



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

FLAVIA CRISTINA LIRO DE SOUZA ROSA

**Efeito da administração de ranelato de estrôncio local
sobre o reparo ósseo de ratos osteopênicos. Análise
imunoistoquímica e microtomográfica.**

Araçatuba – SP
2022

FLAVIA CRISTINA LIRO DE SOUZA ROSA

Efeito da administração de ranelato de estrôncio local sobre o reparo ósseo de ratos osteopênicos. Análise imunoistoquímica e microtomográfica.

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.^a Dra.^a Roberta Okamoto

Coorientador: Prof.^o Dr. Paulo Roberto Botacin

Araçatuba - SP
2022

Dedicatória

Ao meu esposo, Rafael e minha filha Sofia.

Dedico toda a minha formação a ele, que acreditou em mim desde antes do vestibular. Obrigada por acreditar em mim, e se esforçar comigo para que este sonho se tornasse realidade. Gratidão pela paciência de sempre, pela companhia em momentos alegres e momentos difíceis. Obrigada pela ajuda em cada prova, e pelas palavras positivas. Sem dúvida, sem você tudo o que vivo hoje não seria possível. Você me deu o maior presente da minha vida, nossa querida Sofia, que mesmo tão pequena, me deu ainda mais forças e motivação para permanecer. Espero com todo o meu coração um dia retribuir a vocês todo o amor que me foi combustível para a realização deste grande sonho. Amo vocês, com todas as minhas forças.

Aos meus pais, Neide e Flávio.

Meu coração se enche de alegria em partilhar com vocês mais este momento ímpar da minha vida. Obrigada pelo incentivo, investimento, e pela perseverança em acreditar no meu potencial. Diante de tudo o que passamos, hoje vemos que nossa história foi escrita por Deus, e mesmo que haja impossibilidades pelo caminho, com amor, fé e esperança tudo se supera. Amo vocês imensamente. Este sonho é nosso!

“Quando as raízes são profundas, não há razão para temer o vento.”

Provérbio Chinês

*Agradecimentos
especiais*

Dedico a Deus

Meu coração é grato pela oportunidade que me deste de viver. Agradeço pela cura, pela presença em cada momento delicado de minha vida e pela permissão de viver momentos sublimes como este. Vejo a mão do Senhor em cada detalhe de minha vida. Sempre confiarei em Ti, Deus da minha vida. Entregarei meus passos, pois sei que eles serão regidos pelo melhor caminho. Te amo Jesus, te adoro frente ao seu trono, te dou minha vida e mais que tudo eu te amarei.

A minha orientadora querida, Prof.^a Dr.^a Roberta Okamoto

Gratidão eterna por todo o ensinamento ofertado. Obrigada por acreditar e investir em meu potencial. Grata por me incentivar a multiplicar o melhor que há em mim, me mostrando mesmo quando eu não conseguia enxergar, o quão longe eu poderia e posso ir. A senhora é uma grande inspiração, de mulher, de profissional, de cientista e se tornou uma grande amiga, lamentando comigo nos momentos difíceis e vibrando em todas as minhas vitórias. Certamente, a senhora é uma parte muito importante da minha história.

Ao meu coorientador, Prof.^o Dr. Paulo Roberto Botacin

Meu agradecimento especial por todo o conhecimento compartilhado e pelo apoio me dado durante o momento de monitoria na disciplina de Anatomia Humana. Foi enriquecedor cada dia em que pude ensinar e aprender com meus colegas. Por isso, meu muito obrigado, do fundo do coração.

Aos membros da banca examinadora

Prof.^o Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto

Meu muito obrigada a este professor que desde o primeiro contato me tratou com muita gentileza se mostrou sempre solícito a sanar todas as minhas dúvidas. Foi uma grande honra ser aluna. Obrigada por tudo.

Dr.^a Naara Gabriela Monteiro

Minha grande amiga, desde a primeira semana em que estive na universidade. Sempre disposta a me ajudar, me ensinar e compartilhar comigo tudo o que já havia aprendido. Além de profissional impecável, uma grande amiga, a qual pude

compartilhar momentos e com ela, agradecer ao nosso bom Deus por toda a graça recebida. Você faz parte deste momento. Muito obrigada, querida amiga.

Aos meus familiares e amigos

Em especial, minha amada avó **Raymunda Liro**, dona das orações mais fervorosas e respondidas que eu conheço, meu muito obrigada pela educação me dada e mesmo com sua simplicidade, me incentivar a alçar grandes voos. Minha querida tia, **Sandra Liro**, pelo investimento material e imaterial em minha vida. Vibrando a cada nota boa, e torcendo pela resolução de cada problema. Sem você minha tia, esse feito também não seria possível, meu muito obrigada com todo o meu amor. Aos outros familiares, também externo minha gratidão, vocês são parte de mim. Agradecimento especial também as amigas **Pamella Pesse** e **Kamila Isabel Ferreira**, por todo apoio me dado, onde mesmo longe, se tornaram essencial para minha conquista. Amo vocês.

Aos amigos da iniciação científica

Maria Isabela Gandolfo, Jaqueline Silva, Ana Carolina Passos e Tatiany Castro. Agradeço pela amizade que construímos, por toda ajuda dada para que a pesquisa fosse concluída. Meu sucesso tem parte de cada um de vocês. Muito obrigada. Foi um prazer trabalhar com vocês.

Aos amigos da pós graduação

Juliana Moura, Paula Frigério, Ana Cláudia Ervolino, Leticia Pitol, Jaqueline Hassumi, Naara Monteiro, Fábio Batista, Pedro Henrique Ferreira, Gabriel Mulinari e Breno Fernandes. Obrigada por toda ajuda e ensinamentos.

Aos amigos da graduação

Júlia Moro, Isabela Dornelas, Gisele Fridirich, Lorena Pontes, Bruno Urzedo, Thales Batista, Vitor Hugo Sampaio e Michael Júnio. Cada um de vocês contribuíram de alguma forma para que este momento chegasse. Obrigada pelas risadas, pela parceria, pelos cafés e almoços... Vocês abrilhantaram e tornaram inesquecíveis estes últimos 5 anos. Amo vocês.

Agradecimentos

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. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI), pela concessão da minha bolsa de Iniciação Científica (125940/2018-1) e também pelas renovações concedidas.

Aos meus professores que ao longo da graduação, compartilharam tanto conhecimento, com maestria, paciência e dedicação. Hoje, são minhas grandes inspirações profissionais.

Aos meus amigos da **63ª turma do curso integral de Odontologia**, agradeço por todos os momentos que pudemos compartilhar. Desejo sucesso a cada um e um lindo futuro.

Epigrafe

“Porque desde a antiguidade não se ouviu,
nem com ouvidos se percebeu, nem com os
olhos se viu um Deus além de ti, que opera a
favor daquele que por ele espera.”

