

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO**  
**MESTRADO EM IMPLANTODONTIA**

**MÁRCIO ANTONIO FARIA**

**ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DO EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO  
CLORETO DE ESTRÔNCIO EM DEFEITOS ÓSSEOS PROVOCADOS EM  
MANDÍBULA DE COELHOS.**

**São Paulo**

**2006**

**MÁRCIO ANTONIO FARIA**

**ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DO EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO  
CLORETO DE ESTRÔNCIO EM DEFEITOS ÓSSEOS PROVOCADOS EM  
MANDÍBULA DE COELHOS.**

Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro para obtenção do título de Mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração em Implantodontia, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima N. Faraco Schwed.

Cutter ..... F 235  
Patri nº 3865  
Tipo entrada ..... 2011/05  
Nota Fiscal .....  
Data rec. 22.1.12.12  
Preço .....  
Origem .....  
14.01.2012

**Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I**

F235a Faria, Márcio Antonio  
Análise histomorfológica do efeito da aplicação tópica do cloreto de estrôncio em defeitos ósseos provocados em mandíbula de coelhos / Márcio Antonio Faria. Orientação da Profa. Dra. Fátima N. Faraco Schwed. – São Paulo : 2006.  
100p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia. Universidade de Santo Amaro.

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

**MÁRCIO ANTONIO FARIA**

**ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DO EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA DO  
CLORETO DE ESTRÔNCIO EM DEFEITOS ÓSSEOS PROVOCADOS EM  
MANDÍBULA DE COELHOS.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação, nível mestrado, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração: Implantodontia.

Aprovado: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
**Profª Drª Fátima N. Faraco Schwed**  
Drª em Clínica Integrada pela Universidade de São Paulo

  
\_\_\_\_\_  
**Profº Dr. Waldyr Antonio Jorge**  
Prof. Livre Docente em Clínica Integrada pela Universidade de São Paulo

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Nelson Villa**  
Prof. Adjunto do Departamento de Histologia e Embriologia do ICB - USP

CONCEITO FINAL: \_\_\_\_\_

OBSERVAÇÃO:  
\_\_\_\_\_



## DEDICATÓRIA

**À minha esposa Malvina**, companheira de todos os momentos, bons ou ruins, pela compreensão e apoio, e por me ensinar a superar todos os obstáculos que surgiram e, que com certeza surgirão, em minha vida. Sua paciência e compreensão são um tesouro e um privilégio para mim;

**À Professora Dr<sup>a</sup> Fátima N. Faraco Schwed** por sua orientação e paciência;

**Ao Professor Dr. Nelson Villa** que, com sua sabedoria e amizade colaborou inestimavelmente com a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por permitir que este seu filho pudesse cumprir mais uma etapa em sua vida, na busca do constante aperfeiçoamento como ser humano.

À Professora Dr<sup>a</sup> Fátima N. Faraco Schwed pela permanente disposição e orientação neste estudo e por acreditar na sua realização;

Ao Professor Dr. Nelson Villa pelas inúmeras horas de conversas e conselhos e por sua inestimável participação na orientação desta dissertação. Sua amizade é o maior dos prêmios;

Ao Professor Dr. Wilson Roberto Sendyk por ter propiciado esta oportunidade de participar deste programa de mestrado;

Ao Professor Alfredo Gromatsky por suas orientações e antiga amizade;

Ao Professor José Luiz De Lorenzo pelo apoio e incentivo sempre presente.

À Biblioteca da UNISA, em especial à Luciana Cristina Costa Marangoni pelo sempre pronto atendimento em nossas necessidades.

À secretária da pós-graduação, Juliana Selma Oliveira, por seu companheirismo e ajuda sempre presentes.

A todos os meus amigos, colegas de turma deste curso de mestrado, por sua paciência e amizade.

À UNISA pela oportunidade de realizar esta dissertação.

Enfim, a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar *in vivo* a influência da aplicação tópica do cloreto de estrôncio no crescimento ósseo em defeitos realizados em mandíbula de coelhos da raça *New Zealand*, fêmeas. Utilizou-se 12 animais para a criação dos defeitos ósseos na região lateral de mandíbula, bilateralmente. Portanto foram realizadas 24 cirurgias padronizadas com o uso de brocas trefinas de 5,0 mm. Nos defeitos do lado direito foram implantadas esponjas de colágeno reabsorvíveis embebidas em soro fisiológico (grupo controle). Nos defeitos do lado esquerdo, foram implantadas esponjas reabsorvíveis embebidas em solução de cloreto de estrôncio a 2M (grupo teste). Todos os defeitos foram cobertos com membranas reabsorvíveis de colágeno, as quais foram fixadas com parafusos de titânio. Os animais foram divididos em 4 grupos de 6 animais, de acordo com a data de sacrifício: Grupo A (controle de 28 dias); Grupo A1 (teste de 28 dias); Grupo B (controle de 56 dias); Grupo B1 (teste de 56 dias). Após o sacrifício as amostras foram analisadas e a avaliação do crescimento ósseo foi realizada com o auxílio de microscopia de luz. Os resultados encontrados na análise de 28 dias demonstraram que houve um maior crescimento ósseo no grupo teste (A1) em relação ao grupo controle(A). No Grupo A (controle) predominou a presença de um tecido conjuntivo denso com a presença de infiltrado inflamatório crônico. Nas amostras de 56 dias observou-se também uma maior taxa de formação óssea no grupo B1 (teste 56 dias) em relação ao grupo B (controle 56 dias), sugerindo que o cloreto de estrôncio em uso tópico estimulou de forma favorável a reparação óssea neste experimento.

**Palavras chaves:** Estrôncio, Cloreto, Regeneração óssea.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to analyze *in vivo* the influence of the topical application of the strontium chloride in the bone growth in defects accomplished in jaw of rabbits of the race New Zealand, female. It was used 12 animals for the creation of the bone defects in the lateral area of jaw, bilaterally. Therefore 24 surgeries were accomplished standardized with the use of 5.0 mm trephine drills. In the defects on the right side, resorbable collagen sponges were implanted, soaked in physiologic serum (group control). In the defects on the left side, resorbable collagen sponges were implanted, soaked in 2M solution of strontium chloride (group test). All of the defects were covered with resorbable collagen sponges, which were fastened with screws of titanium. The animals were divided in 4 groups of 6 animals, in agreement with the sacrifice date: group A (controls of 28 days); Group A1 (tests of 28 days); Group B (controls of 56 days); Group B1 ( tests of 56 days). After the sacrifice the samples were analyzed and the evaluation of the bone growth was accomplished with the aid of light microscopy. The results found in the analysis of 28 days demonstrated that there was a larger bone growth in the test group (A1) in relation to the control group (A). In the Group A (controls) the presence of a dense connective tissue prevailed with the presence of chronic inflammatory response. In the samples of 56 days was also observed a larger tax of bone formation in the group B1 (test 56 days) in relation to the group B (control 56 days), suggesting that the strontium chloride in topical use stimulated in a favorable way the bone repairing in this experiment.

**Key words:** Strontium, Chloride, bone Regeneration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Incisão e exposição da mandíbula.....	63
Figura 2. Exposição da espessura total da mandíbula.....	63
Figura 3. Confeção do defeito ósseo.....	64
Figura 4. bloco trefinado.....	64
Figura 5. Defeito aberto com perfurações para fixação da membrana.....	65
Figura 6. Medição da profundidade do defeito.....	65
Figura 7. Medição da largura do defeito.....	66
Figura 8. Esponja de colágeno.....	66
Figura 9. Esponja inserida no defeito.....	67
Figura 10. Membrana hidratada.....	67
Figura 11. Adaptação da membrana reabsorvível.....	68
Figura 12. Fixação da membrana.....	68
Figura 13. Sutura interna.....	69
Figura 14. Sutura externa.....	69
Figura 15. Grupo A (controle 28 dias) Tecido conjuntivo denso animal 1 H.E.40 X.....	70
Figura 16. Grupo A Grupo A (controle 28 dias). Tecido ósseo primário. H.E. (250X).....	71
Figura 17. Grupo A (controle 28 dias). Tecido conjuntivo, animal 2. Mallory (40X).....	71
Figura 18. Grupo A (controle 28 dias). Infiltrado inflamatório, animal 3. H.E. (40X).....	72
Figura 19. Grupo A (controle 28 dias). Infiltrado inflamatório. H.E. (400X).....	72
Figura 20. Grupo A (controle 28 dias). Ossificação intramembranosa. H.E. (400X).....	73
Figura 21. Grupo A (controle 28 dias). Centros de ossificação, animal 4. H.E. (100X).....	74
Figura 22. Grupo A1 (teste 28 dias). Tecido conjuntivo, animal 1. Mallory. (40X).....	75
Figura 23. Grupo A1 (teste 28 dias). Tecido conjuntivo, animal 2. H.E. (40X).....	75
Figura 24. Grupo A1 (teste 28 dias). Crescimento aposicional, animal 2. H.E. (250 X).....	76
Figura 25. Grupo A1 (teste 28 dias). Medula e vaso sanguíneo, animal 2. H.E. (100 X).....	76
Figura 26. Grupo A1 (teste 28 dias). Osteoblastos secretores. H.E. (400 X).....	77

Figura 27. Grupo A1 (teste 28 dias). Linhas de crescimento. H.E. (100X).....	78
Figura 28. Grupo A1 (teste 28 dias) Osteócitos jovens. H.E. (100X). ....	78
Figura 29. Grupo A1 (teste 28 dias) Feixes de colágeno. H.E. (100X).....	79
Figura 30. Grupo A1 (teste 28 dias). Tecido ósseo neoformado. H.E. (40X).....	79
Figura 31. Grupo B (controle 56 dias) Tecido conjuntivo, animal 1. Mallory.(40X).....	80
Figura 32. Grupo B (controle).Tecido ósseo neoformado, animal 2. H.E.(40X).....	81
Figura 33. Grupo B (controle 56 dias). Diferenciação de osteoblastos. Gabe. (100X). ....	81
Figura 34. Grupo B (controle 56 dias). Osteoblastos. Gabe. (100X).....	82
Figura 35. Grupo B1 (teste 56 dias). Medula óssea, animal 1. H.E.(40X).....	82
Figura 36. Grupo B1 (teste 56 dias). Medula óssea. H.E. (100X).....	83
Figura 37. Grupo B1 (teste 56 dias) Sistema externo. Gabe. (100X).....	84
Figura 38. Grupo B1 (teste 56 dias). Cortical externa. Gabe. (40 X).....	84
Figura 39. Grupo A Controle aos 28 dias H.E.100x .....	85
Figura 40. Grupo A1 teste aos 28 dias H.E. 100 X.....	85
Figura 41. Grupo B controle aos 56 dias H.E. 100X.....	85
Figura42.Grupo B1 teste aos 56 dias Gabe 100X.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ciclo de Remodelação Óssea Cortical.....29

Tabela 2. Curso de tempo do desenvolvimento da interface de  
um implante endoosseo no osso cortical.....30



## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMP = proteína morfogenética óssea

Ca = cálcio

CaR = receptor celular para cálcio

CaSr = receptor celular para estrôncio

D.N.A. = ácido desoxirribonucleico

E.D.T.A. = ácido etilenodiaminotetracético

Gen-derm = membrana de cortical de osso bovino

Hemospon = esponja de colágeno reabsorvível

mM = milimolar

M = molar

MDGF = fator de crescimento derivado de macrófagos

$\mu$ M = micromolar

PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas

PRP = plasma rico em plaquetas

PTH = paratormônio

R.N.A.m = ácido ribonucléico mensageiro

$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  = cloreto de estrôncio hexa-hidratado

Sr = estrôncio

UNISA = Universidade de Santo Amaro

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Divisão dos grupos experimentais.....	59
---	----

## SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE QUADROS

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 O Tecido Ósseo.....	19
2.1.1 Tecido ósseo primário e secundário.....	19
2.1.2 Células Ósseas.....	20
2.2 Fisiologia e Metabolismo Ósseos.....	22
2.3 Histodinâmica do Processo de Reparação Óssea.....	24
2.3.1 Eventos Precoces do Reparo Ósseo.....	25
2.4 Regeneração Óssea.....	28
2.4.1 Neoformação Óssea.....	28
2.4.2 Remodelação.....	28
2.4.3. Modelação Óssea.....	30
2.5 Regeneração Óssea em uma ferida cirúrgica.....	31
2.6 Estrôncio.....	31
3 PROPOSIÇÃO.....	53
4 MATERIAL E MÉTODO.....	54
4.1 Material.....	54
4.1.1 Material Permanente.....	54
4.1.2 Material de Consumo.....	55
4.1.3 Drogas Utilizadas.....	56

4.2 Método.....	57
4.2.1 Planejamento do Experimento.....	58
4.2.2 Delineamento do Estudo.....	58
4.2.3 Preparo dos Animais.....	59
4.2.4 Técnica Cirúrgica.....	60
4.3 Dinâmica do Experimento.....	62
4.4 Seqüência Fotográfica do Estudo.....	63
5 RESULTADOS.....	70
5.1 Análise Histomorfológica.....	70
5.1.1 Grupo A (controle 28 dias).....	70
5.1.2 Grupo A1 (teste 28 dias).....	74
5.1.3 Grupo B (controle 56 dias).....	80
5.1.4 Grupo B1 (teste 56 dias).....	82
5.1.5 Comparativo Ilustrativo entre as Amostras.....	85
6 DISCUSSÃO.....	86
7 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXOS.....	100

## 1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, vascularizado e muito celularizado que apresenta alto metabolismo, respondendo aos estímulos incidentes de diversas formas.

A formação deste tecido realiza-se através da produção celular de uma matriz orgânica capaz de receber mineral, tendo como pré-requisitos a atividade de uma enzima denominada fosfatase alcalina e um bom suprimento sanguíneo. Esta síntese envolve numerosos processos complexos, relacionados com esta enzima, com as células e com o metabolismo ósseo. (DOUGLAS, 2000)

O tecido ósseo é altamente evoluído. Sua rigidez e resistência se devem a uma estrutura tridimensional constituída de feixes de fibras de colágeno do tipo I associada à alta impregnação mineral desta matriz por cristais de hidroxiapatita, sendo altamente dinâmico, e apresentando um processo de renovação tecidual constante, o que previne o seu envelhecimento.

Dependendo dos fatores que agem sobre o tecido ósseo, ele pode responder com processos de reabsorção ou de deposição ósseas, que representam a fisiologia normal deste tecido. O processo de reparação óssea depende destes mecanismos de deposição e reabsorção, que são essenciais ao sucesso das diversas condutas clínicas realizadas nas várias especialidades, como por exemplo, a periodontia, a cirurgia e mais recentemente a implantodontia.

Buscam-se, atualmente, através de pesquisas científicas, mecanismos e conhecimentos que possam otimizar o processo de reparação óssea com conseqüente melhoria dos resultados. (BRANDI, 1993)

Seria muito útil desenvolver condições que não somente melhorassem a qualidade da reparação óssea como também acelerassem este processo, trazendo ao clínico e ao paciente maior previsibilidade nos procedimentos que envolvem este tecido.

Pesquisadores têm estudado exaustivamente formas de incentivar as condições de neoformação óssea, aumentando as possibilidades de osteoindução, estimulando a síntese óssea, principalmente naquelas situações onde não seria mais possível a presença deste tecido. Buscam também um maior controle nos processos de reabsorção óssea. (BRANDI, 1993)

Deste modo, seria possível criar uma situação ideal para que os implantes osseointegrados conseguissem atingir seus objetivos de reabilitar as áreas edêntulas, parciais ou totais, de nossos pacientes.

Sabe-se, por outro lado, que os minerais e elementos residuais afetam a formação e a reabsorção ósseas, através dos efeitos diretos ou indiretos nas células ósseas ou no mineral ósseo. Assim sendo, muito se tem estudado a respeito de substâncias que possam cumprir este papel, como por exemplo, Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs), Plasma Rico em Plaquetas (PRP) , Hormônio do Crescimento Humano e mais recentemente, íons semelhantes ao cálcio, tais como o estrôncio.

Alguns elementos residuais relacionados quimicamente ao cálcio, como o estrôncio, têm efeitos farmacológicos no osso quando presentes em níveis mais altos do que aqueles requeridos para o funcionamento normal das células.

O estrôncio é um dos metais alcalinos terrosos. Foi descoberto em 1790 numa mina próxima de um vilarejo escocês chamado Strontian e foi isolado em

1808. Ele nunca aparece livre na natureza, porque oxida rapidamente, formando óxido de estrôncio, que tem uma coloração amarelada.

O sal de estrôncio, na forma de cloreto, parece agir como um agonista de osteoblastos e um bloqueador da replicação e função dos osteoclastos, funções estas que podem ser explicadas pela ativação de receptores de Ca.

Importante seria salientar que o cloreto de estrôncio tem sido exaustivamente estudado na área médica, especificamente quanto ao tratamento do processo de osteoporose. Porém, na Odontologia, ainda não existe uma literatura científica significativa, sobretudo na especialidade da implantodontia, e portanto, este poderia ser um vasto campo a ser explorado.

Diante da constatação da eficácia terapêutica do estrôncio nas várias especialidades da Medicina imaginamos que, devido às suas propriedades farmacológicas sobre o osso, o cloreto de estrôncio poderia contribuir positivamente no processo de remodelação óssea. Portanto este trabalho tem a finalidade de verificar se as tais propriedades farmacológicas podem ser observadas em um modelo animal (coelhos).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 O Tecido ósseo**

#### **2.1.1. Tecido ósseo primário e tecido ósseo secundário**

Segundo Tem Cate (1998), o tecido ósseo consiste em 33% de matriz orgânica, dos quais 28% é colágeno tipo I e os outros 5 % proteínas não colagenosas, tais como osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética óssea, proteoglicanas ósseas e sialoproteína óssea. A matriz orgânica é permeada por cristais de hidroxiapatita, que perfazem os 67% restantes.

O tecido ósseo pode ser dividido histologicamente em primário (imaturo) ou secundário (maduro ou Harvesiano). Em qualquer formação óssea o tecido ósseo primário é sempre o primeiro a se formar, sendo então substituído pelo tecido ósseo secundário, quando as condições assim o permitirem. (CATE, 1998)

A arquitetura do tecido ósseo primário apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções sem organização definida, menor quantidade de minerais e maior porcentagem de osteócitos que o tecido ósseo secundário (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1999).

Já o osso maduro, seja compacto ou esponjoso, é considerado idêntico sob a luz da histologia, ou seja, constituído de camadas ou lamelas microscópicas concêntricas, que, se vistas em três dimensões, se assemelham a cilindros que seguem o longo eixo dos ossos, os chamados sistemas de Havers ou ósteons. No centro de cada sistema de Havers existe o canal de Havers, que abriga em seu interior vasos sanguíneos (CATE, 1998).



Os canais Haversianos são interligados por canais colaterais, denominados canais de Volkmann, que também abrigam vasos sanguíneos, estruturando desta forma uma rica rede vascular através do osso compacto e esponjoso (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1999).

Ao redor de cada osso compacto existe uma camada de tecido conjuntivo denso modelado, de função osteogênica, denominado periósteo, que apresenta dupla camada, sendo uma mais externa (essencialmente fibrosa) e outra mais interna (rica em células, principalmente células osteoprogenitoras, ou precursoras de osteoblastos). Este periósteo tem função essencial para a manutenção e o crescimento ósseos, pois é responsável pela irrigação sanguínea das camadas superficiais do tecido ósseo, formação de células de síntese ósseas e ainda desempenha papel importante na reparação de defeitos deste tecido (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1999).

Os ossos têm funções variadas, já que constituem o esqueleto que confere a morfologia geral do corpo, protegendo e suportando órgãos viscerais e servindo para inserções de tendões musculares. Conferem flexibilidade ao corpo, além de serem muito importantes para a manutenção da homeostase e reserva de minerais. (CALVO et al., 1996).

### **2.1.2. Células ósseas**

No tecido ósseo encontramos células distintas responsáveis pela formação, manutenção e reabsorção deste tecido. São denominadas osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, respectivamente.

Segundo Tem Cate (1998), os osteoblastos são células uninucleadas que sintetizam proteínas colagenosas e também não colagenosas. Derivam da célula mesenquimal multipotente e são responsáveis tanto pela formação da matriz orgânica óssea (osteóide) quanto pela sua mineralização. São células cubóides, ou ligeiramente alongadas, responsáveis pela matriz orgânica do osso (SODEK; MCKEE, 2000). Formam uma camada celular sobre a superfície óssea e parecem controlar a entrada e saída de íons no osso. Quando o tecido ósseo não mais está em formação, os osteoblastos que revestem a superfície do osso se tornam inativos, recebendo o nome de células de revestimento.

Os osteoblastos, quando aprisionados pela matriz óssea por eles mesmos produzida, passam a ser denominados osteócitos. Estes, por sua vez, apresentam morfologia diferente dos osteoblastos, com citoplasma elíptico, menor número de organelas e um metabolismo mais baixo. Sua função, segundo diversos autores, é produzir matriz óssea em regime de produção lento, apenas com a finalidade de manutenção da matriz óssea já construída anteriormente. Encontramos ainda, no tecido ósseo, células denominadas osteoclastos, cuja origem difere dos osteoblastos e osteócitos. Enquanto estes derivam da célula mesenquimática, os osteoclastos derivam dos monócitos, que se fundem em grande número constituindo uma célula gigante e multinucleada. O citoplasma dos osteoclastos mostra-se rico em lisossomos, permitindo que esta célula produza enzimas digestivas, principalmente a colagenase, enzima esta que agirá na desorganização do colágeno tipo I, constituinte principal da porção orgânica da matriz óssea. Além disso, os osteoclastos produzem em seu metabolismo ácidos orgânicos, que agirão na dissolução da parte mineral da matriz óssea, ou seja, nos cristais de hidroxapatita.

