



**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**Efeito da aplicação local de ranelato de estrôncio sobre a  
neoformação óssea em defeitos ósseos críticos**

**Bárbara Furtado Masalskas**

Orientador: Prof. Dr. Walter Martins Júnior

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa M. S. de Castro Raucci

Ribeirão Preto

2017

Bárbara Furtado Masalskas

**Efeito da aplicação local de ranelato de estrôncio sobre a  
neoformação óssea em defeitos ósseos críticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Implantodontia.

**Orientador: Prof. Dr. Walter Martins Júnior**

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa M. S. de Castro Raucci

Ribeirão Preto

2017

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto –

Masalskas, Bárbara Furtado, 1991-

M394e Efeito da aplicação local de ranelato de estrôncio na  
neoformação de defeitos ósseos críticos/ Bárbara Furtado Masalskas. -  
Ribeirão Preto, 2017.  
58 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Walter Martins Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Odontologia, ênfase em Implantodontia. Ribeirão Preto,  
2016.

1. . Ranelato de estrôncio. 2. Esponja de colágeno.

CDD 617.6342



Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Pesquisas em Odontologia, Patologia Bucal e Biotério da Universidade de Ribeirão Preto, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – PROSUP.



## ***Dedicatória***

A **Deus**, que nos criou com seu amor incondicional, mostra-nos sempre o melhor caminho e nos proporciona inúmeras oportunidades de sermos a cada dia melhores e gratos pela nossa vida.

Aos meus queridos pais, **Izilda Furtado Masalskas e João Masalskas Filho**. Mãe, obrigada por ser um espelho feminino e mostrar o quanto podemos ir longe quando existem garra e determinação, obrigada pela paciência e apoio em todos os momentos e por dizer esta frase sempre: "Faça a diferença sempre!". Pai, meu eterno herói, obrigada por cada ensinamento, por me deixar errar inúmeras vezes e ter ensinado que a conquista é um dos valores mais bonitos do ser humano, hoje eu sei o quanto isso fez diferença. Sou eternamente grata pelo amor de vocês e nunca tenham dúvida o quanto é recíproco.

Às minhas irmãs, **Michelle Furtado Masalskas, Janaína Furtado Masalskas e Alaíne Furtado Masalskas**. Meninas, obrigada por guiarem o meu trajeto, vocês prepararam o campo, cultivaram as flores e lembraram de deixar um espaço para que eu plantasse as minhas flores, assim como nossos pais nos ensinaram. E, como em todo jardim em que nascem outras espécies de flores que o deixam ainda mais radiante, veio a "nossa" **Lara**, obrigada por carregar tanto amor e mostrar-me o quanto a vida é preciosa, princesa. Amo todas vocês!

Ao meu namorado, **Caio de Paula Martins**, pelo incentivo para que eu alcançasse meus objetivos, pela compreensão em minhas ausências, pelo carinho, companheirismo, e por acreditar que a admiração um pelo o outro é um dos valores mais importantes dentro de um relacionamento. Obrigada por sonhar junto comigo, amo você.

À **minha família**, obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos, sempre com dedicação. Obrigada por acreditarem em mim e fazerem parte da minha formação pessoal.

Aos(as) meus(as) amigos(as): **Bianca Oliveira, Camila Cantarim Quadros, Felipe Marzola, Francine Stefani Pimenta, Isadora Menossi e Marina Rocha Paschoal**, pelo incentivo, amizade, companheirismo e por me incentivarem em todas as decisões, amo todos (as) vocês.

Sem vocês eu não conseguiria realizar todos os meus sonhos, amo todos vocês!



***Agradecimento Especial***



Ao meu orientador, **Prof. Dr. Walter Martins Júnior**, por seu seletto e vasto conhecimento, dedicação, aprendizado e compreensão durante essa trajetória. Pude admirar um grande profissional por vários anos e ter a honra de recebê-lo como orientador. Obrigada por poder dividir esse sonho e conquista com o senhor, continuo tendo o mesmo anseio em assistir suas aulas, assim como foi há 4 anos atrás.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Larissa M. S. de Castro Raucci**, com seu toque sutil, pôde transformar uma simples ideia em algo prazeroso demais. Foi muito gratificante partilhar dos seus conhecimentos, dedicação e detalhes que só uma grande profissional consegue localizar. Obrigada por ser impecável sempre, os detalhes fizeram muita diferença, assim como sempre dizíamos: "*três cabeças pensam muito melhor que duas*".



## ***Agradecimentos***

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da sua Magnífica Reitora **Profa. Elmara Lucia de Oliveira Bonini**, personalidade constante e pioneira na educação nacional.

À **Profa. Dra. Neide Aparecida de Souza Lehfelb**, pela dedicação na Coordenação da Pós-Graduação Stricto Sensu desta Instituição.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara T. C. Silva Sousa**, obrigada pela coordenação, atenção e apoio.

Aos Professores da Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, que me trilharam um caminho de interesse pela docência, sou eternamente grata ao ensinamento de vocês.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto: **Profa. Dra. Andrea Marcia Marcaccini, Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda, Prof. Ms. Celso Bernardo de Souza Filho, Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias, Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Érica Alves Gomes, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior, Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni, Prof. Dr. Paulo Esteves Pinto Faria, Prof. Dr. Silvio Rocha Correa da Silva, Profa. Dra. Vivian Colucci e Prof. Dr. Walter Raucci Neto**, pela dedicação, atenção, pelos conhecimentos e colaboração na minha formação.

Ao **Prof. Dr. João Felipe Bruniera**, pelo auxílio na realização das microtomografias deste estudo, sua disponibilidade e ensinamentos foram essenciais para execução deste trabalho.

À **Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni**, com seu trabalho impecável e conhecimento amplo pôde proporcionar melhorias à análise microtomográfica. Obrigada pela disponibilidade, ensinamentos e por ser receptiva o tempo todo, tenho uma admiração enorme pelo seu perfil pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Paulo Esteves Pinto Faria**, por partilhar seu conhecimento, dedicação, profissionalismo e colaboração em minha trajetória profissional. Obrigada por dar-me a honra de aprender diariamente com seus conhecimentos e mostrar o quanto a Odontologia é encantadora.

Aos meus colegas de pós-graduação **Natália Spadini de Faria, Luciana Martins Domingues de Macedo, Mariana Carvalho A. Amaral, Paula Guimarães e Silas Monteiro**, por todos os momentos passados, pelo incentivo em cada etapa do meu trabalho e companheirismo, proporcionando uma ótima convivência.

Aos meus colegas de pós-graduação, **Ana Flávia Simões Barbosa, Arthur Iozzi Vieta, Geraldo Monteiro Ribeiro, Thaís Fantinato Trindade**, por me ajudarem na realização deste trabalho, formando uma Equipe Ímpar, sem vocês nada disso seria conquistado, muito obrigada.

Ao mestrando e amigo **Tarcísio Quaranta**, pela amizade ímpar, companheirismo e parceria, tornou a caminhada mais leve e divertida, tornou-se um irmão para a vida toda, amo você meu amigo.

À mestrande e amiga **Cecília Proto Guimarães**, por sua amizade, dedicação e ajuda na realização deste trabalho, seu perfeccionismo e companheirismo foram essenciais nesta conquista, amo você.

Ao mestrando e amigo **Silas Monteiro**, pela companheirismo e convivência neste período, mesmo com a distância que nossa amizade permaneça por incontáveis anos.

Aos meus queridos amigos e companheiros de trabalho, **Bruna Tourn Lamas e Rafael Lamas**, pelo apoio, compreensão, ensinamentos, troca de experiências e parceria durante esses anos. Muito obrigada por depositarem confiança em meu trabalho e fazerem do nosso ambiente um lar e de nossa Equipe uma família.

Aos funcionários do Biotério da Universidade de Ribeirão Preto, **Carla Kitanishi Antonietto e Carlos Adriano da Cruz Alves**, que se colocaram sempre à disposição para execução de cada etapa deste trabalho, dando ênfase à impecável organização, tornando assim um ambiente prazeroso. Obrigada pelo carinho e pela convivência diária, vou sentir falta de vocês.

As funcionárias do Laboratório de Patologia da Universidade de Ribeirão Preto-SP, **Marilena Heredia e Nádia Fonseca Silvestre** pela colaboração e dedicação neste trabalho, obrigada pela disponibilidade, atenção e carinho ao longo deste período, vocês são impecáveis.

À **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, pelos esclarecimentos e orientação na área Histológica, obrigada pelos conselhos e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira e Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa**, por disponibilizarem o Microscópio de Luz para as análises histológicas.

À **Flávia de Araújo Prates Rodrigues**, pela disponibilidade em tirar todas as fotos deste trabalho, com toda delicadeza e detalhes que fizeram toda diferença.

À aluna de Iniciação Científica, **Maria Júlia Rossin**, pela ajuda na execução deste trabalho, pelo carinho e prontidão com a pesquisa, seu aprendizado foi de grande relevância como treinamento de minha docência.

À aluna do Programa de Intercâmbio, **Asia Tokajuc** pela ajuda na realização deste trabalho, sendo solícita e dedicada ao acompanhamento do mesmo.

Às secretárias da pós-graduação, **Joana Néia Vieira, Patrícia Machado, Marcela Euzébio Berti**, pela atenção e profissionalismo nestes anos.

Aos **funcionários da Universidade de Ribeirão Preto**, pela atenção e carinho que tiveram por mim durante esses anos de convívio, desde a graduação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“ Faça, porque se você não fizer, em breve, o resto será silêncio.”

***Leandro Karnal***





## ***Resumo***

O objetivo do presente estudo foi avaliar, in vivo, o efeito da aplicação local de ranelato de estrôncio, associado à esponja de colágeno como carreador, sobre a neoformação óssea em defeitos ósseos críticos. Para isso, defeitos de 5 mm de diâmetro foram criados na calvária de 21 ratos Wistar (200-250 g), divididos em 3 grupos (n=7): 1) Esponja de colágeno (C); 2) Esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 5 mM  $\text{Sr}^{2+}$  (C5RE) e 3) Esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$  (C50RE). Nos períodos de 2, 4 e 6 semanas, os ratos foram escaneados no microtomógrafo 1176 (90Kw, 278mA, com resolução isotrópica de 18 $\mu\text{m}$ ). As imagens foram reconstruídas e analisados os parâmetros morfométricos: volume ósseo (VO), superfície óssea (SO), espessura trabecular (ET), número de trabéculas (NT) e separação trabecular (ST) e análise qualitativa da neoformação óssea dos modelos tridimensionais das calvárias. Ao final de 6 semanas, foi realizada a eutanásia dos animais e a análise histológica da região dos defeitos, após coloração com hematoxilina e eosina (HE). Os dados das comparações intragrupos, entre os períodos experimentais, foram submetidos ao teste de Friedman, enquanto que as comparações entre grupos foram feitas com o teste Kruskal-Wallis, ambos seguidos de pós-teste, quando apropriado ( $\alpha = 5\%$ ). Na comparação intragrupos, de modo geral, observou-se aumento de VO, SO, ET e NT em função do tempo em todos os grupos, contudo, apenas C50RE apresentou, ao final de 6 semanas, redução da ST ( $p < 0,05$ ). Em 2 e 4 semanas, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos para nenhum dos parâmetros morfométricos avaliados ( $p > 0,05$ ); contudo, ao final de 6 semanas, C50RE mostrou aumento significativo dos valores de VO, SO e ET em relação a C e C5RE ( $p < 0,05$ ). Neste período, a análise histológica revelou a presença de tecido conjuntivo na central região do defeito em C e C5RE e seu preenchimento por tecido ósseo imaturo em C50RE. Com base nos resultados, conclui-se que a aplicação local do fármaco ranelato de estrôncio a 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$ , associado à esponja de colágeno como carreador, favorece e acelera a neoformação óssea em defeitos ósseos críticos.

**Palavras-chave:** Ranelato de estrôncio. Esponja de colágeno. Neoformação óssea.



## ***Summary***

The aim of the present study was to evaluate in vivo the effect of local delivery of strontium ranelate, using collagen sponge as carrier, on bone neoformation in critical bone defects. For this, defects of 5 mm diameter were created in the calvaria of 21 Wistar rats, divided into 3 groups (n = 7): 1) Collagen sponge (C); 2) Collagen sponge associated with 5 mM Sr<sup>2+</sup> strontium ranelate (C5RE) and 3) Collagen sponge associated with 50 mM Sr<sup>2+</sup> strontium ranelate (C50RE). After 2, 4 and 6 weeks, the rats were scanned in the micrograph 1176 (90Kw, 278mA, with 18µm isotropic resolution). The images were reconstructed and the following morphometric parameters were evaluated: bone volume (BO), bone surface (BS), trabecular thickness (TT), trabecular number (TN) and trabecular separation (TS). At the end of 6 weeks, histological analysis of the defect region was performed after staining with hematoxylin and eosin (HE). Data from the intragroup comparisons, between the experimental times, were done by the Friedman test, while the comparisons between experimental groups were submitted to the Kruskal-Wallis test, both followed by post-test, when appropriate ( $\alpha = 5\%$ ). In the intragroup comparison, in general, it was observed an increase in BO, BS, TT and TN as a function of time in all groups, however, only C50RE showed a reduction of TS at the end of 6 weeks ( $p < 0,05$ ). At 2 and 4 weeks, no significant differences were observed between groups for any of the morphometric parameters evaluated ( $p > 0.05$ ); however, at the end of 6 weeks, C50RE showed a significant increase in BO, BS and TT values compared to C and C5RE ( $p < 0.05$ ). Histological analysis revealed the presence of connective tissue in the central region of the defect in C and C5RE and its filling by immature bone tissue in C50RE. Based on the results, it is concluded that the local delivery of 50 mM Sr<sup>2+</sup> strontium ranelate, using collagen sponge as carrier, enhances and accelerate bone regeneration in critical bone defects.

**Keywords:** Strontium ranelate. Collagen sponge. Bone regeneration.



## ***Sumário***

Resumo

*Summary*

Introdução .....	01
Proposição.....	05
Material e Métodos.....	07
Resultados.....	19
Discussão.....	31
Conclusões.....	41
Referências Bibliográficas.....	43

Anexos



## ***Introdução***

Avanços na Odontologia moderna têm possibilitado o desenvolvimento de procedimentos terapêuticos que proporcionam melhor qualidade de vida ao paciente. Nesse contexto, a regeneração de defeitos ósseos tornou-se procedimento realizado com frequência em cirurgias odontológicas de capacidade regenerativas.

