

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Rhomy Aymara dos Santos Quijada

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO USO TÓPICO DO RANELATO DE
ESTRÔNCIO EM RATOS NO REPARO ÓSSEO PERIIMPLANTAR NA
OSTEOPOROSE INDUZIDA**

Belo Horizonte
2017

Rhomy Aymara dos Santos Quijada

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO USO TÓPICO DO RANELATO DE
ESTRÔNCIO EM RATOS NO REPARO ÓSSEO PERIIMPLANTAR NA
OSTEOPOROSE INDUZIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Implantodontia.

Linha de Pesquisa: Interrelações moleculares, morfológicas e sistêmicas com os tecidos perimplantares.

Orientador: Prof. Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto

Belo Horizonte

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Q6a

Quijada, Rhomy Aymara dos Santos

Avaliação histológica do efeito do uso tópico do ranelato de estrôncio em ratos no reparo ósseo periimplantana osteoporose induzida / Rhomy Aymara dos Santos Quijada. Belo Horizonte, 2017.

45 f. : il.

Orientador: Peterson Antônio Dutra de Oliveira

Coorientadora: Giovanna Ribeiro Souto

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Estrôncio. 2. Regeneração óssea. 3. Osteoporose. 4. Implantes dentários osseointegrados. I. Oliveira, Peterson Antônio Dutra de. II. Giovanna, Ribeiro Souto. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314-089

Rhomy Aymara dos Santos Quijada

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO USO TÓPICO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO EM RATOS NO REPARO ÓSSEO PERIIMPLANTAR NA OSTEOPOROSE INDUZIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Fernando de Oliveira Costa – UFMG
- 2- Profa. Dra. Alcione Maria Soares Dutra Oliveira – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 14 de dezembro de 2017

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Peterson Antônio Dutra de Oliveira
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

AGRADECIMENTOS

À Coordenação, aos professores, orientadores, auxiliares, técnicos, pacientes e colegas.....

a vocês que foram fundamentais durante o percurso... minha gratidão!

À minha família.....e principalmente, a Àquele que me fortalece.....minha gratidão eterna.

Ninguém e nada cresce sozinho. Sempre é preciso um olhar de apoio. Uma palavra de incentivo. Um gesto de compreensão. Uma atitude de segurança. Devemos, assim, sermos gratos. Aos que nos ajudaram a crescer. E termos o propósito de não parar. E não passar em vão pela vida.
(AUTOR DESCONHECIDO)

RESUMO

Durante os últimos anos diversas drogas têm sido avaliadas quanto a capacidade de inibir a perda óssea, melhorar o reparo ósseo em defeitos decorrentes de traumas, doenças crônicas e degenerativas ou mesmo de aumentar a previsibilidade de implantes endósseos. O Ranelato de Estrôncio (RSr) é um medicamento utilizado para o tratamento de mulheres com osteoporose no período pós menopausa. Sua indicação baseia-se nos resultados promissores da diminuição do índice de fratura devido ao seu efeito metabólico dual de prevenir a reabsorção óssea, diminuindo o número de osteoclastos, e estimular a diferenciação osteoblástica, privilegiando o reparo ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação tópica do gel do RSr no reparo ósseo periimplantar em tíbia. Para tanto, 36 ratas Wistar adultas foram divididas em 6 grupos. Três grupos controle saudáveis: G1 com implante instalado, G2 com implante e aplicação de gel de carbopol, e G3 com implante e aplicação de gel de carbopol com RSr a 1%. Três grupos teste com osteoporose induzida por dexametasona: G4 com implante instalado, G5 com implante e aplicação de gel de carbopol e G6 com implante e aplicação de gel de carbopol com RSr a 1%. Após 28 dias da cirurgia, os animais foram sacrificados e as tíbias fixadas, desmineralizadas e processadas para análise histológica. Os cortes histológicos foram analisados quanto a presença de formação óssea e inflamação. Observou-se variável formação óssea e reação inflamatória na região periimplantar em todos os grupos avaliados. Estudos sobre os efeitos sistêmicos de baixas doses de RSr na formação óssea em torno de implantes em amostras com maior número de animais são necessários para confirmar ou não os benefícios do seu uso.

Palavras-chave: Ranelato de estrôncio. Reparo ósseo. Osteoporose. Implante.

ABSTRACT

Over the last years several drugs have been investigated in order to try to prevent and/or to improve the bone healing of defects resulting from traumas, chronic and/or degenerative diseases or even to increase the predictability of intra-bony implants. Strontium Ranelate (SrR) is a drug used for the treatment of women with osteoporosis in the postmenopausal period. Its indication is based on the promising results of the fracture index diminution due to the number of osteoclasts and it stimulates the osteoblastic differentiation, so favoring the bone healing. The aim of this study was to evaluate the effect of the SrR gel topical application on the peri-implant bone healing in rat tibia. For this purpose, 36 adult Wistar rats were divided into 6 groups. Three healthy control groups: G1 with an implant installed, G2 with an implant and an application of Carbopol gel, and G3 with an implant and an application of Carbopol gel with 1% of SrR. Three test groups with dexamethasone-induced osteoporosis: G4 with an implant installed, G5 with an implant and an application of Carbopol gel, and G6 with an implant and an application of Carbopol gel with 1% of SrR. After a period of 28 days from the surgery the rats were sacrificed and the tibia was fixed in formalin, demineralized and processed for histological analysis. Tissue sections were analyzed to verify the presence of bone formation and inflammation. A varying bone formation and an inflammatory reaction in the peri-implant region were observed in all the groups assessed. Studies on the systemic effects of SrR in low doses on the bone formation with implants in samples with a bigger number of animals are necessary to confirm or not the benefits of its usage.

Keywords: Strontium ranelate. Bone healing. Osteoporosis. Implant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 ARTIGO	21
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A – Comissão de ética no uso de animais UFMG	45

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença sistêmica progressiva caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura, levando à fragilidade do osso e aumento do risco de fraturas (LANE, 1998; MARTIN; CORREA, 2010). Uma desproporção entre atividade osteoblástica e osteoclástica, com predomínio da última, leva ao desenvolvimento gradual desta doença (LANE, 1998).