Desta forma, os osteoclastos são células que reabsorvem o tecido ósseo, participando fisiologicamente na dinâmica deste tecido.

## **2.2. Fisiologia e Metabolismo Ósseos**

Junqueira et al. (1999) cita que o tecido ósseo contém 99% do cálcio do organismo e atua no controle da calcemia, que deve ser mantida constante para o funcionamento normal do organismo. Há um intercâmbio contínuo entre o cálcio do plasma sanguíneo e o dos ossos, sendo este mobilizado rapidamente entre compartimentos quando necessário. Segundo este autor, há dois mecanismos básicos de transferência do cálcio dos ossos para o sangue. O primeiro se deve simplesmente à transferência dos íons dos cristais de hidroxiapatita para o líquido intersticial e daí para o sangue, por um mecanismo puramente físico, favorecido pela grande superfície dos cristais. O segundo, mais complexo, se deve à ação do hormônio da paratireóide, o paratormônio, que causa um aumento no número de osteoclastos e reabsorção da matriz óssea, com liberação de fosfato de cálcio e aumento da calcemia.

Um outro hormônio, a calcitonina, produzida pelas células parafoliculares da tireóide, inibe a reabsorção da matriz e conseqüentemente a mobilização do cálcio.

Junqueira et al. (1999) ainda cita que o tecido ósseo é muito sensível a diversos fatores nutricionais. A falta de proteínas na dieta acarreta uma deficiência dos aminoácidos necessários à síntese do colágeno pelos osteoblastos, enquanto uma deficiência de cálcio leva a uma calcificação incompleta da matriz orgânica produzida.

A deficiência de cálcio pode ser devida à falta deste íon nos alimentos ou à falta de vitamina D, que promove a absorção intestinal do mesmo. A vitamina D atua sobre o DNA nuclear das células de revestimento do intestino delgado, induzindo a produção de RNA mensageiro, responsável pela codificação da proteína transportadora de cálcio através da membrana celular.

Outra vitamina que influencia diretamente o tecido ósseo é a vitamina C, ou ácido ascórbico. Sua deficiência dificulta a síntese de colágeno por todas as células produtoras desta proteína, inclusive os osteoblastos e acarreta uma diminuição no crescimento ósseo.

Sobre os hormônios que agem sobre o tecido ósseo, Junqueira et al. (1999) citam que o hormônio do crescimento tem papel relevante. Este hormônio estimula o crescimento em geral, sendo que no caso do tecido ósseo sua ação se mostra indireta. Este hormônio age estimulando certos órgãos, principalmente o fígado, a produzir somatomedinas, que têm efeito sobre o crescimento. Quanto aos hormônios sexuais, tanto masculinos quanto femininos, têm um efeito complexo sobre os ossos, sendo, de um modo geral, estimuladores da formação de tecido ósseo. Estes hormônios influem sobre o aparecimento dos centros de ossificação.

Segundo Misch (2000) o mineral ósseo é a primeira reserva metabólica do elemento essencial cálcio. Além de seus papéis de sustentação e proteção, o tecido ósseo apresenta a função de metabolismo do cálcio. O autor explica que a fisiologia óssea é controlada por uma interação de fatores mecânicos e metabólicos, ou seja, este tecido está sujeito às forças e hormônios. Sob circunstâncias mais fisiológicas, a formação óssea é principalmente regulada pela carga funcional. Por outro lado, os mediadores biomecânicos do metabolismo do cálcio (PTH, estrogênio, vitamina D e outros) predominam no controle da reabsorção. Este autor cita que para cumprir seu

papel duplo, de suporte e metabolismo, o osso responde a um complexo conjunto de mediadores mecânicos, bioelétricos, metabólicos e locais (citocinas e fatores de crescimento). Em condições de estabilidade, a diferenciação dos osteoblastos é mecanicamente mediada, ou seja, depende do estresse ou esforço. Mas nos processos de reparação, surge uma resposta amplamente orientada pelas citocinas, fatores de crescimento locais e vascularização abundante.

Misch (2000) cita que a remodelação óssea existente neste tecido é representada pelos processos de ativação, reversão e formação, caracterizando um ciclo, que em coelhos é de cerca de 6 semanas e nos humanos, cerca de 17 semanas.

Este processo de remodelação, segundo o autor, inclui todas as alterações localizadas nos ósteons ou trabéculas individuais: modificação, hipertrofia, atrofia ou reorientação.

O tecido ósseo está constantemente sendo renovado, ativado por micro traumas. Desta forma, o osso velho está constantemente sendo substituído por osso novo, no mesmo local, causando então uma substituição total do esqueleto adulto há aproximadamente cada 10 anos. (MONOLAGAS 2000).

### **2.3. Histodinâmica do Processo de Reparação Óssea**

Segundo Davis (2000), a diferença entre remodelação óssea e reparo ósseo é a presença de sangue extra vascular.

Na remodelação óssea, as células osteogênicas são derivadas de células perivascularres que atingem a superfície óssea a ser remodelada. Já numa fratura e reparo ósseos, a população de células osteogênicas é derivada da medula óssea,

incluindo células mesenquimais indiferenciadas, osteócitos e osteoblastos. Nesse caso, a população de células osteogênicas migra direto através de um arcabouço formado pelo coágulo sanguíneo.

O tecido ósseo atravessa três processos importantes no processo de regeneração que são: (1) osteocondução, que consiste na migração de células osteogênicas diferenciadas; (2) formação de tecido ósseo neoformado, que é o produto da mineralização da matriz óssea constituída; (3) remodelações ósseas, caracterizadas pelo dinamismo do tecido ósseo, remodelando os ósteons constantemente por meio de formação de novo osso.

Ósteon ou sistema Harvesiano, no osso adulto, é o conjunto anatômico constituído por fibras colágenas e cristais de hidroxiapatita, que se orientam concentricamente ao redor de um vaso sanguíneo (DOUGLAS et al., 2000).

### **2.3.1. Eventos precoces do reparo ósseo**

Em mamíferos ocorre a total reconstituição óssea em estados a estados de pré-injúria. Por esta razão, Brighton, Walter e Talbot (1984, 1996 apud PERRI et al., 2002) afirmaram que a terminologia deve ser regeneração óssea ao invés de reparo.

A hemorragia que acontece numa loja óssea cirúrgica resulta em formação de coágulo e leva ao desenvolvimento de fibrina. Outros dois mecanismos além da formação do coágulo contribuem para a homeostasia. A vaso constrição faz diminuir o sangramento, a retração do coágulo condensa o tampão hemostático e reduz o tamanho do sítio da ferida. Estes são eventos importantes para o reparo por duas razões: (1) os componentes biológicos iniciais são proteínas e outras macromoléculas, além de células que interagirão subsequentemente iniciando suas

funções metabólicas; (2) a liberação de citocinas e fatores de crescimento das plaquetas degranuladas em coágulo sanguíneo têm um efeito estimulador na regeneração de fraturas. Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) têm mostrado ser estimuladores da mitose para fibroblastos e células ósseas e o fator de crescimento de transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) aparece em trombos de fraturas, estimulando a formação de colágeno do tipo I pelas células ósseas. O período de vida das plaquetas em uma ferida e a direta influência dos fatores de crescimento é menor do que cinco dias (MARX et al., 1998).

O PDGF também é sintetizado e secretado por outras células, como macrófagos e células endoteliais. Considera-se o primeiro fator de crescimento presente em uma ferida e em estágios iniciais de cicatrização dos tecidos conjuntivos, incluindo regeneração e reparo ósseo. O PDGF age aumentando a população de células de cicatrização, estimulando a replicação de células tronco da medula e osteoblastos do endóstio, estimulando a angiogênese e a ativação de macrófagos (MARX et al., 1998).

Quanto ao TGF- $\beta$ , faz da parte da superfamília de fatores de crescimento e diferenciação, dentre os quais se encontra a BMP. São divididos em TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2. Da mesma forma que o PDGF, são sintetizados e encontrados nas plaquetas e nos macrófagos, e quando liberados por sua degranulação, ou ativamente sintetizados e secretados por macrófagos, atuam como fatores de crescimento parácrino (Fator de crescimento produzido por uma célula que agirá em uma outra célula adjacente), afetando fibroblastos, células tronco da medula óssea e pré-osteoblastos. Entretanto, cada uma destas células tem também a habilidade de sintetizar e secretar sua própria proteína TGF- $\beta$  para atuar sobre outras células, ou atua sobre si, agindo em sua própria membrana. O TGF- $\beta$  representa então um

mecanismo estimulador de uma cicatrização a longo prazo e controla a regeneração óssea. A função principal do TGF-b1 e do TGF-b2 é considerada a quimiotaxia e a estimulação da multiplicação de pré-osteoblastos. Também agem inibindo a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea. Age também estimulando a quimiotaxia de macrófagos, que servirão de rica fonte de fatores de crescimento, a partir do terceiro dia (MARX et al., 1998).

O tecido ósseo é altamente povoado por células osteoprogenitoras e estas, por meio de sucessivas mitoses, dão origem a outras células ósseas. Em condições emergenciais, as diferenciações celulares provenientes das células osteoprogenitoras se mostram insuficientes para o processo de cura, participando, desta forma, outras células mitoticamente competentes neste processo. Numa ferida óssea, o bloqueio da circulação sanguínea causa isquemia local e necrose das bordas da ferida. Esta necrose acontece por falta de oxigenação dos osteócitos, que em condições normais não se situam a mais do que 0,1 mm de um capilar sanguíneo. Ocorre a diapedese de leucócitos através do coágulo determinada por fatores quimioatrativos, como a PDGF e a TGF- $\beta$ , servindo esta necrose, então, como atrativo dos leucócitos. Primeiramente os neutrófilos, primeira linha de defesa do organismo, depois os macrófagos. Os dois tipos celulares citados estão envolvidos na desestruturação do coágulo e remoção do tecido necrótico por atividade de fagocitose e digestão intra e extracelulares. (PERRI et al., 2002)



## **2.4 Regeneração óssea**

### **2.4.1. Neoformação óssea**

Davis (2000) utiliza o termo formação óssea "de novo" para descrever a nova formação de tecido ósseo que ocorre durante o crescimento aposicional. O novo osso formado em sítios de remodelação representa a diferenciação e a secreção inicial de matriz por uma população de células osteogênicas.

### **2.4.2. Remodelação**

A remodelação ocorre quando há o equilíbrio entre o processo de formação óssea e o processo de reabsorção, em que o osso é gradualmente substituído. Marx e Garg (1998) afirmaram que 0,7% do esqueleto humano é reabsorvido diariamente e repostado por osso saudável e que a remodelação de todo o esqueleto demora 142 dias. A célula responsável por este processo é o osteoclasto, que já foi descrito anteriormente.

Remodelação óssea é definida por Roberts et al. (1987) como um turnover ou reestruturação interna da estrutura óssea pré-existente. É um fenômeno em nível tecidual em que ocorre a ativação (A) de células precursoras ósseas, resultando em uma seqüência de atividades (1) de reabsorção (R), (2) quietude (Q) e (3) formação (F). A duração do ciclo de remodelação A-R(Q)-F, referida por Roberts (1987) é de cerca de 6 semanas para coelhos, 12 semanas para cachorros e 17 semanas para homens. Fase de quietude (Q) é um período de reversão onde os osteoclastos são substituídos por osteoblastos. O resultado da fase de formação (F) é o que tem

maior variação entre as espécies. A cavidade é preenchida em 4, 5, 10 ou 13 semanas para coelhos, cachorros e para o homem, respectivamente. A média de duração do ciclo de remodelação A-R(Q)-F é diretamente proporcional ao tamanho do animal. Usando o coelho como base e sendo ele X, os fatores para eventos similares em cachorros e humanos são 2X e 3X, respectivamente (Tabela 1). A remodelação da interface osso implante, em osso cortical de um coelho com 6 a 18 meses de vida corresponde a 17 semanas no humano. (MARX, GARG, 1998)

Tabela 1.

**Tabela 1 - Ciclo de remodelação óssea cortical**

	Coelho	Cachorro	Homem
<i>Ativação (A)</i>	0,5 semanas	0,5 semanas	1,0 semanas
<i>Reabsorção (R)</i>	1,0	1,5	2,0
<i>Quiétude (Q)</i>	0,5	1,0	1,5
<i>Formação (F)</i>	4,5	10,0	13,0
<i>A-R-(Q)-F</i>	6,0	12,0	17,0
<i>Fator</i>	X	2X	3X

**Tabela 2 – Curso de tempo do desenvolvimento da interface de um implante endoosseo no osso cortical.**

	<b>Coelho</b>	<b>Homem (3X)</b>
<b><i>Modelação da superfície</i></b>		
<b>Estágio 1: Formação do calo</b>	<b>2 semanas</b>	<b>6 semanas</b>
<b>Estágio 2: Compactação lamelar</b>	<b>6 semanas</b>	<b>18 semanas</b>
<b><i>Remodelação</i></b>		
<b>Estágio 3: Remodelação da interface</b>	<b>6 semanas</b>	<b>18 semanas</b>
<b><i>Estágio 4: Maturação compacta</i></b>	<b>18 semanas</b>	<b>54 semanas</b>

Frame (1980) cita que animais de grande porte são caros e necessitam de amplos espaços para serem mantidos. Para superar essas dificuldades, têm-se utilizado animais de pequeno porte, como ratos e coelhos, nos quais os defeitos ósseos são pequenos. Estes animais mostram uma boa cicatrização óssea.

### **2.4.3. Modelação óssea**

Marx e Garg (1998) chamam de modelação a qualquer mudança no tamanho ou forma de um osso. Este processo pode ser resultante de aposição de matéria óssea sobre uma superfície ou de sua destruição através de processo de reabsorção.

## 2.5 Regeneração óssea em uma ferida cirúrgica

Quando se realiza uma ferida cirúrgica, a sua periferia irá sofrer um processo de necrose devido à falta de irrigação sanguínea e conseqüente morte de osteócitos (DAVIS, 2000). Um gradiente de concentração é criado entre o tecido ósseo saudável que é normóxico e o tecido ósseo necrótico que é hipóxico. Esse gradiente de concentração estimula a quimiotaxia de macrófagos, que iniciam a síntese do fator de crescimento derivado de macrófagos (MDGF). As plaquetas no interior do coágulo degranulam e liberam PDGF. A associação de MDGF e PDGF estimula a angiogênese e a mitose de células osteocompetentes.

Urist (1965) descreveu as fases da reabsorção óssea como sendo: desmineralização da matriz óssea e sua digestão da porção orgânica. Segundo o autor, com a ação dos osteoclastos há a produção de ácidos orgânicos insolúveis, os quais dissolvem a parte mineral da matriz sem, no entanto, alterar as proteínas morfogenéticas ósseas, que são liberadas, agindo na superfície das células mesenquimais indiferenciadas. Este processo leva a uma alteração destas células, levando-as a uma diferenciação celular, surgindo os osteoblastos secretores que produzem novo osso.

## 2.6 Estrôncio

Nielsen et al. (2004), em seu trabalho, citam que o estrôncio foi descoberto em 1790 numa mina próxima de um vilarejo escocês chamado Strontian e foi isolado em 1808. É um dos metais alcalinos terrosos. Ele nunca ocorre livre na natureza, porque o estrôncio metálico oxida rapidamente formando óxido de estrôncio, que

tem uma coloração amarelada. O estrôncio natural é uma mistura de 4 isótopos estáveis: Sr 84(0,56%), Sr 86(9,86%), Sr 87(7,02%) e Sr 88(82,56%). Os elementos do grupo 2 da tabela periódica ao qual o estrôncio pertence, junto com o Cálcio e o Magnésio, formam cátions bivalentes nos fluidos biológicos, e formam vários graus de ligação protéica nos fluidos biológicos, como soro e plasma. A ligação protéica do estrôncio no soro ou plasma é da mesma ordem de magnitude do cálcio. Pode-se observar que o Sr é um traço de metal no organismo humano (0.00044% da massa corporal). Os íons radioativos de Sr somente são usados com propósitos de diagnóstico. Têm sido usados como excelentes ferramentas em estudos cinéticos, substituindo o Ca em investigações cinéticas porque os dois íons se comportam de maneira muito parecida no organismo humano. Ambos têm propriedades de afinidade óssea. Entretanto, existem diferenças biológicas entre os dois elementos, explicadas em parte pelo grande tamanho da molécula de Sr. Vias de transporte comuns para o Ca e o Sr têm sido descritas para muitos órgãos. O Sr compete com o Ca na absorção intestinal, reabsorção tubular renal e outros.

Segundo este autor, O Sr compreende 0,02 a 0,03% da crosta terrestre, derivado da água. Sua concentração na água potável varia entre 0,001 e 39 mg/L. Sintomas tóxicos devidos à overdose de Sr não têm sido relatados em humanos.

A noção de que os íons regulam o metabolismo ósseo não é nova. Atualmente, este conceito tem ganhado grande interesse por parte dos pesquisadores, e há inúmeras evidências experimentais que suportam este fato.

Rasmussem et al., (1970), em sua revisão, relataram que as investigações sobre o processo de mineralização óssea têm demonstrado a direta relação entre o conteúdo mineral do plasma e fluidos extracelulares, com sua habilidade em induzir a calcificação. Segundo estes autores, evidências recentes mostram que as células

ósseas, como os osteoblastos e células osteoprogenitoras constituem uma membrana efetiva que separa os fluidos extracelulares dos fluidos ósseos. Estas células não somente controlam a síntese de matriz orgânica óssea como também regulam o intercâmbio de íons entre fluidos extracelulares e o colágeno ósseo. Os autores citaram que usualmente as células ósseas são classificadas em 5 grupos: 1) osteoblastos ativos, 2) osteoblastos em repouso, 3) osteócitos, 4) osteoclastos, 5) células precursoras ou mesenquimais. Afirmaram ainda que os osteócitos e osteoblastos em repouso possuem atividade metabólica, formando unidades funcionais do osso, relacionadas com a homeostasia dos íons. Eles formam um sincício funcional de membranas cobrindo a superfície do osso e separando o fluido extracelular do osso. Um sistema de membranas regula, então, o intercâmbio de íons entre um compartimento especializados. Para os autores parece claro que os íons, principalmente os divalentes, são de grande importância na regulação do metabolismo ósseo.

Ferraro et al. (1983) em seu estudo com osso alveolar de ratos demonstram que tanto o cálcio como o estrôncio, em altas concentrações locais, estimulam a formação óssea. O osso neoformado pela ação do estrôncio não era mais suscetível quanto à ação dos osteoclastos.

Matsumoto (1988) demonstrou o efeito anti-reabsortivo e osteoestimulador do cloreto de estrôncio. Utilizando células de calvária de camundongos em cultura, sob a ação da prostaglandina E<sub>2</sub>, cuja ação é estimuladora da reabsorção óssea in vitro, administrou cloreto de estrôncio na concentração de 1 mM. O processo de reabsorção foi inibido, atingindo-se a maior taxa de inibição com o concentração de 5 mM. Sugere-se que, metabolicamente, o estrôncio inibe a síntese de PTH e vitamina D3 e estimula a secreção de calcitonina.

Brandi (1993) relatou que o estrôncio estável é um elemento natural largamente encontrado na crosta terrestre. Embora o estrôncio seja quimicamente análogo ao cálcio e interaja com este, sua absorção intestinal e atividade biológica parecem não interagir adversamente com o metabolismo do cálcio. Segundo este autor, quando a ingestão oral de estrôncio é intensificada, ocorre reposição de cálcio e sua deposição parece ser preferencialmente nas áreas de remodelação óssea ativa. Porém, doses maciças de estrôncio se mostram desvantajosas, uma vez que podem levar ao raquitismo por estrôncio. O autor ainda cita que dois estudos clínicos relataram que baixas doses de estrôncio administradas à pacientes com osteoporose resultaram em aumento da massa óssea vertebral. Além disso, estudos de curto prazo com administração de baixas doses de estrôncio demonstraram, através de histomorfometria, índices de aumento ósseo na crista ilíaca de pacientes com osteoporose. O trabalho do autor ainda relata que estudos em animais têm demonstrado que baixas doses de cloreto de estrôncio estimulam a formação óssea e inibem a sua reabsorção. Estudos pré-clínicos claramente indicam que baixa dose do sal de estrôncio tem efeito anabólico no osso, diminuindo a sua reabsorção e mantendo uma relativamente alta taxa de formação óssea.

