



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

RAFAEL REIS RIBEIRO

**EFEITO ANTIRREABSORTIVO ÓSSEO ALVEOLAR DO RANELATO DE
ESTRÔNCIO VIA REDUÇÃO DE TNF- α E IL-1 β NA PERIODONTITE INDUZIDA
POR LIGADURA EM RATOS**

FORTALEZA

2017

RAFAEL REIS RIBEIRO

EFEITO ANTIRREABSORTIVO ÓSSEO ALVEOLAR DO RANELATO DE ESTRÔNCIO
VIA REDUÇÃO DE TNF- α E IL-1 β NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA
EM RATOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vilma de Lima.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R372e Ribeiro, Rafael Reis.

Efeito antirreabsortivo ósseo alveolar do ranelato de estrôncio via redução de TNF-alfa e IL-1beta na periodontite induzida por ligadura em ratos / Rafael Reis Ribeiro. – 2018.
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Vilma de Lima.

1. Ranelato de estrôncio. 2. Reabsorção óssea alveolar. 3. Citocinas inflamatórias. 4. Ligante de RANK. 5. Osteoprotegerina. I. Título.

CDD 615.1

RAFAEL REIS RIBEIRO

EFEITO ANTIRREABSORTIVO ÓSSEO ALVEOLAR DO RANELATO DE ESTRÔNCIO
VIA REDUÇÃO DE TNF- α E IL-1 β NA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA
EM RATOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Vilma de Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Helena Serra Azul Monteiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof.^a Dr.^a Iracema Matos de Melo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe querida, um anjo de Deus na terra, que sempre esteve do meu lado.

Ao meu pai, por tudo que me ensinou, razão pelo que sou hoje.

À Gina, por seu apoio incondicional e por sua dedicação como esposa em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof.^a Dr.^a Vilma de Lima, por ter me acolhido em seu laboratório e por ter contribuído para a minha formação durante esse mestrado, com ensinamentos valiosos, os quais levo para vida.

Ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), antes na pessoa do prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, e hoje, prof. Dr. Roberto C. Pereira Lima Jr., por todo o suporte.

Às professoras Nylane M. N. de Alencar, Mariana Lima Vale e Deysi V. T. Wong por gentilmente terem participado do processo de qualificação de mestrado.

Às professoras Ana Maria S. Assreuy, Helena Serra Azul Monteiro e Iracema Matos de Melo, pela gentileza de comporem a comissão de avaliação de defesa dessa dissertação.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará e aos professores que colaboraram em diversas disciplinas.

Às colegas do Laboratório de Osteofarmacologia (LOF), as pós-graduandas Bianca Moreira Kurita e Iracema Matos Melo, compartilhando diversos ensaios, treinamentos e ensinamentos, e à Fabiana Paim, pelos momentos iniciais de parceria.

Às queridas “ICs” (alunas de iniciação científica), Marina Sarte Fiuza, Tereza Cristina Marques Forte, Lorena Araújo e Mylena Saboia, pela presteza e dedicação.

Aos colegas pós-graduandos do LAFICA, Rafael Santana, Anamaria Falcão, Livia Nobre, e do Laboratório de Farmacologia Bioquímica (LFB), Luana David e a técnica Patrícia Sâmara, pelo auxílio nos ensaios.

Às secretarias do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Laura Alves e Célia Carvalho, pela disponibilidade às nossas solicitações.

Aos médicos-veterinários dos biotérios do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Wesley Lyevertton, e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Gabriela Farias, ambos pela atenção dispensada.

Aos funcionários dos biotérios do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Diego Abreu e Francisco Francismar, e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Adalto e José Moreira, pela presteza nos cuidados dos animais.

"Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta."

Carl Sagan.

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória caracterizada por disbiose e reabsorção óssea alveolar (ROA). O ranelato de estrôncio (SrR), um fármaco utilizado no tratamento da osteoporose, tem se destacado por seus efeitos antirreabsortivo e anabólico ósseos. Avaliou-se os efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseos do SrR na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura. Para tanto, ratas *Wistar* (170 ± 20 g; n=6/grupo), submetidas a 28 dias de ligadura (fio de náilon 3.0) dos segundos molares superiores, receberam por via oral diariamente água para injeção (veículo) ou SrR (70, 210 e 630 mg/kg). Após a eutanásia, suas maxilas foram removidas, e a ROA foi analisada por macroscopia, microscopia e imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG e TRAP. O influxo de neutrófilos foi analisado pela atividade da mieloperoxidase (MPO) na gengiva. Sistemicamente, foram avaliados: níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO) e transaminases AST e ALT, índice hepático, leucograma e peso dos animais. A ligadura durante 28 dias aumentou significativamente a ROA, vista por macroscopia e microscopia, e a MPO, bem como a imunomarcção para TNF- α , IL-1 β , RANKL e TRAP, aumentou a razão RANKL/OPG, reduziu FAO, causou leucocitose e redução de peso nos primeiros dias após a ligadura, sem alterações hepáticas. O SrR (210 e 630 mg/kg) reduziu significativamente a ROA em 22% e 45%, respectivamente, como também (SrR 630 mg/kg) reduziu a lesão de furca em 64%, comparado ao grupo veículo. A histologia evidenciou redução significativa do infiltrado leucocitário e reabsorções óssea e cementária [veículo: Md=2 (2-2); SrR 630 mg/kg: Md=1 (1-1)], bem como da imunomarcção para TNF- α , IL-1 β , RANKL e TRAP em 51%, 54%, 63% e 66%, respectivamente, e da razão RANKL/OPG, sem alteração da MPO. Além disso, SrR (630 mg/kg) preveniu a redução da FAO (60%; p=0,01), reduziu a leucocitose, e não alterou as transaminases nem o curso da variação de peso dos animais. Em suma, o SrR apresentou efeito antirreabsortivo ósseo tanto por reduzir a resposta inflamatória, como por favorecer o anabolismo ósseo, sem alterações sistêmicas nos animais.

Palavras-chave: Ranelato de estrôncio. Reabsorção óssea alveolar. Citocinas inflamatórias. Ligante de RANK. Osteoprotegerina.

ABSTRACT

ALVEOLAR BONE ANTIRESORPTIVE EFFECT OF STRONTIUM RANELATE VIA REDUCTION OF TNF- α AND IL-1 β ON LIGATURE-INDUCED PERIODONTITIS IN RATS

Periodontitis is an inflammatory disease characterized by dysbiosis and alveolar bone resorption (ABR). Strontium ranelate (SrR), a drug used to treat osteoporosis, has been notable for its bone anabolic and antiresorptive effects. The anti-inflammatory and antiresorptive effects of SrR on ligature-induced alveolar bone resorption were evaluated. For this, female *Wistar* rats (170 \pm 20 g; n= 6/group), submitted to 28 days of ligature (3/0 nylon thread) of the second upper molars, received *per os* daily water for injection (vehicle) or SrR (70, 210 and 630 mg/kg). After euthanasia, its jaws were removed, and the ABR was analyzed by macroscopy, microscopy and immunohistochemistry for TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG and TRAP. Neutrophil influx was analyzed by myeloperoxidase (MPO) activity in the gingiva. Systemically, it were evaluated: serum levels of bone-specific alkaline phosphatase (BALP) and AST and ALT transaminases, hepatic index, leukogram and animal weight. Ligature for 28 days significantly increased ABR, as seen by macroscopy and microscopy, and MPO, as well as immunostaining for TNF- α , IL-1 β , RANKL and TRAP, increased the RANKL/OPG ratio, reduced BALP, caused leukocytosis, and weight reduction in the first days after ligature, without liver changes. SrR (210 and 630 mg/kg) significantly reduced ABR by 22% and 45%, respectively, as well (SrR 630 mg/kg) reduced the furcation lesion by 64% compared to the vehicle group. Histology showed significant reduction of leukocyte infiltrate and bone and cement resorption [vehicle: Md=2 (2-2), Mg=1 (1-1)], as well as of the immunostaining for TNF- α , IL-1 β , RANKL and TRAP by 51%, 54%, 63% and 66%, respectively, and of the RANKL/OPG ratio, without change of MPO. In addition, SrR (630 mg/kg) prevented the reduction of BALP (60%, p=0.01), reduced leukocytosis, and did not alter transaminases and the time course of animal weight variation. In summary, SrR presented bone antiresorptive effect by both reduction of inflammatory response and support bone anabolism, without systemic alterations in animals.

Keywords: Strontium ranelate. Alveolar bone resorption. Inflammatory cytokines. RANK ligand. Osteoprotegerin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Células e mediadores químicos envolvidos no processo de remodelação óssea	16
Figura 2	– Vias de sinalização intracelular em pré-osteoclastos e osteoclastos	23
Figura 3	– Vias de sinalização intracelular em células tronco mesenquimais da medula óssea (MSC) e osteoblastos	24
Figura 4	– Patogênese da periodontite crônica	27
Figura 5	– Estrutura molecular do ranelato de estrôncio (SrR)	33
Figura 6	– Mecanismos de ação do estrôncio no osso	36
Figura 7	– Vias de sinalização intracelular ativadas pelo estrôncio	37
Figura 8	– Protocolo Experimental	44
Figura 9	– Delineamentos das regiões de interesse para as análises macroscópica e histométrica das hemimaxilas	46
Figura 10	– Efeito do ranelato de estrôncio (SrR) sobre os aspectos macroscópicos do periodonto de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias	51
Figura 11	– Fotografias de hemimaxilas normal ou submetidas à periodontite	52
Figura 12	– Fotomicrografias de periodontos normais ou submetidos à periodontite	53
Figura 13	– Fotomicrografias de periodontos imunomarcados para TNF- α e IL-1 β de ratas normais ou submetidas à ligadura durante 28 dias	55
Figura 14	– Fotomicrografias de periodontos imunomarcados para RANKL, OPG e TRAP de ratas normais ou submetidas à ligadura durante 28 dias	56
Figura 15	– Razão RANKL / OPG	57
Figura 16	– Efeito do ranelato de estrôncio (SrR) na variação de massa corpórea de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) sobre aspectos microscópicos do periodonto de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias	53
Tabela 2 – Efeito do ranelato de estrôncio (SrR) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na gengiva de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias	54
Tabela 3 – Efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) sobre parâmetros sistêmicos de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Complexo avidina-biotina conjugado
Akt	Proteinoquinase B
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AP	Proteína ativadora
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
BMP	Proteína morfogenética óssea
c-Fms	Receptor do fator estimulador de colônias de monócitos
CaSR	Receptor sensor de cálcio
Cn	Calcineurina
CT	Calcitonina
DMO	Densidade mineral óssea
DMP	Proteína de matriz de dentina
EDTA	Ácido etileno-di-amino-tetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FAO	Fosfatase alcalina óssea
FAT	Fosfatase alcalina total
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
H-TAB	Hexadecil-trimetil-brometo de amônio
HCl	Ácido clorídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN γ	Interferona <i>gama</i>
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina (Ex: IL-1 β , IL-6, IL-17, etc.)
JAC	Junção amelo cementária
MAPK	Proteinoquinase ativada por mitógeno
M-CFU	Unidade formadora de colônia de monócitos
M-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos

MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MSC	Célula tronco mesenquimal da medula óssea
NFATc	Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NO	Óxido nítrico
OPG	Osteoprotegerina
OSX	Fator de transcrição Osterix
PBS	Solução tampão de fosfato
PGE ₂	Prostaglandina E 2
PKA	Proteinoquinase A
PKC	Proteinoquinase C
PLC	Fosfolipase C
PTH	Hormônio da paratireoide (paratormônio)
RANK	Receptor ativador do NF- κ B
RANKL	Ligante do receptor ativador do NF- κ B
ROA	Reabsorção óssea alveolar
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Runx	Fator de transcrição relacionado a RUNT
SOST	Esclerostina
SrR	Ranelato de estrôncio
TGF- β	Fator transformador de crescimento <i>beta</i>
Th	Linfócitos T <i>helper</i> (linfócitos T auxiliares)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i>
TRAF	Fator associado ao receptor de TNF
TRAP	Fosfatase ácida tartarato-resistente
VCAM	Moléculas de adesão vascular
Wnt	Proteínas relacionadas aos genes Wingless e INT
1,25-D ₃	1,25-di-hidroxicolecalciferol (calcitriol)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Remodelação óssea	15
2.2	Periodontite crônica	25
2.3	Ranelato de estrôncio	33
3	OBJETIVOS	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	Animais	42
4.2	Fármacos, anticorpos e reagentes	42
4.3	Protocolo experimental	43
4.3.1	<i>Indução da reabsorção óssea alveolar</i>	43
4.3.2	<i>Grupos experimentais</i>	43
4.3.2.1	<i>Grupo controle normal</i>	43
4.3.2.2	<i>Grupos veículo</i>	44
4.3.2.3	<i>Grupos tratados com ranelato de estrôncio (SrR)</i>	44
4.4	Parâmetros de avaliação	45
4.4.1	<i>Análise do periodonto</i>	45
4.4.1.1	<i>Análise macroscópica do tecido ósseo alveolar</i>	45
4.4.1.2	<i>Análises microscópicas do periodonto</i>	45
4.4.1.2.1	<i>Análise histométrica do osso alveolar</i>	45
4.4.1.2.2	<i>Análise histopatológica do periodonto</i>	46
4.4.2	<i>Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO) em gengiva</i>	47
4.4.3	<i>Análises imuno-histoquímicas para TNF-α, IL-1β, RANKL, OPG e TRAP</i>	47
4.4.4	<i>Análise de parâmetros sistêmicos</i>	48
4.4.4.1	<i>Dosagem sérica da fosfatase alcalina óssea (FAO)</i>	48
4.4.4.2	<i>Dosagens séricas das transaminases hepáticas AST e ALT</i>	49
4.4.4.3	<i>Análise do índice hepático</i>	49
4.4.4.4	<i>Leucograma</i>	49
4.4.4.5	<i>Análise da variação da massa corpórea dos animais</i>	49
4.5	Análise estatística	50
5	RESULTADOS	51

5.1	Aspectos macroscópicos do efeito do ranelato de estrôncio (SrR) na reabsorção óssea alveolar	51
5.2	Aspectos microscópicos dos efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) na reabsorção óssea alveolar	52
5.2.1	<i>Análises histométrica e histopatológica</i>	52
5.2.2	<i>Efeito do ranelato de estrôncio (SrR) na atividade da mieloperoxidase (MPO) em gengiva</i>	54
5.2.3	<i>Análises imuno-histoquímicas para TNF-α, IL-1β, RANKL, OPG e TRAP</i>	54
5.3	Efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) em parâmetros sistêmicos	57
5.3.1	<i>Dosagens séricas da fosfatase alcalina óssea e das transaminases hepáticas</i>	57
5.3.2	<i>Leucograma</i>	58
5.3.3	<i>Variação da massa corpórea dos animais</i>	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	APÊNDICE – Fotomicrografias dos controles negativos das imuno-histoquímicas para TNF-α, IL-1β, RANKL, OPG e TRAP	80
	ANEXO – CERTIFICADO DA CEUA UFC	81

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença crônica caracterizada por uma resposta imunoinflamatória do hospedeiro, decorrente do acúmulo de patógenos nos tecidos periodontais de sustentação e proteção dos dentes, culminando na perda da inserção dentoalveolar, em consequência da destruição do osso alveolar, do cimento radicular e do ligamento periodontal (DENTINO *et al.*, 2013; HAJISHENGALLIS, 2015). A fisiopatologia dessa doença é bem semelhante a de outras doenças osseoinflamatórias, como a artrite reumatoide, por exemplo (ARAÚJO; MELO; LIMA, 2015; YANG *et al.*, 2017). Muitas abordagens farmacológicas vêm sendo investigadas com o propósito de se encontrar um tratamento eficaz para doenças de caráter osseoinflamatório, sem que esse apresente efeitos colaterais que culminem no seu interrompimento. Nesse sentido, os fármacos antirreabsortivos ósseos, especialmente os utilizados no tratamento da osteoporose, têm sido avaliados. Os bisfosfonatos, fármacos de primeira escolha para tratar a osteoporose, estão associados à osteonecrose dos maxilares (PICHARDO; MERKESTEYN, 2013). Além disso, recentemente foi demonstrado que o ácido zoledrônico, um potente bisfosfonato, aumenta os níveis de marcadores inflamatórios no periodonto (SILVA, P. G. B. *et al.*, 2017). Esses fatos praticamente inviabilizam o seu uso junto a pacientes com periodontite. Por outro lado, o ranelato de estrôncio (SrR), um fármaco relativamente recente utilizado no tratamento da osteoporose grave, pode se tornar uma alternativa ao manejo das doenças osseoinflamatórias, inclusive podendo beneficiar pacientes com periodontite, devido ao seu mecanismo dual, agindo tanto como antirreabsortivo como anabólico ósseos, e com efeitos colaterais mínimos.

Muitos trabalhos têm investigado os efeitos do SrR na osteoporose (KAUFMAN *et al.*, 2013; MEUNIER *et al.*, 2004; REGINSTER *et al.*, 2005, 2012) e em outras patologias e distúrbios do organismo, como na osteoartrite (NUNES *et al.*, 2015; REGINSTER *et al.*, 2013), na inflamação da articulação temporomandibular (ALVES *et al.*, 2017), no estresse oxidativo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013) e até mesmo na dor (ALVES *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2015); contudo, na periodontite os trabalhos são escassos. Apesar do vasto conhecimento sobre as periodontites e sobre o próprio ranelato de estrôncio, existem alguns aspectos intrínsecos a ambos, tanto em nível de resposta imunoinflamatória, como de mecanismo de ação desse fármaco em que, eventualmente participem vias de sinalização diversas, e que carecem de maiores estudos. Logo, buscou-se analisar os efeitos do ranelato de estrôncio sobre os mediadores inflamatórios e o potencial anabólico induzidos em modelo de periodontite.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Remodelação óssea

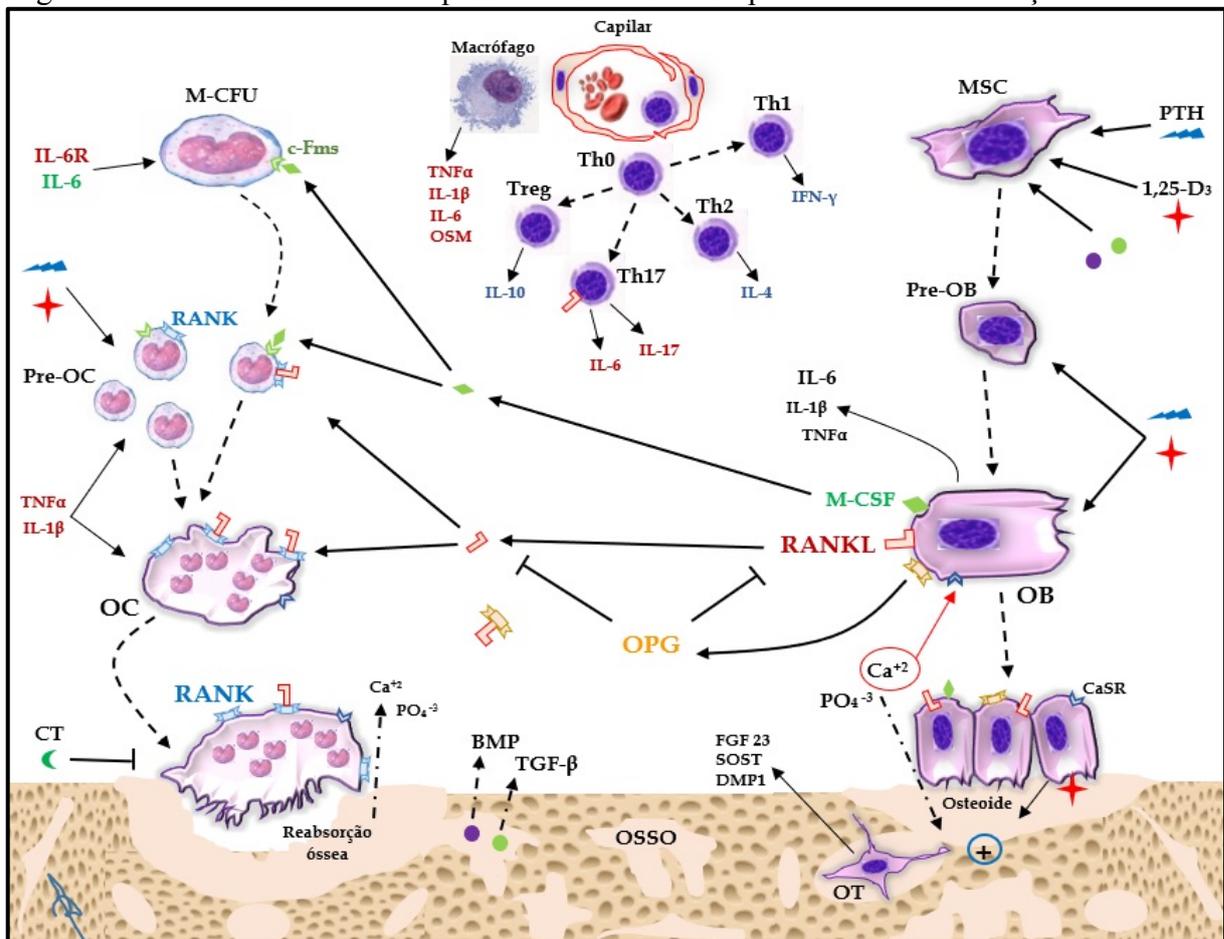
O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células e uma matriz proteica extracelular mineralizada por cristais de cálcio e fosfato, conhecidos como hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. O tecido ósseo sofre contínua remodelação ao longo da vida, através de atividades equilibradas e conjuntas entre as células reabsortivas, os osteoclastos, e as células osteogênicas, os osteoblastos. Outro tipo celular é o osteócito, um osteoblasto na fase terminal de sua diferenciação, e que também regula a remodelação óssea, em parte, ao responder ao estresse biomecânico do osso, produzindo citocinas específicas (DATTA *et al.*, 2008).

O processo de remodelação óssea é regulado por fatores sistêmicos (hormônios) e locais (citocinas), os quais mantêm um estreito acoplamento entre reabsorção e formação ósseas. Desvios significativos neste equilíbrio resultam em reabsorção ou formação ósseas aumentadas e anormais. Em condições fisiológicas, a liberação desses fatores é, em sua maior parte, influenciada pelos níveis séricos dos íons cálcio e fosfato (ERIKSEN, 2010; PACIFICI, 2010; PAGLIARI *et al.*, 2015). Uma leve oscilação na concentração plasmática desses íons, ainda que mínima, já é o bastante para desencadear a liberação dos hormônios que iniciam o processo de remodelação óssea (ERIKSEN, 2010). São vários os hormônios e citocinas envolvidos no metabolismo ósseo, com destaque o eixo receptor ativador do fator nuclear *kappa* B (RANK)/ligante do RANK (RANKL)/osteoprotegerina (OPG), considerado o principal mecanismo regulador da remodelação óssea, com a participação de células e mediadores químicos de origem local e sistêmica (PACIFICI, 2010) (FIGURA 1).

A remodelação óssea se inicia pela reabsorção osteoclástica, que escava uma lacuna de reabsorção no osso, em um processo que dura em média 30 a 40 dias (ERIKSEN, 2010). Os osteoclastos são derivados de células tronco hematopoiéticas da linhagem mieloide, a mesma que dá origem a monócitos e aos macrófagos teciduais, que se diferenciam em uma unidade formadora de colônia de monócitos (M-CFU). Esta unidade celular recebe a influência de uma citocina produzida por células tronco mesenquimais da medula óssea (MSC) e por osteoblastos, o fator estimulador de colônia de monócitos (M-CSF), que interage com seu receptor de membrana, c-Fms, para dar início ao processo de proliferação dos

progenitores de osteoclastos (DATTA *et al.*, 2008; PACIFICI, 2010). Esses progenitores (pré-osteoclastos) expressam em sua membrana o RANK, que é ativado pelo seu ligante, RANKL, principal citocina envolvida na osteoclastogênese e que é sintetizada especialmente por osteoblastos, além de MSC (YASUDA *et al.*, 1998), osteócitos (O'BRIEN; NAKASHIMA; TAKAYANAGI, 2013; YASUDA *et al.*, 1998), fibroblastos (QUINN *et al.*, 2000; RÖMER *et al.*, 2012), linfócitos T ativados (HORWOOD *et al.*, 1999) e linfócitos B (LIU, H. *et al.*, 2017; MANABE *et al.*, 2001).

Figura 1 – Células e mediadores químicos envolvidos no processo de remodelação óssea



Representação ilustrativa do processo de remodelação óssea e a influência do sistema imunológico. O processo inicia-se pela reabsorção osteoclástica, influenciada pelo fator estimulador de colônia de monócitos (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL), que ativam osteoclastos (OC). Fator de crescimento transformador β (TGF- β) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) são liberados da matriz óssea em decomposição e estimulam células tronco mesenquimais ósseas (MSC) a se diferenciarem em osteoblastos (OB) formadores de osso. OB produzem osteoprotegerina (OPG) que impede a interação RANK-RANKL. Osteócitos (OT) produzem esclerostina (SOST) que inibe a osteoblastogênese. Células imunológicas como os macrófagos e os linfócitos T *helper* (Th) liberam citocinas inflamatórias tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas (IL), favorecendo a osteoclastogênese. PTH, paratormônio; 1,25-D₃, calcitriol; CaSR, receptor sensor de cálcio; FGF 23, fator de crescimento fibroblástico 23; DMP1, proteína de matriz de dentina 1; Ca⁺², íon cálcio; PO₄⁻³, íon fosfato; M-CFU, unidade formadora de colônia de monócitos; RANK, receptor ativador do fator nuclear κ B; c-Fms, receptor do M-CSF; CT, calcitonina; Treg, linfócito T regulador; OSM, oncostatina M; IFN- γ , interferona *gama*. Seta contínua indica síntese/interação, seta tracejada indica diferenciação, seta ponto-tracejada indica troca de substâncias entre osso e interstício, barra em 'T' indica inibição. [Elaborado pelo autor. Baseado em PAGLIARI *et al.*, 2015; WALSH; CHOI, 2014].

