



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernanda Castanheira Gonçalves

**Influência do alendronato e ranelato de estrôncio na reparação de alvéolos pós
extração e na progressão/tratamento da periodontite: estudo em ratos**

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernanda Castanheira Gonçalves

Influência do alendronato e ranelato de estrôncio na reparação de alvéolos pós extração e progressão/tratamento da periodontite: estudo em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Odontologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio

Araraquara

2022

G635i

Gonçalves, Fernanda Castanheira

Influência do alendronato e ranelato de estrôncio na
reparação de alvéolos pós extração e na
progressão/tratamento da periodontite: estudo em ratos /
Fernanda Castanheira Gonçalves. -- Araraquara, 2022
111 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

1. Osteonecrose. 2. Alendronato. 3. Estrôncio. 4. Extração
Dentária. 5. Periodontite. I. Título.

Fernanda Castanheira Gonçalves

Influência do alendronato e ranelato de estrôncio na reparação de alvéolos pós extração e progressão/tratamento da periodontite: estudo em ratos

Comissão julgadora

Defesa para obtenção do grau de Doutora em Periodontia

Presidente e orientador Prof^a. Dr^a. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

2º Examinador Prof^a. Dr^a. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

3º Examinador Prof. Dr. Nicolau Conte Neto

4º Examinador Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Neves Jardim

Araraquara, 01 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES

Fernanda Castanheira Gonçalves

NASCIMENTO: 28/12/1992 – Barretos – São Paulo

FILIAÇÃO: José Mauro Gonçalves

Márcia Gonçalves Castanheira

2011 – 2015: Curso de Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2016 – 2018: Curso de Pós – Graduação em Odontologia – Área de
Concentração: Periodontia Nível: Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2018 – 2021 : Curso de especialização – Implantodontia

Faculdade de Odontologia da APCD

2018 – Atual: Curso de Pós – Graduação em Odontologia – Área de
Concentração: Periodontia Nível: Doutorado

Dedico este trabalho à Deus, que tornou possível a realização de cada etapa de minha jornada. Aos meus pais e avós, Márcia e José Mauro, Horácio e Tereza, exemplos de dedicação, esforço, humildade e amor.

Aos meus irmãos Thiago e Nicolý pelo companheirismo durante toda a trajetória desta etapa. Aos meus tios, tias e amigos que de certa forma dividem momentos passados por mim, e acreditam na minha competência e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente...

À Profa. Dra. Rosemary Adriana C. Marcantonio, minha orientadora, exemplo de professora, sinônimo de dedicação, competência, transmissão de conhecimentos, além de ser uma pessoa amiga com um coração muito grande. Me acolheu em meus primeiros passos desde a graduação, confiando em meu potencial e permitindo que me tornasse pesquisadora, saciando minhas dúvidas, anseios e compartilhando comigo conhecimentos não só em âmbito científico, mas também conhecimentos e experiências que levarei comigo a vida inteira.

A Isabella, minha parceira de pesquisa e de vida, extremamente dedicada e inteligente, que esteve comigo todos os altos e baixos desses anos de pesquisa. Aos meus amigos Camila Marcantonio, Felipe Pinotti, José Rodolfo Spin, Carol Marcantonio, Maria Eduarda, Isis, pelos bons momentos, ajuda nas horas difíceis, angústias, descontrações e maravilhosos momentos de convivência que através de conselhos, ideias, transmissão de experiências e conversas foram os alicerces essenciais nessa jornada.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-(FOAr-UNESP), pela estrutura oferecida e acolhimento.

A todos os professores da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, que de certa forma sempre me puderam ajudar por meio da amizade, conversas, e ensinamentos passados durante a graduação podendo-me fazer crescer profissionalmente.

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia e do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia Iza e Suleima, pela paciência, ajuda e confiança depositados. Especialmente, a Claudinha por todos os ensinamentos, paciência, dedicação, conselhos e experiências trocadas e horas agradáveis compartilhadas durante todos esses anos. Aos funcionários do setor de Pós-graduação Cristiano e José Alexandre pela atenção dada aos momentos que precisei.

Aos funcionários, em geral, da Faculdade de Odontologia de Araraquara-(FOArUNESP).

Aos amigos especiais, aos colegas da faculdade, da pós-graduação e colegas fora do ambiente institucional.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

- Disponível em :

Gonçalves FC. Influência do alendronato e ranelato de estrôncio na reparação de alvéolos pós extração e progressão/tratamento da periodontite: estudo em ratos. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

O objetivo foi avaliar o efeito preventivo da administração do Ranelato de Estrôncio sobre o processo de osteonecrose induzida por bisfosfonatos, e o efeito do alendronato e estrôncio na modulação da doença periodontal experimental. Na avaliação da influência do estrôncio na osteonecrose induzida por bisfosfonato, foram utilizados 60 ratos, divididos em 6 grupos: Grupo CTR – administração de soro fisiológico diária por 60 dias, posteriormente foi realizada cirurgia para extração dos primeiros molares inferiores, e continuação da aplicação de soro por mais 30 dias; Grupo ALN – administração alendronato de sódio (1 mg/kg/dia) durante 60 dias antes da extração dentária e a mesma foi continuada por 30 dias; Grupo ALN/S – administração de alendronato por 60 dias e feita a extração, continuação de soro por 30 dias; Grupo ALN/STR – alendronato durante 60 dias e posteriormente foi interrompida a sua administração por 30 dias previamente a extração. Em seguida a extração, foi administrado o ranelato de estrôncio por 30 dias (625 mg/kg/dia); Grupo ALN/S60 – alendronato foi administrado por 60 dias e sua administração interrompida por 30 dias até o momento da extração. Posteriormente, foi administrado soro por mais 30 dias após a cirurgia.; Grupo ALN/STR 60 – administração alendronato por 60 dias, após esse período a administração do alendronato foi interrompida e iniciado o ranelato de estrôncio, por 30 dias. Após esse período os dentes foram extraídos e a aplicação do ranelato de estrôncio foi continuada por mais 30 dias. Foram realizadas análises microtomográfica, análises histológica/estereométrica e histológicas. Os resultados mostraram uma melhora nos efeitos colaterais da osteonecrose por bisfosfonatos nos grupos em que foram administrados estrôncio, mesmo na presença de tecido necrótico ocorreu a formação da matriz de tecido ósseo na porção basal dos alvéolos. Para avaliar a progressão da doença periodontal foram utilizados 21 ratos, divididos em 3 grupos: Grupo CTR – administração de soro fisiológico subcutânea diariamente; Grupo ALD – administração de alendronato de sódio (1 mg/kg/dia); Grupo STR – administração de ranelato de estrôncio (625 mg/kg/dia. Em todos os grupos os medicamentos foram administrados durante 60 dias, sendo que após 45 dias de início da administração foram colocadas ligaduras nos segundos molares superiores. Para avaliar a influência desses medicamentos no tratamento da doença periodontal foram utilizados 42 animais que foram divididos em 3 grupos, cada grupo com 2 sub-grupos cada (7 animais em cada sub-grupo; n=14 ligaduras/sub-grupo) de acordo com o seguinte protocolo: 1) Controle (CTR), indução da doença periodontal e administração de soro fisiológico 1 mg/kg/dia até o momento da eutanásia. 2) Alendronato (ALD), indução da DP por 15 dias, juntamente com a administração diária bisfosfonato 1 mg/kg/dia até o momento da eutanásia. 3) Estrôncio (STR), indução da DP e administração diária de Ranelato de Estrôncio aplicado 625 mg/kg/dia por gavagem até o momento da eutanásia. Cada grupo teve 2 sub-grupos onde o subgrupo RR recebeu tratamento periodontal após a indução da DP e o subgrupo NR os animais não receberam nenhum tipo de tratamento. Os animais foram eutanasiados nos

períodos de 7, 15 e 30 dias. Em ambos os estudos foram realizadas análises microtomográfica, histológica, histométrica, estereométrica. Foi observado que os medicamentos não impediram o aparecimento da doença periodontal. O ALN foi capaz de minimizar a perda óssea alveolar, porém nas regiões interproximais tinham pequenas áreas de tecido necrótico, já os animais tratados com STR continham uma maior área de tecido de reparação, matriz de tecido conjuntivo, fibras colágenas organizadas e matriz osteóide. O ALD e o STR influenciaram na modulação da periodontite, ALD diminuindo a perda óssea alveolar e o STR aumentando o tecido de reparação nas áreas em que ocorreu reabsorção óssea.

Palavras-chave: Osteonecrose. Alendronato. Estrôncio. Extração dentária. Periodontite.

Gonçalves FC. Influence of alendronate and strontium ranelate on post extraction socket repair and their effects on the progression and treatment of periodontitis: study in rats [tese de doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the preventive effect of the administration of strontium ranelate on the process of bisphosphonate-induced osteonecrosis, and the effect of alendronate and strontium on the modulation of experimental periodontal disease. 60 lower rats, divided into 6 groups: Group saline solution for 60 days, administered later to the lower first molars, and continuation of the saline operation for another 30 days; ALN group – alendronate drug administration (1 mg/kg/day) for 60 days before collection and continued for 30 days; ALNS group – administration of alendronate for 60 days and done at 30, continuation of serum for 60 days; Group ALN/STR – alendronate 60 days and 30 days later, its administration was interrupted for 60 days prior to a collection. After receiving, strontium ranelate was administered for 30 days (625 mg/kg/day); Group ALN /S60– alendronate was administered for 60 days and its administration for 30 days until the moment of reception. Subsequently, it was administered for an additional 30 days after surgery.; ALN/Sr 60 group – alendronate administration for 60 days, after which alendronate administration was started and strontium ranelate was started for 30 days. After this period, the teeth were extracted and the application of strontium ranelate was continued for another 30 days. Microtomographic, histological/stereometric and histological analyzes were performed. Osteonecrosis effects an improvement in the beneficial effects of bisphosphonates, even in the formation of bone tissue matrix in the basal portion of necrotic tissues. To evaluate the progression of periodontics, 21 rats were used, the disease was concentrated in 3 groups: Group subcutaneous saline daily; ALD group – administration of drug alendronate (1 mg/kg/day); STR group – administration of rancid strontium 25 mg/kg/day. In all groups, the drugs were administered for 60 days, and after 4 days of starting administration there were 45 days of starting administration, there were 4 connections prior to these second molars. To evaluate the influence of Medications in the treatment of periodontics, 42 animals were used which were resolved into 3 groups, each group with 2 subgroups each (7 animals in each subgroup; 7 animals in each subgroup; 14 ligatures/subgroup) according to the following protocol: 1) Control of periodontal disease and administration of saline solution 1 mg/kg/day until the moment of euthanasia. 1 mg/kg/day 2 days, ALD, A Phosphonate, with daily administration up to 1 mg/kg/day. 3) Strontium (STR), PD induction and daily administration of Strontium ranelate applied 625 mg/kg/day by gavage until the time of euthanasia. Each group had 2 subgroups where the RR subgroup received periodontal treatment after PD induction and the NR subgroup the animals did not receive any type of treatment. The animals were euthanized at 7, 15 and 30 days. In both studies, microtomographic, histometric and stereometric views were performed. It was observed that the drugs did not prevent the onset of periodontal disease. The ALN was able to minimize alveolar loss, but the interproximal regions had areas of alveolar tissue, whereas the animals treated with larger STRs contained an area of connective tissue, small matrix, organized bone fibers. OLD and STR influenced bone loss, ALD modulation of bone injury and increased alveolar tissue in areas where resorption occurred.

Keywords: Osteonecrosis. Alendronate. Strontium Ranelate. Tooth Extraction. Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 Artigos.....	17
3.1 Artigo 1	17
3.2 Artigo 2.....	37
3.3 Artigo 3.....	52
3.4 Artigo 4.....	70
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
5 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE A.....	96
APÊNDICE B	102
ANEXO A.....	109
ANEXO B.....	111

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos, são medicamentos utilizados por pacientes que apresentam doenças relacionadas ao metabolismo ósseo, osteopenia, osteoporose, neoplasias ósseas, metástases ósseas, doenças de pageot, doença óssea metastática, mieloma múltiplo, entre outras doenças raras. Eles têm ação na inibição da perda de densidade óssea mineral, através da indução do apoptose de osteoclastos, impedindo a reabsorção óssea. Seus efeitos benéficos a favor da diminuição e estabilização da densidade óssea, tornaram esses medicamentos de primeira escolha em patologias ósseas¹.

Após 50 anos de inúmeros estudos sobre sua farmacologia e seus mecanismos de ação, pode-se elucidar várias formas de ação desse medicamento usados como forma de tratamento nas doenças ósseas metabólicas². Sua eficácia está descrita através de duas propriedades chaves: forte habilidade de se ligar ao osso mineralizado e sua capacidade de produzir um efeito inibitório em osteoclastos maduros³. Uma vez administrados, eles se ligam aos cristais de hidroxapatita de matriz mineralizada e são incorporados pelas células clásticas à medida que degradam a matriz⁴.

O Alendronato (ALD) é um bisfosfonato nitrogenado de terceira geração e apresenta uma poderosa ação antirreabsorção, favorecendo a apoptose de osteoclastos e inibindo sua diferenciação durante o processo de maturação⁵. O mecanismo de ação apoptótica dos osteoclastos é feita através da inibição da via farnesil fosfato sintase e outras enzimas da via do malevolato, que dá origem a modificações estruturais na membrana dos osteoclastos interrompendo a isoprenilação de proteínas⁶.

Apesar de seus efeitos benéficos, o tempo de administração dos bisfosfonatos e suas concentrações no organismo, tem apresentado sérios problemas aos pacientes. Devido ao fato de sua absorção começar no estômago, passar pelo duodeno e íleo, o medicamento em seu trajeto pode danificar camadas epiteliais durante sua absorção, como nos estudos de Twiss et al.,2001⁷, 2006⁸ e 1999⁹. A excreção do medicamento é feita pelo rim, podendo ocasionar lesões renais^{10,11}. A alta permanência da droga ligada ao tecido ósseo pode ocasionar fraturas ósseas¹². As altas concentrações destas drogas no organismo gera um

acúmulo no osso, um efeito contínuo resultando em osteonecrose^{11,12}. Recentemente vem sido relatado, o risco de osteonecrose em maxilares após a realização de alguns procedimentos cirúrgicos odontológicos¹³⁻¹⁶. O efeito adverso dos bisfosfonatos sobre a indução de osteonecrose dos maxilares tem levado a busca por medicamentos de via de ação óssea diferente, como os compostos a base de Estrôncio^{17,18}.

O estrôncio é um elemento químico pertencente ao grupo dos metais alcalino terrosos, é um metal mole, não radioativo, e na tabela periódica ele está localizado bem abaixo no Cálcio (Ca), sendo assim possui semelhanças estruturais e funcionais como absorção, eliminação e afinidade aos tecidos duros. Devido ao fato de o estrôncio possuir um mimetismo estrutural com o cálcio, o organismo o incorpora em seus tecidos ósseos e dentes. No início de sua administração ele se deposita sobre os cristais de hidroxiapatita e após sua permanência no organismo a longo prazo ele troca com o cálcio, se mantendo ligados ao tecido ósseo^{19,20}.

Ranelato de Estrôncio (STR) é um medicamento antirreabsortivo que tem sido considerado promissor em doenças do metabolismo ósseo devido ao fato de agir tanto na inibição de reabsorção óssea, como na indução de formação óssea, resultando em um aumento de massa mineral óssea em vários estudos farmacológicos clínicos, animais e in vitro^{19,20}. O Ranelato de estrôncio tem a capacidade de diminuir a atividade dos osteoclastos, induzir a apoptose e diferenciação de osteoclastos, resultando em uma diminuição da reabsorção óssea, por outro lado ele aumenta a replicação de células pré-osteoblásticas e secundariamente a atividade de células funcionais e síntese de matriz óssea, estimula a síntese de DNA e síntese colágeno ósseo, classificado como um fármaco formador de osso^{19,20}.

Os mecanismos desse medicamento não estão completamente esclarecidos, estudos vem sendo propostos para descoberta dos seus mecanismos de ação. Ele atua nas células ósseas por vários mecanismos, como na ativação de receptores distintos ao cálcio, aumentando a replicação células pré-osteoblásticas e sua diferenciação em osteoblastos, através do aumento produção de prostaglandinas (PGE2)²⁰. Por outro lado atuam na ativação de receptores sensíveis ao cálcio (CaR) diminuindo a indução de osteoclastogênese, e aumentando a razão OPG/RANKL²⁰.

O ranelato de estrôncio foi primeiramente testado em ratos osteopênicos para avaliar sua eficácia na prevenção de perda óssea²¹. Foram realizados estudos em modelos animais ovariectomizados, para simular a perda da densidade mineral óssea, que ocorre em mulheres pós menopausa, tratamentos com estrôncio apresentaram que o medicamento inibiu perda óssea trabecular induzida por falta de estrogênio. Em outros estudos mostraram que o ranelato de estrôncio diminuiu a reabsorção óssea, porém não atuou na formação óssea, porém foi mantida em alto nível, indicando que o medicamento tem uma ação distinta na reabsorção e formação óssea²¹. Assim, estudos indicaram que o ranelato de estrôncio tem efeitos benéficos promissores a favor da inibição da perda óssea.

Devido aos seus mecanismos de ação a favor da formação óssea mineral e inibição da reabsorção óssea, poucos estudos estão sendo realizados com esse medicamento associando sua influência na modulação do hospedeiro afim de encontrar melhorias no tratamento de doenças periodontais²²⁻²⁴. Por outro lado, os bisfosfonatos também podem promover uma atividade anti-inflamatória, devido a inativação da matriz metaloproteinase. Com isso, os bisfosfonatos tem sido pesquisado para tratar periodontite em experimentos animais²⁵⁻²⁷ e em humanos^{26,28}.

Considerando a ação desses medicamentos a favor da diminuição da perda óssea alveolar^{13,18,22,24,27,29-31}, o objetivo do estudo foi avaliar a influência da administração crônica de ranelato de estrôncio na prevenção e tratamento da osteonecrose induzida por alendronato pós tratamento cirúrgico, extração dentária, e o uso desses medicamentos antirreabsortivos sistêmicos, alendronato e ranelato de estrôncio, na modulação da doença periodontal experimental.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse estudo foi de avaliar a influência dos medicamentos alendronato e ranelato de estrôncio em alvéolos pós extração e na prevenção/tratamento periodontal.

2.2 Objetivos Específicos

Estudo 1: O objetivo desse estudo foi avaliar, em ratos, a influência da utilização do ranelato de estrôncio utilizado de forma a minimizar/debelar os efeitos do bisfosfonato na osteonecrose induzida.

Hipóteses:

- H0: A utilização do ranelato de estrôncio não altera o processo de osteonecrose por bisfosfonato
- H1: A utilização do ranelato de estrôncio altera o processo de osteonecrose por bisfosfonato.

Estudo 2: O objetivo deste projeto foi avaliar o processo de reparo ósseo utilizando os medicamentos antirreabsortivos sistêmicos como: alendronato e ranelato de estrôncio para prevenção e/ou tratamento da doença periodontal induzida. Para responder estas hipóteses foram realizados os estudos:

- Efeito do tratamento sistêmico com alendronato e estrôncio na progressão da doença periodontal experimental.
- Efeito da administração de alendronato e estrôncio no tratamento da doença periodontal experimental.

3 ARTIGOS

Artigos aceitos e que serão submetidos sobre os estudos

3.1 Artigo 1*

Odontology
<https://doi.org/10.1007/s10266-021-00678-1>

ORIGINAL ARTICLE



Strontium ranelate improves post-extraction socket healing in rats submitted to the administration of bisphosphonates

Fernanda Castanheira Gonçalves¹ · Bruno Arruda Mascaro¹ · Cássio Rocha Scardueli¹ ·
Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira² · Luis Carlos Spolidorio³ · Rosemary Adriana Chierici Marcantonio¹

Received: 21 July 2021 / Accepted: 29 November 2021
© The Society of The Nippon Dental University 2022

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of strontium ranelate (Sr) on post-extraction socket healing in rats submitted to the administration of bisphosphonates. Sixty rats were submitted to the tooth extraction of the first lower molar after 60 days of the daily administration of saline solution (SS) or alendronate (ALN). Then, the animals were allocated into six groups namely CTR: administration of SS during the whole experiment, ALN: administration of ALN during the whole experiment, ALN/SS: application of SS for 30 days after extraction in animals previously treated with ALN, ALN/Sr: application of Sr for 30 days after extraction in animals previously treated with ALN, ALN/S60: ALN therapy interruption 30 days before the extraction followed by the application of SS for 60 days, and ALN/Sr60: ALN therapy interruption 30 days before the tooth extraction followed by the application of Sr for 60 days. The healing of the post-extraction sockets was evaluated by microCT and histomorphometry. The use of ALN induced partial bone necrosis, inflammatory infiltration, and a delay in soft tissue healing; the use of Sr improved the connective tissue organization. Sr has subtle positive effects on the post-extraction healing in animals submitted to the administration of bisphosphonate.

Keywords Bone healing · Bisphosphonates · Tooth extraction · Pre-clinical study · Strontium ranelate

* Artigo redigido segundo as normas do periódico *Odontology*, no qual foi publicado:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10266-021-00678-1>.

Original Paper: Strontium ranelate improves post-extraction socket healing in rats submitted to the administration of bisphosphonates

Fernanda Castanheira Gonçalves¹, Bruno Arruda Mascaro¹, Cássio Rocha Scardueli¹, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira², Luis Carlos Spolidorio³, Rosemary Adriana Chierici Marcantonio²

¹ São Paulo State University (Unesp), Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, Araraquara, Brazil.

² Department of Periodontology, Dental School, UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

³ São Paulo State University (Unesp), Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, Araraquara, Brazil.

Corresponding author:

Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Humaitá St., 1680. Zip code 14801-930, Araraquara, SP, Brazil

Phone: +55 (16) 33016376/Fax: +55 (16) 33016369

E-mail: adriana.marcantonio@unesp.br

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of strontium ranelate on post-extraction socket healing in rats submitted to the administration of bisphosphonates. Sixty rats were randomly allocated into 6 groups (n=10) according to the different therapeutic protocols applied: CTR – Administration of saline solution (SS) daily for 60 days that was continued for more than 30 days after extraction of the first lower molar; ALN – Administration of sodium alendronate (ALN) (1 mg/kg/dia) daily for 60 days that was continued for more 30 days after extraction of the first lower molar; ALN/SS – Administration of ALN for 60 days, and the application of SS for 30 days after the extraction of the first lower molar; ALN/Sr – Administration of ALN daily for 60 days, and application of strontium ranelate (Sr) (625 mg/kg/day) for 30 days after extraction of the first lower molar; ALN/S60 – ALN administration for 60 days, and the interruption of this therapy for 30 days. The animals were then submitted to the administration of SS during this period and 30 days after the tooth extraction; ALN/Sr 60 – ALN administration for 60 days, and the interruption of this therapy for 30 days. The animals were then submitted to the administration of Sr during this period and 30 days after the

tooth extraction. The healing of the bone and soft tissues of the post-extraction sockets was evaluated by micro-CT and histomorphometric analysis. The use of ALD induced partial necrosis of the bone, inflammatory infiltration, and a delay in soft tissue healing; the use of strontium only improved the connective tissue organization but did not improve the bone healing. It can be concluded that the Sr has only subtle positive effects on the post-extraction healing in animals submitted to the administration of bisphosphonate.

Key-words: Bone healing, bisphosphonates, tooth extraction, pre-clinical study strontium ranelate.

Introduction

Bisphosphonates are a class of drugs that have been used for the treatment and control of pathologies that alter bone metabolism by inhibiting the bone remodeling process, thereby promoting the maintenance of mineral bone density and preventing the process of tumor metastasis (Kuźnik et al., 2020; Ying et al., 2020). Its mechanism of action consists of blocking the enzyme farnesyl synthase from mevalonate via, which reduces osteoclastic activity and induces the apoptotic process of these cells (Russell, 2011). Paradoxically, this effect of bisphosphonates is also responsible for its side effects, since the reduction in bone remodeling resulting from its mechanism of action impairs the bone repair process is associated with defects and fractures in this tissue. (Borromeo et al., 2015; Molvik, Khan, 2015). It has been reported that the consumption of bisphosphonates impairs the healing of fractures (Molvik H, Khan, 2015), slows implant osseointegration (Hou et al., 2019) and can promote bisphosphonate-induced osteonecrosis, especially at sites of bone defects arising from tooth extraction (Shudo et al., 2018).

These adverse effects related to the use of bisphosphonates have stimulated the search for therapies that aim to stimulate the bone repair process in users of these drugs (Imada et al., 2019; Zang et al., 2019). As approaches for this purpose, it has been proposed to interrupt the administration of bisphosphonates before surgical procedures in the oral cavity; however, the fact that bisphosphonate is integrated into the structure of bone tissue raises doubts regarding the effectiveness of this type of approach (Hasegawa et al., 2017; Shudo et al., 2018). The use of anti-resorptive drugs with different mechanisms of action than bisphosphonates has also been indicated as

a therapeutic alternative to replacing the use of these drugs (Molon et al., 2015; Colapinto et al., 2018); however, its effect on bone healing in patients previously treated with bisphosphonates is uncertain.

Strontium-based compounds (Sr), such as strontium ranelate, strontium carbonate, and strontium chloride have been cited in the literature as candidates for anti-osteoporotic agents that can act both in the mechanisms of resorption and in bone formation (Busse et al., 2010; Marie et al., 2011). *In vitro* studies have shown that strontium-based compounds directly suppress osteoclast genesis by reducing the expression of the NF- κ B pathway in osteoclast precursor cells (Yamaguchi et al., 2012) or indirectly by reducing the paracrine action of osteocytes in the formation of osteoclasts (Bakker et al., 2013), thus being able to inhibit bone resorption. Strontium-based compounds have also been shown to increase the expression of bone formation markers (Quade et al., 2020), and this effect is related to the activation of calcium receptor-dependent or independent pathways in osteoblasts that induce the ERK1/2 and Akt signaling pathways (Fromigué et al., 2009), which are important for proliferation (Kapur et al., 2004) and the reduction of osteoblast apoptosis (Rybchyn et al., 2019), respectively. A clinical study that evaluated hip bone biopsies of 15 patients who were undergoing bisphosphonate treatment, which was replaced by the application of strontium ranelate, showed that this drug promoted an increase in the number of osteoblasts and the formation of an osteoid matrix, without reducing the anti-resorptive effect of pretreatment (Busse et al., 2010).

Thus, the use of strontium ranelate (SrR), can theoretically improve bone remodeling in dental alveoli of patients previously treated with bisphosphonates, which would reduce the possibility of the occurrence of osteonecrosis lesions induced by bisphosphonates. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of SrR on bone tissue after the administration of bisphosphonate following surgical extraction procedures in rat mandibles.

2. Material and methods

2.1. Animals and treatment protocols

This study was approved by the Ethics in Animal Research Committee of the University (27-2015). Sixty male adult rats with a 10-week-old weight of between 190 and 210g (*Rattus Norvegicus*, varience *Albinus*, *Holtzman*) were used. The animals were

maintained on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ with *ad libitum* access to a standard laboratory diet and water.

The animals were randomly assigned into six groups, with 8 animals/group: CTR – Administration of saline solution (SS) daily for 60 days that was continued for more than 30 days after extraction of the first lower molar; ALN – Administration of sodium alendronate (ALN) (1 mg/kg/day) (Conte Neto et al., 2013) daily for 60 days that was continued for more 30 days after extraction of the first lower molar; ALN/SS – Administration of ALN for 60 days, and then SS was applied for 30 days after extraction of the first lower molar; ALN/Sr – Administration of ALN daily for 60 days, and strontium ranelate (Sr) (625 mg/kg/day) (Lavet et al., 2017) was applied for 30 days after extraction of the first lower molar; ALN/S60 – ALN administration for 60 days, with the interruption of this therapy for 30 days. The animals were then submitted to the administration of SS during this period and 30 days after the tooth extraction; ALN/Sr 60 –ALN administration for 60 days, and the interruption of this therapy for 30 days (Figure 1).