Morohashi et al. (1994) estudaram a qualidade dose-dependente do sal de estrôncio. Demonstraram que doses excessivas podem causar distúrbios no metabolismo do cálcio. Através de seu trabalho, determinaram a dose que não afetaria toxicamente o metabolismo do cálcio e o cálcio existente no tecido ósseo. Determinaram que doses abaixo de 175  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ , administradas oralmente na dieta, não exerceram qualquer efeito no metabolismo do cálcio. Determinaram também que a dose ideal para seu estudo foi de 87.5  $\mu\text{mol}/\text{dia}$ , dose na qual se detectou um aumento significativo na concentração de cálcio ósseo. Em altíssimas doses, 875

$\mu\text{mol}/\text{dia}$ , todos os parâmetros mensurados quanto ao metabolismo do cálcio apresentavam-se marcadamente diminuídos. Uma diminuição no nível de cálcio sérico e ósseo foi observada com esta dose.

Kollenkirchen (1995) demonstrou que o estrôncio é absorvido, quando por ingestão oral, pela mucosa intestinal e excretado pela urina e fezes. Em seu estudo com ratas ovariectomizadas, concluiu, através de exame histomorfométrico das metáfises tibiais, que o tratamento com sal de estrôncio (S12911) parcialmente previne a perda de osso. Além disso, a alimentação suplementada com cloreto de estrôncio causa uma efetiva mineralização e aumento da formação de osteóide em ratos.

Boivin et al. (1996), em um estudo realizado com osso ilíaco de macacos, demonstraram a distribuição do íon estrôncio no tecido ósseo dos animais tratados. Utilizaram 20 animais, divididos em 4 animais controle, 12 animais tratados oralmente com estrôncio nas doses de 750, 275 ou 100 mg/kg/dia, sacrificados ao final de 13 semanas e 4 animais tratados com doses de 750 ou 100 mg/kg/dia, sacrificados ao final de 6 semanas. A distribuição do estrôncio foi determinada e quantificada através de micro-análise de raios X e possíveis alterações nos cristais minerais foram estudadas através de difração de raios X. Nos animais controle, traços de estrôncio foram encontrados distribuídos homogeneamente através do tecido ósseo. Nos animais tratados, os traços de estrôncio só foram detectados na matriz calcificada. Nos macacos sacrificados com 13 semanas, determinou-se que o estrôncio foi incorporado dose-dependentemente na substância mineral do osso compacto e esponjoso. O íon se mostrava distribuído heterogeneamente 3 ou 4 vezes mais concentrado no novo osso que no osso pré-existente. Esta distribuição heterogênea do estrôncio pode ser explicada pelo fato de que no osso neoformado



este sal não somente se incorpora dentro dos cristais, como também se deposita na sua superfície (adsorção e intercâmbio). Em contrapartida, no osso velho o estrôncio se encontrava quase que exclusivamente na superfície dos cristais. Os autores observaram que em macacos, que foi o material deste estudo, a exposição ao estrôncio não foi seguida por modificações na matriz orgânica e não resultou em defeitos na mineralização. Porém, em ratos, a exposição a altas doses de estrôncio levou ao raquitismo, com mineralização deficiente. O exame de difração de raios X não demonstrou nenhuma alteração significativa nas características do cristal mineral. O estrôncio parece facilmente se incorporar ao cristal mineral por substituição iônica. Os autores concluíram que o estrôncio é dose-dependente e sua distribuição é altamente concentrada no osso neoformado, no qual se acumula não somente na superfície como também na intimidade dos cristais minerais de hidroxiapatita.

Cabrera et al (1999), em um trabalho de revisão, discutiram o metabolismo do estrôncio. Citaram que o trato gastrointestinal é a principal rota de entrada natural do estrôncio. A absorção do estrôncio pela mucosa gastrointestinal depende grandemente da idade, variando de 90% de absorção nas crianças até cerca de 10% nos idosos. Muitos mecanismos para a absorção do estrôncio foram postulados. Alguns autores sugerem que, ao contrário do cálcio, o estrôncio é absorvido por difusão passiva, isto é, transporte paracelular. O autor cita em seu trabalho, entretanto, que Papworth e col. propuseram duas rotas de entrada para este elemento: carreadores ativos e difusão passiva. Estes autores, em sua revisão, ainda citam que estudos experimentais têm também demonstrado que a absorção intestinal do estrôncio é gradualmente aumentada durante a gravidez e a lactação, com um máximo de absorção no final do período de lactação. Além da via de

absorção intestinal, este elemento pode ser também absorvido pelo pulmão e pele. Neste trabalho os autores ainda citam estudos que demonstram que o estrôncio e o cálcio não só partilham características comuns quanto à cinética e aspectos químicos como também exibem envolvimento similares em grande número de processos biológicos. Depois do osso, o sangue é o segundo tecido do corpo com maior concentração de estrôncio. Dados na literatura indicam que, em condições renais normais, o nível de estrôncio no sangue varia entre 10 µg/l e 217 µg/l , variando grandemente de acordo com o método de análise utilizado. Quanto à excreção, citam em seu trabalho que o estrôncio é eliminado na urina e em menor quantidade, nas fezes e suor. Ainda neste estudo, citam os efeitos do estrôncio no tecido ósseo: observa-se que, em altas doses (quantidade na alimentação ou água > 4 g/l), causa distúrbios na mineralização óssea. O mecanismo pelo qual o estrôncio exerce efeitos deletérios sobre o tecido ósseo ainda é desconhecido, segundo estes autores. Vários mecanismos podem ser avaliados. Pelo ponto de vista químico, uma hipótese razoável é que o grande tamanho do íon de estrôncio frente ao do cálcio faz com que os cristais de hidroxiapatita preferencialmente se liguem aos íons de cálcio. Porém, em grandes concentrações de estrôncio, este elemento pode deslocar o cálcio por uma troca heteroiônica. Isto aconteceria por um mecanismo puramente físico-químico, independente da ação dos osteoblastos, e resultaria numa diminuição na quantidade de cálcio ósseo. Além disso, a incorporação dos grandes íons de estrôncio nos cristais causaria uma distorção nos mesmos, prejudicando o seu crescimento a aumentando a dissolução da parte mineral do osso, com conseqüente diminuição da densidade óssea. Segundo o autor, o estrôncio apresenta a habilidade de entrar nas células via canais de cálcio e subsequentemente se ligar a sítios de ligação intracelulares, como retículo endoplasmático, afetando desta forma a

homeostasia intracelular de cálcio e processos de mineralização óssea ligados ao metabolismo do cálcio. O estrôncio parece não afetar a produção de proteínas colagenosas, produzidas pelos osteoblastos. Em baixas doses, os autores relatam que o estrôncio estimula a formação óssea e a densidade trabecular. Pensa-se que esta ação seja devida à estimulação dos osteoblastos, em razão do notável aumento na produção de osteóide por estas células, além de uma total ausência de defeitos de mineralização, ou qualquer mudança na ação e quantidade de osteoclastos ou outra célula de reabsorção. O fato do aumento de produção de osteóide não vir acompanhado de aumento nos processos de reabsorção sugerem que esta reabsorção seja prevenida.

Dahl et al. (2001) descreveram em seu estudo que a incorporação e distribuição do estrôncio no osso de ratos, macacos e humanos, após a administração oral de estrôncio (tanto o cloreto de estrôncio quanto o ranelato de estrôncio). Após a repetida administração em ratos pelo período de tempo de pelo menos 4 semanas, a incorporação de estrôncio no osso atingiu um platô. O nível máximo de estrôncio foi atingido mais rapidamente no plasma que nos ossos, e dentro de um período de 10 dias em ratos. Os níveis de estrôncio variaram de acordo com a estrutura óssea, sendo maiores nos ossos esponjosos que nos ossos corticais. Além disso, quanto aos cristais minerais, as maiores concentrações de estrôncio foram observadas nos ossos formados recentemente. Segundo estes autores, o estrôncio apresenta um efeito benéfico para o osso. Em estudos in vitro, o seu uso aumenta a replicação de células pré-osteoblásticas e estimula a formação óssea em culturas de células. Além disso, foi demonstrado que o estrôncio diminui a reabsorção óssea in vitro. Estes efeitos, observados tanto em células isoladas quanto em cultura de tecidos, também foram encontrados in vivo. Os autores ainda

afirmam que tratamentos com baixas doses de estrôncio (316 – 634 mg/kg/dia), administrado na forma de cloreto ou ranelato, por 9 a 26 semanas, estimularam a formação óssea e diminuíram a reabsorção em roedores e humanos, resultando num aumento do volume de osso esponjoso, enquanto a mineralização se mostrava normal. Para os autores o tratamento com estrôncio esta associado a um aumento da formação de osteóide e superfícies de osteoblastos, mostrando que o número de áreas de neoformação óssea se mostra aumentado. O osso neoformado pelo tratamento com estrôncios se mostra mecanicamente mais resistente. Os autores relataram ainda que não houve nenhuma alteração no crescimento ou na massa corpórea em estudos longos, nem tampouco alterações detectáveis nos processos de mineralização, química óssea ou mineralização da matriz orgânica. Sendo assim, segundo os autores, estes resultados indicam que o estrôncio aumenta o número de osteoblastos e diminui o número e atividade dos osteoclastos, quando em baixas doses.

Marie et al. (2001), em um estudo de revisão, relataram que os processos de reabsorção e formação ósseas são governados por uma grande variedade de agentes reguladores sistêmicos e locais. Além disso, os minerais e outros elementos afetam direta ou indiretamente a formação óssea através de efeitos celulares. Alguns elementos quimicamente relacionados ao cálcio, como o estrôncio, têm efeitos farmacológicos no osso quando presentes em níveis maiores do que aqueles requeridos pela fisiologia normal das células. Estes autores citam que o estrôncio exerce diversos efeitos nas células ósseas e que, além de sua ação antireabsortiva, parece exercer uma função anabolizante no osso. Neste estudo relatam que o estrôncio é dose-dependente e que em altas doses causa efeitos deletérios no tecido ósseo, como por exemplo, raquitismo. Os autores descrevem, ainda, que o

estrôncio estimula a síntese de DNA e de colágeno por células em cultura de calvária de ratos. Estas células parecem poder discriminar entre estrôncio e cálcio, pois não reagem da mesma forma quando expostas à administração de cálcio. Isto sugere um efeito específico do estrôncio nas células ósseas.

Ferraro et al. (2001) estudaram o efeito do cloreto de estrôncio sobre o osso alveolar de ratos. Utilizaram 32 ratos Sprague-Dawley, divididos em quatro grupos experimentais. Os animais receberam implantes de esponjas de Gelfoam e foram divididos em: grupo I, que recebeu implantes de Gelfoam, não tratados, supraperiostealmente. Grupo II, que recebeu implantes de Gelfoam tratados com cloreto de estrôncio, supraperiostealmente. Grupo III, que recebeu implantes de Gelfoam não tratados, subperiostealmente e Grupo IV, que recebeu esponjas de Gelfoam tratadas com cloreto de estrôncio, subperiostealmente. As esponjas de Gelfoam foram tratadas da seguinte forma: pesaram-se peças de 10 mg de esponjas que foram embebidas em solução 2M de cloreto de estrôncio. Após serem embebidas, as esponjas foram secadas ao ar e novamente pesadas, constatando um peso de 25 mg  $\pm$ 1, calculados para prover 8,25 mg de estrôncio. Num intervalo de uma semana, um rato de cada grupo foi sacrificado. Os resultados obtidos foram os seguintes: em todos os espécimes houve a formação de tecido mole na cirurgia após 5 semanas. Não houve alteração radiográfica no osso. Microscopicamente, encontrou-se uma resposta inflamatória crônica no grupo I que circunscreveu a Gelfoam, resolvida na quinta semana. Para o grupo II, houve uma resposta inflamatória crônica ao redor da Gelfoam, e um novo tecido ósseo se formou na face externa do osso maxilar a partir de 1 semana. A resposta inflamatória desapareceu na quinta semana. Remodelação para osso do tipo cortical foi observada a partir da semana 6 a 8. Para o grupo III, encontrou-se uma reação inflamatória crônica

marcada por uma proliferação de tecido conjuntivo vascularizado. Este processo se resolveu na semana 6 e não houve evidências de formação óssea. Para o grupo IV, encontrou-se uma inflamação granulomatosa. Ela persistiu até a semana 5, com uma formação reativa de tecido ósseo, incluindo esclerose das trabéculas. Pela semana 7, uma grossa camada de osso cortical pode ser observada. Através destes resultados, os autores acham razoável assumir que a osteogênese pode ser estimulada pela presença local do íon de estrôncio.

Verberckmoes et al. (2003) descreveram os efeitos dose-dependente do estrôncio na função dos osteoblastos e na mineralização óssea. Utilizaram cultura de osteoblastos primários da calvária de ratos. Após a cultura celular estar estabelecida, foi adicionado o estrôncio na forma de cloreto ( $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) em diversas concentrações: 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 20 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As células foram mantidas em cultura por três semanas. A escolha das concentrações foi baseada em resultados de um estudo piloto "in vitro", no qual os efeitos dose-dependente do estrôncio foram demonstrados. Como controle foi utilizado um meio sem estrôncio. Os resultados obtidos foram os seguintes: comparados com o grupo controle (0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), houve uma significativa redução na produção de nódulos de cultura celular, na presença de uma mineralização intacta para os grupos de 0,5 a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de concentração de estrôncio. Isto sugere que nestas doses, o estrôncio interfere negativamente na diferenciação dos osteoblastos. Nas doses de 2 e 5  $\mu\text{g}/\text{ML}$ , tanto a formação nodular quanto a mineralização foram normais. Para as doses mais altas (20 e 100  $\mu\text{g}/\text{ML}$ ), uma grande redução na mineralização foi observada, porém na presença de uma formação celular intacta, indicando então, um efeito inibitório na formação da hidroxiapatita. Outras análises (RT-PCR) demonstraram que o estrôncio interfere nos osteoblastos em nível da síntese de RNAm de diversos genes. Os autores

confirmaram neste estudo, então, o efeito multifásico do estrôncio na formação óssea. Sugeriram que o estrôncio, em baixas doses, interfere na formação óssea em nível de osteoblastos, enquanto que em altas doses, interfere em nível físico-químico na formação dos cristais de hidroxiapatita.

Schrooten et al. (2003) estudaram os efeitos dose-dependente do estrôncio em ratos com doença renal crônica. Utilizaram quatro grupos de ratos com doença renal crônica da seguinte forma: um grupo controle (N=6), que não receberam estrôncio e três grupos de animais que receberam estrôncio oralmente durante 18 semanas, adicionando este elemento na forma de cloreto à água de beber. As concentrações dos grupos teste foram: 0,03 g/100 ml, (grupo Sr 30), 0,075 g/100 ml, (grupo Sr 75), e 0,15 g/100 ml (grupo Sr 150). Um grupo constituído de animais sem doença renal crônica e sem receber estrôncio foi utilizado como controle para os efeitos da doença renal crônica na análise histológica óssea. Os resultados mostraram que durante o experimento não houve alterações no peso corpóreo, bioquímica do soro sanguíneo, parâmetros urinários em nenhum dos grupos. No momento da eutanásia, os parâmetros de hormônio da paratireóide estavam significativamente aumentados em relação ao grupo controle de animais não doentes indicando o desenvolvimento de um hiperparatireoidismo secundário à instalação da doença renal crônica. Isto também é comprovado pela diferença histomorfológica entre os grupos, sendo demonstrado que no grupo Sr (30), houve uma dramática redução na ação dos osteoblastos, ocorrendo uma reduzida taxa de formação óssea. Interessantemente, no grupo Sr (75) não houve diferença significativa na taxa de formação óssea em relação ao grupo controle. No grupo Sr (150), entretanto, houve uma redução significativa na taxa de formação óssea e uma evidente interferência no processo e mineralização com a conseqüente formação de

defeitos de mineralização. Os autores concluíram que o papel do estrôncio no desenvolvimento de lesões ósseas em doenças renais é complexo e que depende da dose, agindo por diversos mecanismos de ação.

Brown (2003), em um trabalho de revisão, sugere que o estrôncio age no metabolismo ósseo através de um mecanismo via receptores de membrana para Cálcio (CaR). Os receptores extracelulares sensíveis para cálcio agem mantendo a homeostasia do cálcio extracelular, ativando diversas células e tecidos envolvidos neste processo, que promovem pequenas mudanças no cálcio extracelular e causando mudanças celulares que restauram este cálcio a níveis normais. As células principais da glândula paratireóide e as células C da tireóide, por exemplo, respondem por uma diminuição do cálcio extracelular, com um aumento da secreção do hormônio elevador do cálcio extracelular, paratormônio (PTH), e uma diminuição da secreção do hormônio diminuidor do cálcio extracelular, calcitonina. As células do túbulo contorcido distal do rim são igualmente capazes de serem sensíveis ao cálcio extracelular e respondem por diminuição neste cálcio, através de um aumento da reabsorção tubular de cálcio. O esqueleto também tem papel na manutenção da homeostasia do cálcio extracelular, e tanto os osteoblastos como os osteoclastos podem ser sensíveis ao cálcio extracelular, cuja elevação causa formação óssea e inibição da reabsorção. Brown sugere, então, que o estrôncio pode agir no osso através destes receptores cálcio sensíveis; Entretanto, os mecanismos através dos quais o cálcio extracelular e o estrôncio extracelular exercem estas ações nas células ósseas são ainda controversos. Além disso, segundo o autor, identificar estes receptores moleculares pode ter significativa importância no tratamento de distúrbios ósseos. Idealmente, a terapia óssea deve estimular a osteogênese e inibir a reabsorção óssea, e o estrôncio exerce exatamente estes efeitos, e segundo



alguns autores, agindo através destes receptores sensíveis ao cálcio existentes nas células ósseas.

Coulombe et al. (2004) descreveram os efeitos do ranelato de estrôncio nos receptores de cálcio extracelulares. Citaram que o ranelato de estrôncio, desenvolvido pelo Laboratório Servier da França, é composto de uma molécula de ácido ranélico ligada a dois átomos de estrôncio. Depois de ingerida, esta droga se dissocia no trato gastrintestinal, sendo que somente o estrôncio é absorvido pela mucosa deste aparelho, enquanto que o ácido ranélico é eliminado pelo sistema. Os autores relataram que os receptores extracelulares sensíveis ao cálcio (CaSR) são ativados por cátions divalentes e podem mediar alguns dos efeitos do ranelato de estrôncio no tratamento da osteoporose, estimulando a neoformação óssea e inibindo a reabsorção óssea. Estes autores trabalharam com receptores sensíveis ao estrôncio de células de ovário de hamster Chinês e camundongo, através de mensuração do acúmulo de (3H) inositol-fosfatase, resultante da ativação de receptor de membrana sensível ao estrôncio (CaSR). O ranelato de estrôncio mostrou ativar os receptores em ambas as linhagens de células. Entretanto, quando utilizada outra droga, o ranelato de sódio, não se obteve respostas de ativação de CaSR. Segundo os autores, a resposta de produção de (3H) inositol-fosfatase resultante da ativação de outros receptores para proteína G, potencialmente sugere que a entrada de estrôncio nas células pode influenciar a atividade da fosfolipase C, e que a modulação da atividade dos receptores CaSR nas células ósseas pode contribuir para os efeitos anti-osteoporóticos desta droga.

Ammann et al. (2004) realizaram um estudo sobre a ação do ranelato de estrôncio no aumento da massa óssea e na melhoria da arquitetura deste tecido em ratos fêmeas intactas. Utilizaram ratas intactas que foram tratadas a longo termo

com ranelato de estrôncio em diversas doses (0, 225, 450 e 900 mg/kg/dia) por dois anos. Numa segunda série de experimentos, utilizaram o ranelato de estrôncio na dose de 625 mg/kg/dia em ratos machos e fêmeas pelo mesmo período de tempo. A massa mineral óssea e as propriedades mecânicas deste tecido foram avaliadas em diversos locais do esqueleto (vértebras e fêmur), e a arquitetura microscópica do osso foi avaliada através de histomorfometria na região da junção tíbio-fibular e na metáfise tibial (osso trabecular). A atividade de fosfatase alcalina plasmática e os níveis séricos de fatores de crescimento semelhantes à insulina I (IGF I) também foram medidos. Os autores encontraram os seguintes resultados: nas ratas intactas tratadas com estrôncio por dois anos, houve um aumento de força e da massa óssea dos corpos vertebrais e da região do fêmur. Um efeito similar foi detectado nos ratos machos. O aumento nas propriedades mecânicas foi associado com o aumento da melhoria e estímulo da micro-arquitetura óssea, relacionado com o aumento dos volumes de osso trabecular e cortical e também com o aumento do número de trabéculas e sua espessura. Os autores também relataram um aumento da atividade da fosfatase alcalina plasmática e do IGF-I nos animais tratados, compatível com a atividade de formação óssea estimulada pelo ranelato de estrôncio. Os autores concluíram que o estrôncio, na forma de ranelato, administrado a longo termo, estimula a resistência óssea através do aumento de massa e melhoria da micro-arquitetura, sem, contudo, influenciar na espessura do osso como um todo.

Liu et al. (2004), em estudo sobre biomateriais, utilizaram cultura de células provenientes de medula óssea de coelhos. Estas células foram estimuladas a se diferenciarem em osteoblastos, em um meio constituído de hidroxiapatita porosa adicionada de estrôncio. Após análise em microscopia de luz e eletrônica, chegaram à conclusão de que a hidroxiapatita adicionada de estrôncio não afeta

negativamente a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos e que estes proliferam através da hidroxiapatita mostrando morfologia típica de osteoblastos normais. Os autores concluíram que este material é ótimo para ser utilizado como enxertos em engenharia tecidual óssea e reparos de defeitos ósseos.