O tecido ósseo possui capacidade intrínseca de regenerar-se, como parte do processo de reparação em resposta à injúria (BATES; RAMACHANDRAN, 2007;

EINHORN, 1998). A regeneração óssea compreende uma séria bem orquestrada de eventos biológicos de indução, condução óssea, envolvendo vários tipos celulares e vias de sinalização no esforço para otimizar a reparação tecidual e restaurar suas funções (EINHORN, 1998; CHO; GERSTENFELD; EINHORN, 2002). Diferentemente de outros tecidos, a maioria das lesões ósseas são reparadas sem formação de tecido cicatricial e o osso é regenerado com a restauração de suas propriedades pré-existentes, sendo o osso recém-formado, eventualmente, indistinguível do osso adjacente não lesionado. Entretanto, há outras condições na cirurgia oral e maxilofacial na qual a regeneração óssea é necessária em maior extensão, como na reconstrução de grandes defeitos ósseos criados por trauma, infecção, ressecção tumoral e anormalidades esqueléticas, ou casos em que o processo regenerativo está comprometido, incluindo necrose avascular e osteoporose (DIMITRIOU, 2011). Além disso, a remodelação óssea do processo alveolar após a perda dos elementos dentais pode resultar em redução significativa do volume ósseo dos maxilares vertical e horizontal, condição que limita ou mesmo contraindica a instalação de implantes dentários e compromete a previsibilidade e efetividade da reabilitação protética final (JOHN; WHEIZ, 2004).

Assim, naquelas situações em que o processo normal de regeneração óssea está prejudicado ou é insuficiente, vários métodos de tratamento estão disponíveis e podem ser utilizados sozinhos ou em combinação para a resolução de situações clínicas complexas, que dificultam o tratamento ou representam um desafio médico e socioeconômico. As abordagens comumente utilizadas na prática clínica para promover a regeneração óssea incluem distração osteogênica (ARONSON, 1997; GREEN et al.,



1992), e a utilização de diferentes métodos de enxerto ósseo, tais como enxertos: ósseo autólogo, alógeno, xenógeno, além dos biomateriais sintéticos (HELM; DAYOUB; JANE-JÚNIOR, 2001; PILITSIS; LUCAS; RENGACHARY, 2002).

A fim de aprimorar a eficiência da regeneração óssea, inúmeras estratégias têm sido propostas e, entre elas, a associação entre biomateriais e moléculas capazes de estimular a adesão, proliferação e/ou diferenciação osteoblástica, para garantir a regeneração tecidual rápida, controlada e previsível (HING, 2004; IKADA, 2006; NAVARRO et al., 2010). Nestes casos, a escolha do material carreador é fator importante para que a liberação seja alcançada no momento e local apropriados para induzir de forma eficaz a regeneração óssea (KIM et al., 2009).

Entre estas moléculas utilizadas, os membros da família das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's), particularmente a BMP-2 e 7, tem recebido atenção por sua capacidade de estimular a diferenciação osteoblástica e a formação óssea (WOZNEY; ROSEN, 1998; SUMNER et al., 2004; HUNZIKER et al., 2012), embora os altos custos relacionados à sua purificação ainda limitem sua utilização clínica. Outra alternativa é a utilização de fármacos que atuem sobre osteogênese, na modulação da inflamação, angiogênese e vasculogênese (ARBOLEYA; CASTANEDA, 2013; LIND; BUNGER, 2001; DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

O ranelato de estrôncio (RE), medicamento utilizado para o tratamento da osteoporose, tem sido alvo de diversos estudos devido à sua notável capacidade de promover a formação óssea, tanto por estimular a função de osteoblastos, quanto por inibir a reabsorção óssea por osteoclastos (AMMANN, 2005; MARIE, 2006; NEUPREZ et

al., 2008; MARIE, 2011; SAIDAK; MARIE, 2012). Este efeito dual do RE foi demonstrado em estudos *in vitro*, nos quais o fármaco foi capaz de estimular a proliferação (CANALIS et al., 1996; CHATTOPADHYAY et al., 2007; CAVERZASIO, 2008), sobrevivência (FROMIGUÉ et al., 2009; BRENNAN et al., 2009), diferenciação (BARBARA et al., 2004; ZHU et al., 2007; BONNELYE et al., 2008) e formação de matriz mineralizada em culturas de osteoblastos (CHOUDHARY et al., 2007; BONNELYE et al., 2008; QUERIDO; FARINA, 2013), bem como induziu osteoclastos à apoptose (HURTEL-LEMAIRE et al., 2009), além de promover redução de sua diferenciação e atividade (BARON; TSOUDEROS, 2002; TAKAHASHI et al., 2003; BONNELYE et al., 2008; CAUDRILLIER et al., 2010; QUERIDO, 2016). Demonstrou-se *in vivo*, que o RE favorece o reparo de defeitos ósseos (ZACCHETTI et al., 2014) e a fixação de implantes ortopédicos em ratos que faziam uso sistêmico da droga (MAÏMOUN et al., 2010; LI et al., 2012).

Neste sentido, o modo de ação dual sobre células osteoblásticas e osteoclásticas é uma característica que torna o RE promissor para outras aplicações. Assim, justifica-se a realização de estudos que avaliem o efeito da aplicação local do RE como adjuvante para a neoformação óssea.



## ***Proposição***

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vivo*, o efeito da aplicação local do fármaco ranelato de estrôncio a 5 mM Sr<sup>2+</sup> ou 50 mM Sr<sup>2+</sup> carregado por esponja de colágeno na neoformação óssea de defeitos ósseos críticos, após períodos de 2, 4 e 6 semanas utilizando análise microtomográfica e histológica.

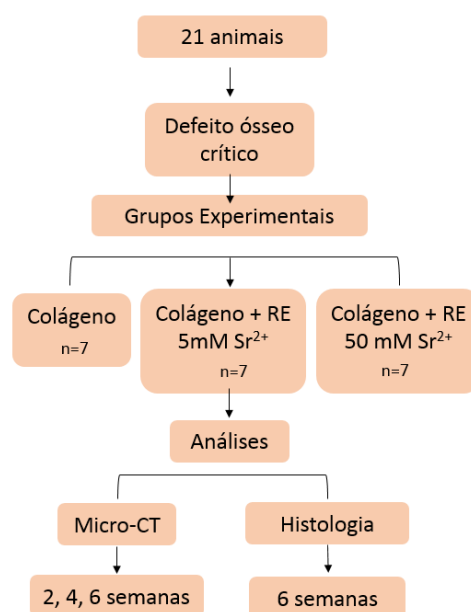


## ***Material e Métodos***

### **1 Delineamento experimental**

Todos os procedimentos com animais aqui descritos foram realizados após a aprovação e de acordo com as normas da *Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade de Ribeirão Preto, sob o registro nº 03/2016* (Anexos). Os fatores em estudo neste trabalho foram: o tratamento de defeitos ósseos com aplicação local do fármaco RE associado a esponja de colágeno em três níveis (concentração de 5 mM  $\text{Sr}^{2+}$ , concentração de 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$  e controle, sem o fármaco), e o tempo experimental em três níveis (2, 4 ou 6 semanas). A amostra foi composta por 21 animais divididos em

3 grupos (n=7), de acordo com o tratamento aplicado. As variáveis de resposta quantitativa considerou os seguintes parâmetros morfométricos: volume ósseo, superfície óssea, espessura trabecular, número de trabéculas e separação trabecular, avaliados por micro-CT. A variável de resposta qualitativa foi a presença de tecido ósseo neoformado na região do defeito, avaliado por análise histológica e micro-CT.



**Figura 1.** Fluxograma do delineamento experimental.

## 2 Biomateriais utilizados

Para os experimentos propostos, foi utilizada esponja de colágeno Hemospon (Technew Comércio e Indústria Ltda., Rio de Janeiro, RJ) como material carreador e o fármaco ranelato de estrôncio (RE), disponível comercialmente em sachês (PROTOS 2g, Servier, Gidy, França). Para o recobrimento dos defeitos ósseos, foi utilizado membrana de colágeno Bio-Guide (Geistlich Pharmaceutical, Wolhusen, Suíça).

### **3 Grupos experimentais**

Foram utilizados 21 ratos machos Wistar, pesando entre 200-250 g após a aprovação da *Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade de Ribeirão Preto*, sob o registro nº **03/2016** (Anexos). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas separados por grupo contendo maravalha trocada diariamente, em sala climatizada (temperatura de 23°C), com luz controlada (12 h de luz/ 12 h de escuro), recebendo, *ad libitum*, água e ração sólida comercial balanceada. Os animais foram aleatoriamente separados em três grupos (n=7) e identificados pela cauda por cores distintas de acordo com o grupo (Figura 2A). Foram definidos os seguintes grupos experimentais:

- (1) C, no qual os defeitos foram preenchidos apenas com a esponja de colágeno e 25 µL de soro fisiológico;
- (2) C5RE, no qual os defeitos foram preenchidos com a esponja de colágeno e 25 µL de RE a 5 mM Sr<sup>2+</sup> em soro fisiológico;
- (3) C50RE, no qual os defeitos foram preenchidos com a esponja de colágeno e 25 µL de RE a 5 mM Sr<sup>2+</sup> em soro fisiológico.

### **4 Preparo das soluções de RE**

Previamente ao procedimento cirúrgico, foram preparadas as soluções de RE, de acordo com a concentração final desejada. Para a obtenção da solução de RE a 50 mM Sr<sup>2+</sup>, 758 mg de RE foram diluídos em 10 mL de soro fisiológico (POVOA et al., 2015). A

solução de RE a 5 mM  $\text{Sr}^{2+}$  foi obtida a partir da diluição da solução anterior (1:10) em soro fisiológico.

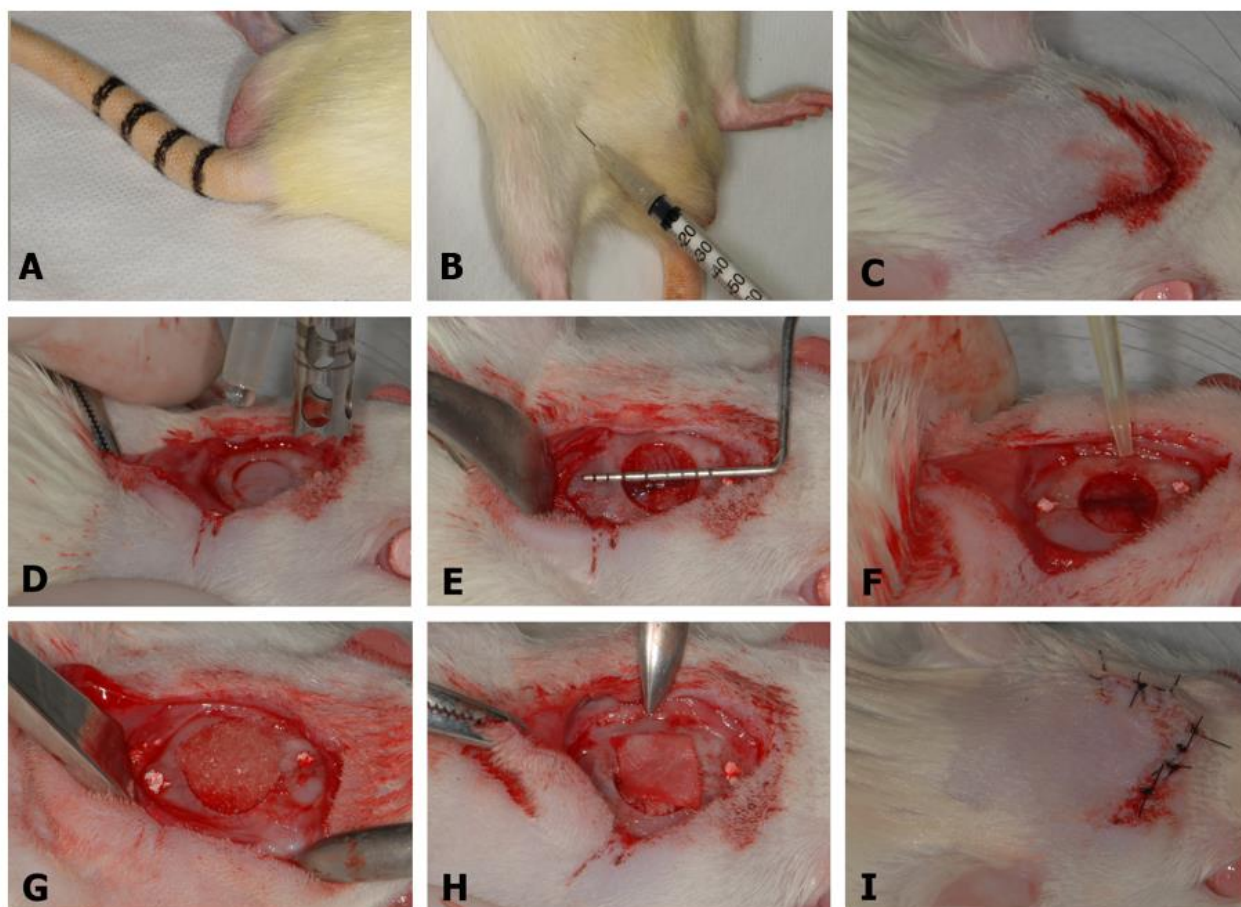
## **5 Procedimento cirúrgico**

Para o procedimento cirúrgico, executado por um único operador capacitado, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com solução de Ketamina (7mg/100g) de peso corporal (Agener União, Embu-Guaçu, SP) e Xilazina (0,6 mg/100 g) de peso corporal (Dopaser Calier, Juatuba, MG) (Figura 2B). Após a anestesia, os animais receberam tricotomia na região dorsal da cabeça, seguido da assepsia da pele com solução tópica de digluconato de clorexidina 2% (NEOBRAx-Ltda, Barretos, SP).