O RANK é um receptor membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), e sua estimulação ativa vias que envolvem o fator associado ao receptor de TNF (TRAF) para ativar o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), culminando, adiante, na diferenciação, na maturação e na ativação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros (DATTA *et al.*, 2008; PAGLIARI *et al.*, 2015; WALSH; CHOI, 2014; WEITZMANN, 2017). O RANK também ativa outras vias de sinalização, como as de quinase c-Jun N-terminal (JNK) e de fosfolipase C γ (PLC γ), culminando na ativação dos fatores c-Fos e proteína ativadora 1 (AP-1), e na estimulação da via cálcio/calcineurina, respectivamente, para finalmente promover a ativação do fator nuclear de células T ativadas 1 (NFATc1), fator de transcrição chave para osteoclastogênese (DATTA *et al.*, 2008; IKEDA *et al.*, 2003; WALSH; CHOI, 2014; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). Em oposição a esse processo, os osteoblastos também produzem uma molécula solúvel, a osteoprotegerina (OPG), que age como um receptor com alta afinidade para RANKL. A OPG impede a interação entre RANKL e seu receptor original (RANK), prevenindo a osteoclastogênese e, conseqüentemente, aumentando a apoptose de osteoclastos. Portanto, a OPG desempenha a função de uma citocina antiosteoclastogênica (PACIFICI, 2010; WALSH; CHOI, 2014). A expressão de OPG pelos osteoblastos pode ser aumentada por hormônios sexuais, como o estrógeno, baixas doses de paratormônio (PTH) (ERIKSEN, 2010), íons cálcio e calcimiméticos como o estrôncio e outros cátions bivalentes (MARIE; FELSENBURG; BRANDI, 2011; PI; QUARLES, 2004).

Os osteoclastos na forma ativada aderem à superfície óssea, através da interação de proteínas de membrana, como a integrina $\alpha_v\beta_3$, com proteínas da matriz óssea, tais como osteopontina e sialoproteína óssea. A partir dessa interação, são ativadas vias de sinalização intracelular que dão início a mudanças no citoesqueleto do osteoclasto, para formar a chamada borda em escova, e ao processo de degradação da matriz óssea, com a produção e/ou liberação de ácido clorídrico (HCL), espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas proteolíticas (DATTA *et al.*, 2008). As principais enzimas liberadas nesse processo são a catepsina K, a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) e a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) (IÑIGUEZ-ARIZA; CLARKE, 2015), esta última, secretada como uma pró-enzima e ativada por proteinases, como a catepsina K (BLUMER *et al.*, 2012; HAYMAN; COX, 2004; HOLLBERG *et al.*, 2005). Foi relatado que a TRAP tem um papel importante na degradação de osteopontina e outras proteínas ósseas, mas também pode exercer um papel regulador no

processo de reabsorção óssea e na imunidade inata, pois modula a sinalização osteopontina/integrina em osteoclastos e macrófagos (HAYMAN; COX, 2004; HOLLBERG *et al.*, 2002).

Ao final de sua atividade reabsortiva, os osteoclastos aumentam a expressão das proteínas transmembrana efrina B2 e receptor de efrina EphB4, bem como a síntese e secreção da quimiocina fosfolipídica 1-fosfato de esfingosina (S1P). O S1P interage com um grupo especial de receptores acoplados à proteína G, os Edg, expressos na membrana das MSC e dos osteoblastos, e desencadeia importantes funções para início da osteogênese, como migração, adesão, diferenciação e sobrevivência dos osteoblastos. Por conseguinte, pré-osteoblastos recrutados aos locais de reabsorção óssea interagem com osteoclastos através do contato célula a célula e ativam a sinalização efrina B2/EphB4. Tanto osteoclastos como osteoblastos expressam efrina B2 e receptor EphB4, e estabelecem uma comunicação bidirecional, que promove o aumento da diferenciação osteoblástica, ao mesmo tempo que inibe a diferenciação de osteoclastos. Isto encerra o processo de reabsorção e inicia a fase de formação óssea (ERIKSEN, 2010; MATSUO; OTAKI, 2012; MESHCHERYAKOVA; MECHTCHERIAKOVA; PIETSCHMANN, 2017). Vale mencionar, ainda, que o fator endócrino calcitonina (CT), um hormônio produzido pela glândula tireoide em resposta a altos níveis séricos de cálcio, contribui para cessão do processo reabsortivo ósseo ao induzir a desorganização do citoesqueleto e interromper a atividade enzimática de osteoclastos, além de inibir a sinalização RANK/RANKL. Esse hormônio também controla o metabolismo do cálcio e do fosfato, e a conversão renal da vitamina D (DAVEY; FINDLAY, 2013).

Após o término do processo de reabsorção óssea, progenitores de osteoblastos, recrutados para as cavidades de reabsorção deixadas pelos osteoclastos, se diferenciam e iniciam a deposição de tecido osteoide, em um processo que pode durar de 3 a 6 meses (DATTA *et al.*, 2008; ERIKSEN, 2010). Os osteoblastos derivam das células tronco mesenquimais da medula óssea (MSC). Uma série de hormônios e fatores de crescimento locais e sistêmicos estimulam essas células mesenquimais, em diferentes estágios, as quais se proliferarem, geram pré-osteoblastos e finalmente se diferenciam em osteoblastos formadores de osso. É de suma importância para proliferação e diferenciação osteoblástica a expressão do fator de transcrição relacionado a RUNT 2 (Runx2) e do fator de transcrição Osterix (OSX). Esses fatores de transcrição gênica são ativados pelas sinalizações intracelulares desencadeadas pelas interações de receptores na membrana das MSC e de pré-osteoblastos com fatores estimuladores, tais como fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador *beta* (TGF- β), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fator de

crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento fibroblástico (FGF), paratormônio (PTH), hormônio do crescimento (GH), prostaglandina E₂ (PGE₂), bem como pela sinalização do receptor nuclear de calcitriol (1,25-di-hidroxicolecalciferol, a forma ativa da vitamina D₃). O Runx2 parece ser essencial na fase inicial de proliferação de progenitores osteoblásticos, enquanto o OSX é mais requerido na fase de diferenciação para osteoblastos maduros (DATTA *et al.*, 2008; ERIKSEN, 2010). Um outro fator de crescimento importante também é o fator estimulador de osteoblastos 1 (OSF-1), também chamado de pleiotrofina, que é quimiotático para osteoprogenitores e estimula a atividade de osteoblastos maduros, de forma autócrina e parácrina (DATTA *et al.*, 2008).

Muitos dos fatores de crescimento envolvidos na osteoblastogênese estão aprisionados na matriz óssea calcificada, e são liberados durante a degradação óssea pelos osteoclastos, dentre eles, TGF- β , BMPs e IGF-1. Já hormônios endócrinos, como o PTH e o calcitriol, têm a sua secreção aumentada na corrente sanguínea em resposta a baixos níveis séricos de íons cálcio. Esses dois hormônios, em níveis séricos regulares e intermitentes, favorecem o anabolismo ósseo. O PTH em baixas concentrações aumenta a expressão de OPG e reduz a de RANKL pelos osteoblastos. Efeito oposto é observado durante a elevação crônica de sua concentração, o que favorece a osteoclastogênese (ERIKSEN, 2010). O calcitriol induz a expressão das proteínas constituintes da matriz óssea pelos osteoblastos, mas em excesso, desfavorece a formação óssea, ao aumentar os níveis de pirofosfatos inibidores de mineralização, e ao induzir o aumento de RANKL dependente de PTH (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018). Os fatores TGF- β e BMP induzem a expressão de um grupo de proteínas denominadas Wnt (junção das palavras Wingless, um gene de drosófila, e INT, um gene comum a vertebrados), importantes reguladoras da osteoblastogênese e osteoclastogênese, envolvidas principalmente nos processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência das células ósseas. A via de sinalização de Wnt pode ser ativada de forma autócrina ou parácrina, e nos osteoblastos, ela é inibida por osteócitos, quando estes liberam esclerostina (SOST), em resposta ao aprisionamento na matriz óssea neoformada (BULLOCK; ROBLING, 2017; GLASS; KARSENTY, 2007).

Os osteócitos encontram-se dispersos pela matriz óssea e constituem mais de 90% das células ósseas de um adulto. Eles são células em fase final de diferenciação, tendo atividade de formação óssea muito mais baixa que a dos osteoblastos. Ainda assim, contribuem com a manutenção da estrutura óssea, respondendo ao estresse mecânico sobre o osso, decorrente principalmente de exercícios físicos, e interagindo com as demais células ósseas. Além de SOST, os osteócitos sintetizam RANKL e fatores de crescimento como, as

BMPs, a proteína de matriz de dentina 1 (DMP1) e o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF 23), este último, considerado um hormônio endócrino, que controla o metabolismo do fosfato (DATTA *et al.*, 2008; ERIKSEN, 2010).

No processo de neoformação óssea, os osteoblastos expressam e liberam uma série de proteínas estruturais e reguladoras que constituem o tecido osteoide. O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural da matriz óssea. As proteínas reguladoras, como a osteopontina, a osteocalcina e a osteonectina, são importantes no processo de mineralização do tecido osteoide, promovendo a captação do cálcio e do fosfato do sangue. Os osteoblastos expressam ainda a isoforma óssea da fosfatase alcalina (FAO) (ERIKSEN, 2010). A FAO é uma metaloenzima presente na membrana plasmática dos osteoblastos ativos, e é essencial para mineralização e formação da matriz óssea (FERNANDEZ; KIDNEY, 2007; VAN HOOFF; DE BROE, 1994). Suas principais funções são: destruição hidrolítica dos pirofosfatos inorgânicos e do ATP, inibidores da mineralização; hidrólise de ésteres de fosfato orgânico, o que aumenta a concentração local de íons fosfato, facilitando a precipitação de fosfato de cálcio; transporte ativo de cálcio e de fosfato, através de sua atividade ATPase; e direcionamento das vesículas osteoblásticas de mineralização ao longo das fibras de colágeno. Em resumo, a FAO adequa e prepara os locais de reabsorção para receber o tecido osteoide, e direciona a formação dos cristais de hidroxiapatita (VAN HOOFF; DE BROE, 1994).

Sabe-se que diversas células do sistema imunológico e citocinas pró-inflamatórias participam do processo de reabsorção óssea (IÑIGUEZ-ARIZA; CLARKE, 2015; PACIFICI, 2010; SCHETT, 2011; WALSH; CHOI, 2014). Foi demonstrado que algumas citocinas, tais como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-17 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (IÑIGUEZ-ARIZA; CLARKE, 2015; SCHETT, 2011; WALSH; CHOI, 2014), e mediadores lipídicos como a prostaglandina E₂ (PGE₂) (WALSH; CHOI, 2014; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013) aumentam a expressão de RANKL e reduzem a expressão de OPG, resultando, portanto, em aumento da reabsorção óssea osteoclástica. Além disso, TNF- α e IL-1 β estão especialmente envolvidas na diferenciação e ativação de osteoclastos, ao estimularem a fusão de pré-osteoclastos e a aumentarem a resposta da sinalização RANK/RANKL (PAGLIARI *et al.*, 2015).

Embora as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-17 possuam um papel importante na ativação do eixo RANK/RANKL, o TNF- α exerce um papel único, que o torna um fator osteoclastogênico extremamente potente. Ele atua de forma sinérgica com RANKL a transdução de sinal através do fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF6), intensificando a osteoclastogênese e conseqüentemente a reabsorção óssea (WEITZMANN,

2017). E mais, alguns estudos relatam que o TNF- α pode agir independente de RANKL. Na ausência de TRAF6, requerido para sinalização RANK/RANKL, o TNF- α ativaria outros TRAF, como o TRAF2, para induzir NF- κ B e a osteoclastogênese (KOBAYASHI *et al.*, 2000; YAO *et al.*, 2017). Além disso, TNF- α é um potente indutor da expressão de RANKL em MSC, pré-osteoblastos e osteoblastos, sendo considerado uma das citocinas inflamatórias mais importantes no processo de reabsorção óssea em diversas doenças osseoinflamatórias, a exemplo, da artrite reumatoide e da periodontite. Outra função do TNF- α no tecido ósseo é o recrutamento de progenitores de osteoclastos e de células mesenquimais. Ele aumenta a expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM) e de moléculas de adesão vascular (VCAM), otimizando a capacidade de migração dessas células (KARNES; DAFFNER; WATKINS, 2015). O TNF- α é a primeira citocina a ser liberada nos processos inflamatórios e suas principais fontes são macrófagos e células dendríticas ativadas, mastócitos, linfócitos T auxiliares (*helper*) ativados, fibroblastos e células mesenquimais (CUNHA *et al.*, 2005; KARNES; DAFFNER; WATKINS, 2015; PAGLIARI *et al.*, 2015; WALSH; CHOI, 2014).

Juntamente com o TNF- α , a IL-1 β exerce papel importante na ativação de osteoclastos, ativando a via de NF- κ B e conseqüentemente intensificando a sinalização intracelular desencadeada pela interação RANK/RANKL (WALSH; CHOI, 2014; WEITZMANN, 2017). IL-1 β faz parte de uma família da qual pertencem também IL-1 α , IL-1Ra, IL-18 e IL-33, estes 3 últimos, antiosteoclastogênicos (SCHETT, 2011). A IL-1 β ativa a via “*downstream*” TRAF6, através da interação do “domínio da morte” (DD) do receptor de IL-1 (IL-1R) com a proteína adaptadora de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e ativação da quinase associada a IL-1R 1 (IRAK1), culminando na translocação de NF- κ B para o núcleo (WANG *et al.*, 2017). Em células mesenquimais da medula óssea, parece que a IL-1 β é requerida para expressão de RANKL mediada por TNF- α (SCHETT, 2011), pois observou-se que em camundongos “*knockout*” para IL-1 ocorre menor reabsorção óssea (WEI *et al.*, 2005).

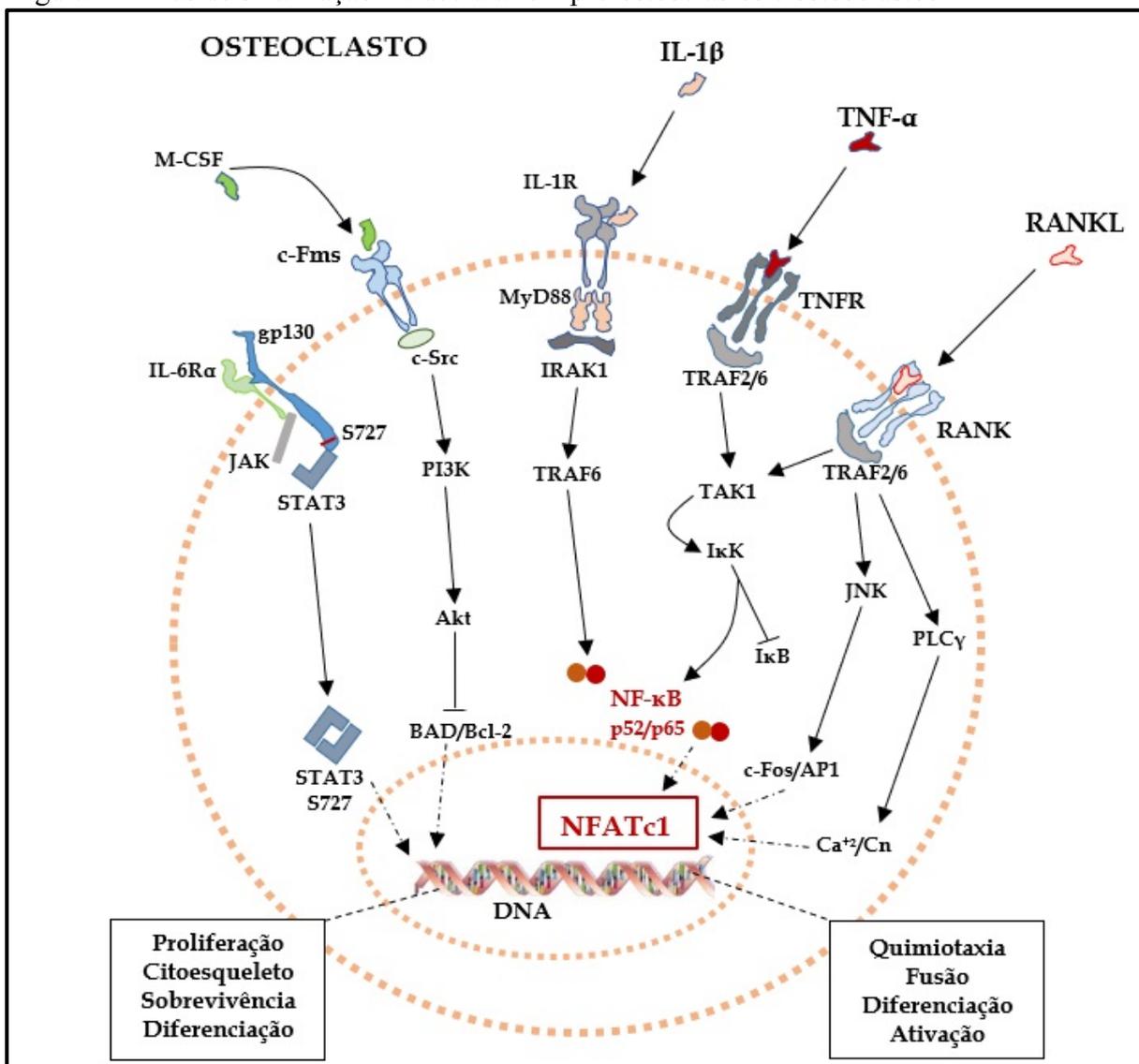
De maneira geral as citocinas pró-inflamatórias induzem a reabsorção óssea, mas observou-se que a IL-6 possui também efeito antiosteoclastogênico, contrário aos seus efeitos inflamatórios e estimuladores da expressão de RANKL pelos osteoblastos (DUPLOMB *et al.*, 2008; YOSHITAKE *et al.*, 2008). Em estado fisiológico, o receptor de IL-6 na membrana do osteoclasto exibe atividade constitutiva, via subunidade glicoproteína 130 (gp130), que ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), o qual interage com NF- κ B, induzido pela sinalização RANK/RANKL, para manter a diferenciação osteoclástica. Em oposição a esse efeito, o aumento na concentração de IL-6 no microambiente ósseo permite a interação

direta da citocina com seu receptor na membrana dos progenitores de osteoclastos (DUPLOMB *et al.*, 2008). Isso ativa outras vias de gp130, as quais suprimem as vias de sinalização de RANK, especificamente a degradação de I κ B (inibidor de NF- κ B) e a ativação de JNK e, conseqüentemente, inibem a diferenciação osteoclástica, exercendo assim um papel regulatório na remodelagem óssea (YOSHITAKE *et al.*, 2008). Esse fato denota a participação de vias de sinalização diversas no processo de reabsorção óssea, e por vezes até contraditórias.

Uma outra citocina que está claramente implicada com processos patológicos de reabsorção óssea é a IL-17A ou simplesmente IL-17, membro de uma família contendo outras 5 isoformas (IL-17B a F) (ISAILOVIC *et al.*, 2015; MATSUZAKI; UMEMURA, 2017). IL-17A é produzida especialmente por linfócitos T CD4+ (*helper*) diferenciados em células Th17 (KORN *et al.*, 2009). A IL-17 está presente em processos inflamatórios diversos, inclusive no osso, onde promove amplificação da produção de outras citocinas como IL-1 β e IL-6 pelas células mesenquimais e osteoblastos, e está relacionada ao aumento da expressão de RANKL. A IL-17 já foi apontada como uma citocina chave na patogênese de doenças como artrite reumatoide e periodontite (ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015).

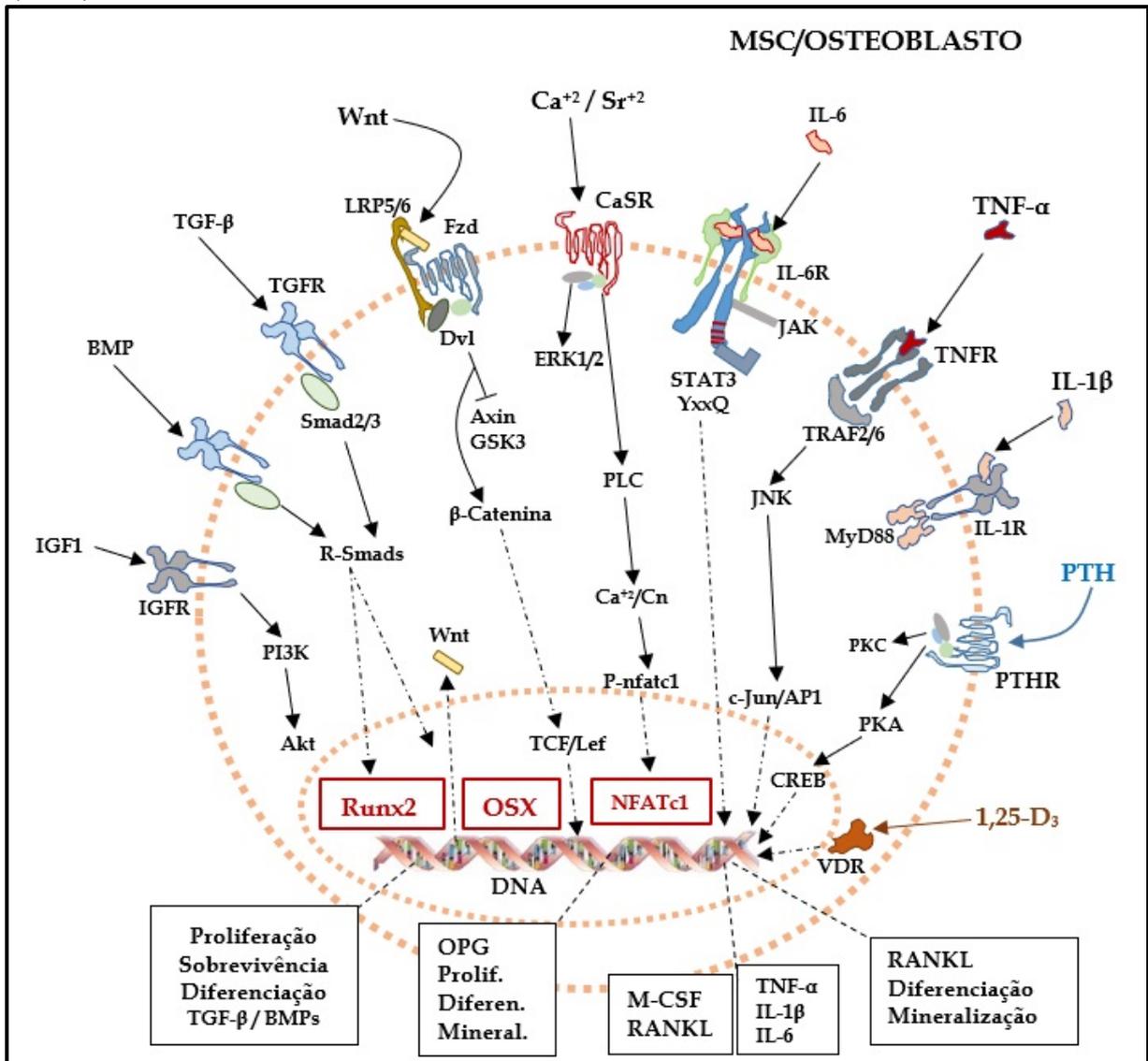
As figuras 2 e 3 ilustram as diversas vias de sinalização intracelular ativadas em osteoclastos e osteoblastos durante o processo de remodelação óssea. São representados os principais receptores envolvidos e seus respectivos ligantes extracelulares.

Figura 2 – Vias de sinalização intracelular em pré-osteoclastos e osteoclastos



Representação ilustrativa das vias de sinalização intracelular ativadas em pré-osteoclastos e osteoclastos durante a remodelação óssea. Essas vias de sinalização ativam fatores de transcrição chave para osteoclastogênese, que incluem o fator nuclear *kappa* B (NF-κB) e o fator nuclear de células T ativadas 1 (NFATc1). p52 e p65, subunidades ativas de NF-κB relacionadas à diferenciação; TRAF, fator associado ao receptor de TNF; TAK, quinase associada a TRAFs; MyD88, proteína adaptadora de diferenciação mielóide 88; IRAK, quinase associada a receptor de IL-1; IκB, inibidor de NF-κB; IKK, quinase de IκB; JNK, quinase c-Jun N-terminal; PLCγ, fosfolipase C *gamma*; c-Fos/AP1, complexo ativador AP-1; Ca²⁺/Cn, cálcio-calcineurina; c-Src, proto-oncogene tirosinoquinase Src (proteína de domínio SH2); PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; Akt, proteinoquinase B; BAD/Bcl-2, promotor da morte associado a Bcl-2 (complexo pró-apoptose); gp130, glicoproteína 130 (IL-6Rβ); S727, resíduo 727 de serina; JAK, quinase de Janus; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição. Seta contínua indica interação e cascata da sinalização, seta tracejada indica ação (indicada nos quadros), seta ponto-tracejada indica translocação para dentro do núcleo, barra em 'T' indica inibição. [Elaborado pelo autor. Baseado em IÑIGUEZ-ARIZA; CLARKE, 2015 e vários outros autores].

Figura 3 – Vias de sinalização intracelular em células tronco mesenquimais da medula óssea (MSC) e osteoblastos



Representação ilustrativa das vias de sinalização intracelular ativadas em células tronco mesenquimais da medula óssea (MSC), pré-osteoblastos e osteoblastos durante a remodelação óssea. Tais vias de sinalização ativam vários fatores de transcrição, em diferentes estágios, essenciais para osteoblastogênese, dentre eles, fator relacionado a RUNT 2 (Runx2), osterix (OSX), fator nuclear de células T ativadas 1 (NFATc1), proteína de ligação a elementos de resposta ao monofosfato de adenosina cíclico (CREB) e fatores de transcrição da via canônica de Wnt (TCF/Lef, fator de células T/fator potenciador linfóide). Wnt, proteínas relacionadas aos genes Wingless e INT; LRP/Fzd, complexo receptor de proteínas Wnt [receptor Frizzled + proteína relacionada ao receptor de LDL (lipoproteína de baixa densidade)]; Dvl, proteína Dishevelled; Axin/GSK3, complexo de destruição axin/quinase glicogênio sintase 3; CaSR, receptor sensor de cálcio; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; PKA, proteinoquinase A; PKC, proteinoquinase C; VDR, receptor nuclear de vitamina D; YxxQ, motivo xxQ de resíduos de tirosina; Smad, proteínas substrato do receptor de TGF; R-Smads, Smads reguladas por receptor. Seta contínua indica interação e cascata da sinalização; seta tracejada indica ação (indicada nos quadros), seta ponto-tracejada indica translocação para dentro do núcleo (e expressão de Wnt), barra em 'T' indica inibição. [Elaborado pelo autor. Baseado em INIGUEZ-ARIZA; CLARKE, 2015 e vários outros autores].