Ni et al. (2005) realizaram um trabalho a fim de avaliar o uso de cimento de hidroxiapatita com estrôncio na substituição de quadril em coelhos, observando os achados histológicos das interfaces cimento-implante e osso-cimento após condições de uso normais pelos animais. As substituições de quadril foram realizadas com o uso de cimento de hidroxiapatita com estrôncio ou com cimento de polimetilmetacrilato e observadas após 6 meses. Observou-se uma boa fixação entre os implantes e o cimento de hidroxiapatita, podendo-se observar a formação de osso esponjoso na sua superfície, mostrando resultados melhores do que com o polimetilmetacrilato. Ainda puderam observar que com o uso do cimento de hidroxiapatita com estrôncio não foi observado processo inflamatório e reações teciduais periféricas ao enxerto, o que aconteceu frequentemente com o uso de polimetilmetacrilato. Os resultados sugeriram que o cimento de hidroxiapatita enriquecido com estrôncio é um material de união óssea bom quando utilizado sob forças.

Marie (2005), em um estudo de revisão, relata os efeitos do estrôncio na otimização da formação óssea e sua reabsorção. Segundo o autor, o estrôncio na forma de ranelato tem a propriedade de diminuir os riscos de fraturas em mulheres pós-menopausa. A eficácia desta droga em estudos clínicos resulta de seu modo de ação único na reabsorção e na deposição ósseas. Estudos farmacológicos em animais têm demonstrado que o ranelato de estrôncio diminui a reabsorção óssea e estimula a sua formação, resultando num aumento da massa óssea. O autor

descreve que em ratos intactos em período de crescimento, o estrôncio estimula o aumento do volume trabecular ósseo sem alterar a sua mineralização. O único mecanismo de ação do estrôncio na formação óssea e sua reabsorção têm sido demonstrados em estudos *in vitro*. Segundo o autor, em culturas celulares de calvária de ratos e culturas de osteoblastos de ratos, o estrôncio estimula a replicação de pré-osteoblastos e estimula a síntese de colágeno pelos osteoblastos. Além disso, o estrôncio diminui a reabsorção óssea em culturas de órgãos e diminui a atividade de reabsorção de osteoclastos de camundongos.

Além disso, o autor relata que estudos farmacológicos e clínicos sugerem que o estrôncio otimiza a formação e a reabsorção ósseas, resultando num aumento da massa óssea, o que pode ser de grande valor no tratamento da osteoporose.

Neste trabalho o autor ainda descreveu os efeitos do estrôncio na formação e reabsorção ósseas. Para melhor entender os efeitos do estrôncio nas células ósseas, os pesquisadores realizaram diversos estudos em modelos de células ósseas de reabsorção e formação. Em um modelo convencional de cultura de células de calvária de ratos, o autor demonstrou que o estrôncio, na forma de ranelato a 0,5 mmol/l, pode estimular a replicação das células pré-osteoblásticas e, secundariamente, a atividade das células funcionais e da síntese da matriz óssea. Estes efeitos foram específicos do ranelato de estrôncio, uma vez que nem o ranelato de cálcio nem o ranelato de sódio apresentaram estes efeitos.

Segundo o autor, estes dados indicam que o estrôncio pode promover a replicação das células ósseas e a síntese de colágeno "*in vitro*", o que pode promover um mecanismo pelo qual o estrôncio pode estimular a formação de osso "*in vivo*".

O autor também demonstrou que o ranelato de estrôncio (0,5 mmol/l) não apresenta nenhum efeito deletério na formação dos nódulos minerais ou no processo de mineralização como um todo, o que pode supor a inexistência de efeitos nocivos "in vivo". Entretanto, conforme cita o autor, os precisos mecanismos de ação intracelulares do estrôncio nas células de síntese ósseas permanecem imprecisos. O estrôncio parece apresentar efeitos inibidores na reabsorção óssea in vitro. Num estudo clássico descrito pelo autor, no qual se trabalhou em cultura de células de ossos longos de camundongos, o estrôncio (1mmol/l) inibiu a atividade de reabsorção, enquanto que com o uso do ranelato de cálcio este efeito não foi atingido.

Outros experimentos mostraram que o ranelato de estrôncio inibiu a atividade de reabsorção dos osteoclastos em cultura de ossos longos, efeito não atingido com o uso do ranelato de cálcio ou ranelato de sódio. O autor relata um estudo realizado com osteoclastos em diferenciação tratados com 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> para estimular esta diferenciação. Ao se adicionar o ranelato de estrôncio demonstrou-se um decréscimo no número de osteoclastos, o que indica uma inibição da atividade dos mesmos e por conseqüência uma diminuição da reabsorção óssea. Em resumo, segundo o autor, as análises farmacológicas mostraram que o estrôncio estimula a formação óssea e reduz a reabsorção em animais intactos, resultando em aumento da massa óssea. Em estudos clínicos, demonstrou-se também que o estrôncio otimiza a formação e a reabsorção, resultando em aumento da massa óssea.

Pi et al. (2005) realizaram um trabalho a fim de determinar e testar um novo receptor celular sensível ao cálcio, além dos já conhecidos CASR (receptores sensíveis ao cálcio) da família das proteínas G em osteoblastos. Os autores testaram o receptor GPRC6A, um novo membro identificado daquela família de

proteínas. Aos testes, verificou-se que o novo receptor se mostrou sensível ao cálcio, magnésio, alumínio, gadolínio e estrôncio. Também se verificou que a osteocalcina, proteína largamente expressa no tecido ósseo, estimulava positivamente estes receptores GPRC6A, em presença do cálcio, porém, inibindo a este tempo, a atividade dos receptores CASR. Os autores sugeriram que o receptor testado é sensível à osteocalcina e pode mediar as respostas de cálcio extracelular em osteoblastos e possivelmente em outros tecidos.

Rizzoli (2005) descreveu que, atualmente, tem-se utilizado duas drogas que podem alterar para melhor a micro arquitetura óssea, aumentando a densidade deste tecido e desta forma prevenindo o risco de fraturas em pacientes que manifestaram osteoporose. O autor relatou que, tanto o uso da teriparatida quanto o uso do ranelato de estrôncio, em estudos que variaram de 18 meses a 3 anos, aumentaram a densidade óssea dos pacientes, mostrando o seu efeito anabolizante no tecido ósseo. Ambos os agentes, segundo o autor, mostraram significativa redução no risco de fraturas destes pacientes, sugerindo que seria interessante unir os efeitos anabolizantes do ranelato de estrôncio e da teriparatida com o efeito anticatabolizante do estrôncio, num intuito de reduzir doses e talvez custos aos pacientes.

Marie (2006) relatou em um trabalho de revisão que pacientes pós - menopausa apresentam aumento da remodelação óssea e um desequilíbrio no balanço entre sua deposição e reabsorção. Segundo este autor, drogas modernas, entre elas o ranelato de estrôncio (Protelos®), agem na prevenção e regressão do processo de osteoporose, pois reduzem a reabsorção óssea e promovem sua formação, induzindo a um balanço positivo deste tecido. O autor relatou que em culturas de células de ratos, o estrôncio estimula a replicação de células pré-

osteoblásticas. Em contrapartida, gera um decréscimo na atividade de reabsorção dos osteoclastos em roedores e de sua diferenciação em humanos, além de um aumento da taxa de apoptose dos osteoclastos em coelhos. Citou também que, *in vivo*, o estrôncio estimula formação óssea e reduz a reabsorção em camundongos, resultando num aumento da massa óssea e melhoria da sua micro arquitetura. O autor afirmou que estudos mostraram que a superfície óssea colonizada por osteoblastos e aposição mineral aumentou em pacientes tratados com estrôncio além de um decréscimo das áreas de reabsorção, quando comparados com grupos placebos, indicando que o tratamento com estrôncio estimula a formação óssea e inibe a sua reabsorção, aumentando desta forma a massa e a força deste tecido.

Burlet (2006) relatou que muitos medicamentos tem sido utilizados no intuito de reduzir a perda óssea e prevenir fraturas, como por exemplo, os bisfosfonatos, moduladores seletivos dos receptores de estrógeno e teriparatidas. Citou que se questionam, atualmente, se estes medicamentos seriam inócuos a longo tempo e também sua eficiência. O autor afirmou que se tornou urgente a necessidade de se encontrar um medicamento que otimize o tratamento dos pacientes pós-menopausa, seguro e eficiente, e citou que a literatura mundial tem apresentado muitos trabalhos sobre o estrôncio, sua eficácia quanto à diminuição do risco de fraturas e segurança de utilização, afirmando que sua utilização é segura e bem tolerada, podendo ser uma alternativa no tratamento destes pacientes.

Llinas et al. (2006) relataram uma possível participação do estrôncio nos processos de osteomalácia. Citaram que a fosfatase alcalina humana apresenta quatro sítios de ligação para metais, sendo dois para o zinco, um para o magnésio e um para o cálcio, este podendo ser substituído pelo estrôncio, que, em altas doses,

desestabilizaria essa enzima, afetando o metabolismo ósseo e podendo influenciar no processo de desenvolvimento de osteomalácia.

Manette et al. (2006) relataram que o ranelato de estrôncio estimula a síntese de proteínas colagenosas e não colagenosas pelos osteoblastos. Os autores afirmaram que o estrôncio estimula a replicação de células pré-osteoblásticas e a inibição da atividade dos osteoclastos em células isoladas de ratos tratados com 2000mg/dia. Chegaram à conclusão, após um estudo de 2 anos sob administração de estrôncio, que houve um aumento de 7,4% na densidade óssea, um significativo aumento nas taxas de fosfatase alcalina, redução de 44% nas deformidades ósseas dos pacientes e 41 % e redução do risco de fraturas. Segundo os autores, estes dados sugerem que o ranelato de estrôncio é uma nova, efetiva e segura droga para o tratamento da osteoporose, com um mecanismo de ação único.

Adami (2006) realizou um trabalho com humanos, mulheres, administrando ranelato de estrôncio (Protelos®Servier) pelo período de três anos, numa dosagem de 2g/dia oralmente. Utilizou 5091 mulheres, sendo que 2479 receberam estrôncio e 2453 foram placebo. Seus resultados mostraram que houve uma redução no risco de fratura vertebral de 16%, redução de fraturas maiores (quadril, pélvis, sacro, costelas) de 19%, aumento da densidade óssea em torno de 8,2% para o fêmur e de 9,8% o quadril e efeitos adversos comparáveis entre o grupo teste e o controle. O autor sugeriu que o tratamento com ranelato de estrôncio é seguro e efetivo para pacientes que necessitem de melhoria da estrutura óssea.

Shahnazari et al. (2006) realizaram um trabalho utilizando galinhas poedeiras, que são sabidamente susceptíveis à osteoporose. Administraram estrôncio na alimentação diária das aves e testaram as qualidades anabolizantes deste íon, analisando os níveis de cálcio, fósforo e estrôncio no soro e tecido ósseo, a



qualidade e quantidade de ovos e as características das cascas. Os autores encontraram os seguintes resultados: As concentrações de estrôncio subiram no soro e no osso, sem, no entanto alterar as concentrações de cálcio e fósforo; houve um aumento do volume de osso cortical e medular, espessura, número e superfície das trabéculas e aumento da força óssea. Concluíram, então, que a suplementação com estrôncio induz grandes e positivos resultados na densidade, volume e micro arquitetura ósseas, além de aumentar a força das diáfises, não causando alterações nas qualidades do tecido ósseo avaliado.

### **3. PROPOSIÇÃO**

Este trabalho tem o objetivo de avaliar, através da análise histomorfológica, o efeito da aplicação tópica do cloreto de estrôncio, em gel, em defeitos ósseos criados na mandíbula de coelhos.

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Material permanente

- a. 01 motor elétrico Nobel Biocare® (São Paulo, SP, Brasil).
- b. 02 contra-ângulos redutores 16:1 (Kavo Brasil).
- c. 24 kits cirúrgicos estéreis Alva Doctor's® (São Paulo, SP, Brasil).
- d. Instrumental cirúrgico composto de cabos de bisturi nº 4, seringas Carpule, descoladores de Mont, afastadores de Farabeuf, pinça dente de rato, pinças hemostáticas, porta agulhas, tesouras ponta fina, uma pinça para colocação de tachas para membrana (Duflex, Juiz de Fora, Brasil)
- e. 1 bomba a vácuo para sucção (ASPIRAMAX®, NS Ind. e Com. Ltda. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).
- f. 2 Becker de vidro
- g. Cubetas de aço inoxidável
- h. Aparelho de oxigeno terapia ( WHITE MED, White Martins, São Paulo, Brasil)
- i. 1 micrótomo histológico (PIKA Tóquio – Japão)
- j. 1 microscópio binocular Nikon modelo Eclipse E200 (Tóquio, Japão).

#### 4.1.2. Material de consumo

- a. 12 embalagens de soro fisiológico estéril (Áster Prod. Méd. LTDA, Sorocaba, SP, Brasil) de 250 ml.
- b. Solução de Iodo Povidine 1% (DGL, São Paulo, SP, Brasil).
- c. 12 kits cirúrgicos estéreis Alva Doctor's® (São Paulo, SP, Brasil).
- d. 24 pares de luvas estéreis para cirurgião e auxiliar (Mucambo, São Paulo SP Brasil).
- e. 20 fios de sutura seda trançada 4.0 com agulha de 1,5 cm (Johnson & Johnson Prod. Prof. LTDA São José dos Campos, SP, Brasil).
- f. 20 fios de sutura 5.0 mono nylon com agulha de 1,7 cm (Johnson & Johnson Prod. Prof. LTDA São José dos Campos, SP, Brasil).
- g. 24 lâminas de bisturi número 15 C (SurgiBlade™, Miami, Flórida – U.S.A.).
- h. 12 sugadores cirúrgicos estéreis descartáveis INDUSBELLO (Ind. Inst. Odont. LTDA, Londrina, PR, Brasil).
- i. 60 pacotes com compressas de gaze estéreis (Polar Fix Mat. Hosp. Ltda. Ribeirão Pires, SP – Brasil).
- j. 12 esponjas de colágeno Hemospon
- k. 6 membranas de colágeno reabsorvível Gen-derm 3,0 cm X 3,0 cm (Baumer S/A, divisão de biomateriais, São Paulo – Brasil).
- l. 4 brocas trefinas de 5 mm. (INP São Paulo – Brasil)
- m. Parafusos de fixação de titânio.
- n. Solução de formol a 10 % pH 7,0.

- o. Corantes histológicos hematoxilina e eosina, soluções A e B de Mallory e nitrato de prata.

#### 4.1.3.Drogas utilizadas

- a. Cloridrato de Xilazina – Virbaxyl 2% (Bayer do Brasil S/A, São Paulo, Brasil).
- b. Anestésico geral à base de Quetamina – (Vetanarcol), Laboratório Konig S/A, Alvallaneda, Argentina.
- c. Antibiótico Penicilina G Benzatina (Prodotti, Campinas, São Paulo, Brasil)
- d. Analgésico e Antiinflamatório – Banamine 20 mg (Schering) São Paulo, SP.
- e. 48 tubetes de analgésico local Cloridrato Lidocaína a 2 % com Epinefrina 1:100.000 – Alphacaine ® DFL – RJ, Brasil
- f. Água purificada para injeção – WPI
- g. Solução de cloreto de estrôncio a 2 M. Manipulada na Farmácia de Manipulação Fórmula e Ação São Paulo, SP, Brasil.
- h. Midazolam (Prodotti, Campinas, SP, Brasil).
- i. Atropina

## 4.2.Método

Foram selecionados 12 coelhos da raça *New Zealand*, fêmeas, com peso entre 4 e 5 kg, idade variando entre 10 e 12 meses, provenientes de criador autorizado, e mantidos sob os cuidados do biotério da Universidade de Santo Amaro (UNISA).

Os animais foram inicialmente mantidos em observação por um período de 15 dias após sua chegada para que fossem descartadas quaisquer anomalias em seu estado geral de saúde. Foram acondicionados em local apropriado com ventilação e temperaturas controladas ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ). Os animais durante todo o experimento foram alimentados com ração Nutríara® (Paulínia, São Paulo – Brasil) e água administrada *ad libitum*. A higienização das gaiolas foi realizada de acordo com as normas do biotério do Unitox, ou seja, lavadas diariamente com água e sabão e desinfetadas com desinfetante hospitalar, sendo realizada a troca da maravalha estéril diariamente.

A pesquisa foi registrada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISA de acordo com o parecer número 071/2006 em 12 de abril de 2006, registro CEP-UNISA N°. 024/06 (anexo 1). Este trabalho foi realizado de acordo com os “Princípios Éticos de Experimentação Animal”, elaborado pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao Internacional Council of Laboratory Animal Science (ICLAS), com base em “Normas Internacionais para Utilização de Animais em Pesquisa” que se apresentam com base na tríade: “Sensibilidade, Bom Senso e Boa Ciência”.

Posteriormente os animais foram operados no Centro de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Santo Amaro.

#### **4.2.1. Planejamento do experimento**

Em cada um dos doze animais foram criados 2 defeitos cirúrgicos na região lateral da mandíbula, um do lado esquerdo e outro do lado direito. Os defeitos foram preenchidos com esponjas de colágeno e cobertos com membranas reabsorvíveis.

Nos defeitos ósseos criados do lado direito, as esponjas de colágeno foram embebidas em solução de soro fisiológico (grupo controle) e nos defeitos do lado esquerdo as esponjas foram embebidas em solução de cloreto de estrôncio 2M (grupo teste), manipulada pela Farmácia de Manipulação Fórmula e Ação (SP, Capital). Durante todo o procedimento cirúrgico os animais foram monitorados quanto às suas funções vitais e reflexos, sendo a anestesia mantida pelo período necessário, por profissionais veterinários. A coleta de material para a confecção de material histológico foi realizada aos 28 e 56 dias da cirurgia e as amostras de tecido foram encaminhadas ao Laboratório de Técnicas Histológicas da UNISA para a obtenção das lâminas histológicas, sendo estas coradas pelos métodos de Hematoxilina-Eosina, Tricrômio de Mallory e Técnica de Gabe, submetidas a exame em microscópio de luz e documentação fotográfica.

#### **4.2.2. Delineamento do estudo**

Os defeitos cirúrgicos foram divididos em 4 grupos experimentais, conforme o tempo de sacrifício dos animais e de acordo com a aplicação tópica de cloreto de estrôncio no sítio cirúrgico (quadro 1).

GRUPO	n	Defeito cirúrgico	Data sacrifício	Localização na mandíbula
A controle (28 dias)	6	Soro fisiológico	28 dias	Lado direito
A1 teste (28 dias)	6	Cloreto de estrôncio	28 dias	Lado esquerdo
B controle (56 dias)	6	Soro fisiológico	56 dias	Lado direito
B1 teste (56 dias)	6	Cloreto de estrôncio	56 dias	Lado esquerdo

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais

#### 4.2.3.Preparo dos animais

Os animais foram pesados para a realização do cálculo da dose de droga anestésica. Foram acondicionados em gaiolas individuais e identificados com plaquetas que continham seus dados (peso, idade, data da cirurgia). A indução anestésica foi realizada, por via intramuscular na parte posterior da coxa, com Quetamina 10mg/kg, Midazolam 0,5mg/kg e Atropina 10mg/Kg de peso. A manutenção da anestesia foi realizada através da quetamina.

Foi realizada a tricotomia da região mandibular em ambos os lados e a região foi posteriormente lavada com solução de Iodo-Povidine. Os animais foram acomodados nas mesas cirúrgicas, isolados com campos estéreis e passaram a receber suprimento de oxigênio através de uma máscara nasal.



A anestesia local foi realizada com a infiltração de cloridrato de lidocaína a 2 % com epinefrina 1:100.000 – (Alphacaine® 100 DFL) na região subcutânea das áreas a serem operadas.

Para verificação do plano anestésico foram avaliados os seguintes parâmetros: a) relaxamento muscular: visto pelo relaxamento mandibular; b) diminuição da frequência cardíaca e respiratória; c) reflexos: podal – ausência de reflexo de retirada ao estímulo doloroso realizado pelo pinçamento da membrana interdigital; auricular – ausência de resposta motora ao pinçamento da base da orelha.

#### **4.2.4.Técnica Cirúrgica**

Optou-se por uma incisão retilínea de retalho total na região látero-inferior em ambos os lados da mandíbula, procedendo ao afastamento da pele e da delgada camada muscular presente nesta região (Figura 2). Após a incisão, com a utilização de afastadores, foi possível a visualização do tecido ósseo da região lateral da mandíbula do animal, procedendo-se, então, à incisão e ao afastamento do periósteo, a fim de que o tecido ósseo exposto pudesse ser submetido ao procedimento de obtenção dos defeitos cirúrgicos (Figura 4).

Foram realizados os defeitos cirúrgicos com o uso de motor e contra-ângulo redutor 16:1, utilizando uma broca trefina de 5 mm de diâmetro. Esta medida foi escolhida por ser proporcional à largura total da mandíbula na região em questão (Figura 5).