A incisão foi realizada utilizando lâmina de bisturi nº 15 (Solidor, Piraporinha, Diadema-SP), determinando um retalho de forma ovalada sob na região da sutura sagital de tal maneira que a margem da incisão não coincidissem com o defeito ósseo a ser realizado (Figura 2C). Após a sindesmotomia, foi produzido um defeito centralizado em relação a calota craniana, utilizando broca trefina (KG Sorensen, Cotia, SP) de 5 mm de diâmetro acionada por contra-ângulo de implante acoplado ao motor D Force 1000 (Dentflex, Ribeirão Preto, SP) em uma velocidade de 500rpm, sob profusa irrigação externa com soro fisiológico 0,9% (Figura 2D). Adicionalmente, foram realizadas duas marcações, nas mesmas condições descritas, utilizando broca esférica de 0,5 mm com 3 mm de distância da margem do defeito no sentido longitudinal que foram preenchidas com guta-percha (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Switzerland) utilizadas como referência nas análises microtomográfica e histológica (Figura 2E). Para realizar o tratamento

proposto em cada grupo experimental, os grupos que receberam o RE, o fármaco foi diluído e levado ao defeito ósseo com o auxílio de um micropipetador (10-100  $\mu$ L, Eppendorf, Alemanha) com metade da solução aplicada no defeito criado antes da inserção da esponja de colágeno (12,5  $\mu$ M) (Figura 2F) e a outra metade da solução (12,5  $\mu$ M) foi inserida após a inserção da esponja de colágeno (Figura 2G) com o objetivo de embeber o carreador. Em todos os grupos experimentais foi utilizado membrana de colágeno a fim de se criar um compartimento, isolando desta forma o defeito ósseo, não permitindo o contato do retalho com o processo cicatricial em curso (Figura 2H). A sutura foi realizada com mononylon 3.0 Ethilon (Johnson Coompany, Waseca, MN, EUA) e a ferida cirúrgica descontaminada com solução de PVPI (Figura 2I). Ao final do procedimento cirúrgico, os animais receberam dose única de analgésico Flunixinameglumina (10 mg/100 g) peso corporal (Banamine, Schering-Plough, Memphis, TN, EUA). Durante o período experimental não foram observadas intercorrências que resultou em condições pós cirúrgicas satisfatórias dos animais.





**Figura 2.** Imagens da sequência de procedimentos realizados durante a cirurgia. A) Identificação na cauda do animal. B) Aplicação de solução anestésica via intraperitoneal. C) Incisão em forma ovalada. D) Descolamento do retalho e obtenção dos defeitos ósseos com trefina 5 mm. E) Realização das marcações equidistantes a 3 mm do defeito, no sentido longitudinal, com guta-percha. F) Aplicação de soro fisiológico (grupo C) ou soro fisiológico com RE (grupos C5RE e C50RE). G) Posicionamento da esponja de colágeno no interior do defeito. H) Recobrimento do defeito com membrana de colágeno. I) Sutura após procedimento cirúrgico.

## 6 Análise morfométrica por micro-CT

### 6.1 Escaneamento ou aquisição das imagens

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram escaneados utilizando-se o microtomógrafo SkyScan modelo 1176 (Bruker micro-CT, Kontich, Bélgica) do Laboratório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto (Figura 3A), para que as imagens do tempo 0 fossem utilizadas como parâmetro comparativo para os escaneamentos futuros. Os animais foram posicionados na porção

central da cama de fibra de carbono no interior do microtomógrafo com a calvária paralela ao longo eixo do suporte e, em seguida, fixados com fita adesiva para evitar eventuais movimentos bruscos do animal durante a aquisição das imagens (Figura 3B). Isto realizado, deu-se início ao escaneamento nos parâmetros de 90 kV, 278 mA, resolução isotrópica de 18  $\mu\text{m}$ , 360° de rotação em torno do eixo vertical com passo de rotação de 0,7°, quantidade total de 2 quadros (*frames*), utilizando filtro de cobre de 0,1 mm de espessura. As projeções bidimensionais das imagens geradas foram arquivadas no formato *Tagged Image File* (TIFF).

Nos tempos experimentais de 2, 4 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina 7mg/100g de peso corporal (Agener União) e Xilazina 0,6 mg/100g de peso corporal (Dopa Calier) e novamente submetidos ao escaneamento microtomográfico seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente.



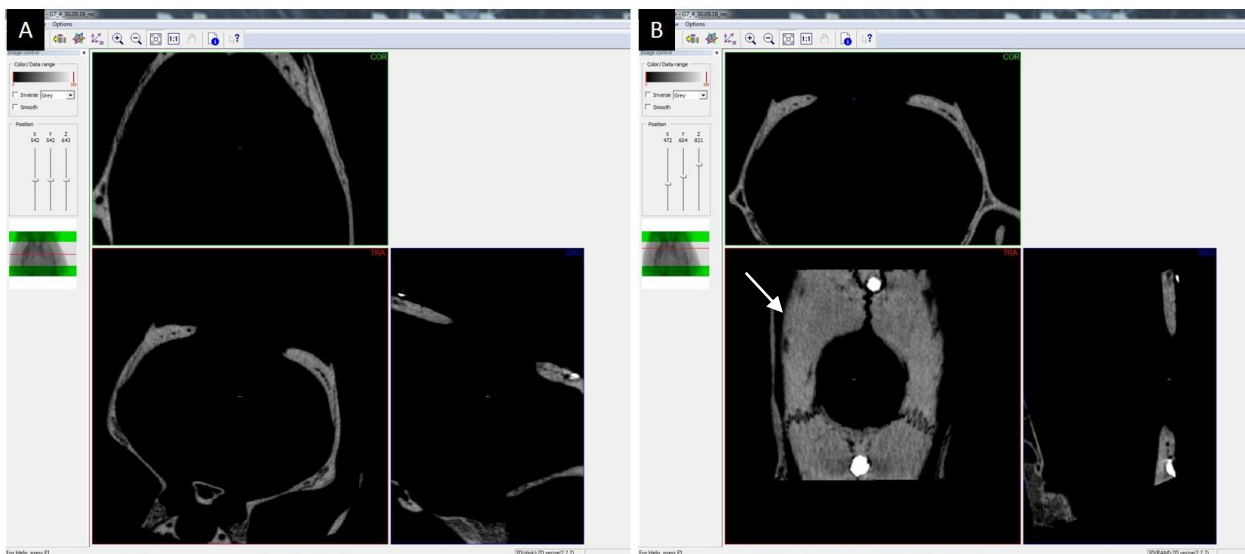
**Figura 3.** A) Microtomógrafo SkyScan modelo 1176 (SkyScan, Kontich, Bélgica). B) Animal posicionado na porção central da cama de fibra de carbono no interior do microtomógrafo com a calvária paralela ao longo eixo do suporte.

## **6.2 Reconstrução das imagens**

A etapa seguinte consistiu na reconstrução tridimensional das secções transversais a partir das imagens das projeções angulares adquiridas, por meio do algoritmo de reconstrução de feixe cônico de Feldkamp modificado, usando o programa NRecon v.1.6.6.0 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). Para este fim, foram aplicadas correções de redução de artefatos em forma de anel (*Ring Artifact*) no valor de 9 (escala de 0-20) de endurecimento de feixe (*Beam Hardening*) no percentual de 25% (escala de 0 a 100%), de suavização (*Smoothing*) no valor de 4 (escala de 0 a 10) e o histograma de contraste definido variou de 0,008 (valor mínimo) a 0,025 (valor máximo). As secções transversais reconstruídas foram salvas em formato *Joint Photographic Experts Group* (JPEG).

## **6.3 Alinhamento e sobreposição das imagens**

As imagens microtomográficas reconstruídas podem ser avaliadas em três planos dimensionais (x, y, z): sagital ou longitudinal, axial e coronal. Assim, no programa DataViewer v.1.5.0 (Bruker microCT, Kontich, Bélgica) no qual é possível a visualização simultânea dos três planos dimensionais, foi realizado correções de desalinhamentos que eventualmente ocorrem no processo de escaneamento (Figura 4) e, em seguida, foi salvo novo diretório das imagens alinhadas do plano axial da calvária. Este novo diretório possibilita melhor definição da região de interesse para análise nas etapas posteriores do presente estudo.



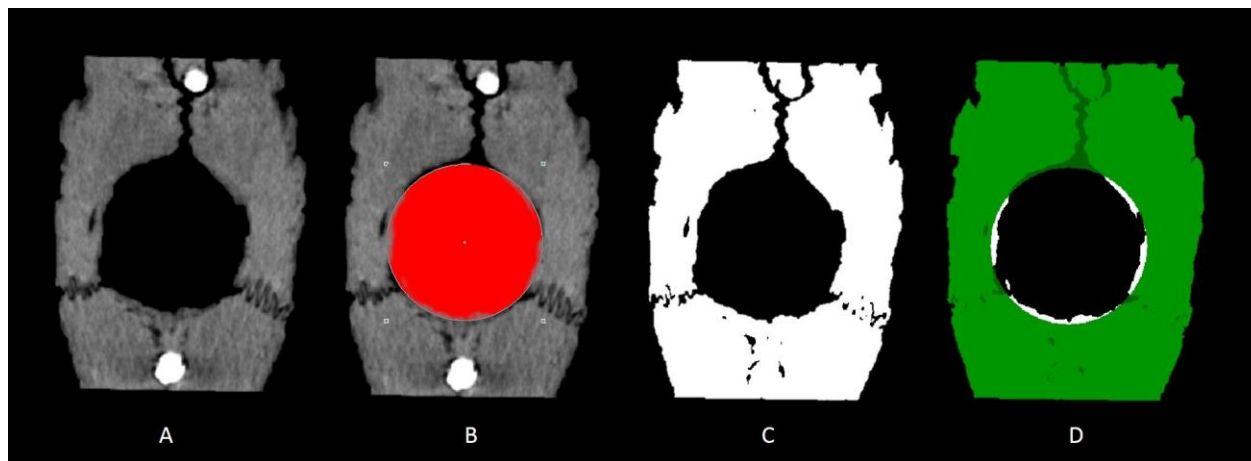
**Figura 4.** Programa DataViewer mostrando os três planos tomográficos: sagital ou longitudinal, axial e coronal (A) antes e (B) após o alinhamento das calotas. Seta indica as imagens alinhadas do plano axial da calota.

Antes da análise morfológica tridimensional quali-quantitativa das calvárias, as imagens de cada animal, obtidas no exame microtomográfico nos tempos experimentais de 2, 4 e 6 semanas, foram sobrepostas em relação àquelas obtidas no exame microtomográfico inicial (após o procedimento cirúrgico), por meio da ferramenta *co-registration* no programa DataViewer v.1.5.1.2 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). Por convenção, o conjunto de dados obtidos logo após o procedimento cirúrgico foi considerado fixo, fazendo-se o registro do conjunto de dados após cada tempo experimental (2, 4 e 6 semanas), em relação ao primeiro. Estes novos registros sobrepostos de dados, de cada animal, foram salvos em novo diretório.

#### 6.4 Análise das imagens

Depois de garantido a sobreposição dos espécimes, realizou-se o processamento e análise das imagens com auxílio do programa CTA n v.1.14.4.1+ (Bruker-microCT,

Kontich, Bélgica). Neste programa, as imagens do escaneamento inicial de cada animal foram utilizadas para definir o volume de interesse (VOI) da análise do presente estudo. Deste modo, o VOI foi delimitado por um cilindro de 6 mm de diâmetro e 2 mm de altura, correspondente ao local do defeito previamente criado. Este VOI foi salvo e utilizado na análise das imagens das calvárias de cada tempo experimental do mesmo animal. Assim, no diretório de imagens de cada tempo experimental foi inserido o mesmo VOI, e realizou-se a binarização do tecido ósseo neoformado no interior do VOI. A técnica de binarização ou *threshold iterativo* consiste na segmentação dos valores de tons de cinza da reconstrução tridimensional obtendo-se assim, uma imagem binária onde os pixels pretos representaram o fundo e as regiões de pixels brancos, o objeto da análise (Figura 5).



**Figura 5.** Representação esquemática do processo de binarização das imagens realizada no programa CTAn v.1.13.5.1+ (Bruker microCT, Kontich, Bélgica). A) Imagem da calvária em tons de cinza da reconstrução tridimensional. B) Volume de interesse inserido na imagem da calvária em tons de cinza da reconstrução tridimensional. C) Imagem da calvária binarizada sem o volume de interesse inserido. D) Volume de interesse binarizado representando o tecido ósseo neoformado na região do defeito.

A partir do VOI binarizado, por meio do *plug-in 3D analysis*, foi possível obter a análise quantitativa tridimensional dos seguintes parâmetros morfométricos: volume

ósseo (*Bone Volume*, mm<sup>3</sup>), superfície óssea (*Bone Surface*, área de tecido neoformado em mm<sup>2</sup>), número de trabéculas (*Trabecular Number*, 1/mm), espessura trabecular (*Trabecular Thickness*, mm) e separação trabecular (*Trabecular Separation*, mm) que são preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (ASBMR) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros quantitativos do tecido ósseo trabecular obtidos pelo CTAn (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica) preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (ASBMR)

Abreviação	Nomenclatura	Descrição do parâmetro	Unidade
BV	Bone Volume	Volume da ROI segmentado como osso	mm <sup>3</sup>
BS	Bone Surface	Superfície da ROI segmentada como osso	mm <sup>2</sup>
Tb.N	Trabecular Number	Média do número de trabéculas por unidade de comprimento	1/mm
Tb.Th	Trabecular Thickness	Média da espessura das trabéculas durante avaliação tridimensional	mm
Tb.Sp	Trabecular Separation	Média da distância entre as trabéculas durante avaliação tridimensional	mm

De forma complementar, os modelos tridimensionais das calvárias foram avaliados qualitativamente em relação à neoformação óssea por meio do programa CTAn v.1.13.5.1+ (Bruker microCT, Kontich, Bélgica).

## 7 Análise Estatística

Os dados quantitativos das comparações intragrupo, entre tempos experimentais, foram submetidos ao teste de Friedman, enquanto que as comparações entre grupos foram realizadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, ambos seguidos do pós-teste Student-Newman-Keuls, quando apropriado. O nível de significância adotado foi de 5%.