Terra (2002) afirmou que a osteoporose é a doença mais comum do metabolismo ósseo, caracterizando-se por ser lenta, progressiva, assintomática e particularmente mais comum nos idosos. Acomete indivíduos de ambos os gêneros, embora haja maior prevalência no gênero feminino, devido à forte associação com as alterações hormonais da menopausa (PINTO NETO et al., 2002).

O estrógeno tem papel fundamental no turnover ósseo e sua deficiência afeta os osteoclastos e osteoblastos causando a redução da massa óssea inclusive nos ossos da maxila e da mandíbula (KRIBBS, 1990).

Do ponto de vista epidemiológico, a osteoporose é uma doença de importância crescente tendo-se em vista o aumento da expectativa de vida da população, que no Brasil é em média, de aproximadamente 72 anos para as mulheres (GALO et al., 2006; UNLUER; GOKALP; DOGAN, 2007). A população brasileira não é mais considerada jovem, sendo composta, atualmente, por aproximadamente 20 milhões de pessoas idosas (10,8% da população total), com previsibilidade de quase 32 milhões (13,8% da população geral) em 2025 (TERRA, 2002; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2013).

Estima-se que uma em cada duas mulheres e um em cada cinco homens acima de 65 anos de idade apresentarão pelo menos uma fratura relacionada à osteoporose em algum momento da vida. A osteoporose atualmente afeta mais de 75 milhões de pessoas na Europa, Japão e os Estados Unidos, com um risco estimado de fraturas de aproximadamente 15%. Dados norte-americanos mostram que as fraturas devido à osteoporose são mais graves, letais em 12 a 20% dos casos e acarretam despesas médicas ao redor de dez bilhões de dólares. No Brasil, há escassez de dados referentes à população acometida pela osteoporose. Estima-se que aproximadamente 10 milhões de brasileiros residentes sofram desta doença. (MEINÃO et al., 1998; RENNO, 2001).

Várias pesquisas foram realizadas para avaliar o impacto da osteoporose no reparo ósseo de implantes dentários endósseos (DAO; ANDERSON; ZARB, 1993; YAMAZAKI et al., 1999; PAN et al., 2000; NOCITI JÚNIOR et al., 2002; DUARTE et al., 2003a; DUARTE et al., 2003b). Estudos realizados com animais demonstraram que o contato osso/implante (COI) é significativamente diminuído na osteoporose, o que pode comprometer a longevidade da reabilitação de pacientes com implantes osseointegrados (YAMAZAKI et al., 1999; PAN et al., 2000; NOCITI JÚNIOR et al., 2002; DUARTE et al., 2003a; DUARTE et al., 2003b).

Em Odontologia, a preocupação com a quantidade (volume) e qualidade (densidade) óssea começou com a definição da osseointegração como a conexão funcional e estrutural direta entre o tecido ósseo vivo e organizado com a superfície de um implante sob carga funcional (HOMOLKA et al., 2002).

A descrição da osseointegração e sua aplicação clínica na Implantodontia foram um dos mais relevantes avanços no tratamento dos pacientes parcial ou totalmente desdentados (BRANEMARK et al., 1969).

A osteoporose é reconhecida por alguns autores como potencial fator de risco para o fracasso de implantes osseointegrados. Becker et al. (2000) sustentam argumentos que classificam a enfermidade como contraindicação total ou relativa para a implantologia oral, embora as evidências clínicas tenham tornado essas afirmações discutíveis e indefinidas.

O ranelato de estrôncio (RSr) é constituído por dois átomos de estrôncio estável e uma molécula de ácido ranélico. Sendo um metal alcalino-terroso, o estrôncio possui muitas semelhanças com o cálcio, como absorção intestinal, incorporação óssea e eliminação renal. O seu raio atômico calculado é de 219 pm, valor próximo do raio atômico do cálcio (194 pm), e, desta forma, o organismo, pelo mimetismo estrutural assinalado, assimila e incorpora o estrôncio nos ossos e nos dentes.

O RSr apresenta características duais em seu mecanismo de ação. Aumenta a formação de tecido ósseo mineralizado in vitro, bem como a proliferação de precursores de osteoblastos e a síntese de colágeno em cultura de células ósseas. Além disso, reduz a reabsorção óssea por meio da diminuição da diferenciação dos osteoclastos e da atividade de reabsorção. Clinicamente, em humanos, estes fatores

manifestam-se por uma diminuição acentuada na prevalência de fraturas em mulheres em tratamento da osteoporose (MEUNIER et al., 2004).

Estudos em animais mostraram aumento da resistência óssea com o uso do RSr, mas a melhoria da microarquitetura óssea ou da qualidade intrínseca do tecido ósseo não foi evidente. Os resultados indicaram que independentemente do teor de estrôncio no osso, as adaptações microarquiteturais desempenham um papel importante no aumento da resistência associada ao RSr, contribuindo para um papel importante para a resistência a fraturas (BOYD; SZABO; AMMANN, 2011).

Um estudo em ratas ovariectomizadas tratadas com RSr (625 mg/kg/dia) e submetidas a instalação de implantes mostrou que, após doze semanas, os níveis séricos de osteocalcina (OCN) aumentaram em 29% e os de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) 5b reduziram cerca de 25%. Verificou-se o aumento de 63,1% do volume ósseo e do percentual de osseointegração em 48,3%, na avaliação pela micro tomografia computadorizada, e aumentou em 55,6% a densidade óssea por área e em 49% o contato osso-implante, por meio de histomorfometria. O tratamento com RSr também aumentou a força máxima *push-out* em até 117,7% e a força de cisalhamento final em 103,5% (LI et al., 2012).