Isaías 64:4

Resumo

ROSA, FCLS. **Efeito da administração de ranelato de estrôncio local sobre o reparo ósseo de ratos osteopênicos. Análise imunoistoquímica e microtomográfica.** 2022. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Objetivo: Investigar a ação do Ranelato de estrôncio local no osso periimplantar em ratos osteoporóticos. **Metodologia:** Utilizou-se ratos Wistar adultos jovens, machos (n=6 para cada grupo e subgrupo) divididos em dois grupos, de acordo com a cirurgia de remoção das gônadas, que no caso refere-se à orquiectomia bilateral (GRUPO Orq) e grupo controle positivo, submetido ao estresse de uma cirurgia fictícia de orquiectomia bilateral (GRUPO Sham). A superfície dos implantes foram funcionalizadas com o Ranelato de Estrôncio (RE) através da técnica LayerByLayer (LbL). As gônadas foram retiradas e após 30 dias, realizadas as instalações dos implantes tratados nas tíbias. Após 60 dias da instalação dos implantes, os animais foram submetidos à eutanásia para análise histológica e imunoistoquímica das tíbias descalcificadas, objetivando analisar tanto as respostas celulares quanto os processos de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL) e formação óssea (OCN E WNT). Também foi realizada a análise microtomográfica (Micro CT) das tíbias calcificadas, onde também foram avaliados com a utilização do software CTAnalyser – CTAn, parâmetros que caracterizam o trabeculado ósseo, como espessura do trabeculado (Tb.th), número (Tb.N), porcentagem de volume ósseo (BV/TV) e separação (Tb.Sp) entre as trabéculas ósseas. Os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade e submetidos ao teste estatístico não paramétrico Mann Whitney. O nível de significância foi de $p=0,05$. Quanto aos resultados, o grupo tratado obteve melhores padrões de formação óssea em quantidade. Com isso, os estudos confirmam que a utilização do Ranelato de estrôncio local melhora o reparo ósseo periimplantar em ratos orquiectomizados.

Palavras chave: Osteoporose. Implantes dentários. Estrôncio.

Abstract

ROSA, FCLS. Effect of local strontium ranelate administration on bone repair in osteopenic rats. Immunohistochemical and microtomographic analysis. 2022. 54 f. Course Completion Work (Bachelor's Degree) – Faculty of Dentistry, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Objective: To investigate the action of local strontium ranelate on peri-implant bone in osteoporotic rats. **Methodology:** Young adult male Wistar rats were used (n=6 for each group and subgroup) divided into two groups, according to the gonad removal surgery, which in this case refers to bilateral orchiectomy (GROUP Orq) and positive control group, submitted to the stress of a sham bilateral orchiectomy surgery (Sham GROUP). The implant surface was functionalized with Strontium Ranelate (RE) using the LayerByLayer (LbL) technique. The gonads were removed and after 30 days, the installation of the treated implants in the tibias was performed. After 60 days of implant placement, the animals were euthanized for histological and immunohistochemical analysis of the decalcified tibias, aiming to analyze both the cellular responses and the processes of bone resorption (TRAP), remodeling (OPG and RANKL) and bone formation (OCN and WNT). A microtomographic analysis (Micro CT) of the calcified tibias was also performed, where parameters that characterize the trabecular bone, such as trabecular thickness (Tb.th), number (Tb.N) were also evaluated using the CTAnalyser - CTAn software., percentage of bone volume (BV/TV) and separation (Tb.Sp) between bone trabeculae. The data obtained were tabulated and submitted to the normality test and submitted to the Mann Whitney nonparametric statistical test. The significance level was $p=0.05$. As for the results, the treated group had better bone formation patterns in quantity. Thus, the studies confirm that the use of local strontium ranelate improves peri-implant bone repair in orchiectomized rats.

Keywords: Osteoporosis. Dental implants. Strontium.

Lista de figuras

Figura 1 - Delineamento experimental	33
Figura 2 - Sequência cirúrgica de orquiectomia	34
Figura 3 - Cirurgia de instalação dos implantes	36
Figura 4 - Imunomarcações com OPG e RANKL	40
Figura 5 - Imunomarcações com OC e WNT	41
Figura 6 – Imunomarcações com TRAP	41

Lista de tabelas

Tabela 1 - Grupos Experimentais	33
Tabela 2 – Subgrupos de acordo com as análises	36
Tabela 3 – Escores das imunomarcações	40

Lista de gráficos

Gráfico 1 - Espessura do trabeculado ósseo (Tb.th)	42
Gráfico 2 - Número de trabéculas ósseas (Tb.N)	42
Gráfico 3 - Separação do trabeculado ósseo (Tb.Sp)	43
Gráfico 4 – Percentual de volume ósseo (BV/TV)	43
Gráfico 5 - Superfície de intersecção (IS)	44
Gráfico 6 – Porosidade total (Po(tot))	44

Lista de abreviaturas e siglas

RE – Ranelato de Estrôncio

LbL – Layer by Layer

CEUA – Comitê de Ética de Uso de Animais

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto

FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba

IC – Implante convencional

IRE – Implante tratado com Ranelato de Estrôncio

ORQ – Grupo submetido à Orquiectomia

SHAM – Grupo submetido à cirurgia fictícia

PVPI – Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante

PSS – Poliestireno Sulfonado

TiO₂ – Óxido de titânio

UV-Vis – Ultravioleta visível

RPM – Rotações por minuto

EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-acético

HE – Hematoxilina e eosina

TRAP – Tartarato

OPG – Osteoprotegerina

RANKL – Kappa B ligante

OCN – Osteocalcina

MicroCT – Microtomografia computadorizada

CTAn – Software CTAnalyser

ROI – Área ao redor do implante

Tb.th – Espessura do trabeculado ósseo

Tb.N – Número de trabéculas

Tb.S – Separação entre as trabéculas

Bv.Tv – Porcentagem de densidade óssea

IS – Superfície de intersecção

Sumário

1 INTRODUÇÃO	28
2 OBJETIVO	30
3 METODOLOGIA	32
3.1 ANIMAIS	32
3.2 CIRURGIA DE ORQUIECTOMIA BILATERAL E CIRURGIA FICTÍCIA	33
3.3 RANELATO DE ESTRÔNCIO	34
3.4 TRATAMENTO DOS IMPLANTES COM RANELATO DE ESTRÔNCIO – MÉTODO LAYER BY LAYER:	34
3.5 CIRURGIA DE INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES	35
3.6 EUTANÁSIA	37
3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA	37
3.8 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA (MICRO CT)	38
4 RESULTADOS	41
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA	41
4.2 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA	43
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico caracterizado pela perda de massa óssea e pela deterioração da microarquitetura desse tecido, levando à sua fragilidade e aumentando o risco de fraturas, e assim podendo causar deformidades, dor crônica, incapacidade e morte.

Sendo assim, tornou-se uma doença comum, devido a sua crescente prevalência entre homens e mulheres, em decorrência do aumento na expectativa de vida e de uma população em envelhecimento (Caires et al., 2017).

Nas mulheres, o estradiol é o melhor estimulador do crescimento ósseo (Pardhe, BashuDev et al., 2018). No entanto, há indícios que a aromatização de testosterona em estradiol desempenha também um papel muito importante na regulação da homeostase dos ossos em homens (Riggs et al, 2002; Almeida et al, 2016).

Na odontologia, busca-se a manutenção de um osso de melhor qualidade, visando os procedimentos reabilitadores com implantes osseointegráveis. Tais procedimentos vêm sendo cada vez mais almejados por parte dos pacientes, por obterem resultados satisfatórios e com naturalidade.

O Ranelato de Estrôncio (RE), medicamento eleito para a realização da pesquisa, pertence ao grupo de agentes anabólicos, ou seja, favorece a neoformação óssea e suprime a reabsorção óssea.

O uso sistêmico desta droga para o tratamento da osteoporose traz alguns efeitos colaterais, como mudanças no funcionamento intestinal, alterações cardiovasculares e aumento do risco tromboembólico, em idosos principalmente. Com isso, tornam-se necessárias novas estratégias de administração deste fármaco. Neste sentido, esta proposta consistiu em utilizar o fármaco Ranelato de Estrôncio localmente. Ou seja, incorporado à superfície de implantes através do método LayerbyLayer (LbL) (Shin et al, 2017), permitindo assim que o seu efeito local se torne fator decisivo para a melhora da resposta de osseointegração neste modelo de estudo, e ao mesmo tempo evitando os efeitos colaterais do uso sistêmico deste fármaco.

Objetivo

2 OBJETIVO

Caracterizar o processo de reparo do tecido ósseo peri-implantar após a instalação de implantes funcionalizados com ranelato de estrôncio, a fim de visualizar o seu efeito local sobre o osso peri-implantar em ratos submetidos a orquiectomia, mimetizando uma condição osteopênica no gênero masculino.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Animais:

Após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) (Processo CEUA – FOA nº 00238-2015), o projeto foi iniciado e desenvolvido. Para que o presente projeto fosse desenvolvido, foram utilizados 12 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, adultos, com peso corporal médio de 300 gramas.

O estudo possuiu a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (Processo CEUA – FOA nº 00335/2018), onde após estar apto a ser executado, o mesmo foi iniciado e desenvolvido. Então, para a pesquisa, foram utilizados 12 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando em média 300g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Em relação ao número de animais utilizados, foi minimizado através de todas as medidas encontradas, assim como evitar o seu sofrimento. Durante todo o experimento, os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), alimentação com ração balanceada sólida (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil) e água ad libitum, exceto no período de 12 horas antecedentes às cirurgias realizadas. Estes animais foram divididos em dois grupos: O grupo SHAM, representando os ratos submetidos à cirurgia fictícia e o grupo ORQ, os quais se enquadram os ratos submetidos à orquiectomia bilateral. Ambos os grupos receberam implantes funcionalizados com Ranelato de Estrôncio através da técnica Layer by Layer (LbL), sendo então grupos SHAM/IRE e ORQ/IRE. Após as cirurgias de instalações dos implantes, os animais foram subdivididos de acordo com as análises a serem realizadas, sendo as tíbias direitas para o estudo dos tecidos descalcificados e as tíbias esquerdas para o exame microtomográfico. A distribuição das ratos de acordo com os grupos foi realizada da seguinte forma:

Tabela 1 – Grupos experimentais:

Grupo I – SHAM/IRE [n=6] (Cirurgia fictícia com implantes funcionalizados)

Grupo II – ORQ/IRE [n=6] (Orquiectomia com implantes funcionalizados)

Divisão de acordo com o tratamento com o tipo cirúrgico.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Delineamento

experimental:

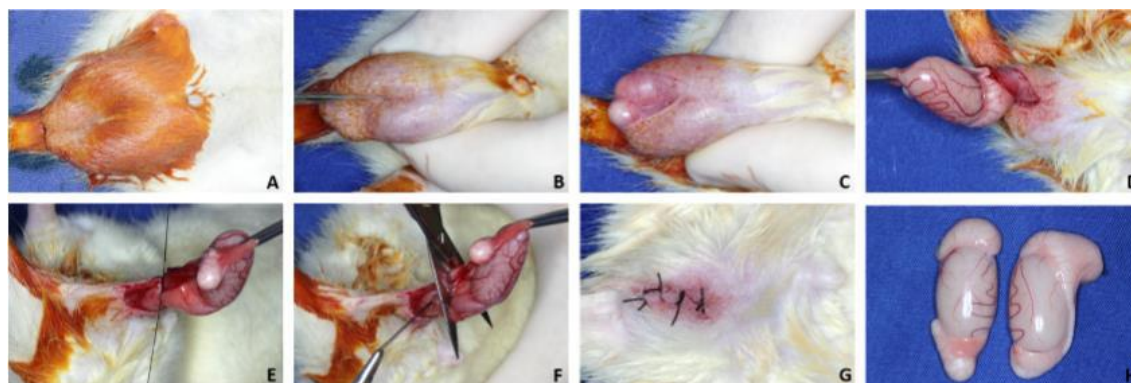


Figura 1: Delineamento Experimental

Fonte: Elaborado pelo autor (2019)

3.2 Cirurgia de orquiectomia bilateral e cirurgia fictícia:

Para a realização da cirurgia de orquiectomia bilateral, os ratos dos grupos orquiectomizados (ORQ) foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina (Coopazine®) e Cloridrato de Quetamina (Vetaset®) e, a seguir, foram imobilizados em posição decúbito dorsal sobre prancha cirúrgica. Foi realizada uma incisão mediana anterior no escroto, a abertura da túnica vaginal e exteriorização dos testículos. Em seguida, os funículos espermáticos foram ligados com fio de Nylon 5.0 e seccionados. Os testículos e os epidídimos foram removidos e o escroto foi suturado com fio de Poliglactina 910 4.0. Os ratos do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas com a exposição cirúrgica dos testículos e dos epidídimos sem suas respectivas remoções (Al-Shahat et al., 2011).

FIGURA 2 - Sequência cirúrgica de orquiectomia

Em **A**: Antissepsia com PVPI em ambos os sacos escrotais; **B**: Incisão; **C** e **D**: Exposição de ambos escrotos; **E**: Laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular; **F**: Remoção de ambos escrotos com auxílio de uma tesoura; **G**: Sutura; **H**: Ambos escrotos removidos (Orquiectomia).

Fonte: Arquivos do laboratório de estudos em tecidos mineralizados FOA-UNESP.

3.3 Ranelato de estrôncio:

Este agente consiste em dois átomos de estrôncio estável e uma porção orgânica (ácido ranélico) e atua estimulando a neoformação e suprimindo a reabsorção óssea (Querido et al, 2014). Este efeito favorável sobre o processo de formação óssea é evidenciado em estudos in vitro e in vivo (Silva et al, 2018). Apesar de seus efeitos anabólicos sobre o tecido ósseo, o uso sistêmico do Ranelato de Estrôncio para o tratamento da osteoporose traz alguns efeitos colaterais, como mudanças no funcionamento intestinal e discreto aumento do risco tromboembólico, em idosos principalmente. Portanto, sua prescrição é restrita apenas a casos graves de osteoporose, os quais não podem ser tratad//os com outros medicamentos (Nair et al, 2016).

3.4 Tratamento dos implantes com ranelato de estrôncio – método layer by layer:

A superfície dos implantes foi funcionalizada pela preparação de filmes Layer by Layer (LbL). A presente técnica é baseada na imersão de um substrato sólido (geralmente possuindo desequilíbrio de cargas em sua superfície) por um determinado intervalo de tempo numa solução aquosa, a qual contém o material a ser depositado. A carga deste material deve ser contrária à do substrato para que ocorra adsorção por atração eletrostática. Após, o conjunto substrato + monocamada é lavado, com a intenção de eliminar o excesso de material.

Posteriormente, o conjunto pode ser seco com ar comprimido, nitrogênio ou ventilador e assim imerso numa solução contendo um outro material, agora de carga contrária à do material inicialmente depositado, formando assim os filmes ultrafinos compostos por bicamadas moleculares catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas. O novo conjunto substrato + bicamada é lavado e pode ser seco novamente. A técnica Layer by Layer tem como vantagens a simplicidade dos materiais envolvidos para a formação de multicamadas, o substrato que poderá ser de qualquer geometria e o solvente comumente empregado, que é a água. Foram empregados o eletrólito poliestireno sulfonado (PSS – com carga negativa), no qual os fármacos foram dispersos, e uma solução de eletrolítica de óxido de titânio (TiO₂ - carga positiva). A solução de PSS foi preparada contendo o fármaco Ranelato de Estrôncio. A melhor concentração do fármaco foi determinada a partir de testes de dose/resposta pela técnica de Espectroscopia da região do ultravioleta visível (UV-Vis). O crescimento de filmes pela técnica LbL é de domínio no Laboratório de Materiais Avançados da UNESP de Bauru, coordenado pelo Prof. Paulo Noronha Lisboa-Filho.

3.5 Cirurgia de instalação dos implantes:

Após 30 dias da realização das cirurgias de orquiectomia bilateral e cirurgias fictícias, foram realizadas as instalações dos implantes nas metáfises tibiais dos animais. Após jejum de oito horas antes do procedimento cirúrgico, os animais foram sedados pela combinação de 50mg/kg de Ketamina intramuscular e 5mg/Kg de Cloridrato de Xilazina e receberam Cloridrato de Mepivacaína como anestesia local e para hemostasia do campo operatório. Posterior a sedação, foi realizada a tricotomia na região medial das tíbias direita e esquerda, e antissepsia da região com PolivinilPirrolidona Iodo Degermante, associada à PVPI tópico. Então, foi feita 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. Os implantes convencionais (IC) instalados foram confeccionados em titânio comercialmente puro grau I, com a superfície tratada por duplo ataque ácido

(ácidos, nítrico, fluorídrico e sulfúrico), com diâmetro de 2mm e altura de 4mm, esterilizados por raios gama (Marca Emfils ®). Os IRE (implantes com a superfície funcionalizada por ranelato de estrôncio), com superfície tratada pela técnica Layer by Layer, incorporando o fármaco Ranelato de estrôncio em sua superfície. A fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,1mm de diâmetro montada em motor elétrico a uma velocidade de 1000 RPM, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%, e contra-ângulo com redução 20:1 e profundidade de 3,0mm, com travamento e estabilidade inicial. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poliglactina 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 - Cirurgia de instalação dos implantes



Em **A**: Antissepsia com PVPI em ambas tíbias após tricotomia; **B**: Acesso a metáfise tibial; **C** e **D**: Fresagem com broca de 1,3mm de diâmetro e leito; **E**: Implante de 1,5 x 3,5mm; **F**: Instalação do implante; **G**: Implante instalado em nível ósseo; **H**: Sutura.

Fonte: Arquivo do laboratório de estudos em tecidos mineralizados FOA-UNESP.

GRUPOS	ANÁLISES	GRUPO IRE
SHAM	Microtomografia computadorizada	6
ORQ	Análise imunoistoquímica	6
TOTAL (n)	24 tíbias – 12 animais	12

Tabela 2 – Subgrupos de acordo com as análises

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

3.6 Eutanásia:

Passados 60 dias da cirurgia de instalação dos implantes, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica. As tíbias foram coletadas reduzidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica OdontoHospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 24 horas e posteriormente banhadas em água corrente por 24 horas. Após a fixação, parte das peças foi deixada em álcool 70%, para a realização da análise microtomográfica (tecido calcificado) e as demais foram armazenadas em EDTA (processamento de tecido descalcificado).

3.7 Análise histológica e imunoistoquímica:

Os animais de todos os grupos tiveram suas tíbias removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% por 48 horas, lavadas em água corrente durante 24 horas, descalcificadas em EDTA 10% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas em xilol. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e cortadas em 5µm de espessura para montagem das lâminas histológicas. Dessas lâminas, algumas receberam coloração em hematoxilina e eosina (HE) e em outras foram feitas reações de imunoistoquímica. Para análise histológica, foi considerada qualitativamente a presença de células e a evolução do reparo ósseo na interface osso/implante. Já para as reações de imunoistoquímica, a atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. Então, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Foram utilizados

anticorpos primários policlonais produzidos em cabras contra os seguintes antígenos: fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (TRAP), osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear kappa B ligante (RANKL), osteocalcina (Santa Cruz Biotechnology), permitindo 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 a interferência na produção dessas proteínas durante a reparo ósseo ao redor dos implantes. Após a incubação do anticorpo primário, foi utilizado o Anticorpo secundário biotinilado, anti cabras e produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). Foi utilizado o kit avidina e biotina como amplificador de sinal (Vector Laboratories) e o cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (Dako). Após a revelação das reações, foi utilizada a Hematoxilina de Meyer para a contra-coloração. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão das proteínas semi-quantitativamente (análise qualitativa ordinal) pela atribuição de diferentes escores de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo alveolar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representam: 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 (Manrique et al, 2015).

3.8 Análise microtomográfica (Micro CT):

Para a análise tridimensional, nos animais pertencentes ao processamento para tecidos calcificados foram removidas as peças (tíbias), reduzidas e armazenadas em álcool 70%. Elas foram primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As amostras foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan, da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), realizando-se cortes de 9 µm de espessura, com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas nas

amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon®. No software Data Viewer® as imagens foram reconstruídas e adequadas ao posicionamento padrão podendo ser observadas em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser® – CTAn foi definida uma área ao redor do implante (ROI) delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante. Esta área ficou definida como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- ROI 4,5mm x 3,2mm). Esse software analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). Também foram avaliados parâmetros que caracterizam o trabeculado ósseo, como espessura do trabeculado ósseo (Tb.th), número (Tb.N), separação entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), percentual de volume ósseo (BV/TV) e Superfície de intersecção (IS).

Análise Estatística: Os dados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade, onde foi determinada a realização do teste estatístico não paramétricos Mann Whitney, através do programa GraphPad Prism 9.01, com nível de significância de $p=0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análises histológica e Imunoistoquímica:

Na tabela a seguir, os escores dos grupos SHAM/IRE e ORQ/IRE são representados:

	SHAM/IRE	ORQ/ IRE
OPG	1	2
RANKL	1	2
OC	2	2
TRAP	1	1
WNT	2	3*

Tabela 3: Escores das imunomarcações.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

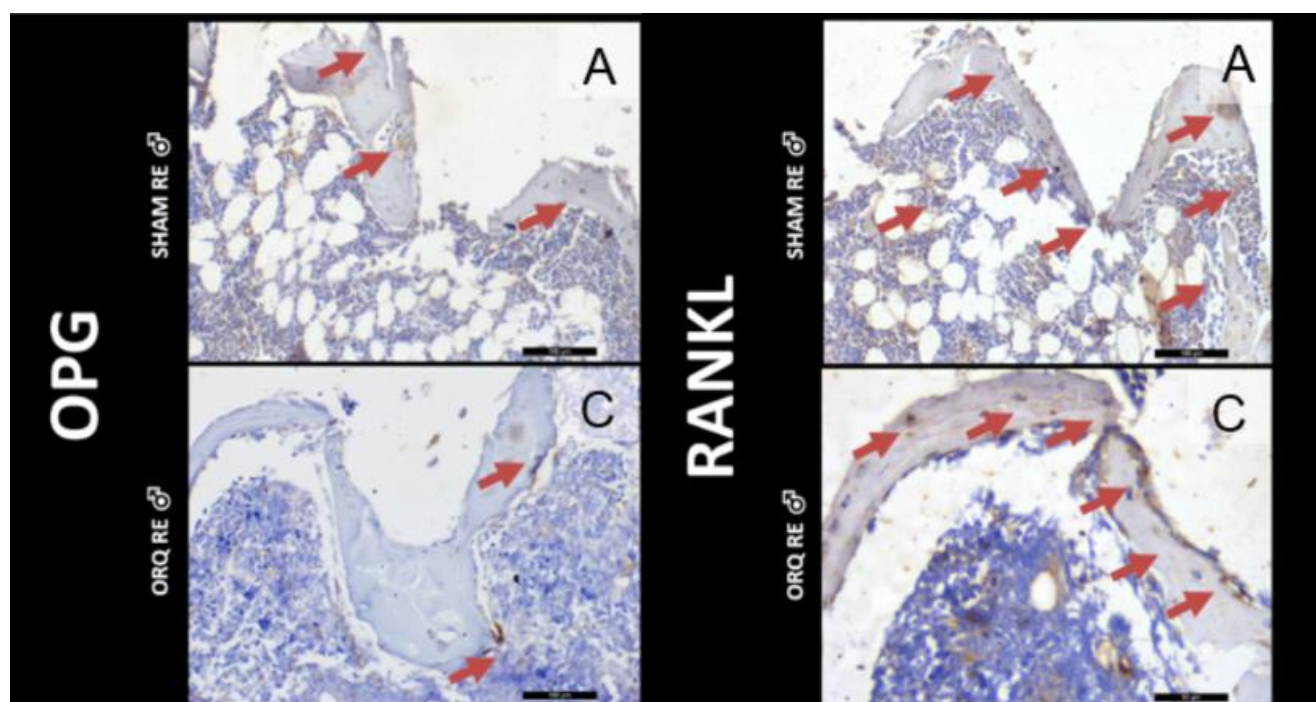


FIGURA 4 – Imunomarcações positivas para as proteínas OPG e RANKL observadas nos animais dos grupos Sham/IRE e ORQ/IRE. As marcações positivas aparecem com a coloração marrom acastanhado em função do cromógeno diaminobenzidina (Objetiva 40x, aumento 400x).

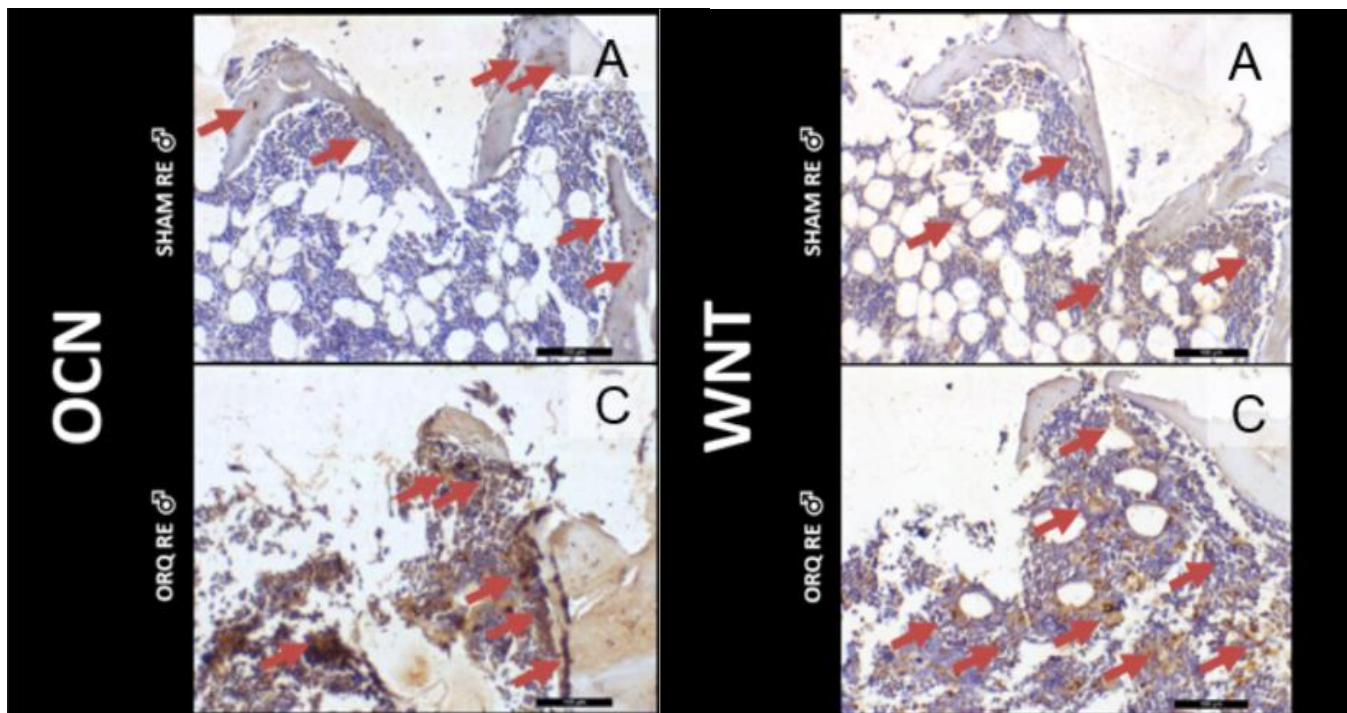


Figura 5– Imunomarcações OC e WNT observadas nos animais dos grupos Sham RE e Orq Re. As marcações positivas aparecem com a coloração marrom acastanhado em função do cromógeno diaminobenzidina (Objetiva 40x, aumento 400x).

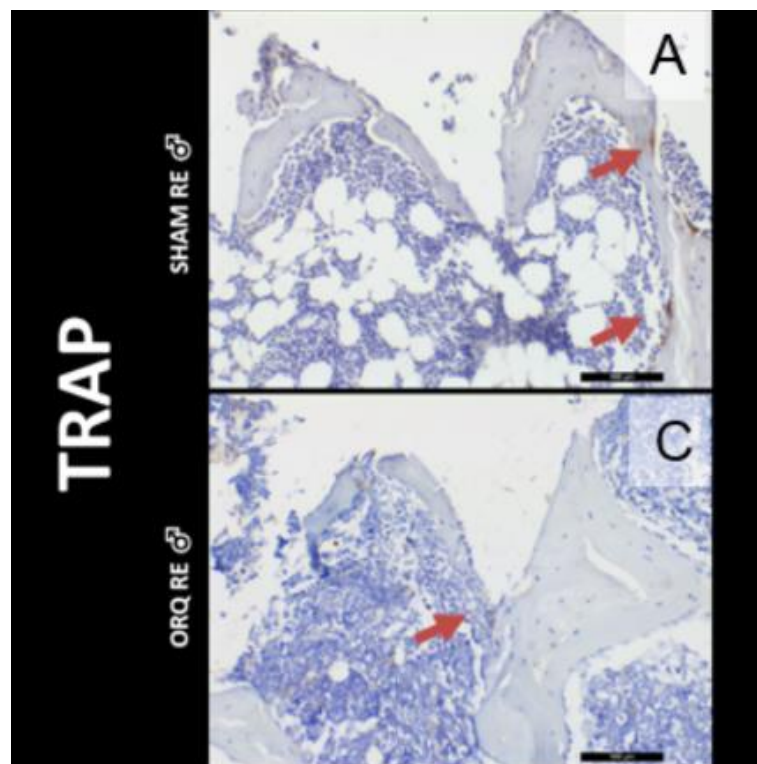


Figura 6 – Imunomarcação da proteína TRAP observada nos animais dos grupos Sham RE e Orq Re. As marcações positivas aparecem com a coloração marrom acastanhado em função do cromógeno diaminobenzidina (Objetiva 40x, aumento 400x).

4.2 Resultados análise microtomográfica (MICRO CT)

Imagens MICRO CT

Espessura do trabeculado ósseo (Tb.th): Neste parâmetro, os resultados foram de 0,9862mm para o grupo ORQ/IRE e 0,9468mm para o grupo SHAM/IRE.

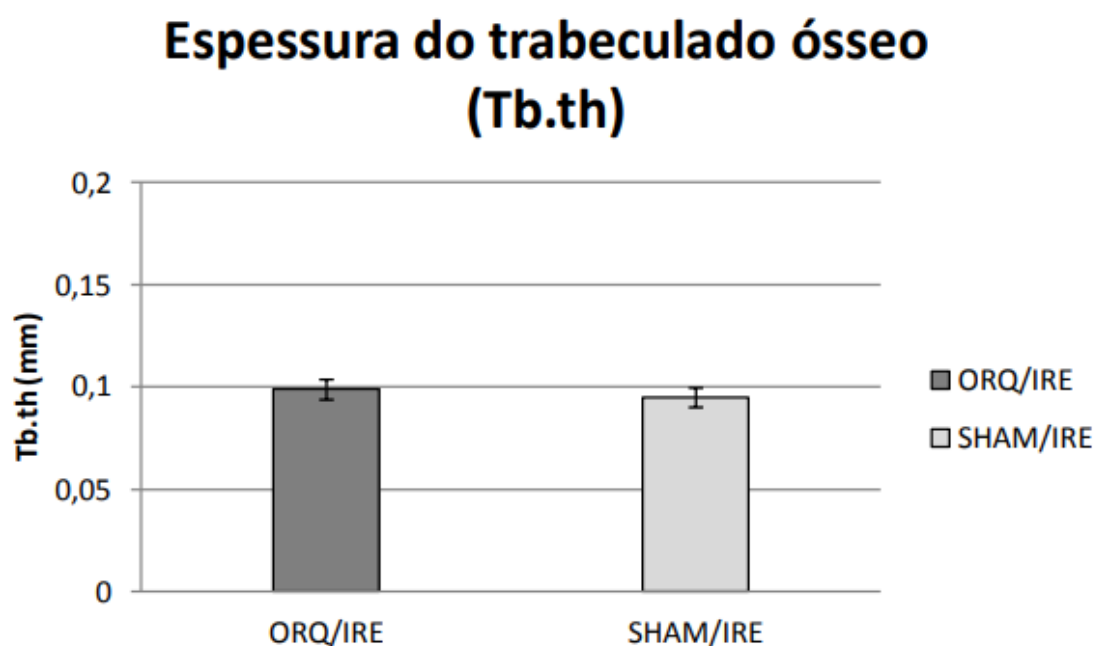


Gráfico 1: Espessura do trabeculado ósseo na comparação entre grupos ORQ/RE e SHAM/RE. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Número de trabéculas ósseas (Tb.N): Neste parâmetro, os resultados foram de 2,87mm para o grupo ORQ/IRE e 2,92mm para o grupo SHAM/IRE.

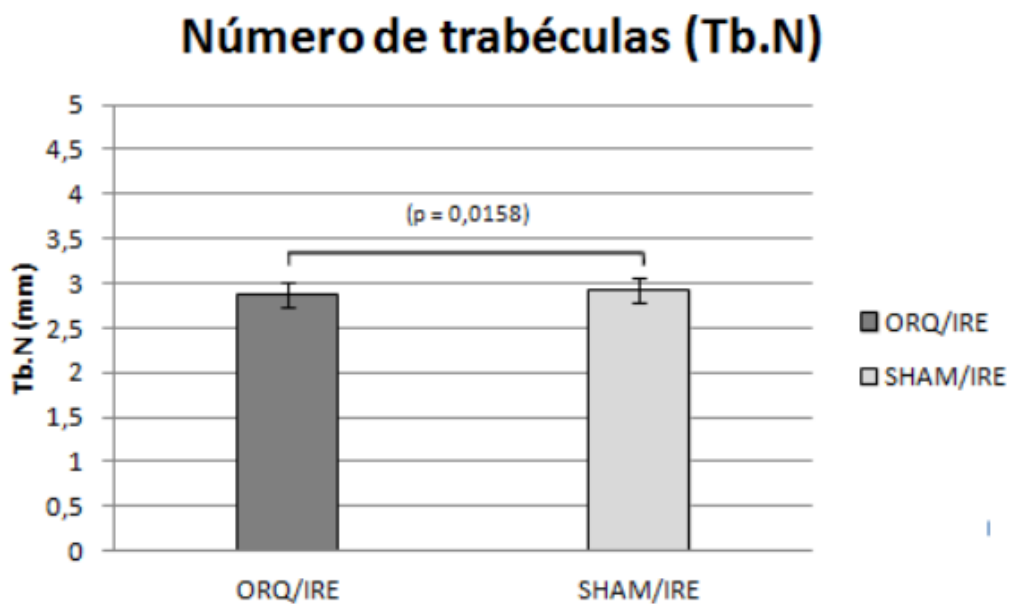


Gráfico 2: Número de trabéculas na comparação entre grupos ORQ/RE e SHAM/RE. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Separação do trabeculado ósseo (Tb.Sp): Neste parâmetro, os resultados foram de 0,1313mm para o grupo ORQ/IRE e 0,1254mm para o grupo SHAM/IRE.

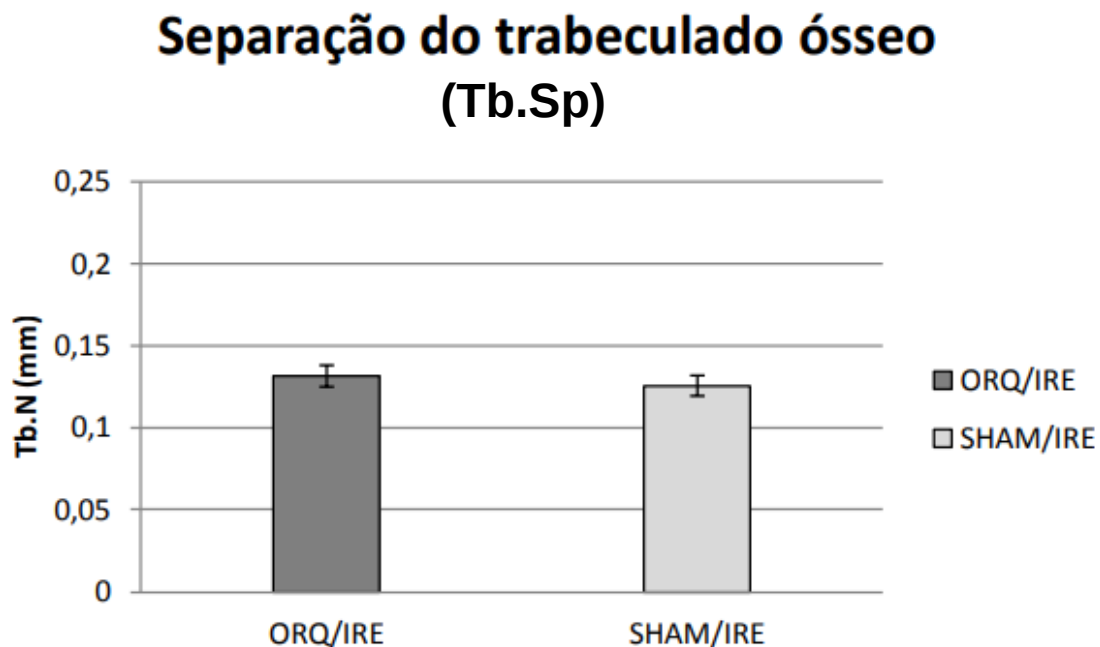


Gráfico 3: Separação do trabeculado ósseo na comparação entre grupos ORQ/RE e SHAM/RE. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Percentual de volume ósseo (BV/TV): Neste parâmetro, os resultados foram de 28,85mm² para o grupo ORQ/IRE e 27,59mm² para o grupo SHAM/IRE.

Percentual de volume ósseo (BV/TV)

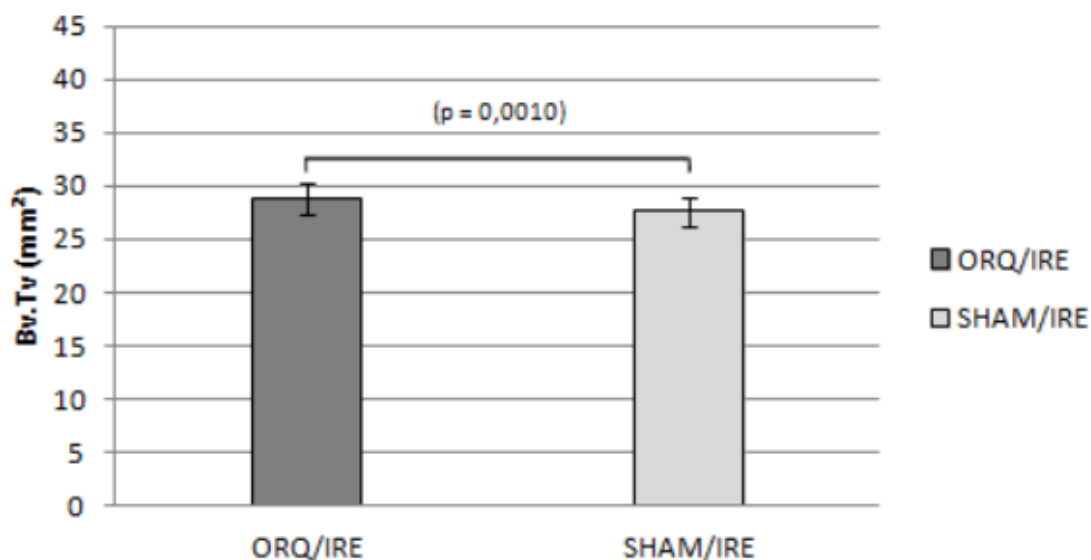


Gráfico 4: Percentual de volume ósseo na comparação entre grupos ORQ/RE e SHAM/RE. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Superfície de Intersecção (IS): Neste parâmetro, os resultados foram de 13,24% para o grupo ORQ/IRE e 12,50% para o grupo SHAM/IRE.

Superfície de intersecção (IS)

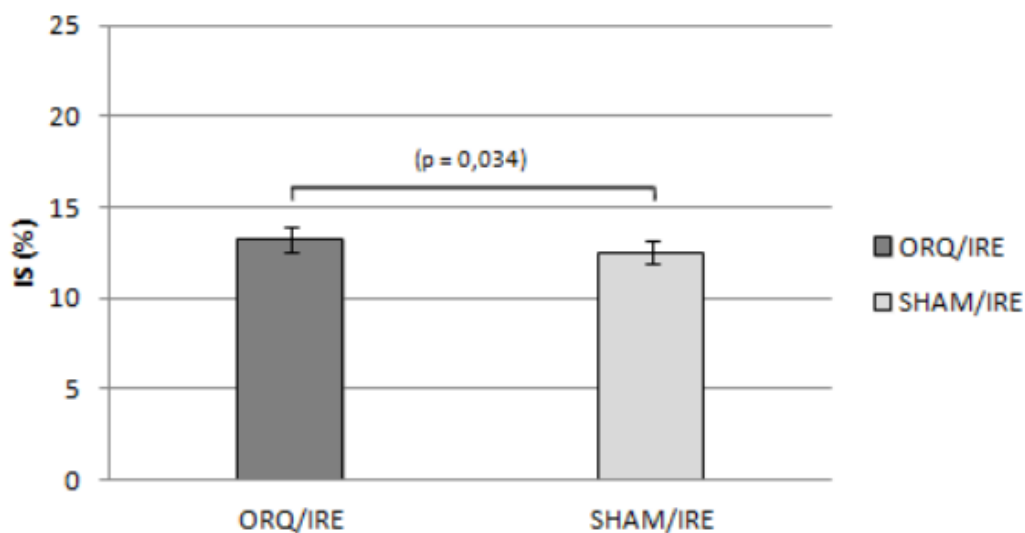


Gráfico 5: Superfície de intersecção na comparação entre grupos ORQ/RE e SHAM/RE. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Porosidade (Po(tot)): Neste parâmetro, os resultados foram de 71,15% para o grupo ORQ/IRE e 72,40% para o grupo SHAM/IRE.

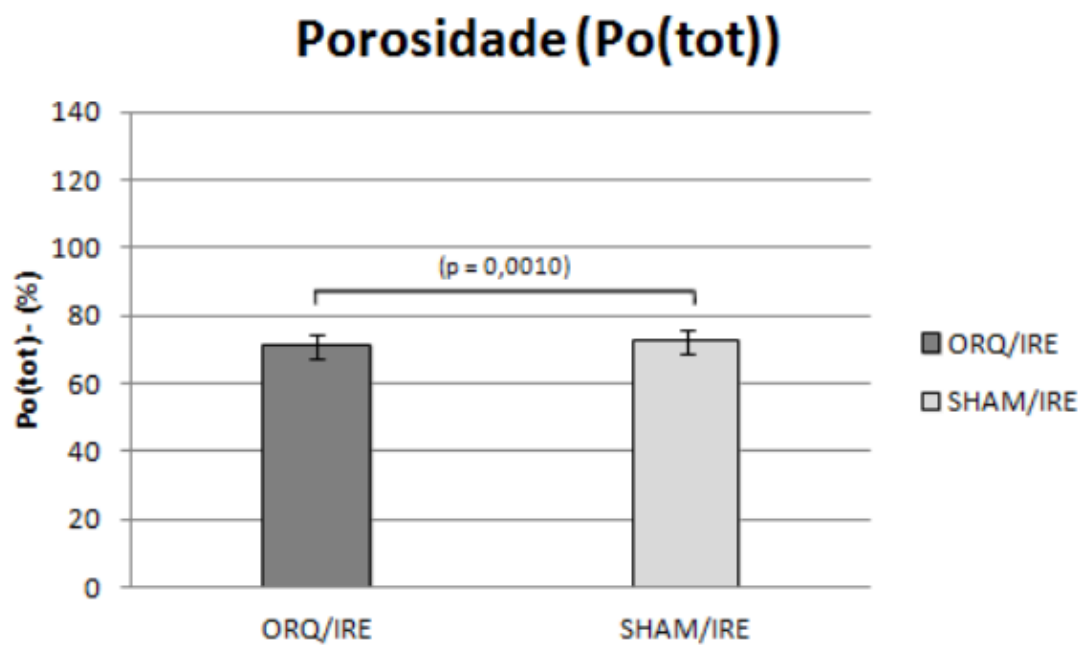


Gráfico 6: Porosidade na comparação entre grupos ORQ/RE e SHAM/RE. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Discussão

O Ranelato de estrôncio foi muito utilizado para o tratamento da osteoporose, agindo como anabólico do tecido ósseo. Porém, seus efeitos adversos quando utilizado sistemicamente pode prejudicar a condição de saúde do indivíduo, sendo interessantes então, estudos de seu uso local. O presente estudo analisou localmente a ação do Ranelato de Estrôncio incorporado na superfície de implantes, através do método Layer by Layer, onde em relação aos resultados da análise microtomográfica o ranelato de estrôncio funcionalizado sobre o implante, proporcionou de um aumento no percentual de volume ósseo no grupo que apresenta a interferência sistêmica(ORQ) quando comprado ao grupo saudável(SHAM). Além disso, a formação óssea no grupo ORQ/IRE proporcionou uma maior superfície de intersecção entre osso e implante, quando comparado com o grupo SHAM/IRE, mostrando que houve tecido ósseo formado em direção as espiras e também, apresentou um íntimo contato ósseo com o implante. Quanto a porosidade, o ranelato de estrôncio foi capaz de melhorar a condição do tecido ósseo periimplantar, a ponto da porosidade se mostrar superior no grupo saudável, em comparação com o grupo funcionalizado. Em relação aos resultados obtidos através da análise imunoistoquímica, houve um prejuízo na formação óssea ao redor das espiras dos implantes funcionalizados instalados no grupo ORQ. Tal fato mimetiza a interferência sistêmica da osteoporose, caracterizando menor formação e maior reabsorção óssea. A expressão das proteínas OPG e RankL mostra que houve um melhor equilíbrio fisiológico do tecido, aumentando a formação e a reabsorção óssea, e assim mostrando que houve um padrão adequado de remodelação. Quanto a expressão da osteocalcina, houve um melhor padrão de mineralização no grupo ORQ/RE. As proteínas da via WNT estão ligadas com a formação óssea, com isso, pode-se observar no grupo ORQ/IRE também obteve um gritante aumento da formação óssea das espiras. Do ponto de vista da microarquitetura, observamos que o grupo apresentou melhores padrões de formação de tecido ósseo em quantidade. Ao passo que celularmente, observamos que houve um maior padrão de formação e remodelação óssea, além de precipitação de minerais.

Conclusão

Os resultados observados neste estudo mostraram que o ranelato de estrôncio utilizado localmente promoveu respostas reparacionais semelhantes entre ratos sham e ratos orquiectomizados, com discreta melhora para este último grupo.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.M; NANI, E.P.; TEIXEIRA, L.N.; PERUZZO, D.C.; JOLYA, J.C.; NAPIMOGA, M.H.; MARTINEZ, E.F. Strontium ranelate increases osteoblast activity. *Tissue and cell*, 48:183-188, 2016.

AL-SHAHAT, A.R.; SHAIKH, M.A.; ELMANSY, R.A. Prostatic assessment in rats after bilateral orchidectomy and calcitonin treatment. *Endocr Regul*, v.45, n.1, p.29-36, 2011.

BRENNAN T, RYBCHYN M, GREEN W, ATWA S, CONIGRAVE A, MASON R. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *British journal of pharmacology*.; v. 157, n. 7, p. 1291-300, aug. 2009.

CAIRES, E.L.P.; BEZERRA, M.C.; JUNQUEIRA, A.F.T.A.; FONTENELE, S.M.A.; ANDRADE, S.C.A.; D'ALVA, C.B. Tratamento da osteoporose pós-menopáusia: um algoritmo baseado na literatura para uso no sistema público de saúde. *Rev. Bras. Reumatologia*, v.57, n.3, p.254-263, 2017.

Gomes-Ferreira, PHS, de Oliveira, D., Frigério, PB et al. Teriparatida melhora as características microarquitetônicas do osso periimplantar em ratos orquiectomizados. *Osteoporos Int* 31, 1807-1815 (2020).

HARVEY N, DENNISON E, COOPER C. Osteoporosis: impact on health and economics. *Nature Reviews Rheumatology*.; v. 6, n. 2, p. 99-105, feb. 2010.

HURTEL - LEMAIRE AS, MENTAVERRI R, CAUDRILLIER A, COUNARIE 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. *Journal of Biological Chemistry*.; v. 284, n. 1, p. 575-84, jan. 2009.

MANRIQUE, N.; SILVA-PEREIRA, C.C.; LUVIZUTO, E.R.; SANCHÉZ, M.D.P.R.; OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R.; SUMIDA, D.H.; ANTONIALI, C. Hypertension modifies OPG, RANK and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Invest* 19:1319-1327 (2015).

NAIR, B.P.; SINDHUA, M.; NAIR, P.D. Polycaprolactone-laponite composite scaffold releasing strontium ranelate for bone tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143:423-430, 2016.

Oliveira LG, Guimarães MLR. OSTEOPOROSE NO HOMEM. *Rev Bras Ortop*. 2010;45(5):392-6.

PARDHE, BASHUDEV ET AL. "Effect of age and estrogen on biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women: a population-based study from nepal." *International journal of women's health*, p.781-788, 2017.

PILMANE, M.; SALMA-ANCANE, K.; LOCA, D.; LOCS, J.; BERZINA-CIMDINA, I. Strontium and strontium ranelate: historical review of some of their functions. *Materials science & engineering*. 2017.

QUERIDO, W.; CAMPOS, A.P.C.; FERREIRA, E.H.M.; SAN-GIL, R.A.S.; ROSSI, A.M.; FARINA, M. Strontium ranelate changes the composition and crystal structure of the biological bone-like apatite produced in osteoblast cell cultures. *Cell Tissues Res*, 357:793-801, 2014. Riggs, B.L.; Khosla, S.; Melton, L.J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*, 23:279-302, 2002.

Shapurian, T.; Damoulis, P. D.; reiser, G. M.; Griffin, T. J.; Rand, W. M. Quantitative evaluation of bone density using the Hounsfield index. *Int J Oral Maxillofac Implants*, Lombardi, v. 21, n. 2, p. 290-297, Mar./Apr. 2006.

SHIN, Q.; QIAN, Z.; LIU, D.; LIU, H. Surface Modification of Dental Titanium Implant Layer-by-Layer Eletrostatic Self-Assembly. *Frontiers in Physicology*, 2017.

SILVA, G.A.B.; BERTASSOLI, B.M.; SOUSA, C.A.; ALBERGARIA, J.D.; DEPAULA, R.S.; JORGE, E.C. Effects of strontium ranelate treatment on osteoblasts cultivated. *J Bone Miner Metab*, 36:73–86, 2018.

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

Yogui, F. C., Ervolino-Silva, A. C., Pitol-Palin, L., Coléte, J. Z., Hassumi, J. S., Monteiro, N. G., Okamoto, R. (2020). Strontium ranelate promotes increased peri-implant bone formation in ovariectomized rats. *Research, Society and Development*, 9(10), e7539109092-e7539109092.