## **8 Análise histológica por microscopia de luz**

Ao final de 6 semanas, os animais foram eutanasiados por sobredose da solução anestésica e as calvárias contendo os defeitos ósseos, removidas por osteotomia com margem de aproximadamente 5 mm de distância de cada lado da área do defeito ósseo. Para isso, foram utilizados discos de diamante (KG Sorensen, Cotia, SP) montado em motor de baixa rotação, sob irrigação externa abundante com soro fisiológico 0,9%. As peças foram identificadas e fixadas em formol 10% tamponado com fosfato de sódio (pH 7,2) por 48 horas e, em seguida, descalcificadas por imersão em solução tamponada de ácido etileno-diaminotetracético (EDTA) a 10%, com trocas semanais durante 30 dias. Finalizado o processo de descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas, para então ser realizada a desidratação em série crescente de solução de álcool etílico (60, 70, 80, 90 e 100%), sob agitação constante. Em seguida, foi realizadas a diafanização em xilol, infiltração e inclusão em blocos de parafina, seguindo protocolo de rotina. Foram obtidos cortes com 6 µm de espessura a partir dos blocos de parafina contendo as calvárias. Os cortes seriados foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A análise histológica foi baseada em imagens representativas dos tratamentos avaliados, obtidas por microscopia de luz (Leica Aristoplan Microsystems- Leitz, Bensheim, Alemanha), captadas por câmera digital (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Suíça) acoplada ao microscópio de luz com as ampliações de 10 x, 25 x e 100 x e analisadas por examinador calibrado e com experiência.



## ***Resultados***

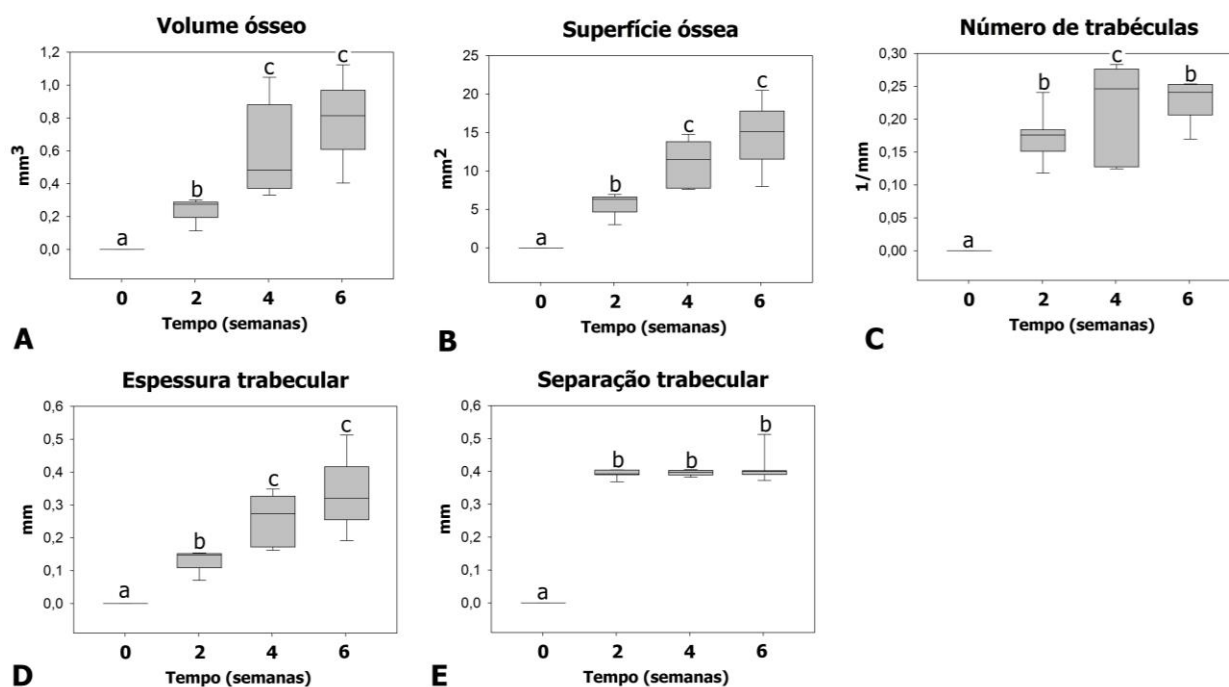
### **1 Análise morfométrica de defeitos ósseos**

#### **1.1 Comparações intragrupos**

A análise dos parâmetros morfométricos nos diferentes tempos experimentais para o grupo C, de defeitos preenchidos somente pela esponja de colágeno, revelaram aumento significativo dos valores de volume ósseo (Friedman,  $p=0,004$ ), superfície óssea ( $p=0,003$ ), número de trabéculas ( $p<0,001$ ) e espessura trabecular ( $p=0,003$ ) em função do tempo até o período de 4 semanas ( $0<2<4$  semanas,  $p<0,05$ ; Figura 6,



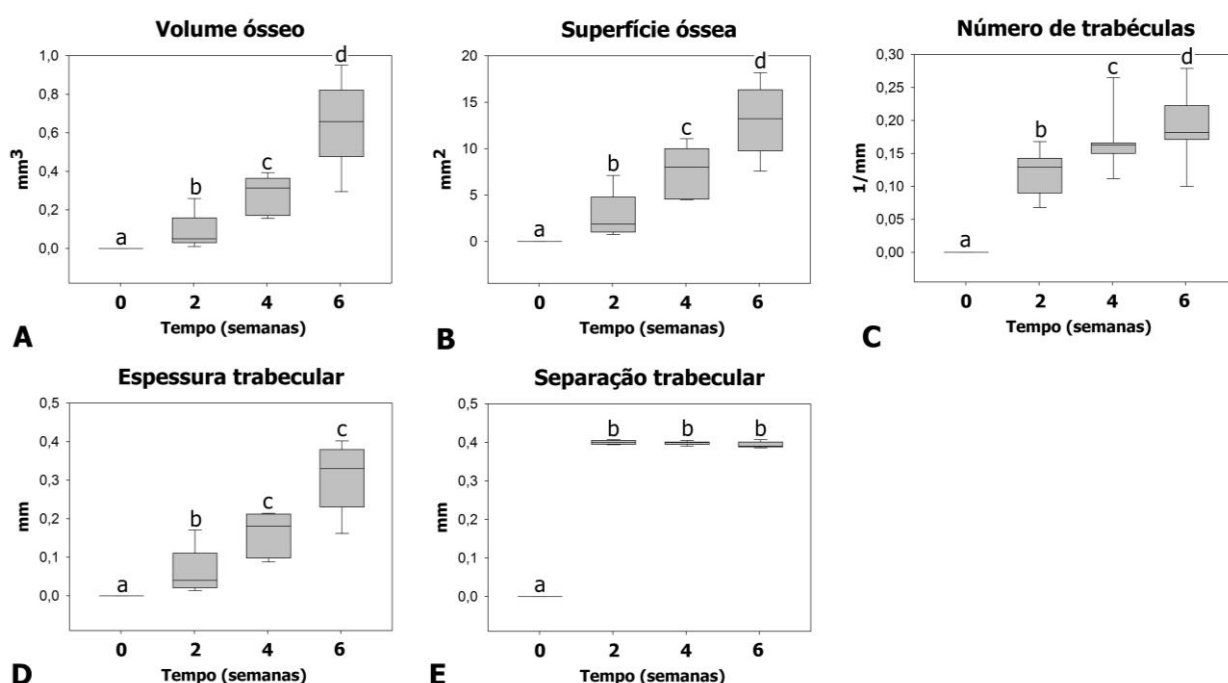
Tabela 1). Contudo, a partir desse período, para a maioria dos parâmetros morfométricos avaliados no grupo C, houve a manutenção dos valores após 6 semanas (4=6 semanas,  $p>0,05$ ), com exceção para o número de trabéculas, que sofreu redução neste período (4>6 semanas,  $p<0,05$ ; Figura 6, Tabela 1). Não foram observadas diferenças significantes para os valores de separação trabecular entre 2 e 6 semanas ( $p>0,05$ ; Figura 6, Tabela 1).



**Figura 6.** Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas na região de defeitos de calvária de ratos preenchidos com a esponja de colágeno (C) nos tempos experimentais de 0, 2, 4 e 6 semanas. A) Volume ósseo. B) Superfície óssea. C) Número de trabéculas. D) Espessura trabecular. E) Separação trabecular. Letras distintas indicam diferença estatística entre grupos ( $p \leq 0,05$ ).

Para o grupo C5RE, de defeitos preenchidos pela esponja de colágeno associado a RE a 5 mM  $Sr^{2+}$ , observaram-se valores crescentes de volume ósseo (Friedman,  $p=0,002$ ), superfície óssea ( $p=0,002$ ) e número de trabéculas ( $p<0,001$ ) nos períodos

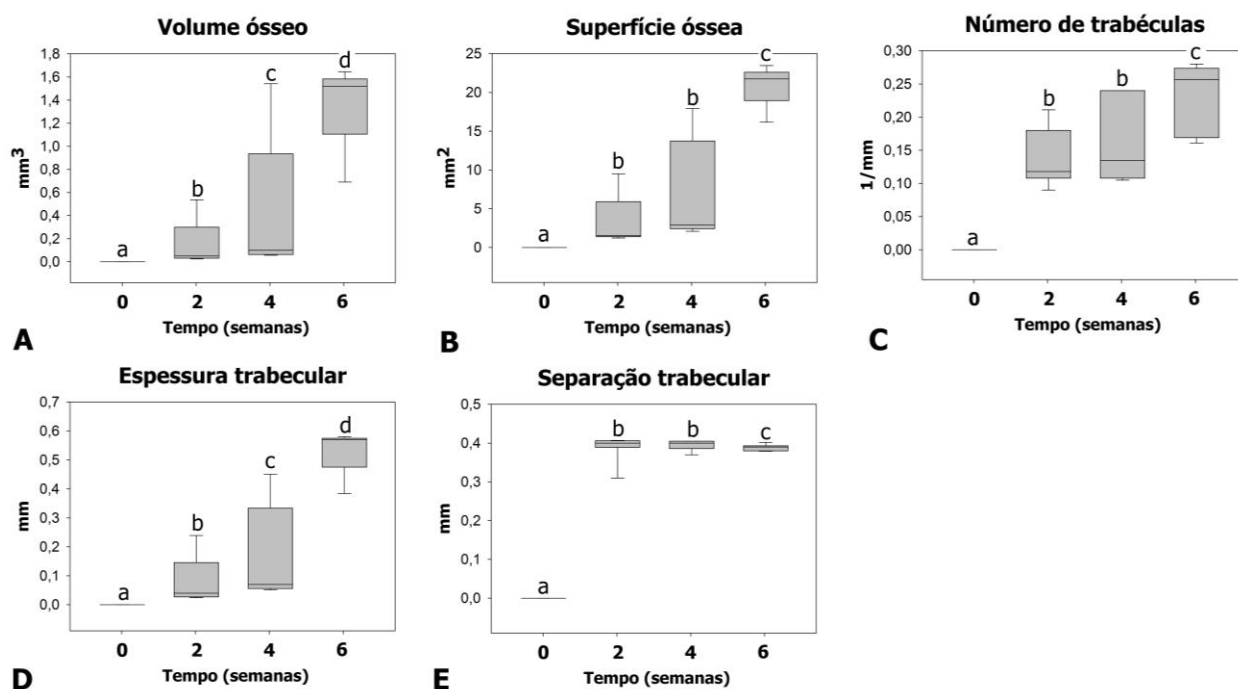
avaliados ( $0 < 2 < 4 < 6$  semanas,  $p < 0,05$ ; Figura 7, Tabela 2). A espessura trabecular também sofreu aumento significativo em função do tempo ( $p = 0,003$ ) até o período de 4 semanas, mantendo seus valores em 6 semanas ( $0 < 2 < 4 = 6$  semanas,  $p < 0,05$ ; Figura 7, Tabela 2). Para este grupo, também não foram observadas diferenças significantes para os valores de separação trabecular entre 2 e 6 semanas ( $p > 0,05$ ; Figura 7, Tabela 2).



**Figura 7.** Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas na região de defeitos de calvária de ratos preenchidos com a esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 5 mM  $\text{Sr}^{2+}$  (C5RE) nos tempos experimentais de 0, 2, 4 e 6 semanas. A) Volume ósseo. B) Superfície óssea. C) Número de trabéculas. D) Espessura trabecular. E) Separação trabecular. Letras distintas indicam diferença estatística entre grupos ( $p \leq 0,05$ ).

No grupo C5ORE, de defeitos preenchidos pela esponja de colágeno associado a RE a 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$ , houve aumento significativo dos valores de volume ósseo (Friedman,  $p = 0,002$ ) e espessura trabecular ( $p = 0,002$ ) em função do tempo ( $0 < 2 < 4 < 6$  semanas,  $p < 0,05$ ; Figura 8, Tabela 2). Também foram observadas diferenças significantes entre

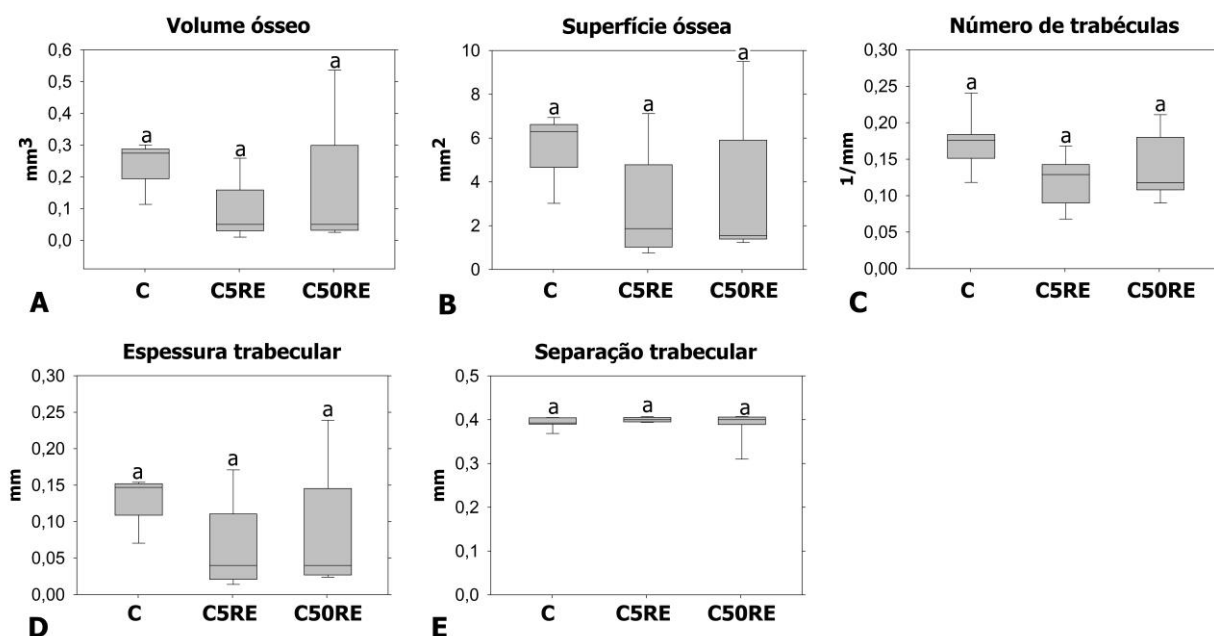
os períodos nos parâmetros superfície óssea ( $p=0,003$ ) e número de trabéculas ( $p<0,001$ ), sendo que, para ambos, houve aumento de 0 a 2 semanas e de 4 a 6 semanas, porém, sem diferenças significantes entre os períodos de 2 e 4 semanas ( $0<2=4<6$  semanas,  $p<0,05$ ; Figura 8, Tabela 2). Somente para o grupo C50RE, observou-se redução estatisticamente significativa dos níveis de separação trabecular ao final de 6 semanas ( $p<0,001$ ; Figura 8, Tabela 2).



**Figura 8.** Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas na região de defeitos de calvária de ratos preenchidos com a esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 50 mM  $Sr^{2+}$  (C50RE) nos tempos experimentais de 0, 2, 4 e 6 semanas. A) Volume ósseo. B) Superfície óssea. C) Número de trabéculas. D) Espessura trabecular. E) Separação trabecular. Letras distintas indicam diferença estatística entre grupos ( $p\leq 0,05$ ).

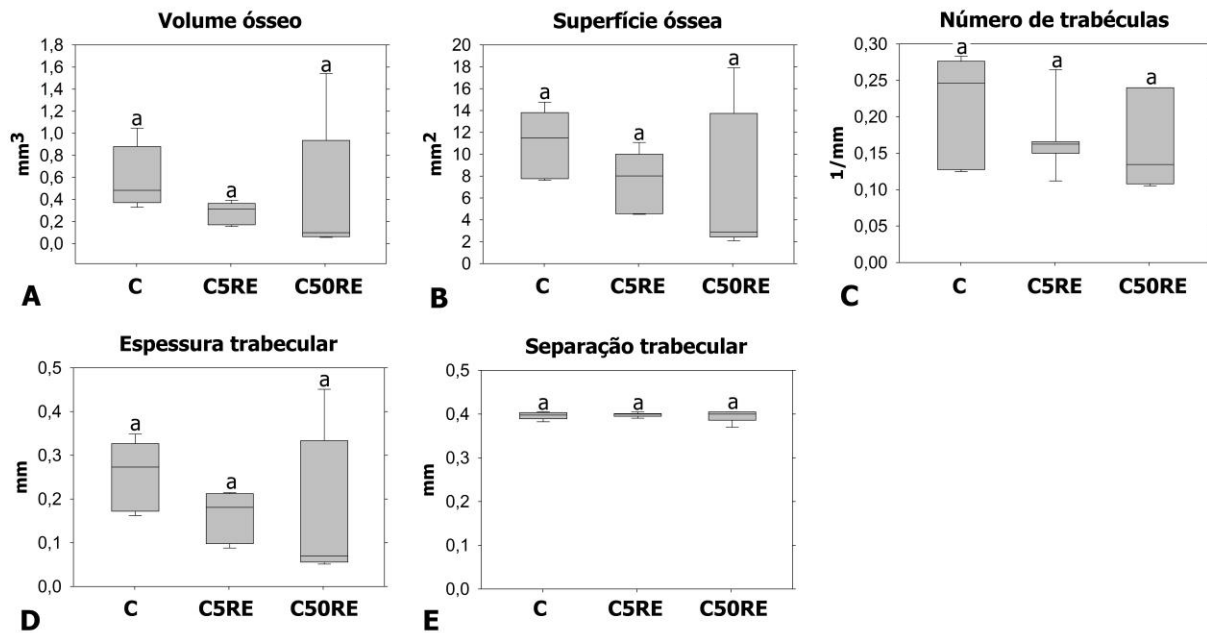
## 1.2 Comparações entre grupos

No tempo de 2 semanas, não foram observadas diferenças significantes na comparação entre grupos para os parâmetros volume ósseo (Kruskal-Wallis,  $p=0,06$ ), superfície óssea ( $p=0,182$ ), número de trabéculas ( $p=0,051$ ), espessura trabecular ( $p=0,177$ ) ou separação trabecular ( $p=0,318$ ; Figura 9, Tabela 2).



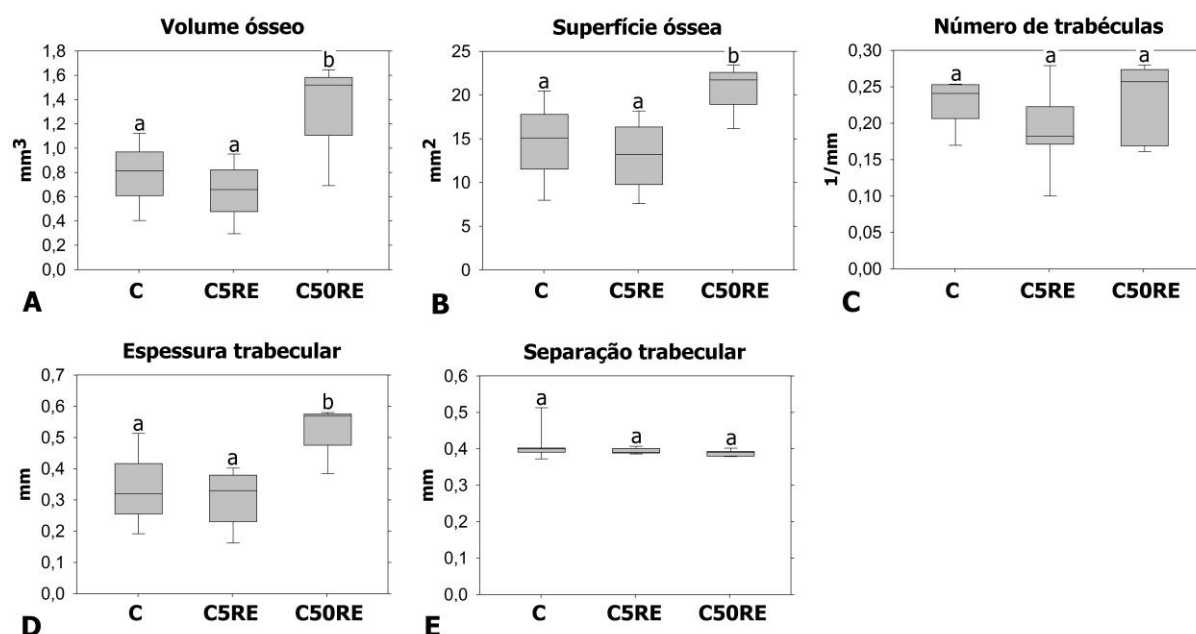
**Figura 9.** Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas na região de defeitos de calvária de ratos preenchidos com a esponja de colágeno (C), esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 5 mM  $Sr^{2+}$  (C5RE) ou esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 50 mM  $Sr^{2+}$  (C50RE) no tempo de 2 semanas. A) Volume ósseo. B) Superfície óssea. C) Número de trabéculas. D) Espessura trabecular. E) Separação trabecular. Letras distintas indicam diferença estatística entre grupos ( $p \leq 0,05$ ).

No tempo de 4 semanas, também não houve diferença significativa na comparação entre grupos para os parâmetros volume ósseo (Kruskal-Wallis,  $p=0,08$ ), superfície óssea ( $p=0,310$ ), número de trabéculas ( $p=0,118$ ), espessura trabecular ( $p=0,275$ ) ou separação trabecular ( $p=0,989$ ; Figura 10, Tabela 2).



**Figura 10.** Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas na região de defeitos de calvária de ratos preenchidos com a esponja de colágeno (C), esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 5 mM Sr<sup>2+</sup> (C5RE) ou esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 50 mM Sr<sup>2+</sup> (C50RE) no tempo de 4 semanas. A) Volume ósseo. B) Superfície óssea. C) Número de trabéculas. D) Espessura trabecular. E) Separação trabecular. Letras distintas indicam diferença estatística entre grupos ( $p \leq 0,05$ ).

Ao final de 6 semanas, foram observadas diferenças significantes na comparação entre grupos para os parâmetros volume ósseo (Kruskal-Wallis,  $p=0,042$ ), superfície óssea ( $p=0,013$ ) e espessura trabecular ( $p=0,006$ ). Para esses parâmetros, o grupo C50RE exibiu valores estatisticamente superiores aos dos demais grupos, C e C5RE, que exibiram similaridade estatística ( $C50RE > C = C5RE$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 11, Tabela 2). Neste período, não se observaram diferenças significantes para os parâmetros número de trabéculas ( $p=0,260$ ) e separação trabecular ( $p=0,290$ ; Figura 11, Tabela 2).



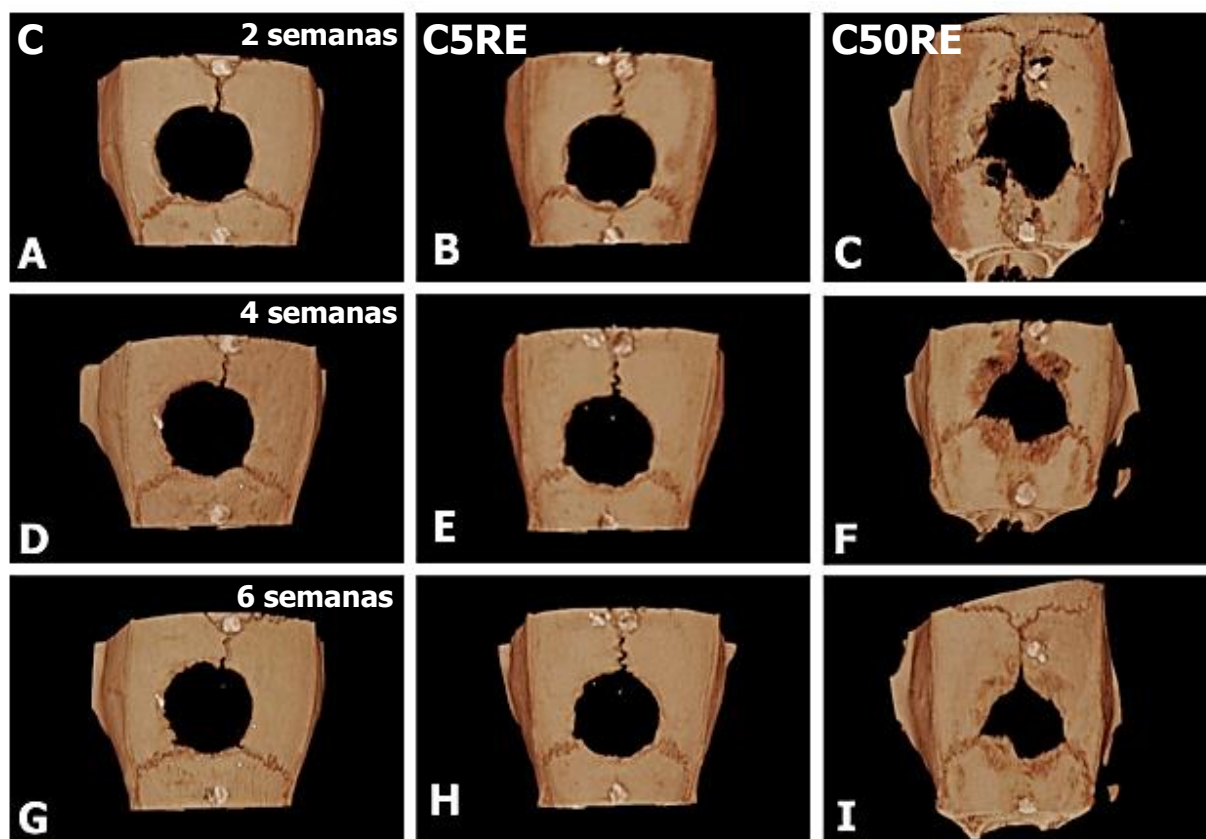
**Figura 11.** Parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas na região de defeitos de calvária de ratos preenchidos com a esponja de colágeno (C), Esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 5 mM  $\text{Sr}^{2+}$  (C5RE) ou esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$  (C50RE) no tempo de 6 semanas. A) Volume ósseo. B) Superfície óssea. C) Número de trabéculas. D) Espessura trabecular. E) Separação trabecular. Letras distintas indicam diferença estatística entre grupos ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2.** Valores de mediana (percentil 25% - percentil 75%) dos parâmetros morfométricos obtidos de imagens tridimensionais de micro-CT reconstruídas na região de defeitos de calvária de ratos preenchidos com a esponja de colágeno (C), esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 5 mM  $\text{Sr}^{2+}$  (C5RE) ou esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$  (C50RE) no tempo de 2, 4 e 6 semanas

Parâmetro morfométrico	Grupo	Tempo (semanas)		
		2	4	6
Volume ósseo	C	0,28 (0,19-0,28)	0,48 (0,37-0,88)	0,81 (0,61-0,97)
	C5RE	0,05 (0,03-0,16)	0,31 (0,17-0,36)	0,66 (0,48-0,82)
	C50RE	0,05 (0,03-0,30)	0,10 (0,06-0,94)	1,52 (1,10-1,58)
Superfície óssea	C	6,31 (4,66-6,62)	11,50 (7,76-13,81)	15,11 (11,54-17,80)
	C5RE	1,87 (1,02-4,79)	8,01 (4,56-10,01)	13,23 (9,8-16,35)
	C50RE	1,55 (1,39-5,91)	2,89 (2,42-13,74)	21,74 (18,95-22,60)
Número de trabéculas	C	0,18 (0,15-0,18)	0,25 (0,13-0,28)	0,24 (0,21-0,25)
	C5RE	0,13 (0,09-0,14)	0,16 (0,15-0,17)	0,18 (0,17-0,22)
	C50RE	0,12 (0,11-0,18)	0,13 (0,11-0,24)	0,26 (0,17-0,27)
Espessura trabecular	C	0,15 (0,11-0,15)	0,27 (0,17-0,32)	0,32 (0,29-0,38)
	C5RE	0,04 (0,02-0,11)	0,18 (0,10-0,21)	0,32 (0,26-0,37)
	C50RE	0,04 (0,03-0,15)	0,07 (0,06-0,33)	0,57 (0,50-0,57)
Separação trabecular	C	0,39 (0,39-0,40)	0,40 (0,39-0,40)	0,40 (0,39-0,40)
	C5RE	0,40 (0,39-0,40)	0,40 (0,39-0,40)	0,39 (0,39-0,40)
	C50RE	0,40 (0,39-0,41)	0,40 (0,39-0,40)	0,39 (0,38-0,39)

## 2 Análise qualitativa de defeitos ósseos

As imagens tridimensionais, obtidas por reconstrução da micro-CT, evidenciaram diferenças no padrão de formação óssea na região dos defeitos entre os grupos experimentais em 2, 4 e 6 semanas (Figura 12A-C, 12D-F e 12G-I, respectivamente). Nestes períodos, enquanto C e C5RE exibiam apenas uma discreta formação de tecido ósseo na periferia dos defeitos (Figura 12A, D, G e 12B, E, H, respectivamente), no grupo C50RE, foi evidente uma maior formação deste tecido (Figura 12C, F, I), que ocorreu de forma centrípeta e possibilitou o recobrimento parcial da área do defeito ao final de 6 semanas (Figura 12I).