2.2 Periodontite Crônica

A periodontite é uma doença crônica caracterizada por uma resposta imunoinflamatória do hospedeiro à disbiose na cavidade oral e acúmulo de patógenos nos tecidos de sustentação e proteção dos dentes, coletivamente conhecidos como periodonto. Em decorrência dessa resposta inflamatória, ocorre a destruição do osso alveolar, a reabsorção do cemento radicular e a degradação do ligamento periodontal, acarretando a perda da inserção dentoalveolar e, por fim, a perda dentária (DENTINO *et al.*, 2013; HAJISHENGALLIS, 2015; WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017).

Pode haver um viés na estatística de incidência e prevalência das doenças periodontais, devido a casos erroneamente classificados e o número de dentes e sítios examinados, mas estima-se que a periodontite afete cerca de 20% a 50% da população mundial (NAZIR, 2017), com uma prevalência em torno de 11% para forma severa da doença (RICHARDS, 2014). As medidas da perda de inserção periodontal e da profundidade da sondagem em seis sítios de todos os dentes (exceto terceiros molares) têm sido o padrão para estimar a doença periodontal, na América e em muitos outros países (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; NAZIR, 2017). Atualmente, a periodontite é considerada a causa principal das perdas dentárias em adultos e uma das duas maiores ameaças à saúde bucal (NAZIR, 2017), repercutindo também na fonação, na mastigação e na autoestima do indivíduo (SANZ *et al.*, 2018); além de afetar a saúde sistêmica, ao aumentar o risco para doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, e eventos adversos na gravidez (HAJISHENGALLIS, 2015; NAZIR, 2017; WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017).

A cavidade bucal possui uma microbiota que compreende entre 700 e 800 espécies, a maioria vivendo em uma relação simbiótica equilibrada, formando a comunidade microbiana oral (CHEN *et al.*, 2017; NAZIR, 2017). A disbiose caracteriza-se pelo desequilíbrio nesse ecossistema, acarretando mudanças no padrão ecológico, com predomínio dos micro-organismos patógenos, e interações micróbio/hospedeiro alteradas (HAJISHENGALLIS, 2015; OLSEN; LAMBRIS; HAJISHENGALLIS, 2017). É conhecido o envolvimento de patógenos específicos no início e progressão das periodontites, os quais estão presentes na placa dental na forma de um biofilme bacteriano (camada fina de glicoproteínas colonizada por bactérias) (DENTINO *et al.*, 2013). As bactérias anaeróbias Gram negativas *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* têm sido consideradas, tradicionalmente, os causadores da periodontite crônica (DENTINO *et al.*,

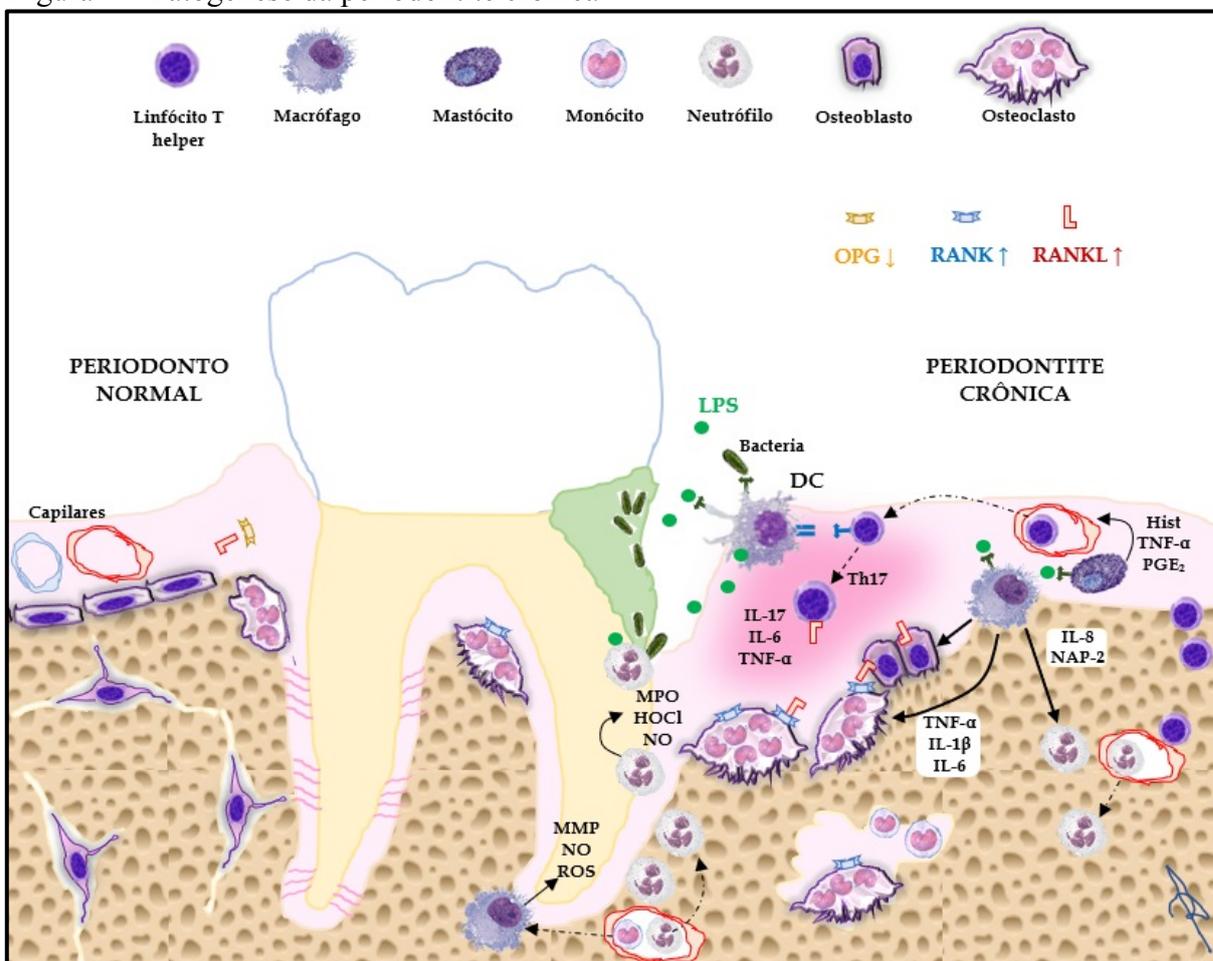
2013; HAJISHENGALLIS, 2015). Entretanto, estudos propõem um modelo polimicrobiano para a doença com uma microbiota mais diversa, onde, não patógenos individuais, mas diversas espécies perturbariam o equilíbrio ecológico no biofilme associado a homeostase periodontal (HAJISHENGALLIS; LAMONT, 2012). Mas a etiologia da periodontite pode ser bem mais complexa, e além da disbiose outros fatores podem estar envolvidos, como fatores genéticos, estado da saúde sistêmica e fatores ambientais e comportamentais. Estes não são propriamente o agente iniciador da doença, mas são fatores de risco, que junto ao fator microbiano podem precipitar a doença. A fumaça do cigarro, a diabetes e a predisposição genética são os fatores de risco mais importantes (HAJISHENGALLIS, 2015; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

O processo fisiopatológico da periodontite inicia-se com o acúmulo da placa dental (biofilme microbiano e restos celulares e de alimentos) na superfície dos dentes, especialmente no sulco gengival (região entre a superfície do colo ou raiz do dente e a gengiva marginal). A placa dental pode apresentar-se calcificada (cálculo) ou não calcificada. Na forma de cálculo, representa um fator retentivo adicional para o acúmulo de mais placa e bactérias (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Em resposta ao acúmulo da placa, inicia-se um processo inflamatório na gengiva adjacente (gengivite), com o intuito de combater a invasão dos micro-organismos patógenos no tecido periodontal. Se a placa não for removida, a inflamação progride e atinge as porções mais profundas do periodonto, causando a perda de inserção periodontal e a formação de uma bolsa, caracterizando-se agora como uma periodontite (DENTINO *et al.*, 2013; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

Existe um consenso de que o biofilme bacteriano, contendo patógenos específicos, é necessário para iniciar a periodontite. Entretanto, sabe-se que a atuação de enzimas líticas liberadas por bactérias contidas nesse biofilme, apesar de provocar dano tecidual direto, é insuficiente para causar, por si só, a destruição tecidual observada na periodontite (DEO; BHONGADE, 2010; HAJISHENGALLIS, 2015; YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013). Deste modo, a exacerbação da resposta inflamatória no hospedeiro, embora inicialmente instalada com o objetivo de eliminar os patógenos periodontais, tem sido considerada na literatura como a principal causa associada aos mecanismos destrutivos observados na periodontite (COCHRAN, 2008; DEO; BHONGADE, 2010). Tal resposta envolve a ativação de numerosas células inflamatórias e diversos mediadores químicos (OROZCO *et al.*, 2006; YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013), que contribuem conjuntamente para a degradação do

tecido e a reabsorção óssea por ativação de vias distintas degradativas do hospedeiro (DEO; BHONGADE, 2010; YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013) (FIGURA 4).

Figura 4 – Patogênese da periodontite crônica



Representação ilustrativa do envolvimento de células (representadas individualmente acima) e mediadores inflamatórios na patogênese da periodontite crônica. Bactérias e produtos bacterianos (lipopolissacarídeos – LPS) ativam células apresentadoras de antígeno, como células dendríticas (DC) e macrófagos, as quais sensibilizam linfócitos T *naïve* e liberam citocinas inflamatórias, aumentando a osteoclastogênese no periodonto. O influxo de neutrófilos e monócitos culmina na liberação de enzimas líticas e espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis pela degradação dos tecidos periodontais. OPG, osteoprotegerina; RANK, receptor ativador do fator nuclear κ B; RANKL, ligante do RANK; Th17, linfócitos T *helper* subtipo 17; IL, interleucinas; TNF- α , fator de necrose tumoral *alfa*; Hist, histamina; PGE₂, prostaglandina E₂; NAP-2, proteína ativadora de neutrófilos 2; MPO, mieloperoxidase; HOCl, ácido hipocloroso; NO, óxido nítrico; MMP, metaloproteinase de matriz. Seta contínua indica liberação/interação de mediadores, seta tracejada indica diferenciação, seta ponto-tracejada indica transmigração. [Elaborado pelo autor. Baseado em HAJISHENGALLIS, 2015].

É sabido que o neutrófilo, um leucócito granulócito polimorfonuclear, tem um papel importante na patogênese da periodontite (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016; NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue e constituem-se na primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos intrusos. Sua principal função é a fagocitose de micróbios, em especial de

bactérias (BORREGAARD, 2010; KLEBANOFF, 2005). Eles possuem três categorias de grânulos citoplasmáticos: os grânulos azurófilos (ou primários), os grânulos específicos (secundários) e os terciários (BORREGAARD, 2010). Os grânulos azurófilos são os principais responsáveis pela morte dos micróbios, durante o processo de fagocitose, ao liberarem seu conteúdo na fusão com os fagossomos. Esses grânulos contêm várias enzimas microbidas e proteolíticas, como lisozima, proteína catiônica, catepsina, colagenase, elastase, bem como mieloperoxidase (MPO), uma metaloenzima responsável pela geração de várias ROS e de radicais clorados (BORREGAARD, 2010; KLEBANOFF, 2005; WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017). Hoje é reconhecido que o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos neutrófilos para o meio extracelular é um dos principais responsáveis pela degradação dos tecidos periodontais (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016; YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013).

Os neutrófilos, por serem os primeiros leucócitos sanguíneos a chegarem nos locais de infecção, caracterizam a resposta imunoinflamatória aguda (BORREGAARD, 2010; CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016). O processo inflamatório na periodontite (FIGURA 4) instala-se quando os produtos bacterianos advindos da placa dental, tais como lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos, são reconhecidos pelos receptores semelhantes a Toll (*Toll-like receptor* – TLR), presentes na membrana plasmática de células residentes, dentre elas, as células dendríticas (DC), os mastócitos e os macrófagos teciduais (histiócitos). A ativação da via de sinalização do TLR nessas células desencadeia a expressão, síntese e liberação de vários mediadores químicos, dentre os principais, TNF- α , histamina, IL-1 β , IL-6, PGE₂, fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), quimiocinas e componentes específicos do sistema complemento. Principalmente histamina e TNF- α pré-formado de mastócitos promovem o aumento da permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão (ICAMs e selectinas) pelo endotélio, permitindo a migração dos neutrófilos para o meio extravascular (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016; YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013). As quimiocinas IL-8 e proteína ativadora de neutrófilos 2 (NAP-2), liberadas por histiócitos e DC, bem como o N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (f-MLP), um peptídeo quimiotático bacteriano, são os principais mediadores químicos recrutadores de neutrófilos aos locais de inflamação (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016; RYDER, 2010; YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013).

Ao chegarem no local infectado, os neutrófilos começam a realizar a fagocitose dos micro-organismos. Concomitantemente, o contato com os patógenos e suas toxinas

desencadeia a chamada “explosão respiratória” (ou explosão oxidativa) nas vesículas fagossômicas, que é a produção de radicais superóxido (O_2^-) e outras ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ambos com ação microbicida. Em seguida, ocorre a fusão dos fagossomos, cheios de micróbios, com os grânulos azurófilos contendo MPO; e então ocorre a ativação do sistema antimicrobiano MPO/ H_2O_2 /cloreto. A MPO, na presença de íons cloreto (Cl^-), converte o H_2O_2 em outras ROS, tais como o radical hidroxila (OH^\cdot) e o oxigênio singlete (1O_2), e no ácido hipocloroso ($HOCl$), este último com ação microbicida ainda mais potente e com potencial altamente lesivo aos tecidos. (KLEBANOFF, 2005; WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017). Estudos recentes demonstraram que as ações da MPO na inflamação vão além. Essa enzima também age de forma autócrina sobre o neutrófilo, ativando a via de sinalização de integrina- β_2 , que promove o aumento do cálcio intracelular e, conseqüentemente, induz a degranulação, liberando quantidades extras de MPO e enzimas líticas no meio extracelular (GRIGORIEVA *et al.*, 2016).

Após algum tempo, ocorre uma mudança no padrão do infiltrado inflamatório no periodonto, passando a predominar as células mononucleares, linfócitos e monócitos/macrófagos. As DC, previamente ativadas pela sinalização de TLR, migram para órgãos linfoides (linfonodos) e apresentam os antígenos microbianos fagocitados aos linfócitos T *helper naïve* (Th0), através da interação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) com os receptores de células T (TCR). A partir daí, os linfócitos Th0 se diferenciam em outras linhagens, principalmente em Th1 e Th17, e migram pela corrente sanguínea para o local inflamado (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017; YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013). Lá os linfócitos Th1 liberam $TNF-\alpha$, interferona gama ($IFN-\gamma$) e os fatores de ativação de macrófagos (MAF) e quimiotático de macrófagos (MCF), que recrutam monócitos e ativam macrófagos. Os macrófagos ativados fagocitam os micróbios, mas também liberam H_2O_2 e óxido nítrico (NO), que são microbicidas, e metaloproteinases de matriz (MMP), um tipo de collagenase que contribui para destruição do periodonto (ZHANG *et al.*, 2016). Os linfócitos Th17 são grandes produtores de citocinas pró-inflamatórias, em especial, $TNF-\alpha$, IL-6 e IL-17, além de expressarem RANKL, favorecendo a osteoclastogênese (YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013; ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015). A partir desse ponto, a degradação do periodonto, que se limitava apenas aos tecidos moles, atinge o osso alveolar, e a lesão torna-se irreversível (YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013).

Da mesma forma que acontece nos demais ossos do esqueleto, a regulação da remodelação óssea alveolar na periodontite envolve o eixo RANK/RANKL/OPG

(COCHRAN, 2008; LIU, H. *et al.*, 2017; RÖMER *et al.*, 2012; YUCEL-LINDBERG *et al.*, 2013). Tem sido descrito que os níveis de RANKL estão aumentados em pacientes com doença periodontal, enquanto os níveis de OPG encontram-se reduzidos, favorecendo, portanto, a reabsorção óssea osteoclástica observada nessa doença. Grande parte desse desequilíbrio na razão RANKL/OPG na periodontite é causada pelo aumento da liberação de citocinas inflamatórias, que aumentam a expressão de RANKL pelos osteoblastos, e pela própria produção aumentada de RANKL a partir de linfócitos T e B ativados (KAWAI *et al.*, 2006; LIU, H. *et al.*, 2017; WARA-ASWAPATI *et al.*, 2007) e neutrófilos ativados por TLR (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016).

Algumas condições sistêmicas específicas podem estar relacionadas com a periodontite, entre elas, *diabetes mellitus* (ANDERSEN *et al.*, 2007; STANKO; HOLLA, 2014), artrite reumatoide (ARAÚJO; MELO; LIMA, 2015; MIRRIELEES *et al.*, 2010; POTEPA; MYDEL; KOZIEL, 2017) e, em menor grau, osteoporose pós-menopáusia (ASPALLI *et al.*, 2014; STRAKA *et al.*, 2015).

Diabetes mellitus ou diabetes é um distúrbio metabólico caracterizado pela hiperglicemia (aumento dos níveis de glicose no sangue), e é considerado um dos três mais importantes fatores de risco para periodontite (NAZIR, 2017; STANKO; HOLLA, 2014). Inúmeros trabalhos e revisões têm evidenciado a relação da diabetes com a periodontite, inclusive sua relação bidirecional (ANDERSEN *et al.*, 2007; STANKO; HOLLA, 2014). A hiperglicemia está relacionada com o aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (AGE), resultando, principalmente, em aumento do estresse oxidativo e diminuição da capacidade antioxidante. Esse *status* oxidativo provoca danos a vários tecidos, especialmente nos altamente vascularizados, como a retina, o glomérulo e o periodonto (ANDERSEN *et al.*, 2007; STANKO; HOLLA, 2014; TOKER *et al.*, 2012; WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017). O acúmulo de AGE nos tecidos também aumenta a produção de MMP e outras collagenases, aumentando, portanto, a degradação tecidual. Ocorre também mudanças no comportamento das células do sistema imune, em especial dos neutrófilos, que reduzem sua capacidade de adesão, quimiotaxia e fagocitose, resultando em redução das defesas contra os patógenos periodontais. Outras mudanças celulares também são observadas, como diminuição da proliferação e diferenciação de osteoblastos, e o aumento da apoptose em vários tipos de células. Por fim, a diabetes é frequentemente relacionada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias no periodonto, particularmente do TNF- α , da IL-1 β e da IL-6 (ANDERSEN *et al.*, 2007; STANKO; HOLLA, 2014).

Atualmente, está cada vez mais evidente a relação entre periodontite e artrite reumatoide, uma doença imunoinflamatória das articulações, embora ainda não haja um consenso (ARAÚJO; MELO; LIMA, 2015). Novos conhecimentos acerca dos autoantígenos comuns na artrite reumatoide têm ajudado a revelar a estreita relação que patógenos da periodontite podem manter com a patogenia da artrite. A *Porphyromonas gingivalis*, uma das principais bactérias causadoras da periodontite, está relacionada à produção de proteínas citrulinadas. Essas proteínas apresentam neoepítomos que desencadeiam a produção de autoanticorpos contra proteínas específicas do hospedeiro. Esses autoanticorpos se espalham pelos fluidos do organismo, incluindo a sinóvia, e interagem com linfócitos T, especialmente os Th17, que promovem a liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-17, que por sua vez induzem osteoclastogênese e o consequente dano ósseo (HAJISHENGALLIS, 2015; SAKKAS *et al.*, 2017).

Sabe-se que a periodontite é a maior causa de perdas dentárias em adultos e sua prevalência aumenta com a idade (DENTINO *et al.*, 2013; NAZIR, 2017). Esse fato coincide com a diminuição da densidade mineral óssea (DMO) observada nos idosos, devido à queda nos níveis hormonais, decorrentes da menopausa e andropausa. Estudos recentes têm correlacionado a periodontite com a osteoporose pós-menopáusicas (ASPALLI *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2017; STRAKA *et al.*, 2015) e demonstraram que a osteoporose está relacionada com a diminuição da DMO dos maxilares e a perda de inserção clínica na periodontite crônica, mas não com outros fatores clínicos, como o sangramento e a placa bacteriana (ASPALLI *et al.*, 2014; STRAKA *et al.*, 2015). Nenhum estudo é conclusivo ou categórico em afirmar que a osteoporose tem relação direta com a piora da periodontite, mas é reconhecido que pessoas com a doença têm maior perda de massa óssea dos maxilares e maior perda de dentes do que pessoas saudáveis. Além disso, tem-se observado a osteoporose associada a quadros mais severos de periodontite (CHOI *et al.*, 2017; STRAKA *et al.*, 2015).

Embora o tratamento da gengivite e da periodontite seja, habitualmente, o debridamento e remoção da placa dental, abordagens farmacológicas às vezes são utilizadas como adjuvantes no tratamento de periodontites mais graves ou refratárias ao tratamento convencional, com o intuito de conter a infecção e controlar a inflamação (DENTINO *et al.*, 2013; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Antibióticos sistêmicos, especialmente os do grupo das tetraciclina, têm sido utilizados há tempos (DENTINO *et al.*, 2013; STANKO; HOLLA, 2014), e mais recentemente, a associação de amoxicilina e metronidazol vem sendo a mais indicada. (DENTINO *et al.*, 2013; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). A clorexidina é um antimicrobiano aplicado

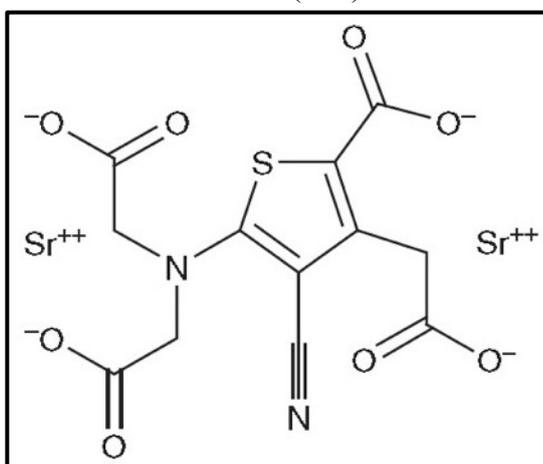
localmente, dentro da bolsa periodontal, na forma de solução ou de gel (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). A modulação da resposta do hospedeiro é utilizada como meio de amenizar os danos teciduais, e vem sendo muito estudada nos últimos anos. Anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e doxiciclina em doses submicrobidas visam reduzir os mediadores prostanoídes e as MMPs, respectivamente, e são aprovados para uso (DENTINO *et al.*, 2013; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Outros fármacos, que originalmente são utilizados para tratar outras doenças, apresentaram potencial modulador de citocinas, em pesquisas com modelo de periodontite (LIMA *et al.*, 2000, 2004). E finalmente, abordagens adicionais com foco no metabolismo ósseo também vêm sendo estudadas (DENTINO *et al.*, 2013), que é o caso dos antirreabsortivos ósseos utilizados no tratamento da osteoporose.

Ainda que o conhecimento acerca dos processos inerentes à prevenção, ao diagnóstico e ao tratamento das periodontites tenha avançado desde as três últimas décadas, alguns indivíduos ainda parecem ser refratários às diferentes abordagens profiláticas ou terapêuticas da doença. Considerando as restrições éticas dos ensaios com humanos, diversos modelos animais são úteis ao estudo da reabsorção óssea alveolar. O modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura é bastante interessante, pois é capaz de mimetizar diversas características da doença em humanos (LIMA *et al.*, 2004). Além disso, a relativa facilidade e a alta taxa de reprodutibilidade da indução da reabsorção óssea alveolar, além do curto prazo de tempo de observação, têm tornado esse modelo e suas variações bastante utilizados não somente pelo nosso grupo, o qual foi pioneiro desses estudos no Brasil (ALENCAR *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2004, 2005; LIMA *et al.*, 2000, 2004), além de outros pesquisadores nacionais (ALMEIDA *et al.*, 2015; MOLON *et al.*, 2012) e internacionais (BULTINK *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2016; PONTES ANDERSEN *et al.*, 2007; XIE; KUIJPERS-JAGTMAN; MALTHA, 2011). Em ambas as situações, em humanos e em animais, ocorre a participação de células e mediadores inflamatórios nos tecidos, com aumento da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (MOLON *et al.*, 2012), e alteração da regulação de proteínas envolvidas na osteoclastogênese, como RANKL e OPG (BENATTI *et al.*, 2012; MOLON *et al.*, 2012).

2.3 Ranelato de estrôncio

O ranelato de estrôncio (SrR) é um fármaco utilizado no tratamento da osteoporose em mulheres pós-menopáusicas e homens adultos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015). Ele se consiste em um sal orgânico contendo 2 íons estrôncio (Sr^{2+}) ligados a uma molécula carreadora orgânica, o ácido ranélico (FIGURA 5), conferindo-lhe características farmacocinéticas e fisicoquímicas vantajosas, alta relação entre estrôncio e sua molécula carreadora, além de boa tolerabilidade e segurança (LEBLANC, 2006).

Figura 5 – Estrutura molecular do ranelato de estrôncio (SrR)



O SrR é um sal orgânico contendo dois íons estrôncio (Sr^{2+}) ligados ao ácido ranélico. [Retirado de DEEKS; DHILLON, 2010].

O perfil farmacocinético do SrR tem sido avaliado tanto em mulheres pós-menopáusicas como em homens, ambos saudáveis ou em tratamento a longo prazo da osteoporose (CABRERA *et al.*, 1999; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015; KAUFMAN *et al.*, 2013). Após administração oral do SrR, íons estrôncio (Sr^{2+}) são liberados do carreador orgânico (ácido ranélico) no intestino e são absorvidos pela mucosa gastrointestinal por mecanismos similares àqueles do cálcio (através de canais iônicos, bombas cálcio-ATPase e transporte passivo paracelular) (CABRERA *et al.*, 1999). Devido à elevada polaridade do ácido ranélico, a absorção, distribuição e ligação a proteínas do mesmo são baixas. O ácido ranélico absorvido não é metabolizado e é rapidamente eliminado por via renal. O pico plasmático de estrôncio (Sr) é atingido em 3 horas e sua concentração no sangue atinge estabilidade com 2 semanas de tratamento. A biodisponibilidade de Sr após administração oral de SrR é em torno de 25%, entretanto, essa biodisponibilidade pode ser

reduzida em até 70% se o SrR for administrado concomitante à alimentos, principalmente com alimentos ricos em cálcio. Por isso recomenda-se a ingestão do fármaco num período de 2 a 3 horas após as refeições e como sua absorção é lenta, pelo menos 2 horas antes de se alimentar novamente ou ao deitar. O Sr tem baixa taxa de ligação a proteínas plasmáticas, girando em torno de 25%, e o seu volume de distribuição é de 1 L/kg. Por ser um cátion bivalente o Sr não é metabolizado. Sua meia vida efetiva é de cerca de 60 horas (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015). O Sr é excretado predominantemente na urina e em menor extensão pelas fezes e no suor (CABRERA *et al.*, 1999).