O RSr apresenta características duais em seu mecanismo de ação, inibindo a reabsorção óssea pela diminuição da diferenciação osteoclástica e promovendo a osteoblastogênese. Clinicamente, em humanos, estes fatores manifestam-se por uma diminuição acentuada na prevalência de fraturas em mulheres em tratamento da osteoporose (MEUNIER et al., 2004).

O presente trabalho se justifica pela possibilidade de avaliação de uma segunda via de administração, o uso tópico, em um modelo animal de ratas com osteoporose induzida, ampliando o conhecimento e prováveis indicações terapêuticas para o uso do RSr. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar histologicamente o efeito da aplicação tópica do RSr no reparo ósseo periimplantar em tíbia de ratos com osteoporose induzida por medicamento. Importante salientar que a presente investigação é a continuidade de um estudo prévio (CAMPOS, 2016) que avaliou o efeito da aplicação tópica do gel de RSr na osseointegração dos implantes no aspecto de sua retenção biomecânica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação tópica do gel de ranelato de estrôncio no reparo ósseo periimplantar em tíbia de ratos saudáveis e com osteoporose induzida por corticóide.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a deposição óssea e a inflamação periimplantar em tíbias de ratos saudáveis ,tratados ou não com RSr tópico;
- b) avaliar a deposição óssea e a inflamação periimplantar em tíbias de ratos com osteoporose, tratados ou não com RSr tópico;
- c) comparar a deposição óssea e a inflamação periimplantar em tíbias de ratos saudáveis e com osteoporose induzida , tratadas com RSr tópico .

3 ARTICLE

Peri-implant histological analysis of osteoporotic rats treated with topical Strontium Ranelate

Article formatted according to the **Clinical Oral Implants Research** journal publication guidelines (Qualis A1).

Email address:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1600-0501/homepage/ForAuthors.htm](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1600-0501/homepage/ForAuthors.htm).

Peri-implant histological analysis of osteoporotic rats treated with topical Strontium Ranelate

Affiliated authors:

Rhomy Aymara Dos Santos Quijada. DDS. MSc.

Thiago Fiuza Campos. DDS. MSc.

Giovanna Ribeiro Souto. DDS. PhD.

Peterson Antônio Dutra de Oliveira DDS. PhD.

Post-Graduation program in Dentistry of Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Keywords: Implants, Osseo-integration, Osteoporosis, Strontium Ranelate.

Corresponding author:

Peterson Antônio Dutra de Oliveira

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – Dentistry Department

Av. Dom José Gaspar 500, Prédio 46 / Sala 101 – Coração Eucarístico

Belo Horizonte - MG - Brazil - CEP: 30535-901

Phone: 55 -31- 33194414

E-mail: peteronperio@gmail.com

Abstract

Introduction: Osteoporosis is considered a potential risk factor for the failure of osseointegrated implants. Strontium Ranelate (SrR) has been used for the treatment of osteoporotic women during the post-menopause period due to its systemic effect on the bone metabolism. Studies suggest that the topic usage of this drug in association with intra-bony implants can bring advantages for the osseointegration, with a reduced number of collateral effects.

Objective: the objective of this study was to assess the effect of the SrR gel topic application in the peri-implant bone healing, in healthy animals and with an induced osteoporosis.

Material and Methods: Wistar adult rats (*Rattus norvegicus albinus*) (n= 36) were divided in six groups: G1 (N=6) healthy; G2 (N=6) healthy with Carbopol gel; G3 (n=6) healthy with Carbopol gel and 1% of SrR; G4 (n=6) induced osteoporosis; G5 (n=6) induced osteoporosis with Carbopol gel; G6 (N=6) induced osteoporosis with Carbopol gel and 1% of SrR. An implant was inserted in the tibia of all the animals. After 28 days from the surgery, the animals were sacrificed and the tibias were fixed, demineralized and processed for histological analyses. Tissue sections were analyzed to verify the presence of bone formation and inflammation.

Results: The presence or the absence of a bone formation was observed together with an inflammatory reaction of the peri-implant region in all the groups assessed.

Conclusion: Studies on the SrR topical effects on the bone formation around implants in samples with a bigger number of animals are necessary.

Introduction

Osseointegration is defined as the functional and direct structural connection between the living bone tissue and organized with the surface of an implant under a functional load (Homolka et al. 2002). Various factors influence osseointegration, such as an inflammation, an occlusal load, the implant design, and the interface/alveolar bone crest relationship (Wagner et al. 2017). Systemic factors that affect the inflammatory response and the bony remodeling must also be considered (Dubey et al. 2103). According Becker et al. (2000), osteoporosis is a potential risk factor for the osseointegration of oral implants.

Osteoporosis is the systemic illness that affects the bone metabolism the most (Wright et al. 2017; Syddall et al. 2012), so reducing the amount of the cortical and trabecular bony tissue (Mombelli & Cionca 2006; Oliveira et al. 2013). It is an illness of growing importance, since an increase of life expectancy of the world's population is predicted (Wright et al. 2017; Galo et al. 2006). Studies on animals have demonstrated that the induced osteoporosis reduces the bone-implant contact, so being able to jeopardize the longevity of the oral rehabilitation with the implants (Duarte et al. 2003a; Duarte et al. 2003b; Nociti Jr. et al. 2002).

Various drugs have been studied for the last years in order to improve the bone healing and to increase the success rate of intra-bony implants (Kellesarian et al. 2017). These drugs include agents that inhibit the bony catabolism, such as biphosphonates, and agents that stimulate the bony anabolism, such as EP4 prostaglandin antagonist receptors, simvastatin, D vitamin and Strontium Ranelate (SrR) (Apostu et al., 2017).

SrR has been used for the treatment of osteoporotic women during the post-menopausal period. Its indication is based on the promising results of the

fracture index diminution (Boyd et al. 2011), due to the dual metabolic systemic effect of preventing the bony reabsorption (so diminishing the osteoclast number) and of stimulating the osteoblastic differentiation (Meunier et al. 2004). The topical usage of this drug when associated with oral intra-bony implants could bring advantages for the osseointegration. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of the SrR gel topic application on the peri-implant bone healing in rats with and without an induced osteoporosis.