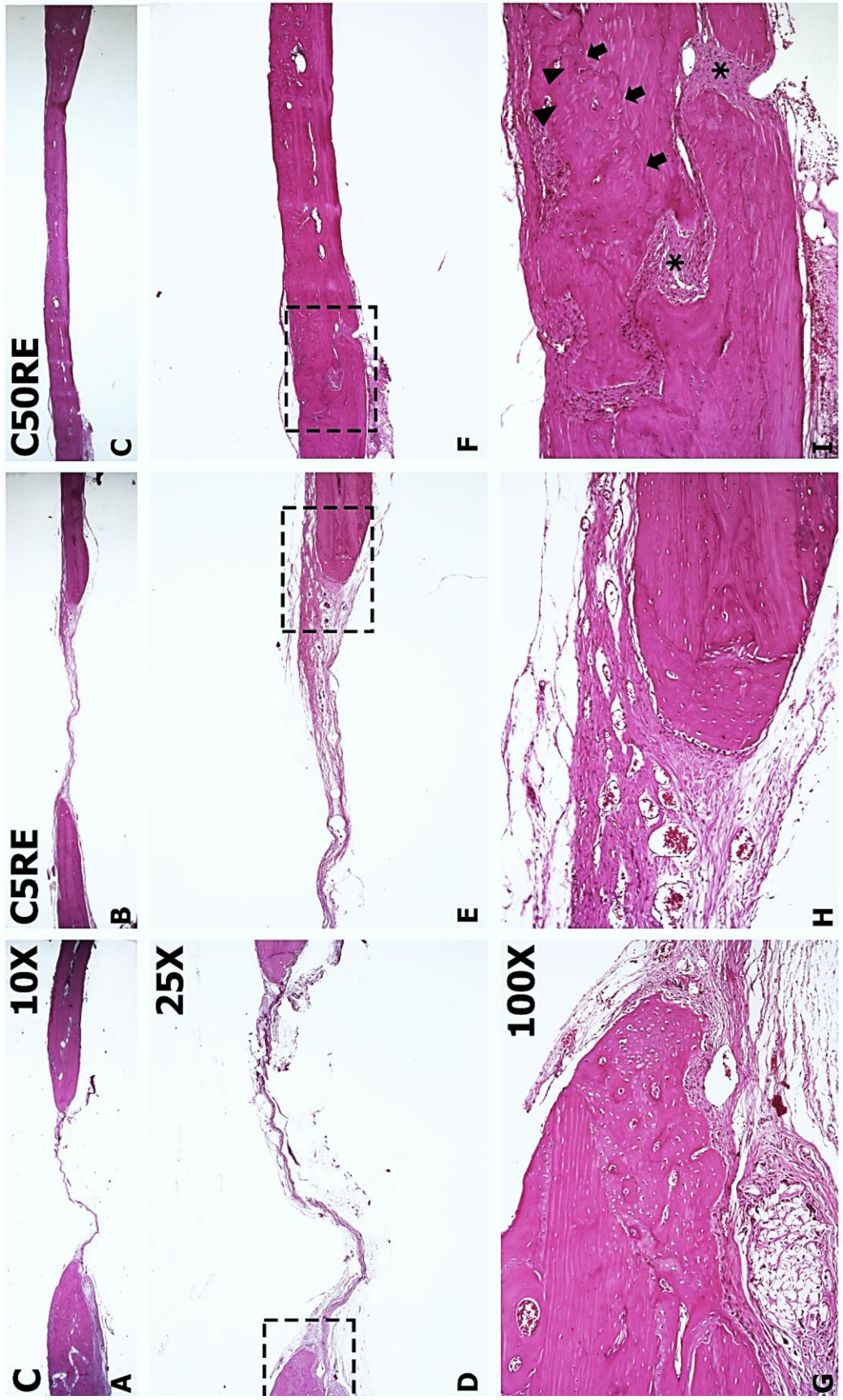


**Figura 12.** Imagens microtomográficas de defeitos ósseos em calvária de ratos preenchidos somente com a esponja de colágeno (grupo C: A, D, G e J), com esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 5 mM  $Sr^{2+}$  (grupo C5RE: B, E, H e K) ou com esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 50 mM  $Sr^{2+}$  (grupo C50RE: C, F, I e L) após 2 (A-C), 4 (D-F) e 6 semanas (G-I). Note-se maior formação de tecido mineralizado para o grupo C50RE em todos os tempos experimentais.

A análise histológica revelou, ao final de 6 semanas, a presença de uma delgada camada de tecido conjuntivo na região central dos defeitos ósseos dos grupos C (Figura 13A, D e G) e C5RE (Figura 13B, E e H), sendo observada a presença de tecido ósseo imaturo apenas na periferia dos defeitos (Figura 13G e H). Em ambos os casos, o tecido ósseo neoformado exibia alto grau de celularidade, com lacunas amplas ocupadas por osteócitos e pavimentação osteoblástica (Figura 13G e H), enquanto que o tecido conjuntivo circunjacente apresentava numerosos vasos sanguíneos e fibras colágenas arranjadas frouxamente (Figura 13G e H).

No grupo C50RE, notou-se a completa regeneração do tecido ósseo na maioria dos espécimes observados, sendo a região do defeito preenchida por tecido ósseo imaturo (Figura 13C, F, I), com presença de numerosos osteócitos localizados em estreitas lacunas, de linhas de reversão (setas, Figura 13I) e de canais medulares ocupados por vasos sanguíneos (cabeças de seta, Figura 13I). Os espaços medulares eram estreitos e ocupados por tecido conjuntivo com fibras colágenas mais densamente arranjadas (asteriscos, Figura 13I). Não foi observado processo inflamatório relevante em nenhum dos grupos experimentais avaliados.





**Figura 13.** Fotomicrografias da região de defeitos ósseos em calvária de ratos preenchidos somente com a esponja de colágeno (grupo C: A, D e G), com esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 5 mM  $Sr^{2+}$  (grupo C5RE: B, E e H) ou com esponja de colágeno associada a ranelato de estrôncio a 50 mM  $Sr^{2+}$  (grupo C50RE: C, F e I) após 6 semanas. Note-se a presença de uma delgada camada de tecido conjuntivo formada na região central do defeito nos grupos C e C5RE, e o preenchimento completo dos defeitos por tecido ósseo imaturo no grupo C50RE. Coloração: hematoxilina e eosina. Magnificação: A-C= 10x, D-F=25x e G-I=100x.



## ***Discussão***

O presente estudo avaliou o efeito da aplicação local de duas concentrações do fármaco RE, de 5 e 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$ , sobre a neoformação óssea em defeitos ósseos críticos, utilizando esponja de colágeno como carreador. A partir da análise morfométrica por micro-CT, foi demonstrado que a aplicação local de RE alterou a dinâmica de formação óssea na região dos defeitos ósseos, porém apenas a concentração de 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$  foi eficiente em favorecer a neoformação óssea, promovendo redução da separação trabecular ao longo do tempo e maiores valores de volume, superfície óssea e espessura

trabecular ao final de 6 semanas. A reconstrução tridimensional dos defeitos por micro-CT confirmou esses achados, embora por essa técnica nenhum dos grupos tenha exibido regeneração completa do defeito ósseo. Por outro lado, pela análise histológica foi observada a total regeneração do tecido ósseo nos defeitos do grupo tratado por RE a 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$ , enquanto os demais grupos exibiram apenas formação óssea incipiente, restrita à periferia dos defeitos.

A perda óssea na região maxilofacial pode representar problema clínico desafiador, especialmente no caso de defeitos ósseos críticos, quando sua capacidade regenerativa fisiológica é excedida (BURG et al., 2000; DURÃO et al., 2016). Esta situação é comumente observada em função de trauma, infecção, ressecção tumoral, doenças perimplantares e da remodelação óssea após perda dentária, além dos casos de defeitos ósseos congênitos (PALAEZ et al., 2014). Visando simular estas situações, a literatura preconiza que o método empregado deve satisfazer alguns critérios: o tamanho do defeito não deve ser menor que o tamanho crítico de cada espécie, a metodologia empregada não deve ser muito onerosa, a técnica cirúrgica deve ser simples, reproduzível e de baixa morbidade, o sítio de implantação deve conter osso compacto e esponjoso, conferir estabilidade ao material empregado e impossibilidade de fratura (KOCHI et al., 2009). Neste estudo, optou-se pela criação de defeitos ósseos críticos, de 5 mm de diâmetro, em calvária de ratos, um modelo classicamente utilizado em diversos trabalhos da literatura (NAGATA et al., 2009; ORTOLAN et al., 2014; VAJGEL et al., 2014) e que apresentam algumas vantagens, como a ausência de movimentação fisiológica do crânio, pequena quantidade de osso esponjoso, permite a padronização da dimensão do defeito e o

adequado acesso cirúrgico, além de fornecer suporte para implantação de biomateriais devido à presença da dura-máter e da pele sobreposta (GOMES; FERNANDES, 2011).

Na tentativa de estimular a regeneração óssea em situações clínicas complexas, muitas estratégias tem sido propostas, entre elas, a associação de biomateriais a fármacos capazes de favorecer a osteogênese, como a sinvastatina (TAI et al., 2013), rosuvastatina (MONJO et al., 2010), lovastatina (YOSHII et al., 2014), tilurone (LEPPARANTA et al., 2013) e purmurfamina (BELOTI et al., 2005). Neste estudo, especulou-se que a aplicação do fármaco RE, administrado sistemicamente para o tratamento da osteoporose, poderia constituir em alternativa promissora para a regeneração de defeitos ósseos críticos, por exibir efeito anabólico sobre o tecido ósseo (AMMANN, 2005; MARIE, 2006; NEUPREZ et al., 2008; MARIE et al., 2011; SAIDAK; MARIE, 2012). Na literatura encontram-se estudos demonstrando os benefícios do uso sistêmico deste fármaco no tratamento e prevenção da osteoporose e consequente diminuição do risco de fratura óssea, pelo aumento da densidade óssea mineral e redução da expressão de marcadores da reabsorção óssea (BRUN et al., 2014; QUERIDO et al., 2015). Contudo, até o momento, este é o primeiro trabalho da literatura a abordar a aplicação local deste fármaco como adjuvante para o tratamento de defeitos ósseos. Considerando as vantagens clínicas observadas nos pacientes que fazem uso sistêmico do RE, a busca pela aplicação local desta droga e seus possíveis benefícios torna-se relevante, pela possibilidade de se induzir a formação óssea apenas na região desejada.

Quanto à segurança do uso do RE, ROSA et al. (2016) relataram, ao avaliar a regeneração óssea em defeitos de fêmures de ratas adultas ovariectomizadas, que o uso

sistêmico de RE (625g/kg, diariamente) foi bem tolerado, seguro e não exibiu qualquer efeito adverso. Em revisão recente de trabalhos sobre o uso clínico RE para o manejo da osteoporose (2 g/dia), REGINSTER et al. (2015), concluíram que o RE exibe com uma ótima relação benefício-risco, desde que suas contra-indicações, que incluem hipertensão descontrolada e histórico de episódio isquêmico, sejam respeitadas.

Nesse estudo, foram avaliados os efeitos de duas concentrações distintas do RE, de 5 e 50 mM Sr<sup>2+</sup>. Essas concentrações foram determinadas com base nas considerações realizadas por estudo de QUERIDO et al. (2015), em que a exposição de osteoblastos cultivados sobre titânio ao RE a 0,012 mM Sr<sup>2+</sup> (equivalente à concentração plasmáticas de mulheres que fazem uso sistêmico de 2 g/dia do fármaco,) ou 0,5 mM Sr<sup>2+</sup> favoreceram sua proliferação e diferenciação de forma dose-dependente. Com base nesse dados, foi delineado um ensaio piloto, utilizando-se concentrações de 0,5, 5, 50 e 500 mM Sr<sup>2+</sup> de RE aplicado em defeitos ósseos, e selecionadas as concentrações 5 e 50 mM Sr<sup>2+</sup>, que exibiram efeitos positivos sobre a neoformação óssea.

Considerando a necessidade de um biomaterial que pudesse carrear e dar substantividade ao medicamento estudado, elegeu-se a esponja de colágeno de origem animal. Sabe-se que, quando da utilização de substâncias para favorecer a formação óssea, o material utilizado como carreador deve ser considerado como variável importante para os resultados obtidos. O colágeno têm propriedades únicas que o tornam útil como arcabouço para facilitar a regeneração de tecidos e a administração de fármacos localmente, como baixa antigenicidade, baixa toxicidade, alta afinidade para a água, é biodegradável, além de favorecer os eventos celulares de migração celular, adesão,

proliferação e diferenciação celular, por apresentar domínios RGD (Arg-Gly-Asp) que se ligam a integrinas da superfície celular (revisado por KRUGER; MILLER; WANG, 2013). A esponja de colágeno adotada neste estudo, já foi utilizada como carreador em outros trabalhos da literatura (SANTANA et al., 2015; NAKAMURA et al., 2016; SHINOHARA et al., 2016), além de permitir a embebição adequada da solução teste, exibe capacidade de expansão, adequando-se ao tamanho do defeito, promove o tamponamento efetivo da lesão e a formação de coágulo estável, sendo reabsorvido após quatro a seis semanas (PRADO et al., 2014). Ainda, trata-se de um material que apresenta vantagens para aplicação clínicas por ser acessível, de baixo custo e fácil manipulação (GLOWACKI, MIZUNO, 2007; SHINOHARA et al., 2016).

Para avaliar a neoformação óssea em resposta aos tratamentos propostos neste estudo, optou-se pela micro-CT, técnica amplamente aplicada para o estudo tridimensional (3D) da microestrutura óssea, que fornece imagens em 3D com resolução espacial suficiente para a avaliação da microestrutura trabecular (GAUTHIER, 2005; HO, 2006; LAN et al., 2013). Especificamente, a micro-CT *in vivo* permite monitorar alterações longitudinais na geometria e microestrutura óssea do roedor em resposta ao tratamento, possibilitando sua visualização e quantificação em um mesmo animal ao longo do tempo (KOCHI, 2009; SCHULTE et al., 2011, LAN et al., 2013), o que reduz grandemente o número de animais necessários para o estudo e minimiza possíveis questões éticas. De fato, no presente estudo foram utilizados apenas 21 animais para a avaliação do efeito de três tratamentos distintos sobre a regeneração óssea, com análise morfométrica em

três tempos experimentais, sendo os mesmos animais utilizados para análise histológica ao final de 6 semanas.

A partir das imagens 3D obtidas pelo micro-CT, foram avaliados o volume ósseo, superfície óssea, espessura trabecular, número de trabéculas e espaço trabecular, parâmetros preconizados pela preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR). O parâmetro de volume ósseo reflete a quantidade de osso neoformado na região do defeito, enquanto a superfície óssea representa a área superficial do tecido mineralizado que está interconectado, sendo a interconectividade importante para o aporte de células osteoblásticas e vasos sanguíneos (VERNA et al., 2002, FONSECA, 2010). Ao lado da quantidade de osso disponível, sua qualidade é um fator determinante para o sucesso, por exemplo, nas reabilitações implantossuportadas de crescimento exponencial na Odontologia, sendo a estabilidade primária do implante, em geral, conseguida pela ancoragem cortical e subsequente osseointegração bem sucedida, que é principalmente suportada pelo compartimento trabecular. Nesse sentido, a média do número de trabéculas ósseas presentes, da espessura das trabéculas e da separação entre as trabéculas, que reflete o diâmetro dos espaços medulares interpostos entre a matriz óssea neoformada, são parâmetros estereológicos utilizados para estimativa para a arquitetura do osso trabecular (BERTL et al., 2015). Assim, o aumento do número de trabéculas e de sua espessura, associada a redução da separação trabecular refletem uma melhor qualidade do tecido ósseo neoformado (BRUN et al., 2014).



Na comparação intragrupos, observou-se que a aplicação local de RE promoveu alteração na dinâmica de formação óssea, uma vez que somente os grupos que receberam RE exibiram aumento do volume ósseo, da superfície óssea e do número de trabéculas a partir da 4ª semana. Estes achados refletem o efeito anabólico do RE sobre o tecido ósseo, já descrito por outros trabalhos na literatura (AMMANN, 2005; MARIE, 2006; NEUPREZ et al., 2008; MARIE et al., 2011; SAIDAK; MARIE, 2012). Embora os mecanismos moleculares pelos quais o RE afeta as células ósseas ainda não seja totalmente compreendidos, alguns autores associam seus efeitos à similaridade entre os íons estrôncio e cálcio, que permite que o estrôncio atue como um agonista de receptores sensíveis ao cálcio, ativando múltiplas vias intracelulares que regulam o comportamento e destino celular, que resultam em aumento da formação óssea (MARIE et al., 2011; SAIDAK; MARIE, 2012; CIANFEROTTI et al., 2015).

Além disso, observou-se, aumento da espessura das trabéculas após 4 semanas e redução da separação trabecular ao final de 6 semanas quando da aplicação de RE a 50 mM  $\text{Sr}^{2+}$ . Este dado permite inferir que houve aumento da qualidade óssea, com a redução do espaço entre as trabéculas ósseas e o aumento de sua espessura, o que reflete positivamente na densidade óssea (QUERIDO et al, 2015; BRUN et al., 2014). Embora não existam dados na literatura sobre os efeitos da aplicação local do RE, estudos demonstraram que o RE é capaz de melhorar a osseointegração de implantes de titânio, em doses baseadas na concentração plasmática de estrôncio alcançada com a dose terapêutica (2 g/dia), por promover melhora da microarquitetura óssea trabecular, do

volume ósseo, do contato osso-implante, e do imbricamento mecânico, indispensável ao travamento primário dos implantes (YUNFENG et al, 2010; MAÏMOUN et al, 2010).

A partir das comparações entre grupos, dos diferentes tratamentos utilizados para a regeneração dos defeitos ósseos, foi demonstrado que, apenas ao final de 6 semanas, o grupo que recebeu a aplicação de RE a 50 mM Sr<sup>2</sup> exibiu aumento significativo da neoformação óssea, com aumento dos valores de volume ósseo, superfície óssea e espessura trabecular. Este fato permite especular que a efetivação do princípio ativo do RE possui maior efeito em longo prazo, possibilitando, além do maior volume ósseo comparado ao grupo controle, o aumento da qualidade do tecido formado.

As análises qualitativas mostraram formação óssea restrita às margens dos defeitos ósseos no grupo que se aplicou apenas a esponja de colágeno, sendo a região central preenchida predominantemente por tecido conjuntivo, com delgadas fibras colágenas e vasos. Sabe-se que a cicatrização do defeito ósseo em calvárias inicia-se normalmente pelas margens da ferida cirúrgica, a partir do periósteo ou da dura-máter (PRITCHARD, 1946; WANG; GLIMCHER, 1999). Essa presença mínima de tecido ósseo neoformado confirmou o caráter permanente do defeito, e está em acordo com resultados de pesquisas anteriores, nas quais o preenchimento de defeitos ósseos críticos apenas com esponja de colágeno resultou em formação óssea mínima e na manutenção do defeito ósseo (SANTANA et al., 2015; NAKAMURA et al., 2016; SHINOHARA et al., 2016). Além disso, as análises qualitativas confirmaram os dados da análise quantitativa por micro-CT, de que a concentração de RE a 5 mM Sr<sup>2+</sup> foi ineficiente em estimular a regeneração dos defeitos ósseos, já que neste grupo foram observados aspectos histológicos semelhantes

ao do grupo controle e a presença de tecido ósseo neoformado apenas na periferia do defeito.

Por meio da análise histológica, observou-se o total preenchimento da região dos defeitos tratados com RE 50 mM Sr<sup>2+</sup> na maioria dos espécimes observados, com a presença de matriz óssea imatura exibindo numerosos osteócitos e estreitos espaços medulares. O estrôncio é conhecido por aumentar a proliferação e diferenciação de osteoblastos, o que leva ao local, um conjunto maior de osteoblastos ativos, e assim, da formação de matriz óssea (CANALIS et al.1996, ARLOT et al. 2007, ATKINS et al. 2009). Além disso, o estrôncio reduz a proliferação e diferenciação e pode induzir apoptose de osteoclastos, resultando em diminuição da reabsorção de osso (BUEHLER et al., 2001, BONNELYE et al., 2008).

Entretanto, a partir da análise qualitativa das reconstruções 3D, não foi observada a total consolidação dos defeitos em nenhum dos animais tratados com RE 50 mM Sr<sup>2+</sup>. Essas diferenças provavelmente se devem a menor capacidade da avaliação por micro-CT em detectar o tecido ósseo em sua fase inicial de formação. Contudo, embora não possa fornecer a mesma quantidade de dados obtidos pela avaliação histológica em função de suas limitações analíticas, a micro-CT apresenta substancial vantagem na determinação das características estruturais e parâmetros de crescimento ósseo em três dimensões (KOCHI, 2009). Dessa maneira, a micro-CT é uma técnica rápida e não destrutiva, que caracteriza e mensura as propriedades tridimensionais da regeneração do tecido ósseo, enquanto que a análise histológica complementa a caracterização celular e

corroborando aos achados estruturais microtomográficos (JONES, 2004; KNACKSTEDT, 2006; PORTER, 2005).

Neste contexto, as técnicas aplicadas neste estudo para avaliação da regeneração óssea foram complementares e mostraram que a aplicação local do fármaco RE em defeitos ósseos pode constituir em estratégia eficaz para o aumento e/ou aceleração do processo de neoformação óssea. Contudo, estudos futuros deverão abordar a eficácia e segurança de diferentes concentrações e sua associação à diferentes carreadores na regeneração óssea, não só em defeitos intraósseos mas também na osseointegração de implantes dentários.



## ***Conclusão***

Com base nos resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que a aplicação de ranelato de estrôncio, na concentração de 50 mM RE  $\text{Sr}^{2+}$ , associado à esponja de colágeno, favorece e acelera a neoformação óssea em defeitos ósseos críticos.



## ***Referências Bibliográficas***

AMMANN, P. Strontium ranelate: a novel mode of action leading to renewed bone quality. **Osteoporos Int.**, v. 16, n. 1, p. 11-15, 2005.

ARBOLEYA, L.; CASTANEDA, S. Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. **Reumatol. Clin.**, v.9, p. 303–315, 2013.

ARLOT, M. E.; JIANG, Y.; GENANT, H. K.; ZHAO, J.; BURT-PICHAT, B.; ROUX, J. P.; DELMAS, P. D.; MEUNIER, P. J. Histomorphometric and mu-CT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. **J. Bone Miner. Res.**, v. 23, n. 2, p. 215-222, 2007.

ARONSON, J. Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. **J Bone Joint Surg Am.**, v. 79, n. 8, p. 1243-1258, 1997.

ATKINS, G. J.; WELLDON, K. J.; HALBOUT, P.; FINDLAY, D. M. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. **Osteoporos Int.**, v. 20, n. 4, p. 653-664, 2009.

BARBARA, A.; DELANNOY, P.; DENIS, B. G.; MARIE, P. J. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. **Metabolism.**, v. 53, n. 4, p. 532-537, 2004.

BARON, R.; TSOUDEROS, Y. In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. **Eur J Pharmacol.**, v. 450, n. 1, p. 11-17, 2002.

BATES, P.; RAMACHANDRAN, M. Bone injury, healing and grafting. **In Basic Orthopaedic Sciences.** The Stanmore Guide. Edited by: Ramachandran M. London: Hodder Arnold, p. 123-134, 2007.

BELOTI, M. M.; BELLESINI, L. S.; ROSA, A. L. Purmorphamine enhances osteogenic activity of human osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal cells. **Cell Biol. Int.**, v.29, p. 537-541, 2005.

BERTL, K.; HEIMEL, P.; RÖKL-RIEGLER, M.; HIRTLER, L.; ULM, C.; ZECHNER, W. MicroCT-based evaluation of the trabecular bone quality of different implant anchorage sites for masticatory rehabilitation of the maxilla. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 43, n. 6, p. 961-968.

BONNELYE, E.; CHABADEL, A.; SALTEL, F.; JURDIC, P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone.**, v. 42, n. 1, p. 129-138, 2008.

BRENNAN, T. C.; RYBCHYN, M. S.; GREEN, W.; ATWA, S.; CONIGRAVE, A. D.; MASON, R. S. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **Br J Pharmacol.**, v. 157, n. 7, p. 1291-1300, 2009.

BRUN, L. R.; GALICH, A. M.; VEJA, E.; SALERNI, H.; MAFFEI, L.; PREMROU, V.; COSTANZO, P. R.; SARLI, M. A.; REY, P.; LARROUDÉ, M. S.; MOGGIA, M. S.; BRANCE, M. L.; SÁNCHEZ, A. Strontium ranelate effect on bone mineral density is modified by previous bisphosphonate treatment. **SpringerPlus.**, doi: 10.1186/2193-1801-3-676, 2014.



BUEHLER, J.; CHAPPUIS, P.; SAFFAR, J. L.; TSOUDEROS, Y.; VIGNERY, A. Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). **Bone**, v. 29, n. 2, p. 176-179, 2001.

BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials.**, v. 21, n. 23, p. 2347–2359, 2001.

CANALIS, E.; HOTT, M.; DELOFFRE, P.; TSOUDEROS, Y.; MARIE, P.J. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. **Bone**, v. 18, n. 6, p. 517-523, 1996.

CAUDRILLIER, A.; HURTEL-LEMAIRE, A. S.; WATTEL, A.; COURNARIE, F.; GODIN, C.; PETIT, L.; PETIT, J. P.; TERWILLIGER, E.; KAMEL, S.; BROWN, E. M.; MENTAVERRI, R.; BRAZIER, M. Strontium ranelate decreases receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand-induced osteoclastic differentiation in vitro: involvement of the calcium-sensing receptor. **Mol Pharmacol.**, v. 78, n. 4, p. 569-576, 2010.

CAVERZASIO, J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. **Bone**, v. 42, n. 6, p. 1131-1136, 2008.

CIANFEROTTI, L.; GOMES, A. R.; FABBRI, S.; TANINI, A.; BRANDI, M. L. The calcium-sensing receptor in bone metabolism: from bench to bedside and back. **Osteoporos Int.**, v. 26, n. 8, p. 2055-2071, 2015.

CHATTOPADHYAY, N.; QUINN, S. J.; KIFOR, O.; YE, C.; BROWN, E. M. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, n. 3, p. 438-447, 2007.

CHO, T. J.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. **J Bone Miner Res.**, v. 17, p. 513-520, 2002.

CHOUDHARY, D. K.; PRAKASH, A.; JOHRI, B. N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian J Microbiol.**, v. 47, n. 4, p. 289–297, 2007.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392–1404, 2005.

DIMITRIOU, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; GIANNOUDIS, P. V. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMCmed.**, v.9, n.66, p. 1741-7015, 2011.

DURÃO, S. F.; GOMES, P. S.; COLAÇO, B. J.; SILVA, J. C.; FONSECA, H. M.; DUARTE, J. R.; FELINO, A. C.; FERNANDES, M. H. The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat. **Osteoporos Int.**, v. 25, n. 5, p. 1535-1545, 2014.

EINHORN, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 355, p. 7-21, 1998.

FONSECA, J. E.; BRANDI, M. L. Mechanism of action of strontium ranelate: what are the facts. **Clin. Cases in Miner. Bone Metab.**, v. 7, n. 1, p. 17-18, 2010.

FROMIGUÉ, O.; HAÏ, E.; BARBARA, A.; PETREL, C.; TRAIFFORT, E.; RUAT, M.; MARIE, P. J. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. **J Cell Mol Med.**, v. 13, n. 8B, p. 2189-2199, 2009.

GAUTHIER, O.; MÜLLER, R.; VON STECHOW, D.; LAMY, D.; WEISS, P.; BOULER, JM. In vivo regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study. **Biomaterials**, v. 26, p. 5444-43, 2005.

GLOWACKI, J.; MIZUNO, S. Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 338-344, 2007.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Lab Anim.**, v. 45, n. 1, p. 14-24, 2011.

GREEN, S. A.; JACKSON, J. M.; WALL, D. M.; MARINOW, H.; ISHKANIAN, J. Management of segmental defects by the Ilizarov intercalary bone transport method. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 280, p. 136-142, 1992.

HELM, G. A.; DAYOUB, H.; JANE-JÚNIOR, J. A. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. **Neurosurg. Focus.**, v. 10, n. 4, p. E4, 2015.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering. **Philos. Trans. Math. Phys. Eng. Sci.**, v. 362, n. 1825, p. 2821-2850, 2004.

HUNZIKER, E. B.; ENGGIST, L.; KÜFFER, A.; BUSER, D.; LIU, Y. Osseointegration: the slow delivery of BMP-2 enhances osteoinductivity. **Bone**, v. 51, n. 1, p. 98-106, 2012.

HURTEL-LEMAIRE, A. S.; MENTAVERRI, R.; CAUDRILLIER, A.; COURNARIE, F.; WATTEL, A.; KAMEL, S.; TERWILLIGER, E. F.; BROWN, E. M.; BRAZIER, M. The

calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 1, p. 575-584, 2009.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **J. R. Soc. Interface.**, v. 3, n. 10, p. 589-601, 2006.

JOHN, H. D.; WENZ, B. Histomorphometric analysis of natural bone mineral for maxillary sinus augmentation. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v. 19, n. 2, p. 199-207, 2004.

JONES, A. C.; ARNS, C. H.; SHEPPARD, A. P.; HUTMACHER, D. W.; MILTHORPE, B. K.; KNACKSTEDT, M. A. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. **Biomaterials**, v. 28, p. 2491-2504, 2007.

KIM, D. H.; RHIM, R.; LI, L.; MARTHA, J.; SWAIM, B. H.; BANCO, R. J.; JENIS, L. G.; TROMANHAUSER, S. G. Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. **Spine J.**, v. 9, n. 11, p. 886-892, 2009.

KNACKSTEDT, M. A.; ARNS, C. H.; SENDEN, T. J.; NAKAMURA, T. Analysis of A-W glass-ceramic surface by micro-beam X-ray diffraction. **J Biomed Mater Res.**, v. 24, p. 259-73, 1990.

KRUGER, T. E.; MILLER, A. H.; WANG, J. Collagen scaffolds in bone sialoprotein-mediated bone regeneration. **ScientificWorldJournal**, v. 31, 2013.

KOCHI, G.; SATO, S.; FUKUYAMA, T.; MORITA, C.; HONDA, K.; ARAI, Y.; ITO, K. Analysis on the guided bone augmentation in the rat calvarium using a microfocus computerized tomography analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 107, n. 6, p. 42-48, 2009.

LAN, S.; LUO, S.; HUH, B. K.; CHANDRA, A.; ALTMAN, A. R.; QIN, L.; LIU, X. S. 3D image registration is critical to ensure accurate detection of longitudinal changes in trabecular bone density, microstructure, and stiffness measurements in rat tibiae by in vivo microcomputed tomography ( $\mu$ CT). **Bone**, v. 56, n. 1, p. 83-90, 2013.

LEPPARANTA, O.; TIKKANEN, J. M.; BESPALOV, M. M.; KOLI, K.; MYLLARNIEMI, M. Bone morphogenetic protein-inducer tilorone identified by high-throughput screening is antifibrotic in vivo. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 48, p. 448–455, 2013.

LI, Y.; LI, X.; SONG, G.; CHEN, K.; YIN, G.; HU, J. Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 23, n. 9, p. 1038-1044, 2012.

LIND, M.; BUNGER, C. Factors stimulating bone formation. **Eur. Spine J.**, v. 10, n. 2, p. 102-109, 2001.

MAÏMOUN, L.; BRENNAN, T. C.; BADOUD, I.; DUBOIS-FERRIERE, V.; RIZZOLI, R.; AMMANN, P.; MARIE, P. J.; FELSENBURG, D.; BRANDI, M. L. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. **Osteoporos Int.**, v. 22, n. 6, p. 1659-1667, 2010.

MARIE, P. J. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 18, n. 1, p. 11-15, 2006.

MARIE, P. J. Cell and gene therapy for bone repair. **Osteoporos Int.**, v. 22, n. 6, p. 2023-2026, 2011.

MONJO, M.; RUBERT, M.; WOHLFAHRT, J. C.; RONOLD, H. J.; ELLINGSEN, J. E.; LYNGSTADAAS, S. P. In vivo performance of absorbable collagen sponges with rosuvastatin in critical-size cortical bone defects. **Acta Biomater.**, v. 6, p. 1405-1412, 2010.

NAGATA, M.; MESSORA, M.; OKAMOTO, R.; CAMPOS, N.; POLA, N.; ESPER, L.; SBRANA, M.; FUCINI, S.; GARCIA, V.; BOSCO, A. Influence of the proportion of particulate

autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 339-45, 2009.

NAKAMURA, T.; SHIRAKATA, Y.; SHINOHARA, Y.; MIRON, R. J.; FURUE, K.; NOGUCHI, K. Osteogenic potential of recombinant human bone morphogenetic protein-9/absorbable collagen sponge (rhBMP-9/ACS) in rat critical size calvarial defects. **Clin. Oral Investig.**, [Epub ahead of print], 2016.

NAVARRO, M.; MICHIARDI, A.; CASTANO, O.; PLANELL, J. A. Biomaterials in orthopaedics ranelate improves implant osseointegration. **Bone**, v. 46, n. 5, p. 1436-1441, 2008.

NEUPREZ, A.; HILIGSMANN, M.; SCHOLTISSEN, S.; BRUYERE, O.; REGINSTER, J. Y. Strontium ranelate: the first agent of a new therapeutic class in osteoporosis. **Adv Ther.**, v. 25, n. 12, p. 1235-1256, 2008.

ORTOLAN, X. R.; FENNER, B. P.; MEZADRI, T. J.; TAMES, D. R.; CORRÊA, R.; DE CAMPOS BUZZI, F. Osteogenic potential of a chalcone in a critical-size defect in rat calvaria bone. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 42, n. 5, p. 520-524, 2014.

PELAEZ, M.; SUSIN, C.; LEE, J.; FIORINI, T.; BISCH, F. C.; DIXON, D. R.; MCPHERSON, J. C.; BUXTON, A. N.; WIKESJO, U. M. E. Effect of rhBMP-2 dose on bone formation/



maturation in a rat critical-size calvarial defect model. **J. Clin. Periodontol.**, v. 41, n. 8, p. 827-836, 2014.

PILITSIS, J. G.; LUCAS, D. R.; RENGACHARY, S. S. Bone healing and spinal fusion. **Neurosurg. Focus.**, v. 13, n. 6, p. e1, 2002.

PORTER, B. D.; LIN, A. S.; PEISTER, A.; HUTMACHER, D.; GULDBERG, R. E. Noninvasive image analysis of 3D construct mineralization in a perfusion bioreactor. **Biomaterials**, v. 28, p. 2525-33, 2007.

PRADO, T. D.; RIBEIRO, R. G.; DAMASCENO, A. D.; NARDI, A. B. Hemostasia e procedimentos anti-hemorrágicos. **Agrarian Academy.**, v. 1, n. 1; p. 225, 2014.

PRITCHARD, J. J. Repair of fractures of the parietal bone in rats. **J. Anat., Oxford.**, v. 80, n. 2, p. 55-60, 1946.

REGINSTER, J. Y; BRANDI, M. L.; CANNATA-ANDÍA, J.; COOPER, C.; CORTET, B.; FERON, J. M.; GENANT, H.; PALACIOS, S.; RINGE, J. D.; RIZZOLI, R. The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis. **Osteoporos Int.**, v. 26, n. 6, p. 1667-1671, 2015.

QUERIDO, W.; FARINA, M. Strontium ranelate increases the formation of bone-like mineralized nodules in osteoblast cell cultures and leads to Sr incorporation into the intact nodules. **Cell Tissue Res.**, v. 354, n. 2, p. 573-580, 2013.

QUERIDO, W.; ROSSI, A. L.; FARINA, M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. **Micron.**, v. 20, 2015 n. 80, p. 122-134, 2015.

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.**, [Epub ahead of print], 2016.

ROSA, J. A.; SAKANE, K. K.; SANTOS, K. C. P.; CORREA, V. B.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; OLIVEIRA, J. X. Strontium Ranelate Effect on the Repair of Bone Defects and Molecular Components of the Cortical Bone of Rats. **Braz. Dent. J.**, v. 27, n. 5, p. 502-507, 2016.

SAIDAK, Z.; MARIE, P. J. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacol. Ther.**, v. 136, n. 2, p. 216-226, 2012.

SANTANA, T. S. Efeito da Terapia celular com a associação de células-tronco mesenquimais e osteoblastos no tecido ósseo. 100f. Tese – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto/SP, 2015.

SCHULTE, F. A.; LAMBERS, F. M.; KUHN, G.; MULLER, R. In vivo micro-computed tomography allows direct three-dimensional quantification of both bone formation and bone resorption parameters using time-lapsed imaging. **Bone**, v. 48, p. 433–442, 2011.

SHINOHARA, Y.; NAKAMURA, T.; SHIRAKATA, Y.; NOGUCHI, K. Bone healing capabilities of recombinant human bone morphogenetic protein-9 (rhBMP-9) with a chitosan or collagen carrier in rat calvarial defects. **Dent. Mater.**, v. 35, n. 3, p. 454-460, 2016.

SUMNER, D. R.; TURNER, T. M.; URBAN, R. M.; TUREK, T.; SEEHERMAN, H.; WOZNEY, J. M. Locally delivered rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gap healing in a canine model. **J. Orthop. Res.**, v. 22, n. 1, p 58-65, 2004.

TAI, I. C.; FU, Y. C.; WANG, C. K.; CHANG, J. K.; HO, M. L. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. **Int. J. Nanomedicine**, v. 8, p. 3895–3904, 2013.

TAKAHASHI, N.; SASAKI, T.; TSOUDEROS, Y.; SUDA, T. S. 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 6, p. 1082-1087, 2003.

VAJGEL, A.; MARDAS, N.; FARIAS, B. C.; PETRIE, A.; CIMÕES, R.; DONOS, N. A systematic review on the critical size defect model. **Clin Oral Implants Res.**, v. 25, n. 8, p. 879-893, 2014.

VERNA, C.; DALSTRA, M.; WIKESJÖ, U. M.; TROMBELLI, L.; CARLES, B. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. **J Clin Periodontol.**, v. 29, n. 9, p. 865-70, 2002.

WANG, J.; GLIMCHER, M. J. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of bone-forming cells. **Calcif. Tissue Int.**, v. 65, n. 6, p. 486-493, 1999.

WOZNEY, J. M.; ROSEN, V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, n. 346, p. 26-37, 1998.

YUNFENG, L.; FENG, G.; GAO, Y.; LUO, E.; LIU, X.; HU, J. Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. **J. Orthop. Res.**, v. 28, n. 5, p. 578-582, 2010.

YOSHII, T.; HAFEMAN, A. E.; ESPARZA, J. M.; OKAWA, A.; GUTIERREZ, G.; GUELCHER, S. A. Local injection of lovastatin in biodegradable polyurethane scaffolds enhances

bone regeneration in a critical-sized segmental defect in rat femora. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 8, p. 589–595, 2014.

ZACCHETTI, G.; DAYER, R.; RIZZOLI, R.; AMMANN, P. Systemic Treatment with Strontium Ranelate Accelerates the Filling of a Bone Defect and Improves the Material Level Properties of the Healing Bone. **Biomed. Res. Int.**, doi: 10.1155/2014/549785, 2014.

ZHU, C. L.; ZHENG, Y.; JIA, Y. A theoretical study on activation of transcription factor modulated by intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations. **Biophys Chem.**, v. 129, n. 1, p. 49-55, 2007.



***Anexos***

## Anexo 1. Documento de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



---

Ribeirão Preto, 5 de maio de 2016

Prezado (a) Pesquisador (a) Walter Martins Junior

Vimos por meio desta, informar que a proposta intitulada “EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O BIO-OSS COLLAGEN EO RANELATO DE ESTRÔNCIO NO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS”, registrada sob o nº 03/2016 e sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) **Walter Martins Junior** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrala (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) 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 de Experimentação Animal - CONCEA e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA UNAERP, em reunião realizada em 23/03/2016.

Atenciosamente,

*Prof.ª Dr.ª Luciana Rezende Alves Oliveira*

**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade de Ribeirão Preto**