



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ANA CRISTINA DE MELLO FIALLOS

**ESTUDO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS
CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATOS: participação da via RANK/RANKL/OPG**

FORTALEZA

2013

ANA CRISTINA DE MELLO FIALLOS

**ESTUDO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS
CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATOS: participação da via RANK/RANKL/OPG**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Vilma de Lima.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

F52e Fiallos, Ana Cristina de Mello

Estudo do ranelato de estrôncio no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos via RANK/RANKL/OPG. Ana Cristina de Mello Fiallos.- 2013.
104f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Clínica odontológica.

Orientação: Profa. Dra. Vilma de Lima.

1. Estrôncio. 2. Regeneração óssea 3. Citocinas. I. Título

CDD: 617.632

ANA CRISTINA DE MELLO FIALLOS

**ESTUDO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS
CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATOS: participação da via RANK/RANKL/OPG**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vilma de Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio (Membro)
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli (Membro)
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Membro)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Sérgio Luís Pereira (Membro)
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, Mário, e às minhas filhas, Daniela e Nicole, por todo amor, dedicação, amizade e incentivo que me proporcionam, sem o que nada seria possível.

Aos meus pais, Hyeron e Edla (*in memoriam*), por todo o amor e amizade, exemplos de força, perseverança e fé.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga e orientadora, Profa. Vilma de Lima, pela dedicação, incentivo, competência e valiosa orientação científica sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

Ao professor da disciplina de Radiologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, Lúcio Mitsuo Kurita, pela colaboração para a realização das análises tomográficas.

Ao professor do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Cleto Nogueira, pela contribuição para o estudo histológico.

Aos professores Luís Carlos Spolidorio, Joni Augusto Cirelli, Nylane Maria Nunes de Alencar e Sérgio Luís Pereira por terem aceitado o convite de participar da banca da defesa deste estudo e diferirem críticas valiosas a este.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem e, em especial, aos professores Sergio Santiago, Lidiany Azevedo e Antero Soares Rôla (Bill) pela amizade, apoio e incentivo indispensáveis para a realização deste doutorado.

A todos os colegas pós-graduandos do Laboratório de Farmacologia Oral, Iracema Melo, Paula Goes, Ana Patrícia Lima, Mariana Vasconcelos, Larice Monteiro, Karin Soares, Aline Dantas e Thayanne Brasil, pela amizade e convívio.

Aos acadêmicos, Nicole Fiallos, Pedro Diniz e Bruna Bezerra, pela colaboração em vários experimentos.

A todos os estudantes de iniciação científica e monitores da disciplina de Farmacologia pelo companheirismo e apoio.

Às secretárias do PPGO, Lúcia e Janaína, pela atenção prestada.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sincera homenagem aos animais que, com suas vidas, prestaram inestimável contribuição para a realização deste estudo.

“Confia no Deus eterno de todo o seu coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo.” (Prov. 3: 5-6)

RESUMO

FIALLOS, A. C. M. ESTUDO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATOS: participação da via RANK/RANKL/OPG. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Clínica Odontológica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia. Data da defesa: Fortaleza, 7 de março de 2013. Orientadora: Profa. Dra. Vilma de Lima.

O reparo ósseo é um processo multifuncional com a participação de vários mediadores. Dentre os fármacos que interferem nesse processo, destaca-se o Ranelato de Estrôncio (RSr), o qual apresenta um mecanismo de ação dual, estimulando a neoformação ao mesmo tempo que inibe a reabsorção óssea. Para avaliar a capacidade osteoindutiva, modelos que favorecem o estudo do potencial de reparo ósseo local têm sido utilizados, tais como o de indução de defeitos de tamanhos críticos (CSD) em calvárias de ratos. O objetivo deste estudo foi avaliar o RSr no reparo ósseo de defeitos críticos de 8 mm de diâmetro induzidos em calvária de ratos. Para tanto, imediatamente após a cirurgia, os CSD receberam uma única aplicação de RSr (2,1 e 6,3 mg) ou nenhum tratamento (Controle). Grupos de animais foram sacrificados a 0 h e aos 15, 45, 90 e 120 dias após a indução do CSD e calvárias foram processadas para análise macroscópica, por meio de Tomografia Computadorizada tipo Cone Beam (TCCB), histológica (HE) e imunohistoquímica para RANKL e OPG. Na análise por TCCB, verificou-se que, no grupo RSr 6,3 mg, o RSr causou redução significativa da área do CSD aos 90 dias ($67,79 \pm 2,32 \text{ mm}^2$) e 120 dias ($62,28 \pm 4,17 \text{ mm}^2$), quando comparadas às calvárias recém-induzidas (0 h) ($78,61 \pm 0,96 \text{ mm}^2$) ($p < 0,05$), mas não em relação ao grupo Controle após 90 dias ($74,2 \pm 2,73 \text{ mm}^2$) e 120 dias ($72,04 \pm 1,74 \text{ mm}^2$) ($p > 0,05$). Na análise histológica das calvárias dos animais do grupo Controle foram observadas alterações histológicas significantes relacionadas ao reparo ósseo como neoformação óssea restrita às bordas do CSD quando comparados aos animais do grupo normal em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). Os animais do grupo RSr (2,1 mg) não apresentaram alterações histológicas significantes quando comparados ao grupo Controle em todos os períodos experimentais ($p > 0,05$) enquanto que, nos animais do grupo RSr (6,3 mg), foram observados aspectos histológicos compatíveis com reparo ósseo aos 90 dias e aos 120 dias como neoformação óssea em borda e no centro do CSD com diferenças significantes quando comparados aos grupos Controle ou RSr 2,1 mg ($p < 0,05$). Complementando esses resultados, as calvárias dos animais após 120 dias da aplicação local de RSr (6,3 mg) apresentaram intensa imunexpressão para OPG e negativa para RANKL, enquanto que as calvárias do grupo Controle apresentaram imunexpressão moderada apenas para RANKL. Assim, pode-se concluir que o tratamento local com RSr evidenciou seu papel osteoindutor favorecendo a reparação óssea do CSD pela modulação da via RANKL/RANK/OPG.

Palavras-chave: Estrôncio. Regeneração óssea. Citocinas

ABSTRACT

FIALLOS, A. C. M. **Study of Strontium ranelate in bone repair of rat calvaria critical size defect: participation of axis RANK-RANKL-OPG.** Thesis submitted as a partial full filmed of the requirement presented to degree of Doctor's title in Dentistry of Clinical Department of Pharmacy, Dentistry and Nursing Faculty of Federal University of Ceará. Defense date: Fortaleza, March 7, 2013. Supervisor: Prof. Dr. Vilma de Lima.

The bone repair is a multifunctional process involving various mediators. Among the many drugs that interfere with this process, we highlight the Strontium Ranelate (SrR), which has a dual mechanism of action, stimulating neoformation at the same time, which inhibits bone resorption. To evaluate the osteoinductive capacity, models of study that investigate the potential for bone repair site have been used, such as induction of critical size defects (CSD) in rat calvaria. The aim of this study was to evaluate bone healing induced by SrR in critical defects of 8 mm in diameter in rat calvaria. For this purpose, immediately after surgery, the CSD received a single application of SrR (2.1 and 6.3 mg) or no treatment (Control). Groups of animals were sacrificed at 0 h and at 15, 45, 90 and 120 days after induction of CSD and calvarial samples were removed and processed for analysis by macroscopic type Cone Beam Computed Tomography (CBCT), histological (HE) and immunohistochemical for RANKL and OPG. In CBCT analysis, it was found that induction of CSD group SrR 6.3 mg caused a significant reduction of the areas of CSD at 90 days ($67.79 \pm 2.32 \text{ mm}^2$) and at 120 days ($62.28 \pm 4.17 \text{ mm}^2$) compared to calvariae newly induced (0 h) ($78.61 \text{ mm}^2 \pm 0.96$) ($p < 0.05$) but not compared to Control groups at 90 days ($74.2 \pm 2.73 \text{ mm}^2$) and at 120 days ($72.04 \pm 1.74 \text{ mm}^2$) ($p > 0.05$). We observed in the histological analysis of calvariae of Control groups significant changes related to bone repair when compared to normal group ($p < 0.05$). The animals that received SrR (2.1 mg) showed no significant histological changes, compared to the Control groups in all experimental periods ($p > 0.05$), while animals of SrR 6.3 mg group showed significantly histological features consistent with bone repair at 90 days and at 120 days as neoformation in edge and center of the CSD when compared to Control or SrR 2.1 mg groups ($p < 0.05$). To complement these results, the calvariae of animals after 120 days of topical application of SrR (6.3 mg) showed intense immunostaining for OPG and RANKL negative, whereas the calvariae of Control groups showed moderate immunoreactivity only for RANKL. Thus, it can be concluded that the local treatment with SrR (6.3 mg) revealed its role favoring osteoinductive bone repair by modulating the CSD RANK/RANKL/OPG.

Keywords: Strontium. Bone regeneration. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da ativação da osteoclastogênese	27
Figura 2 – Ciclo da remodelação óssea	31
Figura 3 – Estrutura química da molécula do RSr	36
Figura 4 – Efeitos do RSr em osteoblastos e osteoclastos in vitro	41
Figura 5 – Ranelato de Estrôncio ativa componentes da sinalização Wnt canônica e não-canônica em osteoblastos.....	43
Figura 6 – Sequência de passos para a indução do CSD	53
Figura 7 – Organograma da distribuição dos grupos experimentais	55
Figura 8 – Procedimentos para a obtenção das imagens tomográficas das calvárias	57
Figura 9 – Quantificação da área do CSD	58
Figura 10 – Processamento histológico das calvárias	59
Figura 11 – Efeito do tratamento local com 6,3 mg de RSr	64
Figura 12 – Imagens tomográficas das calvárias dos animais	64
Figura 13 – Corte histológico da área central da calvaria de ratos adultos normais.....	65
Figura 14 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com salina aos 15 dias	68
Figura 15 – Fotomicrografia em microscópio óptico da área central do CSD de calvária de animal tratado com salina aos 15 dias	68
Figura 16 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com salina aos 45 dias	69
Figura 17 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com Salina aos 90 dias.....	69
Figura 18 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com salina aos 120 dias	70
Figura 19 – Fotomicrografia em microscópio óptico da área da borda do CSD de calvária de animal tratado com salina aos 120 dias	70
Figura 20 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD da calvária de animal tratado com 2,1 mg RSr aos 15 dias.....	72
Figura 21 – Fotomicrografia em microscópio óptico da área central do CSD de calvária de animal tratado com 2,1 mg de RSr aos 15 dias	72

Figura 22 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 2,1 mg aos 45 dias.....	73
Figura 23 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 2,1 mg aos 90 dias.....	73
Figura 24 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 2,1 mg aos 120 dias.....	74
Figura 25 – Fotomicrografia em microscópio óptico da área central do CSD de calvária de animal tratado com 2,1 mg de RSr aos 120 dias	74
Figura 26 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 6,3 mg aos 15 dias.....	76
Figura 27 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com 6,3 mg de RSr aos 15 dias.....	76
Figura 28 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 6,3 mg aos 45 dias.....	77
Figura 29 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 6,3 mg aos 90 dias	77
Figura 30 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com 6,3 mg de RSr aos 90 dias.....	78
Figura 31 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 6,3 mg aos 120 dias.....	78
Figura 32 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com 6,3 mg de RSr aos 120 dias.....	79
Figura 33 – Fotomicrografias de calvárias em estereomicroscópio	79
Figura 34 – Fotomicrografia da marcação de citocinas OPG e RANKL na área central do CSD em calvárias de animal normal, tratados com salina e com 6,3 mg de RSr, após 120 de experimentação	81
Figura 35 – Modelo teórico representativo do mecanismo de ação do RSr em defeitos de tamanho crítico induzidos na calvária de ratos	87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média \pm Erro padrão da medida da área do CSD induzidos nas calvárias de ratos nos intervalos de tempo 64
- Tabela 2 – Análise histológica de calvárias de ratos normais e de ratos submetidos à indução do CSD nos grupos controle sem tratamento (CST) e em grupos que receberam aplicação local de Rsr (2,1 e 6,3 mg) nos diferentes tempos experimentais. **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMU	Unidades multicelulares básicas
BSA	Albumina bovina
CaRs	Receptores sensíveis ao cálcio extracelular
CBFA1	<i>Core-Bindin Factor A1</i>
Cn	Calcineurina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CSD	Defeito de tamanho crítico
DAG	Diacilglicerol
DMO	Densidade mineral óssea
DXA	Absorimetria de energia dual de raio X
EDTA	Ácido etineldiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
FGE	fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
Frizzled	Família de receptores acoplados da proteína G
GDF	Fator de diferenciação de crescimento
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
HE	Análise histopatológica
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
IGF	Fator de crescimento derivado da Insulina
Ihh	<i>Fator Indian hedgehog</i>
IL	Interleucina
INF γ	Interferon gama
LRP5/LPR6	Receptor de lipoproteína de baixa densidade da proteína-5/6
MAPKs	Proteínas ativadoras de mitose
MCP-1	Monócitos-1
MMP	Metaloproteinases
MSCF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NFATc1	Fator nuclear de Células T ativadas

NOR	Grupos controle normal
OPG	Osteoprotegerina
OPGL	Ligante da osteoprotegerina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PDGF	Fator de crescimento de plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PTH	Paratormônio
PTHr	Proteína relacionada ao paratormônio
RANK	Receptor ativador do fator nuclear- κ B
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear- κ B ligante
RAW	Macrófagos de camundongos
RhoA	Receptor muscarínico da acetil-colina
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RSr	Ranelato de Estrôncio
Runx2	Fator de transcrição relacionado ao <i>Runt</i> tipo 2
Rykr	Receptor tirosina quinase
S1P	Sphingosina 1-Fosfato
SAL	Grupos Salina
SOTI	<i>Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention</i>
TCCB	Tomografia Computadorizada tipo Cone Beam
TGF	Fator Transformador de Crescimento
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TRANCE	Citocina Indutora de Ativação Relacionada ao TNF
TROPOS	<i>Treatment of Peripheral Osteoporosis Study</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
Wnt	Proteínas ricas em cisteína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	Remodelação óssea	20
2.1.1	<i>Células envolvidas na remodelação óssea</i>	21
2.1.1.1	<i>Osteoblastos</i>	21
2.1.1.2	<i>Células de revestimento</i>	22
2.1.1.3	<i>Osteócitos</i>	22
2.1.1.4	<i>Osteoclastos</i>	23
2.1.2	<i>Sistema RANK/RANKL/OPG e a sinalização da osteoclastogênese</i>	24
2.1.3	<i>O ciclo da remodelação óssea</i>	26
2.1.3.1	<i>Fase de ativação</i>	27
2.1.3.2	<i>Fase de reabsorção</i>	28
2.1.3.3	<i>Fase de reversão</i>	29
2.1.3.4	<i>Fase de formação</i>	30
2.1.3.5	<i>Fase terminal, quiescente ou de repouso</i>	31
2.2	Reparação óssea	32
2.3	Modelos de defeitos ósseos críticos	35
2.4	Ranelato de Estrôncio	36
2.4.1	<i>Características químicas</i>	36
2.4.2	<i>Mecanismo de ação do RSr</i>	38
2.4.3	<i>Estudos in vitro</i>	39
2.4.3.1	<i>Efeito do RSr sobre os osteoclastos</i>	39
2.4.3.2	<i>Efeitos do RSr sobre osteoblastos e osteócitos</i>	40
2.4.4	<i>Estudo do RSr em animais</i>	44
2.4.5	<i>Ensaio clínico com o RSr</i>	47
3	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	51
3.1	Objetivo geral	51
3.2	Objetivos específicos	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1	Animais	52
4.2	Protocolo experimental	52

4.2.1	Modelo de indução de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos.....	52
4.2.2	Grupos experimentais.....	54
4.2.2.1	Grupo Controle Normal (NOR).....	54
4.2.2.2	Grupos Controle (CLT).....	55
4.2.2.3	Grupos Ranelato de Estrôncio.....	55
4.2.2.4	Grupo Baseline (0 h).....	55
4.2.3	Parâmetros avaliados no defeito ósseo de tamanho crítico.....	56
4.2.3.1	Análise macroscópica do CSD através de Tomografia Computadorizada tipo Cone Beam (TCCB).....	57
4.2.3.2	Estudo histopatológico do CSD.....	59
4.2.3.3	Análise imunohistoquímica do CSD para citocinas RANKL e OPG.....	61
4.3	Análises estatísticas	63
5	RESULTADOS	64
5.1	Análise macroscópica das calvárias pela Tomografia Computadorizada tipo Cone Beam (TCCB).....	64
5.2	Análise histopatológica das calvárias	66
5.2.1	Calvárias dos animais sem a indução do CSD (Normal).....	66
5.2.2	Calvárias dos animais Controle (CLT).....	67
5.2.3	Calvária submetidas ao tratamento local com Ranelato de Estrôncio.....	72
5.2.3.1	Calvárias tratadas com 2,1 mg de Ranelato de Estrôncio.....	72
5.2.3.2	Calvárias que receberam tratamento local com 6,3 mg de Ranelato de Estrôncio.....	76
5.3	Análises imunohistoquímicas das calvárias para expressão de citocinas (OPG e RANKL) em animais normais, controle e tratados localmente com 6,3 mg de RSR.....	81
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICES.....	102

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas da odontologia é regenerar áreas nas quais o tecido ósseo foi perdido. Situações clínicas como fraturas, doenças ósseas em particular as periodontites podem resultar em perda de tecido ósseo. Entretanto, condições locais como defeitos de grandes dimensões ou alterações metabólicas que afetam o metabolismo ósseo podem determinar uma redução na velocidade e na qualidade da regeneração. Assim, o resultado consiste, na maioria das vezes, em um reparo incompleto, com sérios prejuízos estéticos e funcionais que, muitas vezes, comprometem a qualidade de vida do indivíduo (KREBSBACH; KOHN, 2009; PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

Entre os procedimentos terapêuticos propostos para recuperar perdas ósseas, o autoenxerto, homoenxertos e os biomateriais sintéticos são os mais utilizados. Até o presente, apenas o autoenxerto reúne as qualidades biológicas definidas como “ideais” para os substitutos ósseos tais como a osteoindução, osteogênese e a osteocondução. Entretanto, desvantagens relacionadas ao uso do autoenxerto como a alta morbidade, restringem sua aplicação clínica (LAVERNIA *et al.*, 2004).

Assim, visando superar as limitações das terapias atuais, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para descobrir novas tecnologias ou aprimorar tratamentos capazes de potencializar o reparo de defeitos ósseos (LAVERNIA *et al.*, 2004; SCHELLER; KREBSBACH; KOHN, 2009).

Dentro deste contexto, a maioria das pesquisas tem buscado uma melhor compreensão dos fenômenos celulares e moleculares que modulam o mecanismo de remodelação óssea e do processo de reparação de fraturas ósseas (BOYCE; XING, 2008; ANANDARAJAH, 2009; COLOMBIER; LESCLIOUS; TUSLANE, 2005; MARZONA; PAVOLINI, 2009).

Vários pesquisadores têm buscado novas abordagens com ações sob o metabolismo ósseo, dentre eles, fármacos com propriedades osteoindutoras. A literatura revela que o potencial osteoindutivo de fármacos como as estatinas (NYAN *et al.*, 2007; KILIÇ *et al.*, 2008; CALIXTO *et al.*, 2011; RUTLEDGE *et al.*, 2011), paratormônio (PTH) (ANDREASSEN; CACCIAFESTA, 2004; HORCH *et al.*, 2006; YUN *et al.*, 2010) ou osteoindutor de bisfosfanatos

(SANTAMARIA JÚNIOR *et al.*, 2010) vem sendo investigado com vistas ao uso local ou sistêmico.

A análise da literatura revela que o Ranelato de Estrôncio (RSr), utilizado clinicamente com sucesso no tratamento da osteoporose, tem-se destacado, especialmente, por possuir mecanismos de ação duais, atuando ora como anabolizante, ora apresentando um efeito antirreabsortivo ósseo (HURTELLEMAIRE *et al.*, 2009; BRENNAN *et al.*, 2009; MARIE, 2006, 2007). Estudos de osteopenia em ratos têm demonstrado que a administração sistêmica do fármaco é capaz de prevenir a perda óssea (MARIE *et al.*, 1993; HOTT *et al.*, 2003; AMMANN *et al.*, 2004; LIMA, 2010) e favorecer o reparo de fraturas (LI *et al.*, 2010).

Estudos mostram que uma das vias moleculares por meio da qual o RSr exerce estes efeitos no osso é a via do receptor ativador do Fator Nuclear κ B/ Ligante/Osteoprotegerina (RANK/RANKL/OPG). Demonstrou-se que o RSr pode diminuir RANKL, enquanto aumenta a expressão de OPG, com resultado favorável à formação óssea (MARIE; FELSEMBERG; BRANDI, 2011).

Atualmente, o uso clínico do RSr, na forma sistêmica, tem apresentado sucesso para o tratamento e prevenção de fraturas em mulheres com osteoporose pós-menopáusia em decorrência do efeito positivo sobre a recuperação da microarquitetura e massa ósseas (AMMANN *et al.*, 2007; ARLOT *et al.*, 2008; MARIE; FELSEMBERG; BRANDI, 2011).

Dentre os modelos de estudo que podem ser aplicados para a investigação do potencial de reparo ósseo local de fármacos, a indução de um defeito de tamanho crítico em calvária de ratos (8 mm) é considerado ideal. Defeitos desta magnitude, no rato, não sofrem reparo completo e espontâneo devido ao baixo potencial regenerativo da calvária, característica que assegura os resultados quando positivos (TAKAGI; URIST, 1982; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Todavia, se por um lado o uso sistêmico do RSr para o tratamento de patologias ósseas de caráter sistêmico, como a osteoporose, é justificável, por outro, a aplicação local deste fármaco seria a forma mais simples para obtenção de reparo ósseo, como no caso do preenchimento de defeitos ósseos na cavidade oral.

Neste estudo, é apresentada uma revisão da literatura acerca do estado da arte no que se refere à remodelação e à regeneração ósseas e às pesquisas relacionadas ao Ranelato de Estrôncio, bem como a discussão dos resultados

obtidos com o Ranelato de Estrôncio nesse modelo por meio das análises macroscópicas, histológicas e imunohistoquímicas realizadas nas calvárias dos animais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Remodelação óssea

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado, composto principalmente por elementos inorgânicos (cristais de hidroxiapatita – 65%) e orgânicos (proteínas – 35%). Essas duas fases fornecem características mecânicas, tais como: elasticidade, resistência e dureza, além de outras, como: o suporte dos músculos, proteção dos órgãos vitais, locomoção e alojamento da medula óssea (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; KUMAR *et al.*, 2008).

Histologicamente, o osso é formado por um componente celular representado pelos osteoblastos, células de revestimento, osteócitos e osteoclastos e um material extracelular calcificado, a matriz óssea. Os componentes da matriz são fosfatos de cálcio, que formam cristais nanométricos de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ e outros íons minerais incluindo CO_3 , HPO_4 , F, Cl, Mg, Na, íons de K, e alguns oligoelementos como o estrôncio e o zinco (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; ROSCHGER *et al.*, 2008).

Uma das principais características do tecido ósseo é o alto grau de remodelação, um processo dinâmico que resulta na renovação do esqueleto por meio da reabsorção (remoção do osso antigo) e da reposição por osso recentemente formado. Este processo fisiológico vai desde o nascimento até a morte do indivíduo e ocorre por conta da atividade balanceada das células ósseas, destacando-se os osteoblastos e osteoclastos (CLARKE, 2008).

A capacidade de remodelação confere ao osso um potencial singular de reparação que, muitas vezes, permite a reparação de fraturas ou de defeitos ósseos reconstituindo a estrutura original do tecido perdido. Como estão funcionalmente interligadas, as alterações que ocorrem na remodelação óssea interferem de forma decisiva na quantidade e na qualidade do reparo ósseo (TAKAYANAGI, 2005; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008).

O estudo realizado por Epker e Frost (1965) foi um dos pioneiros a demonstrar que interações entre osteoblastos e osteoclastos eram essenciais para a remodelação óssea. Atualmente, sabe-se que o equilíbrio da atividade destas células é regulado por fatores físicos como a estimulação mecânica e por diversos

polipeptídios como hormônios e citocinas (BOYCE; XING, 2007; ANANDARAJAH, 2009). Um desequilíbrio dos fatores mencionados conduz ao desenvolvimento de anormalidades ósseas caracterizadas pelo aumento ou pela diminuição da massa óssea (KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008).

Da mesma forma, considerando a verificação da interligação entre o sistema imunitário e o osso, pode-se afirmar que a remodelação óssea tem como base o desenvolvimento de um processo inflamatório (KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008; ANANDARAJAH, 2009).

2.1.1 Células envolvidas na remodelação óssea

Quatro tipos celulares fazem parte da remodelação óssea: os osteoblastos, as células de revestimento, os osteócitos e os osteoclastos.

2.1.1.1 Osteoblastos

Osteoblastos se originam das células mesenquimais pluripotentes da medula óssea, as quais possuem a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos, condrócitos ou fibroblastos. A diferenciação dos osteoblastos é controlada pela sinalização das vias Wnt/ β -catenina e do Fator Transformador de Crescimento β associada à Proteína Morfogenética Óssea (TGF- β /BMP). Foi demonstrado que a ativação destas vias ativa a expressão de fatores de transcrição *Core-Bindin Factor A1* (CBFA1) e Osterix, os quais determinam a diferenciação osteoblástica (NAKASHIMA *et al.*, 2002; PROFF; RÖMER, 2009; JENSEN; GOPALAKRISHNAN; WESTENDORF, 2010).

Os osteoblastos apresentam aspecto mononuclear, cuboide e formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo depositada (osteóide). Apresentam prolongamentos citoplasmáticos em direção à matriz óssea e através destes se comunicam com outras células como o osteócitos, descritos adiante (MACKIE, 2003; CLARKE, 2008; SOLTAN; SMILER; CHOI, 2009).

Uma das principais funções dos osteoblastos é a formação e mineralização de matriz óssea ou osteóide. Para tanto, possuem um citoplasma rico em organelas que garantem a produção de proteínas colagênicas, principalmente o colágeno tipo I, e não colagênicas, como osteocalcina,

osteopontina, proteoglicanase fosfoproteínas. As proteínas não colagênicas desempenham um papel fundamental no processo de mineralização, ou seja, na ligação do colágeno tipo I aos cristais de hidroxiapatita. Atualmente, sabe-se que os osteoblastos atuam na remodelação óssea tanto na etapa de formação, como na de reabsorção óssea (MATSUO; IRIE, 2008; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

2.1.1.2 Células de revestimento

Após o término da fase de deposição da matriz óssea, os osteoblastos assumem uma forma achatada e alongada, com poucas organelas citoplasmáticas e passam a ser chamados de células de revestimento (CLARKE, 2008; SOLTAN; SMILER; CHOI, 2009).

As células de revestimento recobrem a superfície óssea quiescente e formam uma única camada celular. Sua principal função é o controle da concentração plasmática de cálcio, sendo assim, consideradas o sítio primário da troca de íons entre o sangue e o osso (CLARKE, 2008; SOLTAN; SMILER; CHOI, 2009; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

2.1.1.3 Osteócitos

Durante a mineralização da matriz, alguns osteoblastos ficam aprisionados transformando-se em osteócitos, as células mais abundantes do tecido ósseo (SEEMAN, 2006). Os osteócitos apresentam forma estrelada com prolongamentos citoplasmáticos através dos quais se comunicam por meio de junções tipo *gap*, com os prolongamentos de osteócitos adjacentes, bem como com os dos osteoblastos e das células de revestimento (BONEWALD; JOHNSON, 2008).

Dessa forma, os osteócitos formam uma importante rede de comunicação celular óssea que permite o controle da remodelação óssea por meio da detecção de variações de cargas mecânicas, fenômeno conhecido como mecano-transdução (SEEMAN, 2006; DALLAS; BONEWALD, 2010).

Nesse contexto, alterações da matriz óssea e estímulos mecânicos que atuem sobre o osso são captados pelos osteócitos e transmitidos às células da superfície óssea para que estas possam ativar o processo de remodelação

óssea sempre que for necessário. Estas variações são captadas pelos osteócitos os quais as convertem em sinais moleculares (óxido nítrico, prostaglandinas, alterações de níveis de cálcio) e as transmite para as células da superfície. Por outro lado, a presença de dano tecidual na matriz (fissuras) pode conduzir a uma restrição de nutrientes aos osteócitos, ativando a sua apoptose e, como resposta, a remodelação óssea é solicitada (SEEMAN, 2006; HENRIKSEN *et al.*, 2009; DALLAS; BONEWALD, 2010).

2.1.1.4 Osteoclastos

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, derivadas de células hematopoiéticas da linhagem mieloide, altamente especializadas para a reabsorção da matriz óssea mineralizada. Caracterizam-se por apresentar, na sua membrana plasmática, a expressão do receptor da calcitonina e um citoplasma rico em organelas como complexo de Golgi, mitocôndrias, entre outras (CHAMBERS, 2000; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

Essas organelas garantem a realização da reabsorção óssea, principal função dos osteoclastos. Para tanto, os osteoclastos sintetizam e liberam enzimas proteolíticas, como fosfatase ácida resistente ao tártaro (TRAP), catepsina K, adenosina ácida trifosfatada vanadato sensível, e isozima anidrato carbônica II (BLAIR; ATHANASOU, 2004; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

Nos locais onde ocorre a reabsorção propriamente dita, os osteoclastos, inicialmente, promovem uma acidificação do local através da produção de prótons H^+ e ânions Cl^- . Tal acidificação causa a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, constituintes da fase mineral óssea. Em sequência, inicia-se a fase de degradação da matriz orgânica pela ação das enzimas proteolíticas (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; DELAISSÉ *et al.*, 2003; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

Nessas áreas de reabsorção óssea, os osteoclastos se fixam à superfície óssea por meio de um forte mecanismo de adesão focal via moléculas de integrina $\alpha_v\beta_3$. Essas áreas de reabsorção são conhecidas como “zonas claras”. Nelas, os osteoclastos desenvolvem uma especialização da membrana celular a partir do desenvolvimento de invaginações na borda denominada de “borda em escova” (TEITELBAUM, 2000; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

O resultado da interação do osteoclastos à superfície óssea é o surgimento de escavações, as lacunas de reabsorção ou de *Howship* como consequência da desmineralização óssea pelas enzimas acima mencionadas (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

2.1.2 Sistema RANK/RANKL/OPG e a sinalização da osteoclastogênese

As primeiras evidências de que a interação entre osteoblastos e osteoclastos seria necessária para a indução da osteoclastogênese foram reportadas por Jimi *et al.* (1996) e Takahashi *et al.* (2003). Os resultados desses estudos sugeriram que o processo da osteoclastogênese envolvia a interação de ligantes, presentes na membrana citoplasmática de osteoblastos, com receptores existentes na membrana citoplasmática de osteoclastos (JIMI *et al.*, 1996; TAKAHASHI *et al.*, 2003).