Material and Methods

Study scheme

This experiment is part of a preliminary study carried out by Campos (2016), it was realized according to the animal welfare international standards and approved by the Ethical Commission for the Use Animals of the Federal University of Minas Gerais, protocol n° 366/2015. 36 twenty-week-old Wistar adult rats were used (*Rattus norvegicus albinus*), weighing between 300 and 350 gr. coming from the Biological and Health Science Vivarium of PUC Minas. The sample was divided into 6 groups with 6 animals each:

- a) Group G1 – healthy animals + implant;
- b) Group G2 – healthy animals + implant + Carbopol gel;
- c) Group G3 – healthy animals + implant + Carbopol gel + 1% SrR ;
- d) Group G4 – animals with an induced osteoporosis + implant;
- e) Group G5 – animals with an induced osteoporosis + implant + Carbopol gel;

- f) Group G6 – animals with an induced osteoporosis + implant + Carbopol gel + 1% SrR.

In the animal test group the osteoporosis was induced according to the Santos protocol (2004) by Dexametasona (Azium Solução®-Shering-Plough) intramuscular injections in a dose of 7mg/kg body weight, once a week for 5 weeks. The healthy control groups received 0,9% NaCl injections in the same way of administration, application intervals and volume of the test groups.

Surgery procedures

The surgery for the implant installation was realized after 5 week from the osteoporosis induction. Initially the animals were weighed out for the adequacy of the drug dosage and then anesthetized with a combination of sedatives, 2% Xylazine Hydrochloride (0,1 ml/100gr body weight) muscle relaxant and 10% Ketamine Hydrochloride (0,1 ml/100gr) anesthetic intramuscular injections.

The cleaning process and the asepsis of the surgical area were carried out with 2,0% Chlorhexidine Digluconate (MANIFAR®), followed by a trichotomy of the left tibia region with stainless steel blades and polytetrafluoroethylene (GILLETTE®).

A longitudinal incision on the lower limb of the animals was realized by using n°15 scalpel blades (SOLIDOR®), with a removal of the muscles and the other tissues by a blunt dissection. After the bony exposure, the receptor region was prepared using a 1,3 mm diameter drill (NEODENT®, Curitiba, Paraná, Brazil) attached to a 1:16 Contra-Angle (KAVO®) and this was connected to an implant engine (BLM DRILLER®), with a rotation of 600 RPM with a constant and abundant irrigation with a sterile saline solution.

The auto-tapping implant was manufactured in grade IV titanium, measuring 4mm of height and 1,5 mm of diameter (NEODENT[®], Curitiba, Paraná, Brazil) and it was inserted transversally in the bone with a manual key (NEODENT[®], Curitiba, Paraná, Brazil) until the screw head would touch the cortical bone and would show a mechanical stability. The suture was carried out with a 4-0 nylon thread (Biosut Ltda., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), using simple stitches which were removed after 7 days.

All the animals received a unique dose of Oxytetracycline (Terramicina–Pfizer 25 mg/Kg) antibiotic and a veterinary anti-inflammatory called Flunixin-Meglumin (Injectable Banamine pet), both in a dose of 1.1 mg/kg just after the surgery by intramuscular injections.

After the surgical procedure the animals were monitored until the end of the anesthetic effect, so guaranteeing their welfare in the immediate post-surgical period. With the aim of minimizing any possible traumas in the surgical areas the animals were kept isolated in each cage. The rats were kept with water and animal feed *ad libitum* and sacrificed after 28 days with an anesthesia and a cervical dislocation.

Histological analyses

The tibias of the animals were dissected and fixed in 10% formaldehyde buffered for 48 hours at a room temperature. After the fixation, the bones were demineralized in a 10% EDTA aqueous solution (pH 7,3) until showing a soft consistency, suggesting a correct bony demineralization. The implants were carefully removed and then the tibias were dehydrated in solutions of growing ethanol concentration, diaphanized in xylol and soaked in paraffin (Histosec[®] pastilhas, Merck). Their inclusion in the paraffin was done in a longitudinal direction along the

implant axis (Fig. 1). Serial sections of 4 μm of thickness in microtome were obtained and these were extended on glass slides. The sections were dyed with hematoxylin-eosin for the histological analysis. Analyses regarding to the following parameters were realized: bone formation, presence and type of inflammatory infiltrate of all the area corresponding to the contact surface with the implant.

Results

According to some complications during the sample processing, the analysis was reduced up to the results of 21 animals. Representative sections of the histological standards found in the groups can be observed in the figure 2. Tibias showing absence of bone formation and inflammatory process in the group G3 (Fig. 2A), presence of bone formation with an inflammatory process in the groups G3, G4, G5, and G6 (Fig. 2B), absence of bone formation and presence of inflammatory process in the groups G1, G4 and G5 (Fig. 2C) and presence of bone formation in the absence of an inflammatory process in the groups G1, G2, G5 and G6 (Fig. 2D) were observed.

The bone surrounding the implant was immature, histologically characterized as a cellularized tissue, with absence of lamellar deposition. In some samples, a band of fibrous connective tissue, containing a dense inflammatory infiltrate composed by mononuclear cells, surrounded the implant. In the peri-implant region it was also possible to observe areas of hematogenous bone marrow (Fig. 2A, B and D) and areas of compact, mature and lamellar bone tissue (Fig. 2C). These different findings around the implant are related to the position of the implant placement in the animal tibia. The results of the histological analyses were grouped in table 1.