Experimental protocol

Extraction of the bilateral lower first molar was performed in all animals. The animals were anesthetized by a combination of ketamine chloridrate (Ketamine Agener; Agener União Ltda, São Paulo, SP, Brazil; 0.08 mL/100 g body weight) and xylazine 2% (Rompum; Bayer S.A., São Paulo, SP, Brazil; 0.04 mL/100 g body weight). The animals were placed in the prone position on the operating table, using a Holleback Caver, the teeth were dislocated and completely avulsed or divided into two segments and removed separately (Conte Neto et al, 2013), by a single trained professional (FCG). After the experimental periods for each group, the animals were euthanized through the application of anesthesia overdose. Parts of the regions related to the first molars were obtained together with the second molars.

Clinical Evaluation

The general health of the animals was observed during the experimental period. It analyzed the difficulty of the operator at the time of extraction of teeth and wound healing post-extraction.

Evaluation by Three-dimensional Radiographic Analysis (Micro-CT)

The samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours, washed under running water for 24 hours, and stored in 70% alcohol. The samples were scanned by a microtomograph - μ CT scan (Skyscan, Aatselaar, Belgium) following the parameters: Camera pixel: 12.45; X-ray tube potency: 65 kVP, X-ray intensity: 385 μ A, integration time: 300 ms, filter: Al-1 mm, voxel size: 18 μm^3 . The images were reconstructed, spatially repositioned, and analyzed by specific software (NRecon, Data Viewer, CTAnalyser, Aatselaar, Belgium). The region for analysis was obtained by defining an area of rectangular interest in the region of extraction of the first molars (ROI) with dimensions of 1.20 x 3.0 mm, in the mesiodistal and corono-apical directions (Figure 2) and the vestibulo-lingual sense; an average of 80 images per analyzed region were obtained. A threshold of 65–225 shades of gray was used, which made it possible to analyze the percentage of bone volume in the region.

Histological and Stereometric Analysis

After scanning on the microtomograph, the parts were taken for decalcification with EDTA for 8 weeks. Serial sections were performed 4 μm thickness in the sagittal plane, towards the vestibule/lingual axis along with the second molar, obtaining 3 cuts in each blade and 8 blades per animal. For each sample, eight slides were stained per animal, four by hematoxylin-eosin (HE) for histological and stereometric analysis, and the fifth slide of specific groups was subjected to 0.1% picosirius staining to confirm the presence of collagen fibers with a light microscope and a polarization filter (Lattouf, 2014). The other slides were used for immunohistochemical analysis. The analysis of histological description was performed by a single trained examiner (LCS), through the evaluation of histopathological sections stained in hematoxylin/eosin and picosirius. In total, 32 slides were analyzed, 4 slides per sample and 8 samples per group, with the aid of a commonly transmitted light microscope (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Germany), for morphological observations of the structures of the lower first molar region, with increases of 5x and 20x.

The stereometric analysis was performed using the methods employed by Conte Neto et al. (2013). They were performed by counting cells using a light microscope DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany), with 40x magnification. The images obtained were analyzed using an image analysis program Fiji ImageJ (National Institutes of Health, USA). To achieve this histological analysis,

an area of rectangular interest (ROI) was obtained in the region on the distal root of the first molar (M1), extending from the level of the junction cement/enamel (CEJ) molar second (M2) to the apical portion of M2 and between the mesial and distal surfaces of the alveolar bone. The ROI was divided into three equal areas (Figure 3); the quantification was performed with the aid of a grid of 75x75 pixels with 252 intersection points positioned on each previously determined area, and the values obtained in 3 ROIs were combined for statistical analysis. Within each ROI, the amount of necrotic bone, vital bone, connective tissue matrix, fibroblast (identified as spindle or stellate cells, ovoid or elongated nucleus), inflammatory cells, and other structures (NDA) was analyzed, with 3 cuts by the defect. This analysis was done by a trained examiner who was blinded to the groups (FCG).

Statistical analysis

The data from the stereometric and microtomographic analyses were submitted to the Kolgomorov-Smirnov normality test and it was verified that the data were distributed according to the central distribution theorem, which allowed the use of parametric statistical tests for the inferential analysis of the data. The One-Way ANOVA test complemented by the Tukey test was used to make comparisons between groups. The GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA, USA) was used for the statistical analysis of this study, and the tests were applied at a significance level of 5%.

Results

ALN application interfered with the clinical characteristics of post-extraction sockets

The removal of teeth occurred with greater difficulty in those animals that were treated with ALN. In the 30-day postoperative period of extraction, the animals that received ALN had impaired healing, with many animals presenting extra-oral fistulas, edema in the region of the extraction, and exposed bone, while animals in the control group showed normal healing without complications.

The application of ALD hindered bone remodeling in the post-extraction sockets

The microtomographic analysis showed that the application of ALD promoted greater maintenance of bone tissue volume in the extraction sockets compared to the CTR group. (Figure 4 a–b). However, the histological aspect of these alveoli shows that,

despite the maintenance of the inter-root septa, the tissue present in the scar area was predominantly formed of necrotic bone tissue, disturbed by its empty gaps and surrounded by amorphous tissue (Figure 5 B-H-N), and the stereometric analysis showed that, in fact, the ALD group had a greater amount of necrotic tissue than the other groups (Table 1). These characteristics are consistent with the process of blocking bone tissue remodeling.

The interruption of the application of ALD did not interfere with the bone remodeling process in post-extraction sockets

It was verified that in the animals that were submitted to treatment with ALD and which had periods of interruption of the administration of this drug (ALD/S and ALD/S60) there was greater maintenance of the volume of the alveolus after extraction compared to the CTR group (Figure 4 A, B-C-D), which was associated with a subtle improvement in the healing pattern of the soft tissues that covered the alveoli 30 days after tooth extraction (Figure 5 C-I-O, D-J-P). The analysis of the histological description showed that these alveoli presented immature granulation tissue with abundant leukocyte infiltrate and the new formation of blood vessels supported by a thin weave of collagen fiber bundles; however, there was necrotic tissue on the surface of the region (Figure 5 C-I-O, D-J-P). Although this pattern was better than that found in the ALN group, there were no differences between this group and the ALN/SS and ALN/S60 groups in the stereometric analysis (Table 1).

The application of SrR stimulated the repair in post-extraction sockets in animals previously treated with ALN

The groups where the ALD was stopped and SrR administration started 30 days previously or shortly after extraction had higher volume maintenance of the extraction sockets than the CTR group (Figure 4 A B-C-D), however, this maintenance was associated with the presence of areas with dense mineralization with the absence of osteocytes and the presence of tiny areas of resorption, with the basal portion of the alveolus showing granulation tissue and large areas suggestive of bone matrix deposition (Figure 5 E-K-Q, F-L-R) which was confirmed by the staining of slides with PicroSirius Red (Figure 5 S-T). In the stereometric analysis, it was verified that the animals in the ALD/Sr and ALD/Sr60 groups had higher amounts of vital bone than the other groups. In addition, ALD groups/ALD Sr and/SR60 showed greater quantities of

fibroblasts and connective tissue matrix, and the CTR ALD groups. There were no differences between groups regarding the number of inflammatory cells (Table 1).

Discussion

The results of the present study demonstrated that the administration of bisphosphonate is efficient at stabilizing pathological bone loss; that is, it has positive effects on the repair and stabilization of bone tissue in alveoli after surgical extraction. These data were supposedly confirmed by microtomographic analysis, where the presence of mineralized tissue in the groups in which alendronate was administered or the association of alendronate/strontium is greater than in the control group, in which this drug was not administered (Aguirre et al., 2010). Despite performing the stabilization of mineralized tissue after extraction, we were unable to determine the origin of the mineralized tissues identified with this analysis alone.

Through histological analysis, it was possible to determine the differentiation of tissues and the repair process present in the alveolus. According to the protocol of Conte-Neto et al. (2013), it was possible to establish the osteonecrosis process in the groups in which alendronate was administered, characterized by the presence of necrotic bone tissue in the alveolar process, interdental and interradicular septum, a reabsorbed surface with empty bone gaps, with the absence of osteocytes and the presence of inflammatory tissue (Diaz-Borjon et al., 2006). The histological difference between the groups was characterized by the presence of strontium ranelate treatment, where it was possible to observe that, in addition to the presence of necrotic tissue in the interdental and inter radicular septum, these tissues were denser compared to the other groups; this can be explained by the ability of strontium to deposit on the hydroxyapatite crystals and in the long-term replace calcium, remaining attached to bone tissue (Marie et al., 2006). On the other hand, below the necrotic tissue, in the basal portion of the alveolus, granulation tissue and areas of the bone matrix are observed, with absent or small areas of resorption, confirming its double effect on bone metabolism. This was described by Maire et al. (2011), who reported that strontium can act on bone resorption by decreasing osteoclasts and also on bone formation through osteoblast differentiation, promoting bone turnover in favor of bone neoformation.

In a previous preclinical study, it was demonstrated that the use of SrR was related to the presence of non-vital bone in post-extraction alveoli; however, similar to our

findings, this tissue was not exposed to the oral cavity, which is a specific condition of osteonecrosis induced by bisphosphonates (Koth et al., 2020). Thus, the findings of this study demonstrate that the use of SrR can reduce the possibility of osteonecrosis, but the presence of non-vital bone associated with the use of this medication may be related to or a limited effect in reversing the effects of ALN administration. Alternatively, the resorption inhibition mechanism may be more active than the SrR-induced bone tissue formation mechanism (Koth et al., 2020). The absence of differences in the biomechanical properties of bone tissue in tibiae of ovariectomized rats where SrR was applied after the administration of ALN compared to animals where ALN was applied for the entire experimental period (Díaz et al., 2016) provides some indication that the action of SrR does not differ in a meaningful way from ALN in the maintenance of bone tissue by anti-resorptive mechanisms.

The animals in the control group, where no medication was administered, showed normal repair, with the presence of granulation tissue, fragments of necrotic bone tissue, bone spicules that were necrotic in the region of the alveolus; these characteristics were also observed by Aguirre et al. (2010), who evaluated the effects of bisphosphonates in post-extraction alveolar repair in rats. These findings may be related to the presence of bone spikes which were left at the time of extraction.

Due to this possible complication, some protocols that aim to stimulate bone remodeling in bisphosphonate users have been proposed, but with inconsistent results (Kang et al., 2020; Otto et al., 2020). One of the proposals for the preparation of the patient to undergo oral surgery procedures is the interruption of the consumption of bisphosphonates for some time before the surgical event (Ottensen et al., 2020; Otto et al., 2020). Studies have shown that protocols for interrupting the application of bisphosphonates reduce the occurrence and severity of osteonecrosis after extraction in rats (Zandi et al., 2015) and mini-pigs (Otto et al., 2020). However, this type of approach brings inconsistent results, as studies in humans do not demonstrate any benefits following the suspension of bisphosphonates in the prevention of osteonecrosis after extractions (Hasegawa et al., 2017; Kang et al., 2020). The explanation for the ineffectiveness of the bisphosphonate therapy interruption protocols in preventing osteonecrosis is due to the incorporation of bisphosphonates into the structure of bone tissue and the fact that its elimination time is uncertain (Kang et al., 2020; Ottensen et al., 2020). Also, the risk of interrupting treatment with

bisphosphonates does not allow the indication of this type of approach in all cases (Kang et al., 2020).

The purpose of this study, using SrR as a potentiating agent of bone remodeling, is to investigate its potential to act on bone resorption mechanisms in conjunction with bone formation mechanisms (Baker et al., 2013; Quade et al., 2020). This drug has been used effectively in the treatment of osteoporosis in humans (Barrionuevo et al., 2019) due to its inhibition in the action of osteoclasts (Yamaguchi et al., 2012; Bakker et al., 2013). Moreover, it has been reported that the use of strontium ranelate promoted positive effects in the repair of post-extraction sockets in ovariectomized rats (Miranda et al., 2020), on implant osseointegration in preclinical studies (Scardueli et al., 2018), and in the healing of tibial fractures in rats (Lavet et al., 2017). These effects on bone tissue repair are associated with the stimulation of biological markers that are related to the formation of bone tissue (Fromigué et al., 2009; Rybchyn et al., 2019; Miranda et al., 2020), and this difference in the mechanism of action of SrR with the mechanism of action of bisphosphonates promotes these drugs as alternatives for the safer treatment for bone tissue disorders, as it reduces the possibility of osteonecrosis (Busse et al., 2010; Pan et al., 2017). The replacement of ALN by SrR in this study reduced the severity of the osteonecrosis process associated with tooth extraction; however, the total prevention of osteonecrosis was not observed.

Querido et al. (2015), Komrakova et al. (2015) and Morabito et al. (2016) performed immunohistochemical analysis and demonstrated the presence of bone-forming proteins such as BMP-2 and osteocalcin when they administered strontium ranelate, confirming the presence of osteoblasts, and suggesting bone turnover in favor of bone formation (Marie et al., 2011). In the present study, these bone proteins were also found in the ALD/EST and ALD/EST60 groups, so it was possible to confirm the presence of osteoblasts in the region; another important notification reported in the study was that the longer the strontium administration time, the greater the expression of these proteins. The expression of bone proteins suggests bone remodeling in the basal portion of the alveoli, even after the presence of initial osteonecrosis. This was also reported by Pan et al. (2017), who published a case of BRONJ with serum CTX levels of 130pg/ml at the beginning of the disease, reporting a low rate of bone remodeling; after 3 years of treatment with strontium, the bone remodeling rates increased significantly to 320pg/ml, before returning to normal.

This study has some limitations as the impact of SrR administration on c-terminal telopeptide (CTX) rates, which is an important marker of collagen metabolism derived from bone tissue remodeling and has been used as an important measure, was not investigated. This is a clinical marker for decision making, ensuring that the extraction procedure was performed safely in humans (Hutcheson et al., 2014; Friedlander et al., 2015). Measuring this marker could determine the period required for the use of SrR that would promote its safe use, meaning that the medication that would promote the total prevention of osteonecrosis induced by bisphosphonates. Another limitation is the strontium dosage used, since it is not related to the treatment of diseases associated with bone metabolism and not specifically for the treatment of osteonecrosis; therefore, studies investigating this are still necessary, which will involve adjusting the dosage of strontium so that an ideal concentration for this type of treatment is determined. On the other hand, although this study protocol simulated a chronic administration period in animals, with high doses to induce osteonecrosis in surgical procedures, the animals were healthy, and the drug is often used in patients with pathological changes in bone metabolism, which can result in significant differences.

It can be concluded that the use of SrR reduces the severity of ALN-induced osteonecrosis after extraction but does not fully prevent this event and the interruption of ALN administration has limited effects on osteonecrosis after extraction.

References

- 1) Kuźnik A, Październiak-Holewa A, Jewula P, Kuźnik N: Bisphosphonates-much more than only drugs for bone diseases. *Eur J Pharmacol* 866:172773, 2020. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172773
- 2) Ying ZM, Hu B, Yan SG. Oral bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta: A systematic review and meta-analysis of six randomized placebo-controlled trials. *Orthop Surg.* 2020;12(4):1293-1303. doi:10.1111/os.12611
- 3) Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011;49(1):2-19. doi:10.1016/j.bone.2011.04.022
- 4) Borromeo GL, Brand C, Clement JG, et al. Bisphosphonate exposure and osteonecrosis of the jaw. *J Bone Miner Res.* 2015;30(4):749-750. doi:10.1002/jbmr.2428

- 5) Molvik H, Khan W. Bisphosphonates and their influence on fracture healing: a systematic review. *Osteoporos Int.* 2015;26(4):1251-1260. doi:10.1007/s00198-014-3007-8
- 6) Aliya A Khan, Archie Morrison, David A Hanley, Dieter Felsenberg, Laurie K McCauley, Felice O’Ryan, Ian R Reid, Salvatore L Ruggiero, Akira Taguchi, Sotirios Tetradis, Nelson B Watts, Maria Luisa Brandi, Edmund Peters, Teresa Guise, Richard Eastell, Angela M Cheung, Suzanne N Morin, Basel Masri, Cyrus Cooper, Sarah L Morgan, Barbara Obermayer-Pietsch, Bente L Langdahl, Rana Al Dabagh, K. Shawn Davison, David L Kendler, George K Sándor, Robert G Josse, Mohit Bhandari, Mohamed El Rabbany, Dominique D Pierroz, Riad Sulimani, Deborah P Saunders, Jacques P Brown, Juliet Compston. Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus. *Journal of Bone and Mineral Research* Vol. 30, No. 1, January 2015, pp 3–23. DOI: 10.1002/jbmr.2405
- 7) Hou M, Lee RSB, Du Z, Hamlet SM, Vaquette C, Ivanovski S. The influence of high-dose systemic zoledronate administration on osseointegration of implants with different surface topography. *J Periodontal Res.* 2019;54(6):633-643. doi:10.1111/jre.12664
- 8) Shudo A, Kishimoto H, Takaoka K, Noguchi K. Long-term oral bisphosphonates delay healing after tooth extraction: a single institutional prospective study. *Osteoporos Int.* 2018;29(10):2315-2321. doi:10.1007/s00198-018-4621-7
- 9) Imada M, Yagyuu T, Ueyama Y, et al. Prevention of tooth extraction-triggered bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws with basic fibroblast growth factor: An experimental study in rats. *PLoS One.* 2019;14(2):e0211928. Published 2019 Feb 8. doi:10.1371/journal.pone.0211928
- 10) Zang X, He L, Zhao L, He Y, Xiao E, Zhang Y. Adipose-derived stem cells prevent the onset of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw through transforming growth factor β -1-mediated gingival wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):169. Published 2019 Jun 13. doi:10.1186/s13287-019-1277-y
- 11) Hasegawa T, Kawakita A, Ueda N, et al. A multicenter retrospective study of the risk factors associated with medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients receiving oral bisphosphonate therapy: can primary

- wound closure and a drug holiday really prevent MRONJ?. *Osteoporos Int.* 2017;28(8):2465-2473. doi:10.1007/s00198-017-4063-7.
- 12)de Molon RS, Shimamoto H, Bezouglaia O, et al. OPG-Fc but not zoledronic acid discontinuation reverses osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice. *J Bone Miner Res.* 2015;30(9):1627-1640. doi:10.1002/jbmr.2490
- 13)Colapinto G, Volpi R, Forino G, et al. Patients' osteometabolic control improves the management of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018;125(2):147-156. doi:10.1016/j.oooo.2017.10.015
- 14)Busse B, Jobke B, Hahn M, et al. Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonate-altered hydroxyapatite: Matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure. *Acta Biomater.* 2010;6(12):4513-4521. doi:10.1016/j.actbio.2010.07.019
- 15)Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2011;22(6):1659-1667. doi:10.1007/s00198-010-1369-0
- 16)Yamaguchi M, Weitzmann MN. The intact strontium ranelate complex stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation. *Mol Cell Biochem.* 2012;359(1-2):399-407. doi:10.1007/s11010-011-1034-8
- 17)Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, Klein-Nulend J. Strontium ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and osteoblasts. *Bone.* 2013;53(1):112-119. doi:10.1016/j.bone.2012.11.044
- 18)Quade M, Vater C, Schlootz S, et al. Strontium enhances BMP-2-mediated bone regeneration in a femoral murine bone defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020;108(1):174-182. doi:10.1002/jbm.b.34376
- 19)Fromigué O, Haÿ E, Barbara A, et al. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):2189-2199. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00673.x
- 20)Kapur S, Chen ST, Baylink DJ, Lau KH. Extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 are both essential for the shear stress-induced human osteoblast proliferation. *Bone.* 2004;35(2):525-534. doi:10.1016/j.bone.2004.04.007

- 21) Rybchyn MS, Islam KS, Brennan-Speranza TC, et al. Homer1 mediates CaSR-dependent activation of mTOR complex 2 and initiates a novel pathway for AKT-dependent β -catenin stabilization in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2019;294(44):16337-16350. doi:10.1074/jbc.RA118.006587
- 22) Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E Jr. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(1):65-73. doi:10.1111/iep.12007
- 23) Lavet C, Mabilieu G, Chappard D, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate stimulates trabecular bone formation in a rat tibial bone defect healing process. *Osteoporos Int.* 2017 Dec;28(12):3475-3487. doi: 10.1007/s00198-017-4156-3. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28956091
- 24) Raed Lattouf, Ronald Younes, Didier Lutomski, Nada Naaman, Gaston Godeau, Karim Senni, Sylvie Changotade. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2014, Vol. 62(10) 751–758. DOI: 10.1369/0022155414545787.
- 25) JI Aguirre, MK Altman, SM Vanegas, SE Franz, ACF Bassit, TJ Wronski. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats *Oral Diseases* (2010) 16, 674–685. doi:10.1111/j.1601-0825.2010.01677.x
- 26) Alejandro Diaz-Borjon, MD, Thorsten M. Seyler, Natasha L. Chen, and S. Sam Lim. Bisphosphonate-Associated Arthritis. *J Clin Rheumatol* 2006;12: 131–133. DOI: 10.1097/01.rhu.0000221796.06383.4e
- 27) P. J. Marie & D. Felsenberg & M. L. Brandi. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int* (2011) 22:1659–1667. DOI 10.1007/s00198-010-1369-0
- 28) Koth VS, Salum FG, de Figueiredo MAZ, Cherubini K. Morphological and immunohistochemical features of tooth extraction sites in rats treated with alendronate, raloxifene, or strontium ranelate. *Clin Oral Investig.* 2020 Sep 23. doi: 10.1007/s00784-020-03585-x. Epub ahead of print. PMID: 32968945
- 29) Díaz DH, Rodas JA, Bozzini CE, Mandalunis PM, Escudero ND. Sequential administration of alendronate and strontium ranelate: histomorphometry and bone biomechanics in ovariectomized animals. *Acta Odontol Latinoam.* 2016 Sep;29(2):168-177. English. PMID: 27731487.
- 30) Kang SH, Park SJ, Kim MK. The effect of bisphosphonate discontinuation on the incidence of postoperative medication-related osteonecrosis of the jaw after

- tooth extraction. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2020 Feb;46(1):78-83. doi: 10.5125/jkaoms.2020.46.1.78. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32158685; PMCID: PMC7049769.
- 31) Otto S, Pautke C, Arens D, Poxleitner P, Eberli U, Nehrbass D, Zeiter S, Stoddart MJ. A drug holiday reduces the frequency and severity of medication-related osteonecrosis of the jaw in a minipig model. *J Bone Miner Res.* 2020 Jun 22. doi: 10.1002/jbmr.4119. Epub ahead of print. PMID: 32568416.
- 32) Ottesen C, Schiodt M, Gotfredsen K. Efficacy of a high-dose anti-resorptive drug holiday to reduce the risk of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ): A systematic review. *Heliyon.* 2020 Apr 27;6(4):e03795. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03795. PMID: 32373730; PMCID: PMC7191576.
- 33) Zandi M, Dehghan A, Ghadermazi K, Malekzadeh H, Akbarzadeh M. Perioperative discontinuation of intravenous bisphosphonate therapy reduces the incidence and severity of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A randomized, controlled, prospective experimental study in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015 Nov;43(9):1823-8. doi: 10.1016/j.jcms.2015.08.008. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26355024.
- 34) Barrionuevo P, Kapoor E, Asi N, Alahdab F, Mohammed K, Benkhadra K, Almasri J, Farah W, Sarigianni M, Muthusamy K, Al Nofal A, Haydour Q, Wang Z, Murad MH. Efficacy of pharmacological therapies for the prevention of fractures in postmenopausal women: A network meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 May 1;104(5):1623-1630. doi: 10.1210/jc.2019-00192. PMID: 30907957.
- 35) Miranda TS, Napimoga MH, De Franco L, Marins LM, Malta FS, Pontes LA, Morelli FM, Duarte PM. Strontium ranelate improves alveolar bone healing in estrogen-deficient rats. *J Periodontol.* 2020 Jan 28. doi: 10.1002/JPER.19-0561. Epub ahead of print. PMID: 31994184.
- 36) Scardueli CR, Bizelli-Silveira C, Marcantonio RAC, Marcantonio E Jr, Stavropoulos A, Spin-Neto R. Systemic administration of strontium ranelate to enhance the osseointegration of implants: systematic review of animal studies. *Int J Implant Dent.* 2018 Jul 17;4(1):21. doi: 10.1186/s40729-018-0132-8. PMID: 30014305; PMCID: PMC6047953.
- 37) Pan WL, Chen PL, Lin CY, Pan YC, Ju YR, Chan CP, Hsu RW. Strontium ranelate treatment in a postmenopausal woman with osteonecrosis of the jaw

- after long-term oral bisphosphonate administration: a case report. *Clin Interv Aging*. 2017 Jul 11;12:1089-1093. doi: 10.2147/CIA.S141753. PMID: 28744112; PMCID: PMC5513807.
- 38) Querido W, Farina M, Anselme K. Strontium ranelate improves the interaction of osteoblastic cells with titanium substrates: Increase in cell proliferation, differentiation and matrix mineralization. *Biomater*. 2015;5(March 2016):e1027847.
- 39) Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, et al. The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(4):391–401.
- 40) Morabito N, Catalano A, Gaudio A, Morini E, Bruno LM, Basile G, et al. Effects of strontium ranelate on bone mass and bone turnover in women with thalassemia major-related osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2016;34(5):540–6.
- 41) Hutcheson A, Cheng A, Kunchar R, Stein B, Sambrook P, Goss A. A C-terminal crosslinking telopeptide test-based protocol for patients on oral bisphosphonates requiring extraction: a prospective single-center controlled study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Aug;72(8):1456-62. doi: 10.1016/j.joms.2014.02.036. Epub 2014 Mar 3. PMID: 24793621.
- 42) Friedlander AH, Chang TI, Hazboun RC, Garrett NR. High C-Terminal cross-linking telopeptide levels are associated with a minimal risk of osteonecrosis of the jaws in patients taking oral bisphosphonates and having exodontia. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Sep;73(9):1735-40. doi: 10.1016/j.joms.2015.03.015. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25863230.