As perfurações foram realizadas em baixa rotação e abundante irrigação com soro fisiológico, com a intenção de prevenir o aquecimento do tecido ósseo da região e minimizar as alterações teciduais decorrentes deste procedimento (Figura 6).

Foram realizadas duas pequenas perfurações, ao lado da perfuração principal, com a finalidade de fixar as membranas com parafusos de titânio (Figura 7). Em seguida foram realizadas as mensurações da ferida cirúrgica quanto à largura e profundidade com sonda periodontal, certificando-se que todas tivessem 5,0 x 5,0 mm (Figura 8 e 9).

Depois de realizadas as perfurações, estas foram lavadas com solução de soro fisiológico e preenchidas com esponjas reabsorvíveis de colágeno. As esponjas de colágeno foram seccionadas em porções adequadas para preencher os defeitos cirúrgicos (Figura 11). No lado direito da mandíbula dos animais as esponjas foram embebidas em soro fisiológico (grupo controle) e no lado esquerdo, em solução de gel de cloreto de estrôncio a 2M (grupo teste).

Após a adaptação das esponjas dentro das feridas cirúrgicas, estas foram cobertas com membranas reabsorvíveis de colágeno, também embebidas em soro fisiológico (grupo controle) ou cloreto de estrôncio (grupo teste) e estas foram fixadas com parafusos de fixação de titânio (Figuras 15 e 16).

Procedeu-se, então, à síntese da ferida cirúrgica com sutura em dois planos, utilizando-se fio mononylon 5.0 para a fáscia interna e fio de seda trançada 4.0 para a sutura da pele (Figuras 17 e 18). Os animais foram então acompanhados até a recuperação total dos efeitos anestésicos, quando foram então conduzidos ao biotério para seu posterior acompanhamento e medicação pós-operatória que constou de: a) quatro dias de antibiótico: penicilina G benzatina 1,0 ml 40.000 U.I./Kg de peso subcutâneo em dias intercalados (primeiro, terceiro, quinto e sétimo dias), b)

três dias de analgésico seguidos: (Banamine 0,25 ml/Kg de peso) (primeiro, segundo e terceiro dias), c) curativos diários durante sete dias.

#### **4.3. Dinâmica do experimento**

Após 28 e 56 dias os animais sofreram nova intervenção cirúrgica para remoção das amostras. Os animais foram anestesiados e sacrificados, utilizando-se a técnica preconizada pelo COBEA (deslocamento cervical). Suas mandíbulas foram dissecadas e os fragmentos ósseos das regiões de interesse foram removidos com a utilização do motor cirúrgico e brocas supercortantes.

A remoção das peças cirúrgicas foi realizada imediatamente após a morte dos animais, fixadas em solução de formol a 10 %, pH 7,0 e encaminhadas para a obtenção dos cortes histológicos.

As peças coletadas foram então processadas para técnica de inclusão em parafina, a saber: a) fixação em formol a 10%, pH 7,0 pelo período de 48 horas; b) descalcificação em E.D.T.A. (ácido etilenodiaminotetracético) em solução aquosa a 10%, neutralizado com hidróxido de sódio para pH 7,0; c) inclusão em parafina, temperatura de 56 °C; d) obtenção de cortes com espessura máxima de 5µm; e) orientação dos cortes: seguindo o longo eixo dos alvéolos cirúrgicos, ou seja, da cortical para a base da perfuração; f) obtenção das colorações: Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Mallory e Técnica de Gabe.

Os cortes obtidos foram então submetidos à análise histomorfológica em sistema duplo cego para obtenção dos resultados no Departamento de Histologia e Microscopia Eletrônica da UNISA.

#### 4.4 Seqüência fotográfica do experimento

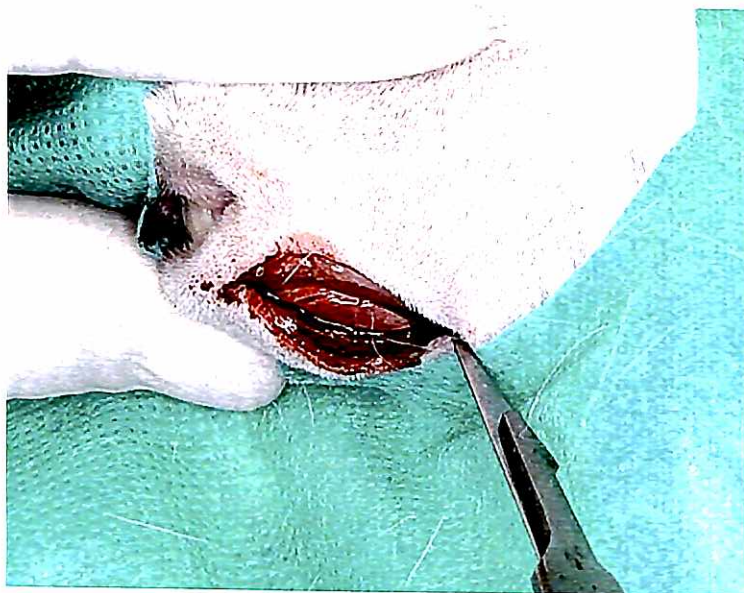
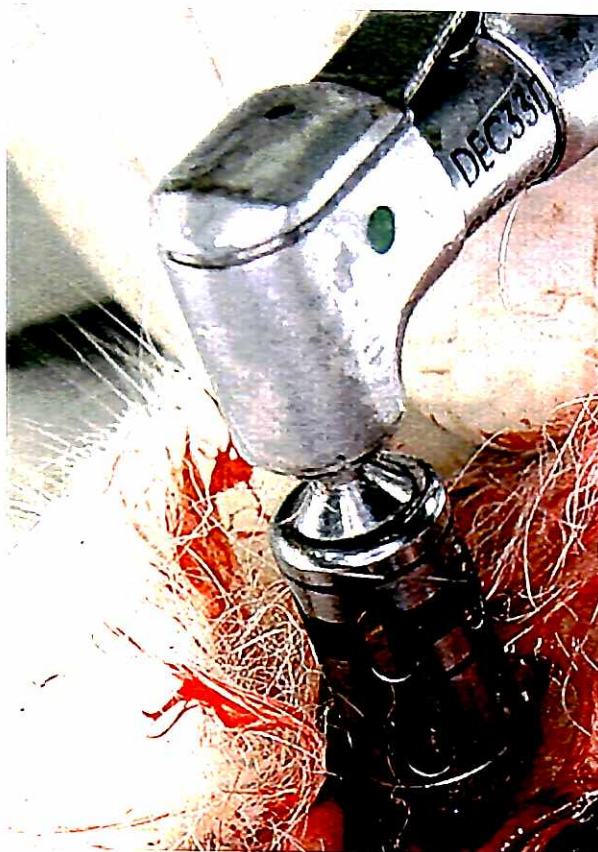


Figura 1. Incisão e exposição da mandíbula.



Figura 2. Exposição da espessura total da mandíbula.



**Figura 3. Confeção do defeito ósseo.**



**Figura 4. Bloco trefinado.**

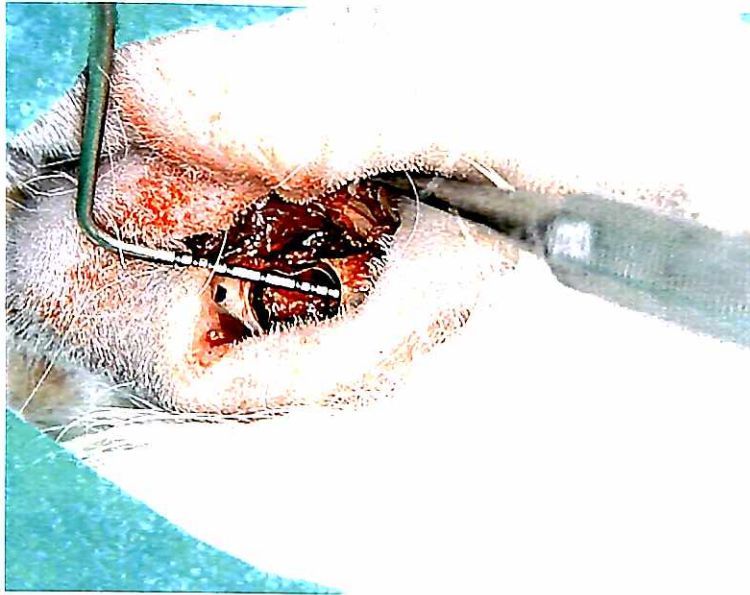




**Figura 5. Defeito aberto com perfurações para fixação da membrana.**



**Figura 6. Medição da profundidade do defeito (5,0 mm).**



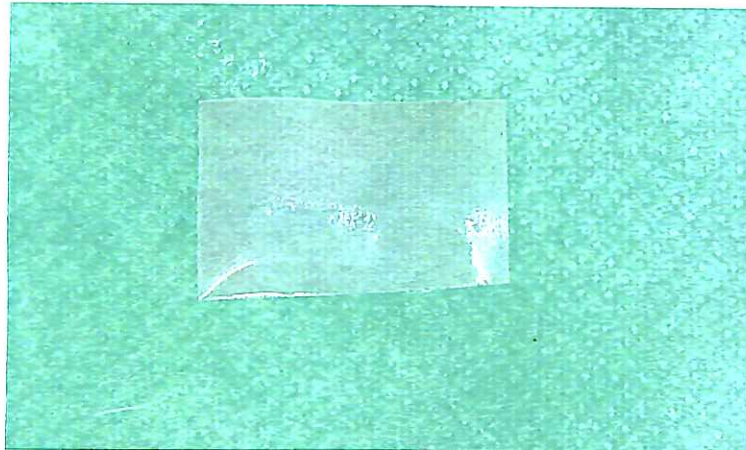
**Figura 7. Medição da largura do defeito (5,0 mm).**



**Figura 8. Fragmento de esponja seca.**



**Figura 9. Esponja inserida no defeito.**



**Figura 10. Membrana hidratada**





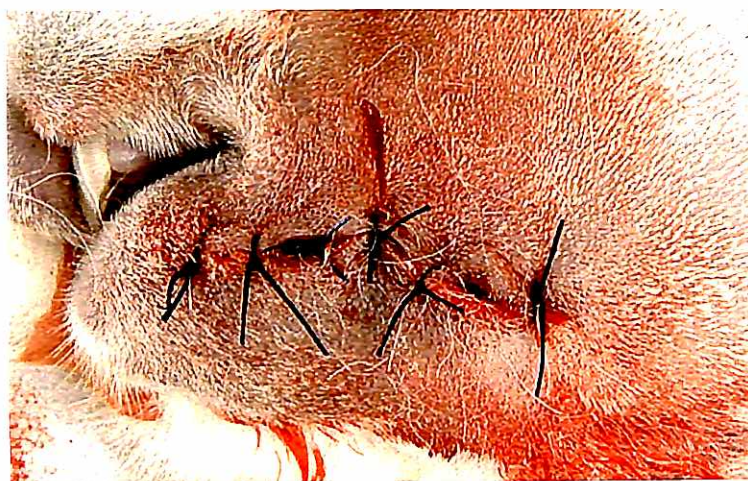
**Figura 11. Adaptação da membrana reabsorvível**



**Figura 12. Fixação da membrana**



**Figura 13. Sutura interna**



**Figura 14. Sutura externa**



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análise Histomorfológica

#### 5.1.1. Grupo A (Controle aos 28 dias)

No **grupo A** (grupo controle com 28 dias), ocorreu um pequeno crescimento de tecido ósseo na superfície inferior do defeito, sendo o restante deste defeito preenchido por um tecido conjuntivo denso, muito fibroso, repleto de células de síntese (fibroblastos), cuja morfologia indica células jovens, com núcleo claro e cromatina frouxa, típico de células em fase altamente secretora. Também se encontram células com características de fibrócitos (Figura 15).

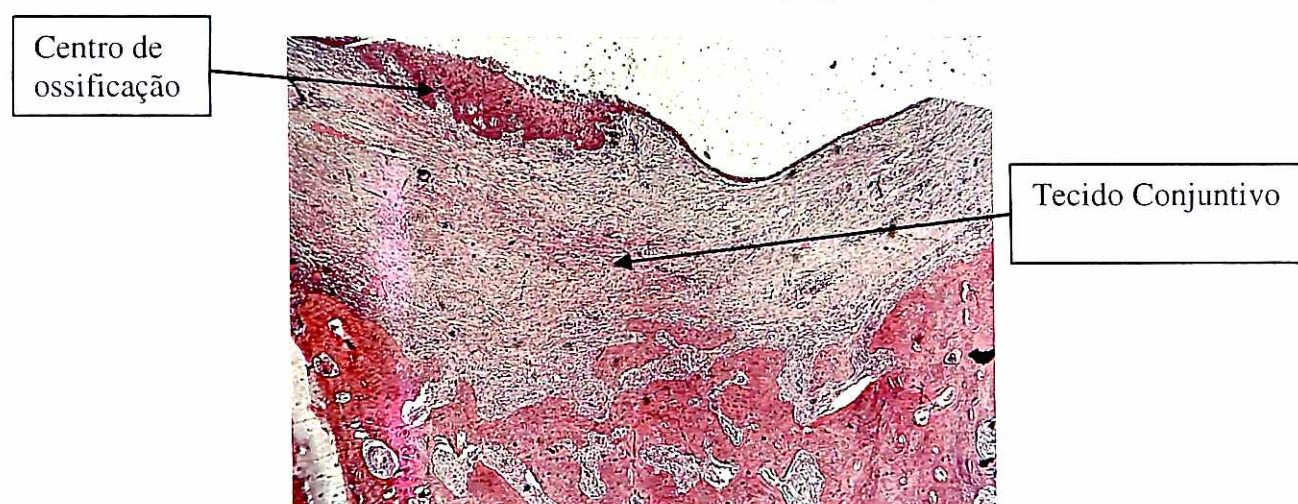


Figura 15. Grupo A (controle 28 dias). Tecido conjuntivo denso, animal 1, H.E. (40X)

O tecido ósseo neoformado mostra-se tipicamente primário, sem a presença de lamelas ósseas bem estabelecidas, mostrando uma matriz cujo arranjo de fibras colágenas se mostra pouco perceptível (Figura 16).



Figura 16. Grupo A (controle 28 dias). Tecido ósseo primário. H.E. (250X)

É possível se observar linhas de crescimento ósseo, que demonstram o crescimento aposicional gradual ocorrido durante o processo de reparação do defeito.

O tecido ósseo pré-existente mostra-se tipicamente secundário (seta), com trabéculas ósseas bem estabelecidas e presença de sistemas de Havers. É um tecido ósseo esponjoso, cuja região medular mostra-se bem definida, com a presença de pequenos capilares sanguíneos e células adiposas, o que demonstra que esta região medular pertence a um tecido ósseo maduro (Figura 17).

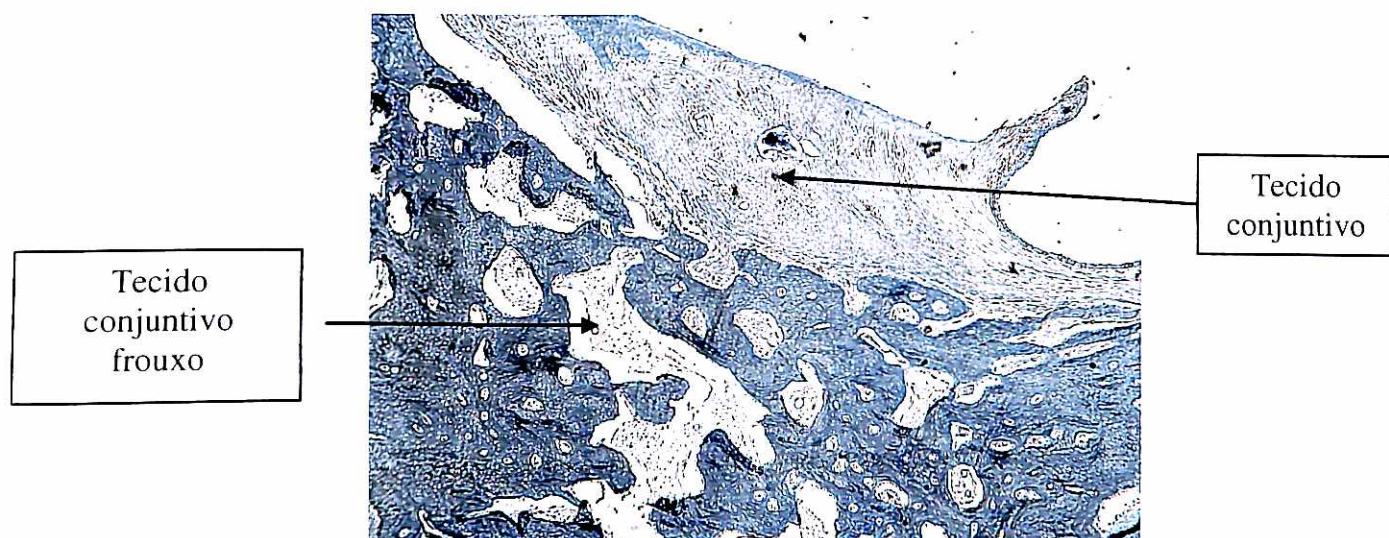


Figura 17. Grupo A (controle 28 dias). Tecido conjuntivo, animal 2. Mallory (40X).



É digna de nota, neste grupo, a grande quantidade de tecido conjuntivo remanescente no interior no defeito ósseo. Numa análise mais apurada, pode-se observar um infiltrado de células inflamatórias crônicas disperso por toda a extensão deste tecido conjuntivo, além de uma quantidade relativamente pequena de vasos sanguíneos, representados por pequenos vasos, entre eles, veias e capilares sanguíneos e raras arteríolas (Figura 18). A principal célula identificada nestas regiões de infiltrado inflamatório é o plasmócito, em organizações de grupos de células entre os grandes feixes de fibras colágenas, encontrados em toda a extensão do tecido conjuntivo denso (figura 19).

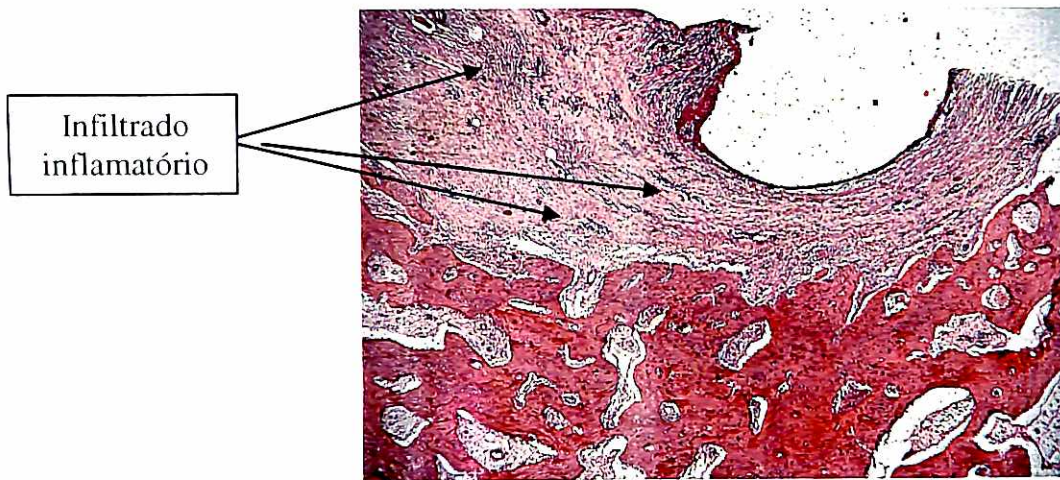


Figura 18. Grupo A (controle 28 dias). Infiltrado inflamatório, animal 3. H.E. (40X).

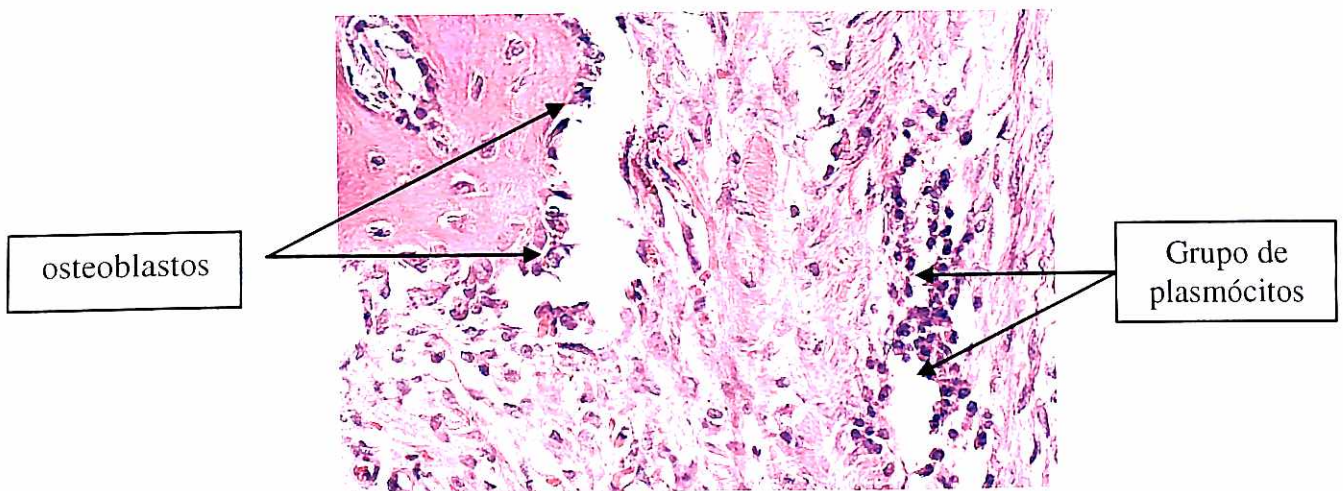


Figura 19. Grupo A (controle 28 dias). Infiltrado inflamatório. H.E. (400X).