Discussion

Osteoporosis is the systemic illness that affect the bony metabolism the most (Wright et al. 2017; Syddall et al. 2012), but its effects on the alveolar bone loss are not completely understood yet. Some studies do not correlate the osteoporosis with the implant loss (Wagner et al. 2017; Giro et al. 2015; Slagter et al. 2008; Dvorak et al. 2011; Holahan et al. 2008), but others show a high index of implant loss associated to osteoporosis (De Medeiros et al. 2017; Alsaadi et al. 2008). In this way, drugs that act in the bony metabolism have been studied with the aim of increasing the intra-bony implant success rates (Kellesarian et al. 2017). In this context, SrR has showed promising outcomes due to its dual metabolic systemic effect, so diminishing the osteoclast activity and stimulating the osteoblastic differentiation (Meunier et al. 2004). Due to its action on the bony metabolism, the hypothesis of the present work was that the SrR topical use could bring advantages for the osseointegration. However, no important histological differences in the peri-implant bone healing induced with a SrR gel topical application between animals with and without osteoporosis were observed.

Strontium (Sr^{2+}) is an alkaline metal earth element belonging to the same family of calcium, with a role in the bony metabolism and similar chemical and physical characteristics (Dahl et al. 2001). There are reports which show that strontium incorporated in titanium alloys provoked an increase of the bony deposition by a local osteoblastic stimulation (Park et al. 2010; Park et al. 2012). SrR has been used with an oral administration for the treatment of the post-menopausal osteoporosis.

However, its oral administration may result in adverse potential reactions. In this way, the local administration, aiming to specific needs, could reduce the

collateral effects. Although there is a previous study using low SrR doses and describing a local effect on the bone formation (Tian et al. 2014), in the present study no differences in the bone formation between animals with or without the SrR application were not found. Further studies assessing the SrR topical effects and the oral administration of low doses in the peri-implant bone formation must be carried out.

Studies on animals have an important role in the research to improve the health and the treatments in humans, despite there are political and scientific efforts to reduce the experimentation in laboratory animals. In these studies, the results and the interpretations are not always direct and no animal study is perfectly done in all its stages. There are various slant sources and thus it is important that they are replicated (Hooijmans et al. 2014). In the present study, although the initial sample has been considered sufficient for the tests, problems derived from the animal losses or from the sample processing were observed. This difficulty can partially explain the absence of difference between the groups.

However, the morphological findings encountered in the present study show a variable bone formation and an inflammatory reaction in the peri-implant region for the group with or without the SrR gel application, with or without an induced osteoporosis, so suggesting that the use of topical SrR did not generate any advantage. It can be concluded that further studies for the evaluation of the SrR topical effects on the bone healing around the implants have still to be carried out, so representing an interesting research field for regenerative bone surgeries.

References

- Alsaadi, G., Quirynen, M., Komárek, A. & van Steenberghe, D. (2008) Impact of local and systemic factors on the incidence of late oral implant loss. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 670-676.
- Apostu, D., Lucaciu, O., Lucaciu, G.D., Crisan, B., Crisan, L., Baciut, M., Onisor, F., Baciut, G., Câmpian, R.S. & Bran, S. (2017) Systemic drugs that influence titanium implant osseointegration. *Drug Metabolism Reviews* **49**: 92-104.
- Becker, W., Hujoel, P.P., Becker, B.E. & Willingham, H. (2000) Osteoporosis and implant failure: an exploratory case-control study. *Journal of Periodontology* **71**: 625-631.
- Boyd, S.K., Szabo, E. & Ammann, P. (2011) Increased bone strength is associated with improved bone microarchitecture in intact female rats treated with strontium ranelate: a finite element analysis study. *Bone* **48**: 1109-1116.
- Campos, T.F. Avaliação da aplicação tópica do ranelato de estrôncio no reparo ósseo periimplantar na osteoporose induzida em ratos. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Dahl, S.G., Allain, P., Marie, P.J., Mauras, Y., Boivin, G., Ammann, P., Tsouderos, Y., Delmas, P.D. & Christiansen, C. (2001) Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* **28**: 446-453.
- De Medeiros, F.C.F.L., Kudo, G.A.H., Leme, B.G., Saraiva, P.P., Verri, F.R., Honório, H.M., Pellizzer, E.P. & Santiago Junior, J.F. (2017) Dental implants in patients with osteoporosis: a systematic review with meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **S0901-5027**: 31484-4.

- Duarte, P.M., César Neto, J.B., Sallum, A.W., Sallum, E.A. & Nociti Jr, F.H. (2003a) Effect of estrogen and calcitonin therapies on bone density in a lateral area adjacent to implants placed in the tibiae of ovariectomized rats. *Journal of Periodontology* **74**: 1618-1624.
- Duarte, P.M., César Neto, J.B., Gonçalves, P.F., Sallum, E.A. & Nociti, J.F. (2003b) Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *Implant Dentistry* **12**: 340-346.
- Dubey, R.K., Gupta, D.K. & Singh, A.K. (2013) Dental implant survival in diabetic patients; review and recommendations. *National Journal of Maxillofacial Surgery* **4**: 142-150.
- Dvorak, G., Arnhart, C., Heuberger, S., Huber, C.D., Watzek, G. & Gruber, R. (2011) Peri-implantitis and late implant failures in postmenopausal women: a cross-sectional study. *Journal of Clinical Periodontology* **38**: 950-955.
- Galo, R., Vitti, M., Santos, C.M., Hallak, J.E. & Regalo, S.C. (2006) The effect of age on the function of the masticatory system--an electromyographical analysis. *Gerodontology* **23**: 177-182.
- Giro, G., Chambrone, L., Goldstein, A., Rodrigues, J.A., Zenóbio, E., Feres, M., Figueiredo, L.C., Cassoni, A. & Shibli, J.A. (2015) Impact of osteoporosis in dental implants: a systematic review. *World Journal of Orthopedics* **6**: 311-315.
- Holahan, C.M., Koka, S., Kennel, K.A., Weaver, A.L., Assad, D.A., Regennitter, F.J. & Kademani, D. (2008) Effect of osteoporotic status on the survival of titanium dental implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **23**: 905-910.
- Homolka, P., Beer, A., Birkfellner, W., Nowotny, R., Gahleitner, A., Tschabitscher, M. & Bergmann, H. (2002) Bone mineral density measurement with dental

quantitative CT prior to dental implant placement in cadaver mandibles: pilot study.