Estes achados incentivaram as pesquisas para a descoberta dos fatores envolvidos nesta interação. Assim, foram descobertas moléculas pertencentes ao grupo de receptores e ligantes relacionados ao Fator de Necrose Tumoral (TNF) representadas pelo Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANK), seu Ligante (RANKL) e o competidor natural por RANKL, denominado Osteoprotegerina (OPG) (SIMONET *et al.*, 1997; TSUDA *et al.*, 1997; LACEY *et al.*, 1998; YASUDA *et al.*, 1998).

Estas moléculas compõem um verdadeiro sistema, o sistema RANK/RANKL/OPG, que desempenha um papel chave na sinalização da osteoclastogênese e da remodelação óssea (BAUD'HUIN *et al.*, 2007; BOYCE; XING, 2008). Pesquisas demonstraram que este sistema é capaz de interagir com diversas vias de sinalização, e está envolvido na regulação dos sistemas osteoarticular, imune e vascular (BAUD'HUIN *et al.*, 2007; BOYCE; XING, 2007; SINGH *et al.*, 2012).

O RANK é uma proteína transmembrana de 616 aminoácidos, membro da família dos receptores do TNF, expresso principalmente por macrófagos, células pré-osteoclásticas, linfócitos T e B, células dendríticas e fibroblastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; BOYCE; XING, 2007; KHOSLA, 2001).

A ativação do RANK pelo RANKL resulta na sua interação com membros da família dos receptores associados ao TNF, ativação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B) e da proteína c-Fos (KHOSLA, 2001; BOYCE; XING, 2008), os quais estão relacionados à maturação dos osteoclastos pelo aumento da expressão de genes específicos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; WADA *et al.*, 2006; PACIFICI, 2010).

O RANKL, também denominado Ligante da Osteoprotegerina (OPGL) ou Citocina Indutora de Ativação Relacionada ao TNF (TRANCE), é uma citocina semelhante ao TNF- α que atua como ligante da OPG (RIFAS; WEITZMANN, 2009). A expressão de RANKL pode ocorrer em diversas células: osteoblastos e seus precursores, linfócitos T e B e megacariócitos. Ao se ligar ao RANK, estimula células dendríticas e modula a atividade de células T devido à ativação do NF- κ B (RIFAS; WEITZMANN, 2009; BAUD'HUIN *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2012).

Nas células imunes, o RANKL apresenta uma série de efeitos, como a ativação da quinase N-terminal c-Jun em células T onde ativa a proliferação dessas células. Nas células dendríticas, promove a inibição da apoptose, a indução da formação de *cluster*, além de atuar como um fator estimulador e de sobrevivência (RIFAS; WEITZMANN, 2009; PACIFICI, 2010; SINGH *et al.*, 2012).

Dessa forma, quando o RANKL se liga ao RANK, na superfície dos osteoclastos, produz efeitos biológicos como fusão, ativação, diferenciação e sobrevivência destes clastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; BOYCE; XING, 2007). Entretanto, o aumento do número de osteoclastos ativos e a reabsorção óssea dependem da presença do Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (MSCF) expresso por osteoblastos, uma vez que os osteoclastos são incapazes de completar esse processo (BAUD'HUIN *et al.*, 2007; PACIFICI, 2010).

Assim, o MSCF, ligado ao seu receptor (c-Fms) em pré-osteoclasto, age como um sinal primário para o desenvolvimento do osteoclasto. Todavia, como já foi dito acima, a diferenciação final do osteoclasto requer a expressão de RANKL pelos osteoblastos e RANK pelos precursores osteoclásticos (BOYCE; XING, 2008; BAUD'HUIN *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2012).

A OPG é uma glicoproteína de 380 aminoácidos e, assim como o RANK, pertence à família de receptores do TNF, sendo a primeira proteína do sistema RANK/RANKL/OPG a ser descoberta (BOYCE; XING, 2007; PACIFICI, 2010). É uma potente glicoproteína secretada por várias células como osteoblastos e

células da medula óssea, cuja ação biológica principal é a inibição da diferenciação e da atividade dos osteoclastos, contribuindo, assim, para a manutenção da massa óssea (BAUD'HUIN *et al.*, 2007; BOSTANCI *et al.*, 2007).

A OPG atua como um competidor de alta afinidade pela ligação com RANK e, dessa forma, previne a ligação do RANKL com o RANK. Assim, a ligação da OPG ao RANK atua como um inibidor efetivo da osteoclastogênese, resultando na inibição da reabsorção óssea e, como consequência, no aumento da área, resistência e densidade óssea (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; BOSTANCI *et al.*, 2007; BOYCE; XING, 2007).

De fato, pesquisas em humanos verificaram que o aumento da razão RANKL/OPG estava associado à ocorrência de patologias ósseas como osteoporose, artrite reumatoide e doença periodontal (PACIFICI, 2010; SINGH *et al.*, 2012).

Tem sido descrito que a regulação do sistema RANK/RANKL/OPG ocorre por conta de fatores locais e sistêmicos (PACIFICI, 2010; BAUD'HUIN *et al.*, 2007). Assim, agentes locais como a Prostaglandina E₂ (PGE₂), citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α e sistêmicos como PTH atuam estimulando a produção de RANKL e favorecendo a reabsorção óssea (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; HA *et al.*, 2006; DAI *et al.*, 2006).

Por outro lado, verificou-se que a produção de OPG é estimulada por fatores que inibem a reabsorção e favorecem a formação óssea como IL-4, IL10, TGF- β , INF γ , BMP 2, 4 e hormônios estrogênios e calcitonina (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; KITAZAWA *et al.*, 2003; EGHBALI-FATOURECHI *et al.*, 2003).

2.1.3 O ciclo da remodelação óssea

Os osteoblastos e os osteoclastos trabalham juntos em prol da remodelação óssea em pequenos núcleos isolados chamados de Unidades Multicelulares Básicas (BMU) (BLAIR; ATHANASOU, 2004; CLARKE, 2008). Estas unidades apresentam distribuição geográfica e ativação cronológica controlada por fatores gerados no ambiente ósseo (VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

A remodelação ocorre em quatro fases sucessivas: ativação, reabsorção, reversão e formação, separadas por um intervalo (fase terminal) em que a superfície óssea entra em repouso (PROFF; RÖMER, 2009).

2.1.3.1 Fase de ativação

Esta fase tem este nome, pois é nela que ocorre a ativação da osteoclastogênese. Para tanto, PTH se liga a receptores acoplados à proteína-G nos osteoblastos, ativando vias intracelulares cálcio-dependentes, as quais induzem a secreção de moléculas que recrutam pré-osteoclastos para a superfície a ser reabsorvida na BMU. Nesses locais, os osteoclastos se diferenciam em células multinucleadas, os osteoclastos ativos aptos à reabsorção óssea (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

Assim, sob a ação de fatores locais e sistêmicos, os osteoblastos sofrem alterações em sua forma e expressam na superfície da membrana o RANKL, fator indispensável para a diferenciação, ativação dos pré-osteoclastos e sobrevivência dos osteoclastos. A interação de RANKL com RANK, receptor expresso pelas células pré-osteoclásticas, ativa uma cascata de sinalização que promove a ativação do osteoclasto (CLARKE, 2008; PACIFICI, 2010).

Por outro lado, a OPG, proteína expressa pelos osteoblastos, regula negativamente a formação e a ativação dos osteoclastos ao interromper a ligação RANK/RANKL. Ao quebrar a interação RANK/RANKL, a OPG inibe a diferenciação final e ativação dos osteoclastos induzindo a sua apoptose. A ligação RANKL/RANK na superfície de precursores dos osteoclastos recruta um receptor associado ao TNF, a proteína TRAF6 (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; BOYCE; XING, 2007; SINGH *et al.*, 2012).

TRAF6 determina a ativação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B) causando a sua translocação para o núcleo. NF- κ B aumenta a expressão de c-Fos e da quinase N-terminal c-Jun que interagem com o Fator Nuclear de Células T Ativadas (NFATc1) para desencadear a transcrição de genes osteoclastogênicos (BOYCE; XING, 2007; SINGH *et al.*, 2012).

De acordo com Boyce e Xing (2007), as principais etapas da ativação da osteoclastogênese são as ilustradas na Figura 1 a seguir:

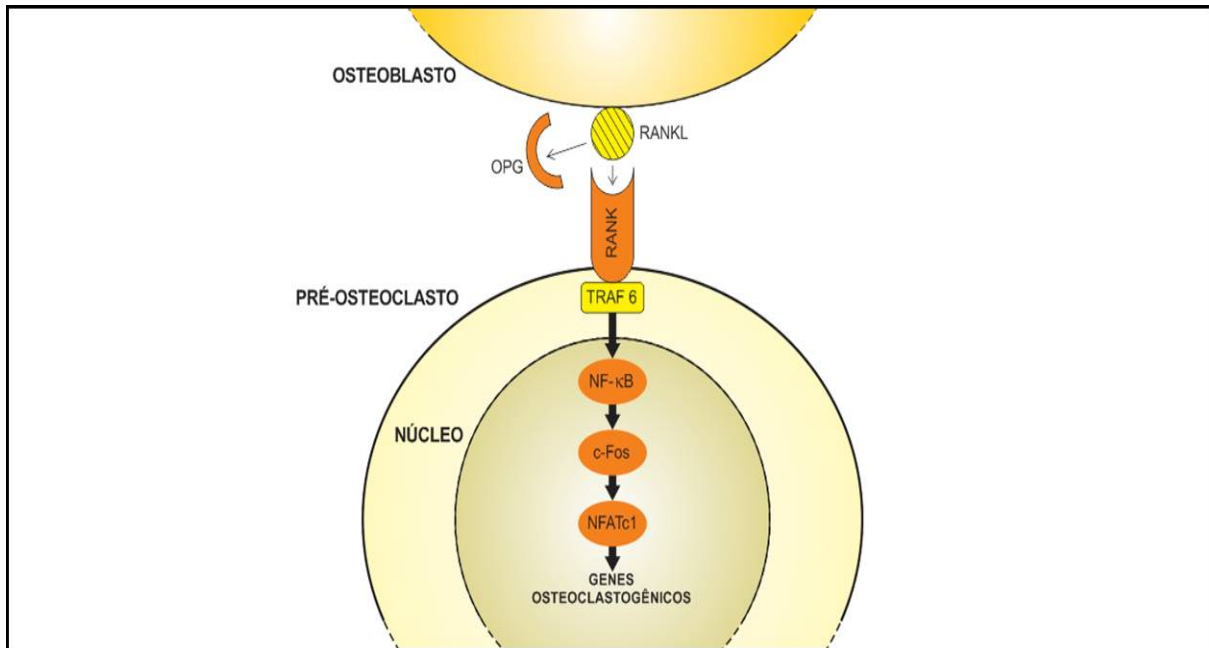


Figura 1 – Etapas da ativação da osteoclastogênese: RANKL se liga ao RANK na superfície dos pré-osteoclastos e recruta a proteína TRAF6 ativando NF- κ B que é translocado para o núcleo. NF- κ B aumenta a expressão de c-Fos, o qual interage com o NFATc1 para desencadear a transcrição de genes osteoclastogênicos. A OPG inibe o início do processo ao se ligar ao RANKL. NFAT, Fator Nuclear de Células T Ativadas; NF- κ B, Fator Nuclear κ B; OPG, osteoprotegerina; RANKL, Ligante do Receptor do Fator Nuclear κ B; TRAF, Receptor associado ao Fator de Necrose Tumoral.

Assim, verifica-se que a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos é controlado pelas células osteoblásticas através do eixo RANK/RANKL/OPG. O equilíbrio entre formação e reabsorção está na dependência de flutuações locais da razão RANKL/OPG (KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008; SINGH *et al.*, 2012).

2.1.3.2 Fase de reabsorção

Em resposta a sinais gerados pelos osteócitos ou ainda pela ativação pelo PTH ou pelas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α ou IL-1), os osteoblastos produzem a proteína Quimioatraente para Monócitos-1 (MCP-1), atraindo pré-osteoclastos. Outras citocinas osteoclastogênicas como MCSF, RANKL e OPG são também expressas, promovendo a diferenciação, a ativação e aumentando a sobrevivência de osteoclastos (TEITELBAUM, 2000; PROFF; RÖMER, 2009). Metaloproteinases de matriz óssea (MMP), como a MMP-13, também são secretadas pelos osteoclastos e degradam o osteoide não mineralizado que recobre a superfície óssea expondo os sítios de adesão (PROFF; RÖMER, 2009).

Nesses locais, os osteoclastos criam um microambiente propício para a secreção de enzimas proteolíticas que junto da liberação de prótons pela enzima anidrase carbônica promovem um ambiente ácido favorável à desmineralização da matriz óssea (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; DELAISSÉ *et al.*, 2003; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

Por fim, após a reabsorção, os osteoclastos sofrem apoptose ou permanecem na superfície óssea como células inativas. Os osteoclastos inativos são células gigantes e multinucleadas, mas não possuem borda em escova nem zona clara, estruturas especializadas relacionadas à função reabsortiva (TEITELBAUM, 2000; DELAISSÉ *et al.*, 2003; VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

2.1.3.3 Fase de reversão

A fase subsequente ao período de reabsorção óssea é denominada de reversão. Os fatores que determinaram a parada da atividade reabsortiva dos osteoclastos ainda não estão bem esclarecidos (PROFF; RÖMER, 2009).

Contudo, acredita-se que a elevada concentração de íons cálcio nas lacunas ou fatores de crescimento como o Fator de Crescimento derivado da Insulina (IGF) I e II, e Fator de Crescimento de Fibroblasto β (TGF- β) liberados nos sítios de reabsorção causariam uma apoptose e/ou inibição da secreção enzimática das células clásticas (EVERTS *et al.*, 2002; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Na fase de reversão, o desaparecimento dos osteoclastos dá lugar às células de revestimento. Estas células preparam a superfície óssea para que osteoblastos possam dar início à formação óssea e, ao mesmo tempo, sinalizam a migração e a diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos (TAKAHASHI *et al.*, 2003; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Adicionalmente, foi verificado que macrófagos residentes, conhecidos como células osteomacs e presentes ao nível das BMU, cooperam com as células de revestimento na preparação da superfície óssea, removendo restos teciduais da superfície óssea (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Ao término desta etapa, a superfície óssea fica completamente recoberta pelas células de revestimento, finalizando o ciclo de remodelação (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

2.1.3.4 Fase de formação

Ainda não está bem esclarecida a natureza do sinal que determina a passagem da fase de reversão para a formação. Acredita-se que as citocinas liberadas durante a fase de reabsorção como Fatores de Crescimento de Insulina I e II (IGF-I, II) e BMP recrutam osteoblastos, estimulando-os a depositar tecido osteoide (MATSUO; IRIE, 2008).

Nesta fase, os pré-osteoblastos são provavelmente ativados por fatores de crescimento e por produtos secretados pelos osteoclastos a se diferenciarem em osteoblastos ativos. Os fatores de crescimento são a cadeia polipeptídica BB do fator de crescimento de plaquetas (PDGF-BB) e o Fator de Crescimento de Hepatócito (HGF) (HOCK; CENTRELLA; CANALIS, 1988; ERIKSEN, 2010).

No que se refere aos produtos secretados pelos osteoclastos, verificou-se que os fatores de ligação Esfingosina 1-Fosfato (*S1P*) se ligam a receptores nos osteoblastos, resultando na ativação de RANKL, o que induz o recrutamento, maturação e aumento da sobrevivência de precursores osteoblasto (CLARKE, 2008; ERIKSEN, 2010; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Também foi proposto que os osteoclastos secretam o ligante Ephrin-B2 que se liga ao receptor EphB4 presente nos osteoblastos, formando o complexo EphB4-Ephrin-B2, o qual é responsável pela supressão da diferenciação dos osteoclastos por inibir a cascata c-fos/NFATc1 da osteoclastogênese (HOCK; CENTRELLA; CANALIS, 1988; CLARKE, 2008).

A sinalização do complexo EphB4-Ephrin-B2 é uma oportunidade única para a ativação simultânea da formação óssea, ao mesmo tempo que inibe a reabsorção (ERIKSEN, 2010; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Adicionalmente, estímulos mecânicos e a sinalização endócrina pelo PTH podem ativar a formação óssea via sinalização dos osteócitos (ROBINSON *et al.*, 2006).

Os osteócitos expressam esclerostina, uma molécula solúvel que se liga ao receptor de lipoproteína de baixa densidade da proteína-5/6 (LRP-5/6) que inibe a sinalização da via Wnt (DALLAS; BONEWALD, 2010; ERIKSEN, 2010).

Assim, tensões mecânicas sobre o osso e a ativação do PTH via receptores na membrana dos osteócitos inibem a expressão de esclerostina, ativando, então, a via Wnt e, conseqüentemente, a formação óssea (DALLAS; BONEWALD, 2010).

Para a formação óssea, células mesenquimais indiferenciadas retornam às lacunas de *Howship*, diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a secreção de matriz orgânica óssea. Proteínas colagênicas, como colágeno tipo I, e não colagênicas como proteoglicanos, fosfatase alcalina, integrinas, proteínas-Gla, osteocalcina são então primariamente depositadas, compondo um tecido ósseo imaturo ou osteoide (NAKASHIMA *et al.*, 2002; ROBINSON *et al.*, 2006; ERIKSEN, 2010; DALLAS; BONEWALD, 2010).

Posteriormente, com a incorporação da hidroxiapatita, ocorre a mineralização da matriz orgânica óssea pelos osteoblastos por meio da liberação de vesículas ricas em fosfatase alcalina conhecidas como “vesículas da matriz” (ANDERSON, 2003; ERIKSEN, 2010; DALLAS; BONEWALD, 2010).

2.1.3.5 Fase terminal, quiescente ou de repouso

A fase de formação é concluída quando uma quantidade igual de osso reabsorvido é formada. Foi demonstrado que os osteócitos desempenham um papel crucial em informar ao sofisticado maquinário da remodelação óssea o momento de cessar a formação de osso. Essa sinalização ocorre através da expressão da molécula esclerostina por osteócitos que determina a inibição da via Wnt (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Na fase terminal, os osteoblastos sofrem apoptose, assumem um fenótipo de células de revestimento na superfície óssea ou de osteócitos quando, então, adquirem forma estrelada ao serem embebidos por matriz mineralizada (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

Dessa forma, a superfície óssea entra num período de repouso até ativação do próximo ciclo de reabsorção. As fases que compõem o ciclo de remodelação estão resumidas na Figura 2, a seguir:

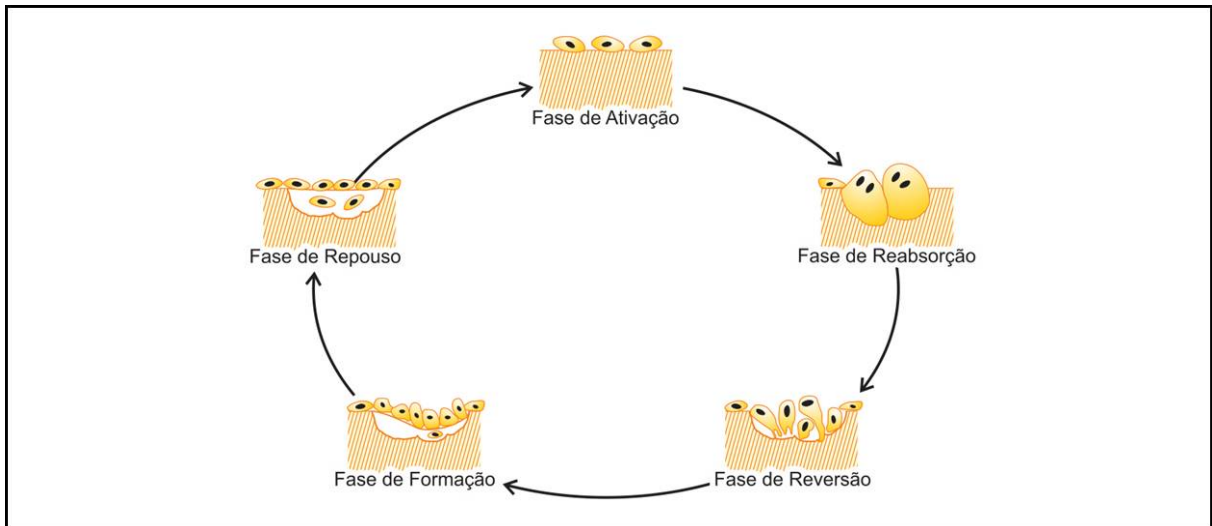


Figura 2 – Ciclo da remodelação óssea: O ciclo de reabsorção se caracteriza pela sequência de fases sucessivas de repouso, ativação, reabsorção, reversão e formação. (Adaptado de WWW.medicografia.com).

Nesse contexto, verifica-se que o ciclo de remodelação óssea se constitui num mecanismo de substituição ou de reconstrução de áreas de tecido ósseo com a intervenção de duas atividades opostas, mas complementares: a formação e a reabsorção intercaladas pelas fases de repouso e reversão.

2.2 Reparação óssea

O processo de remodelação óssea garante ao osso uma aptidão intrínseca de autorreparação. Dessa forma, a reparação óssea é um processo que envolve uma gama de fenótipos celulares responsáveis pelas funções de proliferação, migração, diferenciação e síntese de matriz extracelular óssea. Entretanto, o sucesso deste processo depende do desenrolar destas funções em uma correta sequência temporal (COLOMBIER; LESCLIOUS; TUSLANE, 2005; EINHORN, 2005).

No organismo humano, a reparação óssea pode ocorrer pela regeneração ou pela cicatrização. A regeneração caracteriza o processo de reparo que resulta no restabelecimento integral de forma e função originais do tecido, enquanto que, na cicatrização, o reparo ocorre pelo restabelecimento parcial do tecido, com formação de cicatriz. Entretanto, por apresentar um alto grau de remodelação, a reparação do tecido ósseo nos defeitos de pequenas dimensões ocorre, na

maioria das vezes, por regeneração (EINHORN, 2005; COLOMBIER; LESCLOUS; TUSLANE, 2005; MARZONA; PAVOLINI, 2009).

De uma forma geral, a reparação inicia-se logo após a agressão tecidual, com o rompimento vascular. Ela pode ser dividida em três fases: inflamatória, reparadora e de remodelação (EINHORN, 2005; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; MARZONA; PAVOLINI, 2009).

Após a injúria ao osso, ocorre uma série de eventos moleculares e celulares que visam restaurar forma e função ósseas. Esses eventos são coordenados de forma tempo-espacial e contam com a participação de quatro componentes fundamentais: cortical óssea, periósteo, medula óssea e o tecido mole adjacente (EINHORN, 2005; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007).

A contribuição de cada um destes elementos no processo de injúria ainda não foi completamente elucidada. Sabe-se, contudo, que dele participam elementos celulares como células mesenquimais, inflamatórias, ósseas e mecanismos moleculares (DESCHASEAUX; SENSÉBÉ; HEYMANN, 2009).

Os mecanismos moleculares que regem a ativação celular, no processo de cicatrização das fraturas, são representados por três grupos principais: as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α), expressas na fase inicial inflamatória, os fatores de crescimento expressos na fase de remodelação, representados pela superfamília do TGF- β (GDFs, BMPs, TGF- β), PDGF, FGF e IGF que começam a agir poucas horas após a fratura. Finalmente, as metaloproteinases e os fatores angiogênicos, incluindo VEGF e angiopoietina-1 e 2 que começam a agir na fase remodeladora desde a fase de ossificação endocondral até a mineralização (WARREN, 1990; BOLANDER, 1992; CHO *et al.*, 2001; EINHORN, 2005; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; MARZONA; PAVOLINI, 2009). Os eventos que ocorrem nas fases do processo de reparação óssea são descritos na sequência.

Na fase inflamatória, há a formação de um hematoma sanguíneo ao nível das superfícies ósseas do local lesionado, como consequência da ruptura de vasos. Esse hematoma se estende pelo periósteo e cavidades medulares adjacentes (EINHORN, 2005).

A ruptura vascular conduz a uma interrupção da circulação sanguínea, o que promove a necrose das células ósseas do sítio lesionado e o estabelecimento de um ambiente hipóxico ($PO_2 = 5-10$ mmHg) e ácido (pH 4-6). Este ambiente ativa as plaquetas que, então, liberam o conteúdo dos grânulos alfa, contendo uma

variedade de fatores, como o fator de crescimento de origem plaquetária (PDGF), TGF- β , fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento epidérmico (FGE), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), IGF e GDF (WARREN, 1990; BOLANDER, 1992; EINHORN, 2005).

Sob a ação destes fatores instala-se um edema mais ou menos intenso, acompanhado de um processo inflamatório agudo, com grande mobilização de macrófagos, neutrófilos e células mesenquimais precursoras dos osteoblastos atraídos pela liberação destes fatores. Macrófagos e neutrófilos são essenciais para a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e 6 e de fatores de crescimento como PDGF, FGF, Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), TGF- β , IGF-I (WARREN, 1990; BOLANDER, 1992; LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002).

Adicionalmente, macrófagos também apresentam efeito quimiotático para o recrutamento de células mesenquimais precursoras de osteoblastos e são fundamentais para a fagocitose de corpos estranhos, restos teciduais e células bacterianas (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002).

Durante a fase inflamatória, a ativação das células precursoras de osteoblastos promove a proliferação e ativação destas células. Sob a influência de fatores de crescimento como FGF, VEGF e angiopoietina 1 e 2, a migração de células endoteliais, fibroblastos é intensificada, reestabelecendo a rede vascular (EINHORN, 2005; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007).

Assim, aos poucos, o gradiente de O₂ e o pH do coágulo é restabelecido, permitindo a organização de um tecido de granulação que dá início à fase reparadora, que ocorre por ossificação intramembranosa ou endocondral (EINHORN, 1998; EINHORN, 2005; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007; KANCZLER; OREFFO, 2008).

A ossificação intramembranosa ocorre na região mais interna e estável do periósteo. Nesse tipo de ossificação, fibroblastos produtores de colágeno tipo III formam um calo fibroso que envolve a região da lesão, e, à medida que a ação dos macrófagos prossegue, há o aumento da proliferação vascular e as células osteoprogenitoras são ativadas e se diferenciam em osteoblastos, formando um novo tecido ósseo. Esse também chamado de “calo ósseo” é um osso tipo imaturo, isto é, não apresenta estrutura organizada haversiana. Posteriormente, na fase remodeladora, torna-se maduro e com estrutura organizada (EINHORN, 2005; TSIRIDIS; UPADHYAY; GIANNOUDIS, 2007).

A ossificação endocondral ocorre na região mais externa e menos estável do periosteio, imediatamente próxima ao sítio da fratura. Esse tipo de ossificação é precedido por uma fase cartilaginosa que é substituída posteriormente por osso (EINHORN, 2005; MARZONA; PAVOLINI, 2009).

A fase seguinte é a remodeladora. Nessa, ocorrem sucessivos processos de reabsorção e neoformação óssea até que a área lesionada reassuma as características morfológicas, funcionais e biomecânicas originais (EINHORN, 2005; KANCZLER; OREFFO, 2008; MARZONA; PAVOLINI, 2009).

2.3 Modelos de defeitos ósseos críticos

A consolidação do reparo no tecido ósseo é influenciada por fatores como o suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional que oriente a proliferação celular e o tamanho da lesão (FILVAROFF, 2003; HONMA *et al.*, 2008).

Defeitos ósseos que apresentam dimensões extensas são considerados críticos ao reparo, pois ao dificultar a angiogênese prejudicam o afluxo de nutrientes e a liberação de fatores de crescimento (HONMA *et al.*, 2008). A consequência desta vascularização insuficiente é a formação de tecido fibroso. Por outro lado, defeitos ósseos com dimensões reduzidas reparam-se com facilidade (FILVAROFF, 2003; HONMA *et al.*, 2008).

Entre os modelos de estudo para testar o potencial de substâncias ou fármacos em acelerar o processo de reparo ósseo, a indução cirúrgica de defeitos ósseos é uma alternativa bastante viável (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; MOONEY; SIEGEL, 2005; AALAMI *et al.*, 2004).

Neste contexto, foram propostos critérios metodológicos que permitissem a avaliação adequada dos defeitos ósseos. Surgiu, assim, o conceito de “defeito de tamanho mínimo”, o qual estabelece que, para o estudo da reparação óssea em animais, devem ser criadas ostectomias de um tamanho mínimo que não sofra reparação espontânea durante toda a vida do animal, sendo preenchidas apenas de tecido fibroso (TAKAGI; URIST, 1982; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Assim, apenas nessa situação, o real efeito osteogênico de um substituto ósseo ou o potencial reparador de uma substância poderá ser avaliado. Por outro lado, como a maioria dos estudos não se estendem durante toda a vida do animal,

houve recentemente uma redefinição do conceito de defeito de tamanho crítico (CSD) para aquele que não cicatriza em todo o período de experimentação (ZUO *et al.*, 2012).

Esses defeitos podem ser realizados em diferentes regiões como a calvária de ratos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; GOSAIN *et al.*, 2000; STEPHAN *et al.*, 2010), mandíbula (HUH *et al.*, 2005), tíbia (SROUJI *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2011), entre outras. Na calvária de ratos, são considerados críticos os defeitos ósseos de 8 mm de diâmetro, enquanto que na calvária de camundongos é de 5 mm (TAKAGI; URIST, 1982; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; AALAMI *et al.*, 2004).

O modelo de indução de defeito ósseo crítico desenvolvido em calvária é considerado eficaz, pois a região da calvária apresenta várias vantagens que dificultam o reparo espontâneo, como: metabolismo ósseo lento, quando comparado aos ossos longos e menor suprimento sanguíneo (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998). Outra importante vantagem é o tipo de ossificação intramembranosa semelhante aos ossos da face. Assim, a calvária é considerada um local de eleição para pesquisa com o uso de biomateriais ou agentes farmacológicos, com o objetivo de avaliar mecanismo de regeneração e potencial osteogênico (TAKAGI; URIST, 1982; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; AALAMI *et al.*, 2004; NYAN *et al.*, 2007).

2.4 Ranelato de Estrôncio

O Ranelato de Estrôncio (RSr) é um fármaco recentemente descoberto que tem sido indicado como o principal tratamento para a osteoporose pós-menopáusia e senil. A importância atualmente dada a este fármaco decorre de suas qualidades químicas, que lhe conferem um mecanismo de ação único sobre o osso (PORS-NIELSEN, 2004; REGINSTER *et al.*, 2005; FROMIGUÉ *et al.*, 2009; MARIE, 2010).

2.4.1 Características químicas

O RSr é composto quimicamente por dois átomos estáveis de estrôncio (Sr^{2+}) e uma molécula orgânica sintética, o sal de ácido ranélico, apresentado pela

fórmula química 5-(bis[carboximetil]amino)-2-carboxi-4-ciano-3-tiofenacético (DAHL *et al.*, 2001; REGINSTER *et al.*, 2005). A Figura 3 ilustra a disposição espacial dos átomos que compõem a molécula do RSr.

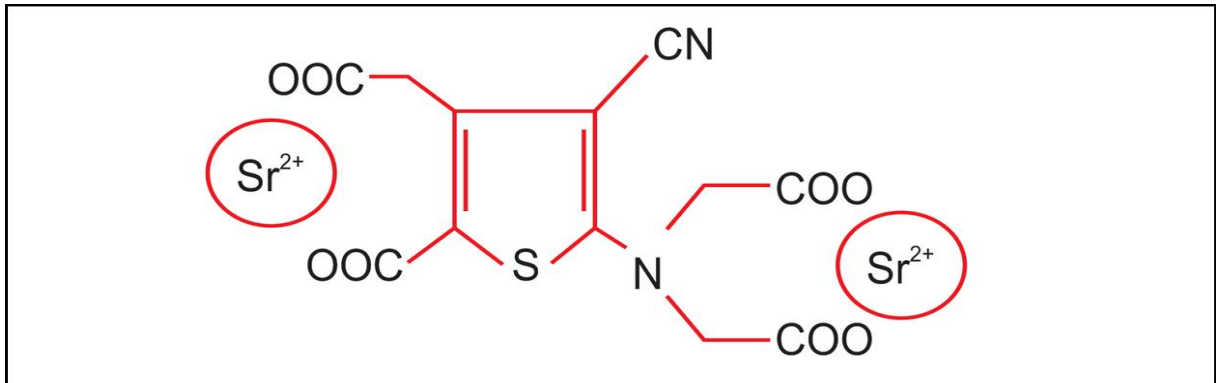


Figura 3 – Estrutura química da molécula do RSr: O RSr é composto quimicamente por dois átomos estáveis de estrôncio (Sr^{2+}) e uma molécula de sal de ácido ranélico representado como 5 (bis[carboximetil] amino) -2-carboxi-4-ciano-3-tiofenacético. (Adaptado de WWW.info-farmacia.com).

Uma vez ingerido o RSr se dissocia em íons estrôncio (Sr^{2+}) e ácido ranélico. O ácido ranélico representa a parte orgânica farmacologicamente inativa do RSr, portadora dos átomos de estrôncio. Por apresentar alta polaridade, o ácido ranélico confere ao fármaco uma baixa absorção, distribuição e ligação a proteínas plasmáticas, sendo assim rapidamente eliminado pelos rins (MARIE, 2005; EMEA, 2012).

O estrôncio (Sr) é um metal alcalino terroso que constitui a parte inorgânica farmacologicamente ativa do RSr. Assim, efeitos do RSr no metabolismo ósseo correspondem aos efeitos produzidos pelo Sr (DELANNOY; BAZOT; MARIE, 2002).

Na natureza, Sr é encontrado associado a minerais como a Estroncionita (SrCO_3) ou a Celestita (SrCO_4) na forma de vários isótopos estáveis (^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr e ^{88}Sr) (PORS-NIELSEN, 2004).

Até bem pouco tempo, as pesquisas científicas realizadas com os isótopos de estrôncio estáveis foram negligenciadas pela associação destes com os isótopos de estrôncio radioativos (^{85}Sr , ^{87}Sr , ^{89}Sr e ^{90}Sr) os quais apresentam comprovado efeito tóxico sobre as células ósseas (DAHL *et al.*, 2001).

Por outro lado, o interesse pelo estudo deste metal aumentou consideravelmente quando foi verificado que o Sr apresenta propriedades físico-químicas e afinidade pelo tecido ósseo similares ao cálcio. Os íons Sr^{2+} apresentam

grande afinidade pelo tecido ósseo sendo nesse tecido incorporados através da adsorção dos íons Sr^{2+} à superfície da hidroxiapatita do osso ou pela substituição iônica com o cálcio do osso (DAHL *et al.*, 2001; PORS-NIELSEN, 2004).

Com relação à farmacocinética, o Sr é semelhante ao cálcio em sua absorção intestinal, incorporação ao osso e sua eliminação pelos rins (MEUNIER *et al.*, 2004; PORS-NIELSEN, 2004; EMEA, 2012). Após sua absorção, o Sr é quase totalmente depositado no osso nele se incorporando. Foram identificados cinco fatores que influenciam a incorporação do Sr ao osso tais como: Dose, onde aumento da dose de Sr é diretamente proporcional à quantidade incorporada ao osso. Entretanto, doses muito altas causam saturação dos mecanismos de absorção no trato gastrintestinal; Nível de Estrôncio plasmático que tendem à estabilidade quando Sr é administrado por cerca de quatro semanas; Gênero que, em ratos, é incorporado em quantidades equivalentes nas fêmeas e machos quando da administração oral; Duração do tratamento que está diretamente proporcional a quantidade de Sr incorporada ao osso. Em ratos, essa tendência dobra a partir do décimo dia de tratamento, mantendo-se constante após a quarta semana de tratamento e, finalmente, o Local do esqueleto determina o grau de concentração de Sr, sendo maior nas áreas medulares, por apresentarem maior metabolismo ósseo, do que nas corticais ósseas (DAHL *et al.*, 2001; DELANNOY; BAZOT; MARIE, 2002).

Estudos indicam que o RSr apresenta similaridades com o Ranelato de Cálcio no que se refere a suas concentrações no tecido ósseo após a distribuição. Entretanto, o efeito dual, anabólico e antirreabsortivo sobre o osso, só foi observado com o RSr, demonstrando um mecanismo de ação diferenciado destes dois cátions sobre o osso (DAHL *et al.*, 2001).

2.4.2 Mecanismo de ação do RSr

O mecanismo de ação do RSr em nível molecular está bem elucidado. Vários estudos pré-clínicos demonstraram que este fármaco exerce um duplo efeito no metabolismo ósseo, uma vez que, de forma simultânea, aumenta a formação e diminui a reabsorção óssea (MARIE, 2010; MARIE; FELSEMBERG; BRANDI, 2011). Assim, ao contrário de outros fármacos utilizados para o tratamento da osteoporose como por exemplo os Bisfosfanatos, o RSr consegue dissociar sua ação estimuladora sobre a formação de osso daquela que promove a reabsorção.

A ação primária do RSr sobre o osso é a promoção de um aumento dos íons Sr^{2+} no microambiente ósseo durante o processo de reabsorção óssea. A consequência é a modulação da atividade das células ósseas com um resultado positivo para a formação óssea (FARLAY *et al.*, 2005; MARIE, 2005, 2006).

Pesquisas iniciais *in vitro* verificaram que diferentes vias estão envolvidas no mecanismo de ação do RSr produzindo efeitos sobre osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

2.4.3 Estudos *in vitro*

Com o intuito de melhor compreender o mecanismo de ação do RSr em células ósseas, estudo *in vitro* foram realizados utilizando células de camundongos, ratos, coelhos ou humanas. Os resultados destes estudos sugerem que o RSr atua em osteoclastos e em osteoblastos de forma distinta.

2.4.3.1 Efeito do RSr sobre os osteoclastos

Estudos *in vitro* demonstraram que o RSr foi capaz de reduzir a atividade de osteoclastos, seja por meio da expressão de marcadores de osteoclastos (BARON; TSOUDEROS, 2002), seja por meio da alteração no citoesqueleto destas células (BONNELYE *et al.*, 2008).

A via de sinalização através da qual o RSr pode controlar a atividade e sobrevivência de osteoclastos é a ativação da via dos receptores sensíveis ao cálcio extracelular (CaRs). Esses sensores são receptores heptahelicoidais e transmembranares acoplados à proteína G (GPCR) e ao sistema fosfolipase C – fosfato de inositol expressos em células precursoras de osteoblastos e osteoclastos (KAMEDA *et al.*, 1998; KANATANI *et al.*, 1999).

Os CaRs podem controlar a vida e a atividade dos osteoclastos e desempenhar um papel chave na manutenção de concentrações de íons cálcio extracelular (BROWN; MACLEOD, 2001).

O RSr, ou mais especificamente, a molécula de estrôncio, é um agonista desses receptores, porém com menor afinidade que o cálcio (COULOMBE *et al.*, 2004). Assim, sugere-se que o Sr ao interagir com os CaRs promovam a redução da reabsorção óssea por indução da apoptose dos osteoclastos. Para

gerar apoptose nos osteoclastos, o Sr ativa CaRs, que ativam fosfolipase C. Essa, por sua vez, ativará o diacilglicerol (DAG) e uma proteína-quinase β II, os quais irão promover a translocação de NF- κ B do citoplasma para o núcleo em osteoclastos maduros, de forma a induzir a apoptose dessas células (HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009).

O mecanismo por meio do qual o RSr reduz a osteoclastogênese envolve a sinalização molecular do eixo RANK/RANKL/OPG. Assim, por meio da ativação dos CaRs, o RSr promove a redução do número de osteoclastos através da aumento da produção de OPG e reduzindo a produção de RANKL, moléculas que desempenham um papel essencial na diferenciação de osteoclastos (MARIE, 2006, 2007; MARIE; FELSEMBERG; BRANDI, 2011).

Adicionalmente, outros estudos *in vitro* demonstram que o RSr é capaz de influenciar os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de RANKL e OPG em células humanas (BRENNAN *et al.*, 2007). Quando utilizado em baixas doses, o RSr também aumentou a expressão de OPG, de maneira significativa nas doses de 1 e 2 mM de Sr^{2+} , e diminui a expressão de RANKL por osteoblastos *in vitro* (BRENNAN *et al.*, 2009). Dessa forma, o aumento da razão OPG/RANKL sugere que o RSr promova um efeito sobre a formação e reabsorção óssea de forma dissociada (MARIE; FELSEMBERG; BRANDI, 2011).

Em estudo *in vitro* utilizando macrófagos de camundongos (RAW 264,7) foi confirmado que o aumento da concentração dos íons Sr^{2+} promove a inibição de RANKL e ativação dos CaRs, determinando a inibição da diferenciação dos osteoclastos (CAUDRILLIER *et al.*, 2010).

2.4.3.2 Efeitos do RSr sobre osteoblastos e osteócitos

Adicionalmente aos efeitos sobre a osteoclastogênese, estudos *in vitro* demonstraram efeitos positivos do RSr sobre a osteoblastogênese e atividade de osteoblastos. Destarte, demonstrou-se que o RSr foi capaz de aumentar a replicação de células pré-osteoblásticas.

Um dos mecanismos moleculares por meio do qual o RSr promove o aumento da replicação de osteoblastos resulta da interação dos íons Sr^{2+} com os CaRs também presentes em osteoblastos. Essa ação determina a expressão de proteínas-quinase de mitógenos ativados (MAPKs) para células formadoras

de osso resultando no aumento da replicação celular (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007; FROMIGUÉ *et al.*, 2009). Além disso, uma ação do RSr via CaRs também foi verificada, reduzindo a apoptose de osteoblastos (HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009).

Demonstrou-se também *in vitro* que o RSr exerce um efeito nos estágios finais da diferenciação osteoblastos ao nível do sistema RANK/RANKL/OPG via CaRs, que resulta no aumento da expressão de OPG e na redução de RANKL (BRENNAN *et al.*, 2009).

Por outro lado, outros estudos sugeriram que o RSr pode promover a replicação de osteoblastos independentemente da via CaRs, isto é, por meio de outros receptores sensíveis a cátions que respondem positivamente ao aumento do Sr^{2+} extracelular (FROMIGUÉ *et al.*, 2009). Entretanto, esses receptores ainda não são conhecidos (MARIE; FELSENBURG; BRANDI, 2011).

Também *in vitro*, outros estudos demonstraram os efeitos do RSr na diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos. Dessa forma, verificou-se um aumento da expressão de marcadores de osteoblastos como a fosfatase alcalina, colágeno tipo I, sialoproteína óssea e osteocalcina em células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea e em osteoblastos imaturos (BARBARA *et al.*, 2004; CHOUDHARY *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2007; BONNELYE *et al.*, 2008; ATKINS *et al.*, 2009; BRENNAN *et al.*, 2009).

A indução, *in vitro*, da osteogênese por meio da formação de nódulos ósseos, confirmou esse efeito positivo do fármaco na diferenciação de pré-osteoblastos (BARBARA *et al.*, 2004; CHOUDHARY *et al.*, 2007; ATKINS *et al.*, 2009).

A Figura 4 a seguir resume os efeitos do RSr sobre osteoclastos e osteoblastos *in vitro* através da ativação do sistema RANK/RANKL/OPG, dos CaRs e das vias Cn/NFATc/Wnt (MARIE; FELSENBURG; BRANDI, 2011).

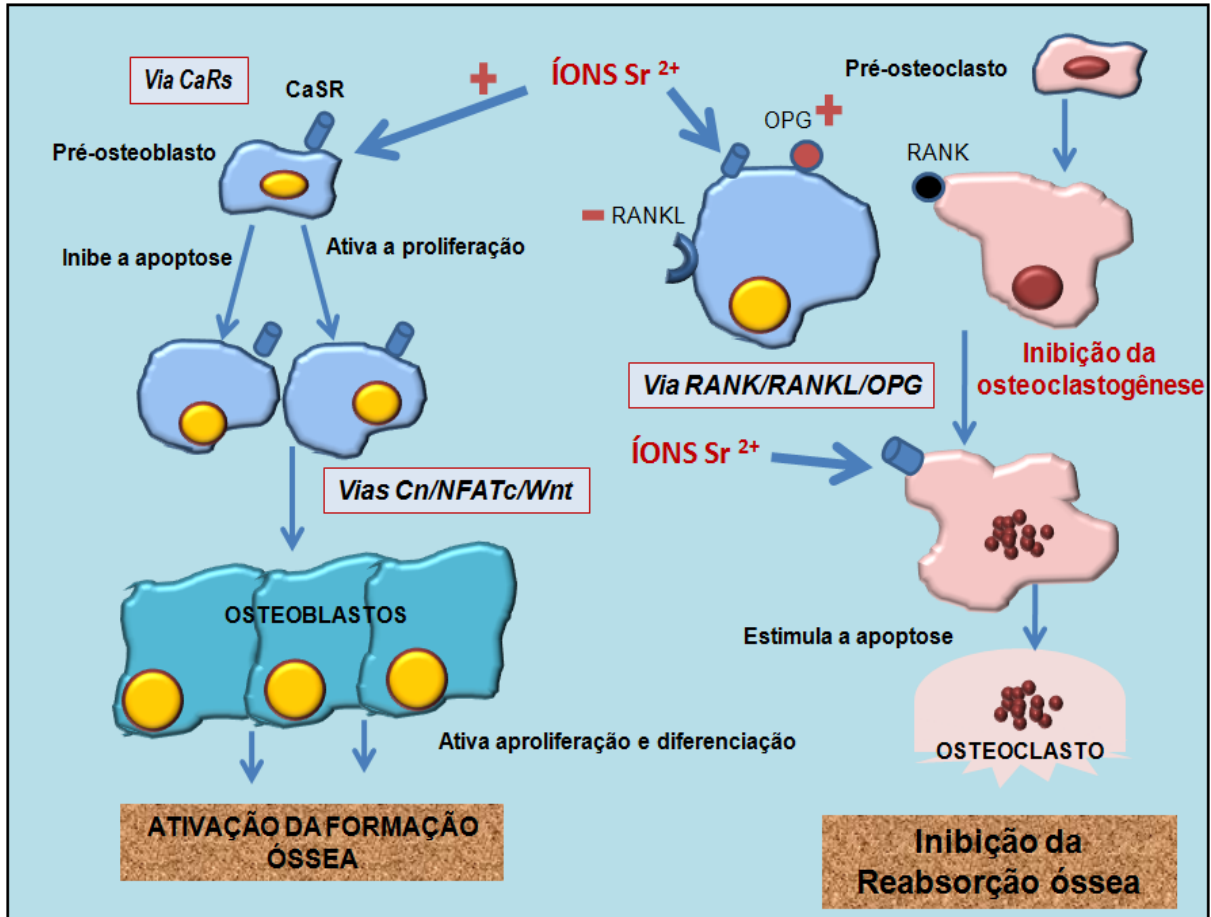


Figura 4 – Efeitos do RSr em osteoblastos e osteoclastos *in vitro*: Os íons Sr^{2+} ativam a replicação e a diferenciação de pré-osteoblastos e reduzem a diferenciação e função de pré-osteoclastos, por meio da ativação da via dos Receptores sensíveis ao cálcio (CaRs), vias Cn/NFATc/Wnt e da via RANK/RANKL/OPG.

Outros estudos demonstraram que o RSr também favorece a diferenciação de osteoblastos em um fenótipo similar ao dos osteócitos indicado pelo aumento da expressão de esclerostina. Atualmente, sabe-se que os osteócitos, através dos mecanossensores, desempenham um papel fundamental na capacidade de remodelação óssea, controlando osteoblastos e osteoclastos por meio das moléculas regulatórias (ATKINS *et al.*, 2009). Por outro lado, ainda não foi possível identificar *in vitro* os fatores que conduzem a mudança do fenótipo dos osteoblastos para osteócitos (MARIE; FELSEMBERG; BRANDI, 2011).

Outra via por meio da qual o RSr atua na ativação de osteoblastos é a da calcineurina (Cn)/Fator Nuclear de Células T Ativadas (*Nuclear Factor of Activated T-cells*, NFATc). NFATc são fatores de transcrição altamente fosforilados e residem no citoplasma de células não-estimuladas (FROMIGUÉ *et al.*, 2009; MARIE, 2010).

Um aumento da concentração intracelular de cálcio leva à ativação do heterodímero serina/Cn que induz a desfosforilação de NFATc e a sua translocação para o núcleo, o qual regula genes alvos específicos (MARIE, 2010). A ativação do heterodímero Cn ocorre de forma semelhante ao cálcio, resultando no aumento da replicação de osteoblastos (FROMIGUÉ *et al.*, 2009; MARIE; FELSENBERG; BRANDI, 2011).

Recentemente, verificou-se que a ativação da via Cn/NFATc pelo RSr em osteoblastos pode também ativar a osteoblastogênese através da ativação da via Wnt em osteoblastos cuja sinalização é fundamental para o controle da replicação, diferenciação e sobrevivência celular (MARIE; FELSENBERG; BRANDI, 2011).

As duas vias que compreendem o sistema Wnt de sinalização, isto é, a canônica (β -catenina-dependente) e a não-canônica (β -catenina-independente) estão envolvidas no controle da formação e reabsorção de osso (MARIE, 2010).

Sinais Wnt Canônicos são transmitidos pela família de receptores Frizzled e de co-receptores LRP5/LPR6, culminando na translocação de β -catenina para o núcleo e na ativação de genes alvos (KATOH; KATOH, 2007; RAO; KÜHL, 2010).

Sinais Wnt não-canônicos são transduzidos através de receptores da família Frizzled e co-receptores, tais como Ryk (Receptor tirosina quinase), que ativam pequenas proteínas G, incluindo RhoA (Receptor muscarínico da acetilcolina), levando ao recrutamento de cascatas de sinalização NFAT (KATOH; KATOH, 2007).

Assim, os resultados obtidos em pesquisas *in vitro* indicam que o RSr ativa tanto a sinalização Wnt canônica e não-canônica em osteoblastos, determinando a modulação positiva da função e da replicação de osteoblastos, atestando a ativação da via de sinalização Wnt na regulação da osteoblastogênese pelo RSr (FROMIGUÉ *et al.*, 2009; MARIE, 2010).

A Figura 5 a seguir ilustra a ativação dos componentes da via Wnt canônica e não canônica pelo RSr e a conseqüente promoção da proliferação e atividade dos osteoblastos (MARIE, 2010).

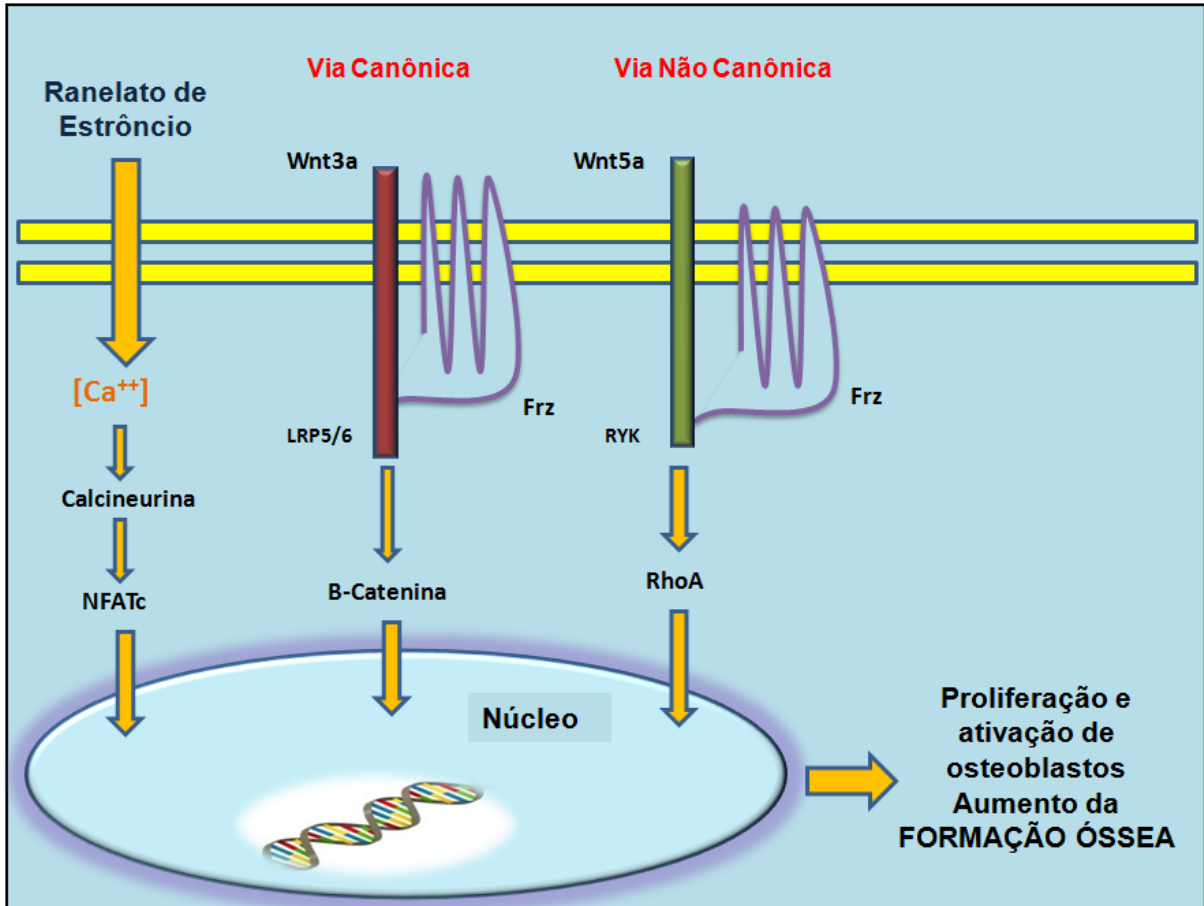


Figura 5 – Ranelato de Estrôncio ativa componentes da sinalização Wnt canônica e não-canônica em osteoblastos: O RSr ativa via de sinalização da via calcineurina/NFATc1 em osteoblastos o que determina o aumento da expressão de proteínas Wnt (Wnt3a e Wnt5a). Wnt3a interage com co-receptores LPR5 (ou LPR6) e Frizzled (Frz) para ativar sinalização Wnt/β-catenina canônica. Wnt5a interage com co-receptor Ryk para induzir sinalização não-canônica RhoA-dependente. Essas duas vias convergem para promover a replicação e ativação da função osteoblástica.

Dessa forma, os resultados dos estudos *in vitro* demonstram claramente que o RSr produz efeitos opostos em osteoclastos e osteoblastos por meio da ativação dos receptores sensores de cálcio, ativação da via NFATc/Wnt e modulação do eixo RANK/RANKL/OPG.

2.4.4 Estudo do RSr em animais

Em diferentes modelos de estudo com animais, os efeitos benéficos do RSr em prol da formação óssea verificados *in vitro* puderam ser confirmados *in vivo*. Em modelo de indução de osteopênia por meio da ovariectomia, Marie *et al.* (1993) verificaram que o tratamento profilático com RSr (77,154 e 308 mg/kg/dia), por 8 semanas, em ratas, inibiu a perda óssea induzida pela deficiência estrogênica.

Verificou-se que o RSr promoveu um aumento da densidade, volume e conteúdo mineral ósseo medidos através da absorptometria de energia dual de raio X (DXA) e pela histomorfometria em tíbia. Adicionalmente, análises bioquímicas para a fosfatase alcalina demonstraram que a formação óssea manteve-se em nível elevado nesses animais, sugerindo que o RSr foi capaz de reduzir a reabsorção óssea, mas não a formação óssea.

Bain *et al.* (2009) demonstraram em ratas ovariectomizadas que o tratamento com RSr, durante 1 ano, com 625 mg/kg/dia de RSr, dose equivalente a utilizada clinicamente em mulheres osteoporóticas, isto é, 2 g/dia teve um efeito positivo significativo na massa, densidade, microarquitetura e resistência óssea. A resposta tecidual ao tratamento com RSr foi avaliada por meio de testes biomecânicos microtomografia computadorizada, histomorfometria e nanoidentação realizadas em vértebra lombar. Adicionalmente, análises bioquímicas revelaram um aumento da fosfatase alcalina e redução de deoxipiridinolina, sugerindo que o tratamento foi favorável à formação, mas não à reabsorção óssea.

Em contraste, Fuchs *et al.* (2008), utilizando o mesmo modelo da ovariectomia, porém com doses mais baixas de RSr (25 e 150 mg/kg/dia) por 8 semanas, encontraram resultados conflitantes. Os referidos autores, por meio de análises densitométricas, utilizando um densitômetro específico, microtomografia computadorizada, histomorfometria e testes biomecânicos, não verificaram nenhum efeito sobre a densidade mineral, volume e resistência mecânica óssea em análises realizadas em tíbia, fêmur e vértebra lombar.

O efeito benéfico do RSr sobre a reparação óssea foi também avaliado por meio do modelo de indução de fratura da tíbia em ratas com osteopênia induzida por ovariectomia. Utilizando a associação destes modelos, verificou-se através de análises por DXA, microtomográficas e histológica (LI *et al.*, 2010) que o tratamento com 625 mg/kg/dia, por 8 semanas, com RSr aumentou o volume e a densidade mineral óssea, o que favoreceu a uma melhor reparação da fratura óssea em tíbia.

Ozturan *et al.* (2011), também associando estes dois modelos, mas com RSr administrado em dose mais baixa (450 mg/kg/dia), por 6 semanas, observaram também resultados positivos sobre o volume e a densidade mineral óssea, por meio de análises por DXA, radiográficas, histológicas e testes biomecânicas que determinaram uma melhor consolidação das fraturas.

O RSr também foi avaliado em modelo de osteopênia induzida por imobilização esquelética. Esse modelo de estudo promove uma perda óssea trabecular associada a uma formação óssea reduzida. Aplicando o modelo de imobilização esquelética, verificou-se em ratos, por meio de histomorfometria, que a administração de RSr (50, 200 e 800/kg/dia), por 10 dias, inibiu a reabsorção óssea e apresentou um efeito protetor sobre a perda óssea trabecular do membro imobilizado. Adicionalmente, o RSr aumentou os níveis séricos de fosfatase alcalina e diminuiu a excreção urinária de hidroxiprolina, o que indica que o RSr reduz a reabsorção enquanto mantém a formação (HOTT *et al.*, 2003).

Em modelo de indução da periodontite, Lima (2010) verificou, em ratos, por meio de análises histomorfométricas e bioquímicas, que a administração sistêmica do RSr (625 mg/kg/dia), por 11 dias, foi capaz de reduzir a reabsorção óssea alveolar, sugerindo um efeito protetor do RSr sobre a periodontite.

Em animais intactos, outros estudos indicam que o RSr também é capaz de aumentar a massa óssea. Em camundongos normais machos e fêmeas, o RSr (200, 600 e 1800 mg/kg/dia), administrado durante 104 semanas, foi capaz de aumentar a resistência e massa óssea vertebral medidas por meio de histomorfometria e densidade mineral óssea por DXA (DELANNOY; BAZOT; MARIE, 2002).

Da mesma forma, através de análise histomorfométrica e da densidade mineral óssea por DXA, verificou-se que o RSr (225 a 900 mg/kg/dia), administrado sistemicamente em ratos normais, promoveu o aumento da densidade mineral óssea da tíbia (área cortical e trabecular) e também a resistência óssea vertebral e do fêmur, bem como o aumento do volume trabecular ósseo (AMMANN *et al.*, 2004).

Em macacas normais (*Macaca fascicularis*), o RSr (100, 275 e 750 mg/kg/dia), administrado sistemicamente por 26 semanas, reduziu a reabsorção óssea alveolar e manteve a formação óssea de forma dependente, resultados que foram obtidos por meio de análises histomorfométricas (BUEHLER *et al.*, 2001).

Maïmoun *et al.* (2010) verificaram um efeito positivo do tratamento sistêmico RSr (625 mg/kg/dia por 8 semanas) na osseointegração de implantes instalados na tíbia de ratos. As análises biomecânicas de tração dos implantes, microtomográficas e de nanoidentação indicaram que o tratamento com o RSr

favoreceu uma maior retenção mecânica dos implantes devido à obtenção de uma maior área de contato entre o implante e o osso.

O efeito do RSr também foi avaliado em modelo de camundongos transgênicos. Nesse modelo, a superexpressão de *Runx2* (fator de transcrição relacionado ao *Runt* tipo 2) foi induzida em animais, o que levou ao desenvolvimento de uma severa osteopênia e tendência a fraturas espontâneas. Foi observado por análises histomorfométricas, densidade mineral óssea por DXA e por testes biomecânicos de resistência a compressão que o tratamento via oral com 1800 mg/kg/dia com RSr (S12911-2, PROTELOS[®]), durante 9 semanas, promoveu um efeito significativo antifratura das vertebrais caudais verificado pelo aumento da microarquitetura óssea cortical e trabecular (GEOFFROY *et al.*, 2011).

2.4.5 Ensaios clínicos com o RSr

Em humanos, a eficácia do RSr no tratamento da osteoporose foi apreciada em várias pesquisas clínicas. O primeiro estudo realizado foi um ensaio clínico multicêntrico randomizado duplo cego e de longo prazo, realizado em 353 mulheres com osteoporose pós-menopausa. Estas participantes receberam RSr (0,5 g, 1 g ou 2 g/dia) ou placebo por 2 anos. Foi observado por meio de análises por DXA que o RSr foi capaz de aumentar, de forma significativa, a densidade mineral óssea quando administrado sistemicamente na dose de 2 g/dia (MEUNIER *et al.*, 2002).

Os resultados desse estudo serviram de base para a realização de grandes estudos clínicos multicêntricos aleatórios, duplo cegos e controlados como o *Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention* (SOTI) (MEUNIER *et al.*, 2004) e o *Treatment of Peripheral Osteoporosis Study* (TROPOS) (REGINSTER *et al.*, 2005).

Em SOTI, o RSr foi administrado na dose de 2 g/dia, em cerca 1649 mulheres osteoporósicas, pós-menopáusicas na faixa etária entre 50-69 anos e osteoporose confirmada, por no mínimo 5 anos, com pelo menos uma fratura vertebral na coluna lombar confirmada por radiografia prévia e densidade mineral óssea de 0,840 g/cm² ou menor.

Nesse estudo, avaliou-se o efeito do RSr sobre o índice de fratura vertebral. Em TROPOS, o RSr foi administrado com a mesma dose de 2 g/dia, em

5091 mulheres osteoporósicas pós-menopáusicas, na faixa etária de 70-74 anos, densidade mineral óssea de 0,600 g/cm² ou menor com alto risco de fratura. Nesse estudo, foi avaliado o efeito do RSr sobre o índice de fratura não vertebral (TROPOS).

As pacientes, nos dois estudos, receberam suplementação diária de Ca e vitamina D. Nos dois estudos, o risco de fratura foi avaliado através de radiografias e análise da densidade mineral óssea por DXA. Análises bioquímicas (fosfatase alcalina e telopeptídeo C) foram também realizadas, a fim de verificar o efeito sobre marcadores da formação e da reabsorção óssea.

Os resultados obtidos em SOTI demonstraram uma redução de 49% do índice de fratura vertebral, no primeiro ano de tratamento, e de 41% até os três anos seguintes. Em TROPOS, após três anos de tratamento, os resultados indicaram uma redução significativa da ocorrência de fraturas não vertebrais. Em ambos os estudos, verificou-se o aumento dos níveis séricos de fosfatase alcalina e a diminuição do telopeptídeo C.

Os resultados dos estudos de SOTI e TROPOS mostraram que o tratamento de longo prazo (mínimo de 12 meses) com o RSr, com regime de administração de 2 g/dia apresentava um efeito positivo na prevenção e redução do risco de fraturas das pacientes. Posteriormente, Bruyere *et al.* (2007) realizaram uma pesquisa utilizando os pacientes provenientes de SOTI e TROPOS e puderam confirmar os resultados obtidos nesses estudos. Para o estudo em questão, foram recrutados pacientes de SOTI, com idade entre 50-65 anos, e osteoporose confirmada por no mínimo 5 anos com pelo menos uma fratura vertebral na coluna lombar e densidade mineral óssea de 0,840 g/cm² ou menor.

As pacientes recrutadas de TROPOS tinham idade entre 70-74 e alto risco de fratura. Todos os pacientes receberam suplementação diária de Ca e vitamina D. O risco de fratura foi avaliado por meio da análise da Densidade Mineral Óssea (DMO) através de absormetria dual de raio X da coluna vertebral lombar e cabeça do fêmur, realizada no início e a cada seis meses durante o estudo (3 anos). As análises dos resultados por meio de radiografias e DXA indicaram que o RSr promoveu uma elevação da densidade mineral óssea com redução significativa do risco de fraturas.

A eficácia do tratamento de longo prazo com 2 g/dia de RSr foi também confirmada por Arlot *et al.* (2008). Esses autores realizaram biópsias do íliaco de

pacientes pós-menopáusicas osteoporóticas submetidas ao tratamento de longo prazo, com o RSr por 12 meses. Após o tratamento, análise dos espécimes através de microtomografias computadorizadas e histomorfometria indicaram que o RSr promoveu um aumento da deposição mineral, bem como o aumento do volume ósseo cortical e trabecular.

Corroborando com estes resultados, Liu *et al.* (2009) verificaram por meio de estudo randomizado, duplo cego, conduzido em 329 mulheres asiáticas pós-menopáusicas, com osteoporose e alto risco de fratura, o efeito do tratamento com RSr. As pacientes receberam tratamento de 2 g/dia de RSr por 12 meses e, após este período, verificou-se, na análise realizada por DXA, um aumento significativo nos valores da densidade mineral óssea em coluna lombar e colo do fêmur.

Adicionalmente, em um estudo quantitativo realizado em mulheres osteoporóticas pós-menopáusicas submetidas ao regime de tratamento de 2 g/dia, por 12 meses, observou-se, por meio de tomografia computadorizada, um aumento significativo do volume ósseo da região distal da tíbia (RIZZOLI *et al.*, 2010).

Mais recentemente, o impacto positivo do RSr sobre o grau de mineralização óssea foi atestado em biópsias obtidas do osso ilíaco de mulheres osteoporóticas submetidas a tratamento (36, 48 e 60 meses) com 2 g/dia com RSr. Nesse estudo, a interação dos íons Sr^{2+} com o mineral ósseo foi analisada por meio de microanálise por raio X. Os resultados indicaram que o tratamento com o RSr preservou a qualidade mineral óssea nas pacientes (DOUBLIER *et al.*, 2011).

Por outro lado, em estudos de curto prazo (6 meses), o RSr não apresentou diferenças significativas em comparação à teriparatida, por meio de análises bioquímicas do soro para marcadores da remodelação óssea (osteocacina e telopeptídeos C-terminal), o que confirma a necessidade de protocolos de longo prazo para se obter o sucesso da terapêutica com o fármaco (RECKER *et al.*, 2009).

Em geral, os resultados dos ensaios clínicos apontam que o RSr é bem tolerado pelo trato gastrointestinal. Entretanto, de acordo com os últimos dados fornecidos pela Agência Europeia de Medicina (EMA, 2012) podem ocorrer efeitos colaterais tais como: alterações cutâneas, enxaquecas, náuseas ou diarreia, que podem desaparecer em poucas semanas. Outros efeitos colaterais importantes como erupção cutânea com eosinofilia (Síndrome de Dress) ou embolia venosa

também são descritos. Entretanto, deve ser contraindicado para pacientes com alterações cardiovasculares ou imobilizados por um grande período de tempo, devido ao risco de ocorrência de trombose venosa (EMEA, 2012).

Nesse contexto, verificam-se que as pesquisas realizadas em *in vivo* (animais experimentais e humanos) com o RSr têm visado a avaliação dos efeitos obtidos quando da administração sistêmica. Até o presente, não foram encontrados relatos com relação ao comportamento do fármaco quando do uso local.

3 PROPOSIÇÃO

Diante do exposto acima o presente estudo teve como objetivos:

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito osteoindutor da aplicação local do RSr no reparo ósseo de defeito de tamanho crítico induzidos na calvária de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar o efeito da aplicação local de RSr na redução da área do defeito ósseo crítico através de análise macroscópica realizada por meio de Tomografias Computadorizadas tipo Cone Beam (TCCB);
- Avaliar o efeito osteoindutivo da aplicação local do RSr no reparo do defeito crítico através de análises histológicas semi-quantitativas;
- Verificar a participação de citocinas RANKL e OPG no mecanismo de ação local do RSr no reparo do defeito crítico através de análise imunohistoquímica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo do estudo e delineamento experimental seguiram as normas de manipulação animal estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (UFC) nº 21/10.

4.1 Animais

Para este estudo, foram utilizados 84 ratos *Wistar* (*Rattus Norvergicus*) machos, com massa corporal entre 180 e 200 g. Esses animais eram procedentes do Biotério Central da UFC e transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, onde foram mantidos em gaiolas com 4 animais/cada. Todos receberam água e ração (*Presence* – Nutrição animal, São Paulo, SP, Brasil) à vontade e permaneceram sob as mesmas condições ambientais de temperatura e ciclos claro-escuros durante todos os experimentos.

4.2 Protocolo experimental

4.2.1 Modelo de indução de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos

Na calvária de cada animal foram induzidos defeitos de tamanho crítico (CSD) de 8 mm de diâmetro (TAKAGI; URIST, 1982; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). As cirurgias foram realizadas nos animais sob anestesia geral com Cloridrato de Cetamina (10%), (0,1 ml/kg) associado a Cloridrato de Xilazina (2%), 1,0 ml/kg (Syntec do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), via intramuscular, no membro inferior do animal.

Em seguida, realizou-se a tricotomia da região frontoparietal da cabeça do animal com lâmina de barbear, antissepsia com solução aquosa de digluconato de clorexina a 0,12% (Periogard®, Colgate-Palmolive-Company, São Paulo, SP, Brasil) e o isolamento da área com campo estéril.

Posteriormente, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, realizou-se uma incisão longitudinal de, aproximadamente, 2,5 cm na calvária do rato,

estendendo-se do osso frontal ao occipital, incluindo a pele e o tecido subcutâneo do animal. Em seguida, com um destaca periósteo, levantaram-se, lateralmente, os retalhos, expondo amplamente a superfície óssea da região.

Para a realização do defeito ósseo de tamanho crítico, foi utilizada uma broca trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro externo (Conexão Sistema de próteses Ltda., São Paulo, SP, Brasil) montada em contra-ângulo (Anthogyr – Injecta – Diadema, SP, Brasil) com redução de 16:1, acoplado em motor para implante com 1.500 rpm sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica a 0,9% para evitar superaquecimento.

Dessa forma, foi possível remover um tampão ósseo circular, obtendo-se, então, um defeito de 8 mm de diâmetro e aproximadamente 1 mm de espessura na região mediana da calvária do animal que transpassou toda a espessura da díploe e expôs as meninges no fundo da lesão. Cuidado adicional foi tomado para evitar a perfuração do seio sagital e da dura-máter.

Finalmente, todos os tecidos foram reposicionados e suturados com pontos interrompidos, usando fio agulhado nº 3-0 absorvível tipo *catgut* simples (Bioline®, Anápolis, GO, Brasil). A Figura 6 a seguir resume as etapas realizadas para a indução dos defeitos de tamanho crítico nas calvárias de ratos:

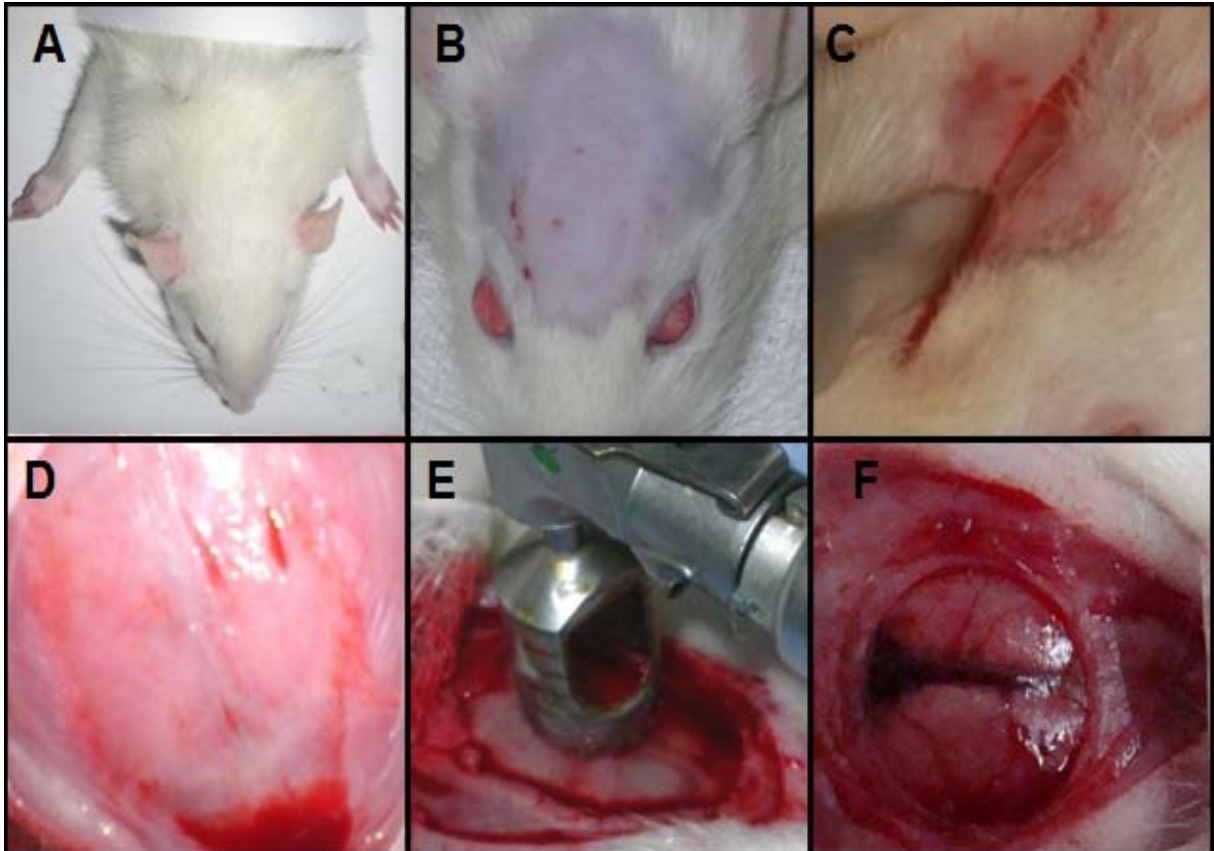


Figura 6 – Sequência de passos para a indução do CSD: (A) Animal anestesiado; (B) Tricotomia da calvária; (C) Incisão longitudinal; (D) Exposição da calvária; (E) Indução do CSD de 8 mm com broca trefina acoplada a contra-ângulo cirúrgico; (F) Área do CSD após a remoção de tampão ósseo.

Após a indução do CDS, os animais foram divididos em grupos e subgrupos de acordo com o tratamento conforme descrito a seguir. Nenhuma medicação foi ministrada no pós-operatório e o sacrifício dos animais foi realizado através de overdose anestésica.

4.2.2 Grupos experimentais

4.2.2.1 Grupo Controle Normal (NOR)

Esse grupo foi constituído por um total de 6 animais não submetidos à indução do defeito de tamanho crítico.

4.2.2.2 Grupos Controle sem tratamento (CST)

Como a área de extensão do defeito não permitiu a realização de dois defeitos na calvária de um mesmo animal foi necessário criar grupos exclusivos de animais Controle. Esses grupos apresentaram um total de 24 animais submetidos à indução de defeitos críticos na calvária e não receberam nenhum tratamento local. Foram subdivididos em quatro grupos com seis ratos/cada de acordo com o momento do sacrifício, aos 15, 45, 90 e 120 dias de experimentação.

4.2.2.3 Grupos Ranelato de Estrôncio

Foram constituídos dois grupos de RSr com 24 animais/grupo. Em cada grupo, os animais receberam tratamento local com RSr (Protos[®] Laboratório Servier, São Paulo, SP, Brasil) nas concentrações de 2,1 mg e 6,3 mg respectivamente, diluídas em 10 µl de água destilada estéril. Esta diluição permitiu a obtenção de uma pasta fina que foi capaz de preencher toda a área do defeito. As concentrações testadas foram estimadas tomando como base a dose usual sistêmica de RSr (625 mg/kg/dia) utilizada em pesquisas em ratos submetidos a modelos de osteopênia e que favoreceu a formação óssea (MARIE *et al.*, 1993; DAHL *et al.*, 2001; AMMANN *et al.*, 2004; MARIE, 2008; LI *et al.*, 2010; LIMA, 2010). Para tanto, considerou-se a meia vida longa do fármaco bem como o fato de que o RSr quando administrado sistemicamente ser quase totalmente absorvido pelo tecido ósseo (MARIE *et al.*, 1993; DAHL *et al.*, 2001).

Os animais de cada grupo foram subdivididos em subgrupos de 6 animais/cada de acordo com o tempo do sacrifício, aos 15, 45, 90 e 120 dias de experimentação.

4.2.2.4 Grupo Baseline (0 h)

Este grupo contou com seis animais sacrificados imediatamente após a indução do defeito e foi criado exclusivamente para a análise em Tomografia Computadorizada tipo Cone Beam (TCCB).

Desta forma, a amostra total da pesquisa foi composta por 84 animais, considerada grande para experimentos da espécie. Esse tamanho, entretanto, foi necessário devido ao número de subgrupos a serem formados. A Figura 7 representa um organograma da distribuição dos animais nos respectivos grupos e subgrupos experimentais nos quais os animais foram distribuídos aleatoriamente em total de cinco grupos e dezesseis subgrupos.

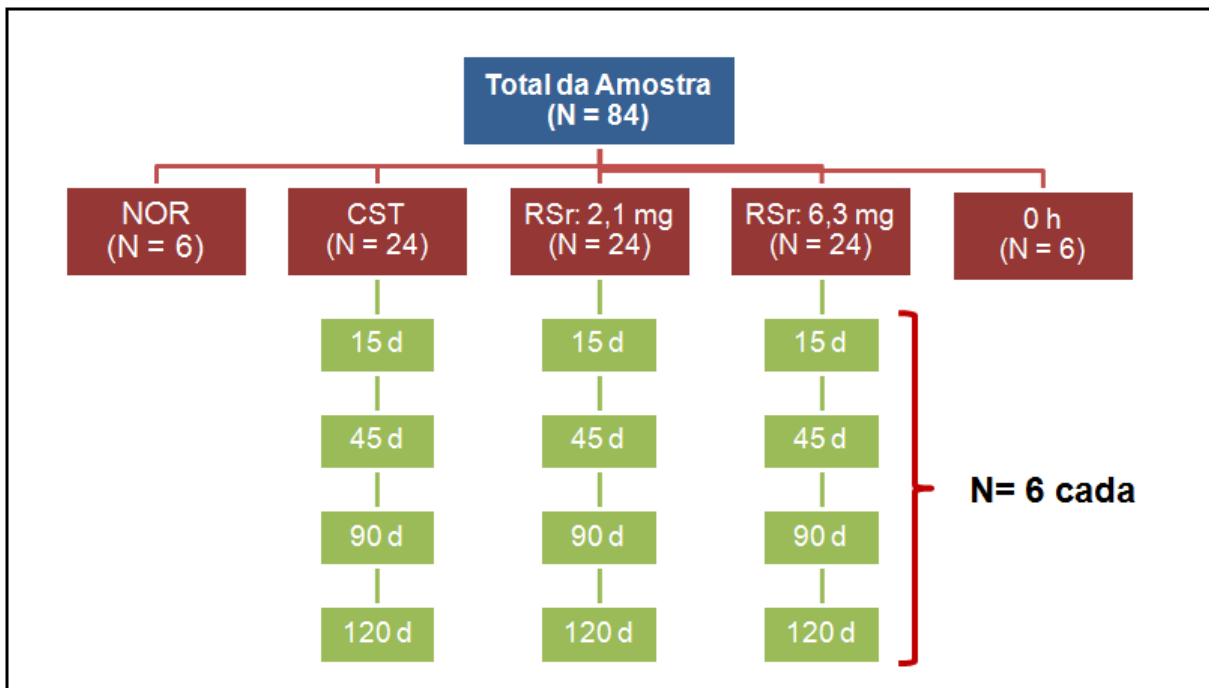


Figura 7 – Organograma da distribuição dos grupos experimentais

4.2.3 Parâmetros avaliados no defeito ósseo de tamanho crítico

Parâmetros locais de redução da área do defeito e de reparo ósseo em área das bordas e do centro do CSD foram considerados para o estudo. Para tanto, foram realizadas análises macroscópicas, histopatológica e imunohistoquímicas. As calvárias dos animais sacrificados imediatamente após a indução do CSD foram utilizadas como controle do estudo macroscópico, enquanto que as calvárias sem a indução do CSD (normais) e dos animais sem tratamento com o fármaco foram utilizadas como controles do estudo histológico e imunohistoquímico.

4.2.3.1 *Análise macroscópica do CSD através de Tomografia Computadorizada tipo Cone Beam (TCCB)*

Imediatamente após a indução dos defeitos (0 h) e aos 45, 90 e 120 os animais foram sacrificados, as calvárias removidas e fixadas em formol a 10% por 24 horas. Não foram realizadas análises dos animais do grupo 15 dias, uma vez que de acordo com a literatura, neste período de tempo, a formação óssea ainda incipiente não é captada em tomadas radiográficas (PRYOR; SUSIN; WIKESJÖ, 2006). Durante este período de tempo de 24 horas em que as calvárias estavam imersas no formol, foram obtidas imagens das calvárias através de TCCB. A aquisição das imagens foi realizada utilizando o tomógrafo computadorizado de feixe cônico Kodak 9000 3D (*Extra-oral Imaging System, Carestream Dental, Rochester, NY, USA*) com as configurações 60 kV, 2 mA, voxel de 75 μm e tempo de exposição de 0,1s. As imagens foram exportadas para o computador e por meio do software KDIS3D (*Extra-oral Imaging System, Carestream Dental, Rochester, NY, EUA*) foram obtidas reconstruções tridimensionais. O protocolo para obtenção é resumido na Figura 8 a seguir:

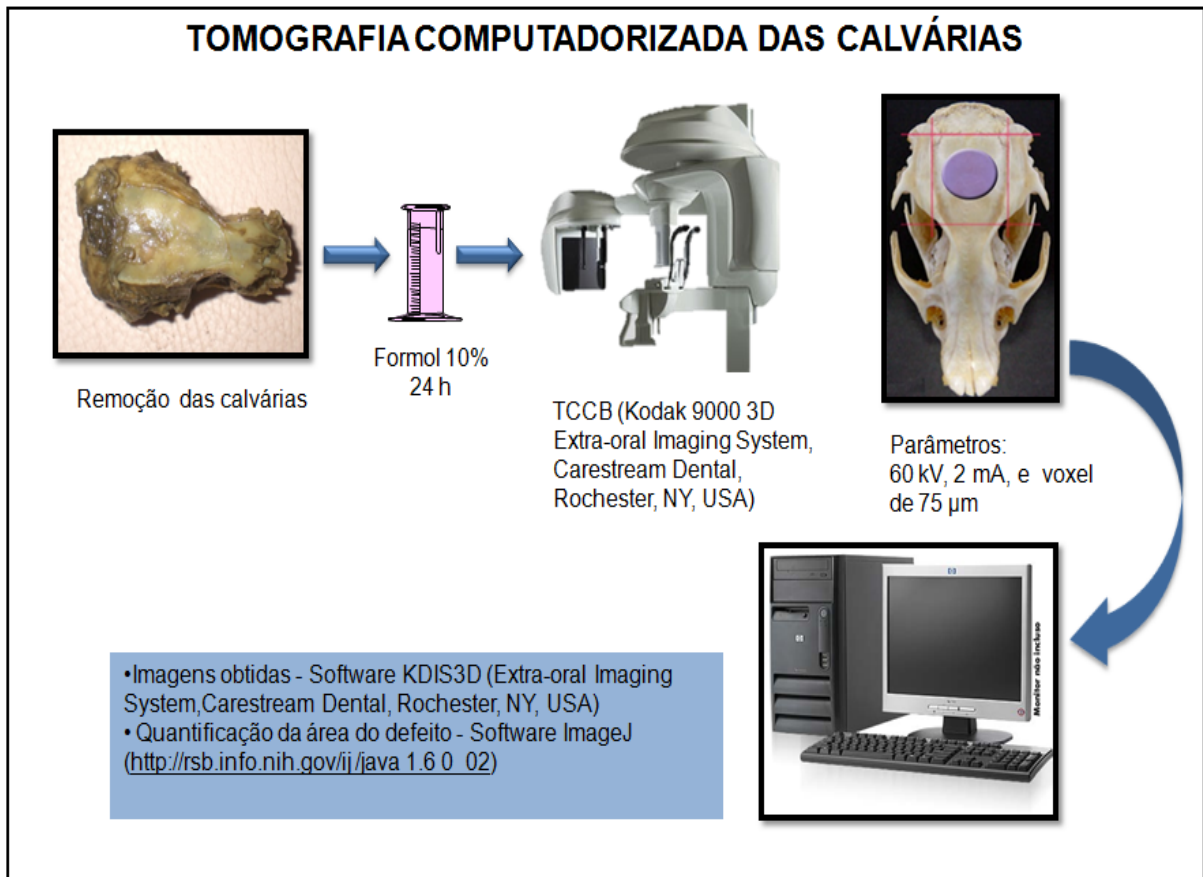


Figura 8 – Procedimentos para a obtenção das imagens tomográficas das calvárias: As imagens das calvárias dos animais dos grupos 0 h, CST e RSr foram obtidas antes da descalcificação.

Após a aquisição das imagens, realizou-se, com auxílio do mouse, a delimitação do contorno da área do defeito em cada calvária de forma cega, por pesquisador especialista em radiologia. Em seguida, a quantificação desta área, em mm², foi obtida aplicando a ferramenta histograma do software Image J (Image J 1.38x, *U.S. National Institutes of Health*, disponível em: http://rsb.info.nih.gov/ij/java.1.6.0_02). Para o cálculo da área do CSD, calculou-se a área inicial do CSD (A_i) nos animais do grupo 0 h. A área com formação óssea (A_0) foi medida nos animais dos grupos CST e RSr sacrificados após 45, 90 e 120 dias de experimentação (Figura 9).

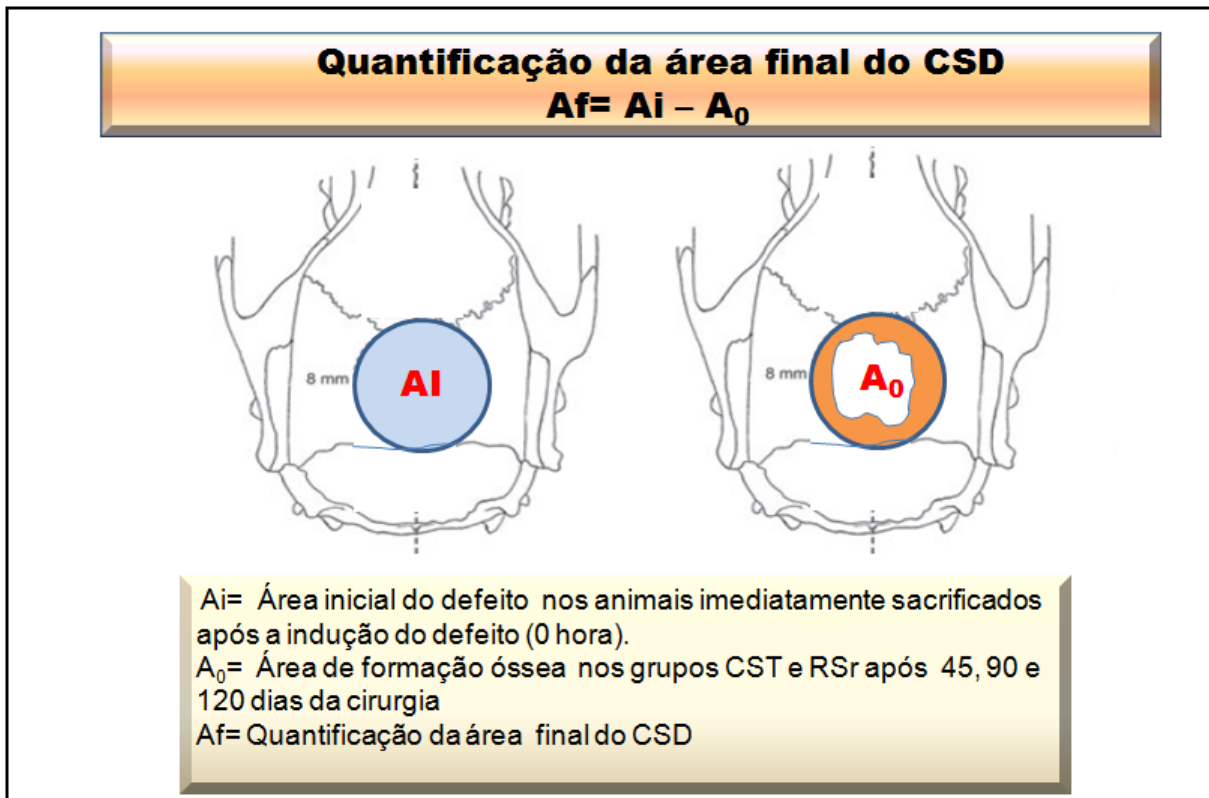


Figura 9 – Quantificação da área do CSD: Metodologia utilizada para a quantificação da área do CSD nas calvárias dos animais do grupo 0h e dos grupos CST e RSr após 45, 90 e 120 dias

Assim, a área final do CSD não reparada pelo tecido ósseo neoformado (A_f) pode ser calculada em cada animal pela equação: $A_f = A_i - A_0$, de acordo com a adaptação do método proposto por Marins *et al.* (2004).

4.2.3.2 Estudo histopatológico do CSD

As análises histológicas foram realizadas em cortes seriados da calvária desmineralizada. Para tanto, nos dias 15, 45, 90 e 120 após o procedimento de enxertia, os animais foram sacrificados e suas calvárias removidas e fixadas em formol a 10% por 24 horas. A seguir, foram descalcificadas com EDTA a 18% por aproximadamente vinte dias e, depois, suspensas em sulfato de sódio a 5%, por 24 horas, para neutralização e, em seguida, banho em água corrente por 24 horas. Finalmente, de cada calvária, foi removido um bloco de aproximadamente 10 mm, contendo o defeito rodeado por cerca de 2 mm de tecido ósseo em toda a periferia. Em seguida, cada bloco foi cortado ao meio no sentido sagital e as peças foram

incluídas em parafina, de modo que, de cada calvária, obteve-se dois blocos com uma hemicalvária de cada animal (MESSORA *et al.*, 2008).

Este procedimento permitiu a obtenção de cortes seriados de 6 μm em micrótomo apropriado, englobando a área central do defeito. As lâminas obtidas foram coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina e analisadas por uma única pesquisadora calibrada, sob a supervisão de um patologista, de forma cega, em microscópio óptico (Leica DM500, Leica Microsystems, Califórnia, CA, USA) acoplado com câmera digital (Sony, Califórnia, CA, USA), com aumento de 100x. Como a grande dimensão do defeito (8 mm) não permitia a observação de toda a extensão por meio de microscópio óptico, foram realizadas também análises em estereomicroscópio (Leica M80, Leica Microsystems, Califórnia, CA, USA) acoplado com câmera digital (Sony, Califórnia, CA, USA) com aumento de 10x.

O esquema do protocolo utilizado para o processamento histológico das calvárias é ilustrado na Figura 10 a seguir:

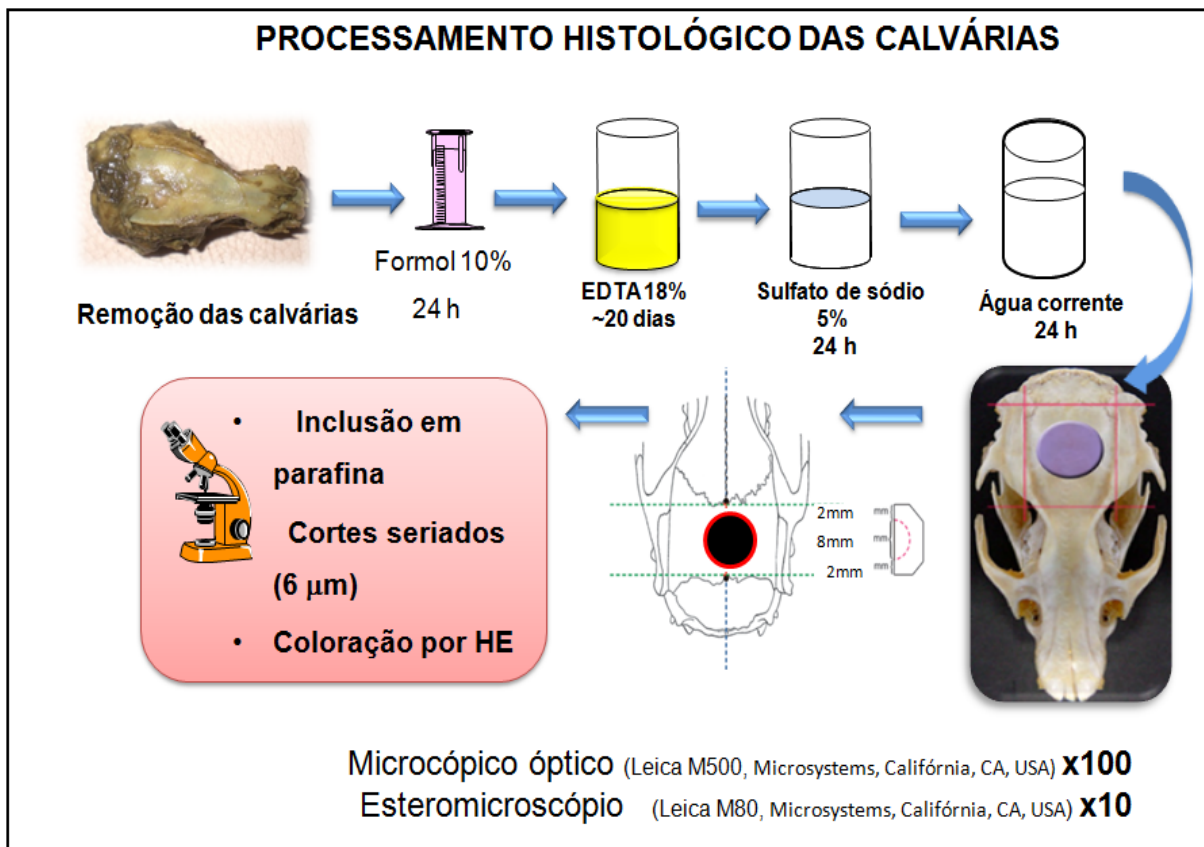


Figura 10 – Processamento histológico das calvárias: Após a remoção das calvárias, os espécimes são imersos em formol por 24 horas seguida da descalcificação em EDTA por cerca de 20 dias, neutralização com sulfato de sódio e banho em água corrente. Finalmente, após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 6 μm corados por HE analisados em microscópio óptico e estereomicroscópio.

Para a análise microscópica semi-quantitativa das calvárias, considerou-se as áreas correspondentes às bordas e centro do CSD observando a presença de neoformação óssea em borda e/ou centro do defeito, aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado leucocitário, vascularização e presença de tecido conjuntivo. O critério para o estabelecimento dos escores foi adotado a partir de uma modificação daqueles estabelecidos por ROCHA *et al.* (2011).

Para tanto, foram atribuídos escores que variaram de 0-4, de acordo com a intensidade desses achados histológicos avaliados em aumento de 100x, conforme Quadro 1 a seguir:

Quadro 1 – Parâmetros inflamatórios e de reparação óssea de defeitos críticos em calvária de ratos (adaptado de ROCHA *et al.*, 2011)

Escore 0	Calvaria normal, sem a indução do CSD; presença da sutura sagital mediana, tecido ósseo íntegro, ausência de hemorragia, infiltrado leucocitário ausente ou discreto.
Escore 1	Neoformação óssea em margens e centro do CSD, presença de numerosos osteoblastos, leve infiltrado leucocitário e vasodilatação, tecido conjuntivo ocupa parte da área central do CSD.
Escore 2	Formação óssea restrita às margens do defeito, osteoblastos presentes, infiltrado leucocitário leve, tecido conjuntivo vascularizado presente no centro do CSD.
Escore 3	Formação óssea restrita às margens do defeito, osteoblastos presentes, infiltrado leucocitário moderado, tecido conjuntivo vascularizado presente no centro do CSD.
Escore 4	Osteoide em formação ativa nas margens do defeito, numerosos osteoblastos, moderado infiltrado leucocitário e vasodilatação tecido conjuntivo ocupa toda a área central do CSD.

4.2.3.3 Análise imunohistoquímica do CSD para citocinas RANKL e OPG

As análises imunohistoquímicas foram realizada nos animais dos grupos SAL e RSr após 120 dias de experimentação. O método utilizado foi o da imunoperoxidase indireta, utilizando anticorpos policlonais para identificação de

RANKL e OPG. Para tanto, foram obtidos cortes histológicos de 3 µm em lâminas silanizadas (Probe-Plus®) adequadas para a técnica de imunohistoquímica.

A seguir, os cortes seriados foram desparafinizados em xilol e reidratados em série decrescente de álcoois (100-70°) e lavados por (3x5 minutos), em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,4 em agitação lenta (25 rpm). Posteriormente, foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena, empregando o peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, por 3 minutos, e lavados (5x5 minutos) em PBS.

As lâminas histológicas foram submetidas à recuperação antigênica usando tampão citrato de sódio, pH 6,0, durante 5 minutos, em potência média. Na sequência, os cortes histológicos foram incubados com solução contendo anticorpo policlonal primário obtido em coelho anti-OPG de rato (AB73400, Abnova, Laguna Niguel, CA, USA) e anticorpo policlonal obtido em cabra anti-RANKL (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluído em PBS acrescido de albumina de soro bovino (BSA a 3%, Sigma, CA, USA) e triton x-100 (0,3%, Sigma, CA, USA), durante 24 horas a temperatura ambiente, sob agitação.

Os cortes histológicos foram novamente lavados em PB (5x5 minutos) e submetidos à segunda incubação com anticorpo secundário biotilado anti-coelho ou anti-cabra feito em burro (1:50, Vector Laboratories, CA, USA), diluídos em BSA a 3% e triton X-100 (0,3%), durante 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, os cortes histológicos foram novamente lavados em PBS (5x5 minutos) e incubados em solução de PBS acrescido de estreptavidina conjugada com peroxidase (1:200, Kit ABC, Vector Laboratories, CA, USA) à temperatura ambiente, durante 1 hora.

A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada em solução de PBS acrescido com diaminobenzidina na concentração de 0,005%, seguido de inativação por meio de inúmeras lavagens em PBS. Esses cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados em xilol e montados com meio de montagem hidrofóbico (Vermount, Erviegas, SP, Brasil). Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão do anticorpo primário.

Após o tratamento imunohistoquímico, as células imunorreativas foram analisadas qualitativamente por um observador em microscópio óptico (Leica DM500, Leica Microsystems, Califórnia, CA, USA) acoplado com câmera digital

(Sony, Califórnia, CA, USA) com aumento de 1000x. Foi utilizada como parâmetro da análise a positividade da imunomarcção quando as células exibiram coloração acastanhada no núcleo e no citoplasma.

4.3 Análises estatísticas

A análise macroscópica (TCCB) foi realizada por um único examinador radiologista, de forma cega, e os dados paramétricos obtidos expressos como Média acompanhada pelo padrão de variação das médias representado pelo seu erro padrão (Média \pm EPM) e o intervalo de confiança das médias (IC) adotado foi de 95%. Os testes utilizados foram análise de variância (ANOVA) para as comparações entre os grupos seguido do teste de Bonferroni.

A análise histológica semi-quantitativa foi realizada por uma única examinadora, de forma cega, sob a supervisão um patologista. Os dados não paramétricos obtidos foram expressos como Mediana acompanhada pelos respectivos valores externos menores e maiores e os testes estatísticos aplicados foram Kruskal-Wallis e Dunn. Para as análises dos dados, tanto os paramétricos como os não-paramétricos foi adotado o nível de significância (α) de 5%. Para essas análises, foi utilizado o software GraphPad Prisma 4.0 (GraphPadSoftwares Inc., San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Análise macroscópica das calvárias pela Tomografia Computadorizada tipo Cone Beam (TCCB)

As análises macroscópicas utilizando a TCCB permitiram quantificar a área do defeito nos animais 0 hora, CST e animais tratados com RSr. Na Tabela 1, a seguir, são apresentados os dados obtidos expressos em Média \pm Erro padrão, da medida da área do CSD realizada nos animais.

Tabela 1 – Média \pm Erro padrão da medida da área do CSD induzidos nas calvárias de ratos nos intervalos de tempo.

0 hora	78,61 \pm 0,96 mm ²	78,61 \pm 0,96 mm ²	78,61 \pm 0,96 mm ²
Grupos	Tempo de indução do CSD		
	45 dias	90 dias	120 dias
CST	80,85 \pm 3,07 mm ²	74,2 \pm 2,73 mm ²	72,04 \pm 1,74 mm ²
RSr (6,3 mg)	74,6 \pm 2,43 mm ²	67,79 \pm 2,32 mm ² #	62,28 \pm 4,17 mm ² #

Testes: ANOVA e Bonferroni; # (p<0,05) estatisticamente significante em relação ao grupo 0 hora; Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

Aos 45 dias, a análise macroscópica não demonstrou redução significativa da área do CSD nos animais que receberam tratamento com 6,3 mg de RSr (74,6 \pm 2,43 mm²) (Figura 11-B), quando comparado com o grupo CST aos 45 dias (80,85 \pm 3,07 mm²) ou com os animais do grupo 0 hora (78,61 \pm 0,96 mm²) (Figura 11-A) (p>0,05).

Por outro lado, redução significativa da área do defeito foi verificada aos 90 dias (67,79 \pm 2,32 mm²) (Figura 11-C) e aos 120 dias (62,28 \pm 4,17 mm) (Figura 11-D) em relação ao grupo 0 hora, mas não em relação ao grupo CST após 90 dias (74,2 \pm 2,73 mm²) e 120 dias (72,04 \pm 1,74 mm²) (p<0,05).

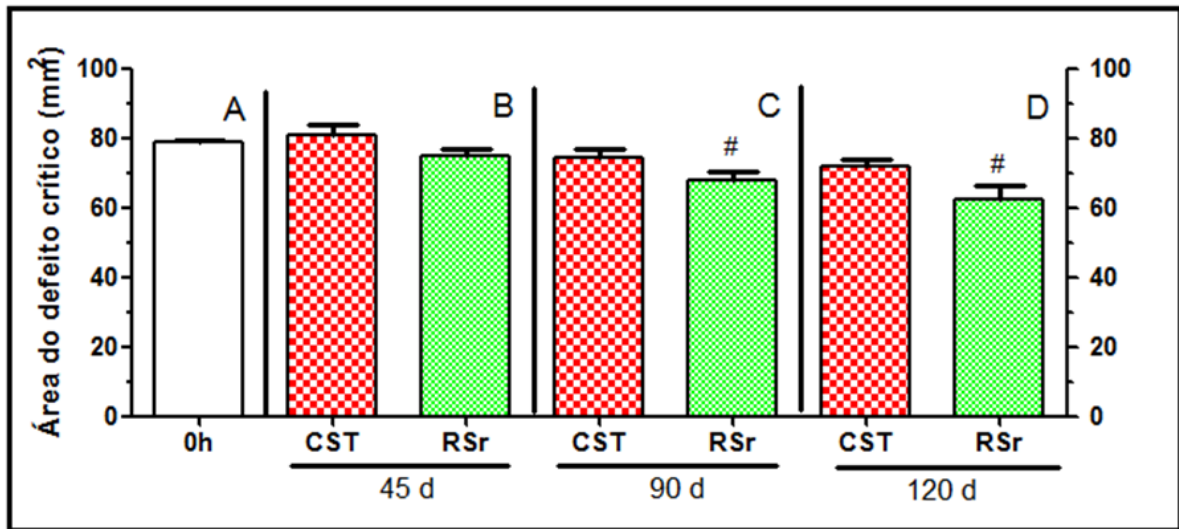


Figura 11 – Efeito do tratamento local com 6,3 mg de RSr: Quantificação da área do CSD (mm²) através de TCCB dos animais sacrificados imediatamente após a indução do CSD (0 h) e após 45, 90 e 120 dias de tratamento. Aos 45 dias (A), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na redução da área do CSD dos animais tratados com RSr em relação aos animais CST e 0 h ($p > 0,05$). Após 90 dias (B) e 120 dias (C) diferenças estatisticamente significativas foram observadas na redução da área do CSD dos animais tratados com RSr em relação aos animais 0 h ($\#p < 0,05$).

Na análise macroscópica da área do CSD, nos animais que receberam 2,1 mg de RSr, aos 120 dias, não foram observadas imagens sugestivas de neoformação óssea ou redução significativa do defeito nem em relação ao CST ou ao grupo de animais 0 hora (dados não apresentados).

Dessa forma, não foram realizadas as medições nos demais tempos experimentais. As imagens tomográficas do CSD dos animais do grupo 0 hora (A), CST (B) e RSr 6,3 mg (C) aos 120 dias é ilustrada na Figura 12 a seguir:

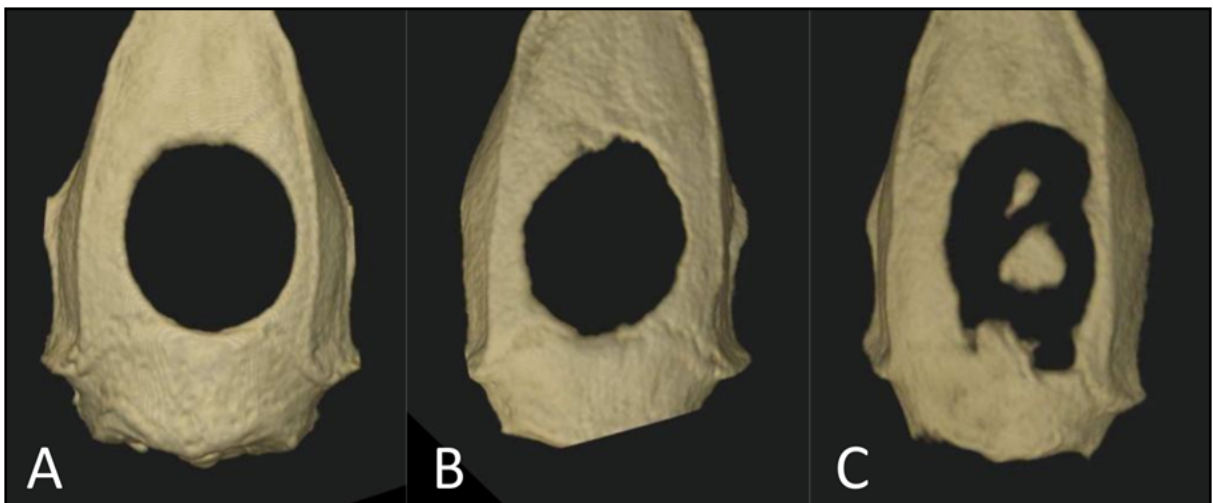


Figura 12 – Imagens tomográficas das calvírias dos animais: (A) 0 h; CST (B) ou com 6,3 mg de RSr (C), após 120 dias de indução dos defeitos.

5.2 Análise histopatológica das calvárias

As análises histopatológicas das calvárias foram realizadas nos animais do grupo normal (sem a indução do CSD), salina e em animais que receberam tratamento local do defeito com RSr nas concentrações de 2,1 mg ou 6,3 mg.

5.2.1 Calvárias dos animais sem a indução do CSD (Normal)

A Figura 13 a seguir ilustra aspectos microscópicos da calvária, sem a indução do CSD, na qual foram evidenciadas características compatíveis com estado de normalidade óssea.

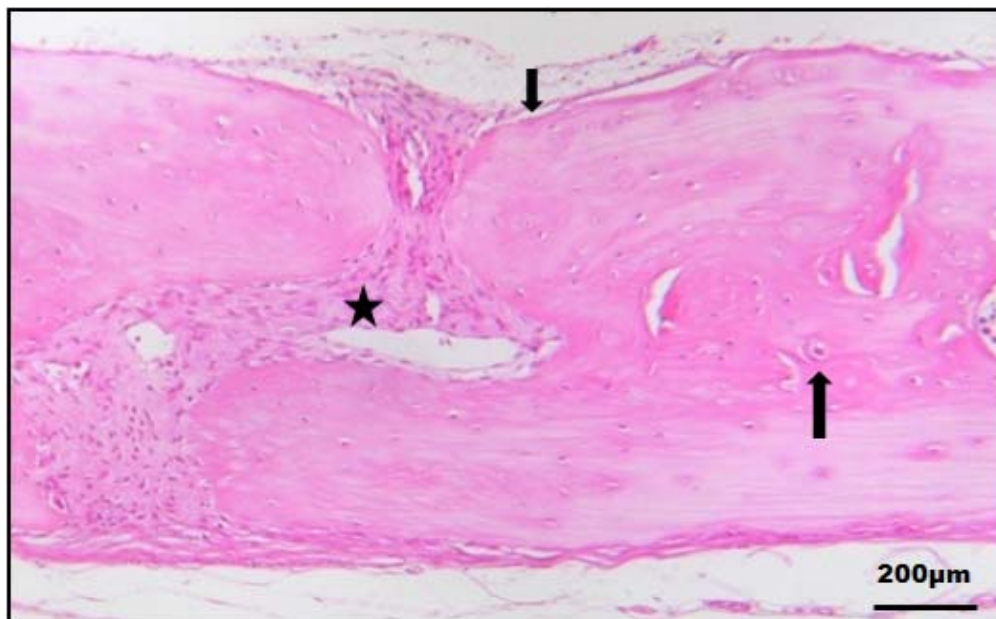


Figura 13 – Corte histológico da área central da calvaria de ratos adultos normais: Tecido ósseo maduro com aspecto lamelar exibindo numerosos osteócitos, ocupando cavidades intraósseas (setas grandes); Tecido conjuntivo céularizado ao nível da sutura mediana central (estrela); Osteoblastos recobrimdo as corticais ósseas e margens da sutura (seta pequena). Infiltrado leucocitário ausente ou discreto. HE x 100.

Observou-se nas calvárias de animais adultos sem a indução do defeito a presença de tecido ósseo maduro que exibia estrutura haversiana característica com muitas lamelas concêntricas associadas a osteócitos. A superfície óssea estava margeada por osteoblastos com forma cuboidal. Na área central, a sutura sagital mediana estava presente associada a um tecido conjuntivo fibroso com muitos fibroblastos fusiformes. O infiltrado leucocitário estava ausente ou discreto.

5.2.2 Calvárias dos animais Controle sem tratamento (CST)

Na análise microscópica dos animais CST, aos 15 dias, observou-se, na região das bordas do defeito (Figura 14), a presença de numerosos osteoblastos associados a um tecido ósseo neoformado do tipo imaturo ou osteoide. A área central do defeito estava preenchida por um tecido conjuntivo, bem vascularizado (Figura 15). Aos 45 dias, a região da borda do defeito apresentava neoformação óssea mais extensa do que a da fase anterior mais ainda restrita às bordas. O número de osteoblastos estava reduzido, o infiltrado leucocitário permanecia moderado e um tecido ósseo de aspecto lamelar mais organizado (maduro) apresentando osteócitos podia ser visto. Tecido conjuntivo vascularizado estava presente na área central do defeito (Figura 16). Aos 90 dias, nas regiões das bordas, um tecido ósseo de aspecto mais maduro, com numerosos osteócitos, predominava. O infiltrado leucocitário permanecia moderado e a área central estava ocupada por tecido conjuntivo, moderadamente vascularizado (Figura 17). Aos 120 dias, a formação óssea estava estabilizada e ainda restrita às bordas do defeito. O tecido ósseo das bordas exibia um aspecto lamelar maduro, com muitos osteócitos e o infiltrado leucocitário estava leve (Figura 18). Com relação à área interna do defeito, ela permaneceu totalmente preenchida por um tecido conjuntivo vascularizado (Figuras 19 e 33-B). Em todo período experimental, diferenças estatísticas foram observadas em relação ao grupo normal ($p < 0,05$), conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Análise histológica de calvárias de ratos normais e de ratos submetidos à indução do CSD nos grupos controle sem tratamento (CST) e grupos que receberam aplicação local de RSr (2,1 e 6,3 mg) nos diferentes tempos experimentais

Grupos	Tempo de indução do CSD			
	15 dias	45 dias	90 dias	120 dias
Normal	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
CST	4 (4-4) [*]	4 (3-4) [*]	3 (3-3) [*]	3 (2-3) [*]
RSr (2,1 mg)	4 (4-4) [*]	3 (3-4) [*]	3 (2-3) [*]	3 (2-3) [*]
RSr (6,3 mg)	4 (3-4) [*]	3 (3-4) [*]	2 (1-3) ^{*#}	2 (1-2) ^{*#^δ}

Os CSD induzidos em animais e receberam aplicação local de RSr (2,1 e 6,3 mg) ou nenhum tratamento (CST). As análises foram realizadas aos 15, 45, 90 e 120 dias da cirurgia. Os dados representam Mediana onde a região do CSD foi considerada para a análise dos seguintes parâmetros: Presença de neoformação na borda e centro do defeito, infiltrado leucocitário, vascularização e presença de tecido conjuntivo na área do CSD. ^{*}p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais normais; [#]p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais CST e ^δp<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais do grupo RSr 2,1 mg (Kruskal-Wallis e Dunn).

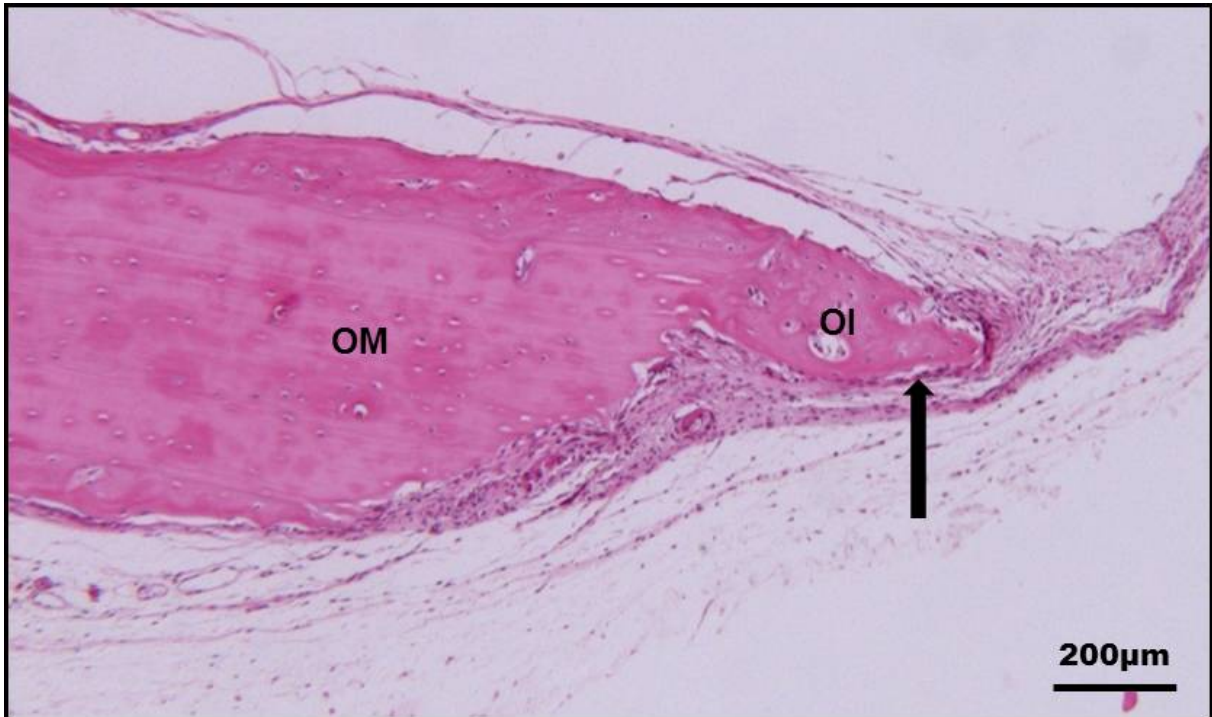


Figura 14 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal do grupo CST aos 15 dias: Observar a presença de marcante de osteoblastos (seta) ao nível da borda do CSD indicando grande atividade reparativa. Formação óssea recente com estrutura desorganizada e imatura (OI). Presença de tecido ósseo mais antigo e maduro (OM) na região adjacente ao defeito. Moderado infiltrado leucocitário e vascularização. HE x 100.

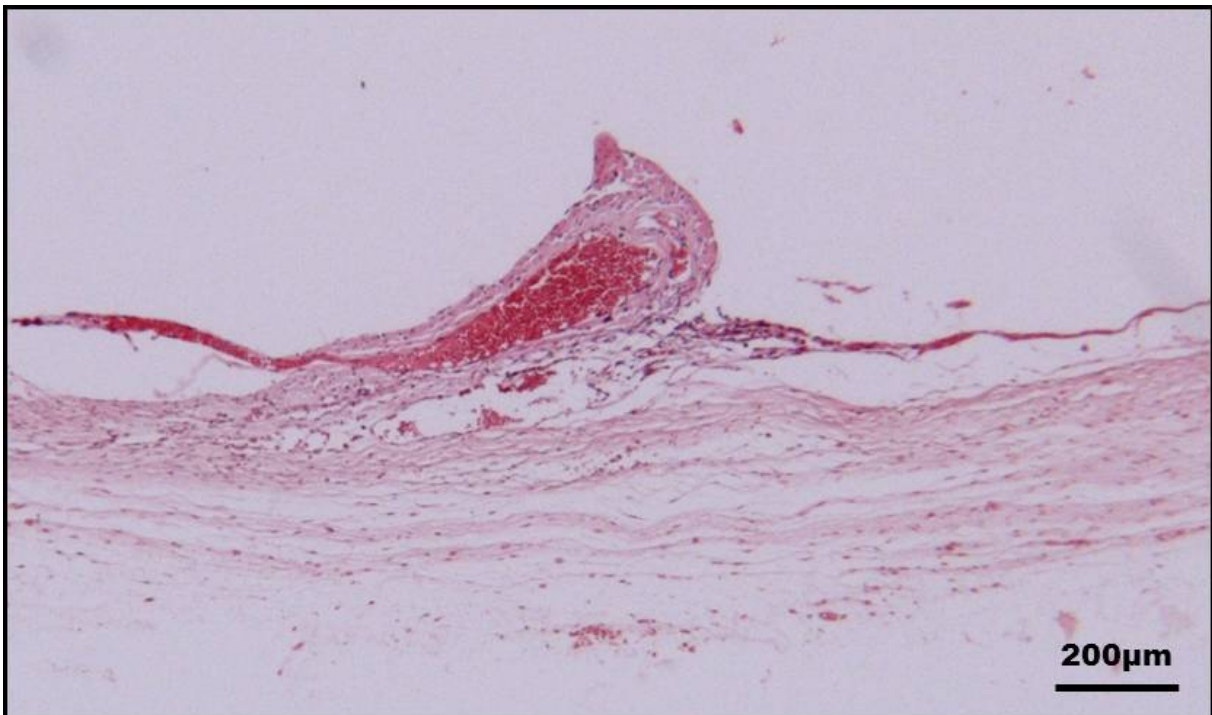


Figura 15 – Fotomicrografia em microscópio óptico da área central do CSD de calvária de animal do grupo CST aos 15 dias: Presença Tecido conjuntivo de aspecto frouxo na área do CSD. HE x 100.

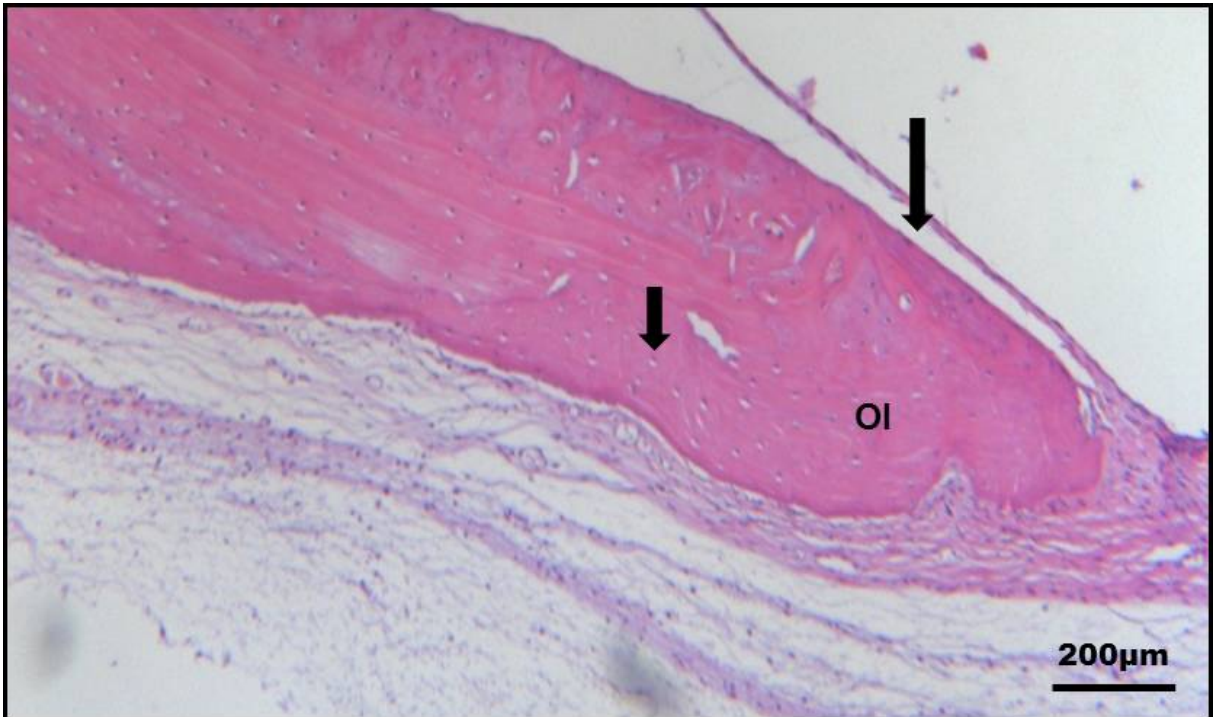


Figura 16 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal do grupo CST aos 45 dias: Observa-se ao nível das bordas do CSD, área mais extensa de formação óssea recente com tecido ósseo de aspecto desorganizado (OI). Osteoblastos presentes ao longo das bordas (seta longa) e osteócitos ao nível de canais de Havers (seta curta). Infiltrado leucocitário moderado. HE x 100.



Figura 17 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal do grupo CST aos 90 dias: Neoformação óssea menos intensa nas bordas (OI), presença de tecido ósseo maduro (OM). HE x 100.



Figura 18 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal do grupo CST aos 120 dias: Presença de tecido ósseo maduro (OM) com inúmeros osteócitos (setas). Leve infiltrado leucocitário. HE x 100.

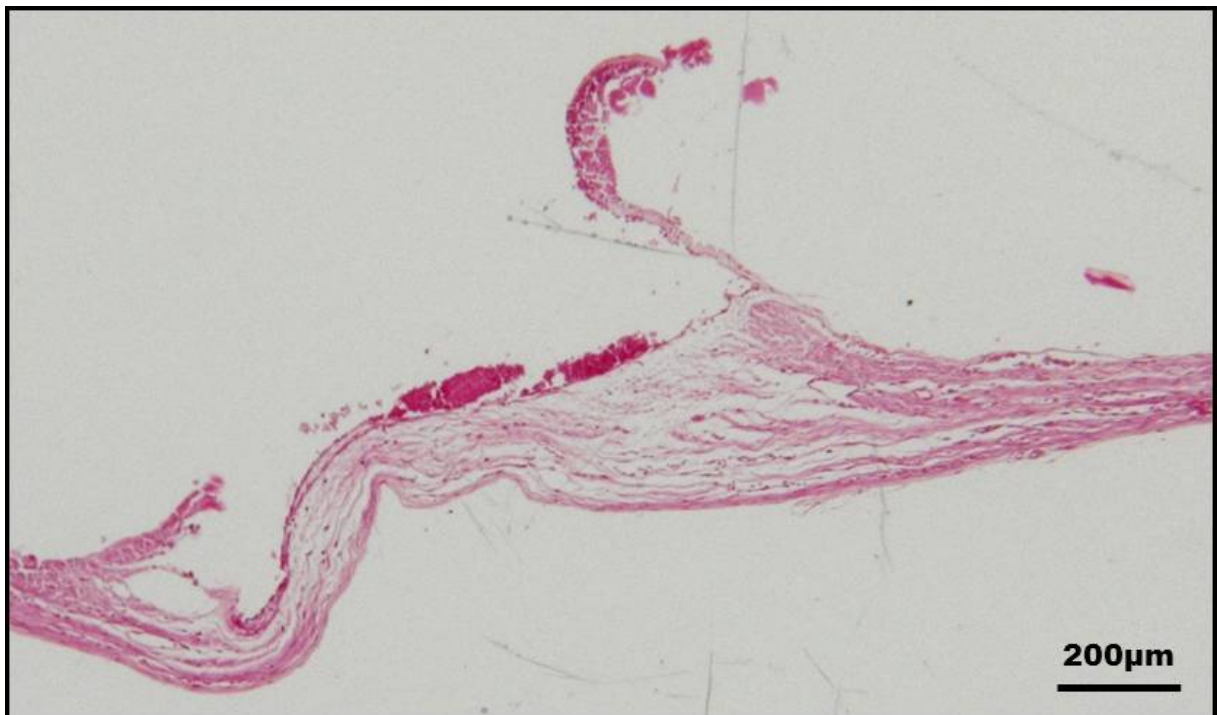


Figura 19 – Fotomicrografia em microscópio óptico da área da borda do CSD de calvária de animal do grupo CST aos 120 dias: Presença de tecido conjuntivo fibroso ocupando toda a área central do CSD. HE x 100.

5.2.3 Calvária submetidas ao tratamento local com Ranelato de Estrôncio

5.2.3.1 Calvárias tratadas com 2,1 mg de Ranelato de Estrôncio

Aos 15 dias, em nível de bordas do CSD, os animais tratados com RSR (2,1 mg) apresentavam reparação óssea discreta através de um tecido ósseo tipo imaturo ou osteoide. Numerosos osteoblastos estavam presentes e o infiltrado leucocitário estava moderado (Figura 20), enquanto que a região central do defeito (Figura 21) estava ocupada por um tecido conjuntivo bem vascularizado. Aos 45 dias, em nível das bordas (Figura 22), a neoformação óssea estava mais extensa e exibia um aspecto predominantemente imaturo, mas ainda estava restrita às bordas do defeito. O número de osteoblastos estava reduzido, o infiltrado leucocitário predominantemente moderado enquanto que a área central do defeito ainda estava ocupada por tecido conjuntivo. Aos 90 dias (Figura 23), a neoformação óssea estava estável, com a presença predominante de tecido ósseo de aspecto maturo e osteócitos podiam ser vistos. O infiltrado leucocitário estava mais leve e a área central do defeito estava ocupada por tecido conjuntivo pouco vascularizado. Aos 120 dias (Figura 24), a formação óssea continuava restrita às bordas do defeito e o infiltrado leucocitário permanecia leve e a região central do defeito estava preenchida por tecido conjuntivo com vascularização reduzida (Figura 25). Em todo período experimental, diferenças estatísticas foram observadas em relação ao grupo normal, mas não com relação ao grupo salina ($p > 0,05$) como apresentado na Tabela 2.

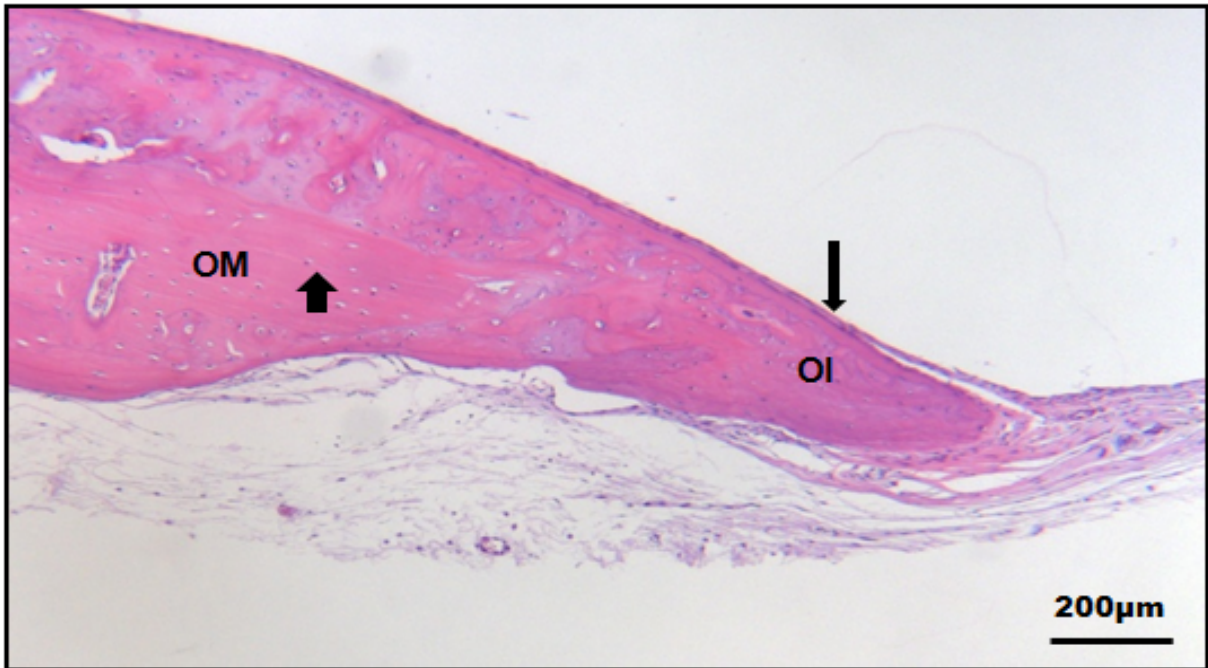


Figura 20 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD da calvária de animal tratado com 2,1 mg RSr aos 15 dias: Neoformação óssea nas bordas (OI); Osteoblastos recobrendo a cortical óssea (seta); Tecido ósseo mais antigo de aspecto lamelar maduro (OM) rico em osteócitos (seta pequena); Moderado Infiltrado leucocitário. HE x 100.

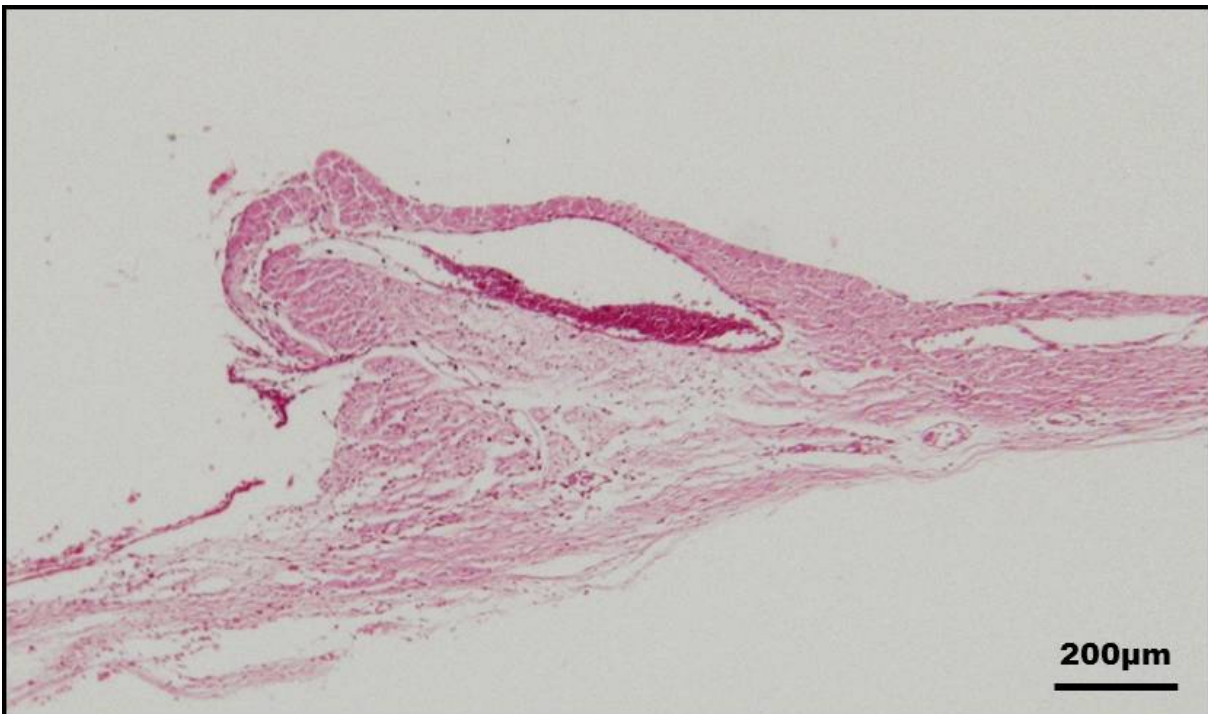


Figura 21 – Fotomicrografia em microscópio óptico da área central do CSD de calvária de animal tratado com 2,1 mg de RSr aos 15 dias: Presença de tecido conjuntivo ocupando a HE x100.



Figura 22 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com Rsr 2,1 mg aos 45 dias: Neoformação óssea nas bordas (OI), Tecido ósseo maduro com aspecto lamelar haversiano (OM); Leve infiltrado leucocitário; Tecido conjuntivo fibrocelular na área central do CSD (estrela). HE x 100.

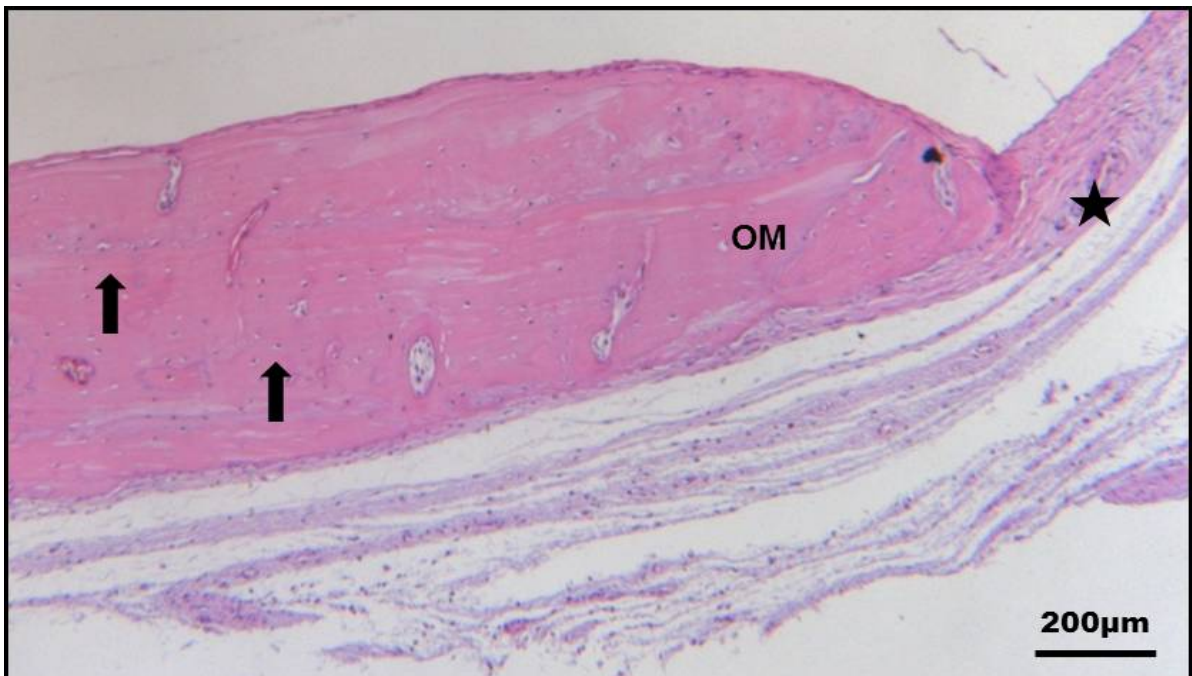


Figura 23 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com Rsr 2,1 mg aos 90 dias: Predomínio de tecido ósseo maduro (OM) com numerosos osteócitos (setas) sugerindo formação óssea mais estável). Leve Infiltrado leucocitário; vascularização menos intensa; Tecido conjuntivo em área central do CSD (estrela). HE x 100.

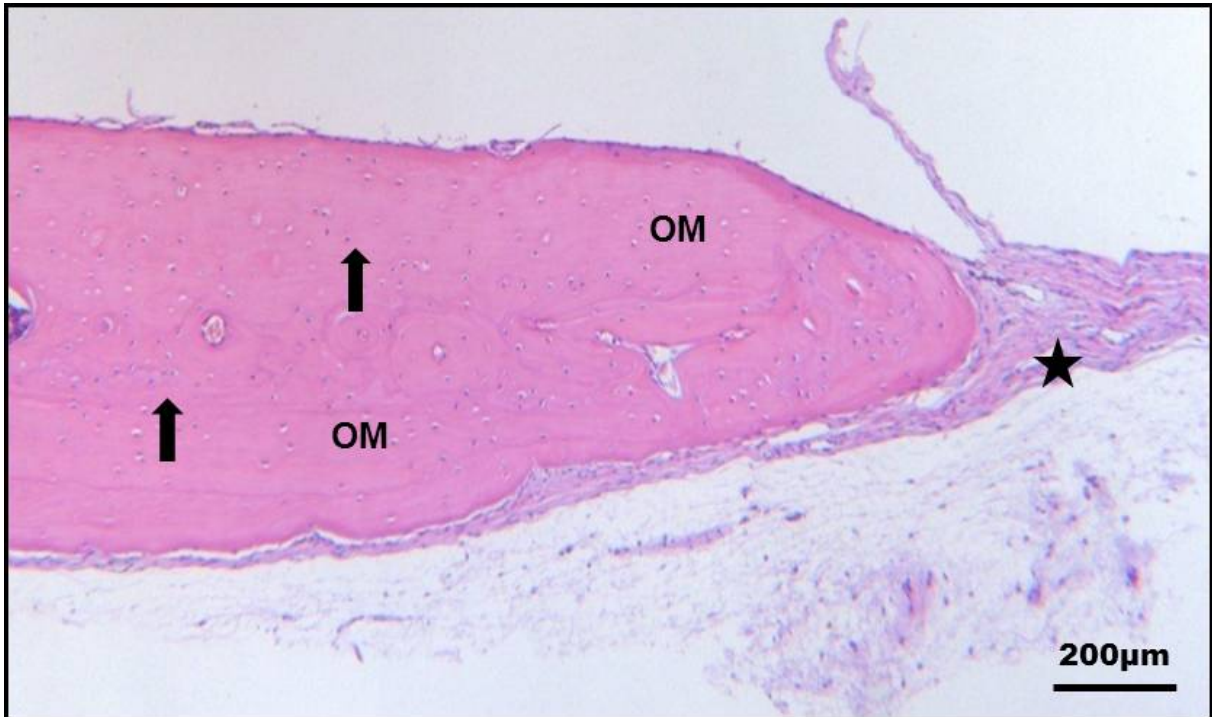


Figura 24 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com Rsr 2,1 mg aos 120 dias: Predomínio de tecido ósseo maduro (OM) com numerosos osteócitos (setas); Leve infiltrado leucocitário; Tecido conjuntivo fibroso ocupando a área central do CSD (estrela). HE x 100.

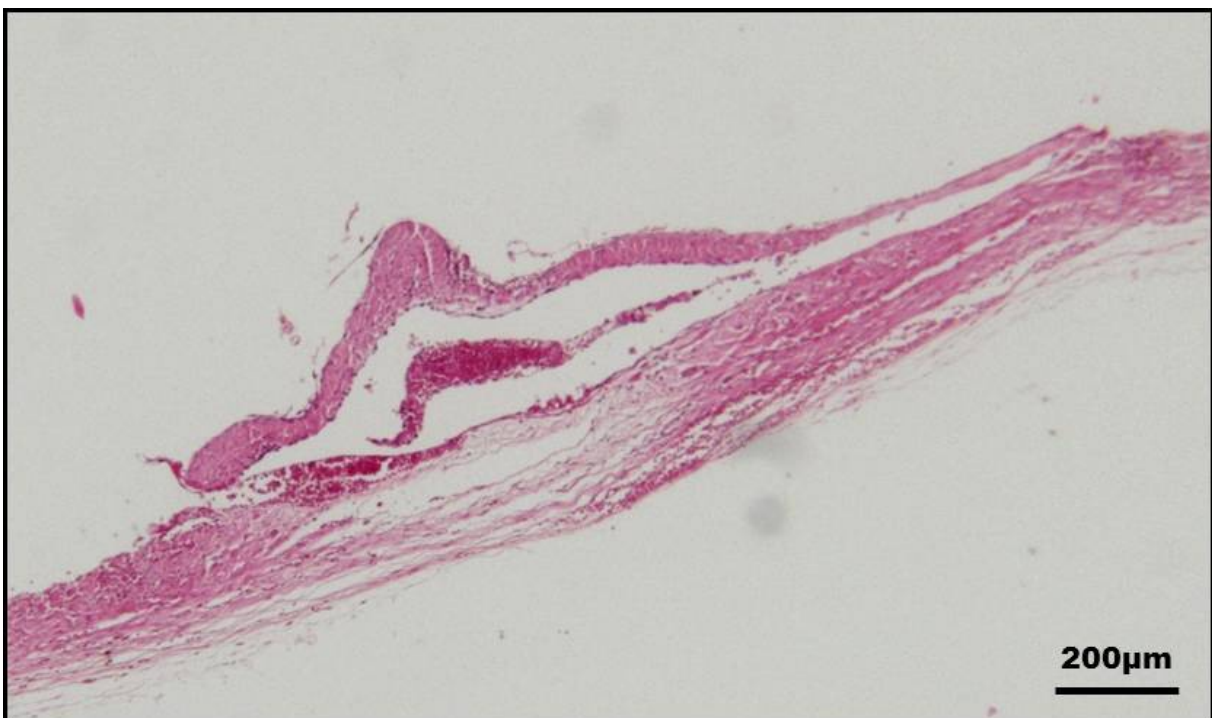


Figura 25 – Fotomicrografia em microscópio óptico da área central do CSD de calvária de animal tratado com 2,1 mg de Rsr aos 120 dias: Presença de tecido conjuntivo fibrocelular ocupando a área central do CSD. HE x 100.

5.2.3.2 *Calvárias que receberam tratamento local com 6,3 mg de Ranelato de Estrôncio*

Em nível das bordas do defeito, aos 15 dias, os animais tratados com 6,3 mg de RSr apresentavam neoformação óssea tipo reparativa, com a presença de tecido osteoide associado a inúmeros osteoblastos. O infiltrado leucocitário estava moderado (Figura 26) e a área central do defeito preenchida por um tecido conjuntivo bem vascularizado (Figura 27). Aos 45 dias, na região das bordas do defeito, a neoformação óssea estava mais extensa ainda com a presença predominante de tecido ósseo tipo osteoide, o infiltrado leucocitário permanecia moderado (Figura 28) e a área central do defeito estava ocupada por tecido conjuntivo. Aos 90 dias (Figura 29) e aos 120 dias (Figura 31), a atividade neoformação óssea estava mais extensa e um tecido ósseo de aspecto maduro predominava nas bordas. Osteoblastos e osteócitos eram numerosos e o infiltrado leucocitário estava mais leve. Com relação à área central do defeito, aos 90 dias (Figura 30) essa área exibia um tecido conjuntivo com a presença de Ilhas de condensações celulares compatíveis com tecido imaturo ou osteoide e aos 120 dias (Figura 32) áreas de neoformação óssea podiam ser observadas (Figura 33-C e Figura 33-D). Aos 90 e 120 dias, diferenças estatísticas foram observadas em relação aos grupos CST e, aos 120 dias, também em relação ao grupo RSr 2,1 mg, $p < 0,05$ (Tabela 3).



Figura 26 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 6,3 mg aos 15 dias: Intensa formação óssea reparativa nas bordas do CSD representada por tecido ósseo com estrutura desorganizada e imatura (OI). Presença de numerosos osteoblastos (seta) e vasos. Moderado infiltrado leucocitário. Tecido conjuntivo ocupa a área central do CSD (estrela). HE x 100.

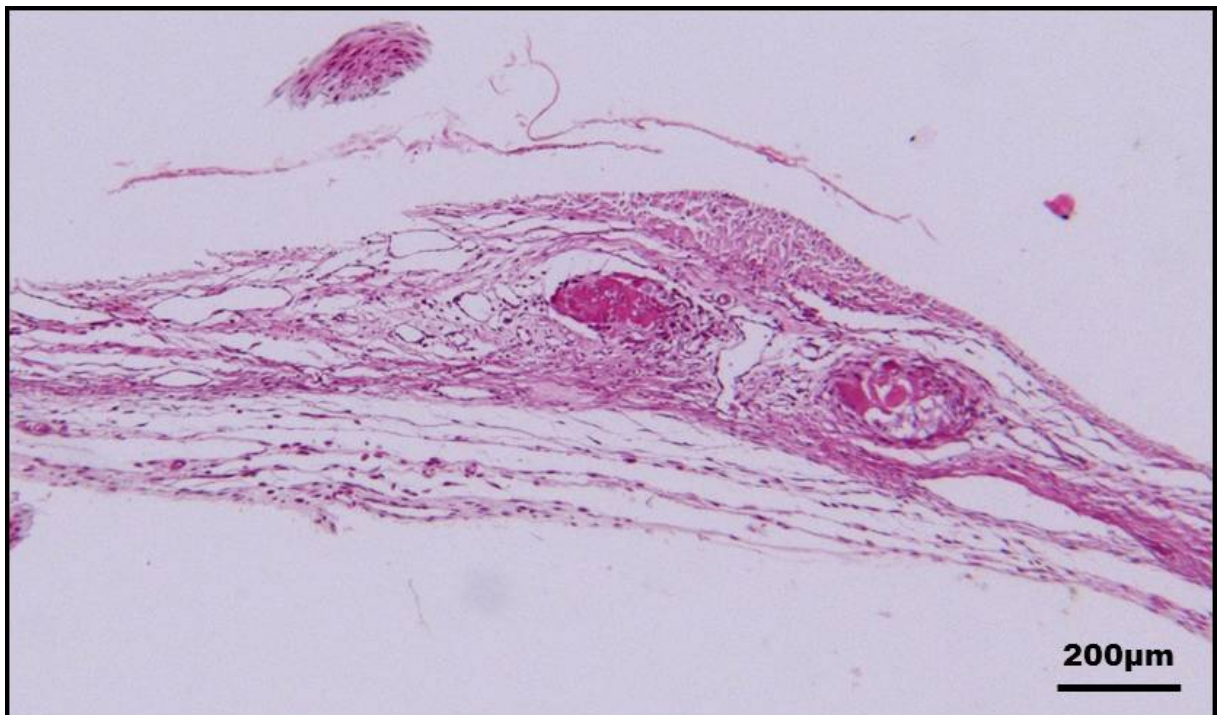


Figura 27 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com 6,3 mg de RSr aos 15 dias: Observar tecido conjuntivo fibroso e vascularizado presente em área central do CSD. HE x 100.



Figura 28 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 6,3 mg aos 45 dias: Neoformação óssea em borda (OI). HE x 100.

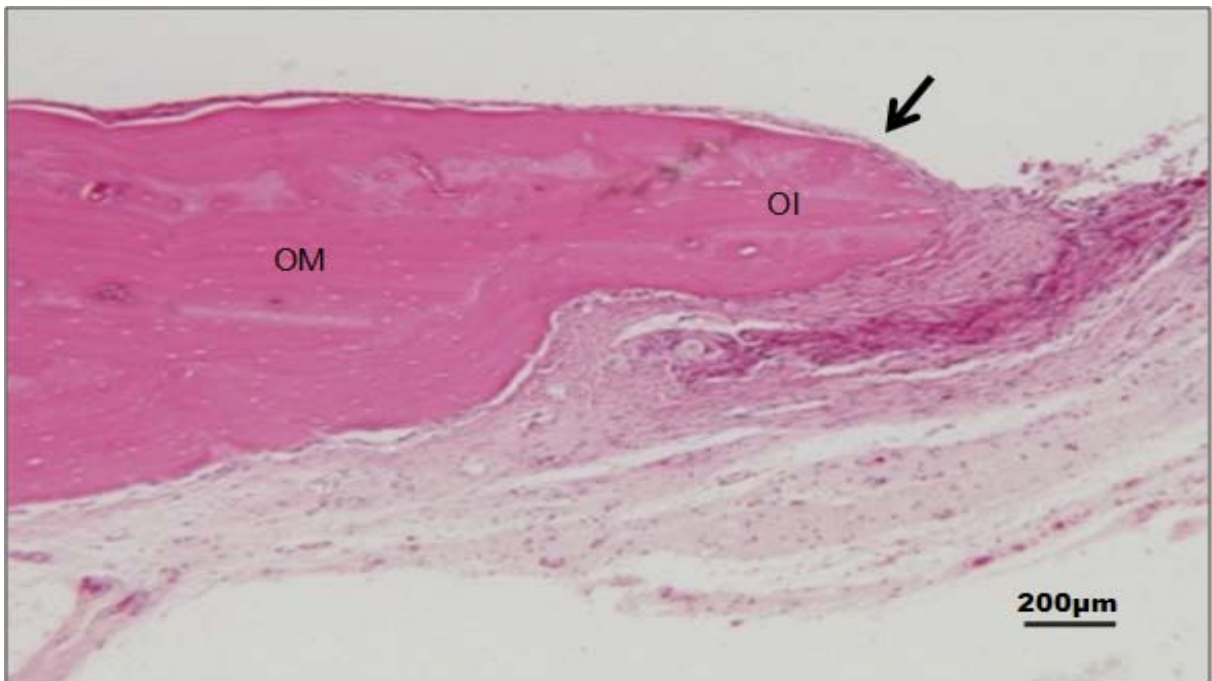


Figura 29 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 6,3 mg aos 90 dias: Neoformação óssea ativa em borda (OI). HE x 100.

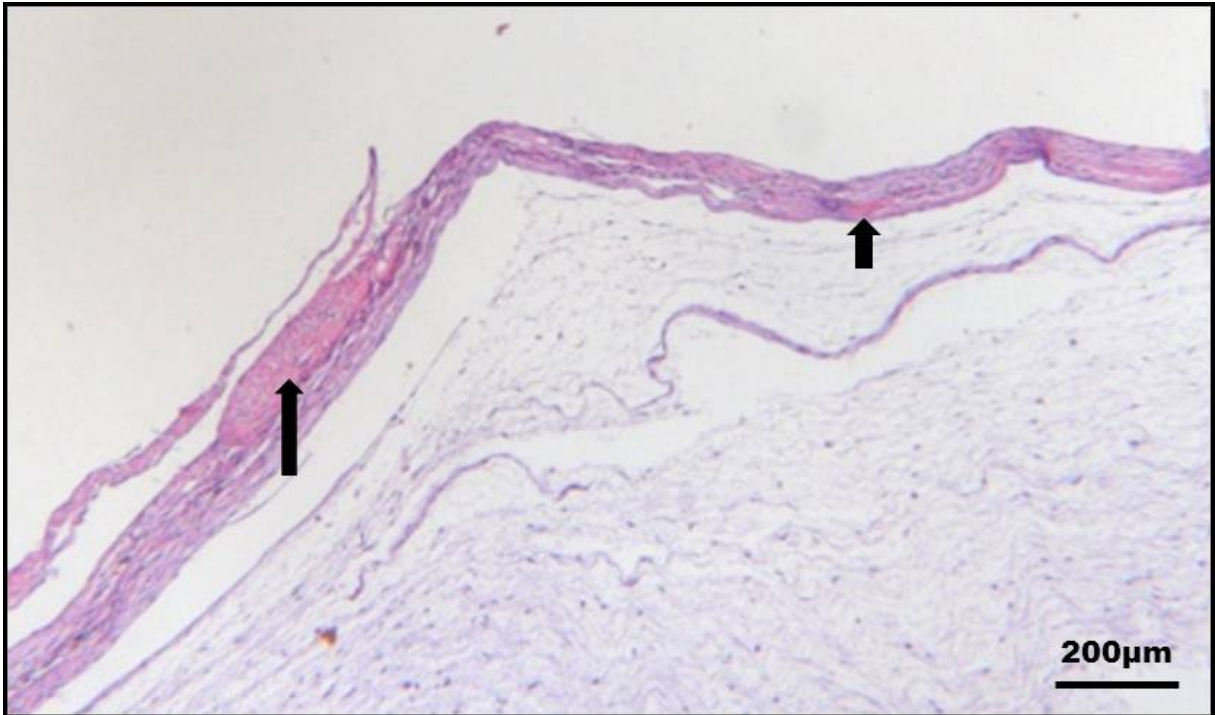


Figura 30 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com 6,3 mg de RSr aos 90 dias: Presença de tecido conjuntivo mais fibroso na área do CSD e ilhas de neoformação óssea (seta grande) ou condensações sugestivas de tecido osteoide (seta pequena). HE x 100.

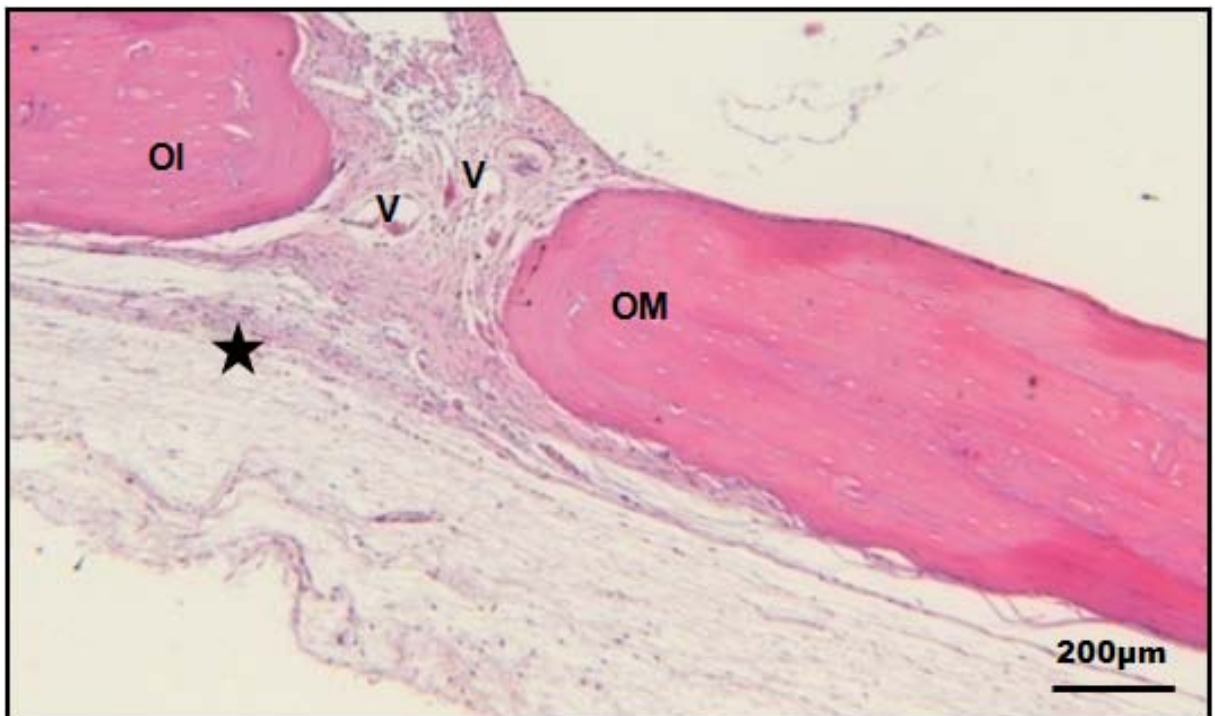


Figura 31 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com RSr 6,3 mg aos 120 dias: Formação mais estável nas bordas com a presença de tecido ósseo de aspecto maduro (OM). Tecido conjuntivo fibroso e vascularizado com zonas de formação óssea na área do CSD (OI). Leve infiltrado leucocitário HE x 100.

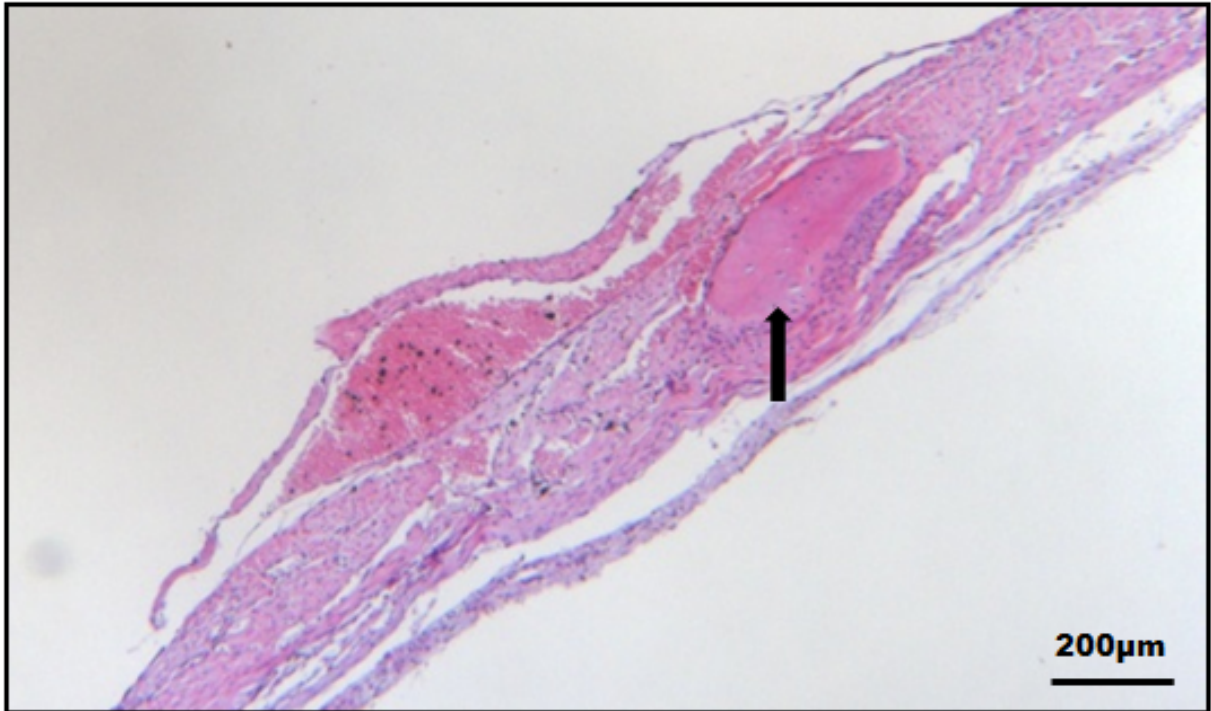


Figura 32 – Fotomicrografia em microscópio óptico da borda do CSD de calvária de animal tratado com 6,3 mg de Rsr aos 120 dias: Presença de tecido conjuntivo fibroso na área central do CSD e áreas de neoformação óssea (seta). HE x 100.

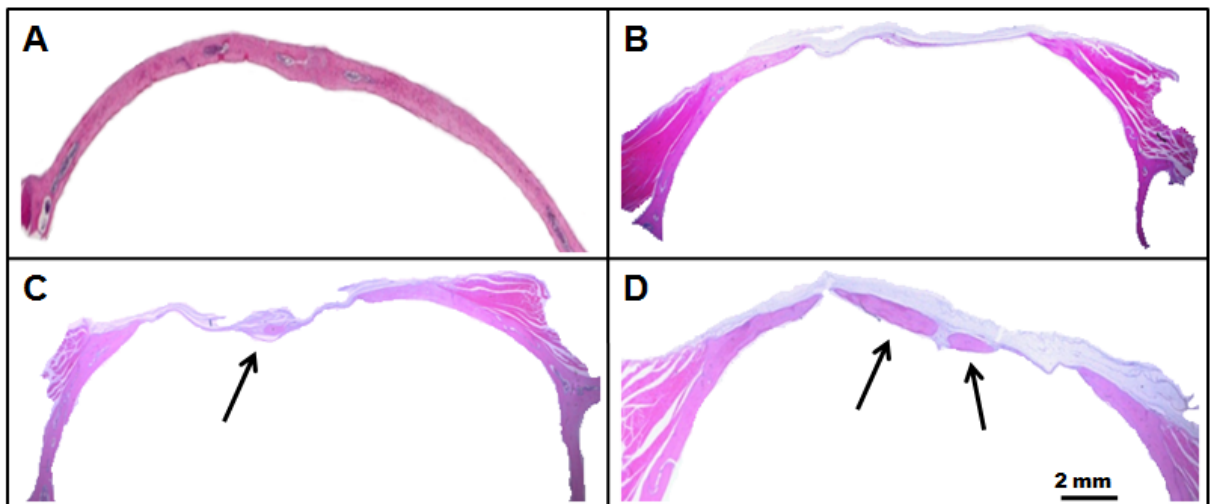


Figura 33 – Fotomicrografias de calvárias em estereomicroscópio: (A) calvária normal aos 120 dias; (B) calvaria CST aos 120 dias; (C) calvária Rsr (6,3 mg) aos 90 dias e (D) aos 120 dias. As setas representam áreas de neoformação óssea no centro do defeito. HE x 10.

As imagens obtidas em estereomicroscópio permitiram visualizar o CSD em toda a sua extensão. Verificou-se que os animais RSr (6,3 mg) apresentaram ilhas de osteoide e zonas de neoformação na área central do CSD aos 90 e 120 dias pós-cirúrgicos. Entretanto, o reparo completo do defeito não foi observado em todo o período experimental em nenhum dos grupos que receberam ou não RSr.

5.3 Análises imunohistoquímicas das calvárias para expressão de citocinas (OPG e RANKL) em animais normais, CST e tratados localmente com 6,3 mg de RSr

As análises imunohistoquímicas foram realizadas para investigar a participação de citocinas no processo de reparo ósseo do CSD. As análises foram realizadas no período máximo de experimentação (120 dias) e, em tecido da área central de calvária normais e nos grupos CST e no grupo RSr que apresentou resultados favoráveis ao reparo ósseo (6,3 mg).

Nos animais normais, a imunoexpressão tanto para OPG (Figura 34-A) e RANKL em osteoblastos (Figura 34-B) foi moderada e com intensidade similar. Nos animais do grupo CST, imunoexpressão em osteoblastos foi negativa para OPG (Figura 34-C) e positiva para RANKL (Figura 34-D). Com relação aos animais do grupo RSr (6,3mg), a imunoexpressão foi em osteoblastos foi positiva para OPG (Figura 34-E) e negativa para RANKL (Figura 34-F) quando comparada aos animais do grupo CST.

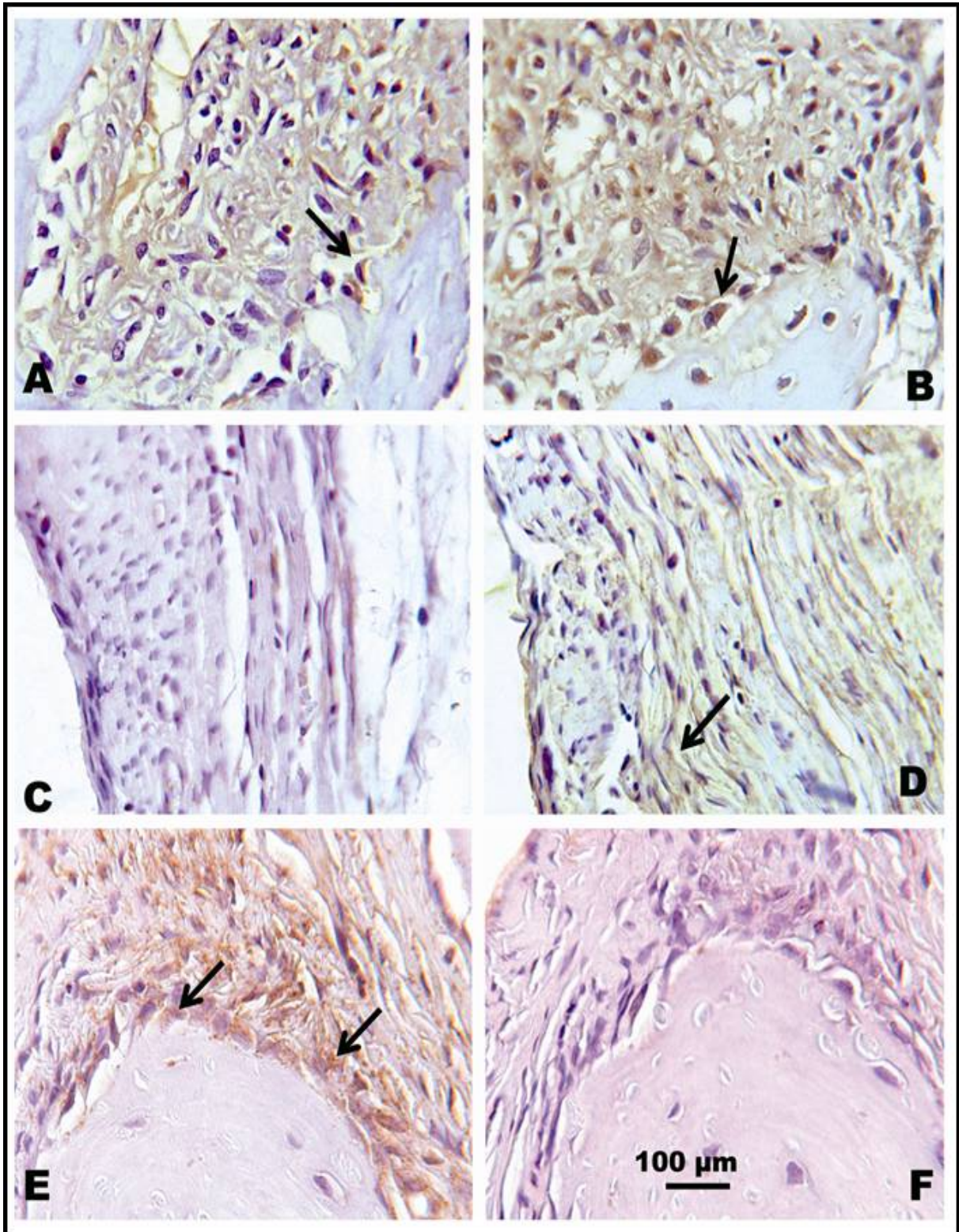


Figura 34 – Fotomicrografia da marcação de citocinas OPG e RANKL na área central do CSD em calvárias de animal normal, tratados com salina e com 6,3 mg de Rsr, após 120 de experimentação: A imunoreação em osteoblastos para OPG (A) e RANKL (B) foi moderada em calvárias normais enquanto que nos animais CST ela foi negativa para OPG (C) e positiva para RANKL (D). Nos animais tratados com 6,3 mg de Rsr ela foi positiva para OPG (E) e negativa para RANKL (F). Técnica de imunohistoquímica para detecção de OPG e RANKL (x 1000).

6 DISCUSSÃO

A reparação tecidual é um processo altamente especializado e dinâmico que depende da interação harmoniosa de vários componentes celulares (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; CLARKE, 2008). Ela é orquestrada por fatores que podem favorecer ou não tal processo. Esses fatores podem ser de natureza sistêmica, como alterações metabólicas e a idade, por exemplo, e por fatores locais como o tamanho da lesão (MACKIE, 2003).

Neste contexto, um importante foco das pesquisas desenvolvidas no âmbito da regeneração tecidual é a descoberta de novas abordagens farmacológicas que possam potencializar o reparo ósseo. Dessa forma, o presente estudo avaliou o efeito da aplicação local do RSr no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos. Até o presente, não foram encontradas pesquisas avaliando o efeito deste fármaco quando localmente aplicado em defeitos ósseos. Para este estudo, utilizou-se um modelo baseado na confecção de defeito ósseo crítico em ratos, consagrado na literatura (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; CHESMEL *et al.*, 1998; MARINS *et al.*, 2004; ROLIM, 2010). Tal modelo proporciona vantagens como fácil acesso e exposição de área óssea. No entanto, a presença de estruturas anatômicas nobres como a veia central, a dura-máter e o encéfalo logo abaixo da sutura sagital, e a convexidade da calvária exigem um cuidado técnico adicional no protocolo cirúrgico.

No presente estudo, o uso da TCCB permitiu quantificar a área do CSD induzidos em calvária de ratos nos animais imediatamente sacrificados (0 hora), salina e tratados com RSr. Observou-se que a área do CSD das calvárias dos animais do grupo controle sem tratamento (CST) não apresentaram, aos 45, 90 e 120 dias, áreas radiopacas sugestivas de neoformação óssea no centro do CSD ou a redução significativa da área em relação aos animais 0 hora. Por outro lado, os animais do grupo 6,3 mg RSr, aos 90 e 120 dias de experimentação, apresentaram redução significativa da área do defeito quando comparadas aos defeitos realizados nas calvárias de animais 0 hora, mas não em relação ao CST. Nestes animais, áreas radiopacas sugestivas de formação óssea foram observadas aos 120 dias. Em animais tratados com RSr 2,1 mg, o mesmo efeito não foi observado.

No que se refere à análise histopatológica das calvárias, de acordo com estudos anteriores sobre o modelo de indução de defeitos em calvária de ratos,

defeitos confeccionados com trefina de 8 mm de diâmetro externo geram uma lesão óssea com dimensões suficientes para limitar a sua regeneração espontânea (TAKAGI; URIST, 1982; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

De fato, no presente estudo, verificou-se que os animais do grupo CST não apresentaram reparo ósseo dos defeitos de 8 mm, mesmo até 120 dias de observação, condizente com a literatura, no que se refere ao reparo de defeitos críticos, em calvárias de ratos (TAKAGI; URIST, 1982; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; HONMA *et al.*, 2008). Aos 15 dias, foi observada neoformação óssea nas bordas do defeito com presença marcante de osteoblastos ativos e um tecido conjuntivo moderadamente vascularizado, ocupando a área central do defeito (TAKAGI; URIST, 1982; MARINS *et al.*, 2004; ROLIM, 2010). Nos demais períodos de observação, a neoformação óssea evoluiu de forma moderada e centrípeta restrita às bordas, e a área central do CSD preenchida por um tecido conjuntivo de espessura e vascularização variável.

Com relação aos grupos tratados localmente com RSr, as concentrações testadas foram estimadas com base nos parâmetros farmacológicos obtidos a partir de estudos anteriores realizados com relação à administração sistêmica do RSr considerando que não foram encontrados, até então, estudos que avaliassem o efeito do RSr quando de aplicação local. Nestes estudos, o RSr administrado na dose de 625 mg/kg/dia em ratos, via sistêmica, apresentou um efeito positivo sobre a formação óssea (MARIE *et al.*, 1993; DAHL *et al.*, 2001; AMMANN *et al.*, 2004; MARIE, 2008; LI *et al.*, 2010; LIMA, 2010).

Corroborando com a análise macroscópica, após 90 dias de experimentação, a análise histológica mostrou que o tratamento com o RSr induziu à neoformação óssea de forma significativa apenas quando a maior concentração (6,3 mg) foi utilizada. Todavia, a aplicação local de RSr na concentração de 2,1 mg não produziu efeito semelhante, nem aos 120 dias. Os dados obtidos a partir dos escores histológicos indicam que, nessa concentração menor de RSr, as alterações histológicas como a reparação óssea restrita às bordas do CSD foram semelhantes àquelas descritas para os animais do grupo CST nos diferentes tempos observados.

Por outro lado, os resultados obtidos indicam que o tratamento local dos defeitos com 6,3 mg de RSr foi capaz de induzir neoformação tanto em nível das bordas quanto em área central. Aos 15 dias de experimentação, as calvárias dos animais RSr 6,3 mg apresentaram um moderado infiltrado leucocitário e presença de

osso imaturo tipo osteoide nas bordas, somado à presença de numerosos osteoblastos. A área central do defeito mostrou-se preenchida por tecido conjuntivo moderadamente vascularizado. Aos 90 e 120 dias, o infiltrado leucocitário se apresentou reduzido, osteoblastos e osteócitos estavam presentes, e a região interna do defeito exibia um tecido conjuntivo vascularizado, com a presença de condensações celulares compatíveis com tecido osteoide e zonas de neoformação óssea de tamanho e quantidade variável. Estes achados histológicos do processo de reparo ósseo dos defeitos induzidos nas calvárias dos animais do grupo RSr 6,3 mg observado no presente estudo, se assemelham àqueles obtidos com a aplicação local agentes de osteoindutores como a BMP (TAKAGI; URIST, 1982), osso bovino (MARINS *et al.*, 2004); microesferas de alginato dopadas com nitrato de estrôncio (ROLIM, 2010) fármacos com ação antirreabsortiva como a sinvastatina (NYAN *et al.*, 2007; CALIXTO *et al.*, 2011) ou alendronato (TOKER *et al.*, 2012).

O efeito do RSr sobre a formação óssea está em concordância com relatos encontrados na literatura que demonstraram que, em cultura de células, o RSr é capaz de estimular a proliferação de pré-osteoblastos, ativar a diferenciação de osteoblastos e promover a mineralização da matriz (BARBARA *et al.*, 2004; BONNELYE *et al.*, 2008) ou a apoptose de osteoclastos (HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009; MARIE; FELSENBERG; BRANDI, 2011).

Da mesma forma, evidências em estudos em animais (DELANNOY; BAZOT; MARIE, 2002; AMMANN *et al.*, 2004; BAIN *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010; OZTURAN *et al.*, 2011) e em ensaios clínicos randomizados, multicêntricos (MEUNIER *et al.*, 2004; REGINSTER *et al.*, 2005; BRUYERE *et al.*, 2007) sugerem que a administração sistêmica aumenta a densidade mineral e a microarquitetura ósseas e acelera a consolidação de fraturas. Por outro lado, não foram encontrados, até então, estudos que avaliassem o efeito do RSr quando localmente aplicado em CSD de 8 mm em calvária de ratos.

Na presente pesquisa, o uso da TCCB e da análise histopatológica ofereceu vantagens uma vez que estas duas metodologias foram complementares: Na TCCB, foram avaliados tecidos ainda não descalcificados enquanto que a histopatologia analisou tecidos já descalcificados. Entretanto, se por um lado a análise quantitativa dos tecidos ainda não processados, por meio da TCCB, minimizou o risco de alterações dimensionais, por outro, não foi capaz de captar a neoformação óssea em sua fase inicial. De fato, quando se avaliou CSD em

calvárias por meio da TCCB, aos 45 dias, tratadas ou não com RSr, não foi possível verificar quaisquer sinais de osso neoformado. Imagens sugestivas de neoformação óssea em borda e centro do CSD só foram captadas pela TCCB aos 90 e 120 dias, com diferenças significativas em relação aos animais do grupo 0 hora, mas não, em relação ao grupo CST.

Por outro lado, em nível histológico, observou-se que, desde os 15 dias, o RSr foi capaz de induzir neoformação óssea em bordas, dada a presença de tecido ósseo imaturo tipo osteoide e numerosos osteoblastos e, aos 90 e 120 dias, foram observadas diferenças significativas em relação aos animais CST. Estudos anteriores realizados em calvária de ratos evidenciaram que quantidades tênues de osso não são perceptíveis pelas análises radiográficas (PRYOR; SUSIN; WIKESJÖ, 2006; LIMA; CALIXTO; ANBINDER, 2011). Segundo estes estudos, para a avaliação de defeitos em calvária de ratos, a radiografia não deve ser usada como único método de avaliação por apresentar um nível de acurácia reduzido, em comparação à análise histológica, esta considerada “padrão ouro” para a avaliação de detalhes como neoformação óssea ainda em uma fase bastante sutil (PRYOR; SUSIN; WIKESJÖ, 2006; LIMA; CALIXTO; ANBINDER, 2011). Estes dados permitiram explicar por que os resultados macroscópicos e histopatológicos obtidos foram, aparentemente, conflitantes.

Vale ressaltar que apesar desta limitação, a técnica da TCCB possibilitou uma medição confiável das áreas dos defeitos induzidos nos animais 0 h, CST e RSr 6,3 mg, revelando com segurança que os animais tratados com 6,3 mg de RSr, aos 90 e 120 dias, apresentaram uma redução da área do defeito. Além disso, esses resultados foram confirmados em nível histológico.

Com relação ao mecanismo de ação do RSr, estudos anteriores puderam demonstrar que ele ocorre por meio da ativação de várias vias que atuam na modulação da diferenciação, atividade e sobrevivência de osteoblastos e osteoclastos (MARIE, 2010; BRENNAN *et al.*, 2009; FROMIGUÉ *et al.*, 2009). Uma destas vias é o sistema RANK/RANKL/OPG. Estudos *in vitro* verificaram que o RSr promoveu o aumento da produção de OPG e reduzir a expressão de RANKL sugerindo que este fármaco é capaz de reduzir a reabsorção óssea favorecer a neoformação através da modulação desta via (BRENNAN *et al.*, 2009; FROMIGUÉ *et al.*, 2009; MARIE; FELSEBERG; BRANDI, 2011).

Dentro desse contexto, achou-se interessante verificar se o efeito positivo na formação óssea observado no presente estudo com o tratamento local com o RSr ocorreram via modulação da via RANK/RANKL/OPG. De fato, os resultados imunohistoquímicos do presente estudos estão condizentes com os relatos da literatura quanto a sinalização da via RANK/RANKL/OPG pelo RSr (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007; BRENNAN *et al.*, 2009; FROMIGUÉ *et al.*, 2009; CAUDRILLIER *et al.*, 2010).

Os animais que receberam 6,3 mg de RSr e tiveram seus CDS avaliados após 120 dias de experimentação apresentaram intensa marcação para OPG, enquanto mínima para RANKL, quando comparado ao grupo CST, no mesmo período experimental. A OPG é uma proteína solúvel produzida por osteoblastos e células precursoras. Uma de suas ações é agir como um competidor de alta afinidade pelo receptor de RANKL, de forma a impedir a ligação do RANKL com o receptor RANK presente em osteoclastos e inibir a osteoclastogênese (BOYCE; XING, 2008; SINGH *et al.*, 2012). Portanto, a razão OPG/RANKL é altamente utilizada como um marcador biológico do metabolismo ósseo estando equilibrada nas situações de normalidade (BAUD'HUIN *et al.*, 2007).

Em suma, os resultados obtidos no conjunto da tese sugerem que a aplicação local de 6,3 mg de RSr favoreceu a reparação óssea local de CSD induzidos em calvária de ratos após 120 dias, reduzindo, assim, a área do CSD. Portanto, pode-se sugerir, como hipótese, que a agressão tecidual causada pela indução do CSD na calvária dos animais promoveu um processo inflamatório acompanhado de alterações vasculares e celulares. Em nível celular, a liberação de mediadores químicos, especialmente citocinas pró-inflamatórias sinalizaram células mesenquimais precursoras de osteoblastos presentes no periósteo e na medula óssea, atraindo-as para o local do CSD e ativaram a diferenciação dessas células em osteoblastos.

Nesse contexto, os resultados do presente estudo sugerem que a aplicação local do RSr no CSD exerceu um efeito osteoindutivo favorecendo a formação óssea na área do defeito através do aumento da expressão de OPG em osteoblastos. O RSr também foi capaz de inibir em osteoblastos a expressão de RANKL, o que pode ter causado um efeito desfavorável à diferenciação e à atividade de osteoclastos, apresentando, assim, um efeito antirreabsortivo. A Figura 35 a

seguir ilustra um modelo teórico da participação do RSr no processo de reparo ósseo do CSD em calvária de ratos.

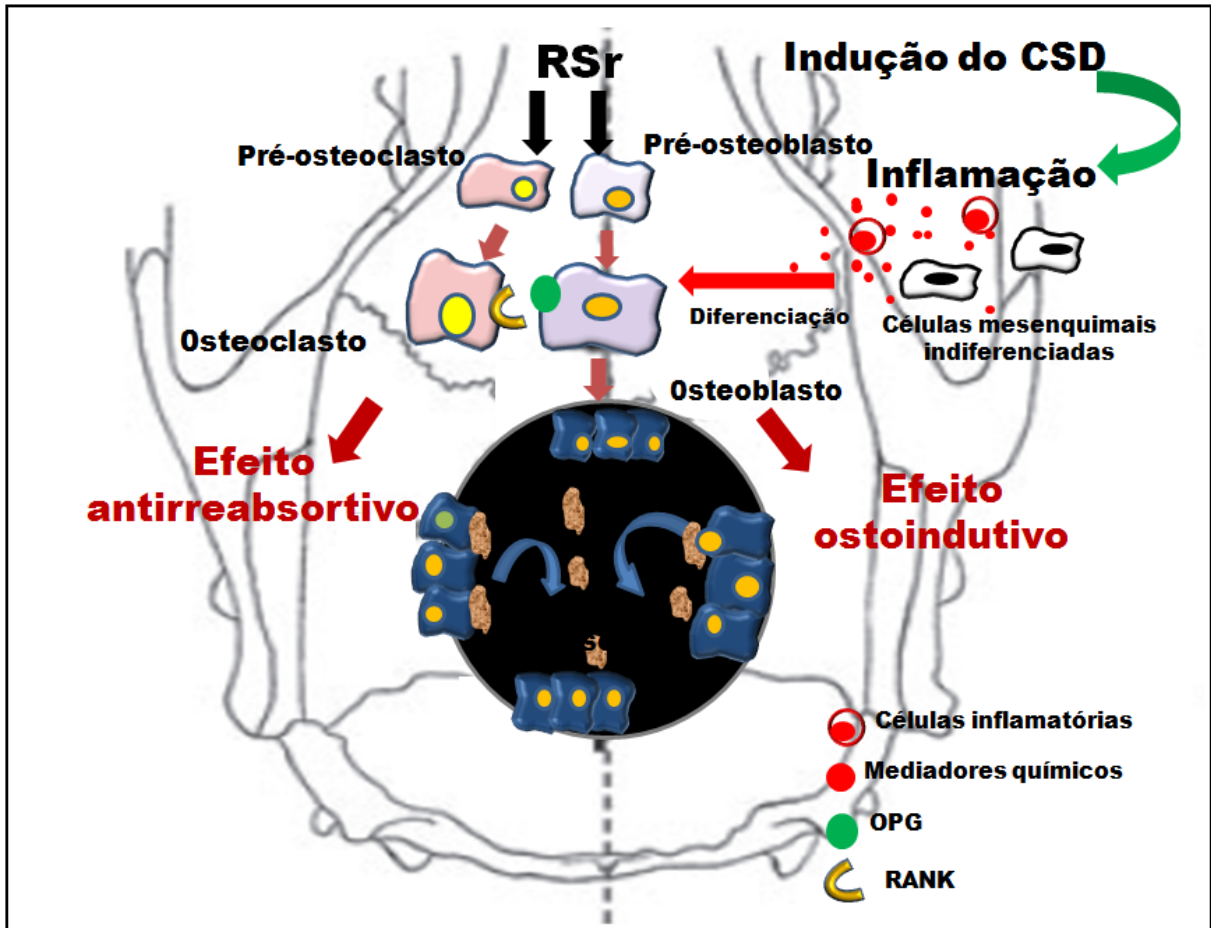


Figura 35 – Modelo teórico representativo do mecanismo de ação do RSr em defeitos de tamanho crítico induzidos na calvária de ratos: A indução do CSD determinou a instalação de um processo inflamatório. A liberação de mediadores químicos pelas células inflamatórias ativou a migração de células mesenquimais indiferenciadas presentes no perióstio e medula para o local as quais se diferenciam em pré-osteoblastos. A aplicação do RSr ativou em pré-osteoblastos a atividade, proliferação, diferenciação e a expressão de OPG e inibiu a apoptose a expressão de RANKL favorecendo a formação de osso. Em pré-osteoclastos, a aplicação local do RSr inibiu a proliferação e diferenciação e ativou a apoptose de osteoclastos.

Tendo em vista os objetivos propostos deste estudo, suas limitações e os resultados obtidos, considerou-se que futuras investigações necessitam ser conduzidas associando a aplicação local do RSr a sistemas de liberação controlada de fármacos, por exemplo.

Como perspectiva futura, acredita-se que melhores resultados possam ser obtidos se a aplicação local do fármaco for associada a um sistema de liberação lenta capaz de permitir uma concentração local efetiva e, dessa forma, prolongar o efeito terapêutico do RSr.

7 CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo permitem concluir que:

- A aplicação local de 6,3 mg de RSr promoveu uma redução da área do CSD como demonstrado pela análise macroscópica por meio de TCCB;
- A aplicação local de 6,3 mg de RSr favoreceu a reparação óssea de CSD induzidos na calvária de ratos após 120 dias através de um efeito osteoindutivo como verificado na análise histológica pela presença de neoformação óssea nas margens e centro do defeito; e
- A aplicação local de 6,3 mg de RSr promoveu em osteoblastos um aumento da expressão de OPG enquanto reduziu a de RANKL, como demonstrado pela análise imunohistoquímica indicando um efeito local osteoindutivo e antirreabsorativo.

REFERÊNCIAS

- AALAMI, O. O.; NACAMULI, R. P.; LENTON, K. A.; COWAN, C. M.; FANG, T. D.; FONG, K. D.; SHI, Y. Y.; SONG, H. M.; SAHAR, D. E.; LONGAKER, M. T. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. **Plast Reconstr Surg**, v. 114, n. 3, p. 713-720, sep 2004.
- AMMANN, P.; BADOUD, I.; BARRAUD, S.; DAYER, R.; RIZZOLI, R. Strontium ranelate treatment improves trabecular and cortical intrinsic bone tissue quality, a determinant of bone strength. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 9, p. 1419-1425, sep 2007.
- AMMANN, P.; SHEN, V.; ROBIN, B.; MAURAS, Y.; BONJOUR, J. P.; RIZZOLI, R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. **J Bone Miner Res**, v. 19, n. 12, p. 2012-2020, dec 2004.
- ANANDARAJAH, A. P. Role of RANKL in bone diseases. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 2, p. 88-94, mar 2009.
- ANDERSON, H. C. Matrix vesicles and calcification. **Curr Rheumatol Rep**, v. 5, n. 2, p. 222-226, jun 2003.
- ANDREASSEN, T. T.; CACCIAFFESTA, V. Intermittent parathyroid hormone treatment enhances guided bone regeneration in rat calvarial bone defects. **J Craniofac Surg**, v. 15, p. 424-429, may 2004.
- ARLOT, M. E.; JIANG Y.; GENANT, H. K.; ZHAO, J.; BURT-PICHAT, B.; ROUX, J. P.; DELMAS, P. D.; MEUNIER, P. J. Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. **J Bone Miner Res**, v. 23, n. 2, p. 215-222, feb 2008.
- ATKINS, G. J.; WELLDON, K. J.; HALBOUT, P.; FINDLAY, D. M. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. **Osteoporos Int**, v. 20, n. 4, p. 653-664, apr 2009.
- 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, n. 8, p. 1417-1428, aug 2009.
- BARBARA, A.; DELANNOY, P.; DENIS, B. G.; MARIE, P. J. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. **Metabolism**, v. 53, n. 4, p. 532-537, apr 2004.
- BARON, R.; TSOUDEROS, Y. In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. **Eur J Pharmacol**, v. 450, n. 1, p. 11-17, aug 2002.

BAUD'HUIN, M.; LAMOUREUX, F.; DUPLOMB, L.; RÉDINI, F.; HEYMANN, D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, n. 18, p. 2334-50, sep 2007.

BLAIR, H. C.; ATHANASOU, N. A. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. **Histol Histopathol**, v. 19, n. 1, p. 189-99, jan 2004.

BLAKE, G. M.; COMPSTON, J. E.; FOGELMAN, I. Could strontium ranelate have a synergistic role in the treatment of osteoporosis? **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 8, p. 1354-1357, aug 2009.

BOLANDER, M. E. Regulation of fracture repair by growth factors. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 200, n. 2, p. 165-170, jun 1992.

BONEWALD, L. F.; JOHNSON, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 606-615, apr 2008.

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

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg**, v. 9, n. 4, p. 310-316, jul 1998.

BOSTANCI, N.; ILGENLI, T.; EMINGIL, G.; AFACAN, B.; HAN, B.; TÖZ, H.; ATILLA, G.; HUGHES, F. J.; BELIBASAKIS, G. N. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. **J Clin Periodontol**, v. 34, n. 5, p. 370-376, may 2007.

BOYCE, B. F.; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Res Ther**, v. 9, suppl. 1, p. 1, 2007.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 139-146, may 2008.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, may 2003.

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

BRENNAN, T.C.; RYBCHYN, M. S.; HALBOUT, P.; CONIGRAVE, A. D.; MASON, R. S. Strontium ranelate effects in human osteoblasts support its uncoupling effect on bone formation and bone resorption. **J Bone Miner Res**, v. 22, p. M014, 2007.

BROWN, E. M.; MACLEOD, R. J. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. **Physiol Rev**, v. 81, n. 1, p. 239-297, jan. 2001.

BRUYERE, O.; ROUX, C.; DETILLEUX, J.; SLOSMAN, D. O.; SPECTOR, T. D.; FARDELLONE, P.; BRIKEN, K.; DEVOGELAER, J. P.; DIAZ-CURIEL, M.; ALBANESE, C.; KAUFMAN, J. M.; PORS-NIELSEN, S.; REGINSTER, J. Y. Relationship between bone mineral density changes and fracture risk reduction in patients treated with strontium ranelate. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 9, n. 8, p. 3076-3081, aug 2007.

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.

CALIXTO, J. C.; LIMA, C. E.; FREDERICO, L.; LIMA, R. P.; ANBINDER, A. L. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 39, n. 3, p. 215-220, apr 2011.

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

CHAMBERS, T. J. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. **J Pathol**, v. 192, n. 1, p. 4-13, sep 2000.

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

CHEMEL, K. D.; BRANGER, J.; WERTHEIM, H.; SCARBOROUGH, N. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v.56, n. 7, p. 857-863, jul 1998.

CHO, T. J.; GERSTENFELD, L. C.; BARNES, G. L.; EINHORN, T. A. Cytokines and fracture healing. **Curr Opin Orth**, v. 12, n. 5, p. 403-408, oct 2001.

CHOUDHARY, S.; HALBOUT, P.; ALANDER, C.; RAISZ, L.; PILBEAM, 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, jul 2007.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, suppl. 3, p. 131-139, nov 2008.

COLOMBIER, M. L.; LESCLOUS, P.; TUSLANE, J. F. La cicatrisation des greffes osseuses. **Rev Stomatol Chir Maxillofac**, v. 106, n. 3, p. 157-165, jun 2005.

COULOMBE, J.; FAURE, H.; ROBIN, B.; RUAT, M. *In vitro* effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 323, n. 4, p. 1184-1190, oct 2004.

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, apr 2001.

DAI, J. C.; HE, P.; CHEN, X.; GREENFIELD, E. M. TNF α and PTH utilize distinct mechanisms to induce IL-6 and RANKL expression with markedly different kinetics. **Bone**, v. 38, n. 4, p. 509-520, apr 2006.

DALLAS, S. L.; BONEWALD, L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1192, p. 437-443, mar 2010.

DELAISSÉ, J. M.; ANDERSEN, T. L.; ENGSIG, M. T.; HENRIKSEN, K.; TROEN, T.; BLAVIER, L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. **Microsc Res Tech**, v. 61, n. 6, p. 504-513, aug 2003.

DELANNOY, P.; BAZOT, D.; MARIE, P. J. Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. **Metabolism**, v. 51, n. 7, p. 906-911, jul 2002.

DESCHASEAUX, F.; SENSÉBÉ, L.; HEYMANN, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. **Trends Mol Med**, v. 15, n. 9, p. 417-429, sep 2009.

DOUBLIER, A.; FARLAY, D.; KHEBBAB, M. T.; JAURAND, X.; MEUNIER, P. J.; BOIVIN, G. Distribution of strontium and mineralization in iliac bone biopsies from osteoporotic women treated long-term with strontium ranelate. **Eur J Endocrinol**, v. 165, n. 3, p. 469-476, sep. 2011.

EGHBALI-FATOURECHI, G.; KHOSLA, S.; SANYAL, A.; BOYLE, W. J.; LACEY, D. L.; RIGGS, B. L. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. **J Clin Invest**, v. 111, n. 8, p. 1221-1230, apr 2003.

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

_____. The science of fracture healing. **J Orthop Trauma**, v. 19, 10 suppl, p. 4-6, nov-dec 2005.

EPKER, B. N.; FROST, H. M. Correlation of bone resorption and formation with the physical behavior of loaded bone. **J Dent Res**, v. 44, p. 33-41, jan-feb 1965.

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

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Questions and answers on the review of Protelos and Osseor (strontium ranelate)**. 15/03/2012. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/medicine_qa/2012/03/wc500124208.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2013.

EVERTS, V.; DELAISSE, J. M.; KORPER, W.; JANSSEN, D. C.; TIGCHELAAR-GUTTER, W.; SAFTIG, P.; BEERTSEN, W. The bone lining cell: its role in cleaning

Howship's lacunae and initiating bone formation. **J Bone Miner Res**, v. 17, n. 1, p. 77-90, jan 2002.

FARLAY, D.; BOIVIN, G.; PANCZER, G.; LALANDE, A.; MEUNIER, P. J. Long-term strontium ranelate administration in monkeys preserves characteristics of bone mineral crystals and degree of mineralization of bone. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 9, p. 1569-1578, sep 2005.

FILVAROFF, E. H. VEGF and bone. **J Musculoskel Neuron Interact**, v. 3, n. 4, p. 304-307, aug 2003.

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, aug 2009.

FUCHS, R. K.; ALLEN, M. R.; CONDON, K. W.; REINWALD, S.; MILLER, L. M.; MCCLENATHAN, D.; KECK, B.; PHIPPS, R. J.; BURR, D. B. Strontium ranelate does not stimulate bone formation in ovariectomized rats. **Osteoporos Int**, v. 19, n. 9, p. 1331-1341, sep 2008.

GEOFFROY, V.; CHAPPARD, D.; MARTY, C.; LIBOUBAN, H.; OSTERTAG, A.; LALANDE, A.; VERNEJOUL, M. C. Strontium ranelate decreases the incidence of new caudal vertebral fractures in a growing mouse model with spontaneous fractures by improving bone microarchitecture. **Osteoporos Int**, v. 22, n. 1, p. 289-297, jan 2011.

GOSAIN, A. K.; SONG, L.; YU, P.; MEHRARA, B. J.; MAEDA, C. Y.; GOLD, L. I.; LONGAKER, M. T. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. **Plast Reconstr Surg**, v. 106, n. 2, p. 360-371, aug 2000.

HA, H.; LEE, J. H.; KIM, H. N.; KIM, H. M.; KWAK, H. B.; LEE, S.; KIM, H. H.; LEE, Z. H. Alpha-Lipoic acid inhibits inflammatory bone resorption by suppressing prostaglandin E2 synthesis. **J Immunol**, v. 176, n. 1, p. 111-117, jan 2006.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1092, p. 385-396, dec. 2006.

HENRIKSEN, K.; NEUTZSKY-WULFF, A. V.; BONEWALD, L. F.; KARSDAL, M. A. Local communication on and within bone controls bone remodeling. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1026-1033, jun 2009.

HOCK, J. M.; CENTRELLA, M.; CANALIS, E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. **Endocrinology**, v. 122, n. 1, p. 254-260, jan 1988.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **J Craniofac Surg**, v. 1, n. 1, p. 60-68, jan 1990.

HONMA, T.; ITAGAKI, T.; NAKAMURA, M.; KAMAKURA, S.; TAKAHASHI, I.; ECHIGO, S.; SASANO, Y. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Dis**, v. 14, n. 5, 457-464, jul 2008.

HORCH, H. H.; SADER, R.; PAUTKE, C.; NEFF, A.; DEPPE, H.; KOLK, A. Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 35, n. 8, p. 708-713, aug 2006.

HOTT, M.; DELOFFRE, P.; TSOUDEROS, Y.; MARIE, P. J. S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. **Bone**, v. 33, n. 1, p. 115-123, jul 2003.

HUH, J. Y.; CHOI, B. H.; KIM, B. Y.; LEE, S. H.; ZHU, S. J.; JUNG, J. H. Critical size defect in the canine mandible. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 100, n. 3, p. 296-301, sep 2005.

HURTEL-LEMAIRE, A. S.; MENTAVERRI, R.; CAUDRILLIER, A.; COURNARIE, F.; WATTEL, A.; KAMEL, S.; TERWILLIGER, E. F.; BROWN, E. M.; BRAZIER, M. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 284, n. 1, p. 575-584, jan 2009.

JENSEN, E. D.; GOPALAKRISHNAN, R.; WESTENDORF, J. J. Regulation of gene expression in osteoblasts. **Biofactors**, v. 36, n. 1, p. 25-32, jan-feb 2010.

JIMI, E.; NAKAMURA, I.; AMANO, H.; TAGUCHI, Y.; TSURUKAI, T.; TAMURA, M.; TAKAHASHI, N.; SUDA, T. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 2187-2190, may 1996.

KAMEDA, T.; MANO, H.; YAMADA, Y.; TAKAI, H.; AMIZUKA, N.; KOBORI, M.; IZUMI, N.; KAWASHIMA, H.; OZAWA, H.; IKEDA, K.; KAMEDA, A.; HAKEDA, Y.; KUMEGAWA, M. Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts.; which are bone resorbing cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 245, n. 2, p. 419-422, apr 1998.

KANATANI, M.; SUGIMOTO, T.; KANZAWA, M.; YANO, S.; CHIHARA, K. High extracellular calcium inhibits osteoclast-like cell formation by directly acting on the calcium-sensing receptor existing in osteoclast precursor cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 261, n. 1, p. 144-148, jul 1999.

KANCZLER, J. M.; OREFFO, R. O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. **Eur Cell Mater**, v. 15, p. 100-114, may 2008.

KATOH, M.; KATOH, M. Wnt signaling pathway and stem cell signaling network. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 14, p. 4042-4045, jul 2007.

KEARNS, A. E.; KHOSLA, S.; KOSTENUK, P. J. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocr Rev**, v. 29, n. 2, p. 155-192, apr 2008.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050-5055, dec 2001.

KILIÇ, E.; OZEÇ, I.; YELER, H.; KORKMAZ, A.; AYAS, B.; GÜMÜŞ, C. Effects of simvastatin on mandibular distraction osteogenesis. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 11, p. 2233-2238, nov 2008.

KITAZAWA, S.; KAJIMOTO, K.; KONDO, T.; KITAZAWA, R. Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. **J Cell Biochem**, v. 89, n. 4, p. 771-777, jul 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins: patologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LACEY, D. L.; TIMMS, E.; TAN, H. L.; KELLEY, M. J.; DUNSTAN, C. R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; SCULLY, S.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y. X.; KAUFMAN, S.; SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; SENALDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 165-176, apr 1998.

LAVERNIA, C. J.; MALININ, T. I.; TEMPLE, H. T.; MOREYRA, C. E. Bone and tissue allograft use by orthopaedic surgeons. **J Arthroplasty**, v. 19, n. 4, p. 430-435, jun 2004.

LI, Y. F.; LUO, E.; FENG, G.; ZHU, S. S.; LI, J. H.; HU, J. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. **Osteoporos Int**, v. 21, n. 11, p. 1889-1897, nov 2010.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. **J Bone Joint Surg Am**, v. 84-A, n. 6, p. 1032-1044, jun 2002.

LIMA, A. P. S. **Atividades antirreabsortiva e anti-inflamatória do ranelato de estrôncio na periodontite induzida em ratos**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LIMA, C. E.; CALIXTO, J. C.; ANBINDER, A. L. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. **Braz Oral Res**, v. 25, n. 1, p. 42-48, jan-feb 2011.

LIU, J. M.; WAI-CHEE KUNG, A.; PHENG, C. S.; ZHU, H. M.; ZHANG, Z. L.; WU, Y. Y.; XU, L.; MENG, X. W.; HUANG, M. L.; CHUNG, L. P.; HUSSAIN, N. H.; SUFIAN, S. S.; CHEN, J. L. Efficacy and safety of 2 g/day of strontium ranelate in Asian women with postmenopausal osteoporosis. **Bone**, v. 45, n. 3, p. 460-465, sep 2009.

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 9, p. 1301-1305, sep 2003.

MAÏMOUN, L.; BRENNAN, T. C.; BADOUD, I.; DUBOIS-FERRIERE, V.; RIZZOLI, R.; AMMANN, P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. **Bone**, v. 46, n. 5, p. 1436-1441, may 2010.

MARIE, P. J. Effective doses for strontium ranelate. **Osteoporos Int**, v. 19, n. 12, p. 1813, dec 2008.

_____. Osteoporosis: a disease of bone formation. **Medicographia**, v. 32, n. 1, p. 10-16, oct 2010.

_____. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. **Osteoporos Int**, v. 16, suppl 1, p. 7-10, jan 2005.

_____. Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. **Bone**, v. 38, n. 2, p. 10-14, feb 2006.

_____. Strontium ranelate: new insights into its dual mode of action. **Bone**, v. 40, n. 5, p. 5-8, may 2007.

_____; FELSENBURG, D.; BRANDI, M. L. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 22, n. 6, p. 1659-1667, jun 2011.

MARIE, P. J.; HOTT, M.; MODROWSKI, D.; POLLAK, C.; GUILLEMAIN, J.; DELOFFRE, P.; TSOUDEROS, 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, may 1993.

MARINS, L. V.; CESTARI, T. M.; SOTTOVIA, A. D.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **J Appl Oral Sci**, v. 12, n. 1, p. 62-69, mar 2004.

MARZONA, L.; PAVOLINI, B. Play and players in bone fracture healing match. **Clin Cases Miner Bone Metab**, v. 6, n. 2, p. 159-162, may-aug 2009.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 201-209, may 2008.

MESSORA, M. R.; NAGATA, M. J.; DORNELLES, R. C.; BOMFIM, S. R.; FURLANETO, F. A.; MELO L. G.; DELIBERADOR, T. M.; BOSCO, AF.; GARCIA, VG.; FUCINI, S. E. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 6, p. 723-729, dec 2008.

MEUNIER, P. J.; ROUX, C.; SEEMAN, E.; ORTOLANI, S.; BADURSKI, J. E.; SPECTOR, T. D.; CANNATA, J.; BALOGH, A.; LEMMEL, E. M.; 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.; SLOSMAN, D. O.; DELMAS, P. D.; SEBERT, J. L.; BRANDI, M. L.; ALBANESE, C.; LORENC, R.; PORS-NIELSEN, S.; DE VERNEJOU, M. C.; ROCES, A.; REGINSTER, J. Y. Strontium Ranelate: Dose-Dependent Effects in Established Postmenopausal Vertebral Osteoporosis – A 2-Year Randomized Placebo Controlled Trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 5, p. 2060-2066, may 2002.

MOONEY, M. P.; SIEGEL, M. I. Animal models for bone tissue engineering of critical-sized defects (CSDs), bone pathologies, and orthopedic disease states. In: HOLLINGER, J. O.; EINHORN, T. A.; DOLL, B. A.; SFEIR, C (eds.). **Bone Tissue Engineering**. Boca Raton: CRC Press, 2005, p. 217-244.

NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G.; ZHANG, Z.; DENG, J. M.; BEHRINGER, R. R.; CROMBRUGGHE, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v. 108, n. 1, p. 17-29, jan 2002.

NYAN, M.; SATO, D.; ODA, M.; MACHIDA, T.; KOBAYASHI, H.; NAKAMURA, T.; KASUGAI, S. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. **J Pharmacol Sci**, v. 104, n. 4, p.384-386, aug 2007.

OZTURAN, K. E.; DEMIR, B.; YUCEL, I.; CAKICI, H.; YILMAZ, F.; HABERAL, A. Effect of strontium ranelate on fracture healing in the osteoporotic rats. **J Orthop Res**, v. 29, n. 1, p. 138-142, jan 2011.

PACIFICI, R. The immune system and bone. **Arch Biochem Biophys**, v. 503, n. 1, p. 41-53, nov 2010.

PÉREZ-SÁNCHEZ, M. J.; RAMÍREZ-GLINDON, E.; LLEDÓ-GIL, M.; CALVO-GUIRADO, J. L.; PÉREZ-SÁNCHEZ, C. Biomaterials for bone regeneration. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 3, p. 517-522, may 2010.

PORS-NIELSEN, S. The biological role of strontium. **Bone**, v. 35, n. 3, p. 583-588, sep 2004.

PROFF, P.; RÖMER, P. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. **Clin Oral Investig**, v. 13, n. 4, p. 355-362, dec 2009.

PRYOR, M. E.; SUSIN, C.; WIKESJÖ, U. M. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. **J Clin Periodontol**, v. 33, p. 6, p. 455-460, jun 2006.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **J Biol Chem**, v. 285, n. 33, p. 25103-25108, aug 2010.

RAO, T. P.; KÜHL, M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. **Circ Res**, v. 106, n. 12, p. 1798-1806, jun 2010.

RECKER, R. R.; MARIN, F.; ISH-SHALOM, S.; MÖRICKE, R.; HAWKINS, F.; KAPETANOS, G.; PEÑA, M. P.; KEKOW, J.; FARRERONS, J.; SANZ, B.; OERTEL, H.; STEPAN, J. Comparative effects of teriparatide and strontium ranelate on bone biopsies and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 8, p. 1358-1368, aug 2009.

REGINSTER, J. Y.; SEEMAN, E.; VERNEJOU, M. C.; ADAMI, S.; COMPSTON, J.; PHENEKOS, C.; DEVOGELAER, J. P.; CURIEL, M. D.; SAWICKI, A.; GOEMAERE, S.; SORENSEN, O. H.; FELSEMBERG, 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, may 2005.

RIFAS, L.; WEITZMANN, M. N. A novel T cell cytokine, secreted osteoclastogenic factor of activated T cells, induces osteoclast formation in a RANKL-independent manner. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 11, p. 3324-3335, nov 2009.

RIZZOLI, R.; LAROCHE, M.; KRIEG, M. A.; FRIELING, I.; THOMAS, T.; DELMAS, P.; FELSEMBERG, D. Strontium ranelate and alendronate have differing effects on distal tibia bone microstructure in women with osteoporosis. **Rheumatol Int**, v. 30, n. 10, p. 1341-1348, aug 2010.

ROBINSON, J. A.; CHATTERJEE-KISHORE, M.; YAWORSKY, P. J.; CULLEN, D. M.; ZHAO, W.; LI, C.; KHARODE, Y.; SAUTER, L.; BABIJ, P.; BROWN, E. L.; HILL, A. A.; AKHTER, M. P.; JOHNSON, M. L.; RECKER, R. R.; KOMM, B. S.; BEX, F. J. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. **J Biol Chem**, v. 281, n. 42, p. 31720-31728, oct 2006.

ROCHA, F. S.; RAMOS, L. M. A.; BATISTA, J. D.; ZANETTA-BARBOSA, D.; DECHICHI, P. Enxerto bovino orgânico associado ao PRP em calvária de coelhos. **Arq Int Otorrinolaringol**, v. 15, n. 2, p. 208-213, abr./jun. 2011.

ROLIM, A. E. H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito crítico, em calvária de rato**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

ROSCHGER, P.; PASCHALIS, E. P.; FRATZL, P.; KLAUSHOFER, K. Bone mineralization density distribution in health and disease. **Bone**, v. 42, n. 3, p. 456-466, mar 2008.

RUTLEDGE, J.; SCHIEBER, M. D.; CHAMBERLAIN, J. M.; BYARLAY, M.; KILLEEN, A. C.; GIANNINI, P. J.; MARX, D. B.; REINHARDT, R. A. Simvastatin application to augment facial jaw bone in a dog model: pilot study. **J Periodontol**, v. 82, n. 4, p. 597-605, apr 2011.

SANTAMARIA JÚNIOR, M.; FRACALOSSO, A. C. C.; CONSOLAROI, M. F. M. O.; CONSOLARO, A. Influence of bisphosphonates on alveolar bone density: a histomorphometric analysis. **Braz Oral Res**, v. 24, n. 3, p. 309-315, jul-sep 2010.

SHELLER, E. L.; KREBSBACH, P. H.; KOHN, D. H. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. **J Oral Rehabil**, v. 36, n. 5, 368-389 may 2009.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, v. 205, p. 299-308, apr 1986.

SEEMAN, E. Osteocytes-martyrs for integrity of bone strength. **Osteoporos Int**, v. 17, n. 10, p. 1443-1448, oct 2006.

SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; KELLEY, M.; CHANG, M. S.; LÜTHY, R.; NGUYEN, H. Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H. L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T. M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309-319, apr 1997.

SINGH, A.; MEHDI, A. A.; SRIVASTAVA, R. N.; VERMA, N. S. Immunoregulation of bone remodelling. **Int J Crit Illn Inj Sci**, v. 2, n. 2, p. 75-81, may 2012.

SOLTAN, M.; SMILER, D.; CHOI, J. H. Bone marrow: orchestrated cells, cytokines, and growth factors for bone regeneration. **Implant Dent**, v. 18, n. 2, p. 132-141, apr 2009.

SROUJI, S.; BLUMENFELD, I.; RACHMIEL, A.; LIVNE, E. Bone defect repair in rat tibia by TGF-beta1 and IGF-1 released from hydrogel scaffold. **Cell Tissue Bank**, v. 5, n. 4, p. 223-230, 2004.

STEPHAN, S. J.; THOLPADY, S. S.; GROSS, B.; PETRIE-ARONIN, C. E.; BOTCHWAY, E. A.; NAIR, L. S.; OGLE, R. C.; PARK, S. S. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. **Laryngoscope**, v. 120, n. 5, p. 895-901, may 2010.

TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Ann Surg**, v. 196, n. 1, p. 100-109, jul 1982.

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

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodontal Res**, v. 40, n. 4, p. 287-293, aug 2005.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, sep 2000.

TOKER, H.; OZEMIR H.; OZER H.; EREN K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. **Arch Oral Biol**, v. 11, n.57, p. 1545-50, nov 2012.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38, suppl 1, p. 11-25, may 2007.

TSUDA, E.; GOTO, M.; MOCHIZUKI, S.; YANO, K.; KOBAYASHI, F.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 234, n. 1, p. 137-142, may 1997.

VÄÄNÄNEN, H. K.; LAITALA-LEINONEN, T. Osteoclast lineage and function. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 132-138, may 2008.

WADA, T.; NAKASHIMA, T.; HIROSHI, N.; PENNINGER, J. M. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 1, p. 17-25, jan 2006.

WARREN, J. S. Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 28, n. 1, p. 37-59, 1990.

XU, W.; GANZ, C.; WEBER, U.; ADAM, M.; HOLZHÜTER, G.; WOLTER, D.; FRERICH, B.; VOLLMAR, B.; GERBER, T. Evaluation of injectable silica-embedded nanohydroxyapatite bone substitute in a rat tibia defect model. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 1543-1552, 2011.

YASUDA, H.; SHIMA, N.; NAKAGAWA, N.; MOCHIZUKI, S. I.; YANO, K.; FUJISE, N.; SATO, Y.; GOTO, M.; YAMAGUCHI, K.; KURIYAMA, M.; KANNO, T.; MURAKAMI, A.; TSUDA, E.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1329-1337, mar 1998.

YUN, J. I.; WIKESJÖ, U. M.; BORKE, J. L.; BISCH, F. C.; LEWIS, J. E.; HEROLD, R. W.; SWIEC, G. D.; WOOD, J. C.; MCPHERSON, J. C. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. **J Clin Periodontol**, v. 37, n. 5, p. 419-426, may 2010.

ZHU, L. L.; ZAIDI, S.; PENG, Y.; ZHOU, H.; MOONGA, B. S.; BLESIIUS, A.; DUPIN-ROGER, I.; ZAIDI, M.; SUN, L. Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 355, n. 2, p. 307-311, apr 2007.

ZUO, C.; HUANG, Y.; BAJIS, R.; SAHIH, M.; LI, Y. P.; DAI, K.; ZHANG, X. Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling. **Osteoporos Int**, v. 23, n. 6, p. 1653-1663, jun 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – DECLARAÇÃO



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº21/10, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO POTENCIAL DE REPARO ÓSSEO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO EM DEFEITOS CRÍTICOS NA CALOTA DE RATOS”**. de responsabilidade de Ana Cristina de Mello Fiallos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 07 de abril de 2010.

Fortaleza, 20 de abril de 2010


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

APÊNDICE B – APARELHOS, INSTRUMENTAIS E OUTROS MATERIAIS

No decorrer dos experimentos, foram utilizados diversos aparelhos, instrumentos e materiais, os quais são citados a seguir:

- Balança para pesagem de animais;
- Balança analítica Marte AL200;
- Microscópio ótico (Leica DM500, Leica Microsystems, Califórnia, CA, USA);
- Lupa estereoscópica (Leica M80, Leica Microsystems, Califórnia, CA, USA);
- Ponteiros para Pipetas automáticas SIGMA;
- Tubos plásticos de 15 ml (FALCON);
- Luvas, máscaras e campo cirúrgicos;
- Lâmina de bisturi nº 15;
- Broca trefina cirúrgica de 8 mm (Conexão Sistema de próteses Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- Motor cirúrgico (BML 600 Plus Driller – CK Driller; São Paulo, SP, Brasil);
- Contra-ângulo (Anthogyr – Injecta– Diadema, São Paulo, SP, Brasil);
- Fio agulhado nº 3-0 absorvível tipo *catgut* (Bioline Fios cirúrgicos Ltda., Anápolis, Go, Brasil);
- Tomógrafo computadorizado de feixe cônico Kodak 9000 3D (*Extra-oral Imaging System, Carestream Dental, Rochester, NY, USA*).

APÊNDICE C – DROGAS, SOLUÇÕES E CORANTES UTILIZADOS

As drogas, soluções e corantes utilizados para a realização dos experimentos foram:

- Cloridrato de Cetamina (Cetamin[®], Syntec do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- Cloridrato de Xilazina (Xylasin[®], Syntec do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil);
- Ranelato de Estrôncio (Protos[®], Laboratório Servier, São Paulo, SP, Brasil);
- Água destilada estéril;
- Soro fisiológico 0,9% (NaCl 0,15 M);
- Solução aquosa de clorexina a 2%;
- Álcool etílico 70°;
- Ácido etineldiamino tetra-acético (EDTA) (Reagen);
- Formaldeído (Reagen);
- Sulfato de Sódio 5% (Merk Brasil, SP, São Paulo, Brasil);
- Hematoxilina (Reagen);
- Eosina (Merk Brasil, SP, São Paulo, Brasil);
- Tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,4 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA);
- Peróxido de hidrogênio;
- Anticorpo policlonal primário obtido em coelho anti-OPG (AB73400, Abnova, Laguna Niguel, CA, USA);
- Anticorpo policlonal primário obtido em cabra anti-RANKL (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA);
- Anticorpo secundário biotilado anti-coelho (W2206, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA);
- Albmina Bovina (BSA) 3%, (A9647, Sigma, St. Louis, MO, USA);
- 3'3-diamobenzidina (0,005% idem BSA) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA);
- Instrumentais cirúrgicos (pinças, cabo de bisturi nº 3, tesoura, afastadores, destaca periósteo, seringa, agulhas);
- Algodão e gaze Cremer[®];
- Fio de sutura reabsorvível 3-0.