Observa-se, principalmente na região inferior do defeito, a formação de trabéculas ósseas compostas por tecido ósseo primário, nas quais é nítida a presença de osteoblastos secretores, muitos deles sendo aprisionados pelo osteóide recém formado e diferenciando-se em osteócitos jovens, cujas lacunas se mostram claras e amplas e sem bordos nítidos (Figura 20).

As regiões entre as trabéculas se mostram preenchidas por um tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado, repleto de fibroblastos, não se encontrando células adiposas, típicas de medula óssea, indicando que este tecido é jovem e que o processo de ossificação intramembranosa ainda se mostrava em curso (Figura 20).



Figura 20. Grupo A (controle 28 dias). Ossificação intramembranosa. H.E. (400X).

Ainda é possível observar, através da Figura 21, alguns centros de ossificação dispersos pelo interior deste tecido conjuntivo, cercados de osteoblastos que parecem estarem se diferenciando das células conjuntivas circunjascentes.





Figura 21. Grupo A (controle 28 dias). Centros de ossificação, animal 4. H.E. (100X).

Observa-se também, na Figura 21, algumas regiões de formação óssea nas regiões mais superficiais do tecido conjuntivo, em áreas de proximidade ao perióstio.

Não foi possível observar a presença da esponja de colágeno nem da membrana reabsorvível nestas amostras.

### 5.1.2. Grupo A1 (Teste aos 28 dias)

No **grupo A1** (grupo teste com 28 dias) foi possível verificar um grande crescimento de tecido ósseo no interior do defeito, crescimento este que praticamente eliminou o defeito ósseo. Este tecido ósseo neoformado se mostra tipicamente primário, esponjoso, alojando entre as trabéculas ósseas um tecido conjuntivo frouxo rico em fibroblastos e vasos sanguíneos congestionados, repletos de células sanguíneas (Figuras 22 e 23).

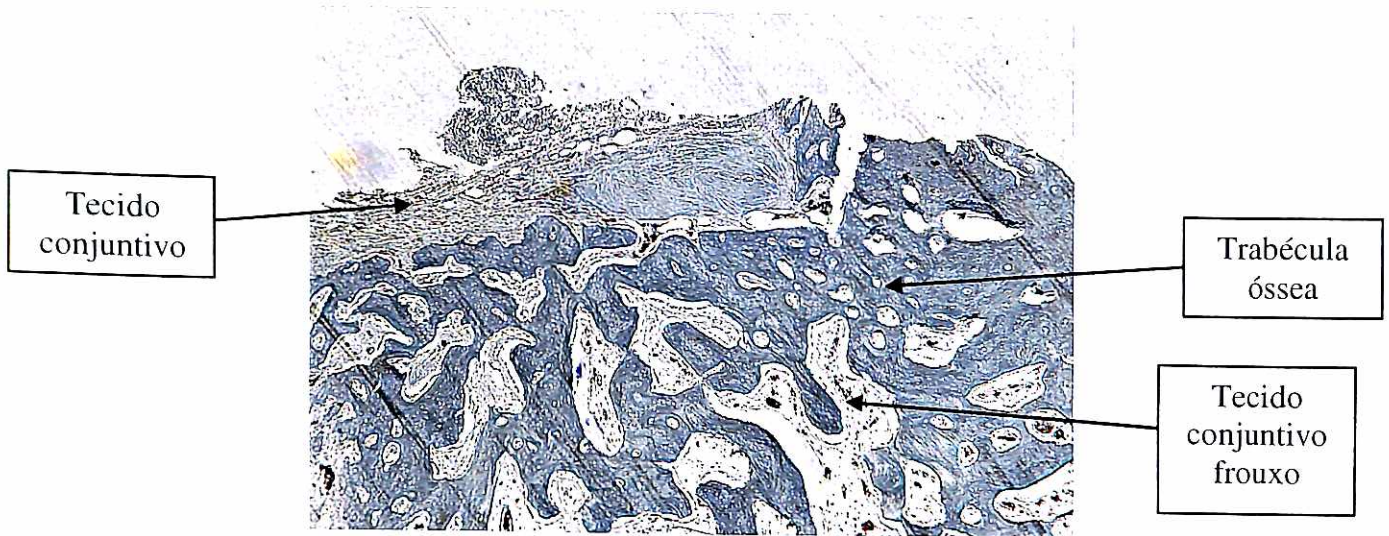


Figura 22. Grupo A1 (teste 28 dias). Tecido conjuntivo, animal 1. Mallory. (40X).

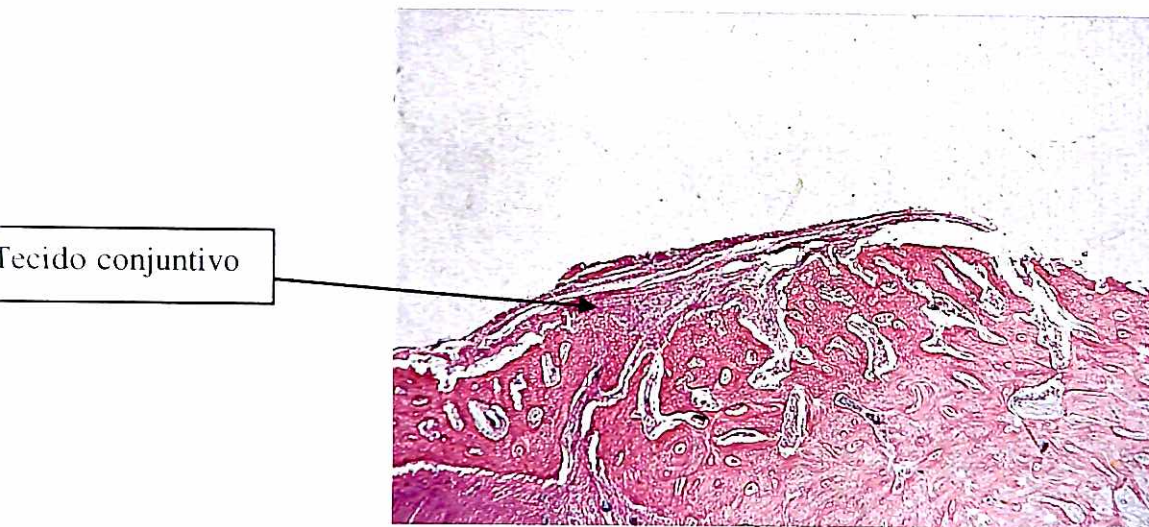


Figura 23. Grupo A1 (teste 28 dias). Tecido conjuntivo, animal 2. H.E. (40X).

Na região mais superficial do defeito encontramos a presença de uma pequena faixa de tecido conjuntivo denso, altamente vascularizado, com a presença de grandes vasos repletos de células sanguíneas. Também se observam a presença de inúmeros capilares sanguíneos. (Fig. 23)

Este tecido conjuntivo apresenta grandes feixes de fibras colágenas, alguns de forma orientada no sentido da largura do defeito ósseo, mas muitas distribuídas aleatoriamente no interior da espessura deste conjuntivo (Figuras 24 e 25).



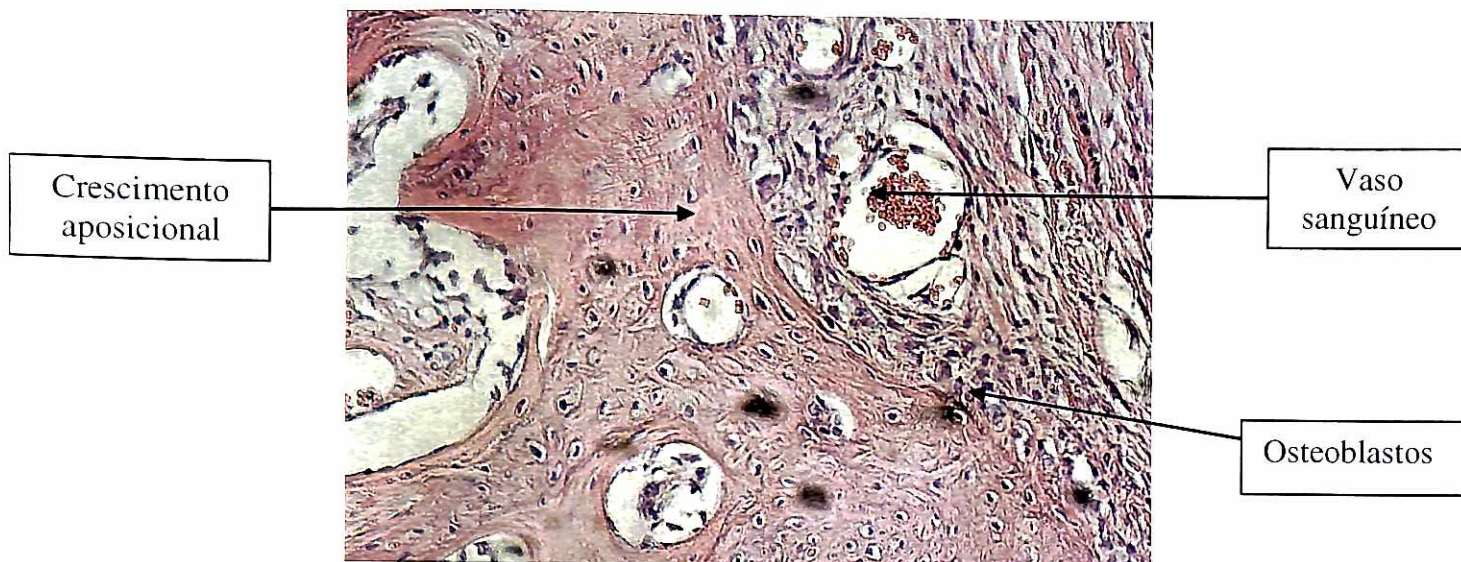


Figura 24. Grupo A1 (teste 28 dias). Crescimento aposicional, animal 2. H.E. (250 X).

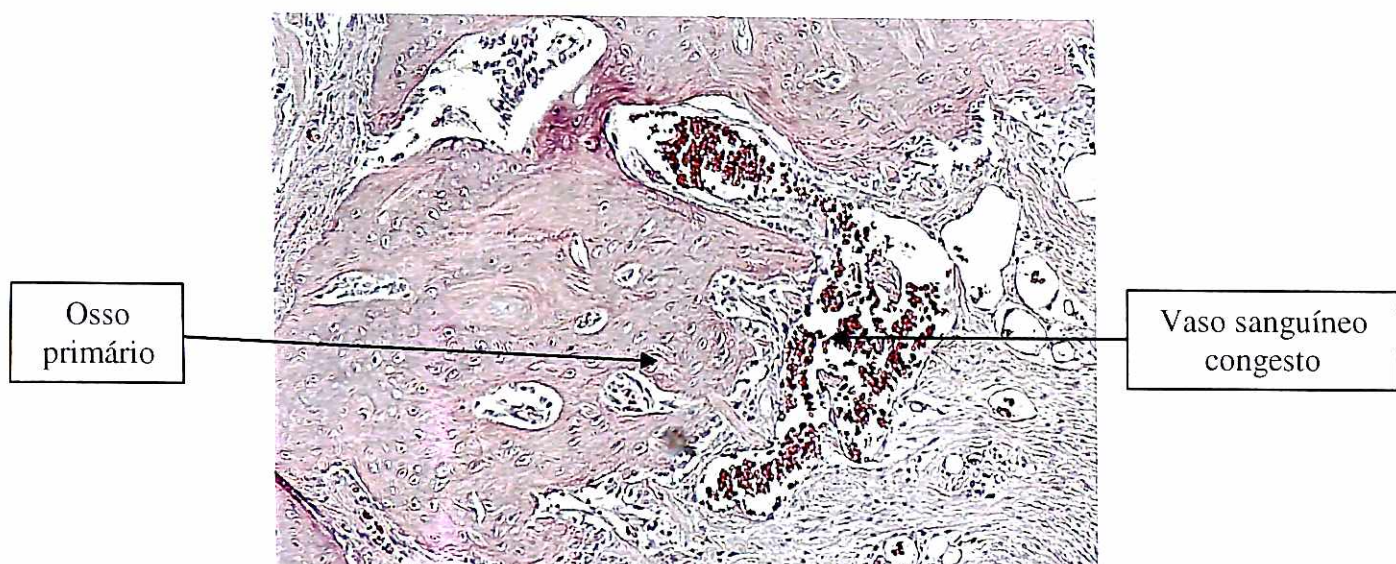


Figura 25. Grupo A1 (teste 28 dias). Medula e vaso sanguíneo, animal 2. H.E. (100 X).

O principal tipo celular identificado no tecido conjuntivo foi de fibroblastos secretores, com núcleos evidentes, claros e cromatina frouxa. Muitas células em processo de diferenciação também se encontram neste tecido conjuntivo, nas proximidades das trabéculas ósseas em formação, dando origem a osteoblastos secretores, com citoplasma grande e muito acidófilas, em arranjo epitelióide na



superfície de um osteóide, no qual pode-se observar a inserção dos feixes de fibras colágenas que estão sendo integradas pela matriz óssea (Figura 26).



Figura 26. Grupo A1 (teste 28 dias). Osteoblastos secretores. H.E. (400 X).

Verifica-se, neste tecido conjuntivo, a presença de algumas células inflamatórias esparsas, plasmócitos, principalmente circunvizinhas aos vasos sanguíneos. (Fig. 26)

Quanto às trabéculas ósseas, estas se mostram bem estruturadas, exibindo muitas linhas de crescimento ósseo aposicional, com a presença de muitos osteoblastos secretores em sua superfície e grande quantidade de osteócitos jovens, cujas lacunas se mostram amplas, de bordos mal definidos e com grande proximidade entre células. É possível se observar a linha demarcatória entre tecido ósseo primário e tecido ósseo secundário (seta) (Figura 27).

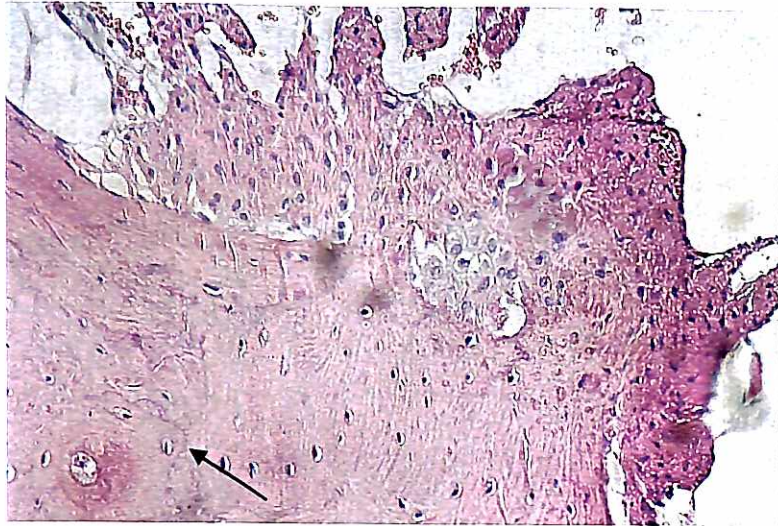


Figura 27. Grupo A1 (teste 28 dias). Linhas de crescimento. H.E. (100X).

Também é possível observar com certa freqüência a presença de lacunas ósseas com dois osteócitos em seu interior, imagem típica de tecido ósseo muito jovem (Figura 28).

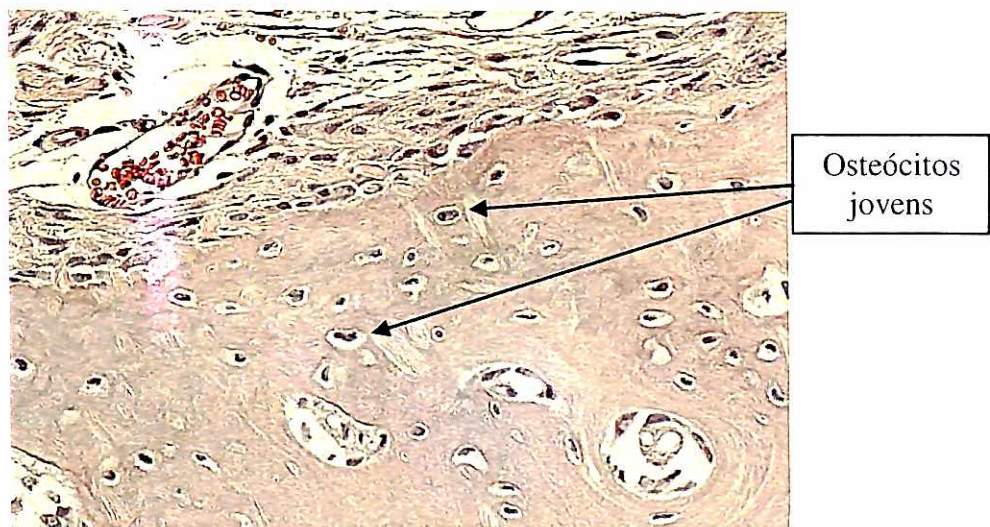


Figura 28. Grupo A1 (teste 28 dias) Osteócitos jovens. H.E. (100X).



Observa-se também a inclusão de feixes de fibras colágenas pela matriz óssea recém formada, denotando a atividade secretora dos osteoblastos aí existentes e sua consequente síntese de matriz óssea (Figura 29).

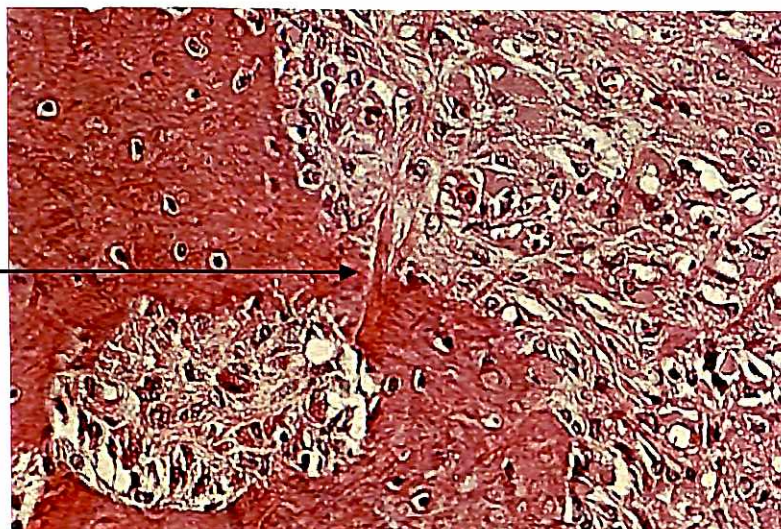


Figura 29. Grupo A1 (teste 28 dias) Feixes de colágeno. H.E. (100X).

Neste grupo (A1, teste aos 28 dias), a quantidade de tecido conjuntivo medular entre as trabéculas ósseas neo-formadas se mostra muito reduzida, podendo-se observar trabéculas largas e com conexão direta com o tecido ósseo secundário pré-existente (Figura 30).

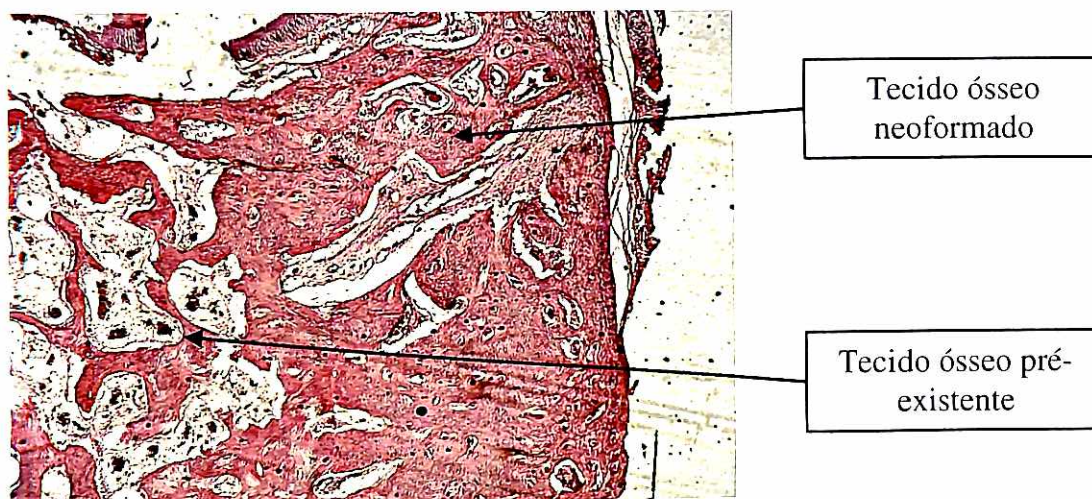


Figura 30. Grupo A1 (teste 28 dias). Tecido ósseo neoformado. H.E. (40X)

### 5.1.3 Grupo B (controle aos 56 dias)

No **grupo B** (grupo controle aos 56 dias), os defeitos se mostraram totalmente fechados, não mais apresentando tecido conjuntivo, mas sim um preenchimento de tecido ósseo esponjoso primário, com algumas regiões demonstrando já o surgimento de alguns sistemas de Havers, o que demonstra uma evolução do tecido ósseo de primário para secundário neste tempo (Figura 31).