Radiology **224**: 247-252.

Hooijmans, C.R., Int'Hout, J., Ritskes-Hoitinga, M. & Rovers, M.M. (2014) Meta-analyses of animal studies: an introduction of a valuable instrument to further improve healthcare. *ILAR Journal* **55**: 418-426.

Kellesarian, S.V., Abduljabbar, T., Vohra, F., Malignaggi, V.R., Malmstrom, H., Romanos, G.E. & Javed, F. (2017) Role of local alendronate delivery on the osseointegration of implants: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **46**: 912-921.

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. (2004) The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of Medicine* **350**: 459-468.

Mombelli, A. & Cionca, N. (2006) Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 97-103.

Nociti, F.H. Jr, Sallum, A.W., Sallum, E.A. & Duarte, P.M. (2002) Effect of estrogen replacement and calcitonin therapies on bone around titanium implants placed in ovariectomized rats: a histometric study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **17**: 786-792.

Oliveira, B.P., Montenegro, F.L.B. & Miranda, A.F. (2013) Osteoporose e a sua relação com a prática odontológica geriátrica em implantodontia: breves considerações. *Revista Portal de Divulgação* **32**: 5-17.

- Park, J.W., Kim, H.K., Kim, Y.J., Jang, J.H., Song, H. & Hanawa, T. (2010) Osteoblast response and osseointegration of a Ti-6Al-4V alloy implant incorporating strontium. *Acta Biomaterialia* **6**: 2843-2851.
- Park, J.W., Kim, Y.J., Jang, J.H. & Suh, J.Y. (2012) Surface characteristics and primary bone marrow stromal cell response of a nanostructured strontium-containing oxide layer produced on a microrough titanium surface. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **100**: 1477-1487.
- Santos PS. (2004) Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose. 2004. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Slagter, K.W., Raghoobar, G.M. & Vissink, A. (2008) Osteoporosis and edentulous jaws. *The International Journal of Prosthodontics* **21**: 19-26.
- Syddall, H.E., Evandrou, M., Dennison, E.M., Cooper, C. & Sayer, A.A. (2012) Social inequalities in osteoporosis and fracture among community-dwelling older men and women: Findings from the Hertfordshire cohort study. *Archives of Osteoporosis* **7**: 37-48.
- Tian, A., Zhai, J.J., Peng, Y., Zhang, L., Teng, M.H., Liao, J., Sun, X. & Liang, X. (2014) Osteoblast response to titanium surfaces coated with strontium ranelate-loaded chitosan film. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **29**: 1446-1453.
- Wagner, F., Schuder, K., Hof, M., Heuberger, S., Seemann, R. & Dvorak, G. (2017) Does osteoporosis influence the marginal peri-implant bone level in female patients? A cross-sectional study in a matched collective. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **19**: 616-623.

Wright, N.C., Saag, K.G., Dawson-Hughes, B., Khosla, S. & Siris, E.S. (2017) The impact of the new National Bone Health Alliance (NBHA) diagnostic criteria on the prevalence of osteoporosis in the United States: supplementary presentation. *Osteoporosis International* [Epub ahead of print].

Table 1: Evaluation of the bone formation and presence of inflammatory process around the area of contact with the implant.

Group (n)	A (n)	B (n)	C (n)	D (n)
G1 (2)		1	1	
G2 (3)			3	
G3 (4)	2			2
G4 (3)		1		2
G5 (6)		2	2	2
G6 (3)			1	2

A=absence of bone formation and inflammation

B=absence of bone formation with inflammation

C=presence of bone formation without inflammation

D=presence of bone formation and inflammation

- a) Group G1 – healthy animals + implant;
- b) Group G2 – healthy animals + implant + Carbopol gel;
- c) Group G3 – healthy animals + implant + Carbopol gel + 1% SrR ;
- d) Group G4 – animals with an induced osteoporosis + implant;
- e) Group G5 – animals with an induced osteoporosis + implant + Carbopol gel;
- f) Group G6 – animals with an induced osteoporosis + implant + Carbopol gel + 1% SrR.

Figure legends

Fig. 1 – Fragment of bone tissue, after decalcification and processing. The fragment was included in the direction in which it was positioned in order to perform the histological sections. The presence of the space where the implant was placed is observed in the center of the fragment.

Fig. 2 – Histological sections in the region where the implant was installed. A) absence of bone formation and peri-implant inflammatory process; presence of immature bone (arrow) and connective tissue with mononuclear inflammatory infiltrate (asterisk); C) absence of immature bone and presence of connective tissue with mononuclear inflammatory infiltrate (asterisk); D) presence of immature bone (arrow) and absence of inflammation. Hematoxylin & eosin, 200 x increase.

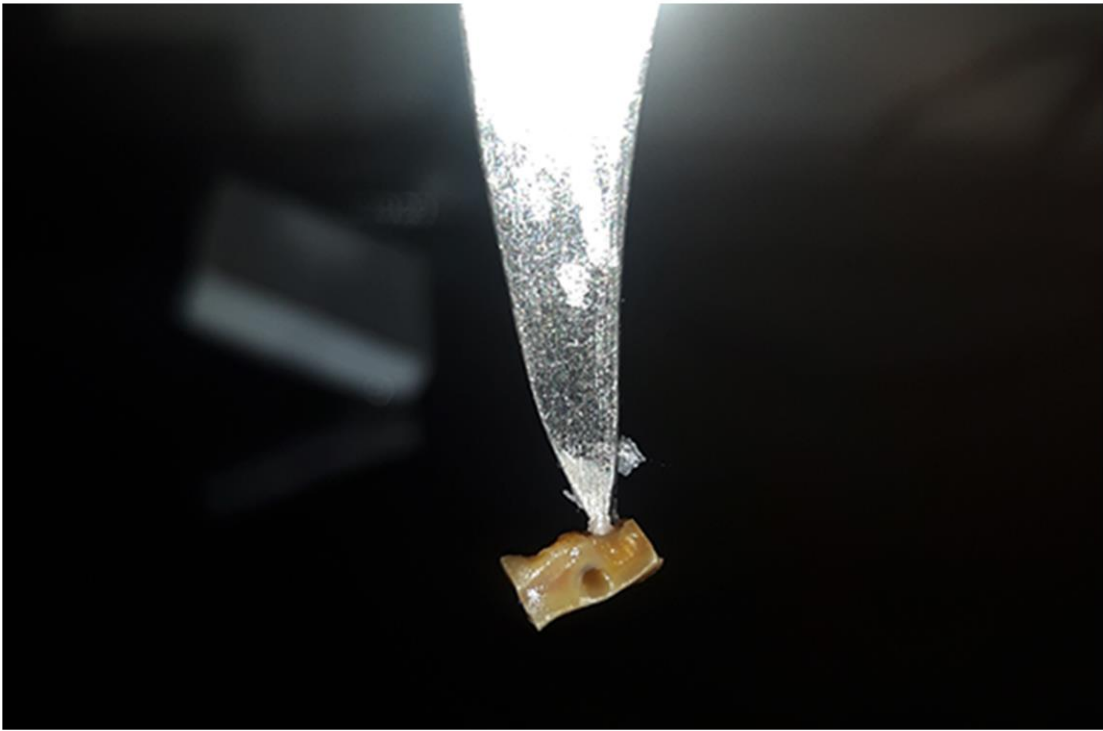


Fig. 1.

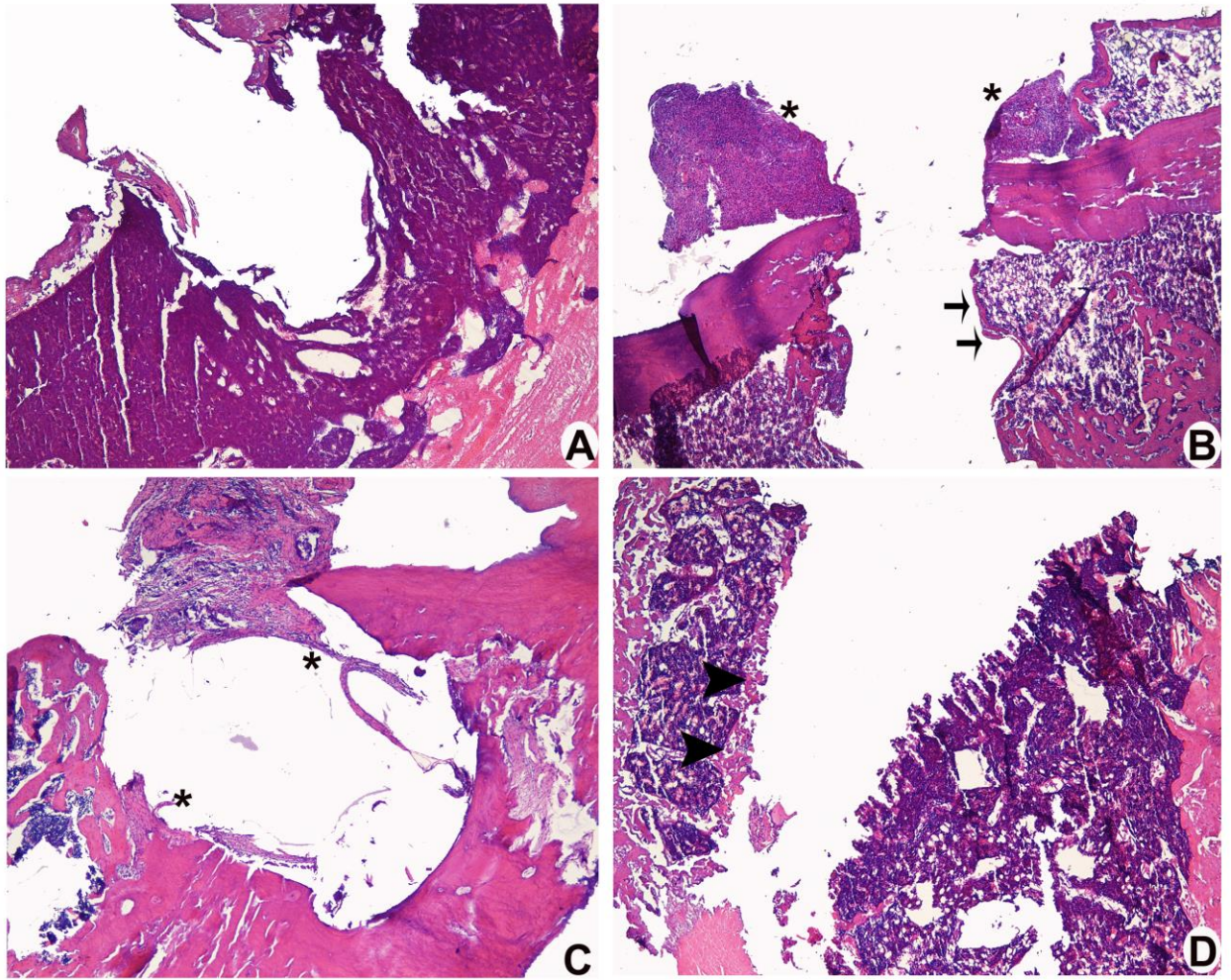


Fig. 2.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, diversas drogas têm sido investigadas no sentido de aumentar a previsibilidade de implantes endósseos assim como a longevidade dos tratamentos. No presente estudo, o fármaco escolhido para a execução dos testes foi o ranelato de estrôncio (RSr), devido aos resultados promissores obtidos em diversos outros estudos sobre o uso via oral do mesmo, resultando em aumento significativo da redução de fraturas em mulheres com osteoporose.

Os nossos resultados não demonstraram diferenças importantes na formação óssea, assim como na reação inflamatória, com ou sem o uso tópico do RSr em ratos saudáveis ou com osteoporose.

Embora a amostra inicial tenha sido considerada suficiente para os testes, problemas derivados da perda de animais ou do processamento das amostras foram observados, reduzindo a amostragem. Esta dificuldade pode, em parte, explicar a ausência de diferença entre os grupos.

Na amostra avaliada, a ausência de diferença entre os grupos sugere que o fármaco utilizado pode não interferir nos mecanismos inflamatórios e de remodelação óssea quando utilizado topicamente, porém estudos com um número maior de amostras se faz necessário para confirmação dos resultados.

REFERÊNCIAS

BECKER, W. et al. Osteoporosis and implant failure: an exploratory case-control study. **Journal of Periodontology**, v.71, n.4, p. 625-631, Apr. 2000.

BOYD, S.K.; SZABO, E.; AMMANN, P. Increased bone strength is associated with improved bone microarchitecture in intact female rats treated with strontium ranelate: a finite element analysis study. **Bone**, v.48, n.5, p. 1109-1116, May 2011.

BRANEMARK, P.I. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. experimental studies. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v.3, n.2, p. 81-100, 1969.

CAMPOS, T.F. **Avaliação da aplicação tópica do ranelato de estrôncio no reparo ósseo periimplantar na osteoporose induzida em ratos**. 2016. 57f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia). Programa de Pós-graduação em Odontologia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Belo Horizonte.

COSTA, C.G; SILVA J.R.; TORTAMANO, I.P. A osteoporose é um fator de risco para a osseointegração de implantes dentários? **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas**, v.55, n.6, p. 429, nov./dez. 2001.

DAO, T.T.; ANDERSON, J.D.; ZARB, G.A. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants? **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.8, n.2, p. 137-144, 1993.

DUARTE, P.M. et al. Effect of estrogen and calcitonin therapies on bone density in a lateral area adjacent to implants placed in the tibia of ovariectomized rats. **Journal of Periodontology**, v.74, n.11, p. 1618-1624, Nov. 2003a.

DUARTE, P.M. et al. Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants. A histometric study in rats. **Implant Dentistry**, v.12, n.4, p. 340-346, 2003b.

GALO, R. et al. The effect of age on the function of the masticatory system - an electromyographical analysis. **Gerodontology**, v.23, n.3, p. 177-182, Sept. 2006.

HOMOLKA, P. et al. Bone mineral density measurement with dental quantitative CT prior to the dental implant placement in cadaver mandibles: pilot study. **Radiology**, v.224, n.1, p. 247-252, July 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Resultado do censo demográfico 2010. [serial online]. Brasil. INSTITUTO BRASILEIRO. 2013. Disponível em: < <http://censo2010.ibge.gov.br/resultados> >. Acesso em: 04 abr. 2016.

KRIBBS, P.J. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.63, p. 218-222, May 1990.

LANE, J.M. Diagnosis and management of orthopaedic problems commonly found in women: osteoporosis. **American Academy of Orthopaedic Surgeons 65th Annual Meeting**, New Orleans, 1998.

LI, Y. et al. Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. **Clinical Oral Implants Research**, v.23, n.9, p. 1038-1044, Sept. 2012.

MARTIN, R.M.; CORREA, P.H. Bone quality and osteoporosis therapy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.54, n.2, p. 186-199, Mar. 2010.

MEINÃO, I.M. et al. Doenças osteometabólicas. In: MOREIRA, C.; CARVALHO, M.A.P. **Noções práticas de reumatologia**. Belo Horizonte: Health, 1998. Cap. 2, p. 379-404.

MEUNIER, P.J. et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v.350, n.5, p. 459-468, Jan. 2004.

NEUPREZ, A. et al. Strontium ranelate: the first agent of a new therapeutic class in osteoporosis. **Advances in Therapy**, v.25, n.12, p. 1235-1256, Dec. 2008.

NOCITI JÚNIOR, F.H. et al. Effect of estrogen replacement and calcitonin therapies on bone around titanium implants placed in ovariectomized rats: a histometric study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.17, n.6, p. 786-792, Nov./Dec. 2002.

PAN, J. et al. Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.58, n.8, p. 877-882, Aug. 2000.

PINTO NETO, A.M. et al. Characterization of hormone replacement therapy users in Campinas, São Paulo. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n.1, p. 121-127, 2002.

PIRES, F.R. Alterações radiográficas da região maxilo-mandibular. **Revista da Associação Paulista de Cirurgões-Dentistas**, v.58, n.3, p. 173-176, set./out 2001.

RENNÓ, A.C.M. Atividade física e osteoporose: uma revisão bibliográfica. **Fisioterapia em Movimento**, v.13, n.2, p. 49-54, mar. 2001.

TERRA, N.L. **Envelhecendo com qualidade de vida: Programa Geron da PUCRS**. 2. reimp. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2002. 203p.

UNLUER, S.; GOKALP, S.; DOGAN, B.G. Oral health status of the elderly in a residential home in Turkey. **Gerodontology**, v.24, n.1, p. 22-29, Mar. 2007.

YAMAZAKI, M. et al. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v.87, n.4, p. 411-418, Apr. 1999.

ANEXO A – Comissão de ética no uso de animais UFMG**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 366 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Avaliação da aplicação tópica do Ranelato de Estrôncio no reparo ósseo periimplantar na osteoporose induzida em ratos”, que tem como responsável FERNANDO DE OLIVEIRA COSTA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/11/2015. Este certificado espira-se em 24/11/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 366 / 2015, related to the Project entitled “Evaluation of topical application of Strontium ranelate on bone healing in the peri-implant induced osteoporosis in rats”, under the supervision of FERNANDO DE OLIVEIRA COSTA, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/11/2015. This certificate expires in 24/11/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende

Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 24/11/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br