de trabéculas), Tb.Sp (separação de trabéculas) e Po(Tot) (porosidade total); e análise por microscopia confocal para determinar a ELCOI (extensão linear de contato osso/implante) e AON (área óssea neoformada).

*Metodologia*

### **3. Metodologia**

No presente estudo foram utilizadas 36 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), 6 meses, adultas, e peso corporal compreendido ao redor de 300g. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela ARRIVE Guidelines (KILKENNY et al. 2010), o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP (PROCESSO CEUA Nº 2015-00616) (Anexo 1).

#### **3.1 Delineamento experimental**

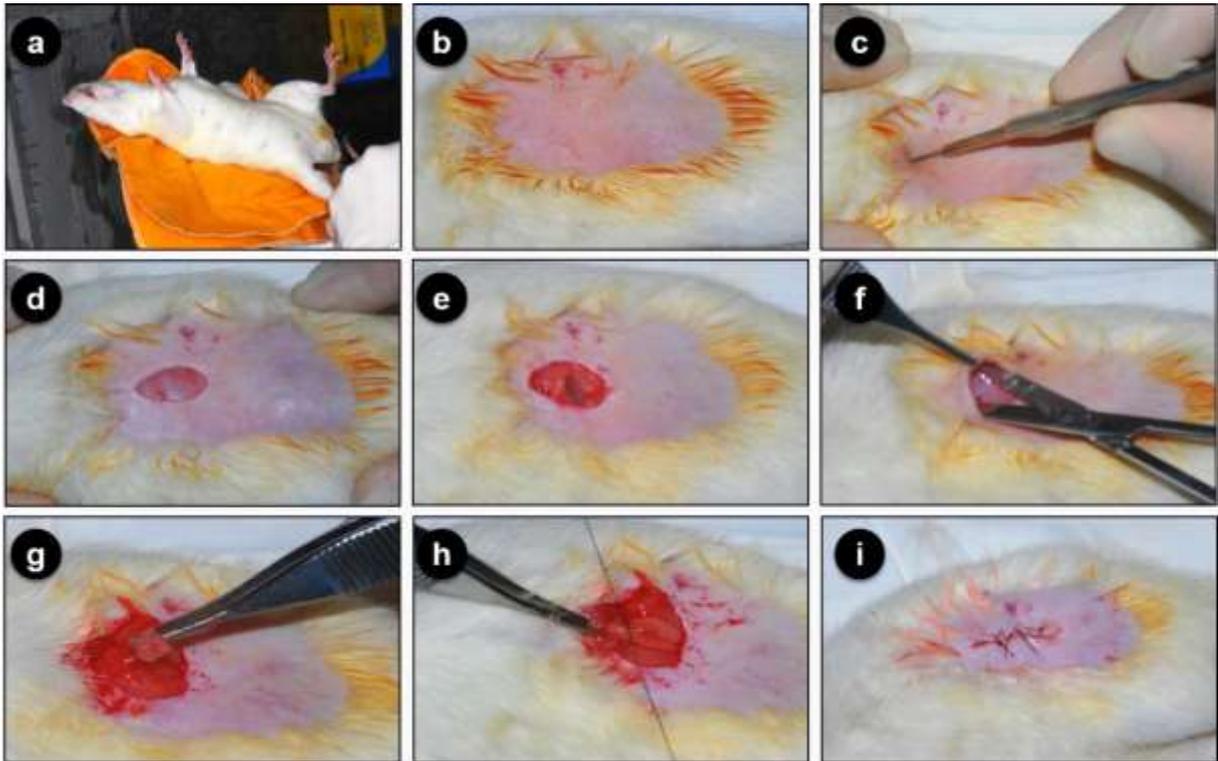
##### **3.1.1 Ciclo estral**

Para garantir que as ratas utilizadas nos experimentos estavam ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foi introduzido no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, aspirada e colocada em lâmina de histologia para leitura microscópica imediata (técnica de Evans e Long, 1922) para reconhecimento das fases do ciclo estral. As ratas foram utilizadas após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares.

##### **3.1.2 Castração Bilateral – Cirurgia de Ovariectomia**

As 36 ratas 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, a seguir, realizadas incisões em ambos os flancos, com a exposição dos ovários e remoção cirúrgica dos mesmos. Para os grupos SHAM, 12 ratas foram submetidas somente ao acesso aos ovários, sem a remoção, com o intuito de submeter às ratas ao mesmo estresse cirúrgico, como as ovariectomizadas (Figura 1).

**Figura 1 – Sequência cirúrgica de ovariectomia**



Fonte: Elaborado pelo autor. Em **a**: anestesia com aplicação intramuscular; **b**: tricotomia e antissepsia na região de flanco; **c-d**: incisão no flanco; **e-f**: divulsão por planos anatômicos; **g**: localização do ovário; **h**: laqueadura o chifre uterino e remoção do ovário; **i**: sutura por planos anatômicos.

### 3.1.3 Tratamento Medicamentoso – Ranelato de Estrôncio

Passados 30 dias da ovariectomia, as ratas do grupo Ran-Sr foram submetidas ao tratamento com ranelato de estrôncio. O medicamento foi administrado para as ratas diariamente na dose de 625mg/kg/dia dissolvido em solução aquosa por gavagem com auxílio de uma agulha de gavagem para ratos corroborando com os estudos de Bain et al. 2009 e Zacchetti et al. 2014 (Figura 2). Esta medicação permaneceu até o término do experimento (eutanásia dos animais), totalizando 72 e 90 dias de administração, respectivamente.

**Figura 2 – Tratamento medicamentoso com ranelato de estrôncio**



Fonte: Elaborado pelo autor. Em **a**: ranelato de estrôncio disponível comercialmente; **b**: agulha de gavagem para ratos; **c**: gavagem de ranelato de estrôncio em rata.

### 3.1.4 Cirurgia de instalação dos implantes

Após 30 dias do início do tratamento medicamentoso, as 36 ratas submetidas à cirurgia de instalação dos implantes. As ratas foram novamente anestesiadas pela combinação Ketamina intramuscular e cloridrato de xilazina e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/kg, Scandicaína 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

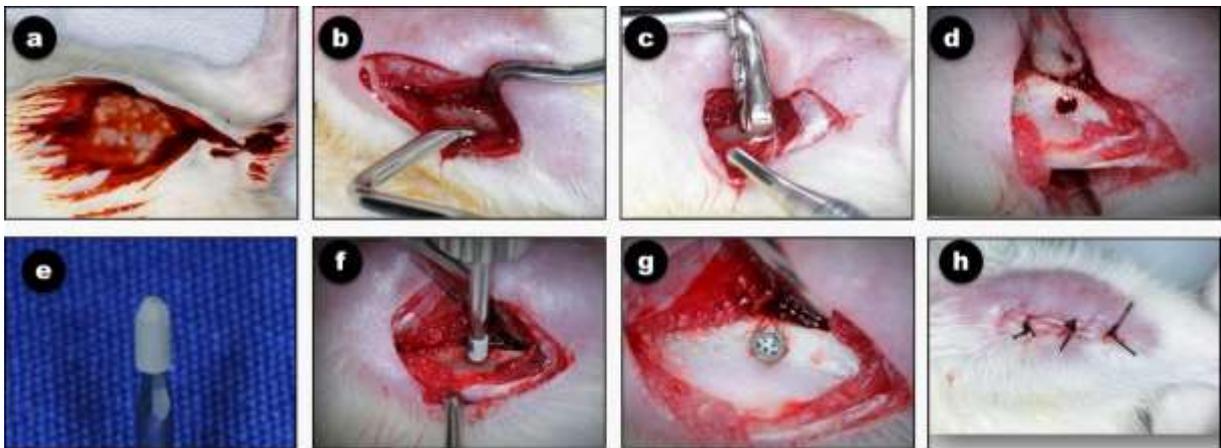
Seguinte à sedação dos animais foi realizada a tricotomia na porção medial da tíbia direita e esquerda e, antissepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico (Figura 3,a). Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm de comprimento na região de metáfise tibial esquerda e direita e a seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes (Figura 3,b-d).

Foram instalados 72 implantes de titânio comercialmente puro grau IV com superfície tratada por duplo ataque ácido (ácidos nítrico, fluorídrico e sulfúrico), com diâmetro de 2.0mm e altura de 4.0mm, esterilizados por raios gama (Figura 3,e). A fresagem foi realizada com fresa espiral de 1.4mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação 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 4.0mm, com travamento e estabilidade inicial (Figura 3,f-g).

Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada metáfise tibial. Os tecidos foram suturados em planos empregando-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 externo (Figura 3,h).

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

**Figura 3 – Sequência cirúrgica de instalação de implante**



Fonte: Elaborado pelo autor. Em **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, diâmetro de 2 mm e altura de 4,0 mm; **f-g**: Instalação do implante com chave digital; **h**: sutura por planos.

### 3.1.5 Aplicação do fluorocromo vermelho de Alizarina

Para a análise de epifluorescência e histométrica, 6 ratas de cada grupo (SHAM, OVX e Ran-Sr) receberam uma injeção do fluorocromo vermelho de Alizarina por via intramuscular na dosagem de 20mg/kg aos 42 dias após instalação dos implantes (RAMALHO-FERREIRA et al. 2015) com o intuito de quantificar a área de precipitação desse fluorocromo no tecido ósseo aos 42 dias (osso novo), e a eutanásia foi realizada aos 60 dias depois da instalação dos implantes.

### 3.1.6 Eutanásia e obtenção das amostras

Para eutanásia, os animais foram anestesiados em dose letal. Decorridos 42 dias após a instalação dos implantes, foi realizado a eutanásia de 18 animais (Nº=6/grupo), foram removidas as tíbias direita e esquerda, e fixadas em

solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) para as análises histológica e imunoistoquímica, e os outros 18 animais (Nº=6/grupo) foram sacrificados após 60 dias da instalação dos implantes, as tíbias do lado direito e esquerdo foram removidas, e armazenadas em álcool 70% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) para a análise microtomográfica e por microscopia confocal.

Ilustração didática do cronograma do delineamento experimental na Figura 4.

**Figura 4 – Delineamento Experimental**



Fonte: Elaborado pelo autor. No dia 0: realizou-se a cirurgia de ovariectomia (grupos OVX e Ran-Sr) e cirurgia fictícia (SHAM); Dia 30: início do tratamento medicamentoso com ranelato de estrôncio (Ran-Sr); Dia 60: cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda das ratas de todos os grupos; Dia 102: eutanásia de N=6 animais por grupo para a análise de imunoistoquímica (42 dias após a instalação dos implantes), e aplicação do fluorocromo alizarina nos demais animais (N=6/grupo); Dia 120: eutanásia do restante dos animais para análise de micro-CT e microscopia confocal (60 dias após a instalação dos implantes).

### 3.1.7 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: SHAM, OVX e Ran-Sr.

**Grupo SHAM:** Nº=12 ratas. Foram submetidas à cirurgia de ovariectomia fictícia, na qual houve apenas a exposição dos ovários sem a sua remoção. Após 60 dias da cirurgia fictícia, foi realizada a cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda, e decorridos 42 e 60 dias pós-operatórios, 6 ratas de cada grupo foram submetidas à eutanásia.

**Grupo OVX:** Nº=12 ratas. Foram submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral. Após 60 dias da cirurgia de ovariectomia, foi realizada a cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda. A eutanásia foi realizada em 6 ratas de cada grupo aos 42 e 60 dias após a cirurgia de instalação dos implantes.

**Grupo Ran-Sr:** N<sup>o</sup>=12 ratas. Foram submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral. Após 30 dias da cirurgia de ovariectomia, foi realizado o início do tratamento medicamentoso com ranelato de estrôncio na dose de 625mg/kg/dia, por meio de gavagem diária até a eutanásia. Decorridos 30 dias após o início do tratamento medicamentoso, foi realizada a cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda. A eutanásia foi realizada em 6 ratas de cada grupo aos 42 e 60 dias após a cirurgia de instalação dos implantes.

### **3.2 Processamento laboratorial para análise histológica e imunoistoquímica**

Após a eutanásia dos animais (n= 18), 42 dias após a instalação dos implantes, as metáfises tibiais esquerda e direita das ratas foram removidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas.

Posteriormente foi realizada a descalcificação das tíbias em EDTA (20%) por cinco semanas, seguida pela desidratação com uma sequência de álcoois. Fez-se, após a desidratação, a diafanização com xilol e inclusão das peças em parafina.

A partir das peças em parafina, foram obtidas cortes com 6 µm de espessura e montados em lâminas.

Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) permitindo a análise histológica e lâminas foram separadas para as reações de imunoistoquímica.

#### **3.2.1 Coloração HE – Análise histológica**

Foi realizado o processamento das lâminas com a coloração de hematoxilina e eosina e, posteriormente, a análise dos resultados histológicos, com a utilização da câmera de captura de imagem (Leica DFC 300 FX, Leica microsystem, Heerbrugg, Switzerland) acoplada a um microscópio de luz (leica Aristoplan Microsystem- Leitz, Benshein, Alemanha), em aumento final de 12,5x e 40x.

### 3.2.2 Processamento imunoistoquímico

O processamento imunoistoquímico foi realizado no Laboratório para estudo de tecidos mineralizados (LSMT) do Departamento de Ciências Básicas da FOA/UNESP.

Foi utilizado o método de detecção por imunoperoxidase e os cortes em parafina foram selecionados para a realização da imunomarcagem contra as proteínas RUNX2, OPN, OCN e ALP, com o intuito de caracterizar o fenótipo osteoblástico, bem como os diferentes estágios da diferenciação das células e processo de mineralização durante o processo de osseointegração avaliados.

O processamento imunoistoquímico iniciou-se pelas etapas de desparafinização (manutenção dos cortes em estufa durante 20 minutos, seguidos banhos em citrisolve e banhos em concentrações decrescente de álcoois) e finalizando com a hidratação dos cortes imersos em PBS (solução de tampão fosfato salina 0,01M). A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio e, na etapa seguinte, as lâminas passaram pela recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0) em calor úmido. Foi realizado ainda o bloqueio da biotina endógena com leite desnatado por 20 minutos. Ainda como método de bloqueio de marcações inespecíficas, o anticorpo primário foi preparado em solução de tampão fosfato e albumina bovina a 1%.

Os anticorpos primários utilizados foram contra RUNX2 (SC8566), OPN (SC10593), OCN (SC18319) e ALP(SC23430), anticorpos policlonais, produzidos em cabra. O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotilado anti-cabra, produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). O sinal da reação foi amplificado através da incubação em avidina e biotina (Kit ABC standard, Vector Laboratories) e a reação foi revelada utilizando a Diaminobenzidina (Dako laboratories). Ao término das reações imunoistoquímicas, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Na sequência, as lâminas passaram pelas etapas de desidratação, embebidas em xilol, as lamínulas foram montadas para posterior análise em microscópio óptico (Nikon, Eclipse 80i, Shinagawa, Tokyo, Japão), objetiva de 25x.

Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas por análise qualitativa ordinal através da atribuição de diferentes escores de acordo com a quantidade de células e área de matriz extracelular imunomarcadas durante o processo de osseointegração. Os resultados foram apresentados na forma de tabelas mostrando o escore representativo dos grupos e

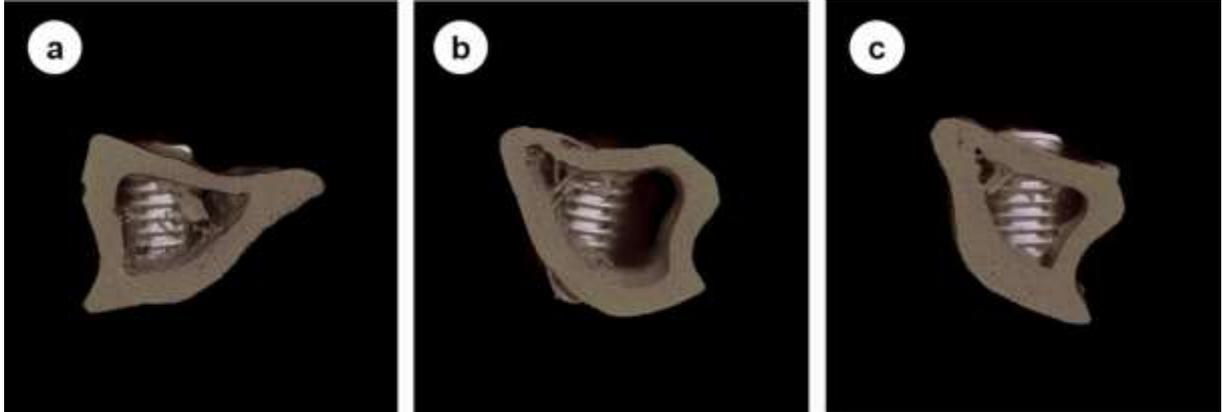
períodos experimentais analisados. O analisador foi submetido ao teste Kappa onde o índice acima de 0,8 foi obtido, mostrando que os escores observados foram consistentes. Os escores utilizados representam 0 (ausência de marcação), 1 (marcação leve), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação intensa).

### 3.3 Análise microtomográfica

Para a análise de micro-CT, após a eutanásia dos animais (Nº= 18), 60 dias após a instalação dos implantes, as tíbias do lado esquerdo de 6 animais dos grupos SHAM, OVX, Ran-Sr foram removidas, reduzidas à área de instalação dos implantes e armazenadas em álcool 70% (Reagentes Analíticos<sup>®</sup>, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil). As peças foram primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (FOA/UNESP). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0,3mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e passaram por uma série de programas. Primeiramente as imagens passaram pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0) que fez a reconstrução 2D a partir dos cortes tomográficos. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens reconstruídas foram adequadas em posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizamos o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), onde definimos a área ao redor do implante (ROI) delimitada por 0,5mm em torno de todo o implante. Esta área foi definida como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- ROI 4,5mm x 3,2mm). O software CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com a escalas de cinza (*threshold*). O *threshold* utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitou a obtenção do volume de osso formado ao redor dos implantes. A fórmula utilizada para o cálculo da área de osso formado de interesse foi: Área Total – Área Plataforma = Área de formação óssea. A partir da localização da área de interesse, o software realizou o cálculo morfométrico aplicado à ROI por meio dos parâmetros porcentagem de volume ósseo (BV/TV), volume ósseo (BV) número de trabéculas (Tb.N), separação entre as trabéculas

(Tb.Sp), espessura do trabeculado (Tb.Th) e porosidade total (Po(Tot)). Utilizamos também o software CTVox que fez a reconstrução 3D das imagens (Figura 5).

**Figura 5 - Reconstrução tridimensional por microtomografia computadorizada dos grupos SHAM, OVX e Ran-Sr pelo software CTVox**



Fonte: Elaborado pelo autor. Reconstrução 3D das tíbias com os implantes osseointegrados realizada pelo software CTVox nos grupos experimentais a:SHAM; b: OVX; c: Ran-Sr.

### 3.4 Análise por microscopia confocal

Para a análise de microscopia confocal, as tíbias direitas de 6 animais de cada grupo foram lavadas em água corrente por 24 horas e, em seguida reduzidas. Após isso, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 90 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 5 dias, em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec - Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas.

Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até que se utilizou apenas a resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit e fotopolimerizada e passou pelo protocolo de processamento do Exakt.

O corte e o desgaste das peças foram realizados no plano méso-distal utilizando o sistema de corte Exakt (Exakt Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 70µm de espessura.

Os cortes foram capturados pelo microscópio a laser confocal Leica CTR 4000 CS SPE (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha), utilizando uma objetiva

de 10x. Sendo assim, a microscopia confocal obteve imagens do fluorocromo vermelho de Alizarina com o intuito de analisar a área de precipitação desse fluorocromo aos 42 dias (osso novo).

#### **3.4.1 Análise histométrica – ELCOI e AON**

Após a análise por microscopia confocal a laser, as imagens foram submetidas à análise histométrica (ELCOI e AON). As imagens obtidas a partir de microscópio óptico (Zeiss, Alemanha), acoplado a uma câmera digital e a um microcomputador foram salvas em arquivo TIFF e transportadas para o programa (ImageJ® 2.1.4.7.i1). Assim, foram calculadas a extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI) e a área de osso neoformado (AON) na região da terceira à quinta espira de cada lado do implante, à semelhança da metodologia de Ramalho-Ferreira et al. (2015). Como cada implante presente na lâmina foi uma unidade para a análise, as leituras foram realizadas nos dois lados do implante, de forma que sua média foi considerada como valor representativo da unidade.

### **3.5 Análise Estatística**

A análise estatística, realizada para a análise de micro-CT (BV/TV BV, Tb.Th, Tb.N, Tb.Sp e Po(Tot)) e microscopia confocal (ELCOI e AON), foi feita utilizando o programa GraphPad Prism 7.01. Para seleção do dado estatístico adequado foram realizados testes de homogeneidade e homocedasticidade (*Shapiro-Wilk*). A análise estatística foi realizada através da aplicação de testes paramétricos ou não paramétricos. Para a comparação entre os resultados obtidos no grupo SHAM, OVX e Ran-Sr foi aplicado o teste de variância (*One Way ANOVA*) seguido do pós-teste de *Tukey* quando necessário. Para todas as análises estatísticas foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

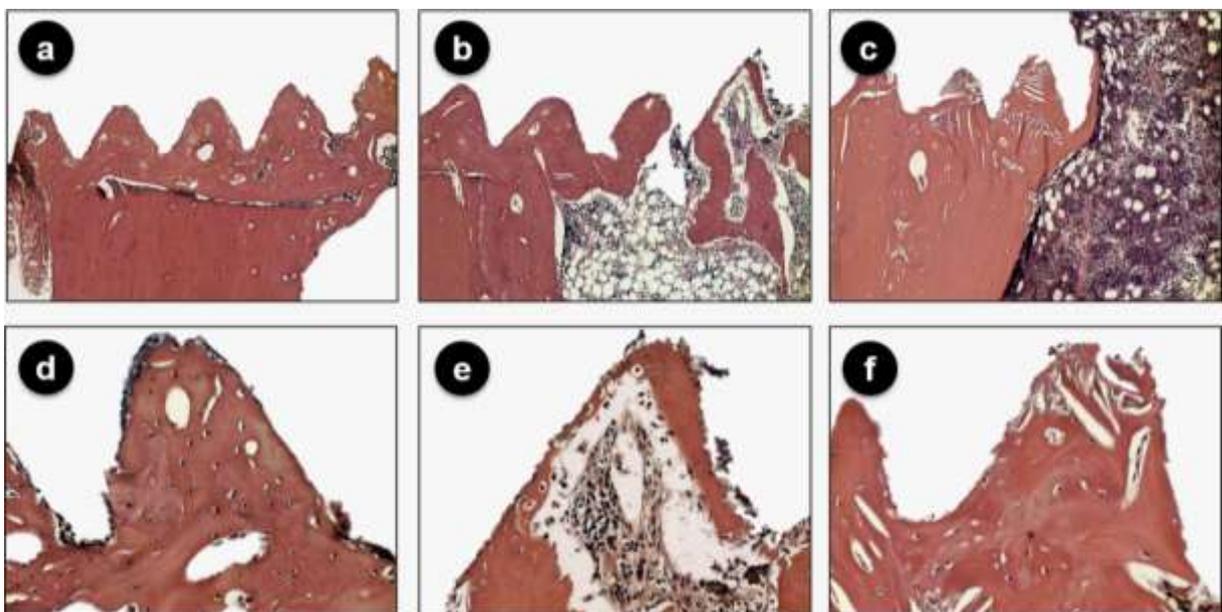
# *Resultados*

## 4. Resultados

### 4.1 Análise histológica

A análise histológica aos 42 dias após a instalação de implantes mostra que o reparo peri-implantar no grupo SHAM mostrou maior grau de corticalização na área de osseointegração em todos os espaços correspondentes ao redor dos implantes, com formação de tecido ósseo maduro, com lamelas concêntricas. No grupo com deficiência de estrógeno (OVX), houve formação de novo osso com corticalização apenas nas primeiras espiras dos implantes, e nas porções mais superficiais. Na porção medular, pequena área de formação óssea foi observada em contraposição à grande quantidade de tecido adiposo observado nesta região. No grupo osteoporótico tratado com ranelato de estrôncio (Ran-Sr), foi observada uma melhora na maturação do tecido ósseo peri-implantar com imagens histológicas muito próximas às do grupo SHAM (Figura 6).

**Figura 6 - Fotomicrografias do aspecto histológico do tecido ósseo peri-implantar aos 42 dias após a instalação dos implantes**



Fonte: Elaborado pelo autor. Cortes histológicos mostrando as espiras após a remoção de implante nos animais representativos dos grupos SHAM (a e d), OVX (b e e), e Ran-Sr (c e f). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Coloração Hematoxilina e Eosina-HE. Aumento original 12,5x (a-c) e 40x (d-f).

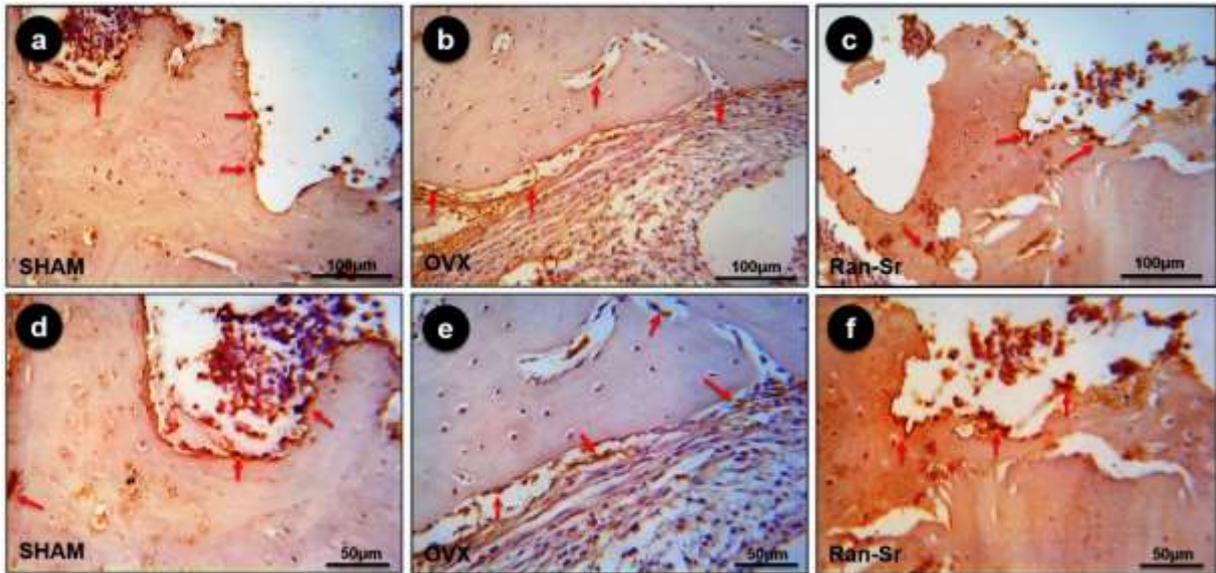
## **4.2. Análise Imunoistoquímica**

As imunomarcações foram avaliadas na região de tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes e com o objetivo de caracterizar as etapas de diferenciação das células da linhagem osteoblástica, observando-se a presença do fator de transcrição RUNX2, que apresenta-se positivo em pré-osteoblastos e osteoblastos mais jovens. A presença da fosfatase alcalina (ALP), positiva em células da linhagem osteoblástica e marcando a atividade de precipitação de fosfato sobre a matriz orgânica a base de colágeno tipo I. A osteopontina (OPN), positiva para células da linhagem osteoblástica e marcando a atividade de precipitação de cálcio sobre a matriz orgânica a base de colágeno tipo I, e por fim, a osteocalcina (OCN), que marca osteoblastos mais maduros no final de fase de mineralização de cálcio sobre a matriz orgânica de colágeno. Os resultados estão ilustrados na Tabela 1.

### **4.2.1 RUNX2**

A RUNX2 apresentou-se marcada positivamente nos três grupos experimentais. Nos animais SHAM, observou-se moderada marcação em células da linhagem osteoblástica, ao redor do tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes. Vale destacar que neste grupo, evidenciou-se osso formado junto às espiras e as marcações positivas para este fator de transcrição foram observadas ao redor do tecido ósseo formado. Já no grupo OVX, observou-se intensa marcação de pré-osteoblastos, positivos para RUNX2, presentes no tecido conjuntivo junto às espiras dos implantes. Pouco osso foi observado junto às espiras dos implantes e o tecido conjuntivo ocupou a maior parte da área de interesse analisado. Apesar de ser observada intensa marcação para a RUNX2 neste grupo experimental, é importante destacar que a marcação estava junto ao tecido não mineralizado, o que mostrou o atraso na resposta de osseointegração. Quando foi analisado o grupo tratado com ranelato de estrôncio (Ran-Sr), foi observado um padrão de imunomarcação muito semelhante ao grupo SHAM, com marcações de células da linhagem osteoblástica jovens no tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes. (Figura 7).

**Figura 7 – Imunomarcção para RUNX2 no tecido ósseo peri-implantar**

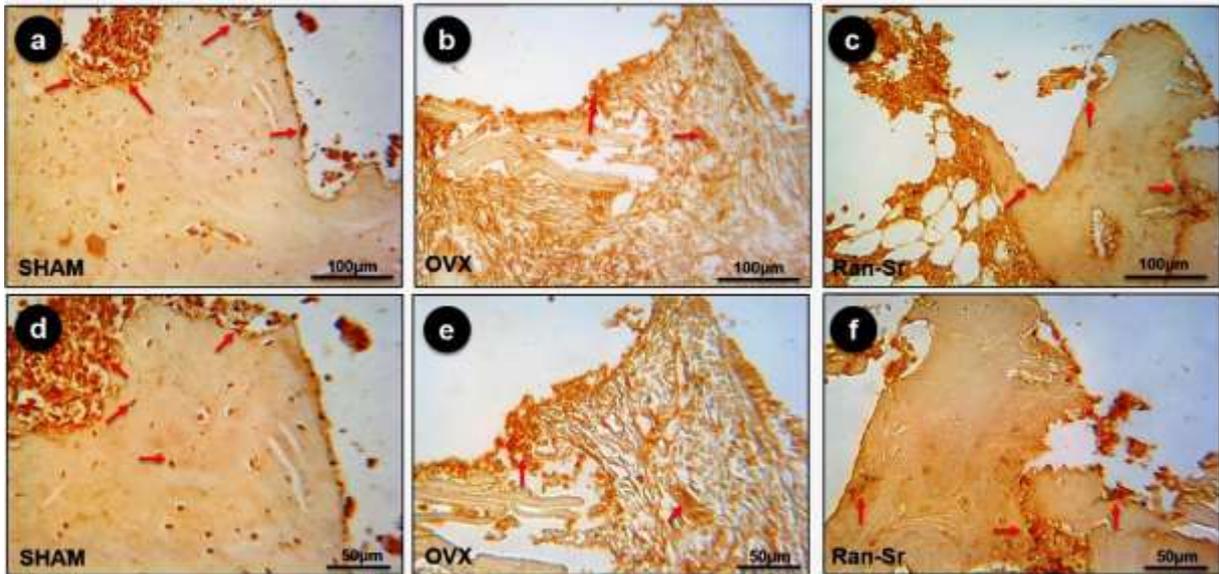


Fonte: Elaborado pelo autor. Imagens representativas das imunomarcações para RUNX2 nos grupos SHAM (a, d), OVX (b, e), e Ran-Sr (c, f). Marcação moderada (a, c, d, f) e imunomarcção intensa (b, e). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Símbolos: setas vermelhas: células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original 25x (a-c) e 40x (d-f). Barra de escala: 100µm (a-c) e 50µm (d-f).

#### 4.2.2 ALP

Intensa marcação para ALP foi observada no grupo SHAM, com importante marcação de osteoblastos presentes junto ao tecido ósseo ao redor das espiras dos implantes. Nos animais OVX foi observada uma discreta marcação para fosfatase alcalina, destacando-se que neste grupo foi observado pouco tecido ósseo presente junto às espiras dos implantes, havendo predominância de tecido conjuntivo nesta região. Após o tratamento com ranelato de estrôncio (Ran-Sr), foi observada moderada marcação para fosfatase alcalina nos osteoblastos presentes no tecido ósseo ao redor das espiras dos implantes (Figura 8).

**Figura 8 – Imunomarcacão para ALP no tecido ósseo peri-implantar**

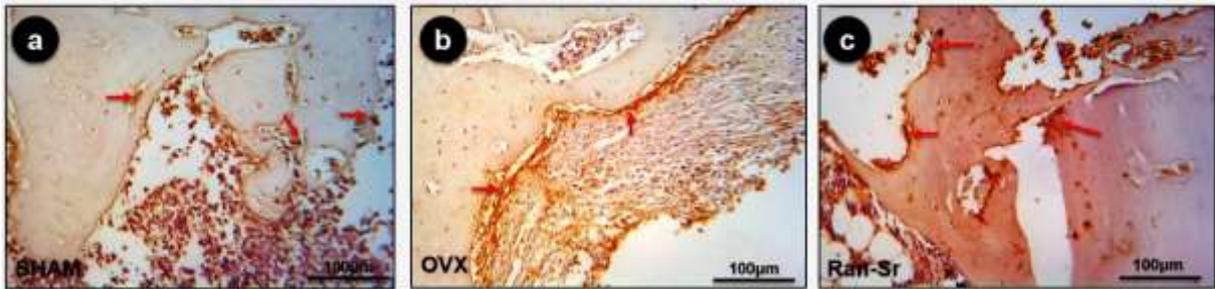


Fonte: Elaborado pelo autor. Fotomicrografias das imunomarcacões para ALP nos grupos SHAM (a, d), OVX (b, e), e Ran-Sr (c, f). Marcação intensa (a, d), moderada (c, f) e leve (b, e). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Símbolos: setas vermelhas: células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original 25x (a-c) e 40x (d-f). Barra de escala: 100µm (a-c) e 50µm (d-f).

#### 4.2.3 OPN

A osteopontina apresenta importante marcação para células da linhagem osteoblástica, no início da precipitação de cálcio sobre a matriz mineralizada. Conseqüentemente, esta proteína apresenta-se marcada nas linhas cementantes/linhas de reversão do tecido ósseo. Importante destacar também a presença desta proteína junto às células de revestimento do tecido ósseo, osteoblastos quiescentes, que ficam com a morfologia achatada junto ao tecido ósseo. Nos espécimes analisados foi possível observar estas características de marcação da OPN principalmente nos grupos SHAM e Ran-Sr. Nos animais SHAM, observou-se moderada marcação, especialmente para as células do endóstio, recobrando o tecido ósseo junto às espiras dos implantes. Marcação com características muito semelhantes foi observada no grupo Ran-Sr. Em ambos os grupos foi possível observar marcação positiva para a osteopontina nas linhas cementantes/linhas de reversão do tecido ósseo. Já no grupo OVX foi observada discreta marcação no tecido conjuntivo. Em alguns pontos onde foi observado o tecido ósseo cortical, foi possível visualizar as linhas cementantes. Neste último grupo pouco tecido ósseo foi observado junto às espiras dos implantes, mostrando mais uma vez o atraso no processo de osseointegração (Figura 9).

**Figura 9 – Imunomarcção para OPN no tecido ósseo peri-implantar**

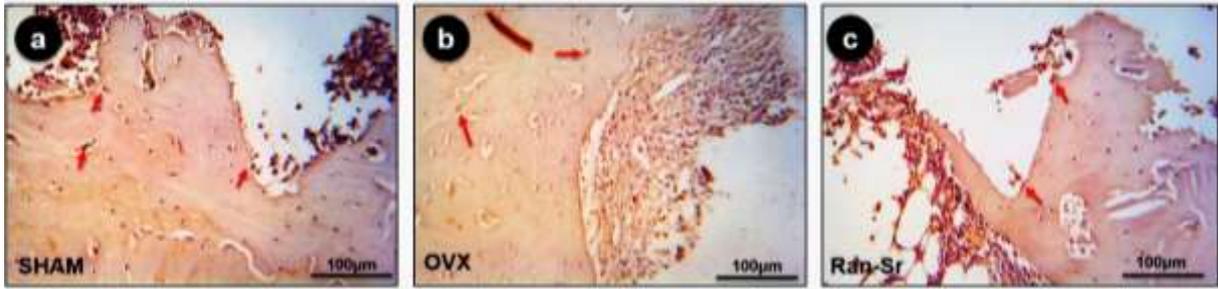


Fonte: Elaborado pelo autor. Fotomicrografias das imunomarcções para OPN nos grupos SHAM (a), OVX (b) e Ran-Sr (c). Imunomarcção moderada (a,c) e leve (b). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Símbolos: setas vermelhas: células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original 25x (a-c). Barra de escala: 100µm (a-c) e 50µm (d-f).

#### 4.2.4 OCN

A osteocalcina que apresenta-se marcada em osteoblastos na etapa final de mineralização, caracterizando um tecido ósseo mais maduro. No grupo SHAM, a OCN mostrou-se marcada principalmente em osteócitos presentes no tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes, com marcação caracterizada como moderada. Vale destacar que, a presença dos osteócitos marcados positivamente para a osteocalcina caracteriza o grau de maturidade do osso formado próximo aos implantes. No grupo OVX foi observada presença positiva para OCN em células semelhantes a osteoblastos em tecido conjuntivo, sem apresentar características de mineralização. Já no grupo Ran-Sr foi observado tecido ósseo junto às espiras dos implantes, com discreta marcação positiva para osteocalcina nos osteócitos desta região. Assim, em comparação ao grupo SHAM, o padrão do tecido ósseo formado após o tratamento com ranelato de estrôncio mostrou-se com atividade precoce de mineralização e por este motivo, com discreta presença da osteocalcina nos osteócitos (Figura 10).

**Figura 10 – Imunomarcção para OCN no tecido ósseo peri-implantar**



Fonte: Elaborado pelo autor. Fotomicrografias das imunomarcações para OCN nos grupos SHAM (a), OVX (b) e Ran-Sr (c). Imunomarcção moderada (a) e leve (b, c). O período de avaliação é 42 dias após a instalação dos implantes. Símbolos: setas vermelhas: células imunomarcadas. Contra-coloração: *Hematoxilina de Harris*. Aumento original 25x (a-c). Barra de escala: 100 µm (a-c).

**Tabela 1: Escores das imunomarcações para as proteína RUNX2, ALP, OPN e OCN nos grupos experimentais SHAM, OVX e Ran-Sr**

Grupos	RUNX-2	ALP	OPN	OCN
SHAM	2	3	2	2
OVX	3	1	1	1
Ran-Sr	2	2	2	1

Fonte: Elaborado pelo autor. Escores da imunomarcações: 1-macação leve; 2-modera; 3-intensa. Período de avaliação: 42 dias após a instalação dos implantes.

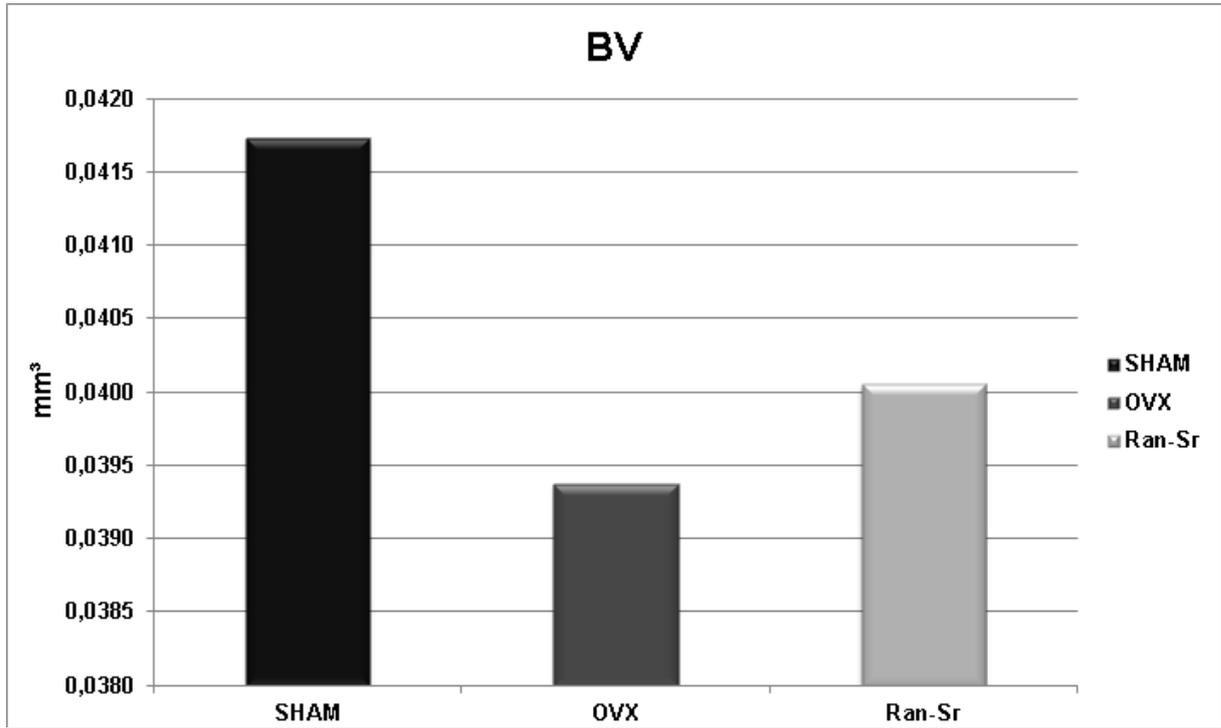
### 4.3. Análise Microtomográfica

Na a análise de Micro-CT, foi avaliado os parâmetros de volume ósseo (BV), percentual de volume ósseo (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (TB.N), separação de trabéculas (Tb.Sp) e porosidade total (Po(Tot)).

#### 4.3.1 BV e BV/TV

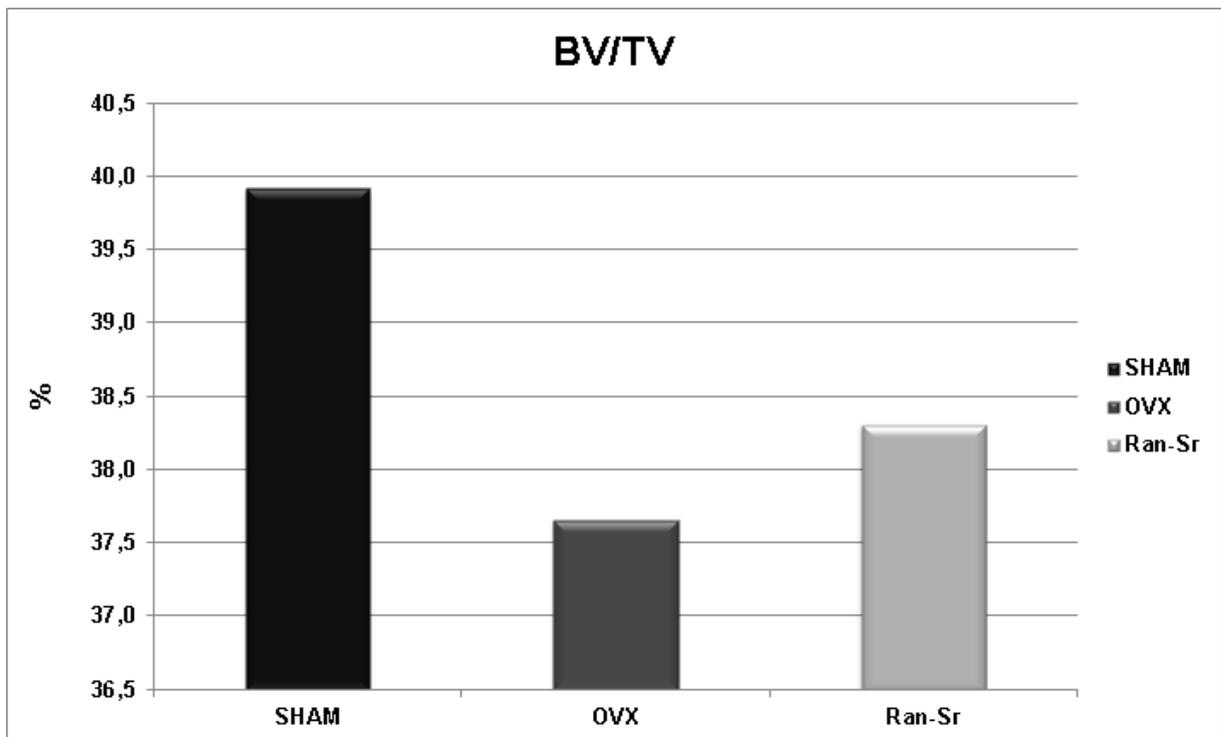
Nos parâmetros de BV e BV/TV, o grupo SHAM foi o que apresentou os maiores valores de volume e porcentagem de volume ósseo, seguidos do grupo Ran-Sr, e os menores valores foi no grupo OVX, porém sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1: Parâmetro de BV obtido pela Micro-CT



Fonte: Elaborado pelo autor. Valores obtidos de BV: SHAM: 0,04174mm<sup>3</sup>; OVX: 0,03938mm<sup>3</sup>; Ran-Sr: 0,04006mm<sup>3</sup>. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

Gráfico 2: Parâmetro de BV/TV obtido pela Micro-CT

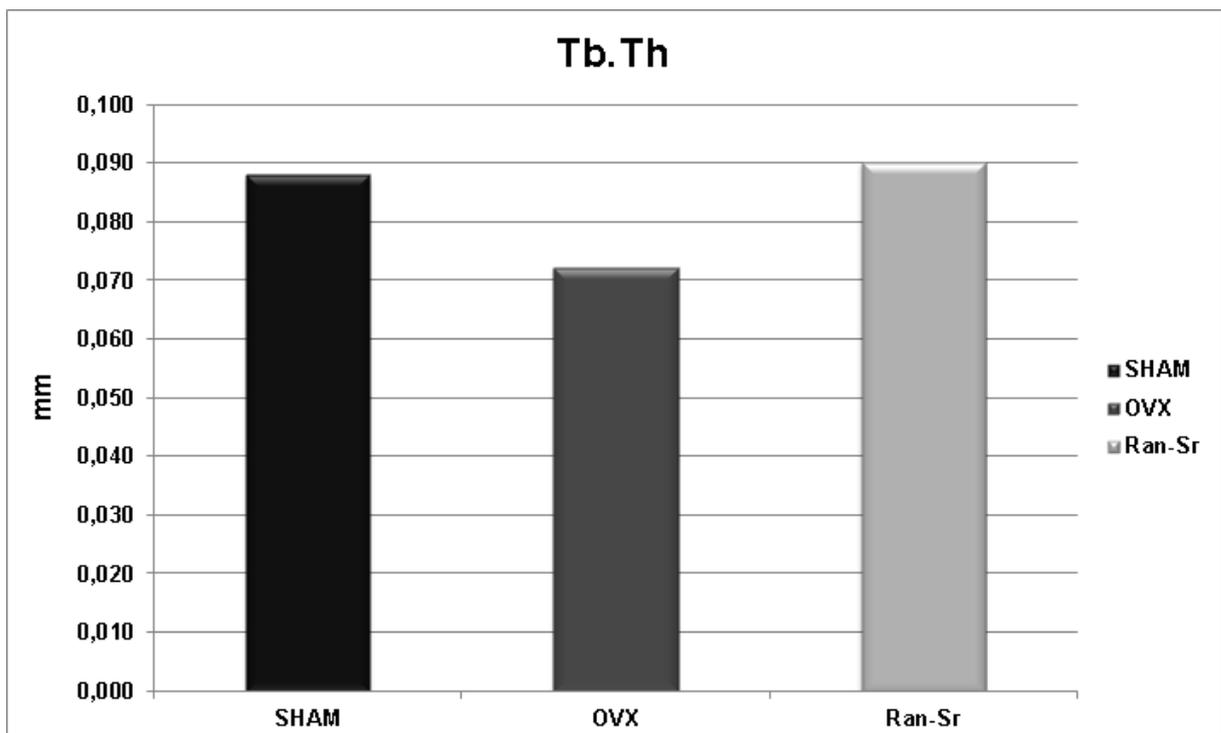


Fonte: Elaborado pelo autor. Valores obtidos de BV/TV: SHAM: 39,92%; OVX: 37,66%; Ran-Sr: 38,31%. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

#### 4.3.2 Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N

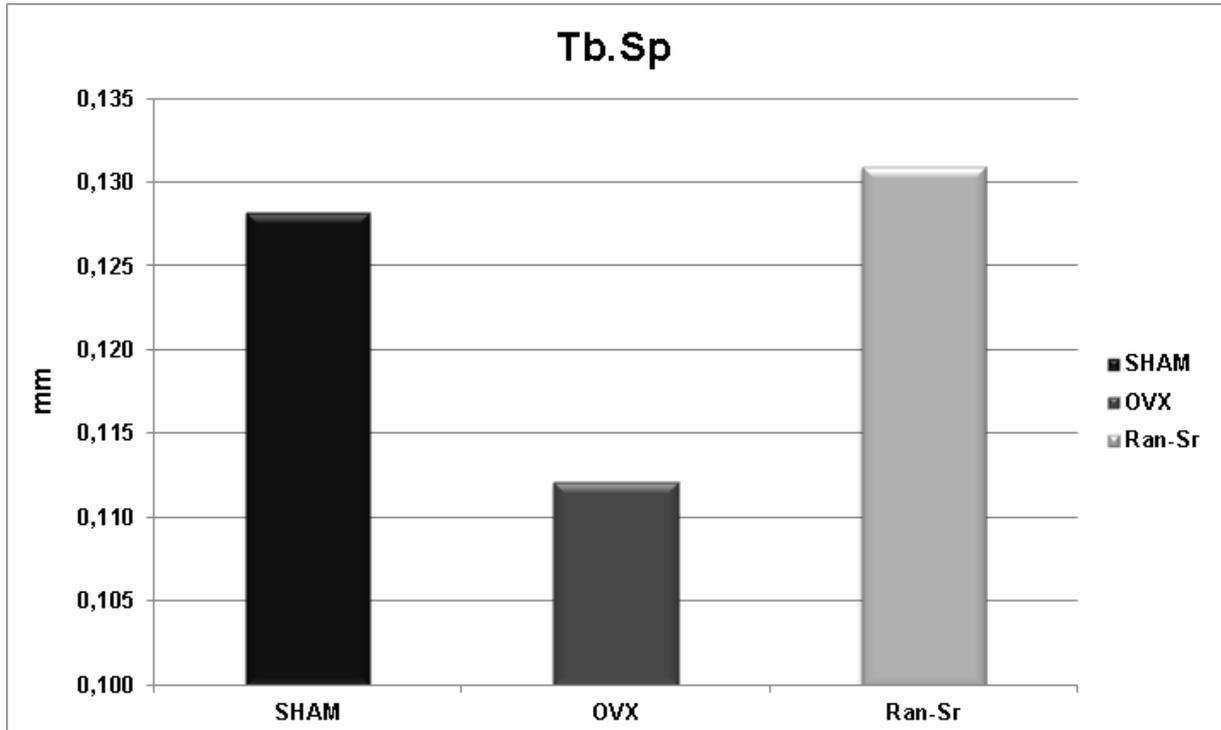
Os grupos SHAM e Ran-Sr obtiveram valores muito próximos e apresentaram maior espessura do trabeculado ósseo e separação entre as trabéculas, e menor número de trabéculas quando comparado ao grupo OVX, que apresentou menor espessura e separação trabecular e maior número de trabéculas (Gráfico 3, 4, 5).

**Gráfico 3: Parâmetro de Tb.Th obtido pela Micro-CT**



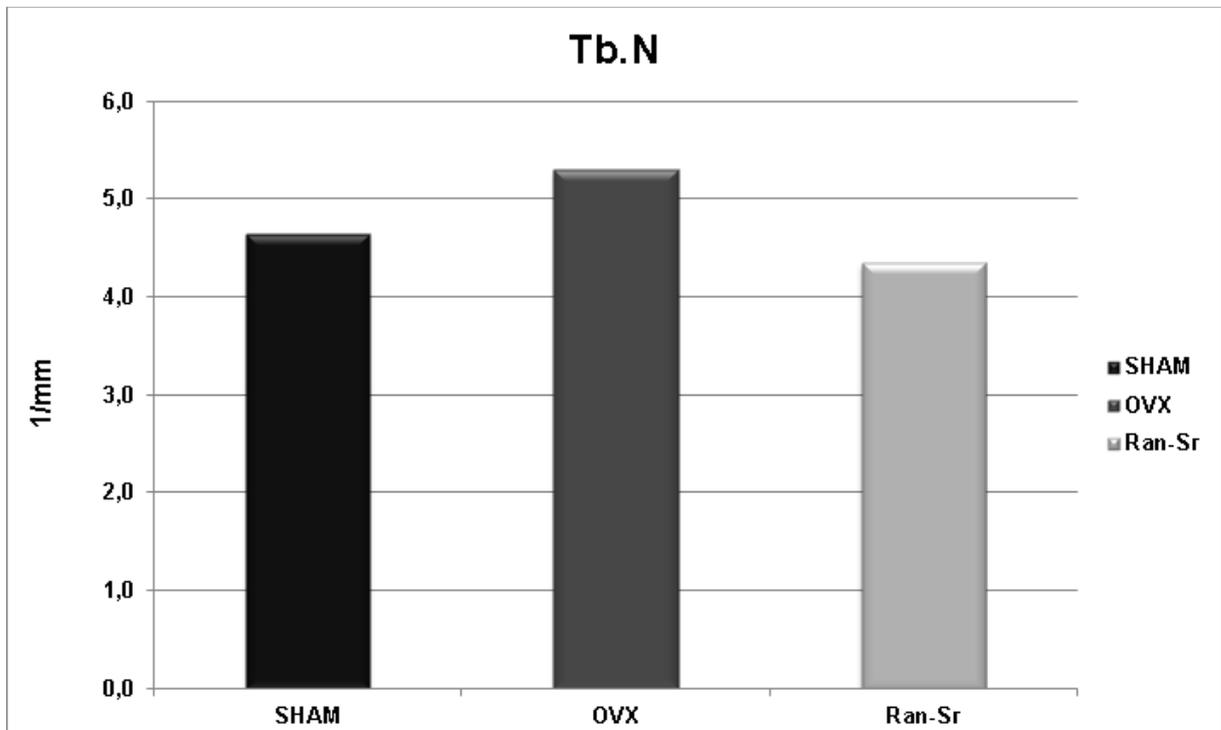
Fonte: Elaborado pelo autor. Valores obtidos de Tb.Th: SHAM: 0,0881mm; OVX: 0,07227mm; Ran-Sr: 0,0903mm. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

**Gráfico 4: Parâmetro de Tb.SP obtido pela Micro-CT**



Fonte: Elaborado pelo autor. Valores obtidos de Tb.Sp: SHAM: 0,1282mm; OVX: 0,1121mm; Ran-Sr: 0,1309mm. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

**Gráfico 5: Parâmetro de Tb.N obtido pela Micro-CT**

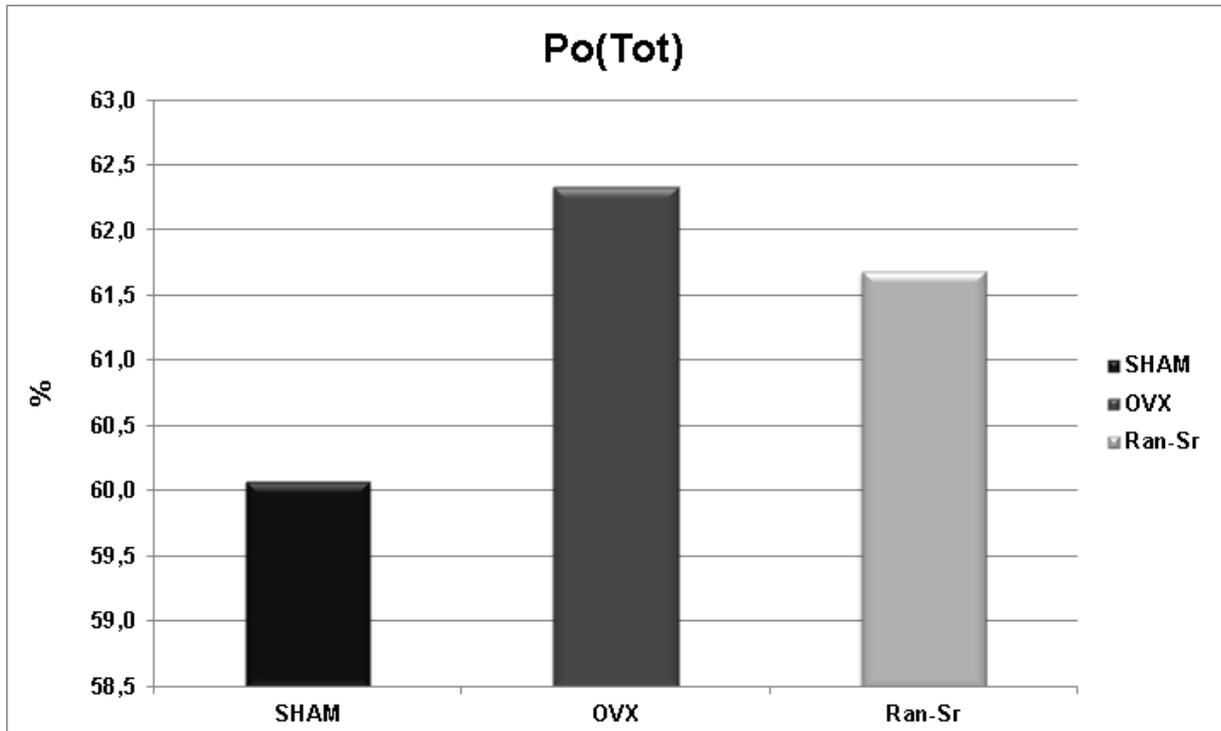


Fonte: Elaborado pelo autor. Valores obtidos de Tb.N: SHAM: 4,6523/mm; OVX: 5,3049/mm; Ran-Sr: 4,3477/mm. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

### 4.3.3 Po(Tot)

O grupo OVX apresentou a maior porosidade, seguido pelo grupo Ran-Sr e SHAM, porém sem diferença estatística (Gráfico 6).

**Gráfico 6: Parâmetro de Po(Tot) obtido pela Micro-CT**

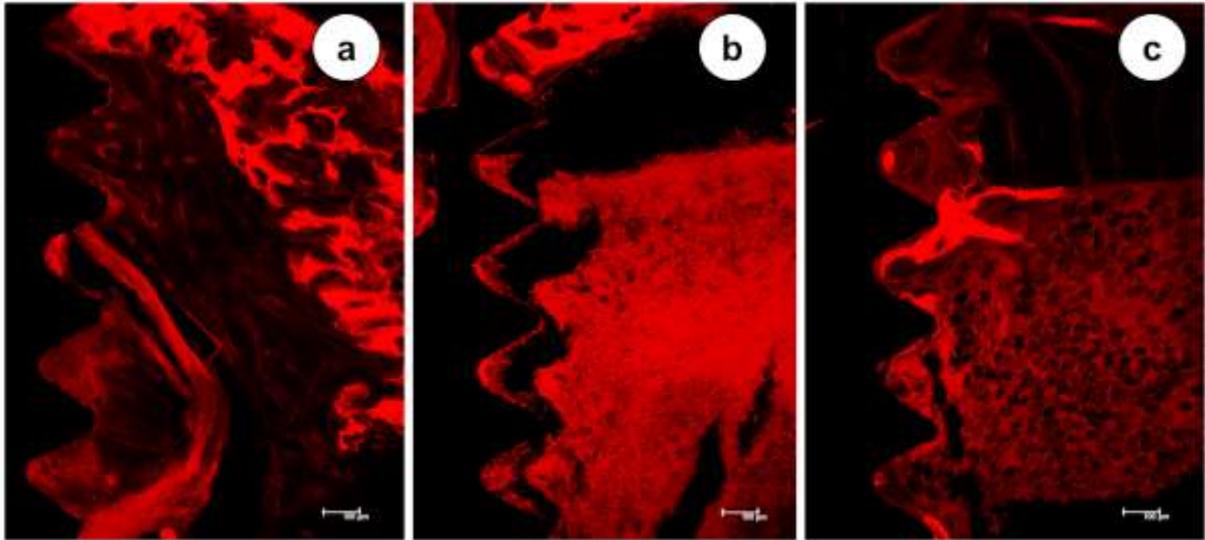


Fonte: Elaborado pelo autor. Valores obtidos de Po(Tot): SHAM: 60,08%; OVX: 62,34%; Ran-Sr: 61,69%. Não houve diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

## 4.4 Análise por microscopia confocal

O fluorocromo alizarina tem a propriedade de se ligar ao cálcio no momento da precipitação da matriz, e por causa desta ação, a quantidade de fluorescência representa o osso neoformado aos 42 dias após a instalação dos implantes, ou seja, o período de aplicação desse fluorocromo. No Grupo SHAM houve neoformação óssea em todas as espiras ósseas. O grupo OVX apresentou um atraso na neoformação óssea na região peri-implantar. Já o grupo Ran-Sr apresentou boa neoformação óssea, com imagens semelhantes ao grupo SHAM (Figura 11).

**Figura 11 – Imagens do osso peri-implantar obtidas pela microscopia confocal**

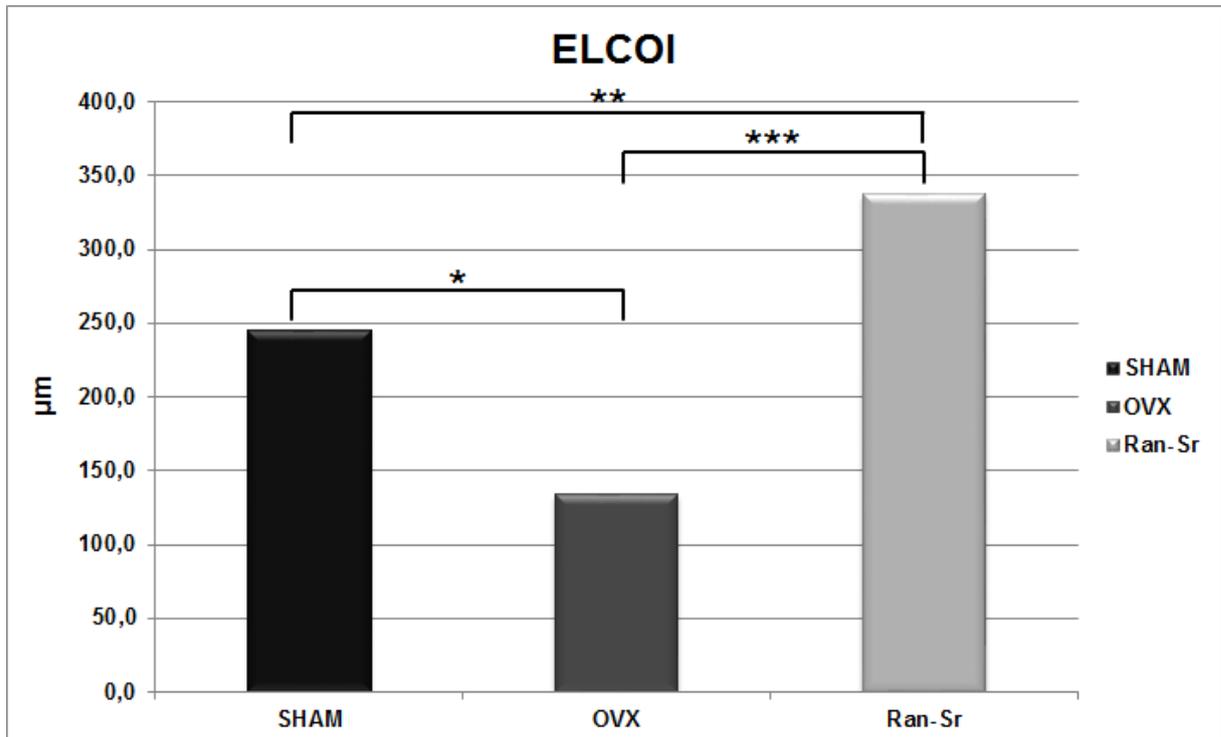


Fonte: Elaborado pelo autor. Área óssea peri-implantar marcada pelo vermelho de alizarina aos 42 dias após a instalação do implante. Eutanásia: 60 dias após a instalação dos implantes. Grupo SHAM (a); OVX (b); Ran-Sr (c). Aumento original 10x (a-c). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$  (a-c).

#### **4.4.1 Análise histométrica - ELCOI**

Na extensão linear de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (ELCOI), o grupo tratado com ranelato de estrôncio apresentou a maior área de contato entre o tecido ósseo neoformado e a superfície do implante (337,12 $\mu\text{m}$ ), sucessivo ao grupo SHAM (245,6 $\mu\text{m}$ ), já o grupo OVX teve a menor extensão linear de contato osso/implante (134,07 $\mu\text{m}$ ). Todos os grupos apresentaram diferença estatística quando comparados ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 7).

Gráfico 7: Extensão linear de contato osso/implante

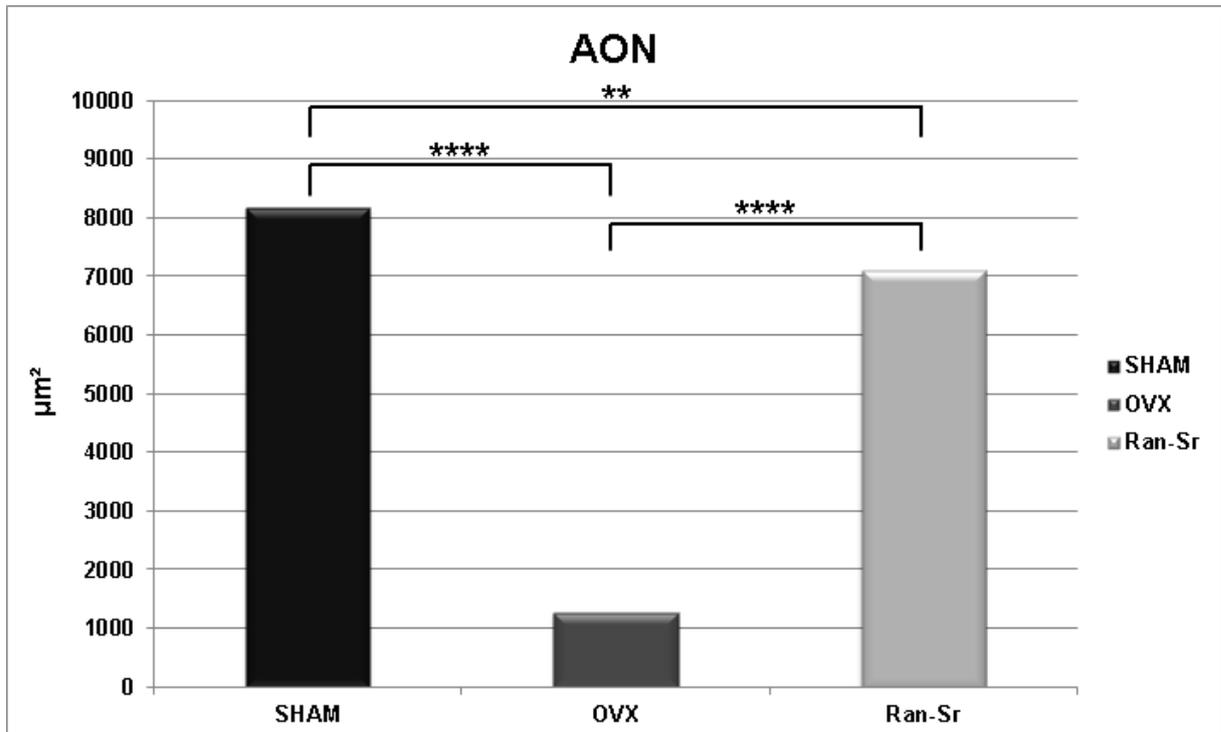


Fonte: Elaborado pelo autor. Valores obtidos da ELCOI : SHAM: 245,60µm; OVX: 134,07µm; Ran-Sr: 337,12µm. Houve diferença estatística entre os grupos: SHAM vs OVX =  $p < 0,05$ ; SHAM vs Ran-Sr =  $p < 0,005$ ; OVX vs Ran-Sr =  $p < 0,001$  (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,005$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

#### 4.4.2 Análise histométrica - AON

Nos resultados obtidos pela análise histométrica para AON, o grupo SHAM apresentou a maior área óssea neoformada ( $8188,19\mu\text{m}^2$ ), seguido pelo grupo Ran-Sr ( $7099,41\mu\text{m}^2$ ), já o grupo OVX teve os menores valores de área óssea neoformada ( $1281,41\mu\text{m}^2$ ), assim como pode ser visto nas imagens do osso peri-implantar por microscopia confocal. Houve diferença estatística entre todos os grupos ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 8).

Gráfico 8: Área óssea neoformada



Fonte: Elaborado pelo autor. Valores obtidos da AON : SHAM: 8188,19 $\mu\text{m}^2$ ; OVX: 1281,41 $\mu\text{m}^2$ ; Ran-Sr: 7099,41 $\mu\text{m}^2$ . Houve diferença estatística entre os grupos: SHAM vs OVX =  $p < 0,0001$ ; SHAM vs Ran-Sr =  $p < 0,005$ ; OVX vs Ran-Sr =  $p < 0,0001$  (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,005$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ; \*\*\*\*= $p < 0,0001$ ). Período de avaliação: 60 dias após a instalação dos implantes.

*Discussão*

## 5. Discussão

Na área odontológica, é extremamente importante a estabilização inicial do implante dentário, e esta é dada pela qualidade do tecido ósseo e pelo tipo de osso ao redor do implante, classificação Lekholm e Zarb (1985). O desequilíbrio no processo de remodelação óssea causado pela osteoporose pode diminuir a qualidade óssea e comprometer a estabilidade biomecânica dos implantes em longo prazo (MOY et al, 2005; CHO et al, 2004). Resultados histológicos, imunoistoquímicos e por microscopia confocal neste estudo demonstram que o tratamento com o ranelato de estrôncio melhora a qualidade e a neoformação óssea ao redor de implantes em ratas com deficiência de estrógeno.

Os resultados obtidos pela imunoistoquímica permitem afirmar que o grupo OVX apresenta-se com atraso de formação do tecido ósseo, com RUNX2 intensa, porém em tecido conjuntivo, e menor presença de ALP, OPN e OCN nas células osteoblásticas. O grupo SHAM apresentou melhores características quanto à presença de proteínas, mostrando a atividade de renovação do tecido ósseo, pela importante presença de RUNX2, ALP, OPN e OCN. Em particular, a OPN nas células de revestimento e a OCN nos osteócitos mostram que o osso formado junto às espiras dos implantes apresenta-se com um grau de maturidade importante, do ponto de vista celular. Já o tratamento com ranelato de estrôncio (Ran-Sr) mostrou um tecido formado com características celulares semelhantes ao SHAM, entretanto, discretamente inferior, especialmente pela discreta marcação positiva para osteocalcina nos osteócitos do tecido ósseo. Assim, em comparação ao grupo SHAM, o padrão do tecido ósseo formado após o tratamento com ranelato de estrôncio mostrou-se com atividade precoce de mineralização e por este motivo, com discreta presença da osteocalcina nos osteócitos. No entanto, vale destacar que neste grupo, observa-se tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes, o que já mostra um estímulo a osseointegração melhor caracterizado, quando comparado ao grupo OVX.

O aumento da ALP no grupo Ran-Sr quando comparado ao OVX corrobora com estudos de Meunier et al. 2004 em pacientes com osteoporose e tratados com ranelato de estrôncio, foi observado o aumento da concentração sérica da fosfatase alcalina a partir do terceiro mês de tratamento e persistiu durante os três anos de avaliação.

Os resultados das análises microtomográficas, com relação aos parâmetros apresentados, mostram que não houve diferenças estatísticas nas características do tecido ósseo formado junto aos implantes entre os grupos SHAM, OVX e Ran-Sr. No entanto, algumas tendências, representadas por maiores valores numéricos, podem ser evidenciadas, como por exemplo maior Po(Tot), e menor BV, BV/TV, Tb.th e Tb.Sp no grupo OVX em comparação aos grupos SHAM e Ran-Sr. O Ran-Sr apresentou valores superiores quanto ao BV e BV/TV ao redor dos implantes quando comparado ao grupo OVX, o que ressalta a ação desse medicamento sobre microarquitetura óssea. Outra observação considerada é a proximidade dos valores observados entre grupo SHAM e Ran-Sr para os parâmetros de Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp, mostrando que esta medicação pode ser capaz de melhorar a osseointegração de implantes de titânio em tíbias de ratos na dose terapêutica de 625mg/kg/dia, equivalente a utilizada em humanos, 2g/dia (MAIMOUN et al. 2010), mas vale destacar que apesar dos maiores valores numéricos, não foram estatisticamente significante entre os grupos.

Maimoun e colaboradores, 2010, instalaram implantes em tíbias de ratas adultas (6 meses) e administraram ranelato de estrôncio por meio de gavagem, 5 vezes na semana, na dosagem de 625mg/kg/dia, durante 8 semanas e apresentaram bons resultados quanto a microarquitetura óssea em torno do implante, com aumento do BV/TV (+36%) e Tb.Th (+13%) quando comparado ao grupo controle. Porém, o no nosso modelo de estudo, as ratas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia (grupos OVX e Ran-Sr), para causar a deficiência de estrógeno assim como ocorre nas mulheres na pós-menopausa, 30 dias após, as ratas foram tratadas com ranelato de estrôncio através de gavagem diariamente, e os implantes foram instalados após 30 dias do início do tratamento medicamentoso, mas não tivemos resultados estatisticamente significantes entre os grupos na análise microtomográfica, isso pode ter ocorrido devido à deficiência de estrógeno.

Dados obtidos da análise histométrica obtidas a partir das imagens pela microscopia confocal, mostram que o Ran-Sr melhora significativamente a ELCOI e AON em ratas com deficiência de estrógeno, quando comparado ao OVX. A redução da massa óssea causada pela osteoporose diminui a qualidade do tecido ósseo (AUDIN E BONNELYE, 2000) e este fato é observado no grupo OVX, pela menor ELCOI e AON na região peri-implantar, bem como pela discreta expressão das

proteínas ALP, OPN e OCN na imunoistoquímica, mostrando um atraso na resposta de osseointegração.

O aumento da precipitação da alizarina no grupo Ran-Sr, tanto na ELCOI como na AON é afirmada pela imunoistoquímica com expressão de células positivas para RUNX2, OPN e ALP, proteínas responsáveis pela expressão de células da linhagem osteoblástica e pela precipitação de cálcio e fosfato sobre a matriz orgânica, o que mostra uma importante atuação do ranelato de estrôncio sobre o tecido ósseo em um modelo com deficiência de estrógeno. Estes resultados são bastante promissores e confirmam observações de outros grupos de pesquisa que mostraram a eficiência do ranelato de estrôncio como medicamento de prevenção e tratamento da osteoporose (HAMDY, 2009).

Bonnelye et al 2008 confirmam em seu trabalho o duplo efeito do ranelato de estrôncio, após 22 dias de tratamento contínuo de ranelato de estrôncio em ensaios in vitro em células ósseas murinas primárias, obtiveram aumento da expressão de marcadores de osteoblastos ALP, BSP e OCN e por outro lado, diminuição do número de osteoclastos maduros. No nosso estudo também obtivemos aumento da expressão de células da linhagem osteoblástica, ALP e OPN, no grupo Ran-Sr em relação ao OVX, porém não foi avaliado a expressão de marcadores para osteoclastos.

Karakan e colaboradores, 2017, mostram em seu estudo em ratos com periodontite induzida com fio de seda em molares, e tratados com ranelato de estrôncio nas dosagens de 300, 625 e 900mg/kg que o ranelato de estrôncio reduz a perda óssea alveolar significativamente quando administrado na dosagem de 900mg/kg, diminui a atividade da RANKL, bem como o número de osteoclastos (significativo na dose de 300 e 900mg/kg) e aumenta o número de osteoblastos (significativo na dose de 625mg/kg).

O ranelato de estrôncio tem dupla ação, reduz a atividade osteoclástica e mantém o processo de formação (HURTEL et al. 2009; BONNELYE et al. 2008, MARIE P et al. 2001) e isso dá ao ranelato de estrôncio uma superioridade de escolha em comparação com os bisfosfonatos pois em estudo feito por Iwata et al. 2006 mostram que os bisfosfonatos reprimem a formação óssea independentemente da reabsorção óssea, além disso, é sabido a sua relação com a osteonecrose dos maxilares (BAGAN et al. 2017). Ramalho-Ferreira et al. 2015 apresenta em trabalho feito com implantes instalados em tíbias de ratas osteoporóticas e tratadas com

alendronato ou raloxifeno, que o grupo tratado com alendronato não apresentou melhora, sendo semelhante ao grupo osteoporótico sem tratamento para as análises de torque reverso e histométrica (ELCOI). Vale destacar que no presente trabalho o grupo Ran-Sr quando comparado ao grupo OVX, apresenta maior ELCOI ( $p < 0,001$ ) e AON ( $p < 0,0001$ ). Pan et al. 2017 relata em seu caso clínico que o ranelato de estrôncio pode ser usado como tratamento alternativo para mulheres na pós-menopausa que receberam terapia com Bisfosfonatos a longo prazo e correm risco de complicações de osteonecrose dos maxilares.

Um aspecto a ser considerado consiste na necessidade de se realizar mais estudos investigando o efeito do mecanismo de ação do ranelato de estrôncio avaliado a longo prazo, a partir de análises com períodos posteriores aos que foram utilizados neste estudo. Apesar dos resultados promissores, é importante avaliar o quanto a resposta positiva sobre o metabolismo ósseo se mantém ao longo do tempo, e o mais importante, avaliar possíveis respostas adversas que possam ocorrer em decorrência do uso a longo prazo desta medicação.

*Conclusão*

## **6. Conclusão**

A partir dos resultados obtidos pelas análises de imunohistoquímica e histométrica (ELCOI e AON) pode-se concluir que o ranelato de estrôncio melhora a osseointegração e qualidade do tecido ósseo neoformado ao redor de implantes em ratas com deficiência de estrógeno.

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

- ALBREKTSON T. **The Branemark osseointegrated implant**. Chicago: Quintessence, 262p, 1989.
- ALBREKTSSON, T., & JACOBSSON, M. Bone-metal interface in osseointegration. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 57, n. 5, p. 597-607, 1987.
- AUBIN, JANE E.; BONNELYE, E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. **Osteoporosis International**, v. 11, n. 11, p. 905-913, 2000.
- BAGAN, L., JIMÉNEZ, Y., LEOPOLDO, M., MURILLO-CORTES, J., & BAGAN, J. Exposed necrotic bone in 183 patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Associated clinical characteristics. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, p. 0, 2017.
- BAIN S, JEROME C, SHEN V, DUPIN-ROGER I, AMMANN P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. **Osteoporos Int**. 20(8):1417-28, 2009.
- BENHAMOU, CL. Effects of osteoporosis medications on bone quality. **Joint Bone Spine**.74(1), 39-47, 2007.
- BEPPU, K., KIDO, H., WATAZU, A., TERAOKA, K., & MATSUURA, M. Peri-Implant Bone Density in Senile Osteoporosis-Changes from Implant Placement to Osseointegration. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 15, n. 2, p. 217-226, 2013.
- BONNELYE, E., CHABADEL, A., SALTEL, F., & JURDIC, P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, 42(1), 129-138, 2008.
- BRANEMARK PI, ZARB GA, ALBREKTSON T. tissue integrated prostheses. **Osseointegration in clinical dentistry**. Chicago: Quintessence Co., 350p, 1985.
- BRENNAN T, RYBCHYN M, GREEN W, ATWA S, CONIGRAVE A, MASON R. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **Br J Pharmacol**.157(7):1291-300, 2009.
- CHO, P., SCHNEIDER, G. B., KRIZAN, K., & KELLER, J. C. Examination of the bone-implant interface in experimentally induced osteoporotic bone. **Implant dentistry**, 13(1), 79-87, 2004.
- DE MEDEIROS, F. C. F. L., KUDO, G. A. H., LEME, B. G., SARAIVA, P. P., VERRI, F. R., HONÓRIO, H. M., ... & JUNIOR, J. S. Dental implants in patients with osteoporosis: a systematic review with meta-analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2017.

EVANS, H. M., & LONG, J. A. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 8, n. 3, p. 38-39, 1922.

FOLWARCZNA J, ZYCH M, TRZECIAK HI. Effects of curcumin on the skeletal system in rats. **Pharmacol Rep.** 62(5):900-9, 2010.

GAETTI-JARDIM EC, SANTIAGO-JR JF, GOIATO MC, PELLIZER EP, MAGRO-FILHO O, JARDIM-JR EG. Dental implants in patients with osteoporosis: a clinical reality? **J Craniofac Surg.** May;22(3):1111-3, 2011.

GRYNPAS M, MARIE P. Effects of low doses of strontium on bone quality and quantity in rats. **Bone.**11(5):313-9, 1990.

HA BJ. Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate. **Arch Pharm Res.** 27(8):867-72, 2004.

HAMDY, Neveen AT. Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. **Rheumatology**, v. 48, n. suppl\_4, p. iv9-iv13, 2009.

HURTEL-LEMAIRE AS, MENTAVERRI R, CAUDRILLIER A, COURNARIE F, WATTEL A, KAMEL S, et al. The Calcium-sensing Receptor Is Involved in Strontium Ranelate-induced Osteoclast Apoptosis NEW INSIGHTS INTO THE ASSOCIATED SIGNALING PATHWAYS. **J Biol Chem.** 284(1):575-84, 2009;.

ISIDOR F. Influence of forces on peri-implant bone. **Clin Oral Implants Res.** 17 Suppl 2:8-18, 2006.

IWATA, K., LI, J., FOLLET, H., PHIPPS, R. J., & BURR, D. B. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. **Bone**, 39(5), 1053-1058, 2006.

KARAKAN, N. C., AKPINAR, A., GÖZE, F., & POYRAZ, Ö. Investigating the Effects of Systemically Administered Strontium Ranelate on Alveolar Bone Loss Histomorphometrically and Histopathologically on Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of periodontology**, 88(2), e24-e31, 2017.

KILKENNY, C., BROWNE, W. J., CUTHILL, I. C., EMERSON, M., & ALTMAN, D. G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS biology**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.

KRIBBS PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. **J. Prosthet. Dent.** 63: 218–222, 1990.

LEUNG KC, CHOW TW, WAT PY, COMFORT MB. Peri-implant bone loss: management of a patient. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 16:273-277, 2001.

MAÏMOUN L, BRENNAN TC, BADOUD I, DUBOIS-FERRIERE V, RIZZOLI R, AMMANN, P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. **Bone**, 46(5),

1436-1441, 2010.

MARIE P, AMMANN P, BOIVIN G, REY C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Calcif Tissue Int.** 69(3):121-9, 2001.

MARIE PJ, HOTT M, MODROWSKI D, DE POLLAK C, GUILLEMAIN J, DELOFFRE P, et al. 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(6):1065-74, 2005.

MARIE PJ. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. **Curr Opin Rheumatol.** 18:S11-S5, 2006.

MARTIN RM, CORREA PHS. Bone quality and osteoporosis therapy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.**54(2), 186-199, 2010.

MEUNIER, P. J., ROUX, C., SEEMAN, E., ORTOLANI, S., BADURSKI, J. E., SPECTOR, T. D., ... & RIZZOLI, R. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 5, p. 459-468, 2004.

MEUNIER, P. J., SLOSMAN, D. O., DELMAS, P. D., SEBERT, J. L., BRANDI, M. L., ALBANESE, C., ... & REGINSTER, J. Y. Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis—a 2-year randomized placebo controlled trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 5, p. 2060-2066, 2002.

MOY, P. K., MEDINA, D., SHETTY, V., & AGHALOO, T. L. Dental implant failure rates and associated risk factors. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 4, 2005.

MUTHUSAMI S, RAMACHANDRAN I, MUTHUSAMY B, VASUDEVAN G, PRABHU V, SUBRAMANIAM V, et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. **Clin Chim Acta.** 360(1):81-6, 2005.

OZAWA S, OGAWA T, IIDA K, SUKOTJO C, HASEGAWA H, NISHIMURA RD et al. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. **Bone.** 30(1):137-143, 2002.

OZTEKIN E, MOGULKOC R, BALTACI A, TIFTIK A. The influence of estradiol and progesterone and melatonin supplementation on TNF-a levels in ovariectomized and pinealectomized rats. **Acta Biol Hung.** 57(3):275-81, 2006.

PAN, W. L., CHEN, P. L., LIN, C. Y., PAN, Y. C., JU, Y. R., CHAN, C. P., & HSU, R. W. Strontium ranelate treatment in a postmenopausal woman with osteonecrosis of the jaw after long-term oral bisphosphonate administration: a case report. **Clinical Interventions in Aging**, v. 12, p. 1089, 2017.

RAMALHO-FERREIRA, G., FAVERANI, L. P., PRADO, F. B., GARCIA, I. R., & OKAMOTO, R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic

rats. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, 44(6), 798-805, 2015.

RIGGS BL, KHOSLA S, MELTON III L J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine reviews**.23(3), 279-302, 2002.

SCHWARZ F, HEGEWALD A, BECKER J. Impact of implant–abutment connection and positioning of the machined collar/microgap on crestal bone level changes: a systematic review. **Clinical oral implants research**. 25(4), 417-425, 2014..

SIBAI, T., MORGAN, E. F., & EINHORN, T. A.. Anabolic agents and bone quality. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 469, n. 8, p. 2215-2224, 2011.

TABATA LF, ROCHA EP, BARAO VA, ASSUNCAO WG. Platform switching: biomechanical evaluation using three-dimensional finite element analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants** 26:482-49, 2011.

TELLA SH, GALLAGHER JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**.142:155-70, 2014.

YAMAZAKI M, SHIROTA T, TOKUGAWA Y, MOTOHASHI M, OHNO K, MICHI K et al. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 87:411-8, 1999.

ZACCHETTI G, DAYER R, RIZZOLI R, AMMANN P. 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**. 2014;2014.

*Anexos*

**ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**



**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 Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação do reparo ósseo na interface osso/implante em ratos com deficiência de estrógeno tratadas com Denosumab ou Ranelato de Estrôncio. Análise histométrica, imunoistoquímica, por microtomografia computadorizada, microscopia confocal e biomecânica**", Processo FOA nº 2015-00616, 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 05 de Agosto de 2015.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 02 de Junho de 2018.

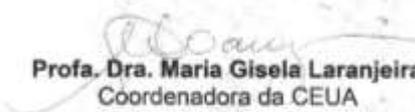
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 02 de Julho de 2018.

**CERTIFICATE**

We certify that the study entitled "**Bone repair Assessment of the bone/implant interface in estrogen – deficient rats treated with Denosumab or Strontium ranelate. Histometric analysis, immunohistochemistry, computed microtomography, confocal microscopy and biomechanics**", Protocol FOA nº 2015-00616, 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 August 05, 2015.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** June 02, 2018.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** July 02, 2018.

  
**Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira**  
Cóordenadora 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 (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br