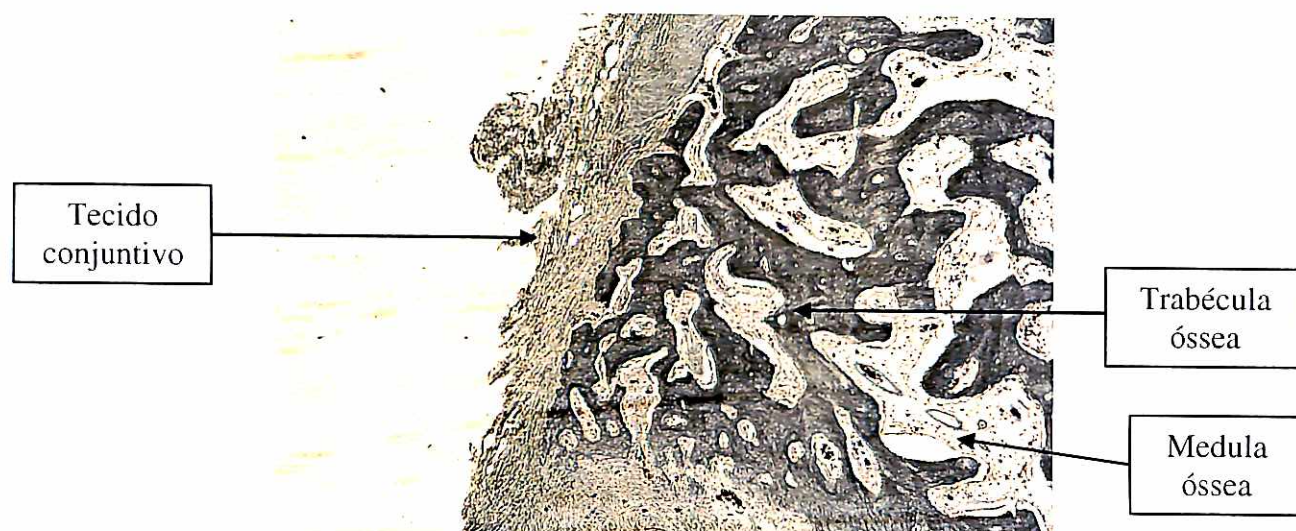


Figura 31. Grupo B (controle 56 dias) Tecido conjuntivo, animal 1.

Mallory.(40X).

A espessura das trabéculas ósseas se mostra muito aumentada e o tecido conjuntivo aprisionado entre elas se apresenta em lojas diminuídas, sempre contendo um sistema vascular sanguíneo com veias e pequenos capilares. Encontra-se uma perfeita conexão entre o tecido ósseo neoformado e o osso pré-existente, sendo difícil a determinação da divisão entre eles (Figura 32).





Figura 32. Grupo B (controle). Tecido ósseo neoformado, animal 2. H.E. (40X).

Na superfície do osso neoformado ainda se encontra atividade de diferenciação de osteoblastos secretores, com conseqüente síntese de matriz óssea (osteóide) demonstrando um persistente crescimento ósseo aposicional no sentido do periósteo. Não há evidências de células inflamatórias nem de vasos sanguíneos congestionados (Figuras 33 e 34).

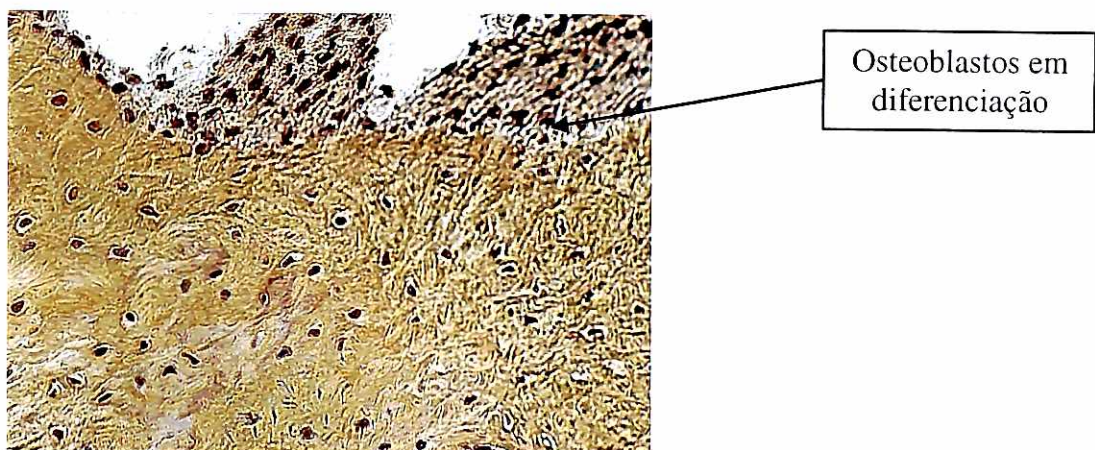


Figura 33. Grupo B (controle 56 dias). Diferenciação de osteoblastos. Gabe. (100X).



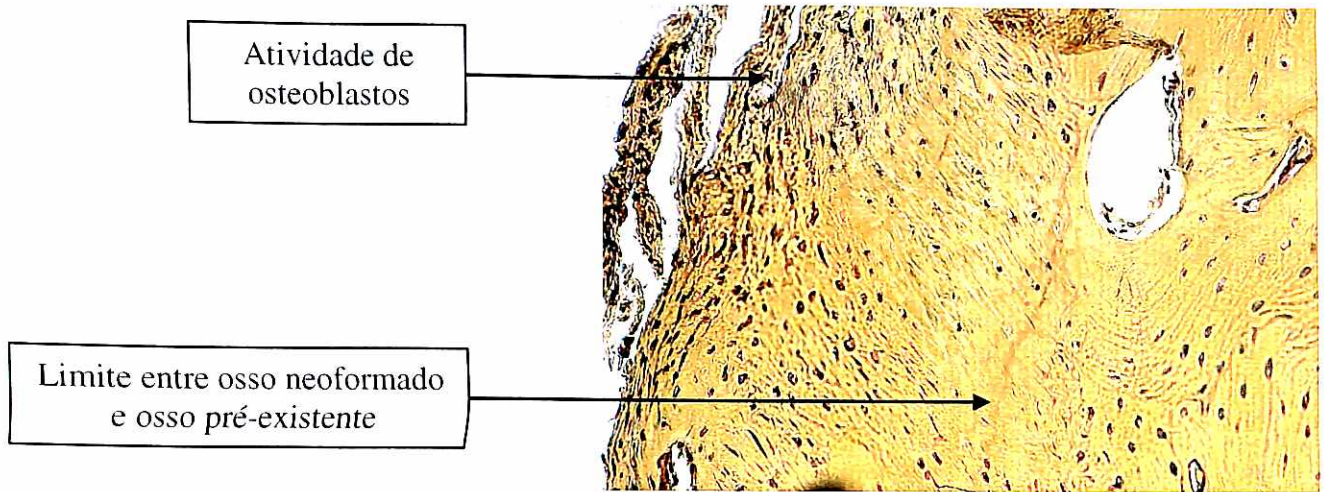


Figura 34. Grupo B (controle 56 dias). Osteoblastos. Gabe. (100X).

#### 5.1.4 Grupo B1 (teste aos 56 dias)

No **grupo B1** (grupo teste 56 dias) observa-se o fechamento total dos defeitos ósseos, com a formação de trabeculado principalmente primário, mas demonstrando evolução para tecido ósseo secundário lamelar em várias regiões do osso neoformado. As trabéculas ósseas se mostram bem formadas e revestidas por osteoblastos de citoplasma baixo, em arranjo epitelióide, típicas células em fase de síntese diminuída. Os osteócitos aparecem em grande quantidade dentro das trabéculas ósseas, incluídos em lacunas de limites nítidos e únicos por lacuna (Figura 35).



Figura 35. Grupo B1 (teste 56 dias). Medula óssea, animal 1. H.E.(40X).

O tecido aprisionado entre as trabéculas se mostra rico em células adiposas, típico de medula óssea madura, com a presença constante de capilares sanguíneos, veias e artérias. É nítido o crescimento aposicional através de inúmeras linhas de crescimento ósseo e o esboço de alguns canais nutrientes (canais de Havers), com seus pequenos vasos sanguíneos típicos (Figura 36).

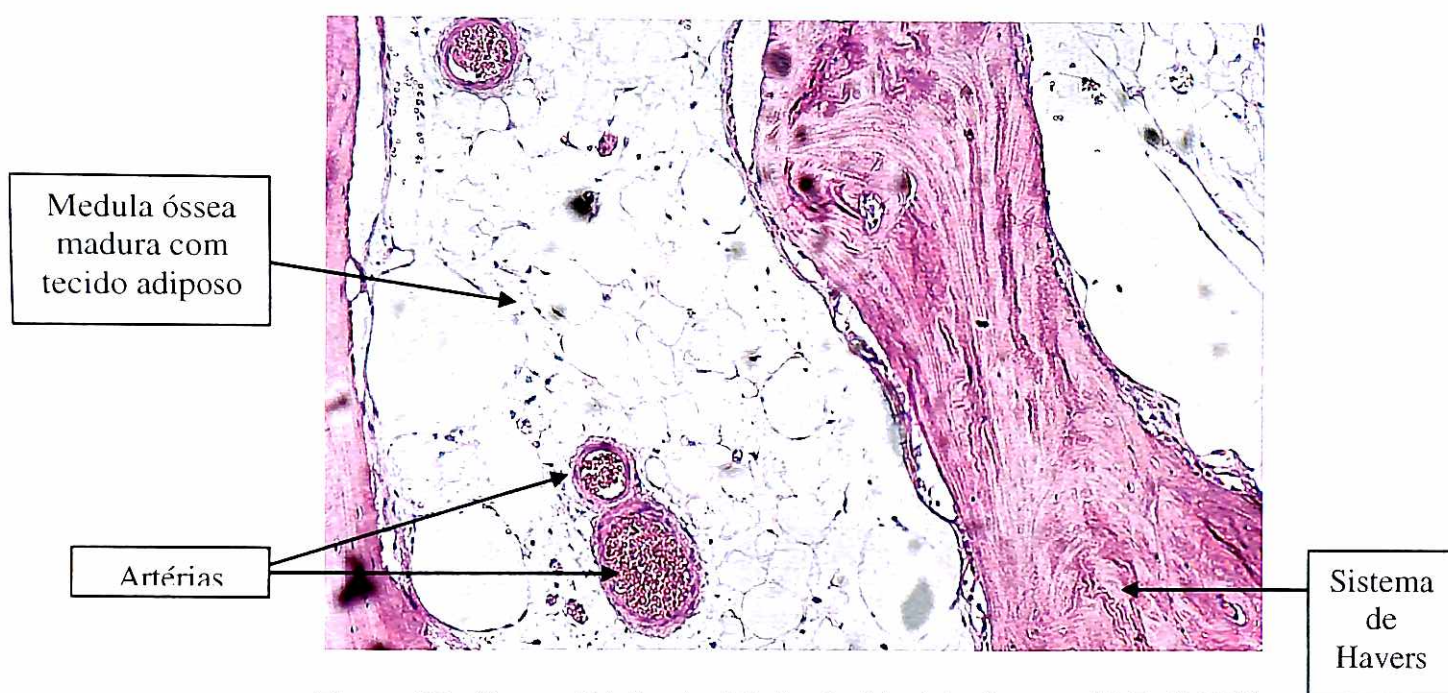


Figura 36. Grupo B1 (teste 56 dias). Medula óssea. H.E. (100X).

Em algumas regiões dos cortes histológicos aparece claramente a formação de uma cortical externa de tecido ósseo secundário, com a estruturação de um sistema circunferencial externo típico de superfícies externas ósseas, onde é visível o arranjo paralelo das fibras colágenas e dos osteócitos (Figuras 37 e 38).





Figura 37. Grupo B1 (teste 56 dias) Sistema externo. Gabe. (100X).

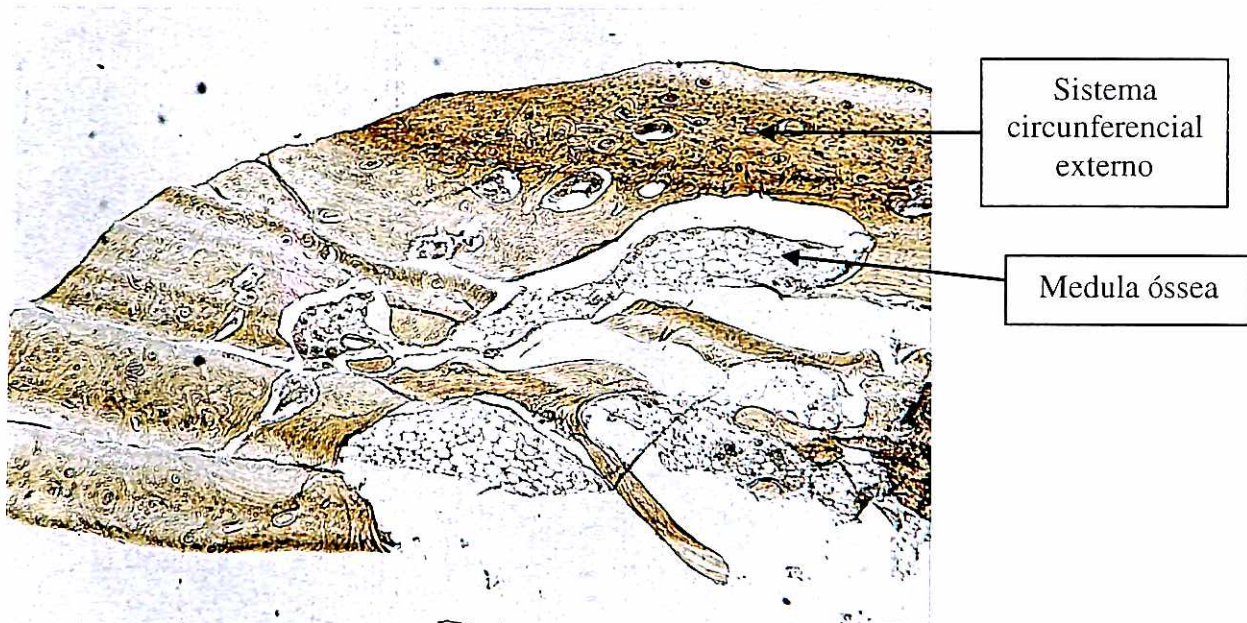


Figura 38. Grupo B1 (teste 56 dias). Cortical externa. Gabe. (40 X).



### 5.1.5 Comparativo ilustrativo entre as amostras

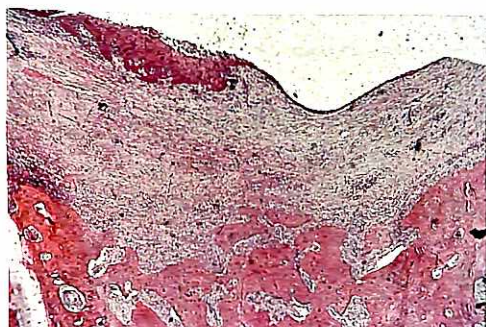


Figura 39 Grupo A (controle 28 dias) H.E.(100x



Figura 40 Grupo A1 (teste 28 dias) H.E. (100x)

Observa-se na Fig. 39 que o grupo A (controle 28 dias) apresenta grande quantidade de tecido conjuntivo remanescente na superfície do defeito cirúrgico. Já a Fig. 40 mostra uma mínima quantidade de tecido conjuntivo remanescente na superfície do defeito cirúrgico no Grupo A (teste 28 dias).

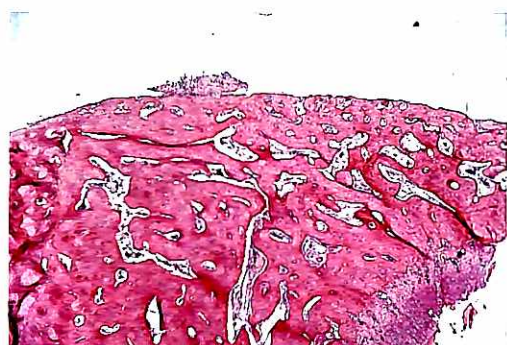


Figura 41 Grupo B (controle 56 dias) H.E.(100x)

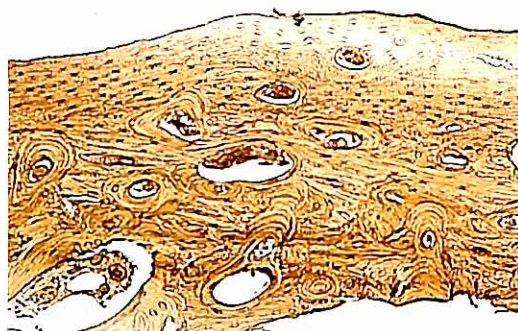


Figura 42 Grupo B1 (teste 56 dias) Gabe (100x)

Observa-se na Fig. 41(H.E. 100X) o defeito cirúrgico totalmente fechado. No entanto não observamos a presença do sistema circunferencial externo. Já a Figura 42 nos mostra o defeito cirúrgico totalmente fechado com a presença do sistema circunferencial externo, o que indica uma maior maturidade óssea.

## 6. DISCUSSÃO

Como Matsumoto (1988) demonstrou em sua pesquisa, o cloreto de estrôncio apresenta ação antireabsortiva e osteoestimuladora no tecido ósseo. O autor utilizou células de calvária de camundongos, sob a ação antireabsortiva da prostaglandina E2, administrando cloreto de estrôncio na concentração de 1 mM, conseguindo desta forma inibir o processo de reabsorção, inibição esta cuja taxa foi maior na concentração de 5 mM.

Brandi (1993) relatou que o estrôncio é quimicamente análogo ao cálcio e interage com este, sendo que sua absorção intestinal e sua atividade não interferem com o metabolismo do cálcio, pelo contrário, quando a ingestão de estrôncio é intensificada, ocorre reposição de cálcio e sua deposição nas áreas de remodelação óssea ativa.

*Segundo este autor, a administração de baixas doses de estrôncio a pacientes com osteoporose aumentou a massa óssea vertebral, além de demonstrar aumento ósseo na crista ilíaca, através de análises histomorfométricas.*

Morohashi et al. (1994) estudaram a qualidade dose-dependente do sal de estrôncio, demonstrando que doses excessivas podem causar distúrbios no metabolismo do cálcio.

Em nosso estudo, não foi detectada qualquer alteração na estrutura do osso neoformado que pudesse ser relacionada à dose administrada de cloreto de estrôncio (tópica em concentração de 2 M). Tanto no grupo A1 (teste 28 dias), quanto no grupo B1 (teste 56 dias), o osso formado nas regiões dos defeitos ósseos aparentou uma estrutura normal, com trabéculas bem formadas e células de aspecto típico de síntese óssea.

Boivin et al. (1996), relataram que ratos sob exposição de altas doses de estrôncio podem apresentar raquitismo, com mineralização deficiente.

Em nosso estudo, este aspecto não foi detectado, uma vez que, como já citado, o tecido ósseo neoformado apresentou características histomorfológicas normais, e seu processo de desmineralização para a confecção das lâminas histológicas demorou cerca de 60 dias, em E.D.T.A., tempo considerado normal para o processamento de amostras de tecido ósseo, demonstrando que este tecido apresentava carga mineral elevada.

Cabrera et al. (1999), em um trabalho de revisão, citaram que a principal via de absorção do estrôncio é gastrintestinal. Sugeriram que a via de absorção deste íon se dá através de difusão passiva, ou seja, transporte paracelular. Entretanto os autores citam que podem haver duas rotas de entrada para este elemento: carreadores ativos e difusão passiva. Em seu estudo, como no nosso, o cloreto de estrôncio foi utilizado de forma tópica. Sugerimos, através de nossos resultados, que este íon também age de forma local, diretamente nas células ósseas, estimulando a ação e replicação dos osteoblastos e a inibição e replicação dos osteoclastos, levando a um aumento da taxa de síntese óssea e a diminuição da reabsorção.

Este achado concorda com as afirmações de Cabrera et al. (1999), quando citam que o estrôncio apresenta a capacidade de penetrar nas células, via canais de cálcio, e subsequentemente se ligar aos sítios de ligação intracelulares, tais como o retículo endoplasmático, afetando desta forma a homeostasia intracelular de cálcio e os processos de mineralização ósseas. Realmente concordamos que o estrôncio deva penetrar nas células, mas na dose por nós utilizada não observamos distúrbios de mineralização. Ao contrário, o estrôncio estimulou e incrementou a ossificação

intramembranosa que se desenvolveu nos defeitos ósseos criados nas mandíbulas dos coelhos.