Até recentemente, o tratamento crônico de mulheres e homens com SrR havia se mostrado relativamente seguro, com efeitos colaterais mínimos. Contudo, a European Medicines Agency (EMA) emitiu, em 2013, seu primeiro parecer da avaliação do risco-benefício do SrR no tratamento da osteoporose. A recomendação era de restringir o uso do SrR, por ter sido observado, em estudos placebo-controlados em mulheres pós-menopáusicas, um risco aumentado de infarto do miocárdio, de tromboembolismo e de acidente vascular cerebral com o uso do fármaco, em relação ao placebo. Por conta disso, desde 2014, o SrR está indicado apenas para o tratamento de osteoporose grave, com elevado risco de fratura, em pacientes que não podem fazer uso de outros medicamentos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015). Entretanto, inúmeros estudos clínicos têm demonstrado que o SrR é seguro e bem tolerado durante tratamentos a curto e a longo-prazo, e que a maioria dos pacientes que apresentaram algum distúrbio cardiovascular durante o tratamento, já tinham algum histórico dessas doenças (ABRAHAMSEN; GROVE; VESTERGAARD, 2014; ATTERITANO *et al.*, 2015; KAUFMAN *et al.*, 2013; LIU, JM. *et al.*, 2009; MEUNIER *et al.*, 2004; REGINSTER *et al.*, 2005, 2012; YU *et al.*, 2015). Apesar disso, o SrR continua sendo considerado uma importante abordagem para o manejo da osteoporose, com um risco-benefício positivo (REGINSTER *et al.*, 2015).

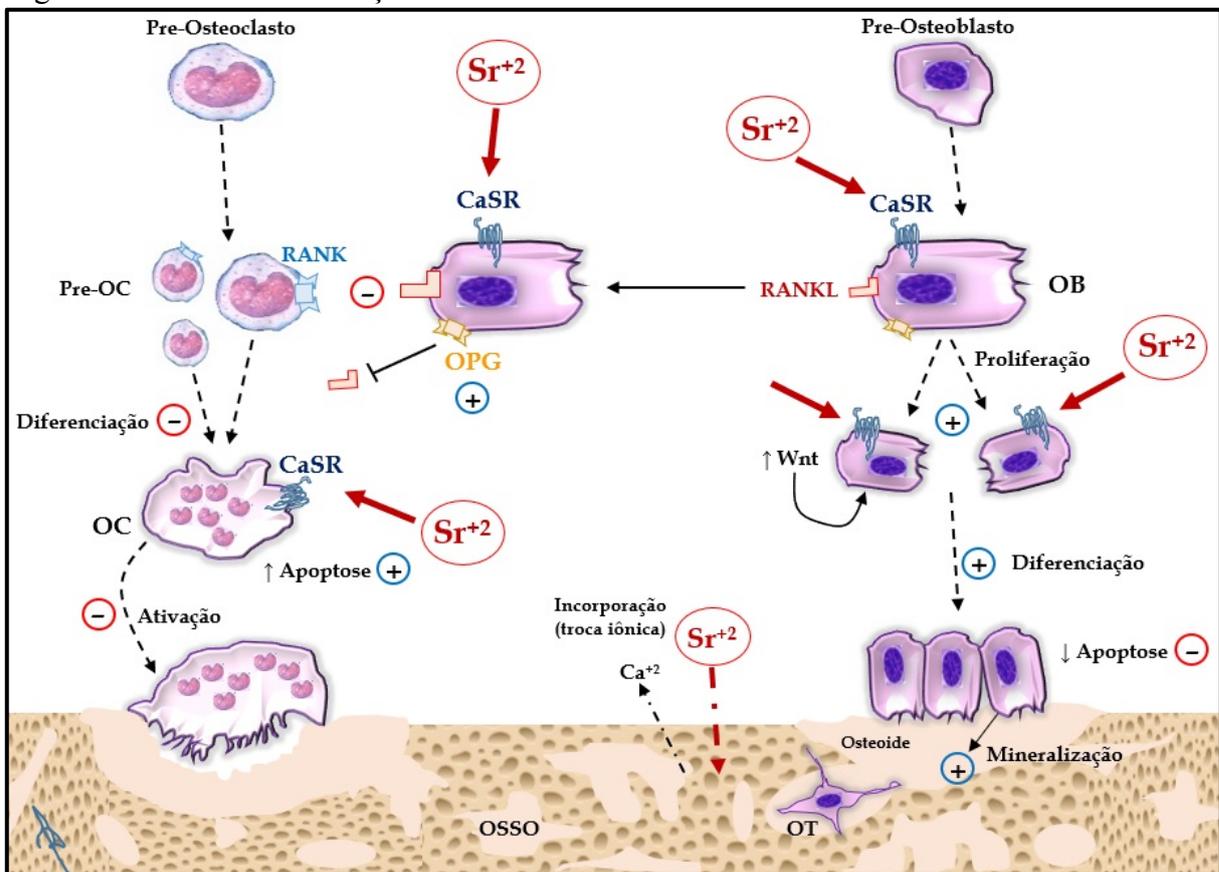
O SrR tem sido indicado para reduzir o risco de fraturas ósseas durante a osteoporose, principalmente em mulheres pós-menopáusicas com a doença já estabelecida, desde quando foi liberado para comercialização, em 2004, na Europa. Estudos mostraram que o fármaco foi eficaz em reduzir o risco de fraturas vertebrais e não vertebrais (principalmente fraturas de quadril) após um período de 3 anos de tratamento em mulheres com osteoporose (MEUNIER *et al.*, 2004; REGINSTER *et al.*, 2005), com eficácia sustentada em um período de 5 a 8 anos (MEUNIER *et al.*, 2009; REGINSTER *et al.*, 2009). O SrR também foi eficaz no tratamento de homens osteoporóticos, pois aumentou a densidade mineral óssea (DMO) e reduziu o risco de fraturas após 2 anos de tratamento (KAUFMAN *et al.*, 2013).

O que tornou o SrR um fármaco diferenciado foi o fato de ele possuir um efeito dual, pelo qual promove simultaneamente formação óssea, via osteoblastos, e inibição da reabsorção óssea osteoclástica. Ele é o primeiro de uma nova classe farmacológica, a dos calcimiméticos, agonistas do receptor sensor de cálcio. Os mecanismos moleculares pelos quais o SrR afeta as células ósseas ainda não são inteiramente conhecidos. Sabe-se, no entanto, que parte dos seus efeitos sobre as células ósseas são consequência da ligação do estrôncio (Sr) ao domínio extracelular do receptor sensor de cálcio (CaSR) presente tanto em osteoblastos, como em osteoclastos (FROMIGUÉ *et al.*, 2009; HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009). Devido a sua similaridade com o cálcio (Ca), o Sr age como um agonista verdadeiro do CaSR, ativando múltiplas vias de sinalização que regulam o comportamento das células ósseas e contribuem para o efeito único do SrR na remodelação óssea (MARIE; FELSEMBERG; BRANDI, 2011).

O CaSR é um membro da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) ou receptores “7 domínios transmembrana” (7-DT), sendo expresso em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, além de células de outros órgãos como rins, glândulas paratireoides, intestino, estômago e pele (ALFADDA *et al.*, 2014; BROWN; LIAN, 2008). A estimulação do CaSR pelo Ca e calcimiméticos como o Sr pode ativar inúmeras vias de sinalização intracelular e vias que culminam na ativação ou inibição de genes, resultando em sobre-regulação ou sub-regulação da expressão de várias proteínas e de várias funções vitais na célula, incluindo diferenciação e replicação celulares, mudanças no citoesqueleto e até mesmo apoptose. Inúmeros trabalhos têm demonstrado os possíveis mecanismos moleculares e vias de sinalização ativadas pelo CaSR em resposta ao Sr. Por exemplo, a ativação da porção α da proteína G_q , pelo domínio intracelular do CaSR, ativa fosfolipase C (PLC), com consequente síntese de trifosfato de inositol (IP_3) e/ou diacilglicerol (DAG), os quais aumentam a concentração de cálcio intracelular ou ativam a proteinoquinase C (PKC), respectivamente, que em seguida ativam fatores de transcrição. Interessante é que o Sr pode induzir diferentes respostas da sinalização de PLC a depender do tipo celular, se osteoblasto ou osteoclasto. Em osteoblastos, a ativação da PLC produz IP_3 , enquanto que no osteoclasto, a PLC ativada pela interação do Sr com o CaSR produz principalmente DAG, com consequente ativação de $PKC\beta II$ (HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009). Outras vias de sinalização, incluindo a ativação da via da proteinoquinase ativada por mitógeno (MAPK) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK), da fosfolipase A2 citosólica ($cPLA_2$) e produção de prostaglandina E_2 (PGE_2) (CHOUDHARY *et al.*, 2003, 2007), ativação de fator nuclear de células T ativadas 1 (NFATc1) e da via autócrina Wnt (FROMIGUÉ *et al.*, 2010) já foram descritas.

A ativação do CaSR nas células ósseas pelo Sr desencadeia uma série de funções vitais dessas células, importantíssimas no metabolismo do osso, como: aumento da proliferação e da diferenciação de osteoblastos; aumento da expressão de osteoprotegerina (OPG) por osteoblastos; diminuição da expressão de ligante do receptor ativador do NF- κ B (RANKL) pelos osteoblastos; aumento da mineralização da matriz de colágeno dos ossos; diminuição da diferenciação osteoclástica; e aumento da indução de apoptose nos osteoclastos (FROMIGUÉ *et al.*, 2009; HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009; MARIE; FELSENBURG; BRANDI, 2011) (FIGURA 6).

Figura 6 – Mecanismos de ação do estrôncio no osso



Representação ilustrativa dos principais mecanismos de ação do estrôncio (Sr ou Sr²⁺) sobre as células do osso e sua interação com a estrutura óssea. O Sr age no receptor sensor de cálcio (CaSR) presente na membrana de osteoblastos (OB) e osteoclastos (OC). No OB, o Sr aumenta a expressão de osteoprotegerina (OPG), de proteínas Wnt (Wnt), e reduz a de ligante do RANK (RANKL). No OC, Sr aumenta apoptose. Íons estrôncio (Sr²⁺) se incorporam ao osso por troca com íon cálcio (Ca²⁺). OT, osteócito; RANK, receptor ativador do fator nuclear κ B. Seta contínua indica síntese/interação, seta tracejada indica diferenciação, seta ponto-tracejada indica troca de substâncias entre osso e interstício, barra em 'T' indica inibição. [Elaborado pelo autor. Baseado em MARIE; FELSENBURG; BRANDI, 2011].

As principais vias de sinalização ativadas pela interação do Sr com o CaSR de osteoblastos são as de PLC e MAPK (FIGURA 7). A ativação de PLC em osteoblastos aumenta a síntese de IP₃, com consequente aumento do cálcio intracelular (Ca_i); o Ca_i ativa a

fosfatase calcineurina (Cn), que desfosforila NFATc1, o qual se transloca para o núcleo e regula a expressão gênica. Como consequência principal tem-se a expressão de proteínas Wnt, entre elas, Wnt3a e Wnt5a, que ativam as vias canônica e não-canônica de Wnt no osteoblasto, respectivamente. Wnt3a está relacionada com o aumento da replicação e diferenciação de osteoblastos, enquanto Wnt5a parece estar envolvida na ativação do osteoblasto para iniciar o processo de deposição e mineralização da matriz óssea, com aumento da expressão de fosfatase alcalina e de proteínas para o tecido osteoide (FROMIGUÉ *et al.*, 2009, 2010).

Figura 7 – Vias de sinalização intracelular ativadas pelo estrôncio

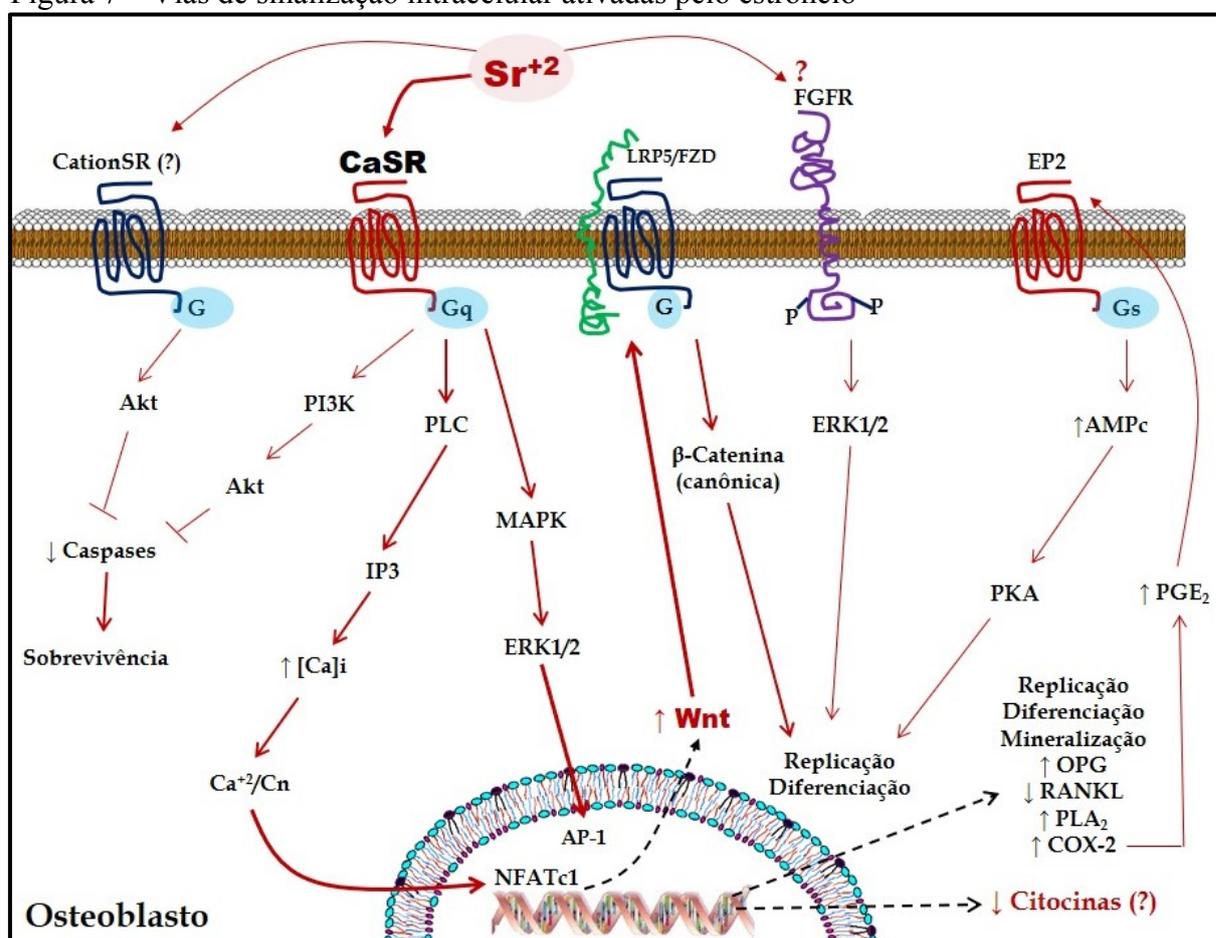


Ilustração mostrando as principais vias de sinalização intracelular ativadas pela interação do estrôncio (Sr ou Sr^{+2}) com o receptor sensor de cálcio (CaSR) no Osteoblasto. CationSR, receptor sensível a cátions; LRP/FZD, complexo receptor de proteínas Wnt; FGFR, receptor do fator de crescimento fibroblástico; EP2, receptor de prostaglandina E_2 tipo 2; G_q , G_s , proteínas G_q e G_s ; P, grupo fosfato; Akt, proteinoquinase B; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; PLC, fosfolipase C; IP3, trifosfato de inositol; Ca, Ca^{+2} , cálcio; Cn, calcineurina; MAPK, proteinoquinase ativada por mitógeno; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico; PKA, proteinoquinase A; AP-1, proteína ativada 1; NFATc1, fator nuclear de células T ativadas 1; PGE_2 , prostaglandina E_2 ; OPG, osteoprotegerina; RANKL, ligante do receptor ativador do fator nuclear κB ; PLA_2 , fosfolipase A_2 ; COX-2, cicloxigenase isoforma 2. Seta contínua indica a cascata de sinalização, seta tracejada indica expressão gênica, barra em 'T' indica inibição. [Arquivo do autor. Baseado em FROMIGUÉ *et al.*, 2009; HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009].

Foi descrito que o Sr pode interagir com outros receptores de membrana no osteoblasto além do CaSR. Estudos sugeriram que o Sr ativa a via de sinalização de proteinoquinase B (PKB ou Akt), através da interação com receptores sensíveis a outros cátions, o que inibe a atividade de caspases e aumenta a sobrevivência dos osteoblastos. Um desses receptores é o GPRC6A, proximamente relacionado ao CaSR e sensível a vários cátions divalentes (FROMIGUÉ *et al.*, 2009; PI; QUARLES, 2004). Uma outra possibilidade também seria a interação do Sr com o receptor do fator de crescimento fibroblástico (FGF), presente na membrana plasmática de osteoblastos e células mesenquimais ósseas. A interação com esse receptor seria de forma alostérica, e ativaria a via de ERK1 e 2, e fator de transcrição AP-1, aumentando, assim, a replicação e diferenciação osteoblástica (CAVERZASIO; THOUVEREY, 2011).

Demonstrou-se, em estudo com cultura de células do ligamento periodontal humanas, que o Sr promove a replicação celular, assim como suprime a expressão de IL-6 por essas células (RÖMER *et al.*, 2012). Células do ligamento periodontal são células mesenquimais fibroblásticas que, em condições de regeneração tecidual, podem se diferenciar em cementoblastos e em osteoblastos (GAY; CHEN; MACDOUGALL, 2007). Devido à semelhança entre osteoblastos e células do ligamento periodontal, é concebível que o Sr aja de maneira similar em osteoblastos (RÖMER *et al.*, 2012).

De fato, o SrR pode ser um fármaco com potencial imunomodulador, reduzindo as citocinas pró-inflamatórias. Alguns estudos já têm demonstrado que o SrR reduz a expressão e os níveis de TNF- α em tecidos inflamados, sugerindo a citocina como um novo alvo para o fármaco (ALVES *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2015). Nesse sentido, o SrR já está sendo considerado um novo tratamento para osteoartrite (PILMANE *et al.*, 2017) bem como para auxiliar na redução da dor nociceptiva induzida por citocinas pró-inflamatórias (ALVES *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2015). O SrR também reduziu a expressão de IL-1 β nas membranas e líquido sinoviais, em modelo de osteoartrite em cachorros (PELLETIER *et al.*, 2013). Por esses efeitos, o SrR já está sendo classificado como um fármaco antirreumático modificador da doença (FARMOD) (PILMANE *et al.*, 2017).

O Sr no tecido ósseo e em outros tecidos mineralizados apresenta uma grande capacidade de se incorporar à estrutura cristalina da hidroxiapatita (fase mineral dos tecidos mineralizados), constituindo-se no seu mecanismo físicoquímico de ação. Essa incorporação do Sr em ossos e dentes pode se dar através de troca iônica reversível na superfície do cristal e por substituição do Ca por Sr para o interior do cristal, sendo este um processo mais lento (DAHL *et al.*, 2001). De forma interessante, a apatita óssea pode admitir quase metade dos

elementos da tabela periódica em sua composição (PASTERIS; WOPENKA; VALSAMI-JONES, 2008). A incorporação de Sr nos tecidos mineralizados tem sido analisada no sentido de identificar e quantificar o mineral, e para o mapeamento elementar do Sr, usando microscopia eletrônica e radiação sincrotrônica (QUERIDO; ROSSI; FARINA, 2015). A identificação de elementos químicos, como o Sr e o Ca, e sua distribuição no osso podem ser conseguidas através de espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS), detectada tanto em microscópio eletrônico de varredura como no de transmissão. O mapeamento elementar do Sr e sua quantificação nos tecidos mineralizados pode ser realizado através de fluorescência de microrraio-X induzida por uma fonte de radiação sincrotrônica (SR μ XRF). Outras técnicas, incluindo a difração de raios-X (XRD), também são úteis para identificação e quantificação de Sr em tecidos mineralizados (OLIVEIRA *et al.*, 2012; QUERIDO; ROSSI; FARINA, 2015).

Vários estudos com modelos animais (AMMANN *et al.*, 2004; BUEHLER *et al.*, 2001; MARIE *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2012) e em humanos (LI *et al.*, 2010), e também com cultura de células osteoblásticas (QUERIDO *et al.*, 2014) têm relatado sobre a captação de estrôncio pelos tecidos mineralizados durante o tratamento com SrR. Oliveira *et al.* (2012) demonstraram que a incorporação do Sr acontece em níveis diferentes de acordo com o sítio ósseo e com a região de um mesmo osso, e que essa captação de Sr acontece preferencialmente ou quase que exclusivamente em ossos em formação, durante o tratamento com SrR. Esses achados foram observados no osso alveolar, região óssea predominantemente constituída de osso esponjoso, e, portanto, mais susceptível à ação por incorporação de minerais como o Sr, visto que esse tipo de osso possui uma taxa de renovação óssea mais alta, quando comparado ao osso cortical (BUEHLER *et al.*, 2001; DAHL *et al.*, 2001). Também foi demonstrado que a incorporação de Sr em osso formado durante o tratamento com SrR em cultura de osteoblastos provocou mudanças na composição e na estrutura do cristal de apatita, mas sem alteração no tamanho e na qualidade do cristal (QUERIDO *et al.*, 2014).

Em relação à qual seria o limite para uma dose não tóxica de Sr, atualmente não se tem estudos suficientes que analisaram a toxicidade e os possíveis efeitos deletérios do excesso de Sr no osso e nos demais tecidos do organismo. O que se sabe até o momento é que doses acima de 4 g/L de Sr (equivalente a ~1.200 mg/kg de SrR) causaram mudanças na estrutura cristalina da apatita óssea, em ratos (CABRERA *et al.*, 1999), induzindo defeitos de mineralização e diminuição da densidade mineral óssea (DMO) (CABRERA *et al.*, 1999; COHEN-SOLAL, 2002). Além disso, tem-se observado casos de raquitismo (OMDAHL; DELUCA, 1971) e osteomalácia (COHEN-SOLAL, 2002) causados pela sobredosagem de Sr

no organismo. Também foi descrito a habilidade do Sr em entrar na célula através dos canais de cálcio e interagir com sítios de ligação do Ca, afetando a homeostase do cálcio intracelular (CABRERA *et al.*, 1999). Por hora, doses como as de 625 mg/kg/dia de SrR, bem documentada na literatura como sendo segura e bem tolerada por modelos murinos, têm sido utilizadas como parâmetro para guiar a escolha das doses usadas em pesquisas pré-clínicas com SrR (AMMANN *et al.*, 2004; BAIN *et al.*, 2009; KARAKAN *et al.*, 2017; MIERZWA *et al.*, 2017).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o efeito anti-inflamatório e o potencial anabólico ósseo do ranelato de estrôncio em modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos.

Para tanto se seguiram os seguintes objetivos específicos:

- Analisar o periodonto de ratas através da mensuração direta da reabsorção óssea alveolar (por macroscopia e histometria), e por histologia, imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG e TRAP e atividade da mieloperoxidase (MPO) gengival;
- Analisar o potencial anabólico ósseo a partir de dosagens séricas da fosfatase alcalina óssea;
- Avaliar eventuais repercussões sistêmicas por meio de dosagens séricas das transaminases hepáticas (AST e ALT), índice hepático, leucograma e variação da massa corpórea dos animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com os princípios e recomendações de criação e de uso de animais para ensino e pesquisa científica, contidos na lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – CE, Brasil, com número de protocolo 87/16 (ANEXO).

4.1 Animais

Foram utilizados 78 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* fêmeas, com idade em torno de 7 semanas (massa corpórea de 170 g \pm 20 g). Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará e transferidos para o Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). Eles foram mantidos em microisoladores, em número de até 4 animais em cada. As ratas receberam ração comercial balanceada própria (Bio Base – Biotec Ratos) e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais, com ciclos de 12 horas claro/escuro durante todo o período experimental.

4.2 Fármacos, anticorpos e reagentes

Para o estudo foi utilizado o ranelato de estrôncio (SrR) (PROTOS® 2 g; Les Laboratoires Servier, Gidy, França), pó granulado em sachê para suspensão oral, contendo 2 g de ranelato de estrôncio anidro, com diluições em veículo aquoso (água para injeção).

Para anestesia foi utilizada a combinação de cloridrato de cetamina (Cetamin, Syntec®, Hortolândia, SP, Brasil) com cloridrato de xilazina (Xilazin, Syntec®, Hortolândia, SP, Brasil), nas doses de 90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal (i.p.).

Para os ensaios de imuno-histoquímica foram utilizados os anticorpos primários policlonais de cabra TNF- α (N-19), RANKL (N-19), OPG (N-20) e TRAP (K-17); e o *kit* com anticorpos secundários e complexo ABC Staining System, ImmunoCruz® (Santa Cruz® Biotechnology, Dalas, TX, EUA). Para IL-1 β foi utilizado o anticorpo primário de coelho da Sigma; e a albumina sérica bovina (BSA) também da Sigma (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Os anticorpos foram diluídos no diluente de anticorpo com redução de

“*background*” da DAKO; e o sistema de coloração para imuno-histoquímica, cromógeno 3,3’diaminobenzidina (DAB), também da DAKO (DAKO®, Carpinteria, CA, EUA). Para o ensaio da mieloperoxidase foram utilizados o hexadecil-trimetil-brometo de amônio (H-TAB) e o tetrametilbenzidina (TMB) da Sigma.

O formaldeído, o álcool etílico, o EDTA, a solução de hematoxilina de Harris, o azul de metileno e as substâncias químicas utilizadas no preparo das soluções tampão foram obtidas da Dinâmica (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil).

Para quantificação dos níveis séricos das enzimas fosfatases e transaminases hepáticas, foram utilizados *kits* prontos para testes (Labtest®, Lagoa Santa-MG, Brasil). Para o leucograma dos animais, foi utilizado o *kit* de coloração Instant Prov Stain Set® (Newprov Produtos para Laboratório, Pinhais, PR, Brasil).

4.3 Protocolo experimental

4.3.1 Indução da reabsorção óssea alveolar

Foi utilizado o modelo de reabsorção óssea alveolar (ROA) induzida por ligadura, introduzido por Lima *et al.* (2000). Este consiste em instalar um fio de sutura de náilon em torno de um dos segundos molares superiores do animal.

No denominado dia zero, a ligadura do segundo molar superior esquerdo dos animais sob anestesia foi feita com fio de náilon 3.0 (Procare®, Barueri, SP, Brasil). Os animais permaneceram com a ligadura durante 28 dias, sendo eutanasiados por “*overdose*” de anestésico. A hemimaxila contralateral foi utilizada como controle (sem ligadura) do próprio animal, dito normal. No dia zero também foi iniciada a administração de veículo (API) ou de SrR (conforme grupos experimentais), diariamente durante 28 dias (FIGURA 8).

4.3.2 Grupos Experimentais

4.3.2.1 Grupo controle normal

Grupo constituído por 6 ratas que foram apenas pesadas diariamente durante 28 dias, quando foram eutanasiadas para coleta de amostras teciduais e fluidos.

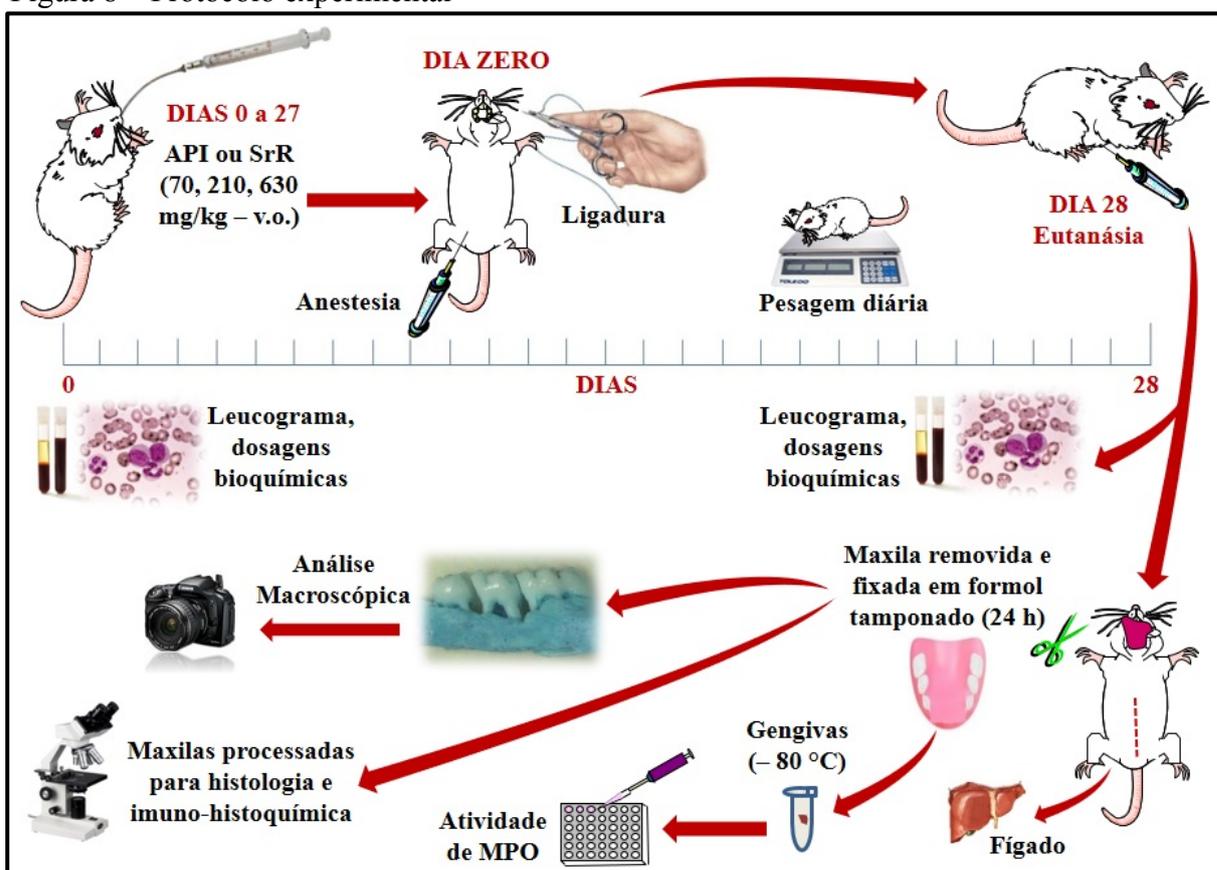
4.3.2.2 Grupos veículo

Esses grupos foram constituídos por 6 ratas, as quais receberam por gavagem veículo aquoso (água para injeção; 2 mL/kg, v.o.) diariamente. Esses animais foram submetidos à ligadura, e eutanasiados 28 dias após esta.

4.3.2.3 Grupos tratados com ranelato de estrôncio (SrR)

Grupos de 6 ratas cada submetidas à ligadura e que receberam (2 mL/kg, v.o.) SrR, nas doses de 70, 210 e 630 mg/kg, respectivamente, diariamente durante 28 dias, com base na área da superfície corpórea do animal (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007), o que está de acordo com trabalhos prévios com animais tratados com SrR (AMMANN *et al.*, 2004; BAIN *et al.*, 2009; MARIE *et al.*, 1993).

Figura 8 – Protocolo experimental



Esquema ilustrando a sequência de ligadura, tratamento com ranelato de estrôncio (SrR) durante 28 dias, eutanásia e coleta de tecidos e fluidos dos animais. [Elaborado pelo autor].

4.4 Parâmetros de avaliação

4.4.1 Análise do periodonto

4.4.1.1 Análise macroscópica do tecido ósseo alveolar

Após 28 dias da indução da ROA, 36 ratas foram eutanasiadas e suas maxilas removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. Em seguida as maxilas foram dissecadas e coradas com azul de metileno (LIMA *et al.*, 2000, 2004). As hemimaxilas foram acomodadas com massa de modelar em lâminas e fotografadas com uma câmera digital Cybershot SONY[®] DSC W210, 12,1 MP (Sony[®], Minato, Tóquio, Japão), padronizando-se uma mesma distância focal para todas as fotos. Para quantificar a reabsorção óssea alveolar (ROA), as imagens foram analisadas no software IMAGEJ[®] (ImageJ 1.51j8, National Institute of Health, EUA), usando uma modificação do método descrito por Kuhr *et al.* (2004). Para os valores relativos à ROA, a medida foi realizada, considerando a área demarcada (no lado vestibular) entre a junção amelocementária (JAC) e a borda óssea subjacente de hemimaxilas normais e desafiadas. Essa área foi comparada a outra previamente conhecida (25 mm²) (FIGURA 9A).

4.4.1.2 Análises microscópicas do periodonto

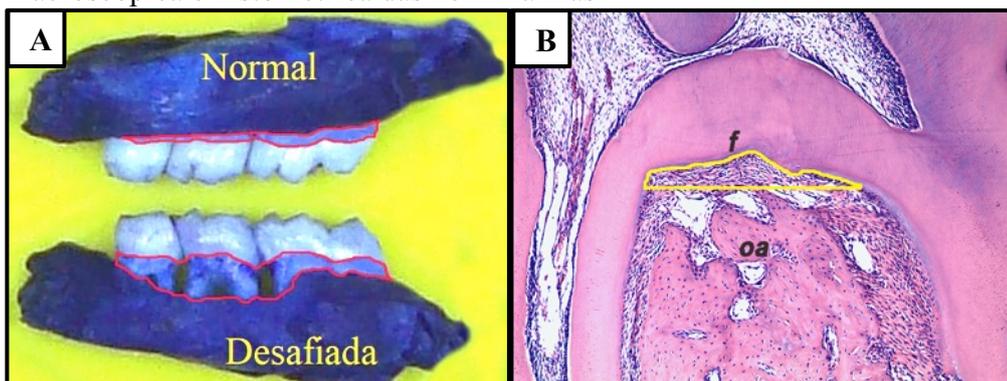
Para as análises histológicas, outras 36 ratas, após eutanásia, tiveram suas maxilas removidas, como descrito para macroscopia, e suas hemimaxilas foram submetidas à desmineralização com EDTA a 10% por aproximadamente 30 dias. Posteriormente, as mesmas foram suspensas em banho em água corrente por até 6 horas e depois desidratadas em etanol. As peças foram incluídas em parafina para realização de cortes longitudinais seriados de 4 µm em micrótomo apropriado. As lâminas obtidas foram coradas pelo método hematoxilina e eosina (HE).

4.4.1.2.1 Análise histométrica do osso alveolar

Para avaliação histométrica da hemimaxilas, foram utilizadas as lâminas obtidas anteriormente, considerando a região de furca do 2º molar. Essa região foi fotografada em microscópio óptico (100x) (NIKON[®] H550S com câmera Infinity 1 3,1 MP acoplada) e a

imagem foi analisada com o software IMAGEJ[®]. A quantificação da ROA na área de furca foi feita através da demarcação da área entre o ponto mais alto da crista óssea remanescente e o teto da furca (FIGURA 9B), comparando-se com uma área previamente conhecida (1 mm²), conforme metodologia descrita por Guimarães *et al.* (2016).

Figura 9 – Delineamentos das regiões de interesse para as análises macroscópica e histométrica das hemimaxilas



Delineamentos em vermelho (fotografia das maxilas) (A) da área entre a junção amelocementária e a borda óssea, de hemimaxilas normal e desafiada, utilizadas para quantificar a reabsorção óssea alveolar (ROA). Delineamento em amarelo (corte histológico) (B) da área de furca (f), que compreende desde o ponto mais alto da crista óssea remanescente até o teto da furca. Osso alveolar (oa). Os valores das áreas delineadas de maxilas normal e com ROA são encontrados em pixel e comparados a uma área conhecida em mm² [Arquivo do autor].

4.4.1.2.2 Análise histopatológica do periodonto

Para a análise histopatológica das hemimaxilas, a região entre os 1º e 2º molares foi avaliada em relação aos aspectos inflamatórios, como presença/intensidade do infiltrado leucocitário, além do estado de preservação do osso alveolar e do cemento, atribuindo-se escores que variaram de 0 a 3 (GUIMARÃES *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2000): *Escore 0*: Infiltrado celular ausente ou discreto; processo alveolar preservado; cemento preservado; *Escore 1*: Infiltrado celular moderado; pequena reabsorção do processo alveolar; cemento preservado; *Escore 2*: Infiltrado celular acentuado; processo alveolar com reabsorção acentuada; destruição parcial de cemento; *Escore 3*: Infiltrado celular acentuado; processo alveolar ausente; destruição total do cemento.

4.4.2 Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO) em gengiva

Após a eutanásia dos animais utilizados para a análise macroscópica da ROA, o tecido gengival dos mesmos foi removido da área adjacente à ligadura, bem como da mesma área da hemimaxila contralateral normal. As gengivas foram mantidas a -80 °C em freezer e posteriormente homogeneizadas e processadas para a análise, em leitor automático de placas (tipo ELISA), da atividade da mieloperoxidase (MPO). Essa enzima tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos ativos nos processos inflamatórios em vários tecidos, e seguiu-se o protocolo conforme metodologia descrita por Lima *et al.* (2005), baseada em Bradley, Christensen e Rothstein (1982).

O tecido gengival foi pesado e triturado em solução contendo NaCl (100 mM), EDTA (15 mM) e NaPO₄ (20 mM) e o homogenato foi centrifugado a 4 °C por 15 minutos, a 3.000 rpm. O pellet foi submetido à solução hipotônica (900 µl de NaCl a 0,2%; 900 µl de NaCl a 1,6%; 900 µl de glicose 5%) e novamente centrifugado a 4 °C por 15 minutos (3.000 rpm). O pellet final foi ressuscitado em solução contendo NaPO₄ a 50 mM e hexadecil-trimetil-brometo de amônio (H-TAB), e centrifugado a 4 °C por 15 minutos, a 10.000 rpm. O sobrenadante foi usado para o ensaio de MPO, utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM), e a concentração de MPO foi determinada, obtendo-se as absorvâncias em comprimento de onda de 450 nm. Os valores foram expressos como atividade da MPO gengival em comparação à curva padrão de neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de ratos induzidos por carragenina (300 µg por animal), com curva padrão do número de neutrófilos de pureza maior que 90%.

4.4.3 Análises imuno-histoquímicas para TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG e TRAP

A partir dos blocos de parafina utilizados para histologia, lâminas revestidas com poli-L-lisina foram processadas para a detecção de TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG e TRAP por ensaio de imuno-histoquímica, utilizando a técnica da estreptoavidina-biotina peroxidase (BAYER; WILCHEK, 1980). Os cortes de tecidos (4 µm) foram desparafinizados e reidratados através de xileno e graduação de álcoois. Após a recuperação antigênica, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena (20 min) com peróxido de hidrogênio a 3% e lavagem com solução tampão de fosfato (PBS). Em seguida, foi feito o bloqueio da proteína com albumina sérica bovina (BSA) a 5% durante 20 minutos. Então, os cortes foram incubados a 4 °C durante a noite com anticorpos primários de cabra anti-TNF- α , anti-

RANKL, anti-OPG ou anti-TRAP, e com anticorpo primário de coelho anti-IL-1 β , todos diluídos [1:100 cada] no diluente de anticorpo com redução de “background” da DAKO®. O processo seguiu com a incubação das lâminas com anticorpo secundário biotilado anti-TNF- α [1:300], anti-IL-1 β [1:300], anti-OPG [1:300], anti-TRAP [1:300] e anti-RANKL [1:200] no diluente DAKO durante 30 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com avidina-biotina-HRP conjugada (Complexo Strep ABC, Vectastain® ABC Reagente e Solução de substrato de peroxidase) durante 30 minutos, de acordo com o protocolo do fabricante. TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG e TRAP foram visualizados com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) da DAKO. Lâminas controle negativo foram processadas simultaneamente como descrito anteriormente, trocando-se o anticorpo primário por PBS-BSA 5%. Nenhum dos controles negativos mostrou imunorreatividade para TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG ou TRAP (APÊNDICE). As lâminas foram contracoloradas com hematoxilina de Harry, desidratadas em uma série de álcoois graduados, limpas em xileno e cobertas com a lamínula.

Para a análise das lâminas, as células coradas, definidas como áreas acastanhadas presentes no citosol das células, foram contados usando microscópio óptico (NIKON® H550S, Tóquio, Japão) em magnitude de 400x. Para a análise de imunomarcação para TRAP, as células foram consideradas TRAP+ quando multinucleadas (3 ou mais núcleos), com ramos citoplasmáticos irregulares (osteoclastos ativos), apresentando coloração intensa.

4.4.4 Análise de parâmetros sistêmicos

4.4.4.1 Dosagem sérica da fosfatase alcalina óssea (FAO)

Amostras sanguíneas a partir do plexo orbital dos animais previamente anestesiados foram obtidas antes do início do tratamento farmacológico (dia zero), e novamente no 28º dia, utilizando microcapilares heparinizados. A quantificação das fosfatases seguiu a metodologia da inativação térmica de amostras (MOSS; WHITBY, 1975). Para a dosagem de fosfatase alcalina total (FAT) foram seguidas as instruções do fabricante do *kit* de testes (Labtest®, Lagoa Santa – MG, Brasil). Para a obtenção dos valores da fosfatase alcalina óssea (FAO), o mesmo protocolo para a dosagem da FAT foi novamente realizado, apenas com o detalhe de que as amostras foram previamente incubadas em banho-maria a 56 °C durante 10 minutos e em seguida resfriadas por mais 10 minutos. Para a finalização adicionou-se 1 mL do reagente de cor, e as leituras foram feitas em espectrofotômetro em 590

nm. A FAO foi determinada pela diferença entre a dosagem da FAT e a dosagem realizada com a amostra aquecida, seguindo a mesma sequência de passos descritos acima.

4.4.4.2 Dosagens séricas das transaminases hepáticas AST e ALT

A partir das amostras de soro sanguíneo utilizadas para as dosagens da FAO, foram também dosados os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), também chamadas de transaminases hepáticas glutâmica oxalacética (TGO) e glutâmica pirúvica (TGP), respectivamente. A quantificação dos níveis de AST e ALT foi realizada seguindo-se a orientação do fabricante do *kit* de testes (LABTEST[®], Lagoa Santa – MG, Brasil). Para tanto, alíquotas de 50 µL da amostra foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 60 minutos para AST ou 30 minutos para ALT. Em seguida, foram adicionados 250 µL do reagente de cor e 2,5 mL de solução NaOH, e efetuadas as leituras espectrofotométricas das absorbâncias em 505 nm.

4.4.4.3 Análise do índice hepático

Após eutanásia, os animais tiveram seus fígados removidos, e os valores de peso úmido do órgão foram comparados com os respectivos valores das massas corpóreas mensuradas no mesmo dia. Tal relação foi considerada como índice hepático, indicativo da condição clínica do fígado, tendo como padrão o índice de animais normais.

4.4.4.4 Leucograma

Amostras sanguíneas, a partir do plexo caudal dos animais sob anestesia, foram colhidas para a confecção do esfregaço corado pelo método HE, para a contagem diferencial dos leucócitos e para a contagem de leucócitos totais utilizando a câmara de Neubauer. Os leucogramas foram realizados uma semana antes do início do tratamento com SrR e no 28º dia, dia da eutanásia.

4.4.4.5 Análise da variação da massa corpórea dos animais

Todos os animais tiveram suas massas corporais medidas diariamente durante 28 dias, a fim de ajustar a dose diária do fármaco para cada animal e para avaliar a repercussão

sistêmica do tratamento e da ligadura. Os valores encontrados na mensuração das massas durante os 28 dias experimentais foram expressos como a variação da massa corpórea (em gramas) em relação à massa inicial.

4.5 Análise estatística

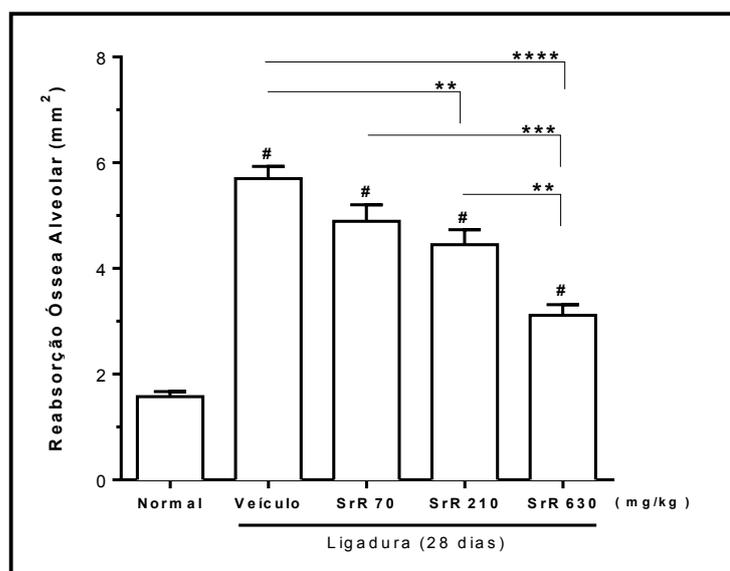
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e utilizada Análise de Variância (ANOVA) seguida pela correção de Bonferroni ou Teste *t*-Student. Os dados não paramétricos obtidos foram expressos como mediana acompanhada de menor/maior valores, e os testes estatísticos aplicados foram Kruskal-Wallis, Dunn ou Mann-Whitney. Para todos os testes o nível de significância (α) adotado foi de 0,05. O software utilizado foi o GraphPadPrism® versão 6.0, com cópia autorizada (La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos macroscópicos do efeito do ranelato de estrôncio (SrR) na reabsorção óssea alveolar

A figura 10 mostra as alterações macroscópicas após 28 dias de permanência da ligadura, bem como os efeitos de diferentes doses de ranelato de estrôncio (SrR) no periodonto de ratas. Observou-se reabsorção óssea alveolar (ROA) acentuada e ampla exposição radicular (FIGURAS 10 e 11C) nas maxilas do grupo veículo, quando comparadas às maxilas normais (FIGURA 11B). O SrR, nas doses de 210 e 630 mg/kg, reduziu significativamente ($p=0,009$ e $p<0,0001$) a reabsorção óssea alveolar em 22% e 45%, respectivamente (FIGURAS 10 e 11E, F), quando comparado ao grupo não tratado, que recebeu apenas veículo (água para a injeção) (FIGURA 11C). Não houve redução da ROA de forma significativa com a dose de 70 mg/kg de SrR. Observou-se também diferença estatística do grupo SrR 630 mg/kg em relação aos grupos SrR 210 mg/kg e SrR 70 mg/kg (FIGURA 10). A figura 11A ilustra os detalhes anatômicos do periodonto de um rato após 28 dias de ligadura.

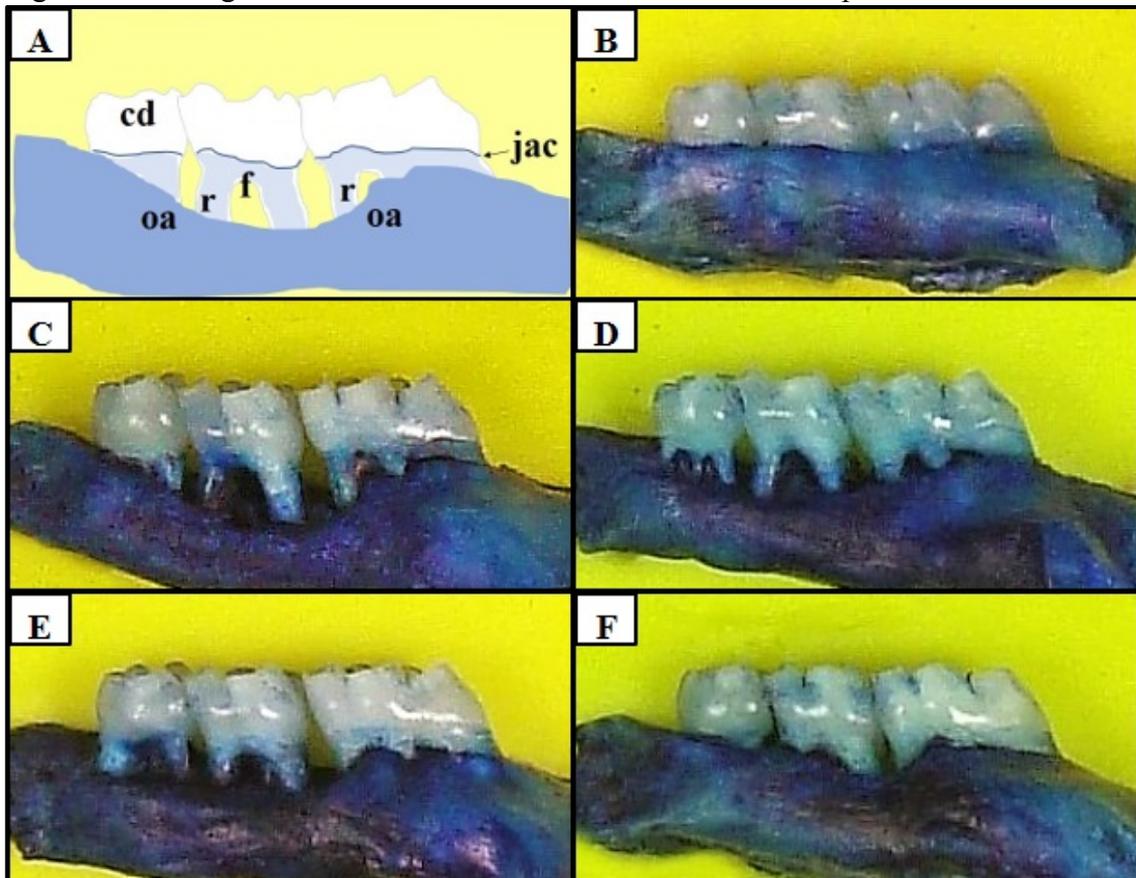
Figura 10 – Efeito do ranelato de estrôncio (SrR) sobre



os aspectos macroscópicos do periodonto de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias

Valores expressos como média \pm erro padrão da média; $n \geq 5$ /grupo; One-way Anova, Bonferroni; # $p < 0,05$ em relação ao normal. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, em relação ao veículo e entre as diferentes doses de ranelato de estrôncio (SrR).

Figura 11 – Fotografias de hemimaxilas normal ou submetidas à periodontite



Desenho esquemático ilustrando os aspectos anatômicos do periodonto de rato (A): coroa dentária (cd), junção amelocementária (jac), furca (f), osso alveolar (oa) e raiz (r). Hemimaxilas normal (B) ou de ratas submetidas a 28 dias de ligadura e que receberam veículo apenas (C) ou tratadas com ranelato de estrôncio (SrR) 70 mg/kg (D), SrR 210 mg/kg (E), e SrR 630 mg/kg (F), em aumento de 4x.

5.2 Aspectos microscópicos dos efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) na reabsorção óssea alveolar

5.2.1 Análises histométrica e histopatológica

Na análise histométrica, os 28 dias de permanência da ligadura causou significativa ($p=0,0002$) lesão de furca do segundo molar (TABELA 1; FIGURA 12B) no grupo veículo, quando comparada à área de furca dos segundos molares de maxilas normais (FIGURA 12A). O SrR (630 mg/kg) reduziu significativamente ($p=0,009$) a lesão em 64% (TABELA 1; FIGURA 12C), quando comparado ao grupo veículo (FIGURA 12B).

Na análise histopatológica da região entre os 1º e o 2º molares, na qual foram considerados graus de infiltrado leucocitário, preservação de ligamento periodontal e reabsorção de osso alveolar e cemento, observou-se que 28 dias de ligadura induziu intenso

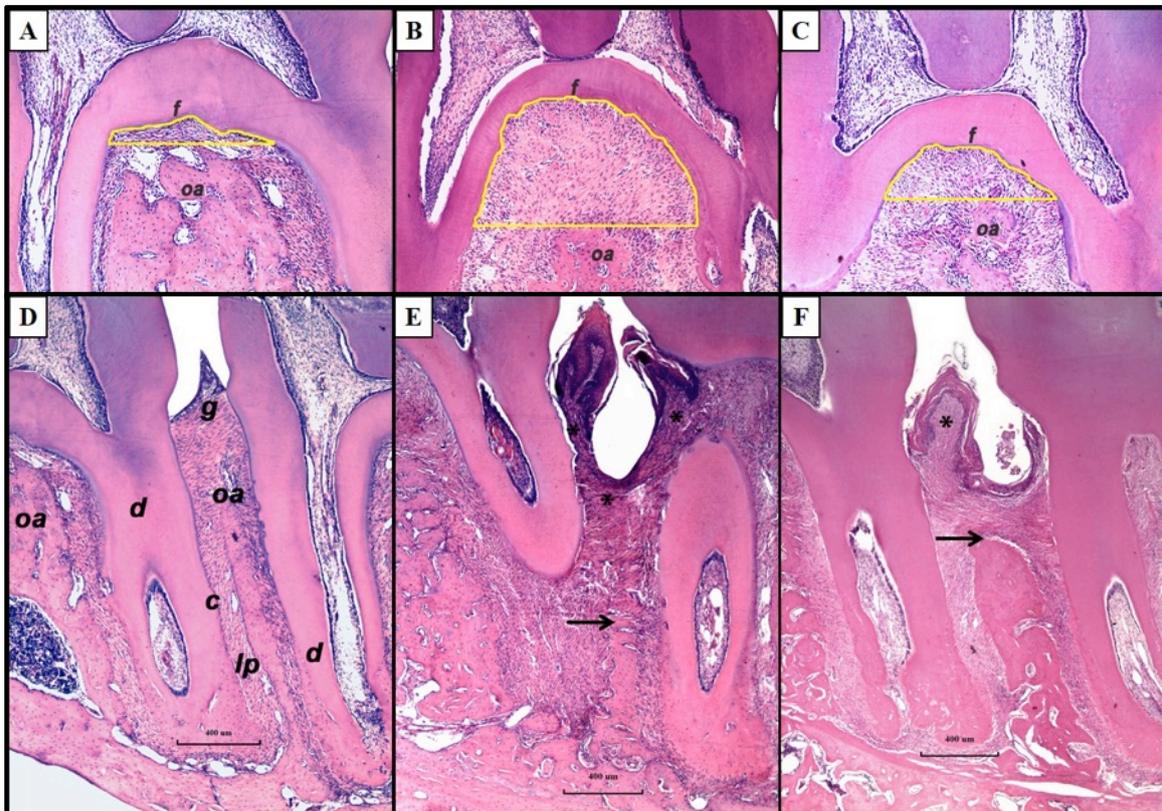
infiltrado leucocitário, perda de inserção periodontal, destruição parcial do cimento e reabsorção óssea alveolar acentuada [Md=2 (2-2)] (TABELA 1; FIGURA 12E) nas maxilas do grupo que recebeu apenas veículo, quando comparado ao periodonto normal (FIGURA 12D). O SrR (630 mg/kg) reduziu significativamente ($p=0,03$) o infiltrado leucocitário e a perda de inserção periodontal, bem como preservou o cimento radicular e reduziu a reabsorção do osso alveolar [Md=1 (1-1)] (TABELA 1; FIGURA 12F), comparado ao periodonto não tratado (FIGURA 12E).

Tabela 1 – Efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) sobre aspectos microscópicos do periodonto de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias

Parâmetros	Normal	Reabsorção Óssea Alveolar			
		Veículo	SrR 70 mg/kg	SrR 210 mg/kg	SrR 630 mg/kg
Histometria ($\times 10^{-3} \text{ mm}^2$)	43,7 \pm 5	279,5 \pm 20,3 [#]	277,5 \pm 66,7 [#]	202,7 \pm 25,5 [#]	100,5 \pm 42,8 [*]
Histologia (escores)	0 (0-0)	2 (2-2) [#]	1,5 (1-2) [#]	2 (1-2) [#]	1 (1-1) [*]

Histometria: valores expressos como média \pm erro padrão da média; One-way Anova, Bonferroni. Histologia: escores como mediana (menor – maior valores); Kruskal-Wallis, Dunn e Mann-Whitney; $p < 0,05$ em relação ao grupo normal (#) ou ao grupo veículo (*).

Figura 12 – Fotomicrografias de periodontos normais ou submetidos à periodontite



Áreas de furca (f; em amarelo) e entre 1º e 2º molares de maxilas normais (A e D), após 28 dias de ligadura, recebendo veículo (B e E) ou ranelato de estrôncio (SrR) 630 mg/kg (C e F). Osso alveolar (oa), dentina (d), gengiva (g), cimento (c), ligamento periodontal (lp), infiltrado inflamatório (*) e seta indica limite da crista óssea alveolar. Hematoxilina-eosina; 100x e 40x, respectivamente; barra = 400 μm .

O SrR, nas doses de 70 mg/kg e 210 mg/kg, não reduziu significativamente os parâmetros histométrico e histopatológico, comparado ao grupo veículo (TABELA 1).

5.2.2 Efeito do ranelato de estrôncio (SrR) na atividade da mieloperoxidase (MPO) em gengiva

A tabela 2 mostra que os 28 dias de permanência da ligadura causou aumento significativo ($p=0,002$) da atividade da MPO, em 220%, nas gengivas dos animais que receberam apenas veículo, quando comparado às gengivas normais. O SrR (630 mg/kg), apesar de reduzir a atividade da MPO em 42%, comparado às gengivas do grupo veículo, não o fez de forma estatisticamente significativa (TABELA 2).

Tabela 2 – Efeito do ranelato de estrôncio (SrR) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) na gengiva de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias

Parâmetros	Normal	Reabsorção Óssea Alveolar			
		Veículo	SrR 70 mg/kg	SrR 210 mg/kg	SrR 630 mg/kg
Mieloperoxidase (MPO) (x 10 ³ U/mg de gengiva)	1,5 ± 0,3	4,8 ± 0,6 [#]	5 ± 1,3 [#]	5,2 ± 0,7 [#]	2,8 ± 0,6 ^δ

Valores expressos como média ± erro padrão da média; One-way Anova, Bonferroni; $p<0,05$ em relação ao normal (#) ou ao grupo ranelato de estrôncio (SrR) 210 mg/kg (δ).

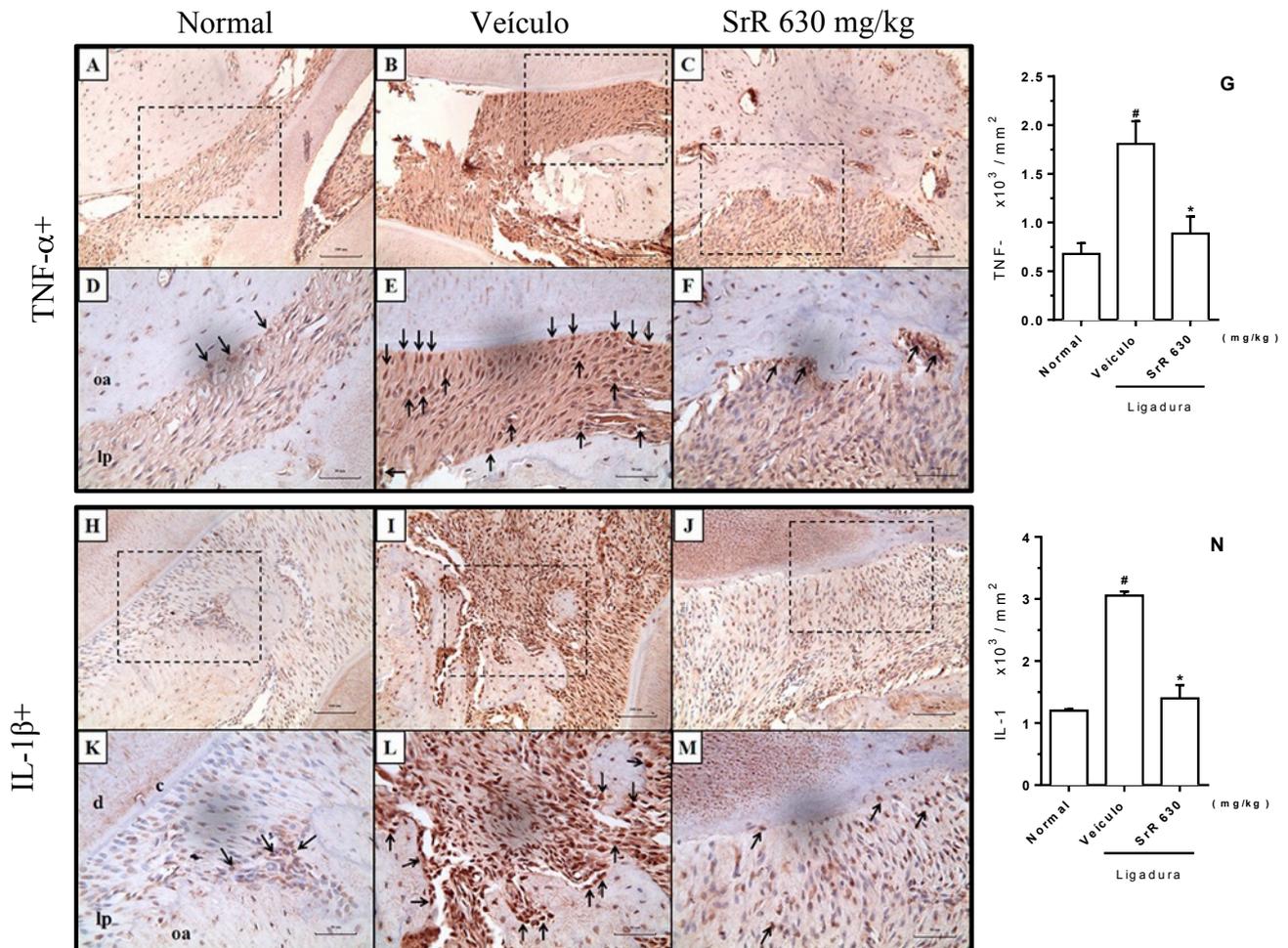
5.2.3 Análises imuno-histoquímicas para TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG e TRAP

A imunomarcção para citocinas pró-inflamatórias foi analisada no periodonto de ratas submetidas a 28 dias de ligadura. A permanência da ligadura causou aumento significativo ($p=0,04$ e $p=0,0002$) da imunomarcção para TNF- α , em 166% (FIGURAS 13E, G), e para IL-1 β , em 154% (FIGURAS 13L, N), nos periodontos do grupo que recebeu apenas veículo, quando comparado à de periodontos normais (FIGURAS 13D, K). O SrR (630 mg/kg) reduziu significativamente ($p=0,03$ e $p=0,002$) a imunomarcção para TNF- α , em 51% (FIGURAS 13F, G), e para IL-1 β , em 54% (FIGURAS 13M, N), comparado ao grupo veículo.

Foi analisado também o número de células imunocoradas para marcadores de remodelação óssea no periodonto das ratas. A ligadura durante 28 dias causou aumento significativo ($p=0,01$) da imunomarcção para RANKL, em 131% (FIGURAS 14E, G), nos periodontos do grupo veículo, comparado à imunomarcção em periodontos normais. O SrR reduziu significativamente ($p=0,003$) a imunomarcção para RANK, em 63% (FIGURAS 14F, G), comparado ao grupo veículo. Apesar de a permanência da ligadura ter causado uma

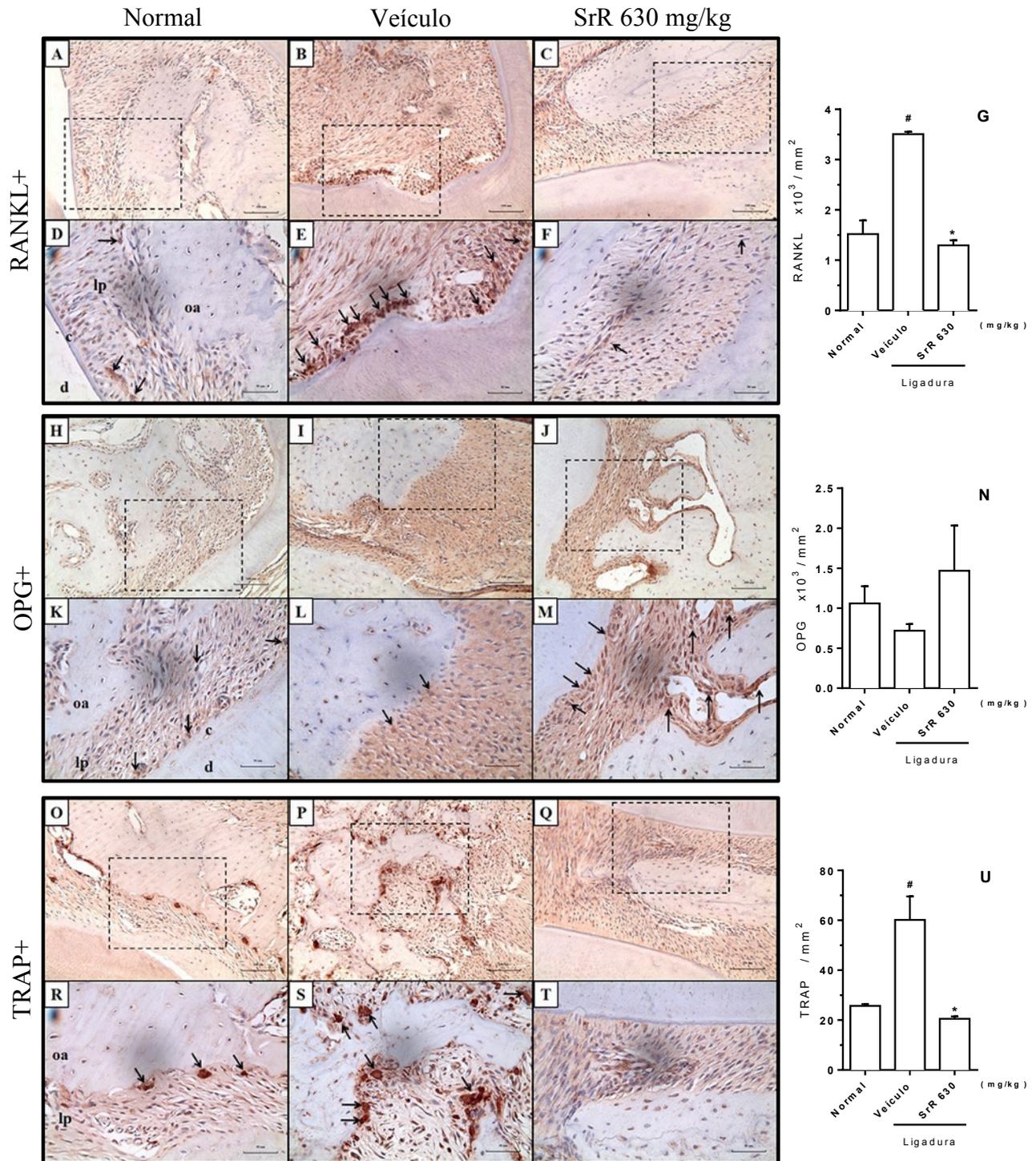
redução de 32% na imunomarcção para OPG (FIGURAS 14L a N) em maxilas do grupo veículo, em relação à imunomarcção de maxilas normais, e de o SrR (630 mg/kg) ter aumentado essa imunomarcção em 104% (FIGURAS 14M a N), em comparação ao grupo veículo, essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Em relação à imunomarcção para TRAP, houve aumento significativo ($p<0,05$) do número de células imunocoradas nos periodontos do grupo veículo, após 28 dias de ligadura, em 134% (FIGURAS 14S, U), comparado à imunomarcção em periodontos normais. O SrR reduziu significativamente ($p=0,01$) a imunomarcção para TRAP, em 66% (FIGURAS 14T, U), comparado ao grupo veículo.

Figura 13 – Fotomicrografias de periodontos imunomarcados para TNF- α e IL-1 β de ratas normais ou submetidas à ligadura durante 28 dias



Fotomicrografias de maxilas imunomarcadas para TNF α (A F) ou IL-1 β (H a M) de ratas normais (A, D, H e K), ou de ratas submetidas a 28 dias de ligadura e que receberam apenas veículo (B, E, I e L) ou tratadas com ranelato de estrôncio (SrR) 630 mg/kg (C, F, J e M). Setas indicam células imunomarcadas. Aumentos de 200x (A, B, C, H, I e J; barras = 100 μ m) e 400x (D, E, F, K, L e M; barras = 50 μ m). Número de células TNF α + (G) ou IL-1 β + (N). Valores expressos como média \pm erro padrão da média; One-way Anova, Bonferroni; $p<0,05$ em relação ao normal (#) ou ao grupo veículo (*).

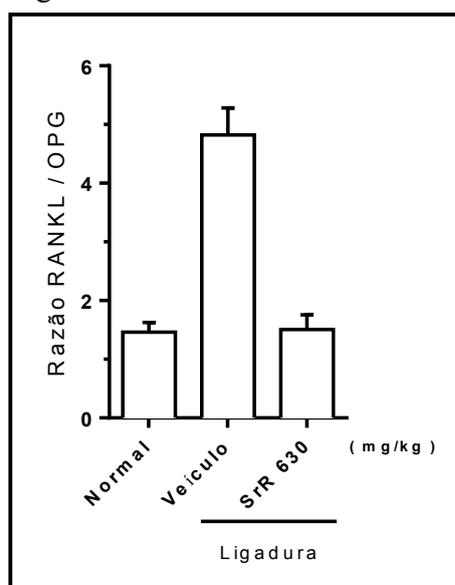
Figura 14 – Fotomicrografias de periodontos imunomarcados para RANKL, OPG e TRAP de ratas normais ou submetidas à ligadura durante 28 dias



Fotomicrografias de maxilas imunomarcadas para RANKL (A a F), OPG (H a M) ou TRAP (O a T) de ratas normais (A, D, H, K, O e R), ou de ratas submetidas a 28 dias de ligadura e que receberam apenas veículo (B, E, I, L, P e S) ou tratadas com ranelato de estrôncio (SrR) 630 mg/kg (C, F, J, M, Q e T). Setas indicam células imunomarcadas. Aumentos de 200x (A, B, C, H, I, J, O, P e Q; barras = 100 µm) e 400x (D, E, F, K, L, M, R, S e T; barras = 50 µm). Número de células RANKL+ (G), OPG+ (N) ou TRAP+ (U). Valores expressos como média ± erro padrão da média; One-way Anova, Bonferroni; p<0,05 em relação ao normal (#) ou ao grupo veículo (*).

Analisando a razão RANKL/OPG, observou-se que estava aumentada de forma significativa ($p < 0,05$) no grupo veículo, após 28 dias de ligadura, em comparação ao grupo normal (FIGURA 15). O tratamento com SrR (630 mg/kg) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a razão RANKL/OPG, comparado ao grupo veículo (FIGURA 15).

Figura 15 – Razão RANKL / OPG



Valores expressos como média \pm erro padrão da média; One-way Anova, Bonferroni.

5.3 Efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) em parâmetros sistêmicos

5.3.1 Dosagens séricas da fosfatase alcalina óssea e das transaminases hepáticas

Os 28 dias de permanência da ligadura causou redução significativa ($p = 0,002$) dos níveis séricos da fosfatase alcalina óssea (FAO), em 39%, no grupo que recebeu apenas veículo, em relação aos valores basais (TABELA 3). O SrR (630 mg/kg) preveniu significativamente ($p = 0,01$) a redução dos níveis séricos da FAO em 60%, quando comparado ao grupo veículo (TABELA 3).

Quanto à possível repercussão hepática, verificou-se que os animais submetidos à ligadura não apresentaram quaisquer alterações, avaliadas pelas transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), quando comparadas aos valores basais. O SrR, em quaisquer doses, não alterou esses níveis. Tais achados foram corroborados pelos aspectos macroscópicos, considerando o peso úmido do órgão, em relação à massa corpórea (índice hepático) do animal no 28º dia (TABELA 3).

Tabela 3 – Efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) sobre parâmetros sistêmicos de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias

Parâmetros	Normal	Reabsorção Óssea Alveolar			
		Veículo	SrR 70 mg/kg	SrR 210 mg/kg	SrR 630 mg/kg
FAO (U/L)	80,8 ± 2,9	49,01 ± 4,4 [#]	63,3 ± 5,5	61,3 ± 8,6	78,6 ± 7,9*
AST/TGO (U/L)	96,6 ± 3,5	112 ± 2,9	87,03 ± 2,7	92,8 ± 2,8	107,9 ± 5,8
ALT/TGP (U/L)	34,5 ± 1,9	42,6 ± 2,1	31,9 ± 2,8	34,03 ± 1,6	43,4 ± 1,7
Índice hepático (x 10 ⁻³)	35 ± 2,3	32,8 ± 1	34,1 ± 1,1	35,6 ± 1	37,3 ± 1,9
Leucócitos totais (x 10 ³ células/μL)	12,4 ± 0,4	21,4 ± 1,5 [#]	23,7 ± 2,95 [#]	21,5 ± 1,3 [#]	16 ± 1,4*
Neutrófilos (x 10 ³ células/μL)	1,3 ± 0,2	3,6 ± 0,6 [#]	4,5 ± 2,3 [#]	4,1 ± 0,8 [#]	2,4 ± 0,5
Linfomononucleares (x 10 ³ células/μL)	11,1 ± 0,4	17,6 ± 1,3 [#]	19,2 ± 1,6 [#]	17,3 ± 1,1 [#]	13,4 ± 1,4

Valores expressos como média ± erro padrão da média; One-way Anova; Bonferroni; p<0,05 em relação ao normal (#) ou ao grupo veículo (*).

5.3.2 Leucograma

No 28º dia de ligadura, os animais que receberam apenas veículo apresentaram leucocitose significativa (p=0,001), à custa de neutrofilia e linfomonocitose, comparados aos valores basais (Normal) (TABELA 3). O SrR (630 mg/kg), apesar de não ter prevenido a neutrofilia e a linfomonocitose, preveniu de forma significativa (p=0,02) o aumento do número total de leucócitos no 28º dia de ligadura, quando comparado aos valores do grupo veículo (TABELA 3).

5.3.3 Variação da massa corpórea dos animais

A instalação da ligadura no segundo molar superior dos animais causou perda de peso significativa (p<0,05) em 24 horas, em comparação aos animais normais, com uma queda em média de 6 g, em relação as suas massas corpóreas iniciais (dia 0), e o SrR, nas três doses utilizadas, não alterou a variação de peso (p>0,05), comparado ao grupo veículo (FIGURA 16).

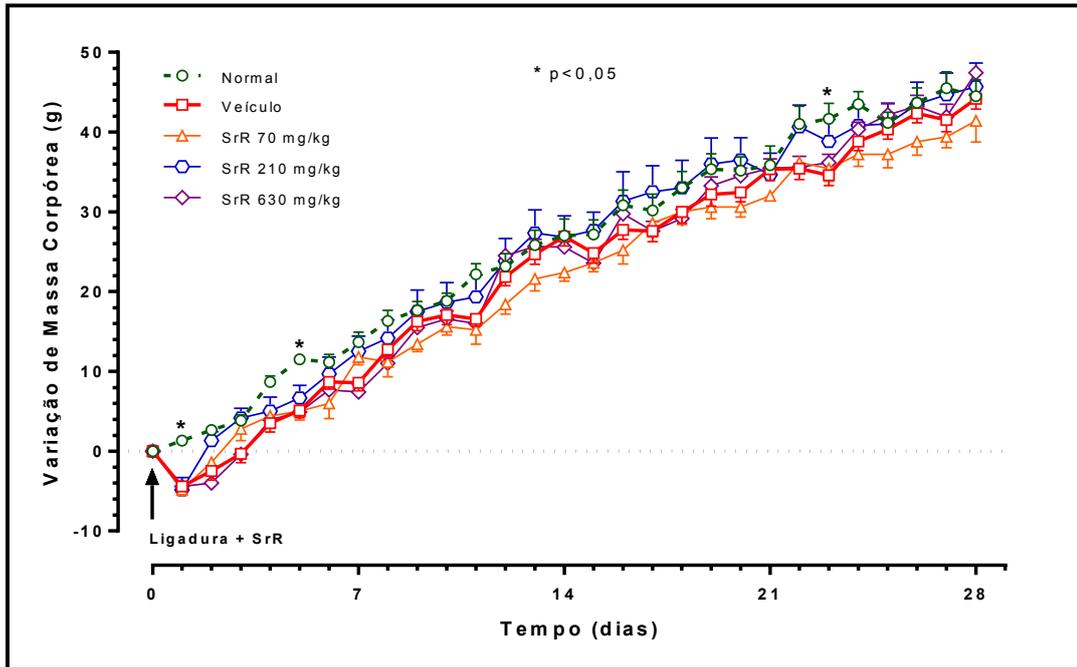


Figura 16 – Efeito do ranelato de estrôncio (SrR) na variação de massa corpórea de ratas submetidas à ligadura durante 28 dias

Animais normais (não manipulados), e submetidos à ligadura durante 28 dias que receberam veículo ou foram tratados com ranelato de estrôncio (SrR). Valores expressos como média \pm erro padrão da média; Two-way Anova, Tukey; * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo avaliou-se os efeitos do ranelato de estrôncio (SrR) sobre a perda óssea alveolar no contexto da resposta inflamatória. Para tanto, utilizou-se o modelo de reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em ratos, já bem estabelecido na literatura (ALENCAR *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2004, 2005; LIMA *et al.*, 2000, 2004).

O ranelato de estrôncio (SrR), um fármaco relativamente recente, com perfil antirreabsortivo e anabólico ósseos, tem sido amplamente estudado desde seu desenvolvimento na década de 1980, e o início de sua comercialização, em 2004. Atualmente é indicado para o tratamento da osteoporose grave, com elevado risco de fratura (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015). Nesse estudo, sua maior importância consistiu em se tornar uma alternativa plausível para o tratamento das doenças osseoinflamatórias, podendo beneficiar também pacientes que estejam em tratamento da periodontite, sobretudo por não oferecer os riscos referentes a outros fármacos antirreabsortivos, dentre eles, os bisfosfonatos, reconhecidos causadores de osteonecrose dos maxilares (LONGATO *et al.*, 2013; PICHARDO; MERKESTEYN, 2013).

Nesse estudo, foram escolhidas fêmeas de ratos *Wistar*, sendo esse gênero, comumente, o primeiro grupo a ser estudado em se tratando de osteoporose, muito embora o SrR seja avaliado tanto em homens como em mulheres. Em ratos machos e em fêmeas ovariectomizadas ou não, observou-se que a administração de altas doses de SrR apresentou maior nível plasmático em machos que em fêmeas, aparentemente devido a diferenças no nível de absorção gastrointestinal entre os gêneros. Entretanto, essa diferença não tem sido observada em humanos (DAHL *et al.*, 2001). A oscilação hormonal característica do período estral nas fêmeas também poderia ser um fator de influência, mas experimentos utilizando ratos machos e fêmeas, com 7 semanas de idade (já sexualmente maduros), tratados com SrR durante 2 anos demonstraram que a concentração de Sr nos ossos e o ganho de massa óssea foram similares entre os gêneros (AMMANN *et al.*, 2004).

No modelo utilizado no presente estudo, 28 dias de ligadura causou importante ROA, com conseqüente exposição das raízes dos molares, em comparação às maxilas normais das ratas. Esses achados estão de acordo com os já observados em outros estudos do nosso grupo de pesquisa, utilizando tempos menores (ALENCAR *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2000; GOES *et al.*, 2012, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2016; LEITÃO *et al.*, 2004, 2005;

LIMA *et al.*, 2000, 2004), o que confirma que tal modelo é de alta reprodutibilidade, promovendo reabsorção óssea alveolar (ROA), participação de células inflamatórias e mediadores químicos. É sabido que os principais fatores que influenciam na concentração de Sr no plasma e nos ossos são a dose e o tempo de tratamento (DAHL *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Portanto, nesse estudo utilizou-se um tempo de experimentação de 28 dias, diferente do tempo de 7 a 11 dias comumente utilizado em nosso laboratório, por ser o tempo necessário para que o Sr, após administração oral de SrR, atinja o equilíbrio plasmático e se incorpore aos tecidos mineralizados, que, segundo estudos farmacocinéticos em ratos, seria a partir de 10 dias, atingindo pico de concentração nos tecidos em 4 semanas (DAHL *et al.*, 2001; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015). O SrR (630 mg/kg), administrado durante 28 dias, reduziu significativamente a ROA induzida por ligadura. Tal achado está de acordo com estudo recente, onde se verificou que o SrR (900 mg/kg) durante 11 dias reduziu de forma significativa a ROA em ratos (KARAKAN *et al.*, 2017); ou em macacos, onde Buehler *et al.* (2001) demonstraram que o SrR diminuiu a reabsorção e manteve a formação ósseas durante a remodelação normal dos ossos. A escolha das diferentes doses de SrR para este trabalho teve como referência a dose de 625 mg/kg que tem sido utilizada em diversos trabalhos (AMMANN *et al.*, 2004; BAIN *et al.*, 2009; KARAKAN *et al.*, 2017; MIERZWA *et al.*, 2017), e reconhecida como segura sistemicamente e não deletéria à estrutura óssea (AMMANN *et al.*, 2004; BAIN *et al.*, 2009; CABRERA *et al.*, 1999).

Um problema importante decorrente da periodontite não controlada é a exposição de raízes, podendo-se exacerbar até a exposição das regiões de furca. Além de um resultado com danos estéticos, constitui-se em um nicho para acúmulo bacteriano (DENTINO *et al.*, 2013). Corroborando os estudos macroscópicos, a análise histométrica da área de furca dos segundos molares superiores evidenciou que a ligadura causou importante lesão dessa região, em consonância com os dados de Guimarães *et al.* (2016). Além disso, a análise histopatológica da região entre 1º e 2º molares revelou um acentuado infiltrado leucocitário gengival, perda de inserção periodontal, destruição parcial do cemento e acentuada reabsorção óssea alveolar, o que está de acordo com vários estudos do nosso grupo de pesquisa (ALENCAR *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2000; GOES *et al.*, 2012, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2016; LEITÃO *et al.*, 2004, 2005; LIMA *et al.*, 2000, 2004). O presente estudo mostrou que o SrR (630 mg/kg) reduziu significativamente a lesão de furca, igualmente corroborando os seus efeitos em nível macroscópico, bem como diminuiu os parâmetros histopatológicos, com redução significativa do infiltrado leucocitário e da perda de inserção periodontal, e redução da reabsorção do osso alveolar interdental, com preservação do cemento radicular.

Sabe-se que o infiltrado inflamatório agudo é predominado por leucócitos polimorfonucleares, os neutrófilos, constituindo-se na primeira linha de defesa do organismo (BORREGAARD, 2010; CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2016; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). Essas células, ao chegarem ao local de inflamação e iniciarem o processo de fagocitose, expõem o conteúdo de seus grânulos, que se constitui principalmente de espécies reativas de oxigênio, mieloperoxidase (MPO) e outras enzimas líticas (KLEBANOFF, 2005; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). Nesse estudo, observou-se que o infiltrado leucocitário no tecido gengival foi provavelmente predominado por neutrófilos, visto que houve um aumento na atividade da MPO, considerada um marcador da presença de neutrófilos nos tecidos. Nesse estudo, o SrR, após 28 dias de tratamento, embora tenha reduzido o infiltrado leucocitário visto no tecido periodontal, não reduziu a atividade da MPO. Este resultado sugere que o SrR talvez não atua sobre neutrófilos ou sobre o mecanismo de influxo dessas células, ao menos no tempo observado. Esse resultado foi semelhante ao de um estudo recente, onde se observou que o SrR, administrado por via oral uma hora antes da injeção intra-articular de zymosan, não reduziu o influxo celular e a atividade da MPO na membrana e fluido sinoviais, em modelo de inflamação da articulação temporomandibular (ATM) induzida por zymosan em ratos (ALVES *et al.*, 2017).

Além de neutrófilos, leucócitos mononucleares contribuem para o influxo celular, entre eles, linfócitos T *helper* (Th), em especial o Th17, e monócitos/macrófagos, que são grandes produtores de citocinas como TNF- α , IL-1 β e outras interleucinas pró-inflamatórias (PAGLIARI *et al.*, 2015; WALSH; CHOI, 2014). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória pertencente a uma superfamília, da qual faz parte também o RANKL, e é o primeiro fator a ser liberado na cascata da inflamação. IL-1 β é uma citocina pleiotrópica e é liberada em sequência ao TNF- α nos processos inflamatórios agudos (CUNHA *et al.*, 2005; PAGLIARI *et al.*, 2015). No tecido ósseo e no periodonto, essas citocinas são produzidas principalmente por macrófagos e células mesenquimais da medula óssea, mas também por linfócitos T ativados e fibroblastos do ligamento periodontal (KARNES; DAFFNER; WATKINS, 2015; PAGLIARI *et al.*, 2015; WALSH; CHOI, 2014; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). No osso, TNF- α e IL-1 β agem em conjunto em osteoblastos, aumentando a expressão de RANKL e diminuindo a de osteoprotegerina (OPG). Além disso, o TNF- α e a IL-1 β também podem agir em pré-osteoclastos, induzindo a fusão destes e a ativação de osteoclastos (PAGLIARI *et al.*, 2015; WEITZMANN, 2017). Então, avaliou-se a expressão das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β no tecido periodontal das ratas, através da imunomarcagem para essas citocinas. Observou-se, nesse modelo, aumento significativo do número de células imunomarcadas para TNF- α e

IL-1 β . O SrR (630 mg/kg) reduziu a imunomarcção para TNF- α e IL-1 β nas hemimaxilas com periodontite, o que sugere que o perfil antirreabsortivo ósseo do SrR teve relação com seu efeito anti-inflamatório nesse modelo. De fato, tal efeito redutor de TNF- α pelo SrR foi observado recentemente em modelo de inflamação da ATM induzida por zymosan, no qual os autores demonstraram que o SrR reduziu a imunomarcção para TNF- α nesse tecido, e sugeriram a citocina como um novo alvo para o SrR (ALVES *et al.*, 2017). Observou-se também a redução da expressão de IL-1 β no tecido sinovial da articulação de cachorros pelo tratamento com SrR em modelo de osteoartrite nesses animais (PELLETIER *et al.*, 2013). Como demonstrado aqui e nos demais estudos citados, o SrR reduziu TNF- α e IL-1 β . Entretanto, permanece desconhecido por quais mecanismos o SrR está realizando essa ação, portanto, sugerimos mais estudos nesse sentido.

Apesar de a literatura sugerir vários mecanismos pelos quais o SrR reduziria a expressão de citocinas e alteraria a razão RANKL/OPG e, conseqüentemente, reduziria a reabsorção óssea, ainda não se sabe ao certo quais vias de sinalização seriam responsáveis por esses efeitos (PILMANE *et al.*, 2017). Nesse estudo sugeriu-se que a redução da expressão de TNF- α e IL-1 β pelo tratamento com SrR pode estar contribuindo para menor ROA observada no modelo em questão. Sabendo-se que TNF- α e IL-1 β induzem a expressão de RANKL e reduzem a de OPG, portanto alterando essa relação, e conseqüentemente ativam osteoclastos, também avaliamos a marcação imuno-histoquímica para RANKL e OPG, e para enzima fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Observou-se que 28 dias de ligadura aumentou significativamente o número de células imunocoradas para os marcadores ósseos de reabsorção, RANKL e TRAP, em consonância com estudo recente do nosso grupo de pesquisa, em que se observou que a ROA induzida por ligadura aumentou o número de células imunomarcadas para RANKL e TRAP (GUIMARÃES *et al.*, 2016). Na imunomarcção para OPG, observou-se leve redução após 28 dias de ligadura, mas esta não foi significativa. Karakan *et al.* (2017) analisaram os níveis de OPG, utilizando o ELISA, em amostras do soro de ratos submetidos a ligadura e tratados com SrR por 11 dias, e não observaram diferenças estatísticas nos níveis de OPG entre os grupos controle, ligado e tratados.

O RANKL pertence à superfamília do TNF e é a principal citocina responsável pela ativação da osteoclastogênese, produzida por vários tipos celulares, principalmente osteoblastos ativos. Por outro lado, OPG, também sintetizada por osteoblastos, é um receptor com alta afinidade para RANKL, que impede a interação RANK-RANKL, conseqüentemente exercendo ação antiosteoclastogênica (IKEDA *et al.*, 2003; WALSH; CHOI, 2014). Nesse

estudo, observou-se que o SrR, na dose de 630 mg/kg, reduziu a imunomarcagem para RANKL no periodonto submetido à ligadura. Resultado semelhante foi demonstrado recentemente em outro trabalho com SrR (KARAKAN *et al.*, 2017). Observou-se que o SrR (630 mg/kg) aumentou a imunomarcagem para OPG, mas não de forma significativa. Isso pode sugerir que o SrR esteja agindo primariamente na redução da expressão de RANKL, com menos influência sobre a expressão de OPG. Em conjunto, a razão RANKL/OPG aumentada indica maior interação RANK-RANKL e, portanto, um aumento da osteoclastogênese. A menor razão RANKL/OPG decorrente do tratamento com o SrR observada em nosso estudo denota a ação antirreabsortiva óssea do fármaco nesse modelo. Tais achados podem ser corroborados pela menor imunomarcagem para TRAP induzida por SrR. Assim sendo, tal redução deve estar relacionada à menor expressão das citocinas inflamatórias. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa já têm demonstrado a capacidade de fármacos anti-inflamatórios naturais (GUIMARÃES *et al.*, 2016) e antirreabsortivos ósseos (GOES *et al.*, 2014) em reduzir a imunomarcagem para TRAP em periodonto de ratos. A TRAP é uma metaloenzima altamente expressa por osteoclastos, além de monócitos e macrófagos, e está relacionada principalmente com a regulação do citoesqueleto do osteoclasto e a formação da borda em escova, além da degradação de proteínas ósseas durante o processo de reabsorção óssea (HAYMAN; COX, 2004).

Até este ponto do trabalho, sugerimos que o efeito antirreabsortivo do SrR esteve relacionado à redução de TNF- α e IL-1 β e, conseqüentemente, menor ativação do eixo RANKL/OPG. Mas considerando-se que o SrR exerce efeitos antirreabsortivos e anabólicos ósseos, nesse estudo foram analisados os níveis séricos da fosfatase alcalina isoforma óssea (FAO), enzima que tem sido muito utilizada na avaliação de pacientes com patologias ósseas e em estudos pré-clínicos envolvendo metabolismo ósseo e fármacos antirreabsortivos (COLEMAN *et al.*, 2008; MEUNIER *et al.*, 2004; VAISMAN; MCCARTHY; CORTIZO, 2005), inclusive durante a ROA induzida por ligadura (GOES *et al.*, 2012, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2016; KARAKAN *et al.*, 2017). A FAO é uma metaloenzima de membrana sintetizada pelo osteoblasto e está envolvida no processo de mineralização da matriz colágena e formação óssea (FERNANDEZ; KIDNEY, 2007; VAN HOOFF; DE BROE, 1994). Nesse estudo, observou-se redução significativa dos níveis séricos da FAO, decorrente dos 28 dias de ligadura, o que está de acordo com dados do nosso laboratório (GOES *et al.*, 2012, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2016). Contudo, verificou-se que o SrR (630 mg/kg) preveniu a redução dos níveis séricos da FAO, durante o referido período de tempo, em relação aos animais não tratados, confirmando a atividade anabólica óssea do SrR. Sabe-se

que o SrR aumenta os níveis séricos da FAO durante o tratamento de mulheres com osteoporose pós-menopáusia (MEUNIER *et al.*, 2004) e homens osteoporóticos (KAUFMAN *et al.*, 2013), com aumento da atividade osteoblástica, e conseqüentemente, aumentando-se a formação óssea.

Um estudo, utilizando SrR em cultura de células derivadas de osteossarcoma de ratos, demonstrou que o Sr, na presença de cofatores magnésio e zinco, aumentou a atividade da FAO através de sua interação direta com a enzima. No estudo, sugeriu-se que o Sr se liga a sítios específicos dentro da enzima e aumenta a afinidade desta por seus substratos, agindo, portanto, como um cofator para FAO (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). Mais recentemente, um estudo utilizando osteoblastos primários de calvária de ratos, cultivados sobre “*scaffolds*” de osso bovino, demonstrou que o SrR aumentou a atividade da FAO, melhorando a mineralização do material bovino (SILVA, G. A. B. *et al.*, 2018).

Sabe-se que a FAO é uma das várias isoformas de fosfatase alcalina, enzima abundante tanto em placenta, fígado e intestino, como nos ossos, onde é predominante (FERNANDEZ; KIDNEY, 2007; VAN HOOFF; DE BROE, 1994). O SrR (630 mg/kg) preveniu a redução da fosfatase alcalina total (resultados não mostrados), com valores semelhantes aos basais, o que está de acordo com a literatura, em que o SrR preveniu a redução da FAO e da fosfatase alcalina total em ratas ovariectomizadas (MARIE *et al.*, 1993) ou não ovariectomizadas (AMMANN *et al.*, 2004), relacionando que as alterações nessa enzima foram de origem óssea. Sistemicamente, o SrR não causou alterações significantes no fígado, visto não ter alterado os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), bem como se mantiveram os índices hepáticos semelhantes aos valores normais dos animais. De forma geral, esses dados estão de acordo com Ammann *et al.* (2004), os quais observaram que o tratamento com SrR (625 mg/kg) durante 2 anos em ratos e ratas intactas não causou toxicidade hepática; e também com a European Medicines Agency (2015), relatando que o SrR não inibe as enzimas do citocromo P450, e não causa maiores alterações nos níveis séricos de transaminases hepáticas. Ademais, o SrR, na maior dose utilizada, reduziu significativamente a leucocitose ao final de 28 dias de tratamento, quando se observou também que o SrR não alterou a cinética da curva de peso dos animais, o que reforça que o SrR foi seguro e relativamente bem tolerado nesse estudo.

Em suma, o SrR apresentou efeito antirreabsortivo ósseo alveolar por reduzir as citocinas TNF- α e IL-1 β , com conseqüente redução da ativação do eixo RANKL/OPG, bem como por aumentar o anabolismo ósseo. Os resultados desse estudo reforçam que o SrR age por um mecanismo dual, mas também evidenciam que o fármaco possui efeito

imunomodulador, reduzindo citocinas pró-inflamatórias. Reunidas, essas informações tornam-se de suma importância para comunidade científica, no tocante ao conhecimento das propriedades do SrR, e abrem possibilidades para mais estudos com foco em seus efeitos anti-inflamatórios. E ainda, colocam o fármaco em uma posição mais elevada como alternativa terapêutica para as doenças osseoinflamatórias, considerando-o um agente modulador da resposta do hospedeiro.

7 CONCLUSÃO

- O efeito antirreabsortivo ósseo alveolar do ranelato de estrôncio está relacionado à redução das citocinas pró-inflamatórias no periodonto, com consequente redução da ativação do eixo RANKL/OPG.
- A redução da reabsorção óssea alveolar durante o tratamento com ranelato de estrôncio também pode estar relacionada com o aumento do anabolismo ósseo.
- A eficácia do ranelato de estrôncio como antirreabsortivo ósseo foi acompanhada por relativa segurança sistêmica nesse estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSEN, B.; GROVE, E. L.; VESTERGAARD, P. Nationwide registry-based analysis of cardiovascular risk factors and adverse outcomes in patients treated with strontium ranelate. **Osteoporos. Int.**, v. 25, p. 757-762, 2014.
- ALENCAR, V. B. M.; BEZERRA, M.; LIMA, V.; ABREU, A. L. C.; BRITO, G. A. C.; ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. Disodium chlodronate prevents bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 251-256, 2002.
- ALFADDA, T. I.; SALEH, A. M. A.; HOUILLIER, P.; GEIBEL, J. P. Calcium-sensing receptor 20 years later. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 307, p. 221-231, 2014.
- ALMEIDA, J.; ERVOLINO, E.; BONFIETTI, L. H.; NOVAES, V. C.; THEODORO, L. H.; FERNANDES, L. A.; MARTINS, T. M.; FALEIROS, P.L.; GARCIA, V.G. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 86, n. 10, p. 1166-1175, 2015.
- ALVES, S. M.; ABREU, S. C.; LEMOSA, J. C.; GOMES, F. I. F.; ALVES, S. M.; DO VAL, D. R.; FREITAS, R. S.; PEREIRA, K. M.; PINTO, V. P. T.; BRITO, G. A. C.; BEZERRA, M. M.; CRISTINO-FILHO, G.; CHAVES, H. V. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of strontium ranelate on the zymosan-induced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats depend on TNF- α inhibition. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 764-772, 2017.
- AMMANN, P.; SHEN, V.; ROBIN, B.; MAURAS, Y.; BONJOUR, JP.; RIZZOLI, R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 19, p. 2012-2020, 2004.
- ANDERSEN, C. C. P.; FLYVBJERG, A.; BUSCHARD, K.; HOLMSTRUP, P. Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studies. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 7, p. 1264-1275, July 2007.
- ARAÚJO, V. M. A.; MELO, I. M.; LIMA, V. Relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis: review of the literature. **Mediators Inflamm.**, v. 2015, art. ID 259074, 2015.
- ASPALLI, S. S.; SHETTY, V. S.; PARAB, P. G.; NAGAPPA, G.; DEVNOORKAR, A.; DEVARATHNAMMA, M. V. Osteoporosis and periodontitis: is there a possible link? **Indian J. Dent. Res.**, v. 25, n. 3, p. 316-320, 2014.
- ATTERITANO, M.; CATALANO, A.; SANTORO, D.; LASCO, A.; BENVENGA, S. Effects of strontium ranelate on markers of cardiovascular risk in postmenopausal osteoporotic women. **Endocrin.**, v. 25, Aug. 2015.
- BAIN, S. D.; JEROME, C.; SHEN, V.; DUPIN-ROGER, I.; AMMANN, P. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. **Osteoporos. Int.**, v. 20, p. 1417-1428, 2009.
- BAYER, E. A.; WILCHEK, M. The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. **Methods Biochem. Anal.**, v. 26, p. 1-45, 1980.

- BENATTI, B. B.; CAMPOS-JÚNIOR, J. C.; SILVA-FILHO, V. J.; ALVES, P. M.; RODRIGUES, I. R.; UBER-BUCEK, E.; VIEIRA, S. M.; NAPIMOGA, M. H. Effects of a *Mikania laevigata* extract on bone resorption and RANKL expression during experimental periodontitis in rats. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 20, n. 3, p. 340-346, 2012.
- BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; ALENCAR, V. B. M.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 1009-1014, 2000.
- BLUMER, M. J. F.; HAUSOTT, B.; SCHWARZER, C.; HAYMAN, A. R.; STEMPEL, J.; FRITSCH, H. Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. **Mechanisms of development**, v. 129, p. 162-173, 2012.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, p. 657-670, Nov. 2010.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, Sept. 1982.
- BROWN, E. M.; LIAN, J. B. New insights in bone biology: unmasking skeletal effects of the extracellular calcium sensing receptor. **Perspective**, v. 1, n. 35, p. 2012-2020, Sept. 2008.
- 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, Aug. 2001.
- BULLOCK, W. A.; ROBLING, A. G. Wnt-mediated modulation of bone metabolism: implications for Wnt targeting to treat extraskeletal disorders. **Toxicologic Pathology.**, v. 45, n. 7, p. 864-868, 2017.
- BULTINK, I. E. M.; VIS, M.; VAN DER HORST-BRUIJNSMA, I. E.; LEMS, W. F. Inflammatory rheumatic disorders and bone. **Curr. Rheumatol. Rep.**, v. 14, n. 3, p. 224-230, June 2012.
- CABRERA, W. E.; SCHROOTEN, I.; DE BROE, M. E.; D'HAESE, P. C. Strontium and bone. **J. Bone Miner. Res.**, v. 14, p. 661-668, 1999.
- CAVERZASIO, J.; THOUVEREY, C. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 27, p. 243-250, 2011.
- CHEN, H.; PENG, S.; DAI, L.; ZOU, Q.; YI, B.; YANG, X.; MA, Z. Oral microbial community assembly under the influence of periodontitis. **Plos One**, v. 12, n. 8, p. 1-14, 2017.
- CHOI, JK.; KIM, YT.; KWEON, HI.; PARK, EC.; CHOI, SH.; LEE, JH. Effect of periodontitis on the development of osteoporosis: results from a nationwide population-based cohort study (2003-2013). **Women's Health**, v. 17, n. 77, 2017.
- CHOUDHARY, S.; WADHWA, S.; RAISZ, L. G.; ALANDER, C.; PILBEAM, C. C. Extracellular calcium is a potent inducer of cyclo-oxygenase-2 in murine osteoblasts through an ERK signaling pathway. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 10, 2003.

CHOUDHARY, S.; HALBOUT, P.; ALANDER, C.; RAISZ, L. G.; PILBEAM, C. C. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. **J. Bone Miner. Res.**, v. 22, n. 7, p. 1002-1010, 2007.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 8 suppl., p. 1569-1576, Aug. 2008.

COHEN-SOLAL, M. Strontium overload and toxicity: impact on renal osteodystrophy. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 17, n. 2 suppl., p. 30-34, Aug. 2002.

COLEMAN, R.; BROWN, J.; TERPOS, E.; LIPTON, A.; SMITH, M. R.; COOK, R.; MAJOR, P. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: Clinical evidence and future directions. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 629-639, 2008.

CORTÉS-VIEYRA, R.; ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E. Neutrophil functions in periodontal homeostasis. **J. Immunol. Res.**, v. 2016, 2016.

CUNHA, T. M.; VERRI JR., W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, Feb. 2005.

DAHL, S. G.; ALLAIN, P.; MARIE, P. J.; MAURAS, Y.; BOIVIN, G.; AMMANN, P.; TSOUDEROS, Y.; DELMAS, P. D.; CHRISTIANSEN, C. Incorporation and distribution of strontium in bone. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 446-453, 2001.

DATTA, H. K.; NG, W. F.; WALKER, J. A.; TUCK, S. P.; VARANASI, S. S. The cell biology of bone metabolism. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 5, p. 577-587, May 2008.

DAVEY, R. A.; FINDLAY, D. M. Calcitonin: physiology or fantasy? **J. Bone Miner. Res.**, v. 28, n. 5, p. 973-979, May 2013.

DENTINO, A.; LEE, S.; MAILHOT, J.; HEFTI, A. F. Principles of periodontology. **Periodontol. 2000**, v. 61, n. 1, p. 16-53, 2013.

DEO, V.; BHONGADE, M. L. Pathogenesis of periodontitis: role of cytokines in host response. **Dent. Today**, v. 29, n. 9, p. 60-62, 64-66, 68-69, 2010.

DUPLOMB, L.; BAUD'HUIN, M.; CHARRIER, CL.; BERREUR, M.; TRICHET, VR.; BLANCHARD, F.; HEYMANN, D. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor κ B ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of serine⁷²⁷ phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3688-3697, 2008.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 11, n. 4, p. 219-227, Dec. 2010.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Strontium ranelate**. Recommendation to restrict of use. 2013. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2013/04/WC500142507.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2016.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Strontium ranelate**. Summary of product characteristics. 2015. Disponível em:

<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000560/WC500045525.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2016.

FERNÁNDEZ, J. M.; MOLINUEVO, M. S.; SEDLINSKY, C.; SCHURMAN, L.; CORTIZO, A. M.; MCCARTHY, A. D. Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. **European Journal of Pharmacology**, v. 706, p. 41-47, 2013.

FERNÁNDEZ, J. M.; MOLINUEVO, M. S.; MCCARTHY, A. D.; CORTIZO, A. M. Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn^{2+} and Mg^{2+} . **Biomaterials**, v. 27, p. 601-607, 2014.

FERNANDEZ, N. J.; KIDNEY, B. A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 36, n. 3, p. 223-233, 2007.

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.

FROMIGUÉ, O.; HAÏ, E.; BARBARA, A.; MARIE, P. J. Essential role of nuclear factor of activated T Cells (NFAT)-mediated Wnt signaling in osteoblast differentiation induced by strontium ranelate. **The J. Bio. Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25251-25258, 2010.

GAY, I. C.; CHEN, S.; MACDOUGALL, M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. **Orthod. Craniofac. Res.**, v. 10, n. 3, p. 149-160, 2007.

GIL, A.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: classic and novel actions. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 72, p. 87-95, 2018.

GLASS, D. A. 2nd.; KARSENTY, G. *In vivo* analysis of Wnt signaling in bone. **Endocrinol.**, v. 148, n. 6, p. 2630-2634, 2007.

GOES, P.; LIMA, A. P.; MELO, I. M.; REGO, R. O.; LIMA, V. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in *Wistar* rats. **Braz. Dent. J.**, v. 21, n. 3, p. 193-198, 2010.

GOES, P.; MELO, I. M.; DUTRA, C. S.; LIMA, A. P.; LIMA, V. Effect of alendronate on bonespecific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 57, p. 1537-1544, 2012.

GOES, P.; MELO, I. M.; SILVA, L. M.; BENEVIDES, N. M. B.; ALENCAR, N. M.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature induced alveolar bone loss in rats. **J. Periodont. Res.**, v. 49, p. 45-54, 2014.

GRIGORIEVA, D. V.; GORUDKO, I. V.; SOKOLOV, A. V.; KOSTEVICH, V. A.; VASILYEV, V. B.; CHERENKEVICH, S. N.; PANASENKO, O. M. Myeloperoxidase stimulates neutrophil degranulation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 161, n. 4, p. 495-500, Aug. 2016.

GUIMARÃES, M. V.; MELO, I. M.; ARAÚJO, V. M. A.; WONG, D. V. T.; FONTELES, C. S. R.; LEAL, L. K. A.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Dry extract of *Matricaria recutita* L. (Chamomile) prevents ligature-induced alveolar bone resorption in rats via inhibition of TNF- α and IL-1 β . **J. Periodontol.**, v. 87, n. 6, p. 706-715, June 2016.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunol.**, v. 15, p. 30-44, Jan. 2015.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 27, n. 6, p. 409-419, 2012.

HAYMAN, A. R.; COX, T. M. Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 10, p. 1905-1907, 2004.

HOLLBERG, K.; HULTENBY, K.; HAYMAN, A. R.; COX, T. M.; ANDERSSON, G. Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport. **Experimental Cell Research**, v. 279, p. 227-238, 2002.

HOLLBERG, K.; NORDAHL, J.; HULTENBY, K.; MENGARELLI-WIDHOLM, S.; ANDERSSON, G.; REINHOLT, F. P. Polarization and secretion of cathepsin K precede tartrate-resistant acid phosphatase secretion to the ruffled border area during the activation of matrix-resorbing clasts. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 23, p. 441-449, 2005.

HORWOOD, N. J.; KARTSOGIANNIS, V.; QUINN, J. M. W.; ROMAS, E.; MARTIN, J. T.; GILLESPIE, M. T. Activated T lymphocytes support osteoclast formation *in vitro*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 265, n. 1, p. 144-150, Nov. 1999.

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. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 1, p. 575-584, 2009.

IKEDA, T.; KASAI, M.; SUZUKI, J.; KUROYAMA, H.; SEKI, S.; UTSUYAMA, M.; HIROKAWA, K. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 47, p. 47217-47222, 2003.

IÑIGUEZ-ARIZA, N. M.; CLARKE, B. L. Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis. **Maturitas**, v. 82, p. 245-255, 2015.

ISAILOVIC, N.; DAIGO, K.; MANTOVANI, A.; SELMI, C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. **J. Autoimmunity**, v. 60, p. 1-11, 2015.

KARAKAN, N. C.; AKPINAR, A.; GÖZE, 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**, v. 88, n. 2, p. 24-31, 2017.

KARNES, J. M.; DAFFNER, S. D.; WATKINS, C. M. Multiple roles of tumor necrosis factor-alpha in fracture healing. **Bone**, v. 78, p. 87-93, 2015.

KAUFMAN, J. M.; AUDRAN, M.; BIANCHI, G.; BRAGA, V.; DIAZ-CURIEL, M.; FRANCIS, R. M.; GOEMAERE, S.; JOSSE, R.; PALACIOS, S.; RINGE, J. D.; FELSENBURG, D.; BOONEN, S. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of osteoporosis in men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 2, p. 592-601, 2013.

KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; MAKIHIRA, S.; SEKI, M.; KARIMBUX, N. Y.; GONCALVES, R. B.; VALVERDE, P.; DIBART, S.; LI, YP.; MIRANDA, L. A.; ERNST, C. W. O.; IZUMI, Y.; TAUBMAN, M. A. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **Am. J. Pathol.**, v. 169, n. 3, p. 987-998, Sept. 2006.

KINANE, D. F.; PRESHAW, P. M.; LOOS, B. G. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions – consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, n. 11 suppl., p. 44-48, 2011.

KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews**, v. 3, p. 1-14, 2017.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 598-625, May 2005.

KOBAYASHI, K.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; KOTAKE, S.; NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; MARTIN, T.; SUDA, T. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL–RANK interaction. **J. Exp. Med.**, v. 91, p. 275-285, Jan. 2000.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KUHR, A.; POPA-WAGNER, A.; SCHMOLL, H.; SCHWAHN, C.; KOCHER, T. Observation on experimental marginal periodontitis in rats. **J. Periodont. Res.**, v. 39, p. 101-106, 2004.

LEBLANC, V. Protelos, the first dual-action bone agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Medicographia**, v. 28, n. 1, p. 55-62, 2006.

LEITÃO, R. F. C.; ROCHA, F. A. C.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 9, p. 1227-1232, 2004.

LEITÃO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; CHAVES, H. V.; ROCHA, F. A.; LIMA, V.; BRITO, G. A. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 6, p. 956-963, June 2005.

LI, C.; PARIS, O.; SIEGEL, S.; ROSCHGER, P.; PASCHALIS, E. P.; KLAUSHOFER, K.; FRATZL, P. Strontium is incorporated into mineral crystals only in newly formed bone during strontium ranelate treatment. **J. Bone Miner. Res.**, v. 25, n. 5, p. 968-975, 2010.

- LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; ALENCAR, V. B. M.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 108, n. 2, p. 123-129, Apr. 2000.
- LIMA, V.; VIDAL, F. D.; ROCHA, F. A.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 1, p. 162-168, Jan. 2004.
- LIMA, V.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; REBOUCAS, C. G.; FALCAO, B. A.; AUGUSTO, R. F.; SOUZA, M. L.; LEITAO, B. T.; RIBEIRO, R. A. Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 113, n. 3, p. 210-217, June 2005.
- LIU, H.; LUO, T.; TAN, J.; LI, M.; GUO, J. Osteoimmunology' offers new perspectives for the treatment of pathological bone loss. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, May 2017.
- LIU, JM.; KUNG, A. W.; PHENG, C. S.; ZHU, HM; ZHANG, ZL.; WU, YY.; XU, L.; MENG, XW; HUANG, ML.; CHUNG, L. P.; HUSSAIN, N. H. N.; SUFIAN, S. S.; CHEN, JL. Efficacy and safety of 2 g/day of strontium ranelate in Asian women with postmenopausal osteoporosis. **Bone**, v. 45, p. 460-465, 2009.
- LONGATO, L.; CAVALLI, L.; MARCUCCI, G.; METOZZI, A.; GIUSTI, F.; BRANDI, ML.; PISCITELLI, P. Osteonecrosis of the jaw in a patient with rheumatoid arthritis treated with an oral aminobisphosphonate: a clinical case report. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 139-141, 2013.
- LU, H.; XU, M.; WANG, F.; LIU, S.; GU, J.; LIN, S.; ZHAO, L. Chronic stress accelerates ligature-induced periodontitis by suppressing glucocorticoid receptor- α signaling. **Exp. Mol. Med.**, v. 48, n. 223, 2016.
- MANABE, N.; KAWAGUCHI, H.; CHIKUDA, H.; MIYAURA, C.; INADA, M.; NAGAI, R.; NABESHIMA, Y.; NAKAMURA, K.; SINCLAIR, A. M.; SCHEUERMAN, R. H.; KURO-O, M. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. **J. Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2625-2631, 2001.
- MARIE, P. J.; HOTT, M.; MODROWSKI, D.; POLLAK, C.; GUILLEMAIN, J.; DELOFFRE, P.; TSOUDERO, Y. An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 8, n. 5, p. 607-615, 1993.
- MARIE, P. J.; FELSEBERG, D.; BRANDI, M. L. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. **Osteoporos. Int.**, v. 22, p. 1659-1667, 2011.
- MATSUO, K.; OTAKI, N. Bone cell interactions through Eph/ephrin. Bone modeling, remodeling and associated diseases. **Cell Adhesion & Migration**, v. 6, n. 2, p. 148-156, Mar./Apr. 2012.

- MATSUZAKI, G.; UMEMURA, M. Interleukin-17 family cytokines in protective immunity against infections: role of hematopoietic cell-derived and non-hematopoietic cell-derived interleukin-17s. **DOI: 10.1111/1348-0421.12560**. 2017.
- MESHCHERYAKOVA, A.; MECHTCHERIAKOVA, D.; PIETSCHMANN, P. Sphingosine 1-phosphate signaling in bone remodeling: multifaceted roles and therapeutic potential. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, v. 21, n. 7, p. 725-737, 2017.
- MEUNIER, P. J.; ROUX, C.; SEEMAN, E.; ORTOLANI, S.; BADURSKI, J. E.; SPECTOR, T. D.; CANNATA, J.; BALOGH, A.; LEMMEL, EM.; PORS-NIELSEN, S.; RIZZOLI, R.; GENANT, H. K.; REGINSTER, J. Y. The Effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 5, p. 459-468, Jan. 2004.
- MEUNIER, P. J.; ROUX, C.; ORTOLANI, S.; DIAZ-CURIEL, M.; COMPSTON, J.; MARQUIS, P.; CORMIER, C.; BADURSKI, G. I. J.; WARK, J. D.; COLLETTE, J.; REGINSTER, J. Y. Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. **Osteoporos. Int.**, v. 20, p. 1663-1673, 2009.
- MIERZWA, A. G. H.; CAMPOS, J. F.; JESUS, M. F.; NADER, H. B.; LAZARETTI-CASTRO, M.; REGINATO, R. D. Different doses of strontium ranelate and mechanical vibration modulate distinct responses in the articular cartilage of ovariectomized rats. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. xxx, p. 1-10, 2017.
- MIRRIELES, J.; CROFFORD, L. J.; LIN, Y.; KRYSCIO, R. J.; DAWSON, D. R.; EBERSOLE, J. L.; MILLER, C. S. Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 37, n. 12, p. 1068-1074, Dec. 2010.
- MOLON, R. S.; AVILA, E. D.; NOGUEIRA, A. V. B.; SOUZA, J. A. C.; AVILA-CAMPOS, M. J.; ANDRADE, C. R.; CIRELLI, J. A. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. **J. Periodontol.**, v. 85, n. 3, p. 465-477, 2012.
- MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin. Chim. Acta.**, v. 61, n. 1, p. 63-71, May 1975.
- NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **IJHS**, v. 1, n. 2, Apr./June 2017.
- NUNES, R. M.; MARTINS, M. R.; SILVA JUNIOR, F. S.; LEITE, A. C. R. M.; GIRAÃO, V. C. C.; CUNHA, F. Q.; MARINHO, A. L. L. F.; PINTO, A. C. M. D.; ROCHA, F. A. C. Strontium ranelate analgesia in arthritis models is associated to decreased cytokine release and opioid-dependent mechanisms. **Inflamm. Res**, v. 64, p. 781-787, 2015.
- NUSSBAUM, G.; SHAPIRA, L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, n. 11 suppl., p. 49-59, Mar. 2011.
- O'BRIEN, C.A.; NAKASHIMA, T.; TAKAYANAGI, H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 258-263, June 2013.

- OLIVEIRA, J. P.; QUERIDO, W.; CALDAS, R. J.; CAMPOS, A. P.; ABRAÇADO, L. G.; FARINA, M. Strontium is incorporated in different levels into bones and teeth of rats treated with strontium ranelate. **Calcif. Tissue Int.**, v. 91, n. 3, p. 186-195, 2012.
- OLSEN, I.; LAMBRIS, J. D.; HAJISHENGALLIS, G. Porphyromonas gingivalis disturbs host-commensal homeostasis by changing complement function. **J. Oral Microbiol.**, v. 9, 2017.
- OMDAHL, J. L.; DELUCA, H. F. Strontium induced rickets: metabolic basis. **Science**, v. 174, p. 949-951, 1971.
- OROZCO, A.; GEMMELL, E.; BICKEL, M.; SEYMOUR, G. J. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 256-260, Aug. 2006.
- PACIFICI, R. The immune system and bone. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 503, n. 1, p. 41-53, Nov. 2010.
- PAGLIARI, D.; TAMBURRELLI, F. C.; ZIRIO, G.; NEWTON, E. E.; CIANCI, R. The role of "bone immunological niche" for a new pathogenetic paradigm of osteoporosis. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2015, 2015.
- PASTERIS, J. D.; WOPENKA, B.; VALSAMI-JONES, E. Bone and tooth mineralization: why apatite? **Elements**, v. 4, n. 2, p. 97-104, 2008.
- PELLETIER, JP.; KAPOOR, M; FAHMI, H; LAJEUNESSE, D.; BLESIOUS, A.; MAILLET, J.; MARTEL-PELLETIER, J. Strontium ranelate reduces the progression of experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1 β in the synovium. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 72, p. 250-257, 2013.
- PI, M.; QUARLES, L. D. A novel cation-sensing mechanism in osteoblasts is a molecular target for strontium. **J. Bone Miner. Res.**, v. 19, n. 5, p. 862-869, Jan. 2004.
- PICHARDO, S. E. C.; MERKESTEYN, J. P. R. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: spontaneous or dental origin? **Oral Maxill. Surgery**, v. 116, n. 3, p. 2012-2020, Sept. 2013.
- PILMANE, M.; SALMA-ANCANE, M.; LOCA, D.; LOCS, J.; BERZINA-CIMDINA, L. Strontium and strontium ranelate: historical review of some of their functions. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 1222-1230, 2017.
- PONTES ANDERSEN, C. C.; FLYVBJERG, A.; BUSCHARD, K.; HOLMSTRUP, P. Relationship between periodontitis and diabetes: lessons from rodent studies. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 7, p. 1264-1275, 2007.
- POTEMPA, J.; MYDEL, P.; KOZIEL, J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nature Rev. Rheum.**, v. 13, Oct. 2017.
- QUERIDO, W.; CAMPOS, A. P.; FERREIRA, E. H. M.; SAN GIL, R. A.; ROSSI, A. M.; FARINA, M. Strontium ranelate changes the composition and crystal structure of the biological bone-like apatite produced in osteoblast cell cultures. **Cell. Tissue Res.**, v. 357, n. 3, p. 793-801, 2014.

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

QUINN, J. M. W.; HORWOOD, N. J.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J. Fibroblastic stromal cells express receptor activator of NF- κ B ligand and support osteoclast differentiation. **J. Bone Miner. Res.**, v. 15, n. 8, p. 1459-1466, 2000.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J.**, v. 22, p. 659-661, Mar. 2007.

REGINSTER, JY.; SEEMAN, E.; DE VERNEJOU, M. C.; ADAMI, S.; COMPSTON, J.; PHENEKOS, C.; DEVOGELAER, J. P.; CURIEL, M. D.; SAWICKI, A.; GOEMAERE, S.; SORENSEN, O. H.; FELSEBERG, D.; MEUNIER, P. J. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: treatment of peripheral osteoporosis (TROPOS) study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, n. 5, p. 2816-2822, 2005.

REGINSTER, JY.; BRUYÈRE, O.; SAWICKI, A.; ROCES-VARELA, A.; FARDELLONE, P.; ROBERTS, A.; DEVOGELAER, J. P. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. **Bone**, v. 45, n. 6, p. 1059-1064, Dec. 2009.

REGINSTER, JY.; KAUFMAN, JM.; GOEMAERE, S.; DEVOGELAER, J. P.; BENHAMOU, C. L.; D. FELSEBERG, D.; DIAZ-CURIEL, M.; BRANDI, ML.; BADURSKI, J.; WARK, J.; BALOGH, A.; BRUYÈRE, O.; ROUX, C. Maintenance of antifracture efficacy over 10 years with strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis. **Osteoporos. Int.**, v. 23, p. 1115-1122, 2012.

REGINSTER, JY.; BEAUDART, C; NEUPREZ, A.; BRUYÈRE, O. Strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: new insights and emerging clinical evidence. **Ther. Adv. Musculoskel. Dis.**, v. 5, n. 5, p. 268-276, 2013.

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

RICHARDS, D. Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population. **Evidence-based Dentistry**, v. 15, p. 70-71, 2014.

RÖMER, P.; DESAGA, B.; PROFF, P.; FALTERMEIER, A.; REICHENEDER, C. Strontium promotes cell proliferation and suppresses IL-6 expression in human PDL cells. **Annals of Anatomy**, v. 194, p. 208-211, 2012.

RYDER, M. I. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. **Periodontol.** 2000, v. 53, p. 124-137, 2010.

SAKKAS, L. I.; DAOUSSIS, D.; LIOSSIS, SN.; BOGDANOS, D. P. The infectious basis of ACPA-positive rheumatoid arthritis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1853, Sept. 2017.

- SANZ, M.; CERIELLO, A.; BUYSSCHAERT, M.; CHAPPLE, I.; DEMMER, R. T.; GRAZIANI, F.; HERRERA, D.; JEPSEN, S.; LIONE, L.; MADIANOS, P.; ATHUR, M.; MONTANYA, E.; SHAPIRA, L.; TONETTI, M.; VEGH, D. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. **J. Clin. Periodontol.**, v. 45, p. 138-149, 2018.
- SCHETT, G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. **European J. Clin. Invest.**, v. 41, p. 1361-1366, 2011.
- SILVA, G. A. B.; BERTASSOLI, B. M.; SOUSA, C. A.; ALBERGARIA, J. D.; PAULA, R. S.; JORGE, E. C. Effects of strontium ranelate treatment on osteoblasts cultivated onto scaffolds of trabeculae bovine bone. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 36, p. 73-86, 2018.
- SILVA, P. G. B.; FERREIRA JR, A. E. C.; OLIVEIRA, C. C.; BRIZENO, L. A. C.; WONG, D. V. T.; LIMA JR, R. C. P.; SOUSA, F. B.; MOTA, M. R. L.; ALVES, A. P. N. N. Chronic treatment with zoledronic acid increases inflammatory markers in periodontium of rats. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 46, p. 1046-1053, 2017.
- STANKO, P.; HOLLA, L. I. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. A review. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 158, n. 1, p. 35-38, 2014.
- STRAKA, M.; STRAKA-TRAPEZANLIDIS, M.; DEGLOVIC, J.; VARGA, I. Periodontitis and osteoporosis. **Neuro. Endocrinol. Lett.**, v. 36, n. 5, p. 401-406, 2015.
- TOKER, H.; OZDEMIR, H.; BALCI, H.; OZER, H. N-acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Periodont. Res.**, v. 47, p. 793-799, 2012.
- VAISMAN; MCCARTHY; CORTIZO. Bone-specific alkaline phosphatase activity is inhibited by bisphosphonates role of divalent cations. **Bio. Trace Element Res.**, v. 104, p. 131-140, 2005.
- VAN HOOFF, V. O.; DE BROE, M. E. Interpretation and Clinical Significance of Alkaline Phosphatase Isoenzyme Patterns. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 31, n. 3, p. 197-293, 1994.
- WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. **Frontiers Immunol.**, v. 5, art. 511, Oct. 2014.
- WANG, L.; QIAO, Q; FERRAO, R.; SHEN, C.; HATCHER, J. M.; BUHRLAGE, S. J.; GRAY, N. S.; WU, H. Crystal structure of human IRAK1. **PNAS Early Edition**, p. 1-6, 2017.
- WANG, Y.; ANDRUKHOV, O.; RAUSCH-FAN, X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, Nov. 2017.
- WARA-ASWAPATI, N.; SURARIT, R.; CHAYASADOM, A.; BOCH, J. A.; PITIPHAT, W. RANKL upregulation associated with periodontitis and Porphyromonas gingivalis. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 6, p. 1062-1069, June 2007.

WEI, S.; KITAURA, H.; ZHOU, P.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 2, p 282-290, 2005.

WEITZMANN, M. N. Bone and the Immune System. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 7, p. 911-924, 2017.

XIE, R.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; MALTHA, J. C. Inflammatory responses in two commonly used rat models for experimental tooth movement: comparison with ligature-induced periodontitis. **Arch. Oral Biol.**, v. 56, p. 159-167, 2011.

YANG, NY.; WANG, CY.; CHYUAN, IT.; WU, KJ.; TU, YK.; CHANG, CW.; HSU, PN.; KUO, M. YP.; CHEN, YW. Significant association of rheumatoid arthritis-related inflammatory markers with non-surgical periodontal therapy. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. xx, p. 1-8, 2017.

YAO, Z.; LEI, W.; DUAN, R.; LI, Y.; LUO, L.; BOYCE, B. F. RANKL cytokine enhances TNF-induced osteoclastogenesis independently of TNF receptor associated factor (TRAF) 6 by degrading TRAF3 in osteoclast precursors. **J. Biol. Chem.**, v. 292, n. 24, p. 10169-10179, 2017.

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; YAMAGUCHI, K.; MOCHIZUKI, S.; TOMOYATSU, A.; YANO, K.; GOTO, M.; MURAKAMI, A.; TSUDA, E.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; SUDA, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 7, p. 3597-3692, 1998.

YOSHITAKE, F.; ITOH, S.; NARITA, H.; ISHIHARA, K.; EBISU, S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- κ B signaling pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 17, p. 11535–11540, 2008.

YU, J.; TANG, J.; LI, Z.; SAJJAN, S.; O'REGAN, C.; MODI, A.; SAZONOV, V. History of cardiovascular events and cardiovascular risk factors among patients initiating strontium ranelate for treatment of osteoporosis. **Int. J. Women's Health**, v. 7, p. 913-918, 2015.

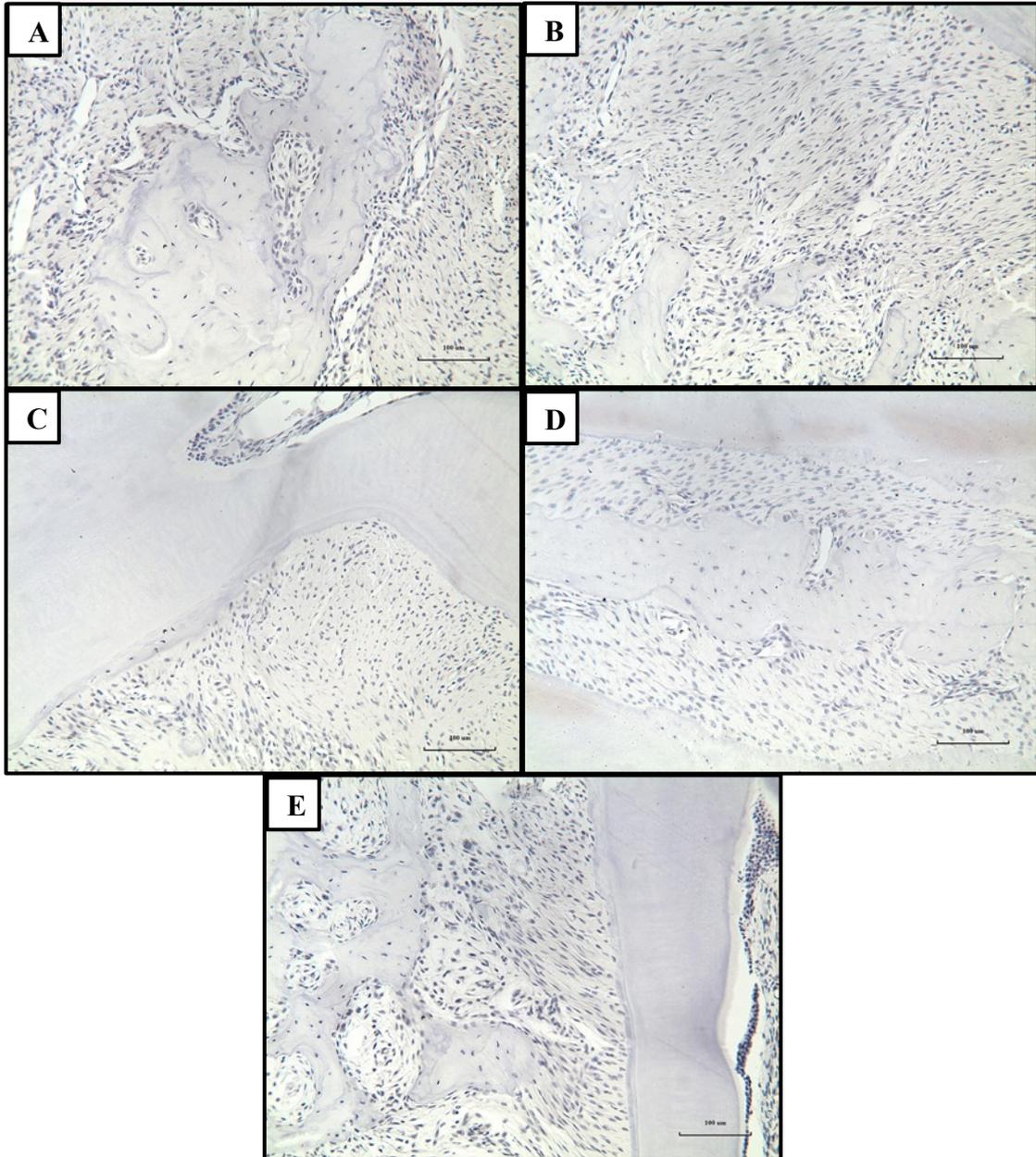
YUCEL-LINDBERG, T.; BÅGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 15, n. 7, Aug. 2013.

ZENOBIA, P.; HAJISHENGALLIS. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. **Periodontol. 2000**, v. 69, n. 1, p. 142-159, Oct. 2015.

ZHANG, P.; FAN, Y.; LI, Q.; CHEN, J.; ZHOU, W.; LUO, Y.; ZHANG, J.; SU, L.; XUE, X.; ZHOU, X.; FENG, Y. Macrophage activating factor: a potential biomarker of periodontal health status. **Arch. Oral Biol.**, v. 70, p. 94-99, 2016.

APÊNDICE

**Fotomicrografias dos controles negativos das imuno-histoquímicas
para TNF- α , IL-1 β , RANKL, OPG e TRAP**



Controles negativos das análises imuno-histoquímicas para TNF- α (A), IL-1 β (B), RANKL (C), OPG (D) e TRAP (E). Aumento de 200x.

ANEXO – CERTIFICADO DA CEUA UFC



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430970 Fortaleza – CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA EM RATAS: PAPEL DA VIA IL-6/STAT-3**”, protocolo Nº87/16, sob responsabilidade da Profa. Dra. VILMA DE LIMA, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 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 – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 16/12/2016.

Vigência do projeto	02/08/2016 a 02/08/2017
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de Animais	238
Peso e idade	150-170g de 5 a 7 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 16 de dezembro de 2016

Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siapo: 1520734