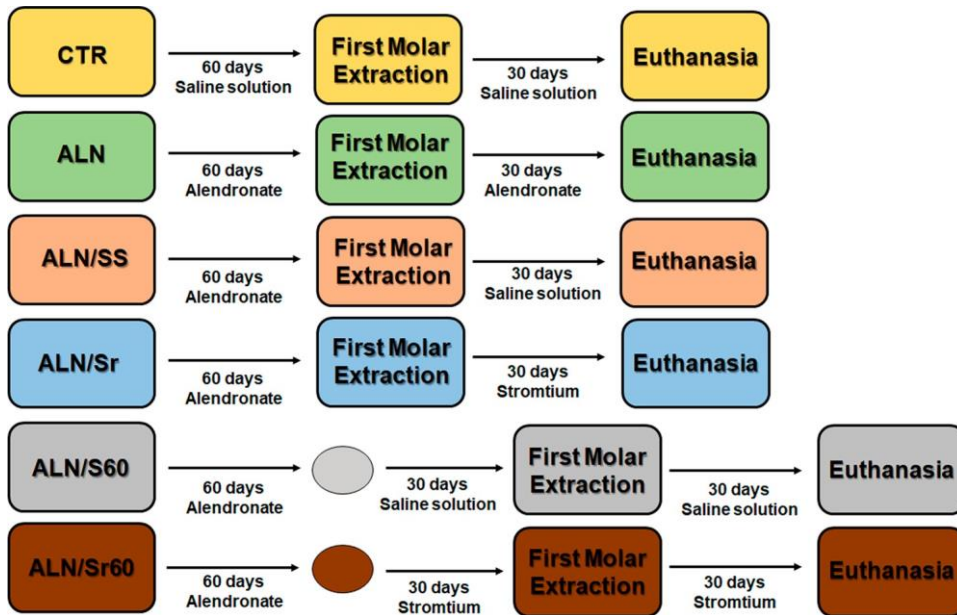
Fig. 1 Experimental design illustration

Fig. 2 **A** Image obtained on the microtomograph of the region of the alveolus of the first molar, second and third molars. **B** Image A with the ROI positioned in the region of the first molar extraction socket; **C** Image A with technique artifact to obtain the threshold of the alveolus region; **D** ROI positioning scheme, it was positioned in its most coronary portion at the level of the cementum / enamel line of the second molar with a size of 1.2 mm in the mesio/distal direction and 3 mm in the corono / apical direction (Adapted from ConteNeto et al. [21])

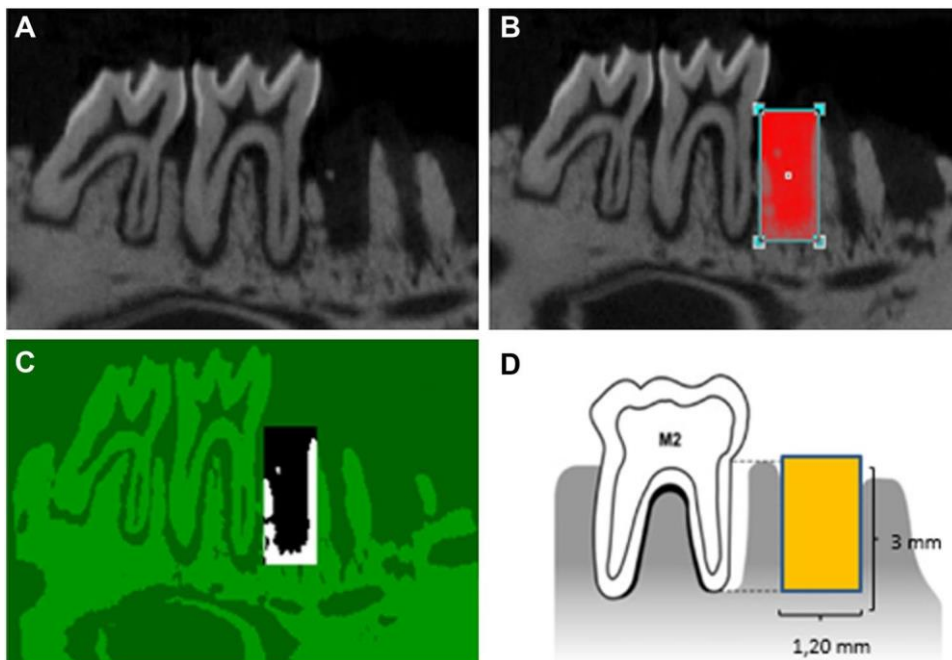


Fig. 3 Stereometric Analysis. The quantification of cells was done using an image program (Fiji Image J). An area of interest was defined, a region related to the distal root of the first molar (M1), delimiting a quadrangular area, which extended from the level of the cementum/enamel junction (CEJ) of the second molar (M2) to the apical portion of M2 and between the mesial and distal surfaces of the alveolar bone, with a microscopic increase of 40x

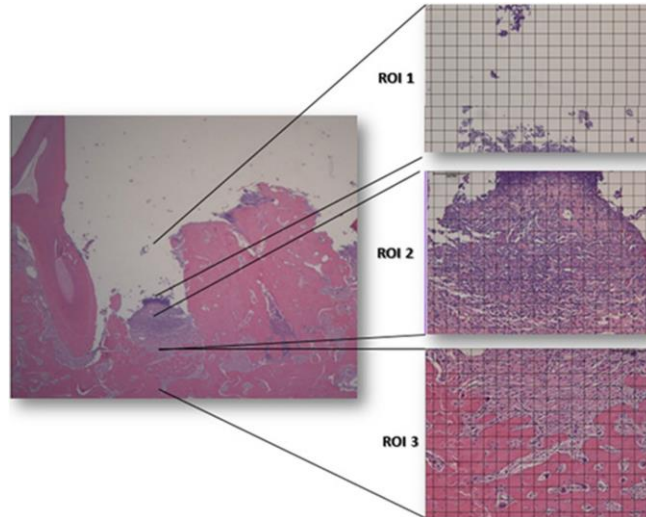


Fig. 4 Radiographic aspects (B), three-dimensional (C and D) and microtomographic evaluation (A) of the alveolar region after 30 days of extraction of the first lower molars in animals treated with ALN, sterile saline (CTR), interruptions of the alendronate and replacement of the medication for strontium. In the groups in which ALN was administered, the apical region of the alveolar cavity (arrow) is more evident, featuring greater bone density when compared to the control animals (asterisk), which presented bone spicules not adhered to the alveolar bone (#) and not disclosure of the alveoli, consequently with lower bone density

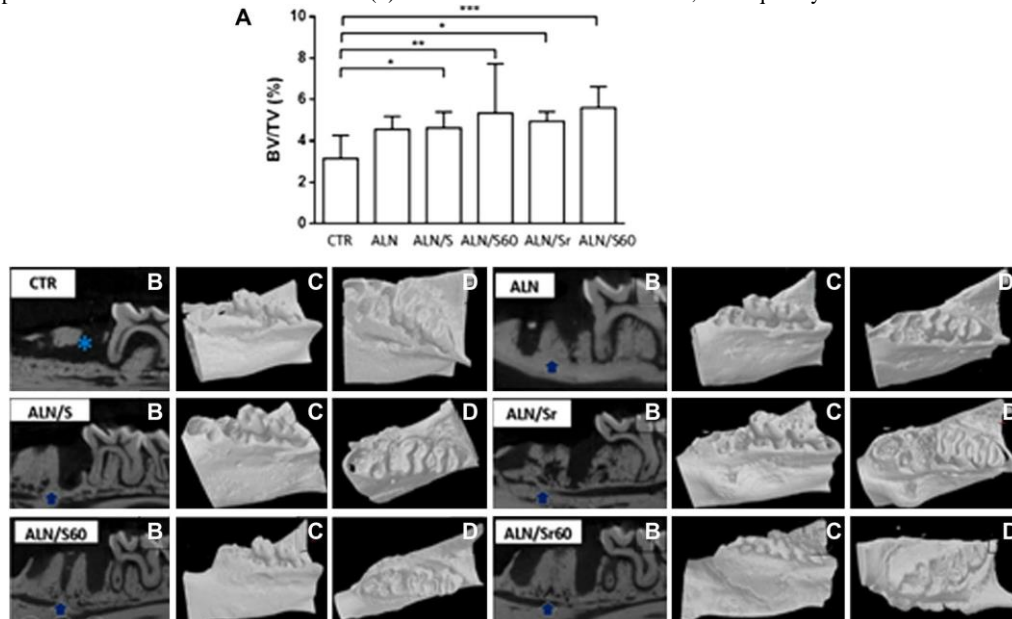


Fig. 5 Histological aspects of tooth extraction sites: **A–R** Microphotographs representing the histological characteristics of bone and connective tissue in alveoli after extraction in the groups: CTR (**A, G, H**), ALN (**B, H, N**), ALN/SS (**C, I, O**), ALN/Sr (**D, J, P**), ALD/S60 (**E, K, Q**), ALD/Sr60 (**F, L, R**). The ALN group presents a non-vital bone tissue represented by the absence of osteocytes and the presence of an inflammatory infiltrate (**B, H, N**); CTR, represents the bone remodeling of the alveolus, vital bone tissue with the presence of osteocytes (**G**) and connective tissue with an abundance of fibroblasts, also the presence of necrotic tissue not associated with the area of alveolar remodeling (bone spike) (**A**); ALN/SS presence of interdental septa and basal region of the necrotic alveolus (**C, O**), and inflammatory infiltrate (**I**); ALD/Sr, presence of necrotic interdental septa (**D**), vital bone tissue with the presence of osteocyte and collagen fibers in the basal region of the alveolus; ALD/S60, necrotic bone tissue without the presence of osteocytes (**E**), vital bone in the basal region of the alveolus (**K**), presence of collagen fibers and islands of mineralized bone tissue inside the alveolus (black arrows) (**Q**), confirmation the presence of collagen fibers confirmed by picosirius staining (**S**); ALD/Sr60, necrotic bone tissue without the presence of osteocyte but without the presence of empty osteocyte gaps (**F**), alveolar basal region with the presence of areas of mineralized bone tissue surrounded by collagen fibers (**L, R**), confirmation of fibers collagen by picosirius (**T**). Abbreviations and symbols: *bt* vital bone tissue, *nbv* non-vital bone, *cf* collagen fibers, *if* inflammatory infiltrate, *black arrows* islands of bone mineralization. Coloring: HE. Original magnification: 40×. Scales: 100 μm

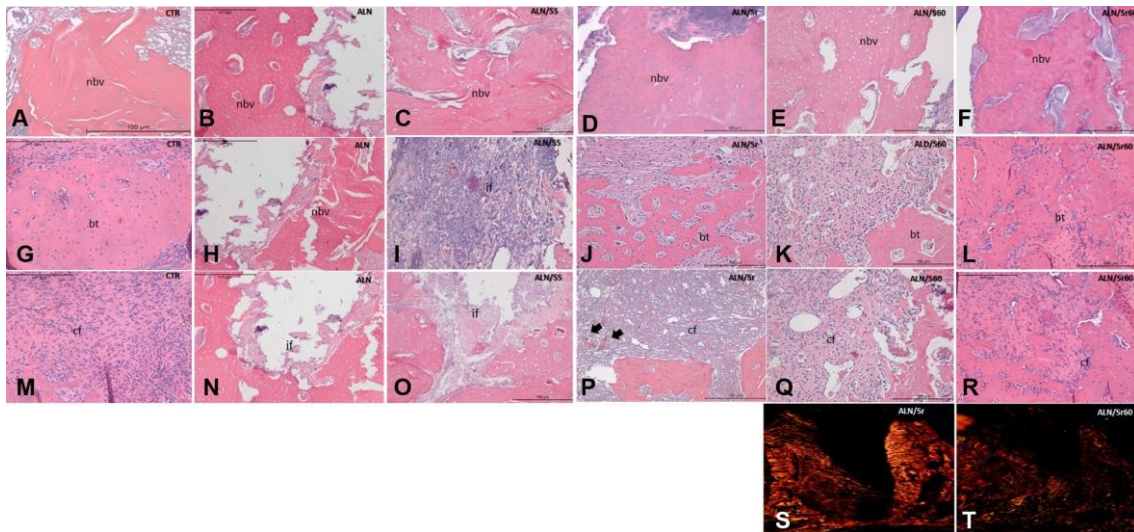


Table 1 Mean and standard deviation of the different tissue components of the alveolus of the lower first molar in all groups (%)

Groups	Inflammatory cells	Necrotic bone	Connective tissue matrix	Fibroblasts	Vital bone	NDA
CTR	26.01 ± 17.49	17.33 ± 13.05	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	56.67 ± 20.45
ALN	14.70 ± 21.80	28.22 ± 24.95	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	4.12 ± 6.56	52.95 ± 34.79
ALN/S	12.30 ± 11.57	2.88 ± 2.22*	21.56 ± 15.73 [#]	4.02 ± 4.27	3.46 ± 4.78	53.41 ± 32.42
ALN/S60	10.98 ± 8.56	9.41 ± 9.08	15.05 ± 17.55	2.69 ± 2.79	10.77 ± 9.72	51.06 ± 22.43
ALN/Sr	17.04 ± 20.81	7.88 ± 6.92	14.58 ± 8.69	2.38 ± 2.49	31.46 ± 17.88 ^δ	26.67 ± 25.06
ALN/Sr60	14.81 ± 14.19	5.92 ± 7.43	11.69 ± 8.06	4.10 ± 3.66	14.23 ± 5.39	49.23 ± 19.38

*Lesser amount of necrotic bone than the ALN group

[#]Greater amount of connective tissue matrix than groups CTR and ALN

^δHigher quantity of vital bone than the CTR, ALN, ALN/S and ALN/S60-One-way Anova groups complemented by the Tukey test

3.2 Artigo 2*

Influência do alendronato e ranelato de estrôncio na progressão da doença periodontal induzida em ratos.

Original Paper: A influência sistêmica do ranelato de estrôncio e alendronato no tratamento adjunto da doença periodontal induzida

Fernanda Castanheira Gonçalves¹, Isabella Fernanda dos Santos ¹, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira², Rosemary Adriana Chierici Marcantonio¹

¹ São Paulo State University (Unesp), Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, Araraquara, Brazil.

² Department of Periodontology, Dental School, UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author:

Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Humaitá St., 1680. Zip code 14801-930, Araraquara, SP, Brazil

Phone: +55 (16) 33016376/Fax: +55 (16) 33016369

E-mail: adriana.marcantonio@unesp.br

Resumo

Os medicamentos antirreabsortivos vêm sendo estudados no tratamento da doença periodontal, por apresentarem mecanismos de ação que mostram reduzir a reabsorção óssea alveolar. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dos medicamentos sobre a perda óssea periodontal utilizando o alendronato e o ranelato de estrôncio na progressão da doença periodontal induzida em ratos. Vinte e um animais foram divididos em 3 grupos: Grupo controle (CTR) – solução salina 1 mg/kg/dia, subcutaneamente, Grupo Ranelato de estrôncio (STR) – 625mg/kg/dia por gavagem e Grupo alendronato (ALD) – 1 mg/kg/dia, subcutaneamente. Os animais

* Artigo redigido segundo as normas do Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.

receberam durante 60 dias os respectivos medicamentos; após 45 dias de terapia medicamentosa, foi induzida a doença periodontal por meio de ligaduras nos segundos molares superiores e, 15 dias após, os animais foram eutanasiados. Foram realizadas análises: microtomográfica; histológica; estereométrica e histométrica. A análise microtomográfica demonstrou que o grupo ALD apresentou maior porcentagem de tecido ósseo mineralizado em relação aos demais grupos, porém na descrição histológica não observou vitalidade tecidual em algumas regiões dos tecidos periodontais. Já o grupo STR apresentou vitalidade óssea em todas as regiões dos tecidos periodontais envolvidos, grandes porcentagens de fibroblastos e matriz de tecido conjuntivo. Em relação à perda óssea, os grupos ALD e STR obtiveram menor perda óssea proximal comparado ao controle, e o grupo ALD apresentou maior quantidade de tecido ósseo na região de furca e o grupo STR maior quantidade de tecido de reparação. Esses achados indicam que o uso dos medicamentos alendronato e ranelato de estrôncio influenciou as características dos tecidos periodontais durante a progressão da doença periodontal, porém não preveniu o seu aparecimento.

Palavras chaves: alendronate, ranelato de estrôncio, periodontite, modulação do hospedeiro

1 Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória que acomete os tecidos de sustentação dos dentes, levando a perda dentária^{1,2}, decorrente de um desequilíbrio entre presença de microrganismos específicos que colonizam a superfície dentária supra/subgingivalmente, juntamente com a resposta do hospedeiro³. A placa bacteriana consiste em bactérias patogênicas que se perpetuam na superfície radicular liberando uma variedade de substâncias microbianas, como peptídeos e antígenos que se difundem do epitélio para o tecido conjuntivo levando a uma resposta inflamatória crônica do hospedeiro^{1,2}.

Embora sejam as bactérias periodontopatogênicas que iniciam a inflamação tecidual, as enzimas derivadas do hospedeiro, metaloproteinases da matriz (MMPs), citocinas e prostanóides, são as responsáveis por causar a maior parte da destruição tecidual⁴. Portanto, é de extrema importância restaurar o equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, para o tratamento e estabilização da doença periodontal. As estratégias de tratamento para periodontite têm se concentrado na

redução do desafio microbiano, como o tratamento periodontal não cirúrgico, que visa a redução e eliminação do biofilme bacteriano, por meio da raspagem e o alisamento radicular, sendo considerado o de primeira escolha^{1,2}.

Devido a periodontite ser considerada uma doença inflamatória crônica, pode-se pensar em estratégias terapêuticas adicionais ao tratamento periodontal convencional, como o uso de agentes que modifiquem a resposta do hospedeiro a fim de reduzir o processo inflamatório^{1,2}, ou ainda, a utilização de substâncias ou medicamentos, sistemicamente ou localmente, que possuem o intuito de impedir o processo de reabsorção óssea e favorecer a neoformação óssea⁵.

Os bisfosfonatos são medicamentos antirreabsortivos utilizados em pacientes que apresentam doenças relacionadas ao metabolismo ósseo como: osteopenia, osteoporose, neoplasias ósseas, metástases ósseas, doenças de pageot, entre outros. Esses medicamentos atuam na inibição da perda mineral óssea, inibindo diretamente e indiretamente a formação, proliferação e função dos osteoclastos, produzindo assim uma diminuição da perda óssea e estabilização da densidade mineral óssea em patologias ósseas⁶⁻⁹. Devido a seus efeitos benéficos a favor da diminuição da perda óssea patológica os bisfosfonatos vem sendo estudados como estratégias terapêuticas medicamentosas nas doenças periodontais^{10,11}. Porém o seu uso crônico e em altas concentrações tem gerado efeitos adversos preocupantes como osteonecrose após procedimentos cirúrgicos nos maxilares¹².

Medicamentos à base de Estrôncio, como o Ranelato de Estrôncio (STR), tem sido demonstrado na literatura como potenciais agentes antirreabsortivos^{13,14}. Esses medicamentos atuam em uma via do metabolismo ósseo diferente dos bisfosfonatos, tanto nos mecanismos de absorção, quanto nos de formação óssea, porém os mecanismos de ação ainda não estão totalmente esclarecidos. Marie et al.¹⁵ (2011), e Wu et al.¹⁶ (2013), demonstraram em seus estudos que o estrôncio promoveu a apoptose dos osteoclastos, atuando assim na diminuição da reabsorção óssea. Canalis et al.¹⁷ (1996), descreveu que o estrôncio age também no processo de formação óssea, promovendo o aumento e diferenciação de células pré-osteoblásticas. Autores como Marie et al.¹⁸ (2006) e Takahashi et al.¹⁹ (2003), também relataram em seus estudos mecanismos diferentes afirmando a atuação do estrôncio na formação e reabsorção óssea. Considerando essas características, o estrôncio pode ser considerado um medicamento promissor nas estratégias terapêuticas adicionais ao tratamento periodontal convencional.

Embora a literatura demonstre que o bisfosfonato e o ranelato de estrôncio apresentam efeito na modulação dos processos inflamatórios e de formação óssea, existem evidências na utilização destes medicamentos na modulação do hospedeiro para doença periodontal. Baseado em seus mecanismos de ação, o objetivo deste projeto é avaliar, em animais, a progressão de perda óssea periodontal utilizando estes medicamentos no tratamento da doença periodontal induzida.

2 Materiais e Métodos

2.1 Modelo Experimental

O modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo nº 16/2018)(ANEXO A), dentro dos regulamentos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e descrito de acordo com as diretrizes da ARRIVE com relação aos itens relevantes²⁰. O tamanho da amostra foi calculado por análise de variância com base na análise de microtomografia computadorizada (microCT) realizada em um estudo anterior do nosso grupo²¹.

Foram utilizados 21 ratos (*Rattus Norvegicus*, variação *albinus*, *Holtzman*), adultos (180-220 gramas). Os animais foram divididos em gaiolas por grupo e submetidos as mesmas condições padrão de iluminação (12 horas ciclo claro/escuro), temperatura 22°C, ad libitum de alimentos e água durante todo o período experimental. Os animais foram submetidos a um período de 7 dias de aclimatação ao meio ambiente e, posteriormente, alocados aleatoriamente nos seguintes grupos: 1 - Grupo controle (C): Os animais foram submetidos a administração diária de soro fisiológico por injeção subcutânea. 2 - Grupo ranelato de estrôncio (STR): Os animais foram submetidos a administração diária 625 mg/kg/dia de ranelato de estrôncio (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil)²² por gavagem. 3 - Grupo Alendronato (ALD): Os animais foram submetidos a administração diária de 1 mg/kg/dia de alendronato (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado por injeção subcutânea¹². Após 45 dias de início da administração dos medicamentos foi induzida a doença periodontal em todos os animais e após 15 dias da indução os animais foram eutanaziados. Os medicamentos foram administrados até a eutanásia dos animais (Figura 1).

2.2 Indução de periodontite

Os animais foram anestesiados com a combinação de 0.8 ml/ kg cloridrato de quetamina (Dopalen, Ceva, São Paulo, Brazil) e 0.4 ml/kg cloridrato de xilazina (Anasedan, Ceva, São Paulo, Brazil). Um fio de algodão foi inserido na região subgingival nos segundos molares superiores e mantidos por 15 dias para indução da doença periodontal por meio do acúmulo de placa bacteriana²³.

2.3 Obtenção das peças

Após o período correspondente os animais foram eutanaziados com sobredose anestésica. As hemi-maxilas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 48 horas. Após este período as peças foram lavadas em água corrente e armazenadas em álcool 70%.

2.4 Análise Microtomográfica

As peças foram submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As amostras foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica, 2003). As imagens foram rotacionadas e reposicionadas em uma orientação padrão no Dataviewer software (SkyScan 1176, Aartselaar, Belgium, 2003) e com threshold (65 a 180) foi estabilizado para distinguir tecido mineralizado usando o CTan/CTvol software (Skyscan 1176, Aartselaar, Belgium, 2003). Inicialmente foi delimitada uma primeira área de interesse (ROI- *Region Of Interest*) (ROI1) na região do segundo molar que compreendeu no sentido corono/apical a distância de 1.000 micrometros a partir do teto da furca e nas regiões interproximais compreendeu até a tábua óssea vestibular e palatina e as raízes dos dentes vizinhos (FIGURA 2). O segundo ROI (ROI2) foi obtido na mesma região anatômica do ROI1, mas circundando somente as raízes do molar. Para obter a percentagem de volume ósseo, ROI2 foi subtraído do ROI1²¹.

2.5 Análise Histológica, Histométrica, Estereométrica

Após o período de fixação e realização da microtomografia computadorizada, as peças foram lavadas em água corrente por 24h e descalcificadas com EDTA, lavadas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes seriados de 5µm de espessura na direção vestibulo-palatino no sentido do longo eixo dos dentes. Foram obtidas lâminas para análise histológica, histométrica e estereométrica, que foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e Tricômio de Masson²¹.

2.5.1 Análise Histológica

As lâminas foram posicionadas no microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com suporte do microscópio DXC-1107 A/107 AP vídeo câmera (Sony electronic Inc, Japan) com objetiva para aumento de 4.0/10 vezes foram obtidas imagens das regiões interproximais mesial e distal dos dentes abrangendo do epitélio até a crista óssea. Nas imagens obtidas foram analisadas as reações inflamatórias do tecido conjuntivo, processos de reabsorção óssea e neoformação tecidual, por um examinador treinado e cego para os grupos experimentais.

2.5.2 Análise Histométrica e Estereométrica

Foram selecionadas 4 lâminas de cada amostra para mensuração da quantidade de tecido ósseo na região de furca e interproximal. As lâminas correspondiam as regiões iniciais, medianas e finais de cada dente. Foram obtidas fotomicrografias da região de furca (teto da furca) e interproximal (junção cimento-esmalte até crista óssea) através do microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com suporte de DXC-1107 A/107 AP vídeo câmera (Sony electronic Inc, Japan) em um aumento de 40X e analisadas através do programa Image J – FIJI (version 1.48B – National Institutes of Health, USA). Para análise interproximal, foi obtida a distância da junção cimento-esmalte a crista óssea na mesial e distal do molar. Para avaliação da área de furca, medidas foram realizadas da região do teto da furca até 1000µm no sentido do ápice da raiz e delimitados pelas raízes do dente. Após a delimitação da área, a quantidade de tecido ósseo da região foi obtida²¹. As lâminas foram avaliadas por um examinador cego e treinado. Com as mesmas imagens anteriores, um examinador cego e treinado foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais:

osso, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos das regiões de furca e interproximal. Através do software Image J – Launcher software (version 1.48B – National Institutes of Health, USA) uma grade foi confeccionada com 30.000 μm^2 de área, apresentando 50 pontos coincidentes das intersecções das linhas horizontais e verticais e posicionada entre a crista óssea e o epitélio. As células presentes sobre cada intersecção foram definidas e realizadas uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por período experimental, a identificação das células foi baseada nas características morfológicas²⁴.

2.5.3 Análise Estatística

Como os dados das análises microtomográfica e histométricas foram numéricos, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para confirmar que os dados de todas as análises se distribuíram de acordo com a normalidade. Devido a isso, o teste paramétrico de two-way Anova complementado pelo teste de Tukey foi utilizado para a análise inferencial dos dados relacionando as variáveis independentes tratamento (CTR, ALD e STR) vs. Período de avaliação (7, 15 e 30 dias). O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para execução da análise estatística desse estudo, e todos os testes foram aplicados ao nível de significância de 5%.

3 Resultados

3.1 Análise microtomográfica.

O grupo ALD obteve uma porcentagem de volume ósseo significativamente maior em relação ao grupo STR e CTR (Figura 2).

3.2 Análise Histométrica

3.2.1 Perda óssea proximal

Houve diferença estatística entre todos os grupos. Grupo controle apresentou maior perda óssea na região interproximal, seguido pelo grupo ALD e STR. (Figura 3r).

3.2.2 Perda óssea região de furca no segundo molar

O grupo ALD apresentou uma maior preservação de tecido ósseo na região de furca em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos ALD e STR não apresentaram diferenças significativas (Figura 3s).

3.3 Análise histológica

Houve presença de células inflamatórias (Figura 3 a-b-c-m) em todos os grupos, com maior quantidade no grupo STR (Figura 3 a-m). No Grupo CTR essas células estavam associadas a reabsorção óssea na região interproximal e na região de furca, com a presença de osteoclastos, tecido ósseo com a presença de osteócitos vital (Figura 3 A-D-G). Já no grupo STR e ALD as células inflamatórias, localizavam-se próximas as áreas de reabsorção óssea presentes na região interproximal e de furca (Figura 3 B-C). A matriz de tecido conjuntivo foi encontrada em maior quantidade no grupo STR (Figura 3 M), nesse grupo a matriz de tecido conjuntivo de reparação se encontravam em áreas basais com a presença de osteócitos e osteoblastos, confirmando a vitalidade tecidual (Figura 3 F-I), essa característica foi confirmada pela coloração Masson, onde no grupo estrôncio apresentava mais fibras colágenas que os demais grupos (Figura 3 J-K-L). O grupo ALD, apresentava-se pequenas áreas de reabsorção óssea na região interproximal e na região de furca, em alguns pontos o tecido ósseo presente na região de furca apresentava-se desvitalizado, ou seja, com ausência de osteócitos, foram encontradas poucas quantidades de osteoclastos comparados aos demais grupos (Figura 3 E-H). A quantidade presente de fibroblastos e vasos sanguíneos não se diferenciaram entre os grupos (Figura 3 O-P).

4 Discussão

A destruição dos tecidos periodontais na doença periodontal é caracterizada pelo desequilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e a flora bacteriana subgengival. Vários tratamentos e terapias adjuvantes ao tratamento de raspagem periodontal foram estudados recentemente para a prevenção e tratamento da progressão da periodontite, mas ainda não se tem estabelecido um protocolo definitivo e eficiente^{21,23}. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de medicamentos antirreabsortivos, alendronato e ranelato de estrôncio, na periodontite experimental em ratos.

Microtomograficamente, a dosagem de ALD administrada antes da indução da DP influenciou aumentando o volume ósseo presente na região de interesse em relação aos demais grupos, sendo confirmada histometricamente com os resultados de perda óssea interproximal e região de furca. Achados semelhantes foram encontrados nos estudos de Camacho-Alonso et al.²⁵ (2018), que observaram através da análise microtomográfica que a densidade óssea é maior em tratamentos associados ao alendronato. Price et al.²⁶ (2013), também avaliou o efeito da administração de alendronato na prevenção da periodontite experimental e relataram a prevenção da perda da densidade óssea alveolar nos grupos em que foram administrados alendronato. Por sua vez, o grupo STR, microtomograficamente, apresentou menor quantidade de volume ósseo em relação ao ALD, porém um pouco maior quantidade que o grupo CTR, porém avaliando a perda óssea linear interproximal e região de furca não obteve diferenças significativas em relação ao grupo CTR. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Kakaran et al.²⁷ (2017), que avaliou que o efeito do estrôncio não foi capaz de prevenir a perda óssea induzida por ligaduras em ratos normais em uma concentração de 625 mg/kg/dia, apenas com uma dose mais alta (900 mg/kg/dia) foi possível encontrar resultados na diminuição da perda óssea por ligaduras. Em contraste, Marins et al.²⁸ (2020) realizaram primeiramente a ovariectomia para simular a deficiência de estrogênio juntamente com a indução da doença periodontal e seu tratamento com a administração de ranelato de estrôncio 625mg/kg/dia foi possível verificar uma diminuição da perda óssea alveolar. Portanto, os efeitos do ranelato de estrôncio na perda óssea induzida por ligadura ainda são controversos.

Analisando histologicamente os tipos e quantidade celulares entre grupos, pode-se observar que a administração do uso crônico dos medicamentos não impediu o aparecimento da DP, foi possível observar em todos os grupos, grande quantidade de tecidos inflamatórios e áreas de reabsorção óssea interproximal e região de furca, embora em níveis e características diferentes entre os grupos. O grupo ALD, como previsto nos estudos de bisfosfonatos relacionados a DP^{10,11,25}, manteve as cristas ósseas alveolares e maior quantidade de tecido ósseo na região de furca, porém em algumas regiões esses tecidos apresentavam sem vitalidade, ou seja, sem a presença de osteócitos. Moreira et al.²⁹ (2014), Ozdemir et al.³⁰ (2012), de Almeida et al.¹¹ (2015), observaram a presença de tecido ósseo necrótico e descrevem que esta ocorrência pode ser relacionada a presença de contaminação bacteriana e

inflamação³¹. Foi encontrado tecido de reparação presente em todos os grupos, porém a maior quantidade de matriz de tecido conjuntivo foi encontrada no grupo STR e sua confirmação realizada pela coloração de Masson, foi observado também grande quantidade de osteoblastos presentes na região de furca, tal achado pode ser explicado pelos mecanismos de ação do estrôncio na remodelação óssea^{15,18}, além de promover a diminuição da reabsorção óssea, atuando na inibição da diferenciação e apoptose de osteoclastos, o medicamento também atua na formação óssea, a favor do aumento da atividade pré-osteoblástica e consequente formação de osteoblastos¹⁸. Outros estudos que comparam a influência do estrôncio na DP, encontraram que o estrôncio foi capaz de produzir uma atividade pré-osteoblástica e não teve efeito na redução da inflamação local²⁷. Foram encontradas no grupo controle muitas lacunas de reabsorção e a presença de osteoclastos, pouco encontradas nos demais grupos, onde pode-se observar que a DP no grupo CTR foi mais acentuada em relação aos demais grupos, caracterizando especificamente a DP.

O uso de ratos para o estudo de periodontite experimental tem sido utilizado e fornece um modelo altamente reprodutível para avaliar a progressão e tratamento da periodontite, pois é fácil manusear, baixo custo e resposta biológica semelhante a humanos³⁶. O modelo de ligadura para induzir a periodontite é fundamental para relações de causa e efeito, o acúmulo de bactérias na ligadura leva a uma inflamação crônica, gerando um desequilíbrio na resposta do hospedeiro levando a perda óssea alveolar, semelhante a periodontite em humanos³⁵.

Alguns fatores na metodologia experimental deste estudo devem ser analisados, como a utilização dos medicamentos antirreabsortivos em ratos sistemicamente saudáveis, usualmente esses medicamentos são utilizados em pacientes que apresentam alguma alteração do metabolismo ósseo, osteoporose, osteopenia, cânceres ósseos, porém, neste estudo foi testado como um medicamento para atuar na modulação do hospedeiro com objetivo de promover menor reabsorção óssea causada. O tempo de administração dos medicamentos também pode contribuir para isso, pois são medicamentos de uso crônico com efeito a longo prazo, embora o metabolismo dos ratos seja maior que o humano, o tempo de administração do medicamento pode ter prejudicado sua ação frente a resposta esperada do metabolismo ósseo. Apesar da maioria dos estudos empregarem o ácido zoledrônico como bisfosfonatos de maior potência antirreabsortiva^{29,32}, o alendronato foi utilizado por ser o antirreabsortivo mais prescrito para tratamento e prevenção de doenças

ósseas³³. O uso do ranelato de estrôncio foi considerado por ser atualmente um medicamento antirreabsortivo promissor, pois atua tanto na reabsorção, quanto na formação óssea, e vem sendo utilizado em estudos relacionados as doenças periodontais^{11,27,29,34}.

5 Conclusão

Baseado nos resultados deste estudo pode se concluir que a administração dos medicamentos antirreabsortivos não evitou o aparecimento da doença periodontal induzida, porém ajudaram na diminuição da perda óssea alveolar causadas pela DP. O alendronato obteve áreas de osteonecrose leve e o STR maior área de tecido ósseo em formação.

Figura 1 – Desenho de Estudo

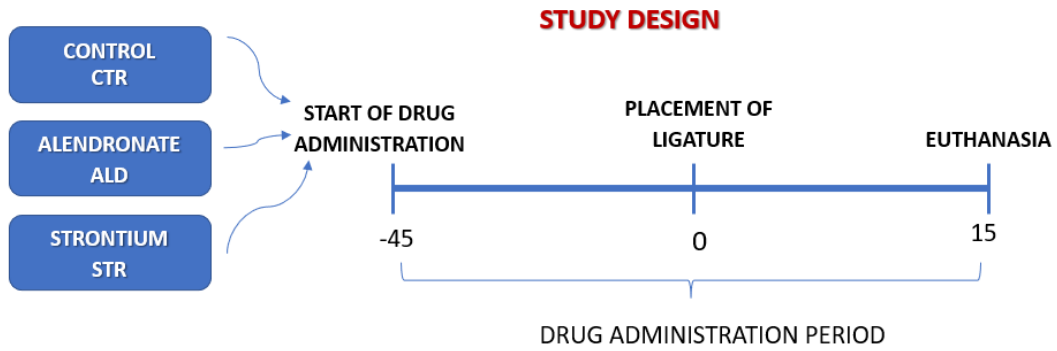


Figura 2 – Imagem Tridimensional/Bidimensional nos planos axial e sagital das maxila nos diferentes grupos e a média de volume ósseo presente na região de segundo molar na progressão da DP analisados microtomograficamente. Foi realizado teste One-way ANOVA seguido de Tukey, seguido pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$).

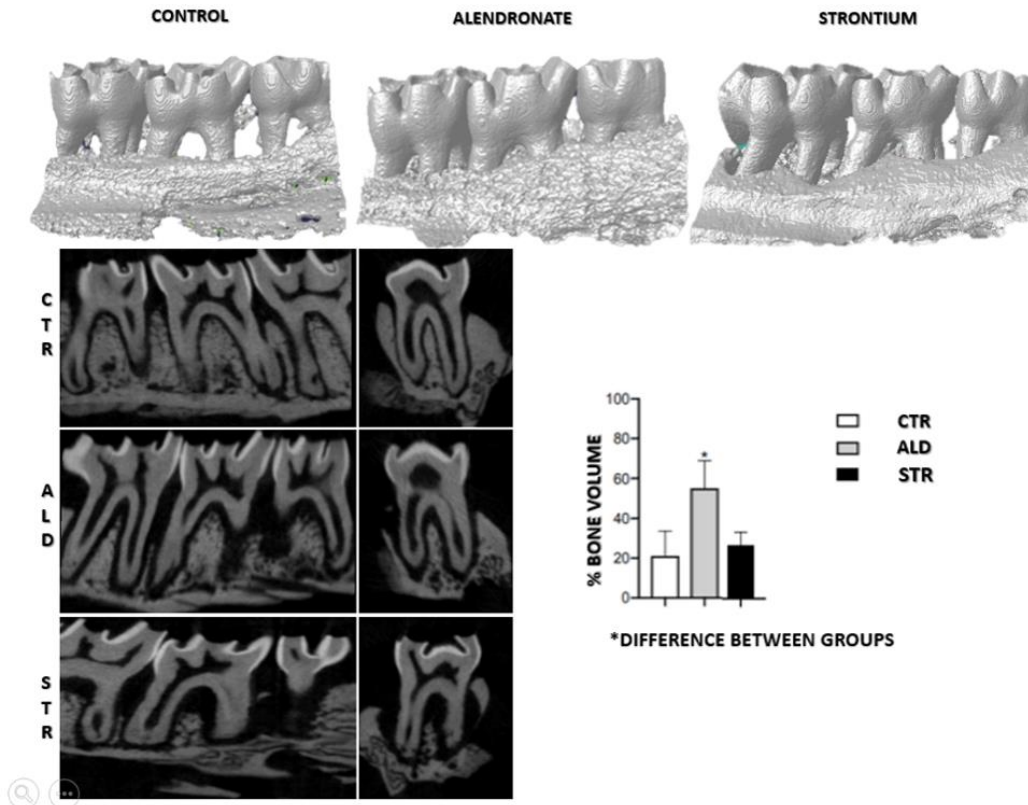
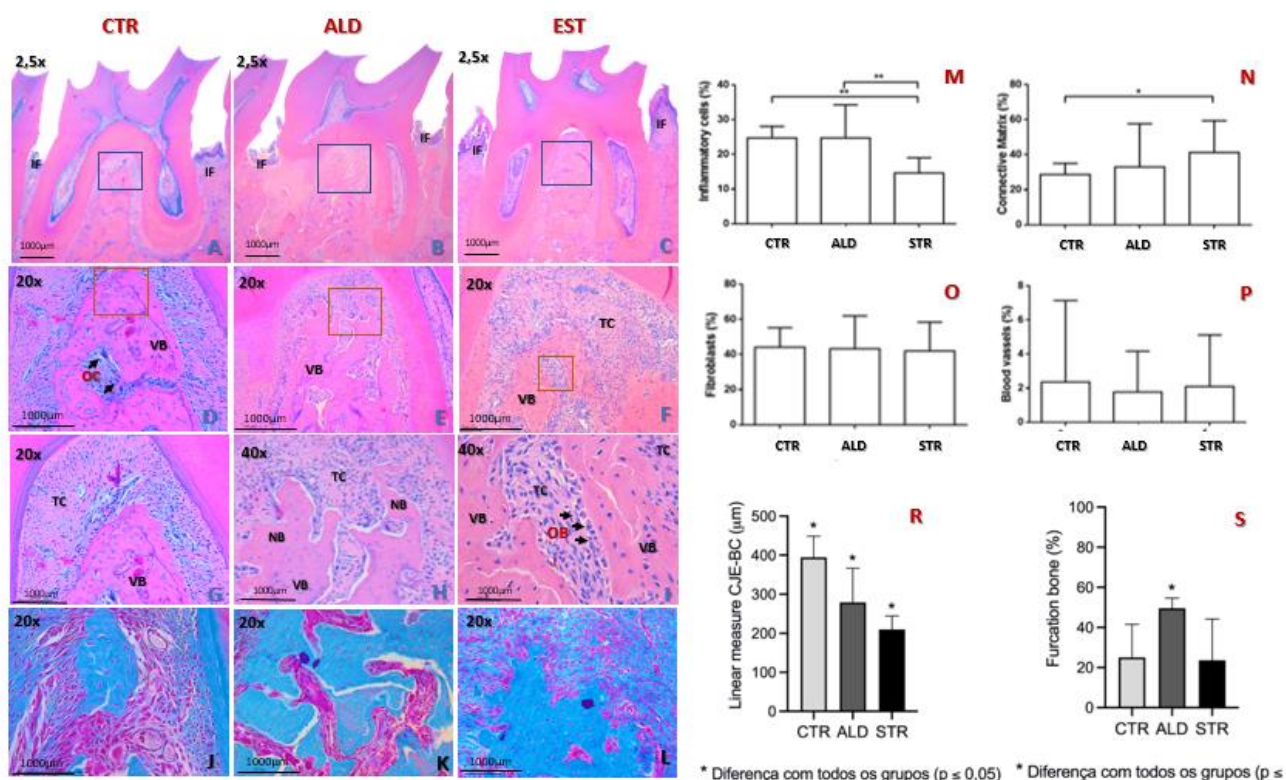


Figura 3 – As imagens histológicas mostram as características teciduais periodontais nos grupos CTR, ALD, EST, nos aumentos de 2,5x, 20x, 40x na coloração Hematoxilina/Eosina (A-I) e Masson (K-M) e os gráficos mostram resultados da análise estereométrica da quantidade presente de células inflamatórias (M), matriz de tecido conjuntivo (N), fibroblastos (O), vasos sanguíneos (P). Siglas: IF = infiltrado inflamatório, VB= tecido ósseo vital, NB= tecido ósseo necrótico, TC= matriz de tecido conjuntivo, OB = osteoblastos, OC= osteoclastos. Observa-se nas imagens A, B, C infiltrado inflamatório na região interproximal em todos os grupos, uma maior quantidade no grupo CTR. Nos grupos CTR e STR encontrou-se sempre tecido ósseo vital (D, F, G, I), já no grupo ALD observou-se alguns pontos de tecido ósseo necrótico (E, H). Observou-se maior quantidade de matriz de tecido conjuntivo de reparação no grupo STR (F,I,M) e esses resultados foram confirmados com a coloração masson (J,K,L), onde observou-se grandes quantidades de fibras colágenas. A presença de osteoblastos também foi maior no grupo STR (I) e grandes quantidades de osteoclastos foram observadas no grupo CTR (D). Todos os grupos apresentaram grandes quantidades de fibroblastos, e também presença de vasos sanguíneos. As imagens R e S demonstram quantidade óssea interproximal e da região de furca analisadas linearmente por meio da análise histométrica em todos os grupos. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, posteriormente foi realizado o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey, ($p \leq 0,05$).



6 Referências

1. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol* 2000. 2018;76(1):131-49.
2. Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *Br Dent J*. 2013;214(9):467-71.
3. Axelsson P, Lindhe J. The significance of maintenance care in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1981;8(4):281-94.
4. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2006;40:144-63.

5. Gjoseva S, Geskovski N, Sazdovska SD, Popeski-Dimovski R, Petrusovski G, Mladenovska K, et al. Design and biological response of doxycycline loaded chitosan microparticles for periodontal disease treatment. *Carbohydr Polym*. 2018;186:260-72.
6. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012;68(7):1013-8.
7. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 Pt 2):6222s-30s.
8. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000;88(12 Suppl):2961-78.
9. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291(3):680-6.
10. Akram Z, Abduljabbar T, Kellesarian SV, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(3):444-54.
11. De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, Novaes VC, Theodoro LH, Fernandes LA, et al. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2015;86(10):1166-75.
12. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, A SB, Guimaraes M, Marcantonio E, Jr. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(1):65-73.
13. Reginster JY. [Strontium ranelate (Protelos)]. *Rev Med Liege*. 2007;62(11):685-7.
14. Hamdy NA. Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48 Suppl 4:iv9-13.
15. Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2011;22(6):1659-67.
16. Wu Y, Adeeb SM, Duke MJ, Munoz-Paniagua D, Doschak MR. Compositional and material properties of rat bone after bisphosphonate and/or Strontium ranelate drug treatment. *J Pharm Pharm Sci*. 2013;16(1):52-64.
17. Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*. 1996;18(6):517-23.
18. Marie PJ. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*. 2006;38(2 Suppl 1):S10-4.
19. Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T. S 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res*. 2003;18(6):1082-7.
20. Berglundh T, Stavropoulos A, Working Group 1 of the VEWoP. Preclinical in vivo research in implant dentistry. Consensus of the eighth European workshop on periodontology. *J Clin Periodontol*. 2012;39 Suppl 12:1-5.
21. Macedo PD, Corbi ST, de Oliveira G, Perussi JR, Ribeiro AO, Marcantonio RAC. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;25:43-9.
22. Lavet C, Mabillean G, Chappard D, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate stimulates trabecular bone formation in a rat tibial bone defect healing process. *Osteoporos Int*. 2017;28(12):3475-87.
23. Corbi SCT, de Vasconcellos JF, Bastos AS, Bussaneli DG, da Silva BR, Santos RA, et al. Circulating lymphocytes and monocytes transcriptomic analysis of patients with type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia and periodontitis. *Sci Rep*. 2020;10(1):8145.
24. Marcantonio CC, Nogueira AVB, Leguizamon NDP, de Molon RS, Lopes MES, Silva RCL, et al. Effects of obesity on periodontal tissue remodeling during orthodontic movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2021;159(4):480-90.
25. Camacho-Alonso F, Davia-Pena RS, Vilaplana-Vivo C, Tudela-Mulero MR, Merino JJ, Martinez-Beneyto Y. Synergistic effect of photodynamic therapy and alendronate on alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontol Res*. 2018;53(3):306-14.

26. Price U, Le HO, Powell SE, Schmid MJ, Marx DB, Zhang Y, et al. Effects of local simvastatin-alendronate conjugate in preventing periodontitis bone loss. *J Periodontal Res.* 2013;48(5):541-8.
27. Karakan NC, Akpınar A, Goze F, Poyraz O. Investigating the Effects of Systemically Administered Strontium Ranelate on Alveolar Bone Loss Histomorphometrically and Histopathologically on Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol.* 2017;88(2):e24-e31.
28. Marins LM, Napimoga MH, Malta FS, Miranda TS, Nani EP, Franco B, et al. Effects of strontium ranelate on ligature-induced periodontitis in estrogen-deficient and estrogen-sufficient rats. *J Periodontal Res.* 2020;55(1):141-51.
29. Moreira MM, Bradaschia-Correa V, Marques ND, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of the effect of sodium alendronate in the progression of experimental periodontitis in rats. *Microsc Res Tech.* 2014;77(11):902-9.
30. Ozdemir SP, Kurtis B, Tuter G, Bozkurt S, Gultekin SE, Senguven B, et al. Effects of low-dose doxycycline and bisphosphonate clodronate on alveolar bone loss and gingival levels of matrix metalloproteinase-9 and interleukin-1beta in rats with diabetes: a histomorphometric and immunohistochemical study. *J Periodontol.* 2012;83(9):1172-82.
31. Kassolis JD, Scheper M, Jham B, Reynolds MA. Histopathologic findings in bone from edentulous alveolar ridges: a role in osteonecrosis of the jaws? *Bone.* 2010;47(1):127-30.
32. Aguirre JI, Castillo EJ, Kimmel DB. Preclinical models of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *Bone.* 2021;153:116184.
33. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):733-59.
34. Pradeep AR, Kumari M, Rao NS, Naik SB. 1% alendronate gel as local drug delivery in the treatment of Class II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2013;84(3):307-15.
35. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(2): 89–105.
36. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol.* 2014;85(3):465-77.

3.3 Artigo 3*

Influência sistêmica do ranelato de estrôncio e alendronato no tratamento da doença periodontal induzida

Resumo

Objetivo: O efeito dos medicamentos antirreabsortivos, como alendronato e ranelato de estrôncio, é atuar sistemicamente na atividade osteoanabólica e antirreabsortiva, e isto tem mostrado grande aplicabilidade como terapia adjuvante ao tratamento convencional das doenças periodontais (DP). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se os medicamentos, alendronato (ALD) e ranelato de estrôncio (STR) influenciam no tratamento da DP induzida.

Métodos: 63 ratos machos foram induzidos a periodontite experimental por um período de 15 dias e após a instalação da DP foram submetidos ao tratamento de raspagem e alisamento radicular (RAR). Após esse período os animais foram divididos randomicamente em 3 grupos: CTR – os animais foram submetidos a administração diária de solução salina (1mg/kg/dia) até o momento da eutanásia; ALD – os animais submetidos a administração diária de alendronato de sódio (1mg/kg/dia) diariamente até a eutanásia; STR – animais submetidos a administração diária de ranelato de estrôncio (625mg/kg) até a eutanásia. A eutanásia foi realizada nos períodos de 7, 15 e 30 dias após o início da RAR. Análises microtomográfica, histométrica, histológica e morfométrica foram estatisticamente analisados.

Resultados: Em todos os grupos a DP foi instalada. No grupo ALD teve uma menor perda óssea alveolar em comparação aos demais grupos, mostrado nas análises microtomográfica, histométrica e histológica, embora o grupo STR tenha mostrado perda óssea alveolar interproximal e na região de furca, o tecido conjuntivo era mais estruturado com a presença de fibras colágenas, não foram observadas diferenças celulares entre os grupos no período de 30 dias.

Conclusão: O ALD e STR não impediu o aparecimento da DP, porém o ALD reduziu a perda óssea alveolar e o STR mostrou maior possibilidade de reparação frente aos demais grupos.

* Artigo redigido segundo as normas do Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.

1 Introdução

A periodontite não é considerada apenas uma infecção bacteriana induzida por biofilme, que acarreta destruição e perda de tecidos periodontais, ela está diretamente relacionada a interação dos sistemas inflamatórios e imunes de cada indivíduo, que envolve as alterações da microbiota subgengival, agentes patológicos (biofilme, placa bacteriana), fatores genéticos e ambientais¹.

O aumento da placa bacteriana leva a uma resposta do hospedeiro frente as bactérias periodontopatogênicas, gerando um aumento dos níveis de inflamação^{2,3}. Essa resposta do hospedeiro ao biofilme também leva a alterações significativas da microbiota, aumentando a proliferação de bactérias específicas em indivíduos susceptíveis a doença periodontal^{4,5}.

O principal foco do tratamento através da raspagem e boa higienização bucal. Mas com base nos conceitos de susceptibilidade do hospedeiro, uma nova estratégia tem sido proposta para controlar a resposta inflamatória por meio da modificação da resposta do hospedeiro, como forma adjunta ao tratamento periodontal⁶. Medicamentos, tais como o uso de antibióticos, como a doxiciclina, atuam como agente modulador da resposta do hospedeiro⁷; os inibidores de catépsina K, previnem a perda óssea alveolar⁸; os agentes naturais, como os flavanóides, atuam como agente terapêutico da doença periodontal⁹; os agentes naturais como, o curcumin, age como agente anti-inflamatório no tratamento da doença¹⁰; os medicamentos antirreabsortivos também tem sido utilizado como tratamento adjunto ao tratamento periodontal convencional, agindo na modulação do hospedeiro¹¹⁻¹⁴.

Os bisfosfonatos, são medicamentos antirreabsortivos, utilizados por pacientes que apresentam doenças relacionadas ao metabolismo ósseo, osteoporose, artrite reumatoide, cânceres ósseos. Eles agem inibindo a perda de densidade óssea mineral, através da inibição da proliferação de osteoclastos impedindo a reabsorção óssea^{15,16}. Os estudos utilizando este medicamento relacionados ao tratamento da doença periodontal, tem levado resultados satisfatórios em relação a diminuição da perda óssea alveolar^{11,14,17}.

O ranelato de estrôncio, vem sido considerados como novos agentes antiosteoporóticos, pois tem a capacidade de agir tanto nos mecanismos de

reabsorção óssea, através da diminuição da diferenciação de osteoclastos e apoptose de osteoclastos, quanto nos mecanismos de formação óssea, por meio da estimulação de células pré-osteoblásticas e aumento da proliferação de osteoblastos¹⁸. Devido seus mecanismos de ação, esse medicamento vem sendo estudado no tratamento da doença periodontal. Karakan et al.¹⁴ (2017), investigou os efeitos do ranelato de estrôncio na perda óssea alveolar em ratos com periodontite experimental e encontrou relatos que o estrôncio diminui a atividade osteoclástica; Gusman et al.¹³ (2021), avaliaram os efeitos sistêmicos do ranelato de estrôncio tanto na progressão, quanto no tratamento adjuvante na periodontite experimental e relatou que o estrôncio reduziu a perda óssea alveolar.

Devido ao fato desses medicamentos apresentarem características importantes para a redução de perda óssea alveolar eficazes na perda óssea alveolar, o objetivo do nosso estudo é avaliar o processo de reparo ósseo utilizando os medicamentos: ranelato de estrôncio, alendronato no tratamento da doença periodontal.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

63 ratos, machos, 3 meses de idade (*Rattus Norvegicus, albinus, Holtzman*), massa corporal entre 190-210 gramas, mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP) foram usados. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (processo nº 16/2018) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Campus Araraquara, Universidade Estadual do Estado de São Paulo.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: 1) Controle (CTR), indução da doença periodontal e administração de soro fisiológico 1 mg/kg/dia até o momento da eutanásia. 2) Alendronato (ALD), indução da DP por 15 dias, juntamente com a administração diária alendronato de sódio 1 mg/kg/dia (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil)¹⁹ até o momento da eutanásia. 3) Estrôncio (EST), indução da DP e administração diária de Ranelato de Estrôncio (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil) aplicado 625 mg/kg/dia²⁰ por gavagem até o momento da eutanásia.

2.2 Periodontite Experimental

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de Cloridrato de Quetamina - 80 mg/kg de massa corporal (Dopalen, Ceva, São Paulo) e Cloridrato de Xilazina (Anasedan, Ceva, São Paulo) - 7 mg/kg de massa corporal e a doença periodontal foi induzida por meio da colocação de fio um de algodão ao redor dos segundos molares superiores bilateralmente. A ligadura foi mantida por 15 dias.

2.3 Tratamento Periodontal

Após a remoção da ligadura foi realizado o tratamento periodontal com a raspagem e o alisamento radicular por um operador treinado (FCG), realizada com o uso de instrumentos manuais (mini Gracey 5-6, HuFriedy, USA). Na superfície vestibular e lingual dos dentes foram realizados 10 movimentos de tração disto-mesial e nas proximais foram realizados movimentos de tração cervical oclusal da mesma cureta¹².

2.4 Períodos Experimentais

Os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico, e nos períodos de 7, 15 e 30 dias após a remoção das ligaduras os animais foram eutanasiados. As hemi-maxilas foram dissecadas e fixadas em paraformoldeido 4% por 48 horas.

2.5 Processamento Microtomográfico

As hemi-maxilas foram armazenadas em álcool 70%, Em seguida as peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003). As imagens obtidas pela projeção dos raios X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo software NRecon. Essas imagens foram rotacionadas e reposicionadas em uma orientação padrão, com o auxílio do software DataViewer e salvas no plano coronal. Em seguida, o software CTAnalyser – CTAn, foi utilizado para a delimitação área de interesse (ROI- *Region Of Interest*).

2.6 Processamento histológico

As amostras foram desmineralizadas em EDTA 10% e processada de maneira convencional. Cortes semi seriados (4mm) foram obtidos no sentido vestibulo-

palatino. Para cada amostra foi obtida 12 lâminas, onde 6 lâminas intercaladas foram coradas com hematoxilina/eosina e trinômio de masson. As imagens foram obtidas por meio do microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com magnificação de 40X.

2.7 Análise dos Resultados

Todas as análises foram realizadas por um avaliador cego e calibrado para os tratamentos realizados.

A análise microtomográfica avaliou o volume de tecido ósseo mineralizado presente na região dos segundos molares superiores, sendo determinadas por uma área de interesse (ROI – Region of Interest). O primeiro ROI foi delimitado no sentido corono/apical da região do teto de furca até 1.000 micrometros no sentido apical até suas limitações proximais com os dentes vizinhos, do qual, foi extraído o valor de “tecido ósseo” dado pela leitura do segundo ROI, que possuirá a mesma delimitação anatômica, mas circundando apenas as raízes do segundo molar²¹.

Na análise histométrica foi avaliado a quantidade de tecido ósseo na região de furca e proximais através da utilização do software de imagens ImageJ - FUJI (National Institutes of Health, USA). Para a realização desta análise foram selecionadas 3 lâminas de cada amostra de todos os grupos, equidistantes 50 µm entre si. Em cada lâmina foram analisados 1 corte. Com todos os dados obtidos por peça, foi obtida um média para cada região analisada. Para análise interproximal, foi delimitado a distância entre a crista óssea (CB) e a junção cimento-esmalte (EJC) em uma imagem de 40x (Figura 2A) foi analisada. Para avaliação de furca, foi determinado desde o teto da furca para o ápice da raiz, uma região de 1000µm, assim foi medido as áreas de tecido ósseo encontradas (Figura 2B).

A análise histológica foi realizada uma descrição dos tecidos periodontais encontrados na região de segundo molar após os tratamentos realizados, foram analisadas 3 lâminas por amostra de todos os grupos, em aumentos de 5, 20 e 40x através do microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany). Na análise morfológica das regiões supracrestais interproximais avaliou a quantidade de: 1) células inflamatórias; 2) fibroblastos; 3) vasos sanguíneos; 4) matriz de tecido conjuntivo. Através do auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS (Leica - Reichert Diastar Products & Jung,

Wetzlar, Germany) com magnitude de 40X. Utilizando o software ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA). Uma grade foi confeccionada com 30.000 μm^2 de área, apresentando 50 pontos coincidentes das intersecções das linhas horizontais e verticais. A grade foi posicionada sobre as imagens histológicas relativas aos cortes de 3 lâminas equidistantes 50 μm entre si, por amostra. A grade foi posicionada sobre as áreas: regiões proximais supracrestais do segundo molar e furca. As células presentes em cada intersecção foi contada. Em seguida, foi executada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por grupo/período, de acordo com ²².

2.8 Análise Estatística

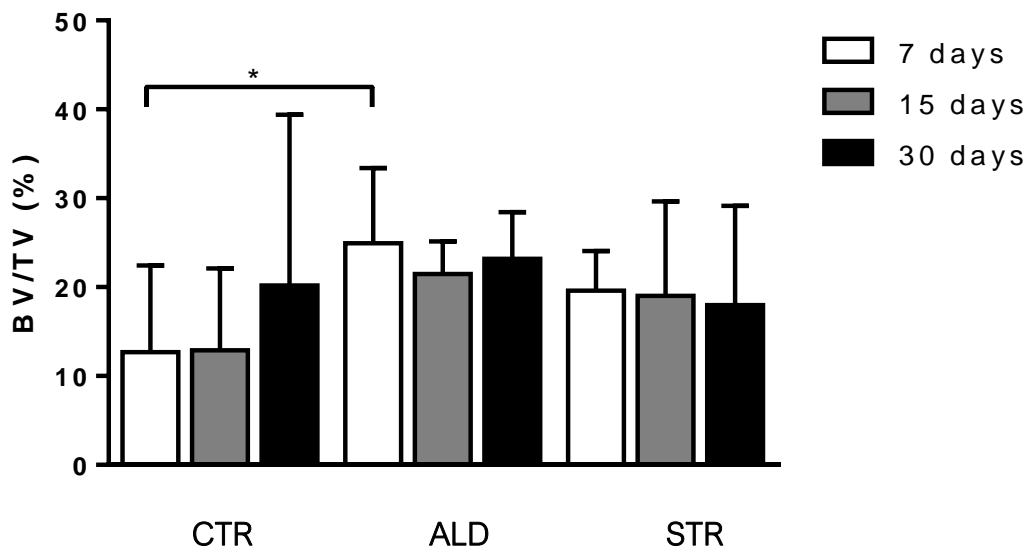
Como os dados das análises microtomográfica e histométricas foram numéricos, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para confirmar que os dados de todas as análises se distribuíram de acordo com a normalidade. Devido a isso, o teste paramétrico de two-way Anova complementado pelo teste de Tukey foi utilizado para a análise inferencial dos dados relacionando as variáveis independentes tratamento (CTR, ALD e STR) vs. Período de avaliação (7, 15 e 30 dias). O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para execução da análise estatística desse estudo, e todos os testes foram aplicados ao nível de significância de 5%.

3 Resultados

3.1 Micro CT

Na análise microtomográfica, foi observado perda de volume ósseo alveolar (BV) em todos os grupos. O grupo ALD apresentou maior quantidade de volume ósseo presente e seu volume se estabilizou ao longo do tempo. Já o grupo CTR apresentou menor quantidade de volume ósseo em relação aos demais grupos, porém obteve um aumento de volume ósseo com o passar do tempo. Já o grupo STR apresentou menor quantidade de volume ósseo em relação ao ALD e maior quantidade de volume ósseo em relação ao CTR, e não obteve diferenças significativas nos períodos de 7, 15 e 30 dias (Gráfico 1).

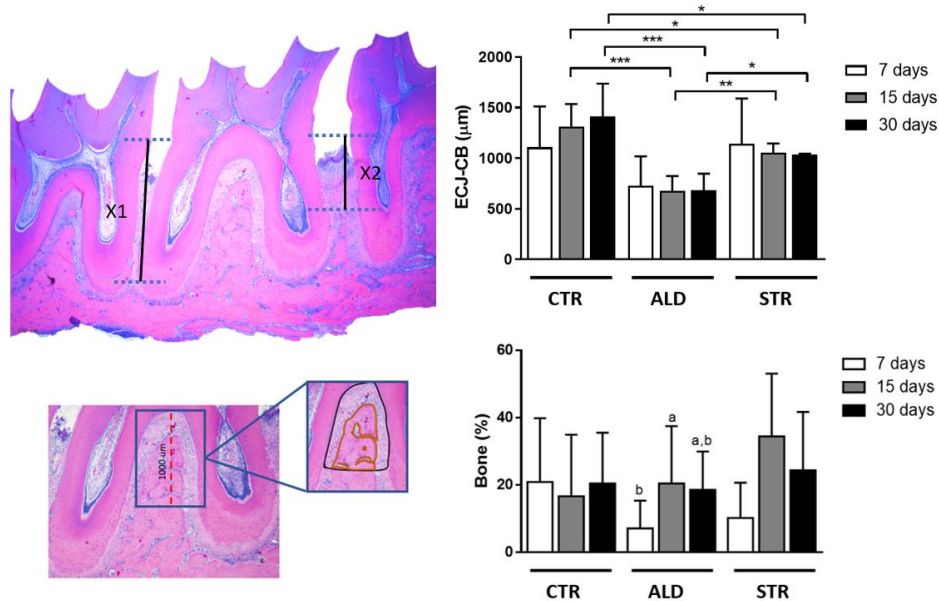
Gráfico 1 – Análise Microtomográfica para avaliação do volume de tecido ósseo mineralizado presente na região dos segundos molares. Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk, e após pelo teste One-way ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).



3.2 Histométrica

Foi verificado que os animais do grupo CTR apresentaram maiores distâncias lineares da junção cimento esmalte até a crista óssea (ECJ-CB) do que os animais do grupo STR e ALD em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). Além disso, os animais do grupo STR apresentaram maiores distâncias lineares da ECJ-CB do que os animais do grupo ALD também em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). Foi verificado que não houve diferenças entre os tratamentos na quantidade de osso entre as furcas. Entretanto, foi observado uma maior quantidade de osso no período de 15 dias comparado ao período de 7 dias nos animais do grupo ALD.

Figura 1 – Avaliação da perda óssea interproximal e região de fuca entre grupos. A perda óssea interproximal foi analisada. Para análise interproximal, foram analisadas através de fotografias com um aumento de 40x a distância entre a crista óssea e a junção cemento-esmalte (Figura 1 A). Para avaliação de furca, através de uma imagem da região de furca com um aumento de 40x, foi avaliada do teto da furca para o ápice da raiz 1000µm e delimitados uma área na região, e a partir dessa nova imagem foi desenhada e mencionada as áreas de tecido ósseo encontradas (Figura 1B).



3.3 Histológica e Morfométrica

O grupo CTR apresentou mais células inflamatórias do que os grupos ALD e STR em todos os períodos, e esse infiltrado inflamatório se estendia em todo tecido conjuntivo (Tabela 1). O grupo STR apresentou uma maior estruturação da matriz de tecido conjuntivo, em relação aos demais grupos, com quantidade moderada de fibroblastos e fibras colágenas organizadas, confirmadas pela coloração de Masson (Figura 3 J,K,L). O tecido ósseo presente apresentou áreas de reabsorção em todos os grupos, e apresentava-se totalmente vital, com a presença de lacunas de osteócitos, nos grupos CTR e STR, já o grupo ALD apresentou pequenas áreas de tecido ósseo necrótico nas regiões interproximais. Nos períodos de 7 dias pode observar osteoclastos e osteoblastos ativos contornando as trabéculas ósseas, nos

períodos 15 e 30 dias, no grupo STR foi possível observar a presença de osteoblastos circundando as trabéculas ósseas e no grupo ALD a presença de osteoclastos com núcleos picnóticos, considerados inativos em sua função, já no grupo CTR foi observado a presença de ambas as células em quantidades menores. Devido a presença de matriz de tecido conjuntivo e fibras colágenas o grupo STR apresentava-se com áreas de reparação frente a doença periodontal nos grupos de 15 e 30 dias maiores do que os demais grupos.

Figura 2 – Imagem microtomográfica bidimensional (A, B, C), imagem histológica HE (D, E, F, G, H, I), imagem histológica masson (J, K, L) do grupo CTR. As imagens D, E, F são imagens com um aumento de 20X do teto da furca e as imagens G, H, I, imagens 20x supracrestais representativas interproximais. As imagens confirmam a instalação da DP em todos os períodos. Microtomograficamente, verifica-se uma maior perda óssea alveolar no período de 7 dias. Histologicamente, foi observado no período 7 dias um maior infiltrado inflamatório (if) principalmente da região interproximal (g, h, i), presença de tecido ósseo vital (bv), envolvidos de matriz de tecido conjuntivo (tc) (d, e, f, g, h, i), presença da fibras colágenas (fb) confirmadas na coloração masson (j,k,l).

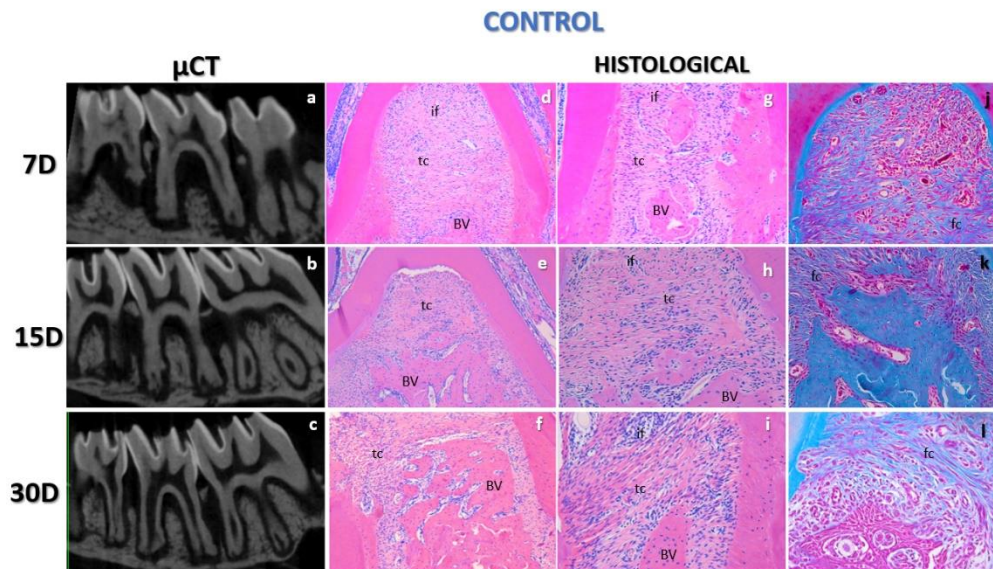


Figura 3 - Imagem microtomográfica bidimensional (A, B, C), imagem histológica HE (D, E, F, G, H, I), imagem histológica masson (J, K, L) do grupo ALD. As imagens D, E, F são imagens com um aumento de 20X do teto da furca e as imagens G, H, I, imagens 20x supracrestais representativas interproximais. As imagens confirmam a instalação da DP em todos os períodos. Nos períodos de 7 e 15 dias verificou-se um intenso infiltrado inflamatório (ig) (d, e, g, h), presença de matriz de tecido conjuntivo (tc) envolvidos do tecido ósseo vital (BV), as imagens J, K, L, representam fibras colágenas (fb) que nesse grupo se apresentam menos intensas.

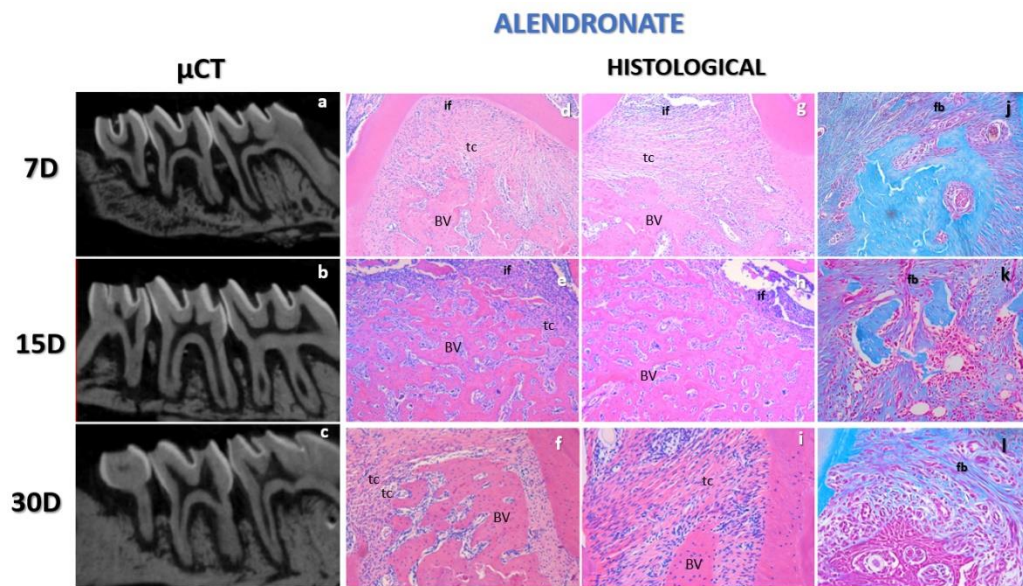
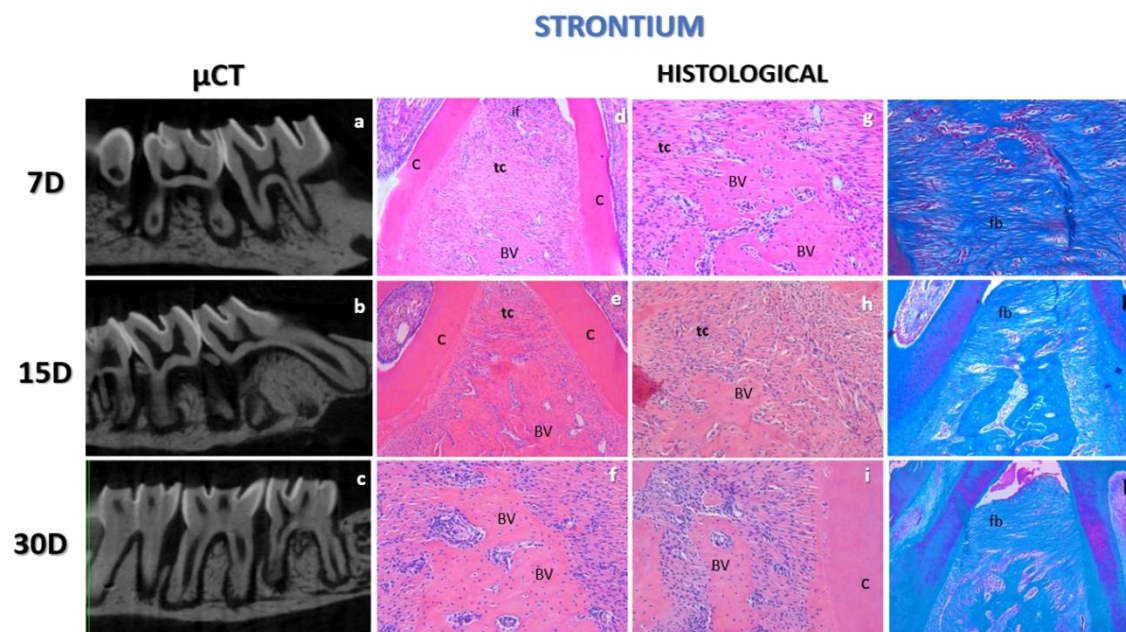


Figura 4 - Imagem microtomográfica bidimensional (A, B, C), imagem histológica HE (D, E, F, G, H, I), imagem histológica masson (J, K, L) do grupo ALD. As imagens D, E, F são imagens com um aumento de 20X do teto da furca e as imagens G, H, I, imagens 20x supracrestais representativas interproximais. As imagens confirmam a instalação da DP em todos os períodos. O grupo STR apresentou grandes quantidade de matriz de tecido conjuntivo (tc) nas áreas de reabsorção óssea, com a presença de abundantes fibras colágenas (fb) organizadas e matriz osteóide confirmadas pela coloração masson, tecido ósseo se apresentava vital (BV).



Analisando a morfometria quantitativa das regiões supracrestais, interproximais e área de furca foi verificado que o grupo CTR apresentou maior quantidade de células inflamatórias em relação aos demais grupos ($p < 0.05$). O grupo STR apresentou menores quantidades de fibroblastos que os outros grupos em ambos os períodos de avaliação ($p < 0.05$), enquanto que o grupo ALD apresentou menor quantidade desse elemento celular que o grupo CTR nos períodos de 15 e 30 dias ($p < 0.05$). O grupo ALD apresentou maiores quantidades de vasos sanguíneos que os outros grupos no período de 7 dias enquanto que o grupo CTR apresentou maiores quantidades de vasos sanguíneos que o grupo STR no período de 30 dias ($p < 0.05$). Por fim, o grupo STR apresentou maiores quantidades de matriz de tecido conjuntivo que o grupo CTR e grupo ALD nos períodos de 7, 15 e 30 dias ($p < 0.05$). A tabela 1 expõe os dados de média e desvio padrão da análise estereométrica de todos os grupos e períodos de avaliação.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da análise estereométrica de todos os grupos e períodos de avaliação. Análise percentual de cada componente tecidual presente na região suprecrestal interproximal e região de furca: 1) células inflamatórias; 2) fibroblastos; 3) vasos sanguíneos; 4) matriz de tecido conjuntivo.

Grupos/Períodos	Componente	7 dias	15 dias	30 dias
CTR	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	22.53 ± 3.21	25.27 ± 5.12	29.79 ± 7.42
ALD		11.05 ± 13.76	16.78 ± 22.21	15.26 ± 9.30
STR		11.05 ± 21.92	11.22 ± 9.09	14.61 ± 13.84
CTR	FIBROBLASTOS	44.62 ± 10.56	40.29 ± 12.11	34.34 ± 8.30
ALD		35.34 ± 14.89	25.22 ± 11.80	35.09 ± 7.37
STR		29.14 ± 5.23	19.27 ± 3.76	18.07 ± 9.06
CTR	VASOS SANGUÍNEOS	2.63 ± 1.16	1.78 ± 1.42	3.18 ± 1.50
ALD		6.65 ± 3.13	2.75 ± 2.83	1.33 ± 1.55
STR		1.50 ± 2.62	2.42 ± 2.75	1.01 ± 1.51
CTR	MATRIZ DO CONJUNTIVO	32.77 ± 12.95	33.26 ± 12.96	32.42 ± 5.18
ALD		46.96 ± 10.79	55.24 ± 15.03	48.32 ± 6.46
STR		58.30 ± 17.01	67.08 ± 8.07	66.30 ± 15.03

4 Discussão

O desafio microbiano é o gatilho, mas não é suficiente para explicar a progressão da DP. O tratamento convencional da DP é a eliminação da microbiota presente na superfície dental por meio de raspagem e alisamento radicular. Tratamentos sistêmicos tem sido proposto como adjuvantes ao tratamento convencional a fim de influenciar na modulação do hospedeiro^{7,9,23}. Medicamentos antirreabsortivos, como os bisfosfonatos e ranelato de estrôncio, devido suas características osteoanabólica e antirreabsortivas utilizadas nos tratamentos das doenças relacionadas ao metabolismo ósseo, vem sendo estudados como tratamento adjuvante da DP apresentando resultados promissores¹¹⁻¹⁴. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência sistêmica do alendronato e ranelato de estrôncio como tratamento adjuvante da periodontite experimental.

O alendronato de sódio é o medicamento mais prescrito no caso de doenças do metabolismo ósseo e a alta dosagem utilizada foi estabelecida por meio de estudos desses medicamentos em animais^{14,19}. O ranelato de estrôncio foi utilizado por ser um medicamento antirreabsortivo promissor e agir em uma via do metabolismo ósseo diferente do alendronato e ter um efeito duplo na remodelação óssea, inibindo a

reabsorção e estimulando a formação óssea¹⁸. A dosagem estabelecida no estudo de 625mg/kg/dia é a mesma não tóxica utilizada em adultos de 2g/dia¹⁴. Por meio dos resultados de todas as análises observou-se a confirmação que a DP foi instalada em todos os grupos.

Na análise microtomográfica tridimensional pode-se observar que nos períodos iniciais (7 e 15 dias) houve maior perda óssea no grupo controle, com diferença estatística somente com o período de 7 dias com o grupo alendronato, todos os grupos apresentaram maior formação óssea aos 30 dias em relação aos períodos anteriores dentro do mesmo grupo. Os estudos de^{12,17} demonstraram uma diminuição da perda óssea na presença do uso de alendronato nos tratamentos da doença periodontal. Zhang et al,²⁴ (2014), onde avaliaram microtomograficamente que a presença de estrôncio na regeneração de defeitos ósseos alveolares induziu uma maior mineralização óssea comparada a cicatrização normal de defeitos ósseos.

Na análise histométrica, pode-se observar a diminuição da perda óssea interproximal nos grupos ALD e STR em relação ao grupo CTR, uma maior perda óssea foi encontrada no período 7 dias em todos os grupos, já na região de furca não obtiveram diferenças significativas ao comparar a presença de tecido ósseo em seu interior. Goes et al.²⁵ (2014), também avaliou os resultados do tratamento da DP experimental com alendronato e detectou também uma menor perda óssea interproximal na análise histomorfométrica, o mesmo resultado foi encontrado por Camacho- Alonso,¹¹ (2018). Comparando os resultados do grupo STR o resultado ao estudo de Karakan et al.¹⁴ (2017), que avaliou o efeito de diferentes concentrações de ranelato de estrôncio sistêmico (300, 625, 900 mg/kg/dia) na perda óssea alveolar na periodontite experimental, e observou uma menor perda óssea alveolar interproximal no grupo SR900, porém todos os grupos em que foram tratados com estrôncio obtiveram resultados superiores ao controle.

Na análise descritiva e quantitativa histomorfométrica, células inflamatórias foram encontradas em todos os grupos e períodos, porém foi encontrado uma maior quantidade de células inflamatórias no grupo CTR. Cantatore et al., 1999²⁶, descreveu uma poderosa atividade anti-inflamatória dos alendronatos por meio da inibição de IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa, o que pode explicar uma menor atividade anti-inflamatória em relação ao grupo CTR. Já o estrôncio pode apresentar efeitos anti-inflamatórios ao reduzir os níveis de TNF- α no gânglio trigêmeo. Souza et al. 2012²⁷,

demonstraram que o ranelato de estrôncio elevou a expressão de heme-oxigenase (HO-1) na periodontite experimental, gerando uma propriedade anti-inflamatória desta droga no periodonto. O grupo STR apresentou uma maior quantidade de matriz de tecido conjuntivo organizada, com a presença de fibras colágenas que aumentou com o passar do tempo, o grupo ALD apresentou maior quantidade de tecido conjuntivo que o CTR e o grupo CTR apresentou uma maior quantidade de fibroblastos que todos os grupos. Nos estudos de Karakan et al.¹⁴ (2017), e Gusman et al.¹³ (2021), encontraram propriedades histológicas semelhantes e associaram as propriedades pré-osteoblásticas a favor da formação óssea, nos grupos que continham tratamento com estrôncio. O tecido ósseo presente em todos grupos apresentava-se vital, com a presença osteócitos, no grupos STR pode observar aderidos as trabéculas ósseas a presença de osteoblastos ativos, podendo sugerir uma confirmação de sua atividade a nível óssea que é o aumento da ativação de células pré-osteoblásticas e consequente aumento de osteoblastos¹⁸, e no grupo ALD a apresentava-se osteoclastos com núcleos picnóticos, ou seja inativos, podendo ser explicado pela ação inibitória de osteoclastos²⁸.

Os modelos animais são necessários para provar relações de causa e efeito e testar o potencial de novas terapêuticas, limitados em estudos humanos. O modelo de roedores é utilizado devido a semelhança da resposta biológica entre ratos e humanos, fácil manuseio e baixo custo²⁸. A periodontite experimental por meio de ligaduras subgingivalmente é altamente reprodutível, pelo fato do acúmulo de bactérias no fio de seda.

As limitações desse estudo são primeiramente encontradas na administração dos medicamentos em animais saudáveis, uma vez que esses medicamentos são utilizados por indivíduos que apresentam uma doença do metabolismo ósseo, e é um medicamento de uso crônico. A dosagem e tempo de administração do medicamento também pode influenciar no tratamento. A dosagem do bisfosfonato utilizado foi utilizado por Jee et al.²⁹ (2010), Conte-Neto et al.¹⁹ (2013) e Camacho et al.¹¹ (2017), a razão da alta dosagem comparada a dos humanos é devido a alta taxa metabólica, idade e via de absorção^{30,31} e a dosagem do ranelato de estrôncio apesar de simular a dosagem de um adulto.

5 Conclusão

Os medicamentos antirreabsortivos não influenciaram no aparecimento da doença periodontal, porém, tiveram interferência no processo de reparação após o tratamento periodontal.

6 Referencias

1. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):317-29.
2. Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1560-8.
3. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9-11.
4. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994;8(2):263-71.
5. Yost S, Duran-Pinedo AE, Teles R, Krishnan K, Frias-Lopez J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med*. 2015;7(1):27.
6. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1592-600.
7. Donos N, Calciolari E, Brusselaers N, Goldoni M, Bostanci N, Belibasakis GN. The adjunctive use of host modulators in non-surgical periodontal therapy. A systematic review of randomized, placebo-controlled clinical studies. *J Clin Periodontol*. 2020;47 Suppl 22:199-238.
8. Hao L, Chen J, Zhu Z, Reddy MS, Mountz JD, Chen W, et al. Odanacatib, A cathepsin K-specific inhibitor, inhibits inflammation and bone loss caused by periodontal diseases. *J Periodontol*. 2015;86(8):972-83.
9. Kariu T, Nakao R, Ikeda T, Nakashima K, Potempa J, Imamura T. Inhibition of gingipains and porphyromonas gingivalis growth and biofilm formation by prenyl flavonoids. *J Periodontal Res*. 2017;52(1):89-96.
10. Xiao CJ, Yu XJ, Xie JL, Liu S, Li S. Protective effect and related mechanisms of curcumin in rat experimental periodontitis. *Head Face Med*. 2018;14(1):12.
11. Camacho-Alonso F, Davia-Pena RS, Vilaplana-Vivo C, Tudela-Mulero MR, Merino JJ, Martinez-Beneyto Y. Synergistic effect of photodynamic therapy and alendronate on alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontitis. *J Periodontal Res*. 2018;53(3):306-14.
12. De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, Novaes VC, Theodoro LH, Fernandes LA, et al. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2015;86(10):1166-75.
13. Gusman DJ, Matheus HR, Alves BE, Ervolino E, de Araujo NJ, Piovezan BR, et al. Influence of systemic strontium ranelate on the progression and as adjunctive

therapy for the nonsurgical treatment of experimental periodontitis. *J Clin Exp Dent*. 2021;13(12):e1239-e48.

14. Karakan NC, Akpınar A, Goze F, Poyraz O. Investigating the effects of systemically administered strontium ranelate on alveolar bone loss histomorphometrically and histopathologically on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2017;88(2):e24-e31.

15. Cremers S, Drake MT, Ebetino FH, Bilezikian JP, Russell RGG. Pharmacology of bisphosphonates. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(6):1052-62.

16. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 Pt 2):6222s-30s.

17. Akram Z, Abduljabbar T, Kellesarian SV, Abu Hassan MI, Javed F, Vohra F. Efficacy of bisphosphonate as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy in the management of periodontal disease: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(3):444-54.

18. Marie PJ. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*. 2006;38(2 Suppl 1):S10-4.

19. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, A SB, Guimaraes M, Marcantonio E, Jr. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(1):65-73.

20. Lavet C, Mabilieu G, Chappard D, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate stimulates trabecular bone formation in a rat tibial bone defect healing process. *Osteoporos Int*. 2017;28(12):3475-87.

21. Macedo PD, Corbi ST, de Oliveira G, Perussi JR, Ribeiro AO, Marcantonio RAC. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;25:43-9.

22. Marcantonio CC, Nogueira AVB, Leguizamón NDP, de Molon RS, Lopes MES, Silva RCL, et al. Effects of obesity on periodontal tissue remodeling during orthodontic movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2021;159(4):480-90.

23. Hao Y, Kacal M, Ouchida AT, Zhang B, Norberg E, Vakifahmetoglu-Norberg H. Targetome analysis of chaperone-mediated autophagy in cancer cells. *Autophagy*. 2019;15(9):1558-71.

24. Zhang Y, Wei L, Wu C, Miron RJ. Periodontal regeneration using strontium-loaded mesoporous bioactive glass scaffolds in osteoporotic rats. *PLoS One*. 2014;9(8):e104527.

25. Goes P, Melo IM, Silva LM, Benevides NM, Alencar NM, Ribeiro RA, et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontol*. 2014;49(1):45-54.

26. Cantatore FP, Acquista CA, Pipitone V. Evaluation of bone turnover and osteoclastic cytokines in early rheumatoid arthritis treated with alendronate. *J Rheumatol*. 1999;26(11):2318-23.

27. Souza JA, Rossa C, Jr., Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(2):128-38.
28. de Molon RS, Fiori LC, Verzola MHA, Belluci MM, de Souza Faloni AP, Pereira RMR, et al. Long-term evaluation of alendronate treatment on the healing of calvaria bone defects in rats. Biochemical, histological and immunohistochemical analyses. *Arch Oral Biol.* 2020;117:104779.
29. Jee JH, Lee W, Lee BD. The influence of alendronate on the healing of extraction sockets of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(2):e47-53.
30. Lin JH, Chen IW, Deluna FA. Uptake of alendronate by bone tissue in hypocalcemic and hypercalcemic rats. *Drug Metab Dispos.* 1993;21(5):800-4.
31. Lin JH, Chen IW, deLuna FA, Hichens M. Role of calcium in plasma protein binding and renal handling of alendronate in hypo- and hypercalcemic rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;267(2):670-5.

3.4 Artigo 4*

Influência da administração sistêmica do alendronato e ranelato de estrôncio na modulação da periodontite experimental.

Original Paper: Influência da administração sistêmica do alendronato e ranelato de estrôncio na modulação da periodontite experimental.

Fernanda Castanheira Gonçalves¹, Isabella Fernanda dos Santos ¹, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira², Rosemary Adriana Chierici Marcantonio¹

¹ São Paulo State University (Unesp), Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry, Araraquara, Brazil.

² Department of Periodontology, Dental School, UFU - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author:

Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Humaitá St., 1680. Zip code 14801-930, Araraquara, SP, Brazil

Phone: +55 (16) 33016376/Fax: +55 (16) 33016369

E-mail: adriana.marcantonio@unesp.br

* Artigo redigido segundo as normas do Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.

Resumo

Objetivos: O objetivo do nosso estudo foi avaliar a influência sistêmica do alendronato e ranelato de estrôncio no tratamento da periodontite induzida.

Métodos: 63 ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: 1) Controle (CTR)= solução salina (1mg/kg/dia); 2) Alendronato(ALD)= alendronato de sódio (1mg/kg/dia); 3) Estrôncio(STR)= ranelato de estrôncio 625 mg/kg/dia. No início do tratamento os animais foram induzidos a doença periodontal (DP) por meio de ligaduras em um período de 15 dias, 7, 15 e 30 dias após a remoção das ligaduras os animais foram eutanasiados. Análises microtomográfica, histométrica, morfométrica e histológica descritiva foram realizadas.

Resultados: O grupo ALD apresentou maior % de volume ósseo e menores % de perda óssea interproximal, no período 7 dias. O grupo STR apresentou maior quantidade de tecido de reparação, matriz tecido conjuntivo com fibras colágenas organizadas em todos os períodos. O CTR apresentou menor porcentagem de volume ósseo em 7 dias e maior perda óssea interproximal em relação aos demais grupos.

Conclusão: Os medicamentos alendronato e ranelato de estrôncio promoveu uma melhora das condições periodontais de reparação frente a periodontite experimental, porem mais estudos e análises precisam ser realizados para comprovação da ação desses medicamentos.

Palavras chaves: periodontite experimental, ranelato de estrôncio, alendronato, perda óssea alveolar, modulação do hospedeiro

1 Introdução

O desafio microbiano é o gatilho, mas não é suficiente para explicar a progressão da DP. A DP está associada diretamente com resposta imune inflamatória exacerbada hospedeiro frente ao desafio microbiano disbiótico, essa cascata de inflamação leva a danos aos tecidos periodontais, causando a periodontite. O perfil inflamatório do paciente influencia na composição do biofilme bacteriano, promovendo a seleção e enriquecimento dessas comunidades¹. Dessa forma, a modulação da resposta do hospedeiro pode ser uma alternativa viável para o tratamento adjunto das DP, devido ao fato que o controle da inflamação parece ter um papel central no tratamento da periodontite, pois influencia tanto na disbiose quanto a progressão da doença².

O tratamento periodontal convencional visa a eliminação do fator local da doença, ou seja, a eliminação das bactérias instaladas na superfície dentária supra/subgingival. Estratégias terapêuticas adicionais tem sido proposta ao tratamento periodontal convencional a fim de modular a resposta do hospedeiro, diminuindo o processo inflamatório e/ou atuando em mecanismos ósseos biológicos, para inibir o processo de reabsorção óssea e/ou induzir a formação óssea²⁻⁵.

Medicamentos antirreabsortivos utilizados na prevenção e tratamento de doenças ósseas, atuam inibindo o processo de perda de densidade óssea mineral. Os bisfosfonatos são antirreabsortivos, que se ligam aos cristais de hidroxiapatita da matriz óssea mineralizada e são incorporadas por células clásticas, responsáveis pela degradação da matriz óssea, promovendo a inibição de sua atividade⁶. Estudos anteriores avaliaram o efeito dos bisfosfonatos na periodontite experimental e mostraram que inibiu a reabsorção do osso alveolar por meio da inibição de osteoclastos⁶⁻⁸. O alendronato de sódio é atualmente o bisfosfonato mais prescrito em humanos⁶. O estrôncio é um metal alcalino, não radioativo e está localizado a baixo do cálcio na tabela periódica e por esse motivo apresentam semelhanças físico-químicas com o cálcio no metabolismo ósseo, permitindo se incorporar na fase mineral óssea durante a ossificação ou remodelação trabeculares, além disso também possuem papel importante na formação óssea através da ativação de osteoblastos e na reabsorção óssea por meio da inativação da atividade de osteoclastos. Estudos com ranelato de estrôncio relacionado com doenças do metabolismo ósseo tem demonstrado o potencial desse medicamento no aumento da densidade óssea, resistência óssea e redução das fraturas vertebrais. Porém, poucas evidencias foram publicadas sobre os efeitos do ranelato de estrôncio na redução de perda óssea alveolar na periodontite experimental^{9,10}.

Desse modo, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a influência sistêmica do alendronato e ranelato estrôncio no tratamento da periodontite experimental.

2 Material e Métodos

2.1 Cuidados animais

Os animais e procedimentos cirúrgicos foram tratados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética Animal (processo nº 16/2018) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Campus Araraquara, Universidade Estadual do Estado

de São Paulo. 63 ratos masculinos, (massa corporal entre 190-210 gramas, 3 meses de idade (*Rattus Norvegicus, albinus, Holtzman*), foram utilizados e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP).

Tamanho da amostra, randomização e tamanho dos grupos foi realizado através do teste de anova, levando-se em consideração uma diferença de 12% entre as médias para a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e um desvio padrão de 5%. A utilização de 7 amostras por período foi suficiente para obtenção de um poder β de 0.80 e poder α de 0.05.

Os animais foram atribuídos a três grupos experimentais:

Grupo CTR – indução da periodontite experimental e administração sistêmica de solução salina fisiológica

Grupo ALD – indução periodontite experimental e administração sistêmica de alendronato de sódio

Grupo STR - periodontite experimental e administração sistêmica de ranelato de estrôncio

Todos os grupos foram avaliados em 3 períodos 7, 15 e 30 dias.

2.2 Anestesia

Intervenções cirurgia foram realizadas por meio de anestesia geral por via intramuscular com cloridrato de xilazina (Dopalen, Ceva, São Paulo) (6 mg / kg de peso corporal) e cloridrato de cetamina (Anasedan, Ceva, São Paulo) (70 mg / kg de peso corporal)

2.3 Indução da Periodontite Experimental

No início do período experimental foi induzida a periodontite por meio da inserção do fio de seda no segundo molar superior bilateralmente, após 15 dias houve a remoção do fio¹¹.

2.4 Tratamento Sistêmico

No grupo CTR foi administrada a solução salina fisiológica 1 mg/kg/dia. No grupo ALD foi administrada por via subcutânea o alendronato de sódio (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil)¹² dissolvido em água destilada até a concentração 1 mg/kg diariamente. No grupo STR, ranelato de estrôncio foi dissolvido em água

destilada na dosagem de 625 mg/kg (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil) e a suspensão foi administrada por gavagem gástrica diariamente¹³. A administração começou no início do período experimental e continuou até o momento da eutanásia.

2.5 Eutanásia

A eutanásia foi realizada nos períodos de 7, 15 e 30 dias após a remoção das ligaduras, por injeção intramuscular de quetamina (70mg/kg) e xilazina (6mg/kg).

2.6 Processamento tecidual

As hemi-maxilas foram dissecadas e fixadas em paraformoldeído 4% por 48 horas. Posteriormente as amostras foram levadas ao processamento microtomográfico, onde foram armazenadas em álcool 70%, e submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de Microtomografia digital computadorizada. Após a passagem pela microtomografia, as amostras foram desmineralizadas em uma solução tamponada de ácido etilenodiaminetetraacético (EDTA), e submetidas ao processamento histológico com a incorporação de parafina. Em cada amostra foram realizados cortes semi seriados (4mm) foram obtidas da região de furca no sentido disto-mesial. Cada amostra foi obtida 12 lâminas, onde 6 lâminas intercaladas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e trinômio de masson. As imagens foram obtidas por meio do microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com magnificação de 10X e 40X.

2.7 Análise dos Resultados

Todas as análises foram realizadas por um avaliador cego e calibrado para os tratamentos realizados.

A análise microtomográfica avaliou a porcentagem de volume de tecido ósseo mineralizado presente na região dos segundos molares superiores, as peças foram scaneadas por um microtomógrafo (Skycan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003). As imagens obtidas foram reconstruídas pelo software NRecon, através de outro software DataViewer foram reposicionadas e salvas no plano coronal, para delimitação da área de interesse (ROI- Region of Interest) e cálculo do volume ósseo foi utilizado o programa Ctan. Para delimitação da porcentagem de volume ósseo da região do segundo molar superior foi estabelecido um threshold de 65-180 tons de

cinza e delimitado o primeiro ROI no sentido corono/apical desenhada do teto da furca até 1000 micrometros e raízes dos dentes vizinhos como limitações interproximais, o segundo ROI desenhado conforme delimitação anatômica das raízes. Para obtenção da porcentagem de volume ósseo (BV) presente na região foi delimitado o primeiro ROI (área total da região), o segundo ROI (área das raízes).

Análise Histométrica avaliou a porcentagem de perda óssea alveolar interproximal e a porcentagem de tecido ósseo na região de furca através de mensurações utilizando o software de imagens ImageJ - FIJI versão 1.48b (National Institutes of Health, USA), selecionando 3 lâminas de cada amostra de todos os grupos, equidistantes 50 μm entre si. Para análise interproximal foi medido a distância da crista óssea alveolar (BC) até a junção cimento esmalte (EJC) em uma fotografia com o aumento de 5x, e para região de furca foi realizado uma fotografia com um aumento de 20x, e estabelecido um padrão de 1000 μm do teto da furca até o ápice do dente, e assim calculado todo volume ósseo no seu interior.

Análise Histológica foi realizada uma descrição dos tecidos periodontais encontrados na região de segundo molar superior utilizando 3 lâminas por amostra de cada grupo e período, em aumentos de 5, 20 e 40x através do microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany).

Na análise morfológica das regiões supracrestais interproximais avaliou os seguintes parâmetros: 1) células inflamatórias; 2) quantidade de fibroblastos; 3) vasos sanguíneos; 4) matriz de tecido conjuntivo. Através do auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS (Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) com magnitude de 40X. Utilizando o software FIJI - ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA), uma grade foi confeccionada com 30.000 μm^2 , apresentando 50 pontos de intersecções por meio de linhas verticais e horizontais. Esta grade foi posicionada sobre as áreas: regiões proximais supracrestais do segundo molar e no teto da furca. As células presentes em cada intersecção foram contadas. Em seguida, foi realizado o percentual de cada componente tecidual presentes nas imagens, de acordo com¹⁴.

2.8 Análise Estatística

Os dados das análises microtomográfica e histométricas foram numéricos, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para confirmar que os dados de todas as análises

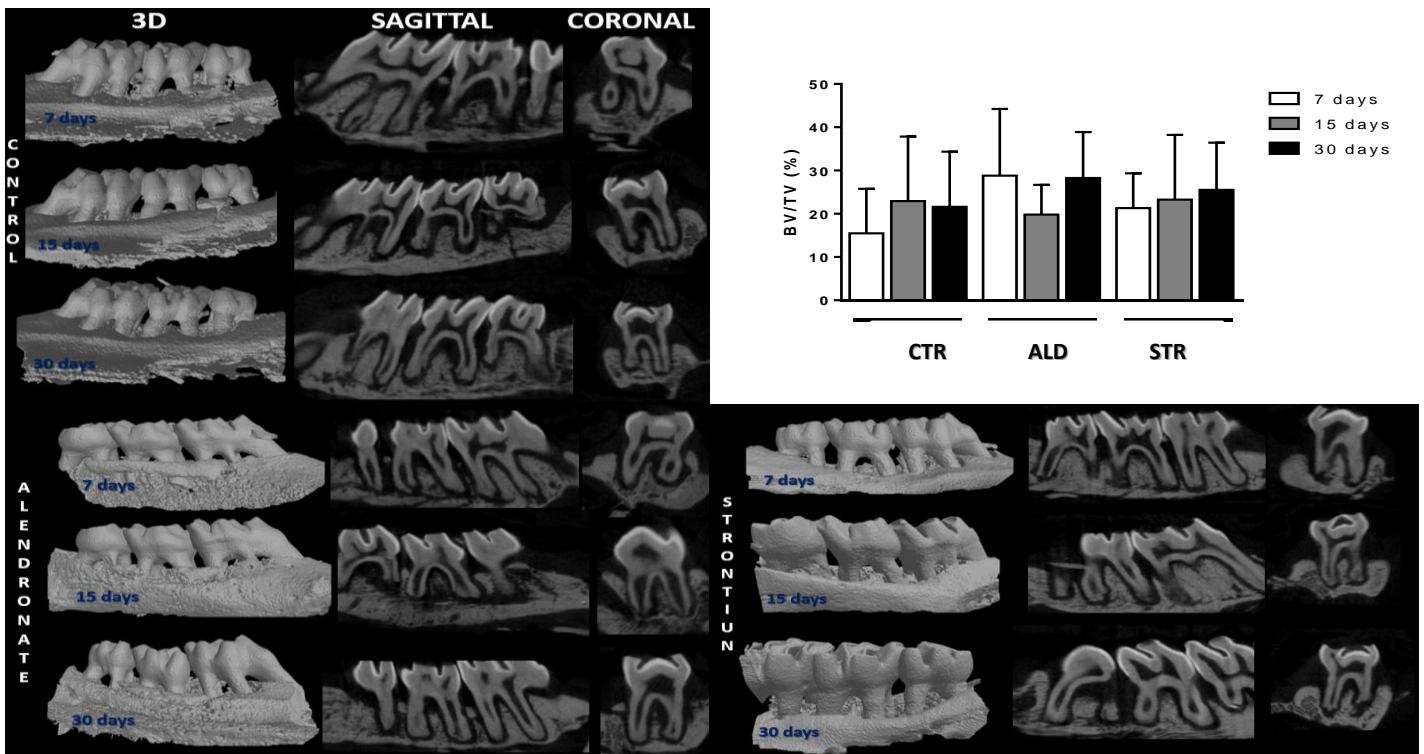
se distribuíram de acordo com a normalidade. Devido a isso, o teste paramétrico de two-way anova complementado pelo teste de Tukey foi utilizado para a análise inferencial dos dados relacionando as variáveis independentes tratamento (CTR, ALD e STR) vs. Período de avaliação (7, 15 e 30 dias). O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para execução da análise estatística desse estudo, e todos os testes foram aplicados ao nível de significância de 5%.

3 Resultados

3.1 uCT

Foi verificado que os dados de BV/TV (volume ósseo/volume tecidual) % apenas no período 7 dias o grupo ALD obteve maiores valores de volume ósseo em relação aos demais grupos, e nos períodos de 15 e 30 dias a porcentagem de BV/TV% não foram diferentes entre os distintos tipos de tratamento (Figura 1).

Figura 1 - Imagens Microtomográficas: tridimensionais, sagitais e coronais, de todos os grupos e períodos. O gráfico representa a média e desvio padrão dos dados de BV/TV% de todos os grupos e períodos de avaliação. Foi verificado que o grupo CTR 7 dias apresentou menor quantidade de tecido ósseo em relação aos demais grupos e períodos, e o grupo ALD apresentou uma maior quantidade BV em relação aos demais grupos.

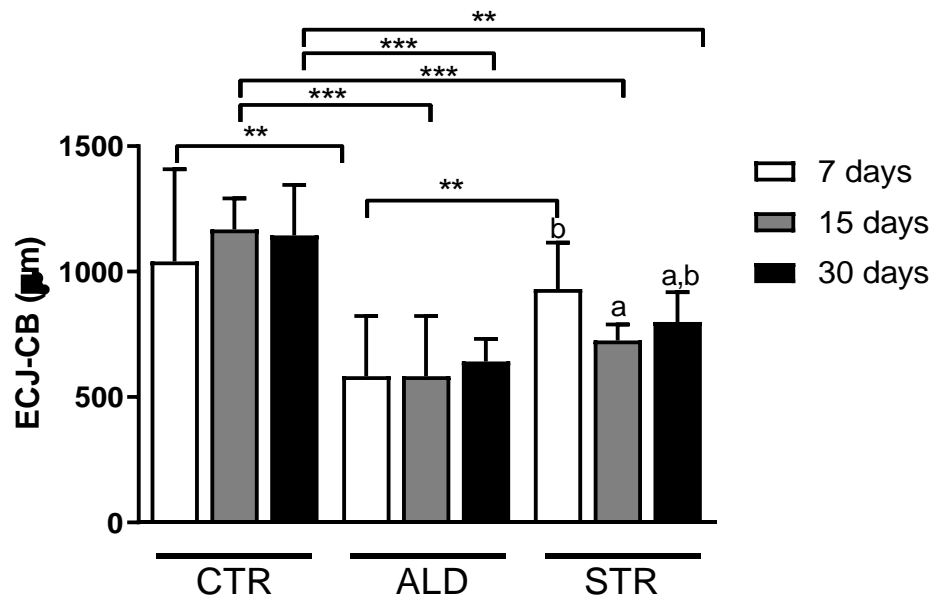


3.2 Histometria

Foi verificado que os animais do grupo CTR apresentaram maiores distâncias lineares da ECJ-CB do que os animais do grupo ALD em todos os períodos experimentais ($p < 0.05$) e que os animais do grupo STR nos períodos de 15 e 30 dias ($p < 0.05$). Além disso, os animais do grupo ALD apresentaram menores distâncias lineares da ECJ-CB do que os animais do grupo STR no período de 7 dias ($p < 0.05$). Os animais do grupo STR apresentaram menores valores de ECJ-CB no período de 15 dias em comparação ao período de 7 dias ($p < 0.05$). (Gráfico 2).

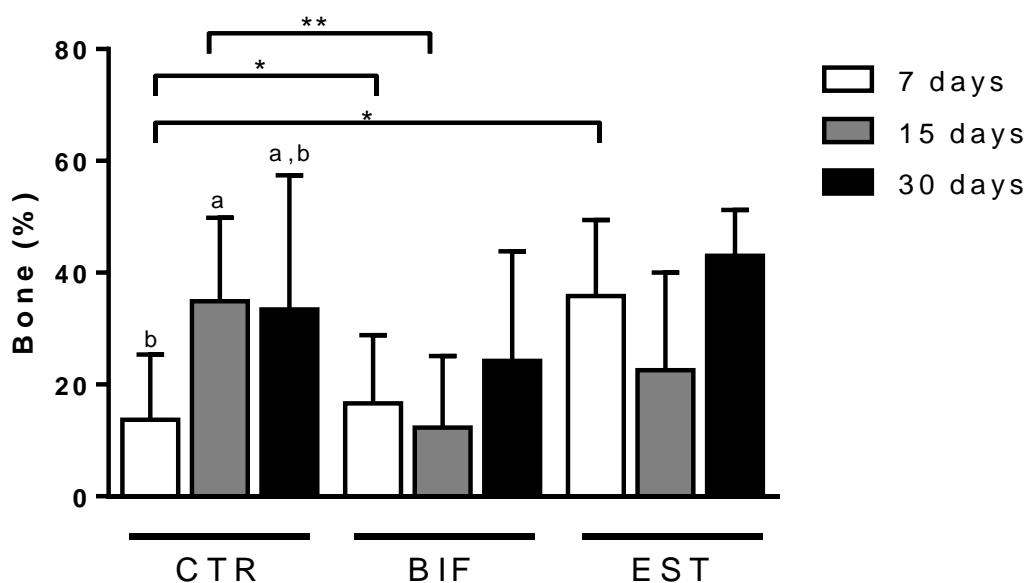
Gráfico 2 - Média e desvio padrão dos dados da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar: ECJ-CB (μm) de todos os grupos e períodos de avaliação. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – Diferenças entre os tratamentos – Teste de two-way Anova complementado pelo

teste de Tukey. O grupo CTR apresentou uma maior quantidade de perda óssea interproximal em relação aos demais grupos. O Grupo STR obteve maior perda óssea interproximal em relação ao ALD, que por sua vez apresentou menor perda óssea interproximal comparado aos demais grupos e períodos.



Na análise da quantidade de tecido ósseo no interior da furca foi verificado que os animais do grupo CTR apresentaram menores quantidade de osso entre as furcas que os animais do grupo ALD e STR aos 7 dias ($p < 0.05$) e maior quantidade de osso que os animais do grupo ALD aos 15 dias ($p < 0.05$). Além disso, foi observado uma maior quantidade de osso no período de 15 dias comparado ao período de 7 dias nos animais do grupo CTR (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Média e desvio padrão dos dados de % osso na furca de todos os grupos e períodos de avaliação. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – Diferenças entre os tratamentos; Letras diferentes representes diferenças estatisticamente significativas dentro de cada tratamento variando-se os períodos de avaliação - Teste de two-way Anova complementado pelo teste de Tukey. O grupo CTR apresentou uma menor quantidade de tecido ósseo no período de 7 dias, em relação aos demais períodos e menor quantidade de tecido ósseo do que os demais grupos. O grupo STR no período de 7 dias apresentou maior quantidade de tecido ósseo no interior da furca em relação aos demais grupos.



3.3 Histologia e Morfometria

No período 7 dias foi observado uma maior quantidade de células inflamatórias em relação aos demais períodos em todos os grupos, no período de 15 e 30 dias esse infiltrado se estabilizou não conseguindo observar diferenças histológicas entre os grupos. Pode-se observar em todos os grupos e períodos que o tecido ósseo na região de furca e região interproximal apresentava-se com áreas de reabsorção o que diferenciou entre eles é que o grupo CTR tinha a presença de osteoclastos e osteoblastos circundando o tecido ósseo em uma processo de remodelação óssea, o grupo STR pode-se observar cordões de osteoblastos contornando as trabéculas ósseas e ALD a presença de inúmeros osteoblastos com núcleos picnóticos, o que considera a inativação da célula, ainda no grupo ALD foi possível observar que o tecido das cristas ósseas interproximais apresentava-se sem osteócitos, podendo ser considerados necróticos, envolvidos de células inflamatórias. Observou-se áreas de reparação tecidual em todos os períodos, mas principalmente nos períodos de 15 e 30 dias, o grupo STR apresentou maiores áreas de matriz de tecido conjuntivo com a presença de fibras colágenas que se apresentam-se organizadas em relação aos demais grupos.

Na análise quantitativa de células na região suprecrestal interproximal e região de furca observou-se que os animais do grupo STR apresentaram menores quantidades de células inflamatórias que os outros grupos no período de 15 e 30 dias

($p < 0.05$). Além disso, o grupo STR apresentou maiores quantidade de matriz de conjuntivo e menores quantidades de fibroblastos que os outros grupos em todos os períodos de avaliação ($p < 0.05$). O grupo CTR apresentou menores quantidades de vasos sanguíneos que os outros grupos aos 7 dias ($p < 0.05$) e menores quantidades de células inflamatórias do que o grupo ALD aos 7 dias ($p < 0.05$). O grupo CTR também apresentou maior quantidade de matriz de tecido conjuntivo que o grupo ALD aos 7 dias ($p < 0.05$). A tabela 1 expõe os dados de média e desvio padrão da análise estereométrica de todos os grupos e períodos de avaliação.

Figura 1 – Microfotografia dos segundos molares superiores e suas estruturas periodontais. Imagens A, C, E, G, I, K, M, O, Q representam a região de furca e as B, D, F, H, J, L, N, P, R imagens representativas interproximais, com aumento de 20x. No período 7 dias em todos os grupos apresentavam uma maior quantidade de células inflamatórias (if) e menor quantidade de tecido ósseo no interior da furca em comparação aos demais períodos. Em todos os períodos foram encontradas crista óssea interproximal finas e áreas de reabsorção (flecha azul), e no grupo ALD as pontas das cristas apresenta lacunas de osteócitos vazios (BN). Matriz de tecido conjuntivo (tc) encontrado envoltos as trabéculas ósseas presentes, preenchendo as áreas de reabsorção (seta azul), no grupo STR as fibras colágenas apresentam mais organizadas. No grupo CTR e ALD apresentaram visivelmente osteoclastos (oc), no grupo ALD estas células estavam com núcleos picnóticos, já no grupo STR foram observados cordões de osteoblastos (ob) aderidos ao tecido ósseo presente.

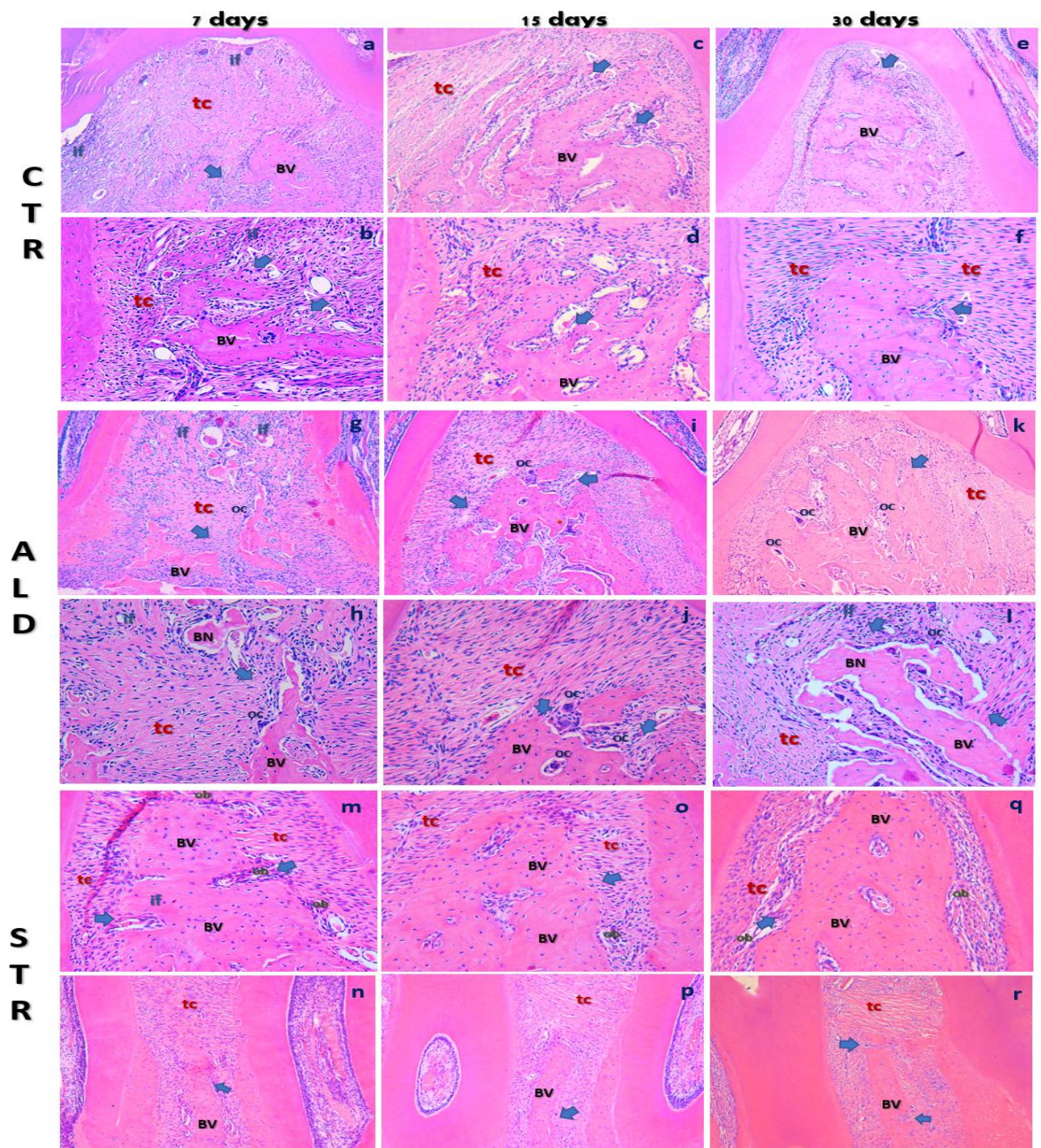


Figura 2 – Imagens representativas histológicas com a coloração Masson. Foi observado a presença de matriz osteóide com fibras colágenas organizadas no grupo STR em maior evidência em relação aos demais grupos, o CTR apresentou fibras colágenas desorganizadas e o ALD apresentou menor quantidades de fibras colágenas desorganizadas em comparação aos demais grupos.

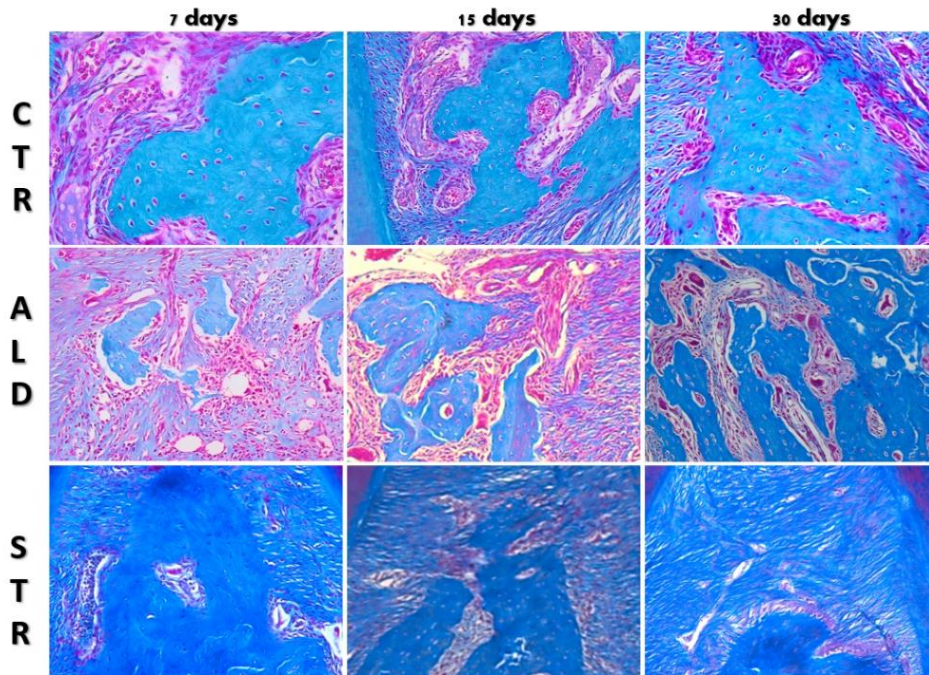


Tabela 1: Média e desvio padrão da análise estereométrica de todos os grupos e períodos de avaliação. Tabela representa a porcentagem de características celulares suprecrestal e interior de furca dos respectivos grupos e períodos: % células inflamatórias, % fibroblastos, % vasos sanguíneos e % matriz de tecido conjuntivo.

GRUPOS/PERÍODOS	COMPONENTE	7 DIAS	15 DIAS	30 DIAS
CTR	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	4.00 ± 4.60	5.22 ± 6.58	3.98 ± 2.69
BIF		2.94 ± 1.53	5.18 ± 3.68	4.03 ± 4.43
EST		2.09 ± 3.04	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
CTR	FIBROBLASTOS	57.41 ± 7.42	64.33 ± 4.79	64.18 ± 3.60
BIF		71.75 ± 2.58	65.21 ± 6.00	63.74 ± 7.43
EST		34.88 ± 3.79	42,38 ± 3.46	35.13 ± 18.16
CTR	VASOS SANGUÍNEOS	1.15 ± 1.01	4.53 ± 4.66	2.77 ± 3.02
BIF		3.72 ± 1.16	2.47 ± 2.73	2.52 ± 2.16
EST		2.95 ± 0.74	0.44 ± 0.74	1.44 ± 3.14
CTR	MATRIZ DO CONJUNTIVO	41.44 ± 7.08	34.76 ± 4.79	35.05 ± 4.41
BIF		25.83 ± 3.20	32.05 ± 7.53	33.21 ± 7.88
EST		60.53 ± 4.26	57,18 ± 3.56	63.27 ± 15.27

4 Discussão

A destruição do tecido periodontal se inicia com a resposta imune do hospedeiro, essa resposta está relacionada com a flora bacteriana subgengival. No momento em que as bactérias periodonto patogênicas superam os mecanismos de defesa do hospedeiro causam a progressão da DP¹⁵⁻¹⁷. Vários medicamentos tem sido usados recentemente atuando na resposta do hospedeiro a fim de prevenir a progressão da DP. O alendronato de sódio, é o bisfosfonato mais utilizado em doenças relacionadas ao metabolismo ósseo⁶. Sua eficácia está descrita através de duas propriedades chaves: forte habilidade de se ligar ao osso mineralizado e sua capacidade de produzir um efeito inibitório em osteoclastos maduros¹⁸. Uma vez administrados, eles se ligam aos cristais de hidroxiapatita de matriz mineralizada e são incorporados pelas células clásticas à medida que degradam a matriz¹⁸. Foi nos últimos anos muito estudado como modulador do hospedeiro em DP, porém suas características teciduais de osteonecrose dos maxilares, tem buscado outras alternativas de tratamento¹⁹⁻²³. A dosagem utilizada para o desenvolvimento de osteonecrose pós extração em animais foi de 1 mg/kg/dia¹², a mesma utilizada em nosso estudo para verificar se com uma dosagem maior melhora os efeitos de inibição de reabsorção em DP.

O ranelato de estrôncio, novo fármaco antirreabsortivo usado para tratamento de osteoporose, possui um mecanismo de ação óssea diferente dos bisfosfonatos, por isso sua utilização. Por possuir um mimetismo estrutural com o cálcio, o organismo o incorpora em seus tecidos ósseos e dentes, assim ele possui ação tanto na formação óssea, como prevenindo a reabsorção óssea. O estrôncio tem a capacidade de diminuir a atividade dos osteoclastos, induzir a apoptose e diferenciação de osteoclastos, resultando em uma diminuição da reabsorção óssea, por outro lado ele aumenta a replicação de células pré-osteoblásticas e secundariamente a atividade de células funcionais e síntese de matriz óssea, estimula a síntese de DNA e síntese colágeno ósseo, classificado como um fármaco formador de osso¹⁰. Lavet et al., 2017¹³, avaliou a influência do ranelato de estrôncio (625 mg/kg/dia) na estimulação da formação óssea em defeitos ósseos nas tíbias de rato. Karakan et al., 2017²⁴, avaliou a influência no ranelato de estrôncio em várias concentrações (250, 625, 900

mg/kg/dia) para tratamento adjunto da DP. A dose de 625 mg/kg/dia no rato é o equivalente a concentração de 2mg/kg/dia utilizada em humanos²⁵.

Foi verificado que a indução de periodontite em roedores por meio de ligaduras nos segundos molares superiores foi realizada com sucesso, devido as características histopatológicas apresentadas. Através da microtomografia computadorizada, foi avaliado que o grupo ALN apresentou no período de 7 dias maior volume ósseo em relação aos demais grupos, o que era o esperado por esse medicamento devido aos estudos relacionados a osteoporose^{26,27}.

Em relação a perda óssea alveolar, o grupo ALD apresentou uma menor perda óssea interproximal comparado aos demais. E o grupo STR apresentou uma menor perda óssea alveolar nos períodos de 15 e 30 dias, resultado semelhante ocorreu nos grupos que foram tratados com ranelato de estrôncio^{24,28}, também avaliou o estrôncio como tratamento adjuvante para periodontite e relatou que o grupo que continha estrôncio teve uma menor perda óssea alveolar em comparação ao grupo sem tratamento. A maior perda óssea alveolar ocorreu nos períodos de 7 dias em todos os grupos, sendo que o CTR apresentou menor quantidade de osso no interior da furca em comparação aos outros grupos. A maior quantidade de osso encontrado no grupo STR e ALD pode não ser devido à sua formação, mas sim à diminuição reabsorção, número reduzido de osteoclastos no grupo STR e osteoclastos inativos no grupo ALD, característica também presente no estudo Karakan et al.²⁴ (2017).

Nas descrições dos tecidos celulares periodontais encontrados na região, observa-se uma maior quantidade de células inflamatórias no período de 7 dias em todos os grupos, no período 15 e 30 dias no grupo STR não foram observadas características de inflamação, fato também descrito por Souza et al.³²(2012), em seu estudo, e explicado por Alves et al.²⁹ (2017), onde relatou que o estrôncio reduz os níveis de TNF- α no gânglio trigeminal promovendo efeitos anti-inflamatórios. Foi verificado matriz de tecido conjuntivo supracrestal em todos os grupos, porém o grupo STR apresentou em maiores quantidades e se diferenciavam com os demais grupos por possuírem fibras colágenas bem organizadas em todo seu tecido, confirmado pela coloração masson. A síntese de matriz óssea e aumento da síntese de fibras colágenas foram descritas em 2006 por Marie et al.¹⁰, e atualmente replicada no estudo de Gusman et al.²⁸ (2021), que também encontrou características similares no tecido conjuntivo encontrado no grupo estrôncio. O tecido ósseo presente em todos

os grupos apresenta-se vitais com a presença de osteócitos, com exceção algumas áreas interproximais do grupo ALD onde encontrados tecido ósseo com ausência de osteócito, que pode ser explicado, pela ação dos bisfosfonatos já relatados em outros estudos^{30,31}, onde foi capaz de ocasionar a morte de osteócitos nos tecidos ósseos alveolares e a exposição da crista óssea alveolar, considerados sinais de necrose. No grupo STR pode-se observar cordões de osteócitos contornando as trabéculas ósseas, devido ao fato do estrôncio estimular a formação óssea através da estimulação de células osteoblásticas com a liberação de PGE2, e no grupo ALD grande quantidade de osteoclastos com núcleos picnóticos, considerando seus efeitos inibitórios em osteoclastos maduros, importante característica presente na ação dos bisfosfonatos^{18,20}.

As limitações desse estudo estão relacionadas primeiramente na condição de saúde dos animais, foram utilizados animais saudáveis e esses medicamentos possuem efeito crônico e sistêmico no tratamento de doenças ósseas. Os medicamentos também foram aplicados em uma condição de inflamação, devido a essas características o medicamento não conseguiu barrar o aparecimento da inflamação causada por biofilme. A dosagem do medicamento também pode influenciar no resultado do estudo uma vez que a dosagem do alendronato é muito alta para tratamento de DP e a dosagem do estrôncio precisa ser ajustada para esse tipo de doença. Mais estudos precisam ser realizados para confirmação da atuação dos medicamentos em uma doença inflamatória e aprofundar nos mecanismos de ação frente a periodontite.

5 Conclusão

A administração sistêmica dos medicamentos não influenciou no aparecimento da DP, porém influenciou nos mecanismos de reparação tecidual alveolar. O grupo ALD foi verificado uma preservação de tecido ósseo alveolar e inativação de osteoclastos, porém com áreas de tecido ósseo necrótico. Já o STR apesar da perda óssea alveolar apresentava uma síntese de matriz óssea e fibras colágenas, condições benéficas para reparação tecidual alveolar.

6 Referências

1. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):30-44.
2. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):317-29.
3. Donos N, Calciolari E, Brusselaers N, Goldoni M, Bostanci N, Belibasakis GN. The adjunctive use of host modulators in non-surgical periodontal therapy. A systematic review of randomized, placebo-controlled clinical studies. *J Clin Periodontol*. 2020;47 Suppl 22:199-238.
4. Li F, Jiang P, Pan J, Liu C, Zheng L. Synergistic application of platelet-rich fibrin and 1% alendronate in periodontal bone regeneration: a meta-analysis. *Biomed Res Int*. 2019;2019:9148183.
5. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):131-49.
6. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2-19.
7. Cetinkaya BO, Keles GC, Ayas B, Gurgor P. Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a stereologic study in rats. *J Periodontol*. 2008;79(10):1950-61.
8. Moreira MM, Bradaschia-Correa V, Marques ND, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of the effect of sodium alendronate in the progression of experimental periodontitis in rats. *Microsc Res Tech*. 2014;77(11):902-9.
9. Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos Int*. 2005;16 Suppl 1:S7-10.
10. Marie PJ. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*. 2006;38(2 Suppl 1):S10-4.
11. Macedo PD, Corbi ST, de Oliveira G, Perussi JR, Ribeiro AO, Marcantonio RAC. Hypericin-glucamine antimicrobial photodynamic therapy in the progression of experimentally induced periodontal disease in rats. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;25:43-9.
12. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, A SB, Guimaraes M, Marcantonio E, Jr. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(1):65-73.
13. Lavet C, Mabileau G, Chappard D, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate stimulates trabecular bone formation in a rat tibial bone defect healing process. *Osteoporos Int*. 2017;28(12):3475-87.
14. Marcantonio CC, Nogueira AVB, Leguizamon NDP, de Molon RS, Lopes MES, Silva RCL, et al. Effects of obesity on periodontal tissue remodeling during orthodontic movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2021;159(4):480-90.
15. Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1592-600.
16. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2001;25:8-20.
17. Tsai HC, Li YC, Young TH, Chen MH. Novel microinjector for carrying bone substitutes for bone regeneration in periodontal diseases. *J Formos Med Assoc*. 2016;115(1):45-50.
18. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*. 2008;19(6):733-59.

19. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, Garcia-Arranz M, Yebenes L, Burgueno M. Zoledronic acid - related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(6):744-50.
20. de Molon RS, Shimamoto H, Bezouglaia O, Pirih FQ, Dry SM, Kostenuik P, et al. OPG-Fc but not zoledronic acid discontinuation reverses osteonecrosis of the jaws (onj) in mice. *J Bone Miner Res.* 2015;30(9):1627-40.
21. Kang SH, Park SJ, Kim MK. The effect of bisphosphonate discontinuation on the incidence of postoperative medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2020;46(1):78-83.
22. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(9):1115-7.
23. Yanik S, Aras MH, Erkilic S, Bozdog Z, Demir T, Cetiner S. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Arch Oral Biol.* 2016;65:59-65.
24. Karakan NC, Akpinar A, Goze F, Poyraz O. Investigating the effects of systemically administered strontium ranelate on alveolar bone loss histomorphometrically and histopathologically on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2017;88(2):e24-e31.
25. Reginster JY, Deroisy R, Jupsin I. Strontium ranelate: a new paradigm in the treatment of osteoporosis. *Drugs Today (Barc).* 2003;39(2):89-101.
26. Deng J, Feng Z, Li Y, Pan T, Li Q, Zhao C. Efficacy and safety of recombinant human parathyroid hormone (1-34) are similar to those of alendronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(47):e13341.
27. Wang YK, Qin SQ, Ma T, Song W, Jiang RQ, Guo JB, et al. Effects of teriparatide versus alendronate for treatment of postmenopausal osteoporosis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(21):e6970.
28. Gusman DJ, Matheus HR, Alves BE, Ervolino E, de Araujo NJ, Piovezan BR, et al. Influence of systemic strontium ranelate on the progression and as adjunctive therapy for the nonsurgical treatment of experimental periodontitis. *J Clin Exp Dent.* 2021;13(12):e1239-e48.
29. Alves SM, Abreu SC, Lemos JC, Gomes FIF, Alves SM, do Val DR, et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend on TNF-alpha inhibition. *Pharmacol Rep.* 2017;69(4):764-72.
30. Aghaloo TL, Kang B, Sung EC, Shoff M, Ronconi M, Gotcher JE, et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1871-82.
31. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams A, Jorgensen M, et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2012;27(10):2130-43.
32. Souza JA, Rossa C Jr, Garlet GP, Nogueira AV, Cirelli JA. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(2):128-38.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos objetivos deste projeto de pesquisa que foi avaliar as respostas teciduais da utilização sistêmica de alendronato e de estrôncio não radioativo em alvéolos pós extração e na prevenção e tratamento da doença periodontal, os resultados se mostraram interessantes e confirmaram a ação do estrôncio a favor da formação óssea em dois tipos de problemas relacionados com o metabolismo ósseo, osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos e doença periodontal induzida. Devido o aparecimento corriqueiro de estudos relatando o aparecimento de lesões necróticas após procedimentos cirúrgicos em maxilares de indivíduos que fazem uso crônico de bisfosfonatos, foi realizado o estudo a fim de induzir a osteonecrose por medicamentos por bisfosfonatos, e uma possível prevenção ou tratamento por meio da interrupção do medicamento ou o uso de ranelato de estrôncio. No estudo realizado mostrou uma possível diferenciação dos tecidos e um processo de reparação presentes nos alvéolos com o uso de estrôncio, demonstrando uma melhora nos efeitos colaterais da osteonecrose, mesmo na presença de tecido ósseo necrótico ocorreu uma formação de tecido ósseo basal dos alvéolos.

Também pode-se associar a influência desses medicamentos antirreabsortivos em outro tipo de patologia bucal, a doença periodontal, que a décadas vem sendo estudadas, mas a sua prevenção e o seu tratamento não possuem um protocolo efetivo ideal. Embora a presença de biofilme na superfície dental que iniciam a inflamação tecidual, a resposta do organismo frente a essas bactérias, como a liberação de proteínas, citocinas e prostanoídes que são responsáveis pela destruição tecidual³². Alguns tratamentos da periodontite se concentram apenas na redução do desafio microbiano, ou seja, raspagem e alisamento radicular para eliminação das bactérias, porém estratégias terapêuticas adicionais também podem ser uma alternativa para modificação da resposta do hospedeiro, afim de diminuir o processo inflamatório³³. Assim, o uso de substâncias ou medicamentos, que agem sistemicamente ou localmente com a finalidade de impedir a reabsorção óssea e favorecer a formação óssea, vem sendo pesquisados com o objetivo de atuar no tratamento da doença periodontal.

Nos estudos relacionados a doença periodontal, foi utilizado o alendronato de sódio, por ser o bisfosfonato mais utilizado atualmente em pacientes que apresentam doença do metabolismo ósseo^{3,4}, e o ranelato de estrôncio, é um novo

antirreabsortivo, que apresenta uma atuação em uma via de metabolismo ósseo que atua tanto inibindo o processo de reabsorção óssea, quanto na formação de tecido ósseo²⁰. Devido a ação desses medicamentos, foram os medicamentos de escolha para o estudo atual, a modo de avaliar a influência desses medicamentos na progressão, na modulação e no tratamento da doença periodontal.

No estudo relacionado a influência dos medicamentos na progressão da doença periodontal, foi verificado que o uso crônico desses medicamentos não impediu o aparecimento da doença, porém melhorou as características teciduais presentes, o ALD diminuiu a reabsorção óssea comparada ao grupo que não obteve tratamento, porém na parte apical das cristas ósseas apresentava-se tecido ósseo com a ausência de osteócitos, já com a presença sistêmica de estrôncio, embora tenha tido maiores áreas de perda óssea na região de furca e interproximal, as áreas de reabsorção apresentava-se em processo de reparação com a presença de matriz de tecido conjuntivo e abundância de fibras colágenas organizadas.

A administração sistêmica medicamentos como tratamento adjuvante da doença periodontal, foi observado que os medicamentos não influenciaram no aparecimento da periodontite experimental, porém obteve com o tempo uma maior quantidade de tecido de reparação nas áreas em que obteve reabsorção óssea, o ALD promoveu a inativação dos osteoclastos, observados pela presença de osteoclastos com núcleos picnóticos, e conseqüente diminuição de reabsorção de tecido ósseo interproximal e região de furca; no grupo STR encontrou-se uma grande quantidade de cordões de osteoblastos rentes ao tecido ósseo presente, matriz de tecido conjuntivo e presença de uma matriz osteóide confirmando o aparecimento do tecido de reparação e a indução de formação óssea, e esse processo foi aumentando com o passar do tempo.

Apesar dos efeitos benéficos a favor na manutenção do tecido ósseo apresentado por ALD, algumas áreas interproximais encontrou-se áreas de tecido necrótico, ou seja, com ausência de osteócitos, achados também encontrados nos estudos de De Almeida et al.²⁷ (2015), devido a essas características foram propostos medicamentos alternativos em vez do uso de bisfosfonatos. Já o STR como já descritos em outros estudos, eles atuam na proliferação dos tecidos periodontais melhorando o seu reparo^{22,30}, porém devido a poucos estudos comparando o STR a doença periodontal, mais estudos serão necessários para avaliação de seus

mecanismos de ação, dosagem e aplicabilidade do medicamento. Em virtude dos estudos atuais, a administração sistêmica desses medicamentos que vem atuando em benefício da cicatrização óssea, uma aplicabilidade local também poderia melhorar esse processo cicatricial.

5 CONCLUSÃO

O uso do alendronato foi capaz de induzir a osteonecrose dos maxilares pós extração dentária e a administração sistêmica do ranelato de estrôncio reduziu a severidade dessa patologia. Por outro lado, os mecanismos de ação desses medicamentos não conseguiram se sobrepor na indução da doença periodontal, ou seja, obteve a presença de perda óssea interproximal e da região de furca, representando as características da doença periodontal ativa, o ranelato de estrôncio como prevenção e tratamento, induziu uma maior formação de matriz de tecido conjuntivo, osteoblastos, matriz osteóide referentes a um tecido de reparação nessas áreas e o alendronato de sódio reduziu a perda óssea alveolar, porém com pequenas áreas necrose nas cristas ósseas interproximais.

REFERÊNCIAS*

1. Ohe JY, Kwon YD, Lee HW. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Investig*. 2012;16(4):1153-9.
2. Cremers S, Papapoulos S. Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*. 2011;49(1):42-9.
3. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*. 2008;19(6):733-59.
4. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2-19.
5. Chacon GE, Stine EA, Larsen PE, Beck FM, McGlumphy EA. Effect of alendronate on endosseous implant integration: an in vivo study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006;64(7):1005-9.
6. Zhang Y, Wei L, Wu C, Miron RJ. Periodontal regeneration using strontium-loaded mesoporous bioactive glass scaffolds in osteoporotic rats. *PLoS One*. 2014;9(8):e104527.
7. Twiss IM, Pas O, Ramp-Koopmanschap W, Den Hartigh J, Vermeij P. The effects of nitrogen-containing bisphosphonates on human epithelial (Caco-2) cells, an in vitro model for intestinal epithelium. *J Bone Miner Res*. 1999;14(5):784-91.
8. Twiss IM, Burggraaf J, Schoemaker RC, van Elburg RM, den Hartigh J, Cohen AF, et al. The sugar absorption test in the evaluation of the gastrointestinal intolerance to bisphosphonates: studies with oral pamidronate. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(6):431-7.
9. Twiss IM, van den Berk AH, de Kam ML, Bosch JJ, Cohen AF, Vermeij P, et al. A comparison of the gastrointestinal effects of the nitrogen-containing bisphosphonates pamidronate, alendronate, and olpadronate in humans. *J Clin Pharmacol*. 2006;46(4):483-7.
10. Berenson JR. Bisphosphonates in multiple myeloma. *Cancer*. 1997;80(8 Suppl):1661-7.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Bergner R, Henrich DM, Hoffmann M, Honecker A, Mikus G, Nauth B, et al. Renal safety and pharmacokinetics of ibandronate in multiple myeloma patients with or without impaired renal function. *J Clin Pharmacol*. 2007;47(8):942-50.
12. Fleisch H. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J*. 2003;(12) Suppl 2:S142-6.
13. de Molon RS, Shimamoto H, Bezouglaia O, Pirih FQ, Dry SM, Kostenuik P, et al. OPG-Fc but not zoledronic acid discontinuation reverses osteonecrosis of the jaws (onj) in mice. *J Bone Miner Res*. 2015;30(9):1627-40.
14. Kang SH, Park SJ, Kim MK. The effect of bisphosphonate discontinuation on the incidence of postoperative medication-related osteonecrosis of the jaw after tooth extraction. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2020;46(1):78-83.
15. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(9):1115-7.
16. Yanik S, Aras MH, Erkilic S, Bozdog Z, Demir T, Cetiner S. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Arch Oral Biol*. 2016;65:59-65.
17. Panahifar A, Cooper DM, Doschak MR. 3-D localization of non-radioactive strontium in osteoarthritic bone: Role in the dynamic labeling of bone pathological changes. *J Orthop Res*. 2015;33(11):1655-62.
18. Querido W, Farina M, Anselme K. Strontium ranelate improves the interaction of osteoblastic cells with titanium substrates: Increase in cell proliferation, differentiation and matrix mineralization. *Biomatter*. 2015;5:e1027847.
19. Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. *Osteoporos Int*. 2005;16 Suppl 1:S7-10.
20. Marie PJ. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*. 2006;38(2 Suppl 1):S10-4.
21. 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*. 1993;8(5):607-15.
22. Karakan NC, Akpınar A, Goze F, Poyraz O. Investigating the effects of systemically administered strontium ranelate on alveolar bone loss

histomorphometrically and histopathologically on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2017;88(2):e24-e31.

23. Kirschneck C, Wolf M, Reicheneder C, Wahlmann U, Proff P, Roemer P. Strontium ranelate improved tooth anchorage and reduced root resorption in orthodontic treatment of rats. *Eur J Pharmacol.* 2014;744:67-75.

24. Marins LM, Napimoga MH, Malta FS, Miranda TS, Nani EP, Franco B, et al. Effects of strontium ranelate on ligature-induced periodontitis in estrogen-deficient and estrogen-sufficient rats. *J Periodontal Res.* 2020;55(1):141-51.

25. Goes P, Melo IM, Dutra CS, Lima AP, Lima V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1537-44.

26. Sharma A, Raman A, Pradeep AR. Role of 1% alendronate gel as adjunct to mechanical therapy in the treatment of chronic periodontitis among smokers. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(3):243-9.

27. De Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, Novaes VC, Theodoro LH, Fernandes LA, et al. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2015;86(10):1166-75.

28. Kanoriya D, Pradeep AR, Singhal S, Garg V, Guruprasad CN. Synergistic approach using platelet-rich fibrin and 1% alendronate for intrabony defect treatment in chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2016;87(12):1427-35.

29. de Molon RS, Cheong S, Bezouglaia O, Dry SM, Pirih F, Cirelli JA, et al. Spontaneous osteonecrosis of the jaws in the maxilla of mice on antiresorptive treatment: a novel ONJ mouse model. *Bone.* 2014;68:11-9.

30. Gusman DJ, Matheus HR, Alves BE, Ervolino E, de Araujo NJ, Piovezan BR, et al. Influence of systemic strontium ranelate on the progression and as adjunctive therapy for the nonsurgical treatment of experimental periodontitis. *J Clin Exp Dent.* 2021;13(12):e1239-e48.

31. Moreira MM, Bradaschia-Correa V, Marques ND, Ferreira LB, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of the effect of sodium alendronate in the progression of experimental periodontitis in rats. *Microsc Res Tech.* 2014;77(11):902-9.

32. Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006;40:144-63.
33. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol*. 2011;38 Suppl 11:60-84.

APÊNDICE A

Estudo 1 – O ranelato de estrôncio melhora a cicatrização pós-extração do alvéolo em ratos submetidos à administração de bisfosfonatos.

O estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animal da FOAr-UNESP (CEUA-27-2015).

1 Distribuição dos animais e grupos

Foram utilizados 60 ratos *Rattus Norvegicus*, variação *albinus*, *Holtzman*, machos, adultos, de aproximadamente 10 semanas de idade, com massa corporal entre 190-210 gramas, mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP), alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, luz e temperatura controladas, sendo que suas gaiolas foram identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e período. Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos com 10 animais em cada grupo (Figura 1). Os grupos foram divididos em:

Grupo controle (CTR): administração diária de soro fisiológico por injeção subcutânea durante 90 dias, com início 60 dias antes da extração dos primeiros molares inferiores. Após este período os animais foram eutanasiados.

Grupo alendronato (ALN): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia 28 durante 90 dias com início 60 dias antes da cirurgia para a extração dos dentes. Após 30 dias das extrações os animais foram eutanasiados.

Grupo alendronato/SORO (ALN/S): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia durante 60 dias e realizado a extração. A partir do procedimento cirúrgico os animais receberam administração diária de injeção subcutânea de soro fisiológico durante 30 dias onde os animais foram eutanasiados.

Grupo alendronato/estrôncio (ALN/Sr): administração de alendronato (ALN)

(ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia durante 60 dias. No dia das extrações dos dentes foi iniciado a administração de Ranelato de Estrôncio (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil) administrado 625 mg/kg/dia^{43, 44, 41} por gavagem diariamente e depois de 30 dias os animais foram eutanasiados.

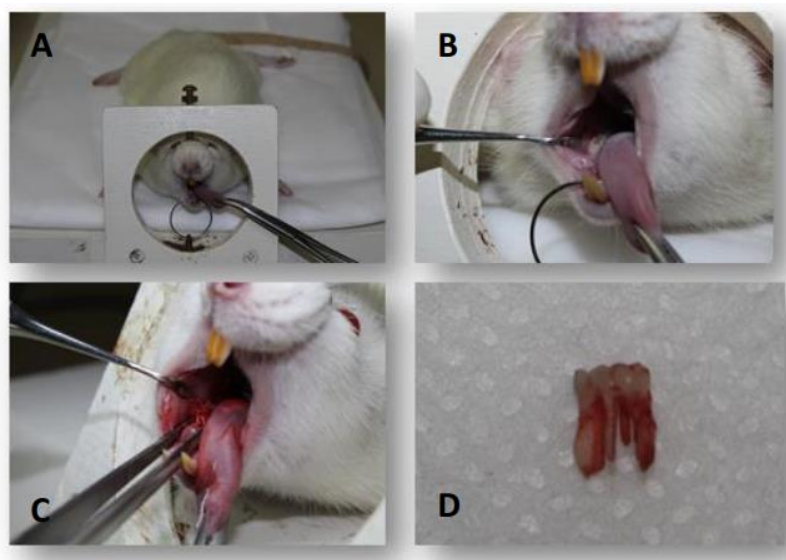
Grupo alendronato/SORO 60(ALN/S60): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia durante 60 dias. A administração deste medicamento foi interrompida 30 dias antes da cirurgia para a extração dos dentes. Após 30 dias das extrações os animais foram eutanasiados, durante este período os animais foram submetidos a administração subcutânea de soro fisiológico.

Grupo alendronato/estrôncio 60 (ALN/Sr60): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia durante 60 dias, após este período foi iniciado a administração de Ranelato de Estrôncio (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil) aplicado 625 mg/kg/dia por gavagem diariamente durante 60 dias. 30 dias após o início da administração do ranelato de estrôncio os dentes foram extraídos e os animais foram eutanasiados após 30 dias.

2 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente. Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica. Com o auxílio de uma pinça hemostática foi imobilizada a língua do rato e a mandíbula para estabilização, com uma sonda exploradora o tecido gengival ao redor dos primeiros molares foram delicadamente afastados, posteriormente, utilizando um Holleback Carver onde os dentes foram luxados e avulsionados totalmente ou divididos em dois segmentos (mesial e distal) e removidos separadamente 28. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único profissional treinado.

Figura 1 – Imagem representativa das posições do animal no procedimento cirúrgico. A – Animal é estabilizado na mesa cirúrgica na posição decúbito-ventral com mandíbula e maxila apoiadas de modo que fiquem abertas; B – Abertura bucal satisfatória com afastamento lingual através da pinça hemostática; C – Descolamento e luxação do primeiro molar inferior; D- imagem do primeiro molar inferior extraído.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Após o procedimento de extração dental os animais receberam uma dose intramuscular de penicilina associada à estreptomicina (Pentabiótico pequenoprote, FortDodge, Brasil) na dosagem 0,1 ml/kg de peso e 5mg/kg de dipirona sódica intramuscular (Febrax, Lema InjexBiologic, Brasil). Após os períodos experimentais de cada grupo os animais foram eutanasiados e foram obtidas as peças da região dos primeiros molares que foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e armazenadas em álcool 70%. Estas peças foram avaliadas através de análise radiográfica tridimensional (Micro-CT) e análises histológica e estereométrica.

3 Avaliação por Análise Radiográfica Tridimensional (Micro-CT)

As peças armazenadas em álcool 70%, foram primeiramente submetidas a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo

SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 18 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstruídas pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstituídas e selecionadas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital).

Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida uma área de interesse na região de extração dos primeiros molares (ROI). O software CTAn analisa e mede amagem de acordo com a escalas de cinza (thershold). O threshold utilizado na análise foi definido 45 de 65-180 tons de cinza que possibilitaram o volume de osso na região (Figura 4). A área de interesse (ROI) foi determinada com os mesmos parâmetros para todas as imagens de todos os grupos com a dimensão de 1,20X3,00mm, onde foi delimitada uma área quadrangular onde a dimensão vertical abrangeu uma região relativa à distância da junção cimento-esmalte da raiz mesial do segundo molar (CEJ) até a sua porção apical e a distância horizontal foi definida entre as superfícies ósseas mesial e distal do tecido ósseo do alvéolo distal referente ao primeiro molar extraído.

A porcentagem (%) de tecido mineralizado na região de interesse foi definida a partir da quantidade de tecido mineralizado (BV) em relação a área total do ROI (TV). Porcentagem de tecido mineralizado = $BV \times 100/TV$.

4 Processamento Histológico

Após a fixação das peças em formaldeído a 4%, estas foram lavadas em água corrente por 12 horas e colocadas em solução de EDTA para descalcificação por um período de 8 semanas, com trocas semanais a cada 48 horas. Foram realizados cortes seriados de 4µm de espessura no sentido

vestíbulo/lingual ao longo eixo do dente. As lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e PicroSirius Red.

5 Análises Histológica e Estereométrica

5.1 Análise histológica

A análise microscópica foi realizada por um único examinador através da avaliação dos cortes histopatológicos corados. As lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha), para observações morfológicas das estruturas periodontais da região do primeiro molar inferior. Foi realizada por um examinador treinado (LCS).

5.2 Análise Estereométrica

A análise estereométrica foi realizada utilizando os métodos empregados por Conte Neto et al, 28. Foram realizadas medições na região relativa a raiz distal do primeiro molar (M1), delimitando uma área quadrangular, que se estendeu desde o nível da junção cimento/esmalte (CEJ) do segundo molar (M2) até a porção apical do M2 e entre a mesial e distal superfícies de osso alveolar. Esta área foi dividida em 3 seções (coronária – ROI 1; mediana – ROI 2; apical – ROI 3).

As imagens das seções ROI 1, ROI 2, ROI 3 dos cortes microscópicos foram capturadas utilizando-se câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). A determinação da densidade volumétrica (%) de osso necrótico, osso vital, matriz de tecido conjuntivo, fibroblasto (identificados como células fusiformes ou estreladas, núcleo ovóide ou alongado), células inflamatórias e de outras estruturas (NDA) foi feita com auxílio de um programa analisador de imagens Fiji ImageJ (National Institutes of Health, USA) por um examinador treinado e cego para os grupos. Foram analisados 3 cortes por defeito, que representaram no sentido vestibulo/lingual a porção vestibular, média e lingual, a intervalos de 12 cortes. A quantificação foi

feita com auxílio de uma grade de 75x75 pixels com 252 pontos de intersecção posicionadas em cortes.

6 Análise dos Resultados

Os dados obtidos nas análises das imagens do microtomógrafo e da estereometria foram numéricos e devido a isso foram submetidos a análise da distribuição dos dados pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Como os dados se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central, foi aplicado o teste paramétrico de one-way Anova complementado pelo teste de Tukey para comparação dos dados de BV/TV entre os grupos. O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para execução da análise estatística. Todos os testes foram aplicados ao nível de significância de 5%.

APÊNDICE B

Estudo 2 – A influência de medicamentos antirreabsortivos na progressão da doença periodontal

O modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (processo nº 16/2018), dentro dos regulamentos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

1 Distribuição dos animais e grupos

Artigo 2 - Influência do alendronato e ranelato de estrôncio na progressão da doença periodontal induzida em ratos.

Foram utilizados 21 ratos *Rattus Norvegicus*, variação *albinus*, *Holtzman*, machos, adultos, de aproximadamente 10 semanas de idade, com massa corporal entre 190-210 gramas, mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP), alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, luz e temperatura controladas, sendo que suas gaiolas foram identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e período.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos com 7 animais em cada grupo (n=14 ligaduras/grupo). Os grupos serão divididos em: Grupo controle (CTR): Os animais foram submetidos a administração diária de soro fisiológico por injeção subcutânea durante 60 dias. Após 45 dias de início da administração de soro, foi induzida a doença periodontal com a inserção das ligaduras nos dois segundos molares superiores. Após 15 dias os animais foram eutanaziados. Grupo bisfosfonato (ALD): Os animais foram submetidos a administração diária de bisfosfonato (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia (Conte Neto et al, 2013) durante 60 dias. Após 45 dias de início da administração do medicamento, foi induzida a doença periodontal com a inserção das ligaduras nos dois segundos molares superiores. Após 15 dias os animais foram eutanaziados.

Grupo ranelato de estrôncio (STR): Os animais foram submetidos a administração diária de Ranelato de Estrôncio (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil) aplicado 625 mg/kg/dia (Lavet et al, 2017) por gavagem durante 60 dias. Após 45 dias de início da

administração do medicamento, foi induzida a doença periodontal com a inserção das ligaduras nos dois segundos molares superiores. Após 15 dias os animais foram eutanaziados

Artigo 3 e 4 – A influência sistêmica do ranelato de estrôncio e alendronato na modulação do hospedeiro e no tratamento adjunto da doença periodontal induzida

Neste estudo foram utilizados 126 ratos (*Rattus Norvegicus*), variação *albinus*, *Holtzman*, adultos, com peso variando entre 180-220 gramas, provenientes do Biotério do Campus de Araraquara – UNESP. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) - UNESP, em caixas plásticas coletivas com 4 animais cada, e tratados com ração e água ad libitum antes e durante todo o período experimental, mantidos em ambiente com luz e temperatura controladas.

Esses animais foram divididos em 5 grupos com 2 sub-grupos cada (7 animais em cada sub-grupo; n=14 ligaduras/sub-grupo). Os grupos e sub-grupos foram divididos em:

Controle (CTR): No momento de indução da doença periodontal com ligaduras nos dois segundos molares superiores os animais foram submetidos a administração diária de soro fisiológico por injeção subcutânea até o momento da eutanásia. Após 15 dias da indução da doença periodontal, as ligaduras foram removidas. Neste momento um grupo de animais recebeu tratamento com raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais (mini Gracey 5-6, HuFriedy, USA) (**grupo CTR - R**) e outro grupo (**grupo C**) não receberá nenhum tratamento.

Grupo bisfosfonato (ALD): No momento de indução da doença periodontal com ligaduras nos dois segundos molares superiores os animais foram submetidos a administração diária de bisfosfonato (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia (Conte Neto et al, 2013) até o momento da eutanásia. Após 15 dias da indução da doença periodontal, as ligaduras foram removidas. Neste momento um grupo de animais recebeu raspagem e

alisamento radicular com instrumentos manuais (mini Gracey 5-6, HuFriedy, USA) (**grupo ALD-R**) e outro grupo (**grupo ALD**) não recebeu nenhum tratamento.

Grupo ranelato de estrôncio (STR): No momento de indução da doença periodontal com ligaduras nos dois segundos molares superiores os animais foram submetidos a administração diária de Ranelato de Estrôncio (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil) aplicado 625 mg/kg/dia (Lavet et al, 2017) por gavagem até o momento da eutanásia. Após 15 dias da indução da doença periodontal, as ligaduras foram removidas. Neste momento um grupo de animais recebeu raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais (mini Gracey 5-6, HuFriedy, USA) (**grupo STR-R**) e outro grupo (**grupo STR**) não recebeu nenhum tratamento.

Após os períodos de 7, 15 e 30 dias os animais foram eutanasiados.

A MESMA METODOLOGIA FOI UTILIZADA PARA O ARTIGO 2, 3 e 4

2 Indução da doença periodontal

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 80 mg/kg de massa corporal (Cloridrato de Quetamina) e 7 mg/kg massa corporal (Cloridrato de Xilazina). Posteriormente, os ratos foram colocados em posição supina na mesa operatória. Cada animal, para ganhar livre acesso aos dentes da região posterior da maxila, a boca foi retraída por um retrator para afastar queixo e língua, facilitando a abertura bucal. As ligaduras (fios de algodão, no 24) foram inseridas através de sonda e pinça específicas na região subgingival em volta dos segundos molares superiores, para que seja induzida a doença periodontal através do acúmulo de placa bacteriana. Após um período de 15 dias, as ligaduras foram removidas e os tratamentos aplicados em cada grupo.

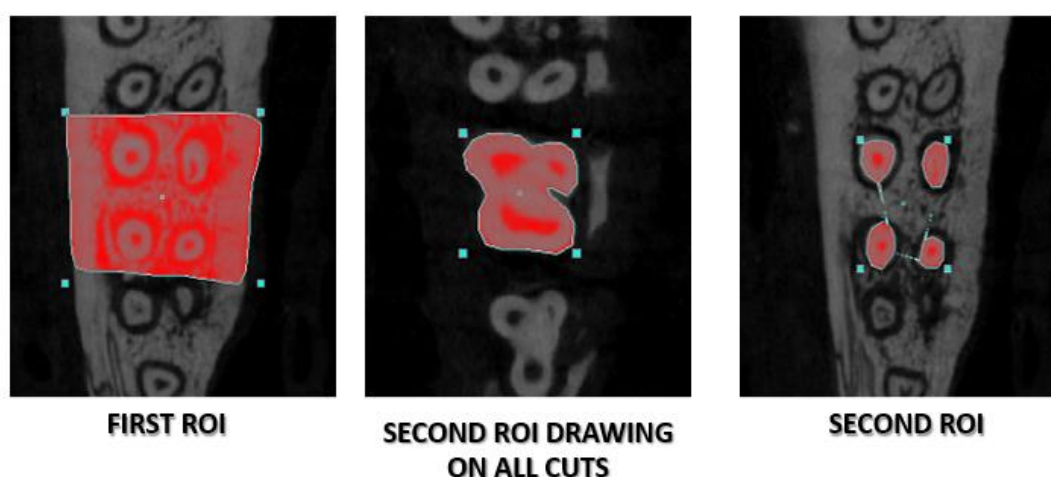
3 Obtenção das peças cirúrgicas

Após os períodos correspondentes os animais foram eutanaziados com sobredose anestésica. As hemi-maxilas foram removidas, e fixadas em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 48 horas. Após este período as peças foram lavadas em água corrente e colocadas em álcool 70%.

4 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Após o período de fixação em paraformaldeído, as hemi-maxilas foram armazenadas em álcool 70%, e submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de Microtomografia digital computadorizada, que avalia a porcentagem de volume ósseo presente na região do segundo molar superior. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 18 μ m (50Kv e 500 μ), filtro de Al 0.5mm; tamanho do voxel: 17,48 μ m; voltagem de 50KV e corrente elétrica de 500 μ A. As imagens obtidas pela projeção dos raios X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas pelo software NRecon. Essas imagens foram rotacionadas e reposicionadas em uma orientação padrão, com o auxílio do software DataViewer e salvas no plano coronal. Em seguida, o software CTAnalyser – CTAn, foi utilizado para a delimitação área de interesse (ROI- *Region Of Interest*)^{66,67}.

Figura 3 – Análise Microtomográfica para avaliação de volume ósseo presente na região do segundo molar superior. Após o escaneamento das peças pelo microtomógrafo foi obtido o volume ósseo por meio de um programa de computador CTAN, onde primeiramente delimitou-se uma primeira área de interesse ROI (Region of interest), que foi localizado no no segundo molar no sentido corono/apical da região do teto de furca até 1.000 micrometros no sentido apical até suas limitações proximais com os dentes vizinhos, do qual, foi extraído o valor de “tecido ósseo” dado pela leitura do segundo ROI, que possui a mesma delimitação anatômica, mas circundando apenas as raízes do segundo molar.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

5 Análise histológica e histométrica

Após o período de fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 24h e submersas em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) para descalcificação. Posteriormente, as peças foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

Foram realizados cortes seriados de toda a peça. Os cortes foram realizados da face vestibular para a palatina, ao longo do eixo do dente com 5 µm de espessura. Foram obtidas para cada bloco lâminas comuns e silanizadas. As lâminas comuns foram coradas pela técnica de hematoxilinaeosina (HE).

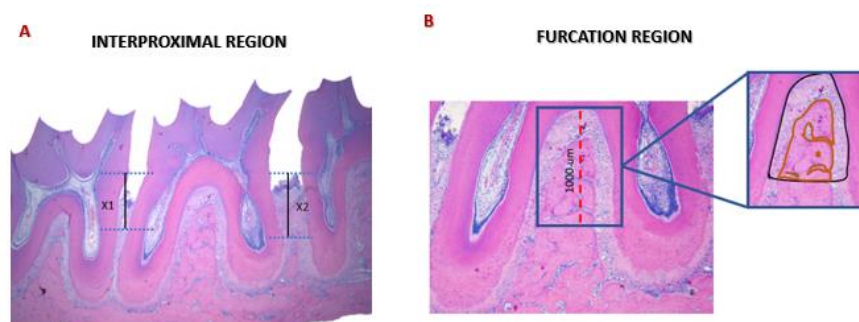
6 Análise Histológica

As lâminas foram posicionadas no microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com objetiva para aumento de 4.0/10 vezes, através do qual as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC- 1107A/107AP (Sony Eletronics Inc, Japão). Na análise histológica foram observadas as reações inflamatórias do tecido conjuntivo em cada grupo experimental, processos de reabsorção óssea e neoformação tecidual. As avaliações foram realizadas por um examinador treinado, calibrado e cego para os grupos experimentais.

7 Análise Histométrica

Utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany) com magnificação de 40X, as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo DXC- 1107A/107AP (Sony Eletronics Inc, Japão). Para realização da histometria, um examinador cego e calibrado selecionará 3 lâminas de cada grupo, equidistantes 50 µm entre si. As mensurações foram feitas utilizando o software de imagens ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA). Foi avaliada a quantidade de tecido ósseo na região de furca e proximais.

Figura 4 – Análise Histométrica para mensuração linear da quantidade óssea interproximal e região de furca através do programa IMAGE J. Para análise interproximal, mediu-se através de fotografias com um aumento de 40x a distância entre a crista óssea e a junção cimento-esmalte (A). Para avaliação de furca, através de uma imagem da região de furca com um aumento de 40x, foi avaliado a distância do teto da furca para o ápice da raiz 1000 μ m e delimitados uma área na região, e a partir dessa nova imagem foi obtido nas áreas de tecido ósseo (B).



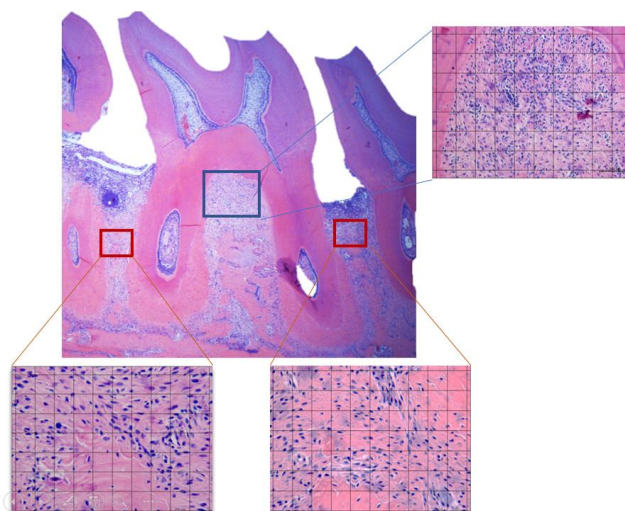
Fonte: Arquivo pessoal da autora.

8 Análise Estereométrica

Foi realizada por um examinador cego e treinado, com o auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS (Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) com magnitude de 40X. Utilizando o software FIJI - ImageJ - Launcher versão 1.48b (National Institutes of Health, USA), uma grade foi confeccionada com 30.000 μ m² de área, apresentando 50 pontos coincidentes das intersecções das linhas horizontais e verticais. Esta grade foi posicionada sobre as áreas: A- Regiões proximais mesial e distal do segundo molar e B- Furca. As células presentes em sobre cada intersecção foi definida. Em seguida, foi executada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por período experimental, de acordo com Odze et al.⁷¹. Dessa forma, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: osso, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. (Macedo, 2018).

Figura 5 – Análise Estereométrica para mensurar a proporção dos seguintes componentes celulares: células inflamatórias, matriz tecido conjuntivo, fibroblastos, vasos sanguíneos. Para isso utilizou-se imagens tiradas com um aumento de 40X em 3 regiões: furca, supracrestal

mesial e supracrestal distal. Através do software Image J foi confeccionada uma grade de 30.000 μm^2 de área, apresentando 50 pontos coincidentes das intersecções das linhas horizontais e verticais. As células presentes sobre cada intersecção foi definida e realizada uma análise percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por período experimental.



Fonte: Arquivo pessoal da autora.

9 Análise estatística

Os dados gerados pelas análises histométricas, estereométrica, imunológica e microtomográficas foram numéricos. Dessa forma foram submetidos ao teste de Normalidade de Shapiro-Wilk para avaliar se os dados respeitaram a distribuição de acordo com o teorema da distribuição central. Para dados normais, os testes paramétricos de Anova complementado pelo teste de Tukey foram utilizados para a análise inferencial dos dados. Dados que não foram considerados normais, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn foram utilizados para a análise dos dados. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

ANEXO A – COMITE DE ÉTICA



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"INFLUÊNCIA DO ESTRÔNCIO NÃO RADIOATIVO E DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE OSSEONECROSE INDUZIDA POR BISFOSFONATOS"**, protocolo nº 27/2015, sob a responsabilidade do(s) Prof(a), Dr(a), **Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (excluído o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.095, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 28/02/2015.

Vigência do Projeto	Junho/2018
Espécie/Instagem	Rato - Holtzman
Nº de animais	80
Peso/Idade	180-210g – 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara



Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

ANEXO B – COMITE DE ÉTICA

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada **"AVALIAÇÃO DE MEDICAMENTOS QUE INTERFEREM NA MODULAÇÃO ÓSSEA ASSOCIADO OU NÃO AO BISFOSFONATO. ESTUDO NA GENGIVITE EXPERIMENTAL EM RATOS"**, registrada com o nº 16/2018, sob a responsabilidade do(a) Prof(a), Dr(a), **Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 25/06/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Março/2023
Espécie/linhagem/raça	Rato – Ratas Norueguesas, albinas, Holtzman
Nº de animais	616
Peso/Idade	180-220g – 8 semanas
Sexo	Misto
Origem	Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP


Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

**Não autorizo a publicação deste trabalho até
01/04/2024.**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 01, abril de 2022

Fernanda Castanheira Gonçalves