Ainda segundo Cabrera et al (1999), o estrôncio não parece afetar a produção de proteínas colagenosas produzidas pelos osteoblastos. Concordamos com esta afirmação em vista dos achados histomorfológicos nos grupos testes, onde se verificou a formação de uma matriz óssea com estrutura de feixes colágenos bem estruturada, principalmente visível nas amostras de 56 dias, onde já é possível observar a estruturação de sistemas de Havers, sistema circunferencial externo e estrutura lamelar do tecido ósseo.

Estes autores ainda descrevem em seu trabalho, que a causa do aumento de massa óssea não pode ser bem definida: se por um aumento na síntese de osteóide, ou por uma diminuição na taxa de reabsorção.

Também em nosso estudo não pudemos chegar a uma conclusão definitiva sobre esta questão, apesar de termos observado que a quantidade de osteoblastos secretores era muito grande. Em contrapartida, não pudemos documentar osteoclastos, levando-nos a crer que o processo de reabsorção comum em reparações ósseas não foi relevante.

Segundo Dahl et al. (2001), o estrôncio apresenta um efeito benéfico para o osso. Em estudos "in vitro", o seu uso aumenta a replicação de osteoblastos e estimula a formação óssea em células sob cultura. Estes efeitos foram observados tanto em células isoladas quanto em cultura de tecidos e também em estudos "in vivo". Estes autores chegaram à conclusão de que o cloreto de estrôncio, em baixas doses, não causa nenhum distúrbio no metabolismo ósseo, mas aumenta o número de osteoblastos e diminui o número e atividade de osteoclastos.



Poderíamos concordar com estas afirmações totalmente, não fosse o fato de que a ausência de osteoclastos, em nosso trabalho, ocorreu tanto nos grupos teste como nos grupos controle. Desta forma, esta afirmação nos leva a crer que a grande diferença observada entre os grupos teste e controle, com uma taxa de formação óssea maior nos grupos teste, deve ser de responsabilidade do maior número e atividade dos osteoblastos.

Marie et al. (2001) citaram que o estrôncio exerce ação anabolizante no tecido ósseo, e em baixas doses estimula a síntese deste tecido, resultando num aumento da massa óssea em animais normais. Segundo estes autores, ratos expostos à administração de estrôncio (na forma de cloreto), mostraram aumento no volume de osso trabecular, avaliado através de histomorfometria, sem alteração do perfil mineral ou do processo de mineralização. Ainda neste estudo, citaram que a administração local de cloreto de estrôncio, na forma injetável e na concentração de 0,5 mM, uma vez por semana, também estimulou a formação de osso alveolar em ratos.

Este estudo se aproxima do nosso, quanto à aplicação tópica do cloreto de estrôncio, apesar de a forma de administração ser diferente. Os resultados também são coincidentes, pois em nosso estudo também detectamos um incremento na formação de tecido ósseo mandibular quando tratado localmente com cloreto de estrôncio.

Ferraro et al. (2001) estudaram o efeito do cloreto de estrôncio sobre o osso alveolar de ratos, administrando este íon através de um veículo de esponja de colágeno (Gelfoam) localmente. As esponjas de colágeno foram embebidas em solução de cloreto de estrôncio a 2 M para os grupos teste e embebidas em solução fisiológica para os grupos controle. As esponjas foram implantadas

subperiostealmente e suprapariostealmente, porém não foram criados defeitos ósseos. Desta forma, o cloreto de estrôncio foi utilizado localmente e os resultados sugerem que a osteogênese pode ser estimulada pela presença local deste íon.

Utilizamos um protocolo de trabalho semelhante em nosso estudo: a concentração do cloreto de estrôncio foi também de 2M e o veículo utilizado foi igualmente uma esponja de colágeno (Hemospon®). Porém, diferentemente destes autores, colocamos as esponjas de colágeno dentro de defeitos ósseos, subperiostealmente e cobertas com membranas reabsorvíveis, e não em sua superfície. Porém, nossos resultados nos levaram a sugerir, igualmente a estes autores, que o cloreto de estrôncio pode realmente estimular a osteogênese em tecido ósseo quando utilizado localmente.

Ammann et al. (2004) realizaram um estudo sobre a ação do ranelato de estrôncio no aumento da massa óssea e na melhoria da arquitetura deste tecido em ratos. Os autores relataram que os animais tratados com estrôncio demonstraram aumento e melhoria da micro-arquitetura do tecido ósseo, relacionados com o aumento do número de trabéculas e sua espessura. Isto parece vir de acordo com nossos resultados, uma vez que é notável a maior produção de matriz óssea, a maior quantidade de trabéculas ósseas e sua maior espessura em nossos grupos teste.

Segundo Marie (2005), o estrôncio administrado em ratos em período de crescimento estimula o aumento do volume trabecular ósseo sem alterar a sua mineralização. Segundo o autor, o estrôncio estimula a replicação de pré-osteoblastos e estimula a síntese de colágeno pelos osteoblastos. Além disso, o estrôncio inibe a reabsorção óssea de osteoclastos em camundongos.

Estas afirmações coincidem com os resultados de nosso estudo, onde é possível se observar o grande número de osteoblastos recém diferenciados e secretores em nosso grupo A1 (teste de 28 dias), assim como a grande quantidade de feixes de fibras colágenas sendo anexadas pelo osteóide recém sintetizado, demonstrando a grande atividade destas células.

Deve-se discutir o fato de termos encontrado infiltrado inflamatório em nosso grupo A (controle de 28 dias). Este infiltrado se mostrou disperso por um grande volume de tecido conjuntivo denso que preencheu o defeito ósseo criado nos grupos controle.

Poder-se-ia deduzir que este infiltrado inflamatório fosse devido à presença da esponja de colágeno no interior dos defeitos, mas a mesma esponja foi utilizada nos defeitos ósseos do grupo A1 (teste de 28 dias), e neste, as células inflamatórias se mostraram raras ou inexistentes.

Outra possibilidade para o surgimento destas células no grupo A (controle de 28 dias) seria a presença da membrana reabsorvível, mas, seguindo o mesmo raciocínio, a mesma membrana foi utilizada nos grupos teste A1 e B1. Não temos condições de afirmar com certeza a razão do surgimento deste infiltrado inflamatório, mas sabemos que se repetiu em todos os animais do grupo A (controle de 28 dias).

Ferraro et al. (2001), levantaram a hipótese de que o aumento na taxa de formação óssea encontrada em seu estudo pudesse ser relacionado a um estímulo inflamatório causado pela presença das esponjas de colágeno. Discordamos deste fato, uma vez que encontramos processo inflamatório crônico somente nas amostras do grupo controle. Em nosso modelo experimental, chegamos à conclusão de que não se pode atribuir a presença de células inflamatórias à esponja de colágeno nem à membrana reabsorvível.



Além deste infiltrado inflamatório, a presença da grande quantidade de tecido conjuntivo denso no grupo controle, que não existia na mesma proporção no grupo teste, nos leva a crer que a utilização do cloreto de estrôncio, segundo nossa metodologia, acelerou a produção de tecido ósseo nos defeitos cirúrgicos criados.

Na análise de 56 dias, as diferenças histomorfológicas entre os grupos teste e controle foram mais discretas. A principal diferença encontrada foi a formação do sistema circunferencial externo no grupo teste, indicativo da reestruturação da cortical compacta externa da mandíbula. No grupo controle, apesar do tecido ósseo estar bem estruturado, esta formação cortical não foi visível.

É interessante também ressaltar como a estrutura do tecido conjuntivo normalmente existente entre as trabéculas do tecido ósseo neoformado se apresentou no estudo.

Nos grupos teste e controle de 28 dias (A e A1), o tecido aí encontrado foi diagnosticado como sendo um tecido conjuntivo frouxo. A quantidade de vasos sanguíneos se mostrou maior no grupo teste (A) que no controle (A1), o que nos leva a sugerir que o maior afluxo sanguíneo na região é indicativo de uma maior atividade tecidual e celular.

Também o próprio tecido conjuntivo remanescente, presente no interior dos defeitos ósseos, que se apresentou em maior quantidade no grupo controle do que no teste, mostrou uma variação na quantidade e no tamanho dos vasos sanguíneos. Estes se mostraram maiores e em maior quantidade nas amostras no grupo teste (A1). Este fato também nos leva a acreditar que houve uma maior atividade osteogênica do tecido ósseo no grupo teste (A1 e B1), tratado com o cloreto de estrôncio topicamente.

Quanto à medula óssea observada nos grupos B e B1 (teste e controle de 56 dias), pudemos observar a presença de células adiposas e vasos sanguíneos, que se mostraram mais presentes nas amostras do grupo B1 (teste 56 dias), apesar de também existirem nas amostras do grupo B (controle 56 dias), ainda que em menor quantidade.

A presença de tecido adiposo na medula óssea das amostras do grupo B1 (teste 56 dias) sugere a existência de uma medula madura, chamada de medula óssea amarela, típica de tecidos ósseos secundários. Esta afirmação é reiterada pela avaliação do tecido ósseo encontrado nestas amostras, uma vez que é possível observar a constituição de diversos sistemas de Havers, alguns totalmente formados, outros em formação ou em remodelação.

Esta condição de remodelação ou substituição de sistemas de Havers em tecido ósseo é característica de ossos maduros, pois é sabido que este tecido apresenta alto metabolismo, sendo constantemente remodelado através da construção e modificação dos sistemas já existentes. Isto demonstra que o tecido ósseo apresenta um *turn over* alto, e é indicativo de tecido saudável.

Ainda analisando a medula óssea encontrada nas amostras de 56 dias, é importante citar a presença de vasos de calibre maior, como artérias e veias, vasos estes que não foram encontrados nas amostras de 28 dias, demonstrando que o tecido ósseo formado no interior dos defeitos cirúrgicos somente evoluiu, de primário para secundário, e teve sua arquitetura incrementada durante este período.

Nota-se que a presença destes grandes vasos foi mais evidente nas amostras dos grupos A1 e B1 (teste 28 e 56 dias) que nas controle, levando-nos novamente a crer que a utilização tópica do cloreto de estrôncio foi benéfica para o tecido ósseo neste modelo experimental.

## 7. CONCLUSÕES

Através dos nossos resultados podemos concluir que:

- a) neste modelo experimental a aplicação tópica de gel de cloreto de estrôncio a 2M estimulou a reparação óssea de defeitos criados em mandíbulas de coelhos.
- b) A reparação óssea estimulada pelo gel de cloreto de estrôncio foi mais evidente nas amostras de 28 dias.
- c) Nas amostras de 56 dias a diferença no crescimento ósseo entre as amostras controle e teste não foi tão expressiva.

## REFERÊNCIAS 1

ADAMI, S. Protelos: nonvertebral and hip antifracture efficacy in postmenopausal osteoporosis. **Bone**, v. 38, suppl. 1, p. 23-7, 2006

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. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 12, p. 2012-201, 2004

BOIVIN, G.; DELOFFRE, P.; PERRAT, B.; PANCZER, G.; BOUELLE, M.; MAURAS, Y.; ALLAIN, P.; TSOUDEROS, Y.; MEUNIER, P.J. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S12911) administration. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 9, p. 1302-11, 1996

BRANDI, M. L. New treatment strategies: ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites and analogs. **The American Journal of Medicine**, v. 95, suppl. 5A, p. 69-73, 1993

BROWN, E. M. Is the calcium receptor a molecular target for the actions of strontium on bone?. **Osteoporos Int.**, v. 14, n. 3, p. s25-s34, 2003

BURLET, N.; REGINSTER, J.Y. Strontium ranelate: The first dual acting treatment for postmenopausal osteoporosis. **Clinic. Orthop. & Related Research**, v. 443, p. 55-60, 2006

CABRERA, W. E.; SCHROOTEN, I.; DE BROE, M.E.; D'HAESE, P.C. Strontium and bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 5, p. 661-68, 1999

CALVO, M.S.; EYRE, D.R.; GUNDBERG, C.M. Molecular Basis and Clinical Application of Biological Markers of Bone Turnover. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 235-40, 1996

<sup>1</sup> De acordo com a NBR 14724 e NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002. Abreviaturas dos Periódicos segundo Index to Dental Literature<sup>1</sup>e (Seriados em Ciência da Saúde) SECS.

CATE, T. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998

COULOMBE, J.; FAURE, H.; ROBIN, B.; RUAT, M. In vitro effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 1184-90, 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.446-53, 2001

DAVIES, J.E. **Bone Engineering**. Toronto: Copyright, p.656,2000.

DOUGLAS,C.R. et al. Fisiologia do osso. **Patofisiologia Oral**. São Paulo: Pancast, 2000. v.2, cap. 51, p. 201 – 217.

FERRARO, E. F.; CARR, R.; ZIMMERMAN, R. A comparison of the effects of strontium chloride and calcium chloride on alveolar bone. **Calcif. Tissue**, v. 35, p. 258-60, 1983

FERRARO, E. F.; GLASS, R. T. The effect of strontium chloride upon alveolar bone. **Calcif. Tissue Int.**, v. 6, p. 345-47, 2001

FRAME,J.W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J. Oral Surg.**, Chicago, v. 38, n. 3, p. 176-80 Mar, 1980.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In:\_\_\_\_\_.**Histologia Básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 8, p. 136-153

KOLLENKIRCHEN, V. Measurement of bone resorption by strontium excretion in prelabelled rats. **Bone**, v. 17, n. 4, p. 455s-60s, 1995

LLINAS, P.; MASELLA, M.; STIGBRAND, T.; MÉNEZ, A.; STURA, E.A.; LE DU, M.H. Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: implication for its secondary effect in bones. **Protein Science**, v. 15, p. 1691-1700, 2006

LIU, X.; CHEN, D. Effects of strontium substitute hydroxyapatite of different porosities on osteoblasts in vitro. **Journal of Oral Tissue Engineering**, v. 2, n.2, p. 66-75, 2004

MANETTE, C.; COLLETE, J.; SARLET, N.; TANCREDI, A. Comprehensive therapy in osteoporosis using a single drug: from ADFR to strontium ranelate. **Curr. Med. Chem.**, v.13, n.13, p. 1585-90, 2006

MARIE, P. J.; AMMANN, P.; BOIVIN, G.; REY, C. Mechanisms of action and therapeutic potencial os strontium in bone. **Calcif. Tissue**, v. 69, p. 121-29, 2001

MARIE, P. J. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. **Osteoporos Int.**, v. 16, p. s7-s10, 2005

\_\_\_\_\_, P.J. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, suppl. 1, p. S11-S15, 2006

MARX, R.E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.**Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Endod.**, St. Louis, v. 85, n. 6, p. 638-46, 1998.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone Structure, Metabolism, and Physiology: Its Impact on Dental Implantology. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 7, n. 4, p. 267-76, 1998.

MATSUMOTO, A. Effect of strontium chloride on bone resorption induced by prostaglandin E2 in cultured bone. **Arch. Toxicol.**, v.62, p. 240-41, 1988

MISCH, C.E. Fisiologia e Metabolismo Ósseos. In:\_\_\_\_\_. **Implantes Dentários Contemporâneos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Santos, 2000. Cap.17, p. 225-39

MONOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 121, p. 115-37, 2000

MOROHASHI, T.; SANO, T.; YAMADA, S. Effects of strontium on calcium metabolism in rats. I. A distinction between the pharmacological and toxic doses. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 64, p. 155-62, 1994

NIELSEN S. P. The biological role of strontium.**Bone**, v. 35, p. 585-88, 2004

NI, G.X.; LU, W.W.; CHIU, Z.Y.L.; FONG, D.Y.T.; LUK, K.D.K. Strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement for primary hip replacement: A in vivo study. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 77B, n. 2, p. 409-15, 2005

PERRI, P.S. et al. **Biologia da osseointegração**. In: Gomes, L.A. **Implantes Osseointegrados: técnica e arte**. São Paulo: Santos, 2002. cap.01, p.1-9.

PI, M.; FABER, P.; EKEMA, G.; JACKSON, P.D.; TING, A.; WANG, N.; FONTILLA-POOLE, M.; MAYS, R.W.; BRUNDEN, K.R.; HARRINGTON, J.J.; QUARLES, L.D. Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. **J. Biol. Chem.**, v.280, n. 48, p. 40201-09, 2005

RASMUSSEN H.; FEINBLATT, J.; NAGATA, N.; PECHET, M. Effect of ions upon bone cell function. **Federation Proceedings**, v. 29, n. 3, p. 1190-97, Jun. 1970

RIZZOLI, R. Bone anabolic agents in the treatment of patients with osteoporosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, suppl. 3, p. 155, 2005

ROBERTS W.E. et al. Implants: Bone physiology and metabolism. **CDA J.**, Los Angeles, v. 15, n. 10, p. 54-61, Oct. 1987.

ROBERTS, W. E.; GARETTO, L. P. In: MISCH, C. E. **Implantes Osseointegrados**, 2.ed. São Paulo: ed. Santos, 2000. Cap.17, p. 225-238

SCHROOTEN, I.; BEHETS, G.J.S.; CABRERA, W.E.; VERCAUTEREN, S.R.; LAMBERTS, L.V.; VERBERCKMOES, S.C.; BERVOETS, A.J.; DAMS, G.;

GOODMAN, W.G.; DE BROE, M.E.; D'HAESE, P.C. Dose-dependent effects of strontium on bone of chronic renal failure rats. **Kidney Int.**, v. 63, p. 927-35, 2003

SHAHNAZARI, M.; SHARKEY, N.A.; FOSMIRE, G.J.; LEACH, R.M. Effects of strontium on bone strength, density, volume and microarchitecture in laying hens. **J. Bone Miner. Res.**, v. 21, n. 11, p. 1696-703, 2006

SODEK, J.; MCKEE, M.D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v.24, n. 1, p. 99-126, Oct. 2000

URIST, M.R. Bone: Formation by autoinduction. **Science**, Washington, n. 150, n.698, p. 893-9, Nov. 1965.

VERBERCKMOES, S. C.; BROE, M. E.; D'HAESE, P. C. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. **Kidney Int.**, v. 64, p. 534-43, 2003



**ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética**



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO  
Comitê de Ética em Pesquisas  
Registro CONEP n.º 308  
Aprovado em 16/05/2000

**PARECER N.º 071/2006**

**REGISTRO CEP UNISA N.º 024/06**

**Projeto de Pesquisa:** “Análise histomorfológica e histomorfométrica do uso do cloreto de estrôncio sobre a indução do crescimento ósseo em defeitos provocados em mandíbula de coelho.”

**Pesquisadores Responsáveis: Orientadora:** Prof.ª Dr.ª Fátima Faraco

**Pós-Graduando:** Márcio Antônio Faria

**Área Temática Especial:** Implantodontia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa, com objetivo “Análise histomorfológica e histomorfométrica do uso do cloreto de estrôncio sobre a indução do crescimento ósseo em defeitos provocados em mandíbula de coelho.”

São Paulo, 12 de abril de 2006

**PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI**  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas  
UNISA - Universidade de Santo Amaro

## Parecer Consubstanciado de Projeto

**Título do Projeto:** Análise histomorfológica e histomorfométrica do uso do cloreto de estrôncio sobre a indução do crescimento ósseo em defeitos provocados em mandíbula de coelho

**Pesquisador Responsável:** Pós- Graduando: Márcio Antônio Faria  
**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fátima Faraco

**Data da Versão**

**Cadastro 283**

**Data do Parecer 12/04/2006**

**Grupo e Área Temática** 1.5 Novos procedimentos

### Objetivos do Projeto

Avaliar o emprego de cloreto de estrôncio sobre o crescimento ósseo em defeitos ,mandibulares provocados em coelhos.

### Sumário do Projeto

Coelhos são submetidos a cirurgia para estabelecer lesões ósseas nas mandíbula, avaliando-se posteriormente a regeneração óssea quando aplicado cloreto de estrôncio.

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Sim
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total Na Instituição sim
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01/12/2005
Data de término prevista	30/06/2006
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

Aprovar

O projeto tem mérito por avaliar o emprego de cloreto de estrôncio sobre crescimento ósseo em defeitos da mandíbula.

São Paulo, 12 de abril de 2006.



**PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI**  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas  
UNISA - Universidade de Santo Amaro



*Universidade de Santo Amaro*  
*Mestrado em Odontologia*  
*Implantodontia*

**PROVA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO**

Programa: Mestrado em Odontologia  
Área de Concentração: Implantodontia  
Candidato(a): **MARCIO ANTONIO DE FARIA**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

***I – Membros Titulares:***

**1.º EXAMINADOR:** Profa. Dra. Fátima Neves Faraco  
**TÍTULOS E INSTITUIÇÃO:** Doutora em Clínica Integrada pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

**2.º EXAMINADOR:** Prof Dr. Waldyr Antonio Jorge  
**TÍTULOS E INSTITUIÇÃO:** Livre Docente pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**3.º EXAMINADOR:** Prof. Dr. Nelson Villa  
**TÍTULOS E INSTITUIÇÃO:** Livre Docente pela Universidade de São Paulo

***II – Membros Suplentes:***

**1.º SUPLENTE:** Prof. Dr. Paschoal Laércio Armonia  
**TÍTULOS E INSTITUIÇÃO:** Livre Docente em Clínica Integrada pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

**2.º SUPLENTE:** José Leonardo de Simone  
**TÍTULOS E INSTITUIÇÃO:** . Doutor em Clínica Integrada pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo