



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

ANA PATRÍCIA SOUZA DE LIMA

**ATIVIDADES ANTIRREABSORTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
RANELATO DE ESTRÔNCIO EM RATOS**

FORTALEZA
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA PATRÍCIA SOUZA DE LIMA

**ATIVIDADES ANTIRREABSORPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
RANELATO DE ESTRÔNCIO EM RATOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Profa. Dr^a Vilma de Lima

FORTALEZA
2010

ANA PATRÍCIA SOUZA DE LIMA

**ATIVIDADES ANTIRREABSORTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
RANELATO DE ESTRÔNCIO EM RATOS**

**Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.**

Área de concentração em Clínica Odontológica

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dr^a Vilma de Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC**

**Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio.
Universidade Estadual Paulista-UNESP**

**Profa. Dr^a Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará-UFC**

Dedicatória

Aos meus pais, Roberto e Ana, modelos reais de força e perseverança, verdadeiros mestres, por todo o amor, amizade, incentivo, confiança e dedicação compartilhados, além da educação moral e intelectual proporcionada a mim.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pela oportunidade de evoluir e por demonstrar claramente sua presença em minha vida.

Aos meus pais, Roberto Vidal de Lima e Ana Maria Ulisses de Souza, os quais sempre me apoiaram e motivaram à busca dos meus ideais, e responsáveis pelo que eu sou.

Aos meus irmãos, Carlos Roberto e Leonardo Bruno, pelo amor e amizade reservados a mim durante todas as etapas de minha vida, os quais certamente foram essenciais para a concretização de mais um objetivo.

Ao Fernando Alcântara, meu namorado, fiel companheiro, pelo apoio constante em muitos momentos da minha vida e decisões importantes, além da ajuda direta em vários momentos de mais uma fase concluída.

Aos meus familiares, especialmente ao meu avô Souza e Valdir e a minha avó Terezinha Ulisses, que sempre me incentivaram, além dos meus tios e tias: Márcia, Célia, Cláudio, Carlos, Olívia e Francisco que de uma forma particular, cada um contribuiu em mais uma etapa alcançada na minha profissão.

A todos os meus amigos, especialmente aqueles desde a vida acadêmica, que permanecem fazendo parte da minha vida e que, além do apoio imprescindível, também compartilharam muitos momentos importantes da minha formação mesmo após a graduação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Vilma de Lima, pelo incentivo, competência, paciência, amizade, além dos constantes e valiosos ensinamentos em meu processo de aprendizagem.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) e Farmacologia (PPGF), que muito contribuíram em minha formação acadêmica.

À professora Norma Maria Barros Benevides, do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e às professoras Nylane Maria Nunes de Alencar e Gerly Anne de Castro Brito do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pela sua contribuição na realização de diversas fases desse estudo.

À doutoranda Paula Goes Pinheiro e à estudante de iniciação científica Iracema Matos de Melo pelo companheirismo, disposição e dedicação em auxiliar durante toda a pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica (PPGB) Luana Silva, Ariévilo Rodrigues, Edfrank Vanderlei pela colaboração em ensaios bioquímicos.

Aos estudantes de Iniciação Científica e monitores da disciplina de Farmacologia Mariana Vasconcelos Magalhães, Pedro Henrique Accioly, Edson Xavier Aguiar, Pedro Everton Goes Marques, Luciana Carvalho Cândido, pela colaboração em experimentos e contribuições junto ao nosso grupo de pós-graduandos.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia Oral: Caio, Yuska, Ana Cristina e Aline pela amizade e convívio.

Aos meus colegas da turma de Mestrado Virgínia, Marília, Denise, Isabela, Daniela, Alrieta, Françoise, Gabriela, Jorgeana, Mirela, André, Saulo, George e Luciano por estarmos compartilhando da mesma experiência.

Aos funcionários da secretaria do PPGO, Germano Mahlmann Muniz Filho e Lúcia Ribeiro, pela atenção prestada.

Aos bioteristas do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Francisco Haroldo Pinheiro e Carlos Pereira de Oliveira pela dispensação e cuidado dos animais laboratoriais.

Aos técnicos de laboratório José Ivan Rodrigues e Socorro França (Departamento de Morfologia) por sua assistência técnica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro a este estudo (Processos Universal n^o 477293/2007-7) e pela concessão de bolsa de mestrado (Processo n^o 133036/2009-0).

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato Aminotransferase
ALT	Alanina Aminotransferase
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSP	Sialoproteína óssea
CaSR	Receptor sensor de cálcio
CFU	Unidades Formadoras de Colônia
COX-2	Ciclooxigenase-2
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTX	Telopectídeo C
C5a	Componente 5a do sistema complemento
DMO	Densidade mineral óssea
DRESS	<i>Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms</i>
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
FAT	Fosfatase Alcalina Total
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
H & E	Hematoxilina e Eosina
MMP	Metaloproteinase de Matriz
IC	Intervalo de confiança
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IL	Interleucina
IFN γ	Interferon gama
IP ₃	Trifosfato inositol
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
POA	Perda óssea alveolar
PTH	Hormônio da paratireóide
QUALIOST	Questionário de qualidade de vida na osteoporose
RANK	Receptor ativador de Fator Nuclear kappa B

RANKL	Ligante do receptor ativador de Fator Nuclear kappa B
RR	Risco relativo
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SERMs	Moduladores seletivos do receptor de estrogênio
SR	Ranelato de estrôncio
Sr	Estrôncio
SOTI	<i>Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TROPOS	<i>Treatment of Peripheral Osteoporosis Study</i>
VCAM	Molécula de Adesão Vascular

RESUMO

ATIVIDADES ANTIRREABSORTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO RANELATO DE ESTRÔNCIO EM RATOS. Ana Patrícia Souza de Lima. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Clínica Odontológica da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Data da defesa: 26 de março de 2010. Orientadora: Profª Drª Vilma de Lima.

A Periodontite é uma doença que envolve a presença de bactérias e se caracteriza principalmente por eventos inflamatórios que levam à perda dos tecidos periodontais como cemento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar. O Ranelato de estrôncio (SR) é um fármaco recém desenvolvido para tratamento da osteoporose que, diferente de outros agentes anti-osteoporóticos, possui duplo efeito no metabolismo ósseo: diminui a reabsorção e estimula a formação óssea. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito antirreabsortivo do SR na periodontite experimental considerando aspectos locais e sistêmicos e a resposta inflamatória através de modelos experimentais clássicos de inflamação em animais. A periodontite foi induzida pela colocação de um fio de sutura (náilon 3.0) ao redor dos 2º molares superiores esquerdos de ratos (± 200 g) utilizando a própria hemiarcada contralateral para controle. Os animais foram divididos em 4 grupos ($n=6$ /cada) que receberam por via oral SR (70, 210 e 630 mg/kg) ou solução Salina (SAL) durante 11 dias. Foram acrescentados 2 grupos (SR e SAL) para análise histológica. A perda óssea alveolar (POA) foi avaliada através de análises macroscópica (mm^2), histológica e imunohistoquímica e por dosagens séricas de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO). Para verificar possíveis repercussões sistêmicas, avaliou-se Leucograma, Variação de peso (g), e os níveis séricos de Transaminases (AST e ALT), Uréia e Creatinina. Para investigação da resposta inflamatória, utilizaram-se os modelos de peritonite e de edema de pata, ambos induzidos por Carragenina (Cg 700 μg) por via intraperitoneal e intraplantar, respectivamente. Os animais foram divididos em grupos (± 200 g; $n=6$ /cada) que receberam, previamente à injeção de Cg, SR 630 mg/kg-vo, Dexametasona 1 mg/kg-sc (DEX) e solução Salina-vo (SAL). No modelo de peritonite 1 grupo de animais não manipulados (Normal) foi acrescentado. Após a 4ª h da peritonite, os ratos foram sacrificados para coleta do líquido peritoneal e avaliação da migração neutrofílica. No modelo de edema de pata, o volume de líquido deslocado pelas patas dos ratos, considerado o edema, foi mensurado por hidropletismômetro antes e 1, 2, 3 e 4 h após injeção de Cg. Observou-se que o SR (70, 210 e 630 mg/kg) reduziu ($p<0,05$) a POA em 16,9%, 39,4% e 37,5%, respectivamente. À análise imunohistoquímica e histológica, SR diminuiu a expressão de TNF- α e IL-1 β e promoveu importante ($p<0,05$) redução do infiltrado leucocitário e osteoclastos, assim como preservação do osso alveolar, ligamento periodontal e cemento [SR630= 1,5 (1-3); SAL= 2,5 (2-3)]. Tais análises foram corroboradas pelo aumento ($p<0,05$) dos níveis séricos de FAO (SR70= 94 \pm 4,6; SR210= 90,9 \pm 6; SR630= 107,5 \pm 14,2; SAL= 57,9 \pm 6,9 U/l). Inicialmente os animais apresentaram perda de peso, seguido de tendência a normalidade, mas, tal como no leucograma ou nas demais dosagens séricas bioquímicas, não foram observadas alterações significante ($p>0,05$) entre os grupos. Quanto a resposta inflamatória, SR 630 mg/kg foi capaz de reduzir a migração neutrofílica induzida por Cg [SR=5,7 \pm 0,6; Sal=8,3 \pm 0,6 ($\times 10^3/\text{mm}^3$); $p<0,05$] além de reduzir edema de pata na 3ª e 4ª h após administração da Cg. Em conclusão, o SR foi capaz de reduzir a POA, confirmando seu potencial antirreabsortivo, além de exibir atividade anti-inflamatória, podendo, portanto, vir a ser uma ferramenta importante no tratamento adjuvante da periodontite.

ABSTRACT

ANTIRESORPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF STRONTIUM RANELATE IN RATS. Ana Patrícia Souza Lima. Dissertation presented to Dentistry Post-Graduation Program of Clinical Dentistry Department of Pharmacy, Dentistry and Nursing Faculty of Federal University of Ceara, as partial pre-requisite for Master Degree on Dentistry. Defense date: March the 26th 2010. Supervisor: Prof. Dr. Vilma de Lima.

Periodontitis is a disease which involves the presence of bacteria and it is characterized by inflammatory events that lead to loss of periodontal tissues such as root cementum, periodontal ligament and alveolar bone. Strontium Ranelate (SR) is a recent developed drug used for osteoporosis treatment that, different from other anti-osteoporotic drugs, it possess a dual effect on bone metabolism: it decreases bone resorption by the time it stimulates bone formation. The aim of this study was to evaluate the SR anti-resorptive effect in experimental periodontitis considering local and systemic aspects and the inflammatory response through classical inflammation experimental models in animals. Periodontitis was induced by placing a suture (nylon 3.0) around the left 2nd upper left molars of rats (\pm 200g) using their contralateral hemimaxillae for control. The animals were divided into 4 groups (n = 6/each) which received SR (70, 210 and 630 mg/kg) or saline 0.9% (SAL) orally, during 11 days. Two more groups were added (SR and SAL) for histological analysis. Alveolar bone loss (ABL) was evaluated by macroscopic (mm²), histologic and immunohistochemistry analysis, and by serum bone alkaline phosphatase (BALP) levels. In order to evaluate possible systemic repercussions, body weight variation (g), leukocyte count and serum levels of: transaminases (AST and ALT), urea and creatinine were assessed. In order to investigate inflammatory response, peritonitis model and paw edema we used, both of them induced by carrageenan (Cg 700 g), a potent anti-inflammatory agent, by intraperitoneal and intraplant via, respectively. Animals were divided in groups (\pm 200 g; n = 6/each) which received 0.9% saline-vo (SAL); Dexamethasone 1 m/kg-sc (DEX) and SR 630 mg/kg-vo before Cg injection. On peritonitis model, a group of non-handled (Normal) animals was added. After the 4th hour of peritonitis, animals were sacrificed in order to collect peritoneal fluid and to evaluate neutrophil migration. On paw edema model, the dislocated liquid volume by rats paw (edema) was measured by a hydropletismometer before (0h) and 1, 2, 3 and 4 h after Cg injection. It was observed that SR (70, 210 and 630 mg/kg) prevented ABL (p<0.05) by 16.9%, 39.4% and 37.5% respectively. On immunohistochemical and histologic analysis, SR reduced TNF- α and IL-1 β expression and additionally promoted important (p<0.05) decrease on leukocyte infiltrate and osteoclast number as well as, alveolar bone, periodontal ligament and root cementum preservation [SR 630 = 1.5 (1-3); SAL=2.5 (2-3)]. These analyses were corroborated by the increase (p<0.05) of BALP serum levels (SR70= 94 \pm 4.6; SR210= 90.9 \pm 6; SR630= 107.5 \pm 14.2; SAL= 57.9 \pm 6.9 U/l). Initially, animals presented loss of weight, followed by a normal tendency, but as well as in leukogram or in the other serum biochemical dosage, it was not observed any significant alteration (p>0.05) between groups. About inflammatory response, SR 630 mg/kg was able to reduce neutrophil migration induced by Cg [SR=5.7 \pm 0.6; Sal=8.3 \pm 0.6 ($\times 10^3$ /mm³); p<0.05] besides, paw edema decreased on the 3rd and 4th hour after Cg administration. In summary, SR was able to prevent ABL, confirming its anti-resorptive potential, and also exhibit anti-inflammatory activity, which can be an important tool as adjuvant to periodontitis treatment.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Justificativa e objetivos	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Ranelato de estrôncio	15
2.1.1 Aspectos moleculares e bioquímicos	15
2.1.2 Ranelato de estrôncio e o tecido ósseo	18
2.1.2.1 Estudos <i>in vitro</i>	18
2.1.2.2 Estudos em animais	19
2.1.2.3 Ensaio Clínico	20
2.2 Periodontite	23
2.3 Modelos clássicos de inflamação induzidos por carragenina	25
3 METODOLOGIA	28
3.1 Seleção de animais	28
3.2 Indução da Periodontite Experimental	28
3.2.1 Parâmetros avaliados na Periodontite Experimental	31
3.2.1.1 Parâmetros Locais do tecido periodontal e atividade osteoblástica	31
a) Estudo morfométrico do tecido ósseo	31
b) Análise histopatológica do osso alveolar	33
c) Análise imunohistoquímica para detecção de TNF- α e IL-1 β	33
d) Avaliação das dosagens bioquímicas de Fosfatase alcalina óssea	34
3.2.1.2 Parâmetros sistêmicos dos animais	35
a) Leucograma	35
b) Análise da variação de massa corpórea	35
c) Avaliação das alterações hepáticas	35
d) Avaliação das alterações renais	36
3.3 Indução da resposta inflamatória por carragenina	37
3.3.1 Modelo de migração neutrofílica (Peritonite)	37
3.3.2 Modelo de indução do Edema de Pata	40
3.4 Análise estatística	42
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença altamente prevalente que envolve a presença de bactérias do biofilme dental e a geração de uma resposta inflamatória. A exposição crônica dos tecidos periodontais às bactérias e seus metabólitos levam à destruição progressiva dos tecidos de suporte periodontal, como cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. Embora bactérias e endotoxinas sejam pré-requisitos para a inflamação e a destruição dos tecidos periodontais, sua presença por si só representa uma proporção relativamente pequena na expressão da doença (GROSSI *et al.*, 1994). De acordo com o modelo mais aceito da patogênese da periodontite, o principal componente de destruição dos tecidos moles e duros é resultado da ativação de uma resposta imunoinflamatória do hospedeiro ao desafio bacteriano (OFFENBACHER 1996; PAGE & KORNMAN, 1997).

A resposta inflamatória subjacente à periodontite envolve presença de citocinas inflamatórias que podem induzir o aumento da expressão de RANKL (Ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa B) e a diminuição de OPG (Osteoprotegerina) levando a osteoclastogênese e reabsorção do osso alveolar (NAKASHIMA *et al.*, 2000; TAUBMAN *et al.*, 2007; COCHRAN, 2008).

De forma geral, as doenças inflamatórias crônicas associadas à perda óssea demonstram o grande impacto da inflamação, tanto no metabolismo quanto na arquitetura óssea, como observado na periodontite. Isto pode levar até mesmo a perda de unidades dentárias gerando experiências negativas em vários aspectos de qualidade de vida: físicos, psicológicos e sociais (NEEDLEMAN *et al.*, 2004). Nos últimos anos, pesquisadores têm voltado cada vez mais sua atenção para os processos que envolvem o tecido ósseo e a inflamação, resultando na identificação de moléculas alvo para o tratamento da perda óssea inflamatória. Essas novas abordagens terapêuticas incluem a utilização de agentes bloqueadores de citocinas pró-inflamatórias (HERMAN *et al.*, 2008). Adicionalmente, sabe-se que o reparo ósseo constitui um dos maiores desafios dentro da odontologia e medicina, levando a necessidade da utilização de terapia genética, moléculas biotivas, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento, os quais possuem propriedades osteoindutoras (SERVICE, 2000).

Além disso, novas terapias farmacológicas surgiram para a prevenção e o tratamento em doenças associadas à perda óssea, como os bisfosfonatos que, apesar de serem bem tolerados, foram recentemente associados à osteonecrose de mandíbula; terapias utilizando moduladores do receptor de estrogênio, mas que a longo prazo, pode aumentar o risco de câncer de mama, derrame e embolia; inibidor do RANKL (Denosumab); PTH, um agente anabólico ósseo, e o Ranelato de estrôncio que se destaca pelo seu duplo efeito no tecido ósseo, funcionando como agente anabólico e antirreabsortivo (VALVERDE, 2008).

O Ranelato de estrôncio (SR) é um fármaco recém-desenvolvido para prevenção e tratamento da osteoporose, doença caracterizada pela perda de massa óssea e deterioração da microarquitetura óssea, resultando em aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura. Diferente de outras abordagens terapêuticas que incluem uma dieta suplementada de cálcio e vitamina D em adição à utilização de estrógenos, bisfosfonatos ou moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), que reduzem a reabsorção óssea, ou ao flúor que estimula a formação de osso, o SR tem se destacado por apresentar um duplo efeito no metabolismo ósseo: diminuir a reabsorção e ao mesmo tempo funcionar como agente anabólico ósseo (CHAPUY *et al.*, 1995; SCHEIBER *et al.*, 1998).

Atualmente, o SR é considerado um fármaco seguro, bem tolerado, especialmente no trato gastrointestinal superior, e eficaz no tratamento da osteoporose (DELMAS, 2005; NUPREZ *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009).

Existe uma hipótese de que o SR pode interferir no metabolismo ósseo através de alterações no eixo RANK-RANKL-OPG, aumentando os níveis de OPG e diminuindo a expressão de RANKL, dessa forma, reduzindo a osteoclastogênese e a reabsorção óssea (MARIE, 2007). Tal mecanismo está associado à ação do SR como agonista dos receptores sensores de cálcio (CaSR) expressos nas superfícies de osteoclastos e osteoblastos (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007; BRENNAN *et al.*, 2009; HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009).

1.1 Justificativa e objetivos

Considerando a etiopatogênese da periodontite, sua prevalência e importância em diversos fatores associados à doença, dentre eles, o impacto social, além da constante busca para identificação de novas abordagens terapêuticas, onde o alvo destina-se ao controle da perda óssea alveolar, os objetivos desse trabalho foram determinados, os quais se seguem abaixo:

- Objetivo geral:

- Avaliar o efeito antirreabsortivo e anti-inflamatório do Ranelato de estrôncio em animais.

- Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do Ranelato de estrôncio na periodontite experimental, considerando repercussões locais e sistêmicas.
- Avaliar o efeito do Ranelato de estrôncio em modelos clássicos de inflamação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ranelato de estrôncio

2.1.1 Aspectos moleculares e bioquímicos

O Ranelato de estrôncio (SR) é um agente formado por dois átomos estáveis de estrôncio (Sr^{2+}), constituindo a parte ativa do composto, e uma molécula orgânica sintética, o sal de ácido ranélico, quimicamente apresentado como 5-(bis[carboximetil]amino)-2-carboxi-4-ciano-3-tiofenacético. O estrôncio constitui aproximadamente 34% de toda a sua estrutura. Entretanto, diferente de outros sais de estrôncio, o SR possui maiores biodisponibilidade e tolerância gastrointestinal (DAHL, 2001; REGINSTER *et al.*, 2003) (figura 1).

O estrôncio é um metal alcalino terroso, utilizado industrialmente em tubos de raios catódicos de televisores em cores, pirotecnia, no refinamento do zinco, dessulfurização do aço, cerâmicas, pigmentos para pintura, lâmpadas fluorescentes, em radiologia e em medicamentos (ATSDR, 2004). Tal como outros metais divalentes, como por exemplo, o magnésio, o estrôncio tem sido objeto de estudo por demonstrar propriedades físico-químicas similares ao cálcio e afinidade pelo tecido ósseo (NIELSEN, 2004).

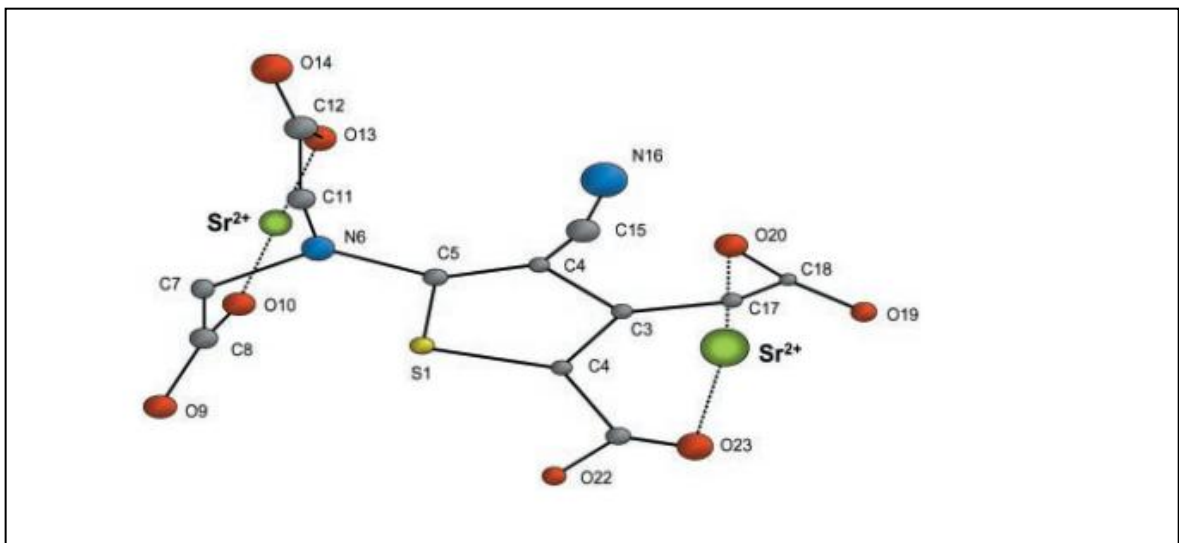


Figura 1: Desenho esquemático da estrutura molecular do Ranelato de estrôncio. N: Nitrogênio; O: Oxigênio; Sr: Estrôncio; C: Carbono. Estrutura molecular composta por dois átomos estáveis de Sr^{2+} , que corresponde à parte ativa do composto. Além disso, possui uma parte orgânica sintética, o sal de ácido ranélico, quimicamente apresentado como 5-(bis[carboximetil]amino)-2-carboxi-4-ciano-3-tiofenacético (DIMAI, 2005).

SKORYNA *et al.* (1981) têm sugerido que no passado, o uso do estrôncio como agente terapêutico pode ter sido negligenciado devido a uma confusão que existia entre seus isótopos estáveis (^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr e ^{88}Sr) e radioativos (^{85}Sr , $^{87\text{m}}\text{Sr}$, ^{89}Sr e ^{90}Sr). Assim, as investigações do átomo de estrôncio estável ficaram em descrédito por causa de uma associação indevida com o estrôncio radioativo que exercia um efeito tóxico nas células ósseas. (SKORYNA *et al.*, 1981; MARIE, 1996).

O ácido ranélico constitui a parte orgânica do Ranelato de estrôncio e é farmacologicamente inativo. Atua como um portador dos átomos de estrôncio, conferindo melhor biodisponibilidade a este elemento (MARIE, 2005), além de características relacionadas ao peso molecular, à farmacocinética e à aceitabilidade do medicamento. Devido à sua alta polaridade, apresenta baixa absorção, distribuição e ligação às proteínas plasmáticas, sendo rapidamente eliminado após absorção (EMEA, 2009).

Muitos estudos, descritos em maiores detalhes adiante, indicam que o SR atua tanto como um antirreabsortivo, quanto como um agente anabólico ósseo (MARIE *et al.*, 2001). Apesar das similaridades entre o ranelato de cálcio e ranelato de estrôncio, principalmente relacionadas às suas concentrações no tecido ósseo após a distribuição (DAHL *et al.*, 2001), estes efeitos foram observados especificamente para ranelato de estrôncio e não foram reproduzidos com ranelato de cálcio, sugerindo um efeito distinto desses dois cátions (MARIE, 2005).

O mecanismo de ação do SR não está completamente elucidado, mas existe a hipótese de que ele atue interagindo com receptores sensores de cálcio (QUARLES *et al.*, 1997) (figura 2). Foi observado que a adição de Sr^{2+} às células da paratireóide induziu um aumento rápido e sustentado de íons Ca^{2+} no meio intracelular, e também dos níveis de IP_3 (1,4,5-inositol-trifosfato) (SHOBACK *et al.*, 1995), segundo mensageiro que se liga a canais de cálcio e o abre, causando ativação de vários processos celulares. O cálcio liberado do tecido ósseo pode regular a função de osteoblastos e osteoclastos através desses receptores (QUARLES *et al.*, 1997) identificados em osteoblastos de camundongos, ratos e em osso bovino (CHANG *et al.*, 1999), além de outros receptores sensíveis ao estrôncio (PI *et al.*, 2004).

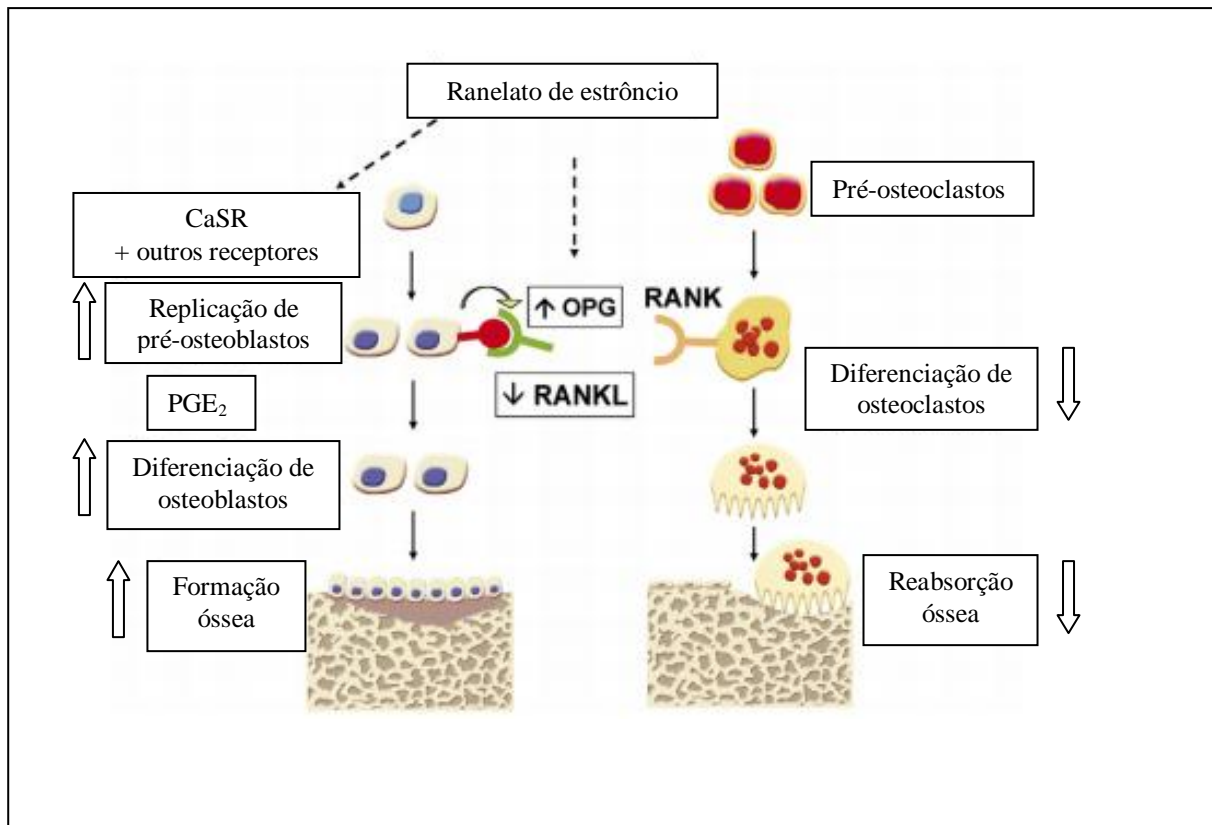


Figura 2: Desenho esquemático do mecanismo de ação do Ranelato de estrôncio (SR) nas células ósseas. O SR estimula a formação óssea através da ativação dos receptores sensores de cálcio e aumento de prostaglandina E₂. Por outro lado, o SR pode inibir a formação óssea através do aumento dos níveis de osteoprotegerina e diminuição do ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa B expresso em osteoblastos (MARIE, 2007).

Outro mecanismo pelo qual o estrôncio pode agir é através da indução da expressão de ciclooxygenase 2 (COX-2) e produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), através da ativação de sinal extracelular regulado por quinase que pode estar envolvida no efeito de formação óssea (CHOUDHARY *et al.*, 2006). Estes efeitos do SR não foram encontrados em células de camundongos COX-2-nulo, o que aponta para um papel protetor de PGE₂ na osteoblastogênese induzida pelo Ranelato (MARIE, 2007).

Assim, sugere-se que o SR seja capaz de aumentar a replicação de pré-osteoblastos, diferenciação dos osteoblastos, síntese de colágeno tipo I e mineralização da matriz óssea através de mecanismos dependentes de cálcio. Paralelo a estes efeitos anabólicos, ocorre inibição da diferenciação e atividade de osteoclastos, além do aumento de apoptose dessas células, mediada por aumento da razão OPG/RANKL, e por mecanismos regulados através dos CaSR. Seu efeito,

de forma geral, é uma formação óssea com melhores condições na geometria, espessura cortical e morfologia do osso trabecular e qualidade intrínseca do tecido ósseo, que se traduz em resistência óssea reforçada (FONSECA, 2008).

2.1.2 Ranelato de Estrôncio e o tecido ósseo

2.1.2.1 Estudos *in vitro*

Com o objetivo de compreender melhor o efeito do SR em células ósseas, estudos foram realizados utilizando modelos de reabsorção ou formação de células ósseas *in vitro*. Alguns estudos *in vitro* têm sugerido que o SR aumenta a replicação e atividade osteoblásticas e, simultaneamente, diminui diferenciação e atividade de osteoclastos (CANALIS *et al.*, 1996; BARON *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2003).

Observou-se através do modelo de cultura celular de calvária de camundongos que o SR (0,5 mmol/l) foi capaz de aumentar a replicação de células pré-osteoblásticas e a síntese de matriz óssea (CANALIS *et al.*, 1996). Além disso, nesta mesma concentração, foi capaz de diminuir número de osteoclastos, avaliados através da expressão de anidrase carbônica II e receptor vitronectina, marcadores osteoclásticos, através do modelo de diferenciação de osteoclastos induzida pelo tratamento com 1,25-D3 dihidroxivitamina em cultura de células de medula (BARON *et al.*, 1996). Em concentração maior, a 1 mmol/l, o SR também demonstrou-se capaz de inibir a reabsorção óssea, desta vez avaliada através de liberação de cálcio. Contudo, estes efeitos não foram observados quando utilizado o ranelato de cálcio (TAKAHASHI *et al.*, 2003).

Adicionalmente, demonstrou-se através do mesmo modelo experimental que o SR promoveu formação nodular, aumentando a diferenciação de células progenitoras precocemente para maturação de osteoblastos e inibiu a formação e maturação de osteoclastos (BONNELLYE *et al.*, 2007); além disso, o SR também foi capaz de aumentar a expressão de Sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCN), marcadores osteoblásticos, em culturas de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) osteoblástica, após 21 dias de tratamento (ZHU *et al.*, 2007).

Mais recentemente foi demonstrado que o SR pode aumentar a replicação de células pré-osteoblásticas e mesenquimais pluripotentes através de dois mecanismos. Primeiro, como previamente sugerido, o SR pode interagir diretamente

com um CaSR e acionar sinais mitogênicos conectado a este receptor, ou ainda, o SR pode induzir a liberação de um fator de crescimento autócrino em receptor específico (CAVERZASIO, 2008).

2.1.2.2 Estudos em animais

O SR foi inicialmente avaliado em animais osteopênicos para testar sua eficácia na prevenção de perda óssea. O modelo de ovariectomia em ratas é caracterizado pela perda do osso trabecular devido a uma taxa acelerada de reabsorção óssea, como encontrado em mulheres na pós-menopausa (MODROWSKI *et al.*, 1993). Através desse modelo, o tratamento profilático com SR (77, 154 e 308 mg/kg/dia) durante 8 semanas reduziu a perda de osso trabecular induzida pela deficiência de estrógeno. Neste estudo, foram realizadas análises histomorfométricas e bioquímicas e observou-se que o SR além de diminuir a reabsorção óssea, manteve a formação óssea em níveis elevados (MARIE *et al.*, 1993).

Adiante, o SR foi avaliado em outro modelo de osteopenia, desta vez induzida por imobilização esquelética em ratos. Neste estudo, a perda de osso trabecular resultou do aumento da reabsorção associada a uma formação óssea reduzida. Verificou-se que a administração de SR (50, 200 e 800/kg/dia), durante 10 dias, aboliu o aumento da reabsorção óssea e causou a prevenção parcial da perda óssea trabecular do membro imobilizado. Além disso, o SR aumentou os níveis séricos de fosfatase alcalina e diminuiu a excreção urinária de hidroxiprolina, sugerindo também que o SR reduz reabsorção, enquanto mantém a formação óssea (HOTT *et al.*, 2003).

Outros estudos indicam que o SR também é capaz de aumentar a massa óssea em animais intactos. Em camundongos intactos, tanto em machos quanto em fêmeas, o SR (200, 600 ou 1.800 mg/kg/dia) administrado durante 104 semanas, aumentou a massa óssea vertebral, mensurada através de histomorfometria. Este efeito resultou do seu duplo efeito no metabolismo ósseo: aumento da formação óssea e diminuição da reabsorção óssea (DELANNOY *et al.*, 2002).

Adicionalmente, foi demonstrado que a administração do SR (225 a 900 mg/kg/dia) em ratos intactos, promoveu aumento da densidade mineral óssea (DMO)

da vértebra lombar e do fêmur, e aumento do volume ósseo trabecular na metáfise tibial, avaliado por histomorfometria (AMMANN *et al.*, 2004).

Como mostrado nos estudos com ratas ovariectomizadas, esses efeitos também podem ser visto em modelo de compressão axial de vértebra em ratos. Foi observado que o SR de forma dose-dependente preveniu alterações na resistência óssea, não mostrando diferenças em animais tratados com 625 mg/kg durante um ano, quando comparado ao grupo controle, indicando prevenção do efeito da ovariectomia no osso. Este fato está associado aos efeitos positivos significativos do SR na resistência óssea (AMMANN, 2006).

Sabendo que o tecido ósseo humano é caracterizado por um processo de remodelação, torna-se essencial a determinação de todos os possíveis benefícios do SR previamente em animais, como por exemplo, em estudo realizado em macacos (*Macaca fascicularis*), onde o SR (100, 275, 750 mg/kg/dia) foi administrado durante 26 semanas, verificando-se uma diminuição dos índices histomorfométricos indicativos de reabsorção, com efeito significativo quando utilizada a maior dose. Adicionalmente, além do efeito inibidor da reabsorção óssea, o SR manteve a formação óssea (BUEHLER *et al.*, 2001)

Como descrito previamente o efeito do SR no tecido ósseo tem sido estudado em vários modelos animais, incluindo ratos machos e fêmeas saudáveis, ratas ovariectomizadas, ratos submetidos à imobilização de membros e em estudos com macacos (TOURNIS, 2007). Estes estudos pré-clínicos mostraram que o duplo efeito, de diminuir reabsorção e atuar na formação óssea, resulta também na melhora da microarquitetura óssea em roedores, prevenindo assim a perda mineral óssea (MARIE, 2007).

2.1.2.3 Ensaios Clínicos

Para avaliar a eficácia do SR em mulheres pós-menopáusicas com osteoporose estabelecida, ensaios clínicos foram realizados. O primeiro estudo a demonstrar a eficácia do SR em um ensaio clínico controlado, foi realizado por MEUNIER *et al.* (2002). Neste estudo, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, multicêntrico e prospectivo, 353 mulheres osteoporóticas receberam SR (0,5, 1 e 2 g/dia) ou placebo durante 2 anos. Observou-se um aumento significativo da densidade mineral óssea lombar e redução em 44% de novas fraturas vertebrais

no segundo ano de tratamento no grupo que recebeu SR (2 g/dia), em comparação com aqueles que receberam placebo, evidenciando o potencial efeito antiosteoporótico do SR.

Através desses dados é que foram realizados dois grandes ensaios clínicos: *Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention* (SOTI) (MEUNIER, *et al.*, 2004) e *Treatment of Peripheral Osteoporosis Study* (TROPOS) (REGINSTER, *et al.*, 2005), com a utilização de 2 g/dia do SR em mulheres pós-menopáusicas com osteoporose, e média de idade de 69 anos em SOTI, e 77 anos em TROPOS. Ambos os estudos foram aleatorizados, duplo-cegos, controlados por placebo, envolvendo mais de 6.700 mulheres, 1649 (SOTI) e 5091 (TROPOS), observando a redução de fraturas vertebrais e não-vertebrais, respectivamente. A terapia com SR foi associada a uma redução significativa nas fraturas vertebrais, com redução de 41% no risco relativo (RR) ao longo de 3 anos, sendo a incidência de fraturas 32,8% no grupo placebo e 20,9% no grupo tratado. Esse efeito benéfico foi observado também após 1 ano de tratamento (RR 0,51, intervalo de confiança [IC] 95%, 0.36-0.74). Houve também redução significativa das fraturas vertebrais clínicas (RR 0,62, IC 95%, 0.29-0.80) com 3 anos de tratamento, acompanhado do aumento dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea, marcador bioquímico de formação óssea, e diminuição dos níveis de Telopectídeo C (CTx), marcador de reabsorção óssea. Isso sugeriu que o SR induziu alterações opostas dos marcadores de reabsorção e formação óssea, simultaneamente. Além disso, pôde-se observar redução significativamente do risco de fraturas não-vertebrais (RR 0,84; IC 95%, 0.702-0.995) em mulheres tratadas com SR. Em um subgrupo de pacientes com alto risco à fraturas, pacientes acima de 74 anos, houve uma redução de 36 % ao risco nas fraturas de quadril, uma das principais fraturas não vertebrais mais comuns observadas em mulheres com osteoporose.

Em ambos os ensaios clínicos descritos acima, o SR foi bem tolerado no trato gastrointestinal, apresentando como efeito adverso mais comum náusea e diarreia, que desapareceram logo após os primeiros meses de tratamento.

A eficácia do SR também foi avaliada, especificamente, em pacientes com osteoporose e idade entre 50-65 anos que possuíam um risco muito elevado a fraturas. Neste estudo foram incluídos pacientes com pelo menos uma fratura vertebral na coluna lombar e densidade mineral óssea (DMO) de 0,840 g/cm² ou menor. Os pacientes receberam 2 g/dia de SR ou placebo durante período de

estudo e todos os pacientes receberam diariamente suplemento de cálcio e vitamina D. Foram obtidas radiografias da coluna no início e anualmente durante o estudo. O principal critério utilizado para avaliação da eficácia do tratamento com SR foi a incidência de fraturas. Após 4 anos de tratamento com o SR houve redução significativa do risco de fraturas vertebrais em 35% (RR 0,65; IC 95%; 0,42-0,99; $p < 0,05$). No grupo tratado com SR a densidade mineral óssea aumentou em comparação à basal em 15,8% na coluna lombar e em 7,1% no fêmur. Este estudo contribuiu para confirmar a eficácia do SR na prevenção de fraturas vertebrais em mulheres osteoporóticas, independente da idade (ROUX *et al.*, 2008).

Mais recentemente, foram realizados estudos para avaliar não só a eficácia do SR, mas também sua segurança de uso a longo prazo. Assim como o estudo descrito anteriormente, foram incluídas mulheres com osteoporose e a partir de 50 anos que possuíam pelo menos uma fratura vertebral e densidade mineral óssea (DMO) de 0,840 g/cm² ou menor. Foram excluídas mulheres com patologias ou tratamentos que pudessem interferir no metabolismo ósseo. A avaliação foi realizada após 4 e 5 anos considerado o surgimento de novas fraturas vertebrais, fraturas osteoporóticas periféricas, mudanças na altura do corpo vertebral, DMO de vértebras lombares e colo do fêmur, marcadores de remodelação óssea e qualidade de vida. Observou-se após 4 anos de tratamento redução em 33% do risco a fratura com SR 2g/dia (redução do risco = 0,67, $p < 0,001$). Entre os pacientes com duas ou mais fraturas vertebrais, a redução do risco foi de 36% ($p < 0,001$). A qualidade de vida, avaliada pelo QUALIOST[®], foi significativamente maior ($p = 0,025$) em pacientes tratados com SR, além do maior número de pacientes sem dores na coluna ($p = 0,005$) do que no grupo placebo. Efeitos adversos foram semelhantes entre os grupos (MEUNIER *et al.*, 2009).

Adicionalmente, a eficácia e segurança clínica da administração do SR (2g/dia) durante período de um ano foi avaliada em um estudo randomizado, duplo-cego, em 329 mulheres asiáticas pós-menopáusicas com osteoporose. Observou-se aumento significativo de 3 a 5% na DMO em coluna lombar e colo do fêmur no grupo tratado com Ranelato de estrôncio comparado ao placebo (LIU *et al.*, 2009). Além disso, esse estudo também mostrou que o SR foi bem tolerado, e em ambos os grupos foi observado leve distúrbios gastrointestinais. Não houve alterações clinicamente relevantes nos exames laboratoriais de rotina, tais como hemograma e exames para avaliação da função hepática e renal. Estes dados obtidos através de

ensaios clínicos indicam a segurança de uso do SR e seus benefícios significativos no tratamento da osteoporose.

Apesar de raros, existem relatos de casos de reações cutâneas aos agentes utilizados no tratamento da osteoporose. Estes agentes incluem: Alendronato, Ibandronato, Residronato, Zolendronato, Raloxifeno, Hormônios da paratireóide e seus derivados, e Ranelato de estrôncio (Musette *et al.*, 2009).

As reações cutâneas mais comuns são dermatite e eczema (2,3% e 1,8% *versus* 2,0% e 1,4% para o placebo), enquanto prurido, urticária e angioedema as mais raras (menor de 1 caso em 10.000) (EMEA, 2008). Síndromes de hipersensibilidade, tais como DRESS (PERNICOVA *et al.*, 2008; JONVILLE-BERA *et al.*, 2009) e Necrólise epidérmica tóxica (LEE *et al.*, 2009) também foram relatados. No entanto, esses casos são muito raros e com o reconhecimento precoce e manejo adequado, o prognóstico pode ser melhorado (EMEA, 2009). Além disso, como descrito anteriormente, o Ranelato de estrôncio foi bem tolerado em ensaios clínicos sem efeitos colaterais importantes, sendo o efeito colateral mais comum a diarreia (O'DONNELL *et al.*, 2006). Adicionalmente, a Agência Européia de Medicamentos (EMEA) lançou em novembro de 2007 uma consultoria sobre o uso do SR (EMEA, 2007).

Considerando o Ranelato de estrôncio como importante agente antirreabsortivo, cujos efeitos são devidos à sua dupla ação no metabolismo ósseo, porém não totalmente elucidado, é importante ressaltar que os mecanismos biológicos da perda óssea podem estar associados aos processos inflamatórios, como observado, por exemplo, na periodontite. Assim, consideram-se necessários estudos para investigação de seu efeito em processos inflamatórios e/ou na perda óssea associada a processos inflamatórios.

2.2 Periodontite

A periodontite é uma das doenças mais difundidas que afetam a dentição humana (ALBANDAR, 2002 e 2005; SHEIHAM, 2002). De acordo com PIHLSTROM *et al.* (2005), é uma doença altamente prevalente que se caracteriza por uma inflamação dos tecidos que circundam o dente e proliferação apical de células epiteliais ao longo da raiz, formando uma bolsa periodontal devido à destruição de

tecido conjuntivo de inserção dental e osso alveolar. Novos conceitos sobre a patogênese da periodontite têm definido como uma inflamação desencadeada por ativação do sistema imune do hospedeiro em resposta aos microorganismos presentes no biofilme dental (TAUBMAN *et al.*, 2007). Embora as bactérias sejam necessárias para ocorrência da periodontite, a susceptibilidade do hospedeiro também é requerida (PRESHAW *et al.*, 2004).

Alguns fatores modificadores da doença, incluindo a diabetes, fatores genéticos, tabagismo ou uso de álcool, podem alterar a resposta imunoinflamatória do hospedeiro e contribuir fortemente para susceptibilidade e alterações na expressão da doença entre indivíduos distintos (PIHLSTROM *et al.*, 2005; KORNMAN, 2008). As alterações inflamatórias que ocorrem na periodontite podem levar a sinais clínicos como desconforto, dor, dificuldade na mastigação e até a perda de dentes (PIHLSTROM *et al.*, 2005).

A regulação do metabolismo ósseo na periodontite envolve o Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANK), seu ligante (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG), os quais constituem o eixo RANK-RANKL-OPG (ROSA-RAÑAL, 2001; COCHRAN, 2008). A ligação da molécula RANKL, expressa em células precursoras de osteoblastos, em seu receptor RANK, este expresso em células precursoras de osteoclastos, promove o recrutamento, diferenciação e ativação de osteoclastos. Por outro lado, a ligação de OPG-RANKL impede a ligação RANK-RANKL e, conseqüentemente, inibe a osteoclastogênese (BOYLE *et al.*, 2003; TAUBMAN *et al.*, 2007). Assim, o aumento da expressão de RANKL ou a diminuição de OPG pode levar a um desequilíbrio no eixo RANK-RANKL-OPG em favor da osteoclastogênese.

A resposta inflamatória vista na periodontite envolve citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-11, IL-17, e podem induzir a osteoclastogênese através do aumento da expressão de RANKL e diminuição de OPG (NAKASHIMA *et al.*, 2000). Isto resulta em reabsorção do osso alveolar, uma das principais características da periodontite (TAUBMAN *et al.*, 2007; COCHRAN, 2008).

Atualmente, vários procedimentos têm sido propostos e avaliados para a regeneração dos tecidos periodonais, tais como cirurgias com regeneração tecidual

guiada (RTG), utilização de uma variedade de enxertos e biomateriais com propriedades osteoindutoras, fatores de crescimento e proteína derivada da matriz do esmalte. Entretanto, essas diferentes possibilidades terapêuticas muitas vezes não levam à regeneração óssea de fato (CHEN & JIN, 2010).

2.3. Modelos clássicos de inflamação induzidos por carragenina

O processo inflamatório é considerado um mecanismo de proteção, cuja principal função é livrar o organismo de agentes que causem lesões celulares e teciduais. Dessa forma, a reação inflamatória é fundamental na defesa e homeostasia do corpo. Entretanto, os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória podem ser potencialmente danosos ao organismo quando sua intensidade ou duração ultrapassam o suficiente e necessário para conter o agente agressor, como ocorre na periodontite, artrite, aterosclerose entre outras doenças inflamatórias crônicas (RANKIN, 2004; ROBBINS & COTRAN, 2005).

É possível destacar três grandes eventos que ocorrem durante a resposta inflamatória: aumento do suprimento sanguíneo para as áreas afetadas, aumento da permeabilidade capilar e migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para os espaços intersticiais circundantes ao local de inflamação ou lesão (RANKIN, 2004). A mobilização dessas células segue algumas fases, como ativação, rolamento pelo endotélio, adesão firme e, finalmente, a transmigração (MUNRO, 1993; SPRINGER, 1994; WAHL *et al.*, 1996). Todas essas etapas são dependentes da expressão de moléculas denominadas moléculas de adesão, presentes em leucócitos e em células endoteliais, além de mediadores quimiotáticos (SPRINGER, 1994; WEBER, 2003).

O desenvolvimento de modelos de estudo de inflamação é de suma importância para que se possam compreender as patologias associadas aos processos inflamatórios. Os modelos de peritonite e edema de pata, ambos induzidos por carragenina, são considerados clássicos por reproduzirem os principais eventos celulares e vasculares e, assim, permitirem o estudo de várias substâncias com efeitos anti-inflamatórios (SHIVKAR e KUMAR, 2003; UCKUN *et al.*, 2008).

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marinhas vermelhas, denominadas *Chondrus*, capaz de gerar uma reação inflamatória aguda,

ideal para estudos de agentes anti-inflamatórios por possuir vantagens sobre outras substâncias indutoras de inflamação. Uma das vantagens é que ela é de fácil manuseio e menos susceptível às alterações ambientais quando comparada a outros mucopolissacarídeos (GARDNER, 1960). Ainda, doses orais únicas de anti-inflamatórios não esteroidais, em níveis não tóxicos, podem reduzir a inflamação causada por esse irritante. (WINTER *et al.*, 1962)

Vários tipos de carragenina podem ser encontrados de acordo com o seu teor de sulfato e configuração estrutural: kappa (κ), iota (ι), e lambda (λ), sendo este último, o mais eficiente como irritante, por ser mais rico em resíduos sulfatados (DI ROSA, 1972).

No modelo de peritone induzido por carragenina, os valores máximos de aumento da permeabilidade vascular e do acúmulo de leucócitos são observados em 150 minutos e 4 horas após a administração do irritante, respectivamente. Além disso, existe um maior acúmulo de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares após 4 horas e 24 horas, respectivamente (HARA *et al.*, 1994). Este modelo tem sido, portanto, extremamente importante, tanto que trabalhos bastante recentes têm demonstrado a avaliação da resposta inflamatória a partir de diferentes agentes utilizando esse modelo (VANDERLIND *et al.*, 2009; UCHÔA *et al.*, 2009).

O modelo de edema de pata induzido por carragenina pode ser dividido em etapas distintas de acordo com os mediadores envolvidos na resposta inflamatória. A fase inicial envolve a participação de histamina e serotonina; em seguida, as cininas e, posteriormente, em uma fase final, as prostaglandinas (DI ROSA *et al.*, 1971; CRUNKHON & MEACOCK, 1971).

O curso temporal de formação do edema após a injeção de carragenina na região subplantar de ratos possui uma resposta bifásica. O desenvolvimento da primeira fase se inicia logo após a administração do agente irritante, de forma rápida, e diminui após o período entre 20 minutos e 1 hora. A segunda fase se inicia a partir da 1ª hora após injeção do estímulo inflamatório e atinge seu pico máximo na 3ª hora (VINEGAR, 1976). Estudos histológicos do tecido subplantar mostraram que em 20 minutos após a injeção da carragenina não houve alteração celular quando comparado ao tecido normal, enquanto que após 180 minutos, observou-se intensa

resposta inflamatória fagocítica com grande quantidade de neutrófilos e edema tissular, a qual era precedida por uma resposta inflamatória não fagocítica (VINEGAR *et al.*, 1987).

Em estudo cujo objetivo foi comparar a relação entre edema e extravasamento plasmático (exsudato) na inflamação induzida por carragenina nas patas de ratos, observou-se que a administração de carragenina (500 μg) exibiu extravasamento plasmático estável durante as 4 horas estudadas e o edema aumentou progressivamente (ZANIN e FERREIRA, 1978).

Assim, considerando que a utilização de modelos animais apropriados contribui para o estudo da reação inflamatória e para o desenvolvimento de terapias e novas perspectivas farmacológicas, achou-se interessante avaliar a resposta inflamatória do fármaco em estudo, Ranelato de estrôncio, através dos modelos de peritonite e edema de pata, ambos induzidos pela carragenina.

3. Metodologia

3.1 Seleção de animais

Para este estudo utilizou-se o total de 78 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* machos, com massa corpórea de aproximadamente 200 gramas, dos quais 36 ratos foram usados para o desenvolvimento do experimento de periodontite, 24 para realização do modelo de peritonite e 18 para o ensaio de edema de pata. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC e transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (CCS - UFC), onde foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de seis animais em cada uma delas. Todos receberam ração comercial balanceada e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. O protocolo estabelecido foi seguindo as normas de manipulação animal estabelecidos pelo COBEA. Os animais foram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

O protocolo de estudo e delineamento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ceará (n^o 72 / 8).

3.2 Indução da periodontite experimental

Para a indução da periodontite foi utilizado um modelo baseado em LIMA *et al.* (2000 e 2004), o qual consiste em inserir um fio de sutura de náilon 3.0 em torno do segundo molar superior esquerdo de um rato sob anestesia com Hidrato de cloral (250 mg/kg-ip). Previamente à passagem do fio, uma guia (agulha) foi utilizada nos espaços interproximais mesial e distal do dente citado para facilitar a colocação do fio. Em seguida, após inserção do fio, realizou-se um nó que permaneceu voltado para a face vestibular da boca do rato (figura 3). Os animais foram sacrificados no 11^o dia do experimento, dia onde foi observado, em estudo piloto realizado por LIMA *et al.* (2000), pico da lesão periodontal, exibindo perda óssea intensa.

a) Grupos Salina

Esses grupos foram constituídos por seis ratos cada, submetidos à Periodontite. Os animais receberam injeções de solução salina a 0,9% (2 ml/kg-vo), trinta minutos antes da instalação do fio e após este, diariamente por um período de onze dias, sendo então, sacrificados. Para análise histopatológica das hemiarçadas foi adicionado um grupo de seis animais

b) Grupos tratados com Ranelato de estrôncio

Os animais foram subdivididos em 3 grupos de seis ratos cada, os quais receberam Ranelato de estrôncio (Protos[®]; Laboratório Servier, França), nas doses de 70, 210, 630 mg/kg, respectivamente, administradas por via oral, trinta minutos antes da instalação do fio e após este, diariamente, até o 11^o dia. Para análise histológica das hemiarçadas, um grupo adicional de seis animais foi tratado com Ranelato de estrôncio na dose de 630 mg/kg.

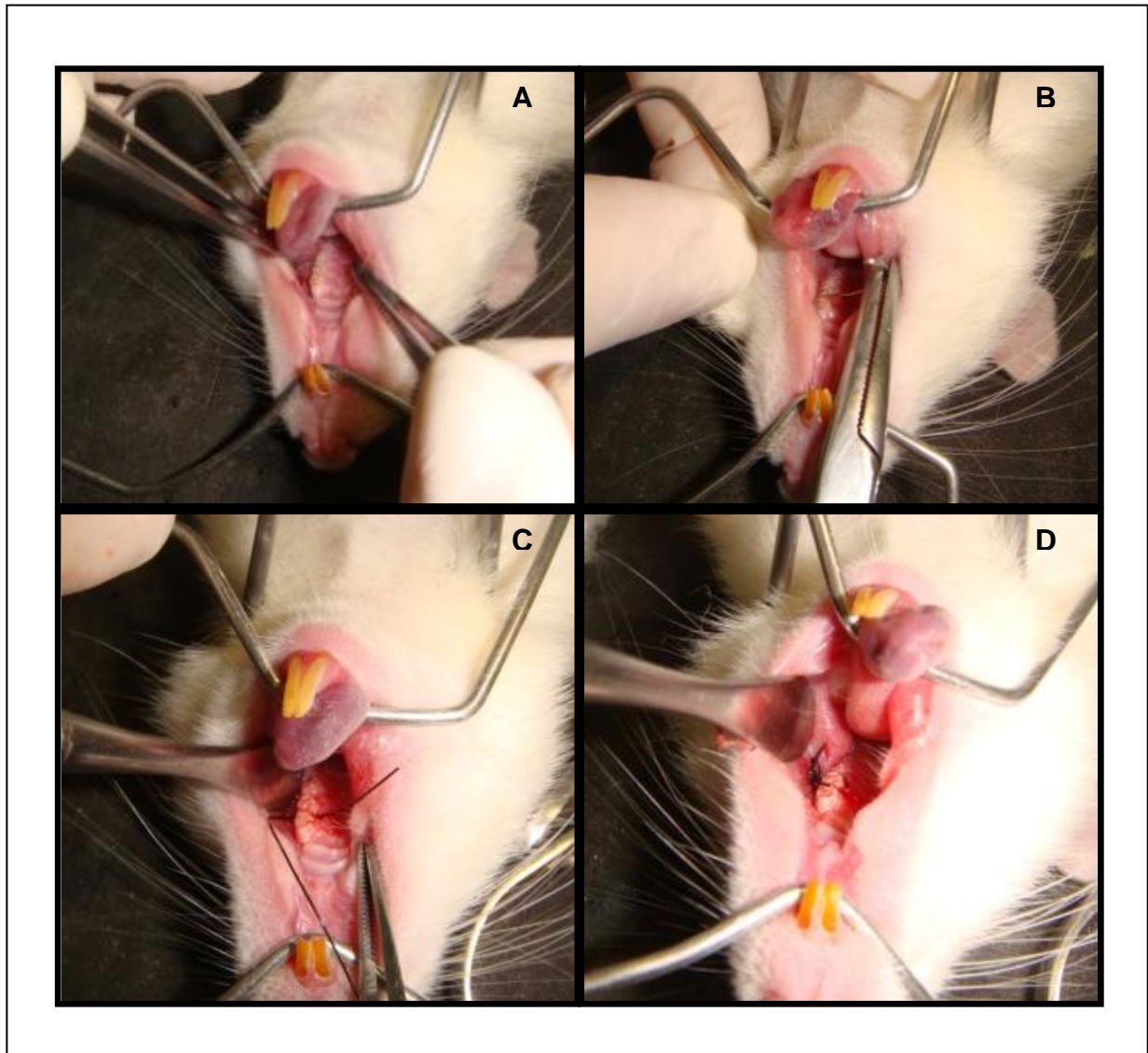


Figura 3: Sequência de passos para realização da indução de periodontite em segundo molar superior esquerdo em rato. A. Visualização do campo; B. Inserção de agulha como guia para a passagem do fio entre o primeiro e segundo molar; C. Inserção do fio de sutura 3.0 entre o primeiro e segundo molar superior; D. Nó voltado para face vestibular (arquivo pessoal).

3.2.1 Parâmetros avaliados na Periodontite Experimental

3.2.1.1 Parâmetros Locais do tecido periodontal e atividade osteoblástica

A estrutura óssea alveolar observada na periodontite foi estudada através de análises morfométrica, histológica e imunohistoquímica (figura 4). As hemiarcadas sem doença periodontal, ou seja, as contralaterais, foram utilizadas como controle. A atividade osteoblástica foi avaliada através da análise dos níveis séricos de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)

a) Estudo morfométrico do tecido ósseo

No 11^o dia após indução da periodontite, os animais foram sacrificados e suas maxilas foram removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. A seguir, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas, dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, com o objetivo de discriminar a porção óssea dos elementos dentários, os quais se coram em menor intensidade (LIMA *et al.*, 2000; 2004). Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram acomodadas em lâminas para microscópio, e posteriormente fotografadas em câmera digital Sony Cyber-Shot[®] (modelo DSC – W80, Hong Kong, China).

Todas as imagens foram feitas com papel milimetrado de área conhecida para posterior conversão de pixel em mm². As imagens foram lançadas em Software IMAGE J[®] para a quantificação da perda óssea alveolar (POA), que foi mensurada através do método de área de KUHR *et al.* (2004) com modificações. Para isso, foram feitas medições ao longo da região entre a ponta da cúspide dos molares e da crista óssea alveolar remanescente, subtraída da respectiva área da hemiarcada normal contralateral, controle próprio do animal. Todas as imagens obtidas foram comparadas com a área conhecida (0,5 x 0,5 mm²).

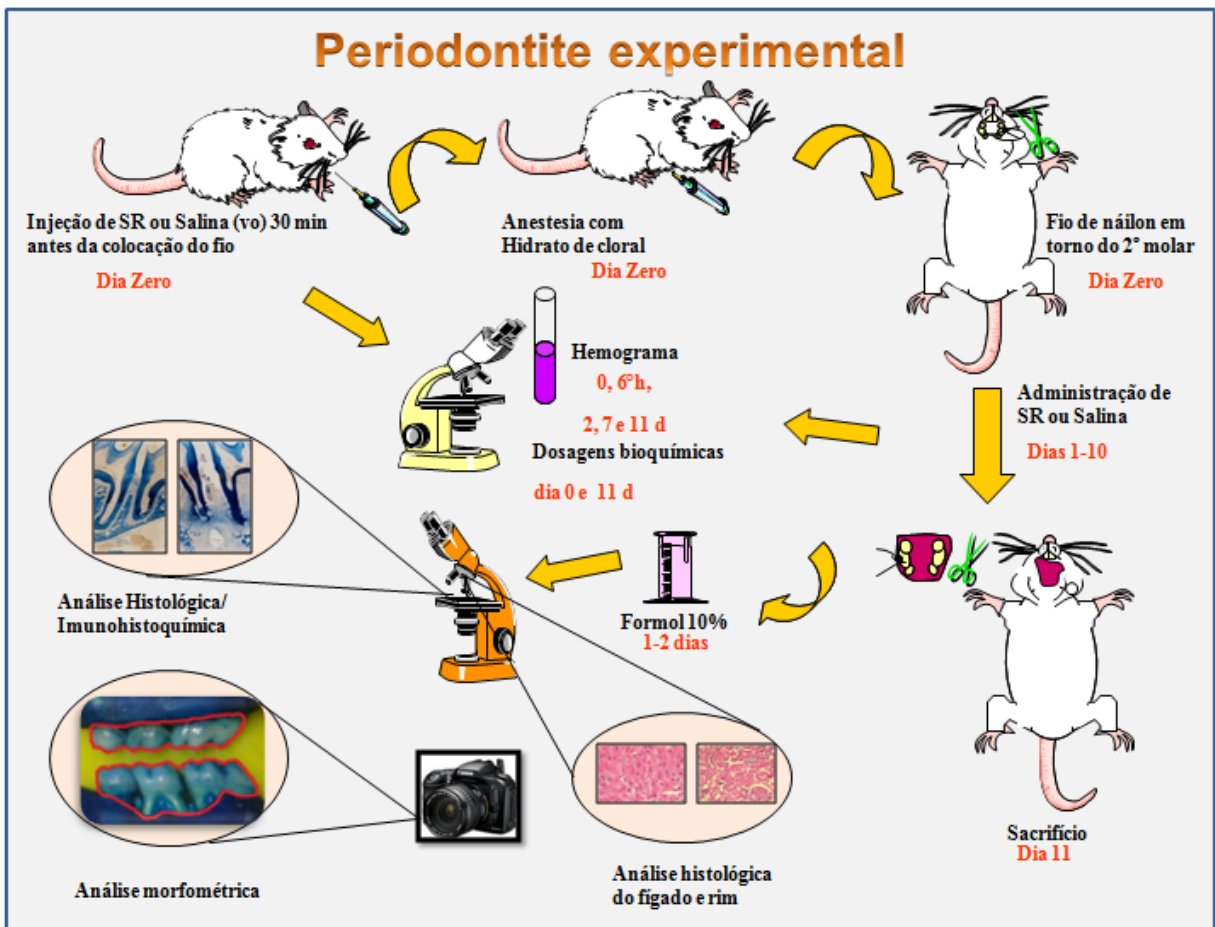


Figura 4: Desenho esquemático da representação da sequência de passos realizados na periodontite experimental. Inicialmente o animal recebe injeção de solução Salina ou Ranelato de estrôncio por via oral, em seguida é feita a colocação do fio de sutura (náilon 3.0) sob anestesia com hidrato de cloral 10%. A administração de solução Salina ou Ranelato de estrôncio é realizada diariamente durante 11 dias. Posteriormente os animais são sacrificados para remoção das maxilas e estas seguem para as respectivas análises, morfométrica, histológica e imunohistoquímica. A coleta sanguínea para realização do leucograma é feita no dia zero, na 6ª hora, no 2º, 7º e 11º dia do experimento e para a realização das dosagens bioquímicas é feita no dia 0 e 11º dia do experimento (baseado em Lima *et al.*, 2000 e 2004).

b) Análise histológica do osso alveolar

As análises histológicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada. Para tanto, 11 dias após a inserção do fio, os animais foram sacrificados. As hemiarcadas foram removidas e fixadas em formol a 10% por 24 horas. A seguir, foram submetidas a tratamento com ácido nítrico a 7%, por aproximadamente 7 dias, para a desmineralização. Posteriormente, as hemiarcadas foram suspensas em sulfato de sódio a 5%, seguido de banho em água corrente por 24 horas. As peças foram armazenadas em álcool absoluto até sua inclusão em parafina. Foram feitos cortes seriados de 4 μm em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas com Tricômio de Mallory.

A análise microscópica da hemiarcada foi realizada considerando a região entre os 1º e 2º molares, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular e de osteoclastos, além do estado de preservação do processo alveolar e cimento, atribuindo-se escores que variaram de 0 a 3, de acordo com a intensidade dos achados *Escore 0*: ausência ou apenas discreto infiltrado celular, poucos osteoclastos e preservação do osso alveolar e cimento; *Escore 1*: moderado infiltrado celular, presença de alguns osteoclastos, pouca reabsorção óssea e cimento preservado; *Escore 2*: Acentuado infiltrado celular, grande número de osteoclastos, degradação acentuada do processo alveolar e destruição parcial do cimento; *Escore 3*: Acentuado infiltrado celular, número aumentado de osteoclastos, ausência de processo alveolar e destruição total de cimento (LIMA *et al.*, 2000).

c) Análise imunohistoquímica para detecção de TNF- α e IL-1 β

As análises imunohistoquímicas foram realizadas a partir das mesmas amostras utilizadas para a análise histológica, porém foram realizados cortes seriados (4 μm) em lâminas com poli L-lisina (Probe on Plus[®]), adequadas para a técnica de imunohistoquímica. A seguir, os cortes seriados foram desparafinizados em Estufa a 37 °C, e re-hidratados e imersos em tampão de citrato 0,1 M (pH 6,0) sob aquecimento a 100 °C em microondas, por 15 minutos. Após o resfriamento,

obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas pelo bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3%. A seguir, a incubação com um dos anticorpos primários anti-TNF- α , anti-IL-1 β anti-rato foi feita durante a noite (*overnight*). Após a lavagem no dia seguinte, foi feita incubação com anticorpo (secundário) biotilado anti-IgG de carneiro, por 30 minutos. Durante esse período, o complexo ABC (Vectastain[®]) foi preparado, para incubação posterior, conforme instruções do fabricante. Após nova lavagem com PBS, uma coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine DAB/peróxido foi realizada, seguida por uma nova contra-coloração com hematoxilina de Harry. Os controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%. Nenhum dos controles negativos mostrou imunorreatividade para TNF- α , IL-1 β . Por fim, foi realizada a desidratação em uma série de concentrações de álcoois, clareadas em xilol e as respectivas montagens das lâminas e lamínulas (LIMA, 2004)

d) Avaliação das dosagens bioquímicas para Fosfatase Alcalina Óssea

Para dosagem dos níveis séricos de Fosfatase Alcalina Óssea inicialmente foi realizada a dosagem dos níveis séricos da enzima Fosfatase Alcalina total (FAT) que compreende as isoformas entérica, hepática e óssea. Posteriormente, uma amostra do material foi aquecida para obtenção da atividade da fosfatase alcalina óssea. O método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor. A quantificação foi realizada utilizando-se "Kit" específico, cuja metodologia seguiu orientação do laboratório fabricante (LABTEST[®]). Alíquotas de 100 μ l da amostra foram incubadas em banho-maria a 56 °C por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente no espectrofotômetro em temperatura de 30 °C com leitura das absorbâncias em 405 nm. A fração óssea, por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (MOSS & WHITBY, 1975).

3.2.2.2 Parâmetros Sistêmicos dos animais

Os parâmetros sistêmicos dos animais foram estudados através de análises do leucograma, variação de massa corpórea, avaliação de alterações hepáticas e renais por meio de dosagens bioquímicas e análises histológicas do fígado e rim.

a) Leucograma

Após anestesia dos animais utilizando-se Hidrato de cloral a 10% (250 mg/kg-ip). Foi feita coleta de sangue a partir da secção na ponta da cauda do animal, com tesoura. A primeira gota de sangue foi desprezada e a seguinte, colhida para a confecção do esfregaço corado pelo método hematoxilina-eosina (H&E), para as contagens diferenciais. Adicionalmente, 20 μ l de sangue foram diluídos em 380 μ l de Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Os hemogramas foram realizados antes da indução da periodontite, 6 e 48 horas após e nos 7^o e 11^o dias após a periodontite (LIMA *et al.*, 2000)

b) Análise da variação de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corpóreas medidas antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante os 11 dias do período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g), em relação à massa inicial;

c) Avaliação das alterações hepáticas

No 11^o dia, os animais foram sacrificados, e tiveram o fígado removido, fixado em formol a 10% por 24 horas e processados para a coloração com hematoxilina-eosina. A análise foi realizada sob microscopia óptica. Para corroborar os achados histopatológicos, no 11^o dia, por ocasião do sacrifício dos animais, foram

coletadas amostras de sangue e alterações hepáticas dos animais investigadas através da determinação da atividade sérica das enzimas transaminases (AST e ALT). A quantificação foi realizada utilizando-se “Kits” específicos para cada tipo de dosagem. A metodologia seguiu orientação do laboratório fabricante (LABTEST®). Alíquotas de 50 µl da amostra foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 60 minutos para AST e 30 minutos para ALT, em seguida foram adicionados 250 µl do reagente de cor e 2,5 ml de solução NaOH. Posteriormente foi determinada diretamente em espectrofotômetro a leitura das absorbâncias utilizando comprimento de onda de 505 nm.

d) Avaliação das alterações renais

No 11º dia, os animais foram sacrificados, e tiveram os rins removidos, fixados em formol a 10% por 24 horas e processados para a coloração com hematoxilina-eosina. A análise foi realizada sob microscopia óptica. Para corroborar os achados histopatológicos, no 11º dia, por ocasião do sacrifício dos animais, foram coletadas amostras de sangue e alterações renais dos animais investigadas através da determinação dos níveis séricos de uréia e creatinina, utilizando-se “Kits” específicos para cada tipo de dosagem. A metodologia seguiu orientação do laboratório fabricante (LABTEST®). Para determinação dos níveis séricos de uréia, alíquotas de 10 µl da amostra foram adicionadas a 1 ml de urease tamponada e incubadas em banho-maria a 37 °C por 5 minutos, em seguida foi adicionado 1 ml da solução oxidante, posteriormente foi determinada diretamente em espectrofotômetro a leitura das absorbâncias utilizando comprimento de onda de 600 nm. Para determinação dos níveis séricos de creatinina, alíquotas de 125 µl da amostra foram adicionadas a 250 µl de ácido pícrico e 1 ml de solução tampão. Em seguida, foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. Após esse período foi realizada uma leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 510 nm. Em seguida foi adicionado 50 µl de solução acidificante para a realização de uma nova leitura das absorbâncias

3.3 Indução da resposta Inflamatória por carragenina

3.3.1 Modelo de migração neutrofílica (Peritonite)

Para indução da peritonite experimental, os ratos receberam injeção de carragenina por via intraperitoneal (700 µg/cavidade dissolvidos em 1 ml de solução salina estéril) e foi aguardado um período de quatro horas para posterior coleta do líquido peritoneal e avaliação da migração leucocitária, para isto, os animais foram sacrificados imediatamente após lavagem da cavidade, injetando-se 10 ml de solução salina 0,9% contendo 5 UI/ml de heparina. Em seguida foi feita uma leve massagem no abdômen dos animais, e através de uma incisão foi coletado cerca de 7 ml de fluido peritoneal, com pipeta de Pasteur (figura 5).

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita por (SOUZA & FERREIRA, 1985), onde foi coletado 20 µl do fluido peritoneal e diluído em 380 µl do reagente de Turk para posterior contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada através de esfregaços corados pelo método hematoxilina-eosina (H&E) em lâmina para microscopia, para isto, 50 µl do fluido peritoneal foi centrifugado em citocentrífuga a 1500 rpm, durante 10 minutos. Após este processo as células foram contadas através de microscopia óptica sendo os resultados expressos como a média ± E.P.M. do número de células x 10³/ml de fluido peritoneal. Os animais foram divididos em quatro grupos:

a) Grupo Normal

Esse grupo foi constituído por seis ratos não manipulados, os quais foram controles normais do experimento;

b) Grupo Salina

Esse grupo foi constituído de seis ratos, os quais receberam injeções de solução salina a 0,9% (2 ml/kg-vo) uma hora antes da indução da peritonite por Carragenina (700 µg/cavidade dissolvidos em 1 ml de salina estéril);

c) Grupo Dexametasona

Esse grupo foi constituído por seis ratos, os quais receberam injeções de Dexametasona (1 mg/kg-sc), 30 minutos antes da indução da peritonite por carragenina;

d) Grupo Ranelato de estrôncio

Esse grupo foi constituído por seis ratos, os quais receberam injeções de Ranelato de estrôncio na dose de 630 mg/kg-vo, uma hora antes da indução da peritonite por carragenina.

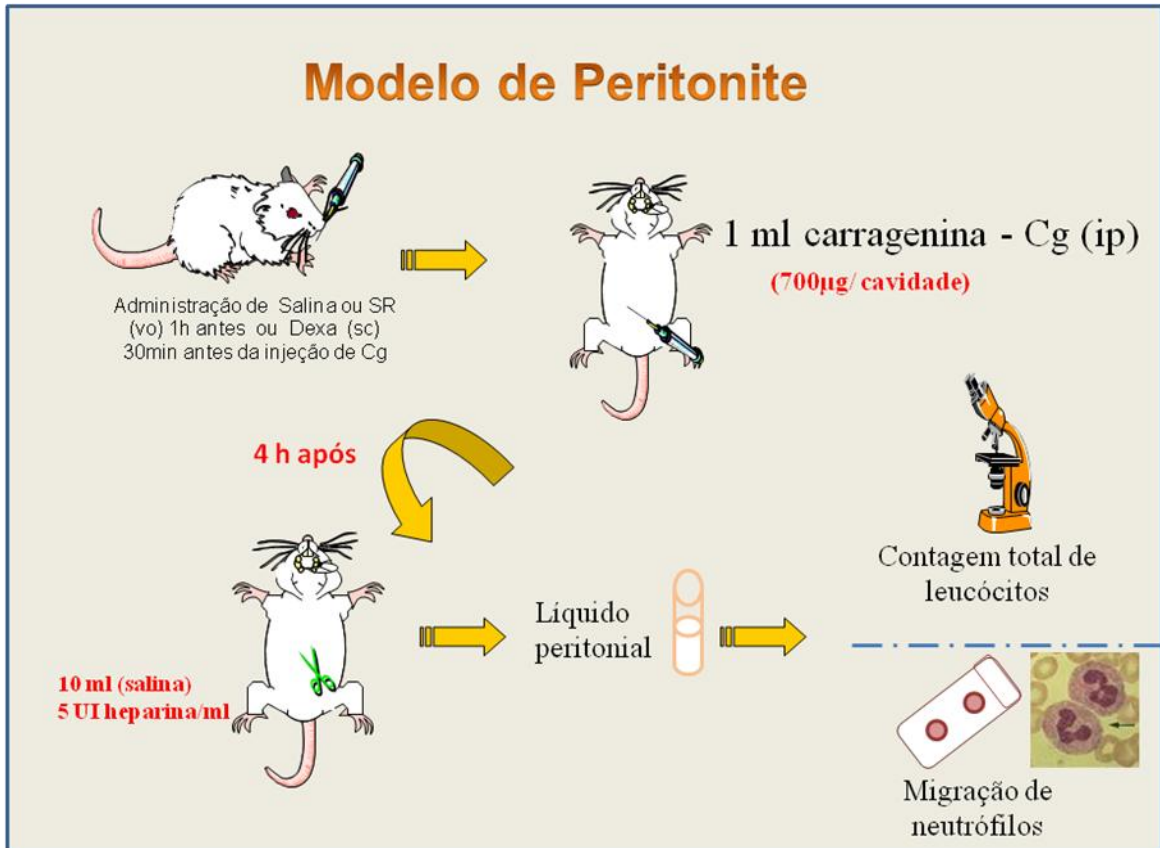


Figura 5: Desenho esquemático da representação da sequência de passos realizados na migração neutrofílica induzida por carragenina (peritonite experimental). Inicialmente o animal recebe injeção de solução Salina, Dexametasona ou Ranelato de estrôncio. Em seguida é administrada carragenina por via intraperitoneal. Após um período de 4 horas é realizada uma laparotomia para remoção do líquido peritoneal. Posteriormente, a partir do líquido peritoneal é realizada a contagem total de leucócitos e neutrófilos (baseado em SOUZA e FERREIRA, 1985).

3.3.2 Modelo de indução do Edema de Pata

Para a indução do edema de pata foi administrado Carragenina (700 µg/pata dissolvida em 0,1 ml de solução salina, por via subcutânea plantar de ratos. Os volumes das patas direitas de cada animal foram medidos através de um hidropletismômetro manual antes da injeção dos estímulos inflamatórios e após 1, 2, 3 e 4 horas a indução (figura 6). O edema foi calculado através da diferença entre o volume de líquido deslocado pelas patas em um determinado tempo após e antes do estímulo (LANDUCCI *et al.*, 1995). Os resultados foram expressos em volume de edema (ml) e comparados àqueles obtidos das patas dos animais onde foi injetado o estímulo inflamatório e solução salina (0,1 ml).

a) Grupo Salina

Esse grupo foi constituído por seis ratos, os quais receberam injeções de solução salina a 0,9% (2 ml/kg-vo.), uma hora antes da indução do edema de pata por carragenina (700 µg/pata);

b) Grupo Dexametasona

Esse grupo foi constituído por seis ratos, os quais receberam injeções de Dexametasona (1 mg/kg-sc.), 30 minutos antes da indução do edema de pata por carragenina (700 µg/pata);

c) Grupo Ranelato de estrôncio

Esse grupo foi constituído por seis ratos, os animais receberam injeções de Ranelato de estrôncio na dose de 630 mg/kg-vo. uma hora antes da indução do edema de pata por carragenina (700 µg/pata);

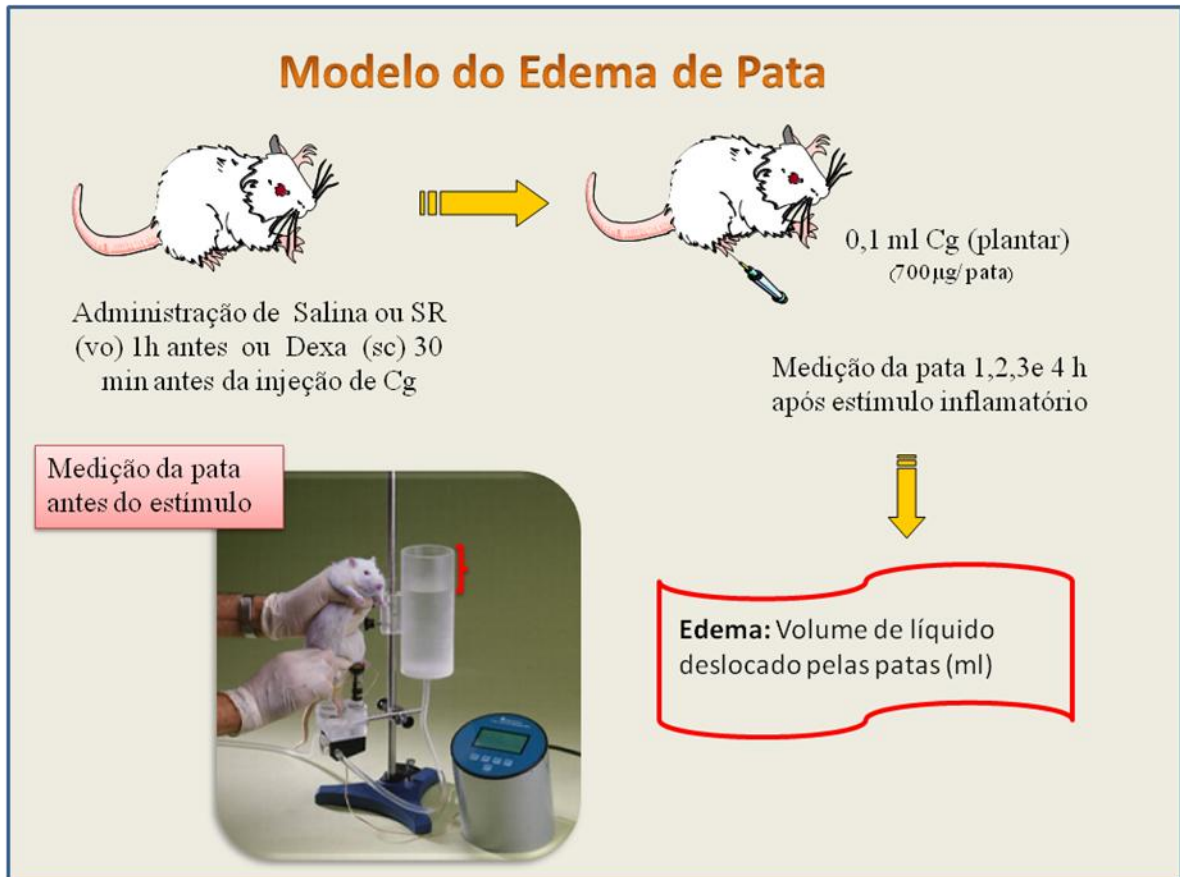


Figura 6: Desenho esquemático da representação da sequência de passos realizados no modelo experimental do Edema de Pata. Inicialmente é feita a medição da pata direita do animal através de um hidropletismômetro. A seguir o animal recebe injeção de solução Salina, Dexametasona ou Ranelato de estrôncio. Posteriormente é administrada carragenina por via intraplantar. A medição da pata é realizada após um período de 1, 2, 3 e 4 h após o estímulo inflamatório induzido por carragenina. O edema da pata corresponde ao volume de líquido deslocado pelas patas no determinado período subtraído pelo o volume obtido inicialmente (baseado em LANDUCCI *et al.*, 1995).

3.4 Análise estatística

Para os dados paramétricos, os resultados foram expressos como Média \pm Epm. Nas comparações entre os grupos foi utilizada Análise de Variância (Anova) seguida pelo teste de Bonferroni.

Para os dados não paramétricos, os resultados obtidos foram expressos como Mediana acompanhada de valores externos, e os testes estatísticos aplicados foram Kruskal-Wallis e Dunn.

Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Periodontite experimental

Foi utilizado o modelo de indução da Periodontite através da inserção de fio de náilon 3.0 em torno dos segundos molares superiores esquerdos dos ratos durante 11 dias (LIMA *et al.*, 2000 e 2004). Foram avaliados parâmetros locais do tecido periodontal através de análises morfométrica e histológica do tecido ósseo alveolar, e imunohistoquímica para detecção de TNF- α e IL-1 β ; atividade osteoblástica, por meio de dosagem sérica de Fosfatase Alcalina Óssea. Também foram avaliados parâmetros sistêmicos dos animais através de análises do leucograma, variação de massa corpórea, avaliação das alterações hepáticas e renais por meio de dosagens bioquímicas e análises histológicas do fígado e rim.

1.1 Parâmetros locais do tecido periodontal e atividade osteoblástica

a) Análise morfométrica do tecido ósseo alveolar

A figura 7 ilustra análise morfométrica de hemimaxilas de animais submetidos a 11 dias de periodontite. Em animais sem tratamento (grupo Salina) foi observado intensa reabsorção do osso alveolar. Grupos tratados com Ranelato de estrôncio reduziu significativamente ($P < 0.05$) a perda óssea alveolar, comparado ao grupo de animais sem tratamento, a partir da dose intermediária utilizada. SR (70, 210 e 630 mg/kg) diminuiu a perda óssea alveolar em 16,9%, 39,4% e 37,5% respectivamente.

Esses dados são melhores visualizados através da figura 8 (A) ilustra hemimaxila normal, onde não foi induzida a periodontite e utilizada para o controle. (B e C) hemimaxilas onde foi induzida a doença em animais não tratados (Salina) e tratados com Ranelato de estrôncio na dose de 630 mg/kg.

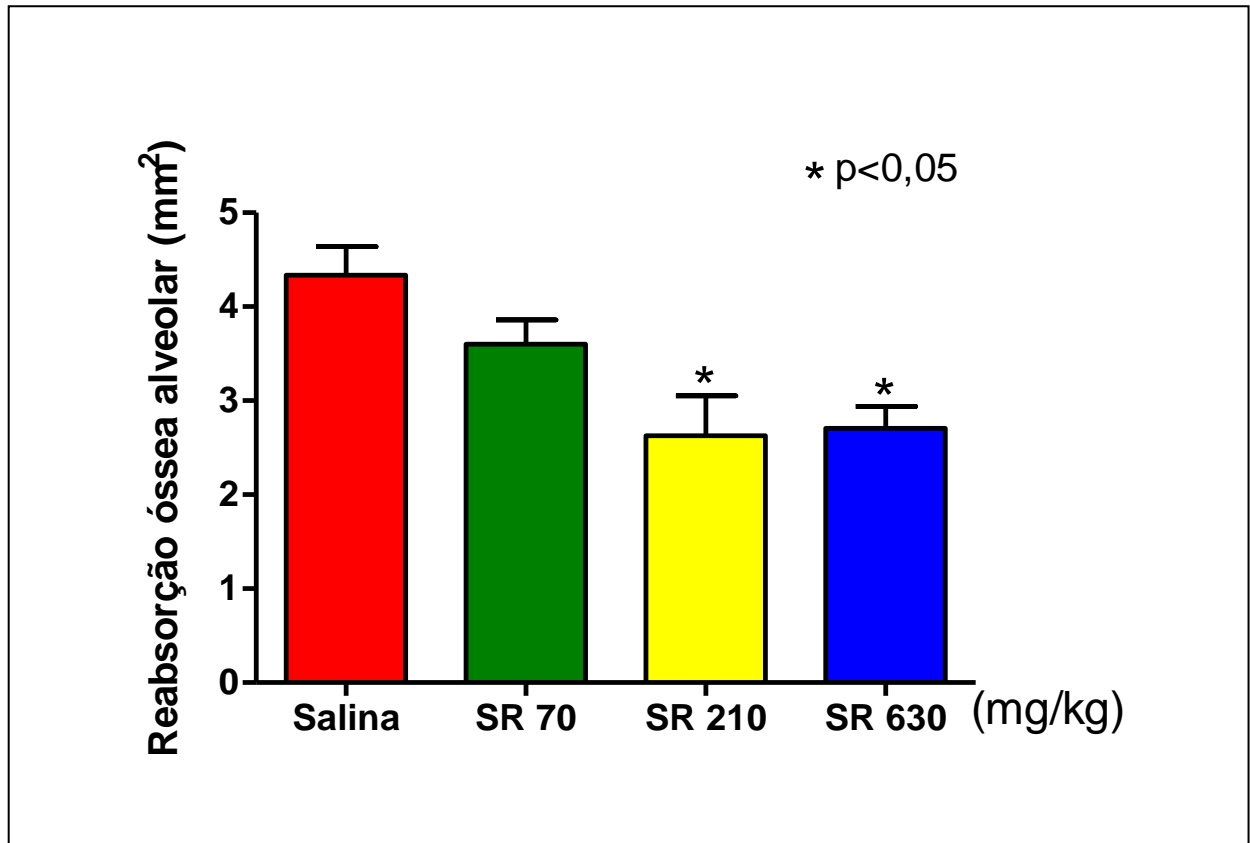


Figura 7: Efeito do Ranelato de estrôncio (SR) sobre a perda óssea alveolar na periodontite induzida por corpo estranho em ratos: SR (70, 210 ou 630 mg/kg-vo) ou solução Salina foram injetadas diariamente e 30 minutos antes da indução da periodontite através da inserção cirúrgica do fio de náilon em torno dos segundos molares superiores esquerdos dos ratos. Os animais foram sacrificados após 11 dias do procedimento cirúrgico. Observou-se que SR foi capaz de inibir, de forma significativa ($p < 0,05$), a partir da dose intermediária utilizada, a perda óssea alveolar (POA), representando redução na reabsorção óssea das maxilas em 16,9%, 39,4% e 37,5%, respectivamente. As barras representam Médias \pm EPM de animais com periodontite induzida. * $p < 0,05$ indica diferenças estatísticas dos ratos que receberam SR, nas diversas doses, em relação aos animais que receberam apenas Salina (Anova, Bonferroni).

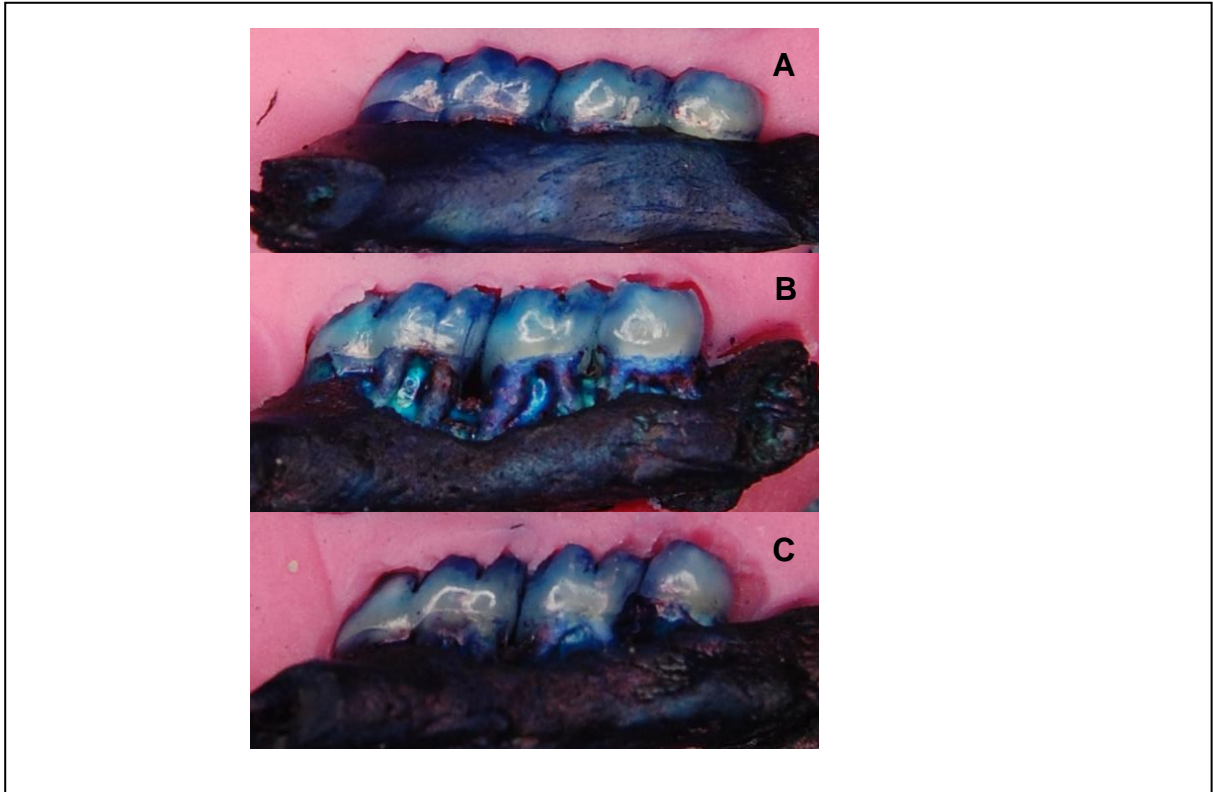


Figura 8: Aspecto macroscópico do periodonto de ratos normais (A) ou submetidos à periodontite tratados com Salina (B) ou com Ranelato de estrôncio (C): Os animais foram submetidos à periodontite por corpo estranho e receberam SR (630 mg/kg-vo) ou Salina (2 ml/kg-vo) antes da cirurgia e após, durante 11 dias. Os ratos foram sacrificados no 11^o dia e suas maxilas foram removidas e fixadas em formol a 10%. A seguir as hemiarcadas foram separadas, dissecadas e coradas em azul de metileno a 1%, antes de serem acomodadas em lâmina para microscópio para posterior observação. (A): Periodonto de animais normais que receberam Salina e não foram submetidos à periodontite. (B): Periodonto de animais que receberam Salina, mas foram submetidos à periodontite, mostrando intensa destruição do osso alveolar e exposição das raízes. (C): Periodonto de ratos submetidos à periodontite, que receberam SR (630 mg/kg), mostrando redução da reabsorção óssea, pequena exposição das raízes.

b) Análise histológica

A análise histológica, da região entre o 1º e 2º molar, do periodonto de ratos submetidos à Periodontite ao longo de 11 dias e sem tratamento (Salina), revelou infiltrado inflamatório com reabsorção severa do cimento e osso alveolar (figura 9B) que recebeu uma média de escore de 2,5 (2-3) (tabela 1). O efeito do SR 630 mg/kg no periodonto de ratos submetidos à periodontite durante 11 dias pode ser conferido na figura 9C, onde observa-se menor infiltrado inflamatório, destruição de cimento e osso alveolar, recebendo uma média de escore 1,5 (1-3) (tabela 1). Na figura 9A pode-se observar a região entre 1º e 2º molar de um periodonto normal, onde não foi induzida a doença. Verifica-se ausência de infiltrado inflamatório e total preservação das estruturas de suporte periodontal, média de escore 0 (0-0) (tabela 1).

c) Análise imunohistoquímica para detecção de TNF- α e IL-1 β

No controle positivo, observou-se uma intensa marcação imunohistoquímica para TNF- α e IL-1 β (figuras. 10 C e D). Análise qualitativa revelou que houve moderada expressão de TNF- α e IL-1 β no tecido onde foi induzida a periodontite comparado ao tecido saudável (figuras 10. A e B) e houve uma redução na expressão dos mesmos nos tecidos de ratos tratados com Ranelato de estrôncio (630 mg/kg) (figuras. 10 E e F).

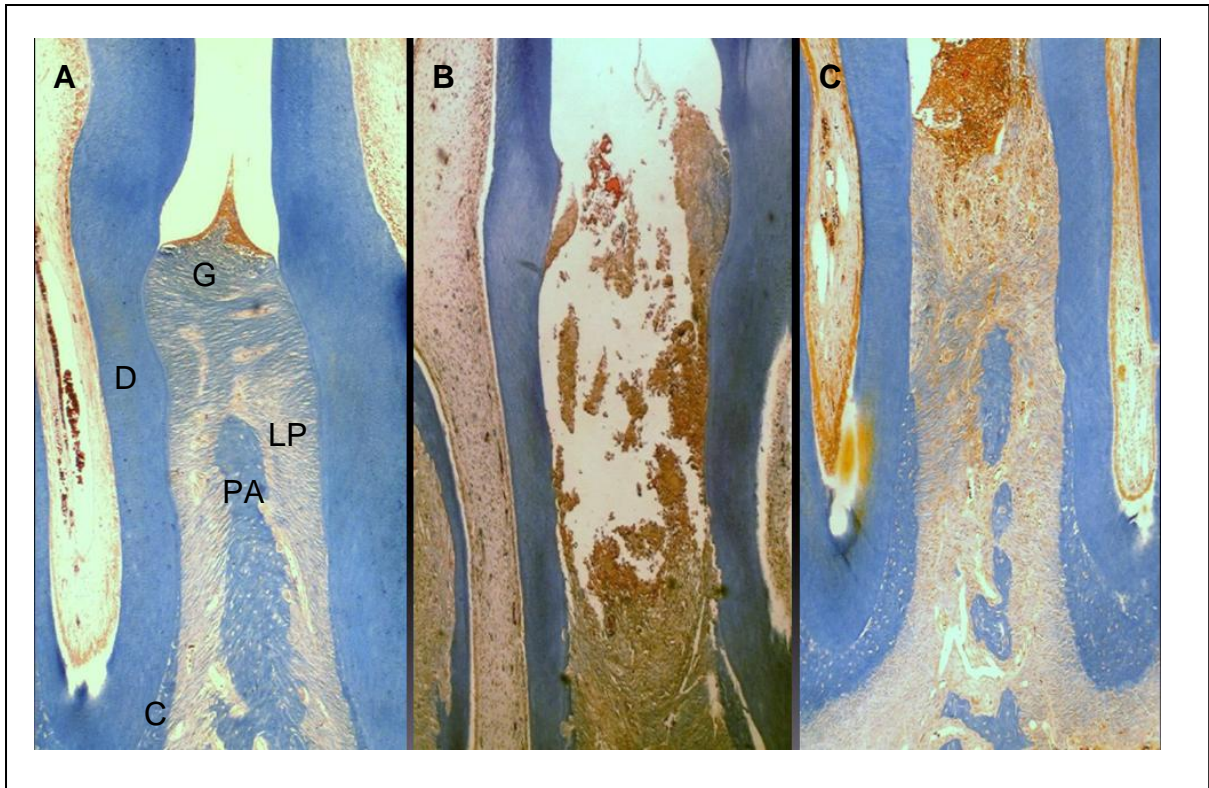


Figura 9: Fotomicrografias do periodonto normal (A) e do periodonto de ratos submetidos à periodontite tratados com Salina (B) e com SR (C): Os ratos foram submetidos a periodontite através da colocação do fio de náilon em torno dos segundo molares superiores esquerdos e receberam SR (630 mg/kg-vo) ou Salina (2 ml/kg-vo) diariamente, durante 11 dias. Os animais foram sacrificados no 11^o dia e suas hemiarquadas foram removidas e processadas para coloração por tricrômico de Mallory. As regiões entre 1^o e 2^o molares foram analisadas. (A): Periodonto de animais, que receberam Salina e não foram submetidos a periodontite. (B): Periodonto de animais que receberam Salina, porém, foram submetidos a periodontite. (C): Periodonto de animais submetidos a periodontite e que receberam SR, mostrando presença de infiltrado celular discreto, com pouco número de osteoclastos, além da preservação do processo alveolar e do cemento, comparando-a com as fotomicrografias A e B. PA: processo alveolar; G: gengiva; C: cemento; e LP: ligamento periodontal.

Tabela 1: Efeito do Ranelato de estrôncio (SR) sobre as alterações histológicas observadas na periodontite induzida em ratos.

	Normal	Salina	SR 630 mg/kg
Escores	0 (0-0)	2,5 (2-3)	1,5 (1-3)*

A periodontite foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundo molares superiores esquerdos dos ratos previamente anestesiados. Os animais receberam Salina (2 ml/kg-vo) ou SR (630 mg/kg-vo) 30 minutos antes da cirurgia e, após esta, diariamente durante 11 dias. No 11^o dia foi feito o sacrifício dos ratos e remoção das hemiarcadas para confecção de cortes seriados, processados para colocação utilizando o tricrômico de Mallory. Os dados representam Mediana, onde as regiões entre os 1^o e 2^o molares foram consideradas para análise dos seguintes parâmetros: presença de infiltrado celular e de osteoclastos e grau de preservação do processo alveolar e cemento. *p<0,05 representa diferenças estatísticas entre animais com periodontite induzida tratados com SR e o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Dunn).

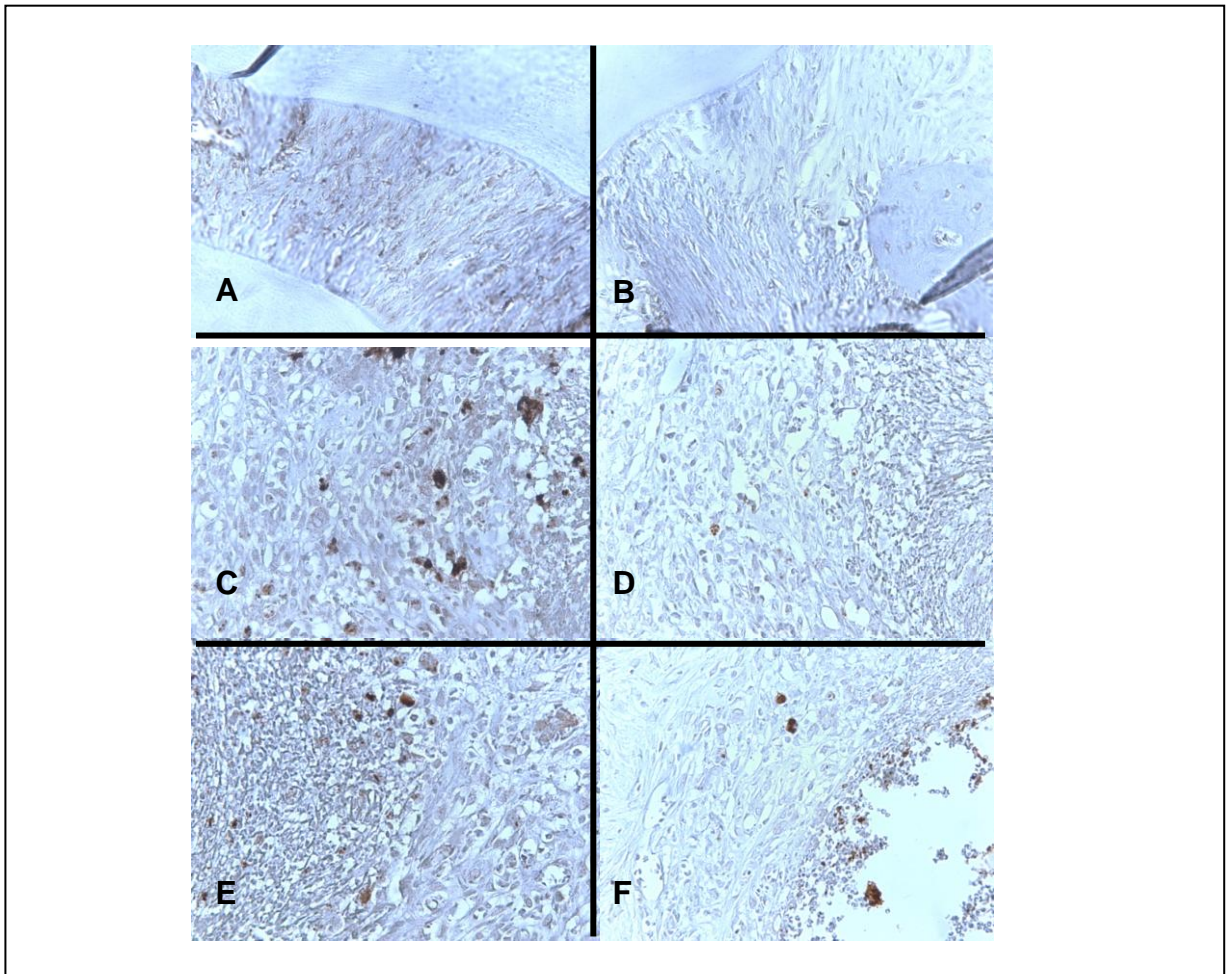


Figura 10: Fotomicrografias do periodonto de ratos para a detecção de TNF- α e IL-1 β : Os ratos foram submetidos a periodontite através da colocação do fio de náilon em torno dos segundo molares superiores esquerdos e receberam SR (630 mg/kg-vo) ou Salina (2 ml/kg-vo) diariamente, durante 11 dias. Os animais foram sacrificados no 11^o dia e suas hemiarcadas foram removidas e processadas para análise imunohistoquímica. As regiões entre 1^o e 2^o molares foram analisadas. (A e B): Expressão de TNF- α e IL-1 β no periodonto normal; (C e D): Expressão de TNF α e IL-1 no periodonto onde foi induzida a periodontite em animal que recebeu Salina (2 ml/kg-vo); (E e F): Expressão de TNF- α e IL-1 β no periodonto onde foi induzida a periodontite em animal que recebeu Ranelato de estrôncio (630 mg/kg-vo).

d) Avaliação da dosagem sérica de Fosfatase Alcalina Óssea

Foi observado inicialmente que os níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (FAt) exibiram um aumento significativo nos grupos de animais tratados com Ranelato de estrôncio comparado ao grupo salina. FAt é constituída por três isoformas: hepática, entérica e óssea. Para confirmar que este aumento correspondia à atividade da isoforma óssea da fosfatase alcalina, realizou-se a dosagem de Fosfatase Alcalina Óssea (FAO). Observou-se um aumento significativo em todos os grupos tratados com SR (70, 210 e 630 mg/kg) quando comparados ao grupo de animais não tratados (Salina). (Figura 11)

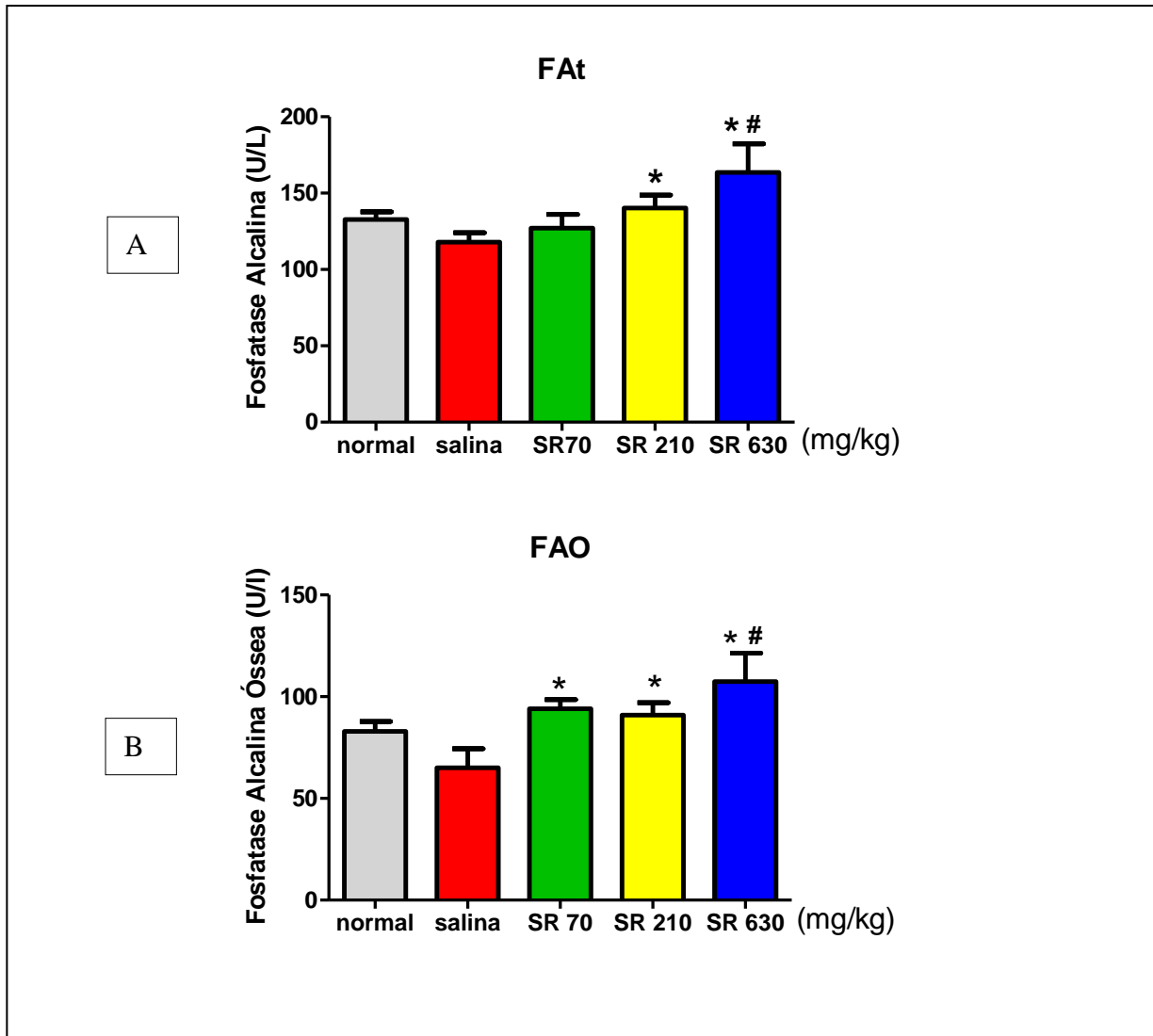


Figura 11: Efeito do Ranelato de estrôncio (SR) sobre os níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (A) e Fosfatase Alcalina Óssea (B) na periodontite induzida por corpo estranho em ratos: A periodontite foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundo molares superiores esquerdos dos ratos previamente anestesiados. Os animais receberam Salina (2 ml/kg-vo) ou SR (70, 210 e 630 mg/kg-vo) 30 minutos antes da cirurgia e, após esta, diariamente durante 11 dias. Amostras sanguíneas foram coletadas a partir do plexo venoso orbital dos animais antes da cirurgia e no 11º dia do experimento. A seguir foram centrifugadas e coletado o sobrenadante para a realização das dosagens séricas de Fosfatase alcalina total e óssea. Observou-se que SR foi capaz de aumentar ($p < 0,05$) os níveis de FAt, a partir da dose intermediária utilizada e dos níveis de FAO a partir da menor dose administrada. Os valores representam Média \pm EPM das respectivas dosagens bioquímicas realizadas antes e após a indução da periodontite). #, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normal e salina, respectivamente; (Anova e Bonferroni).

1.2 Parâmetros sistêmicos dos animais

a) Leucograma

O leucograma realizado antes (dia 0), na 6^a h e no 2^o, 7^o e 11^o dia experimental após a indução da periodontite está ilustrado na tabela 2 demonstrando o número de leucócitos totais, neutrófilos e mononucleares (monócitos e linfócitos) para cada grupo experimental.

Observa-se que tanto no grupo de animais sem tratamento (Salina) e tratado com SR (630 mg/kg) houve pico de leucocitose (leucócitos totais) no sétimo dia após indução da doença. Observa-se também que na 6^a h e no 7^o dia as células predominantes foram neutrófilos em ambos os grupos, Salina e SR (630 mg/kg), enquanto que os números de mononucleares foi significativa na 6^a h e no 2^o dia em animais sem tratamento e no 7^o dia em animais tratados com SR.

b) Análise da variação de massa corpórea

A variação de massa corpórea dos animais durante 11 dias de periodontite e em animais normais em que não foi induzida a doença está ilustrada na figura 12. Foi observado que inicialmente todos os animais, tanto os do grupo salina quanto os do grupo tratado com Ranelato de estrôncio submetidos à periodontite, apresentaram uma perda de peso após o primeiro dia do procedimento cirúrgico para colocação do fio, contudo, esses animais em ambos os grupos exibiram uma tendência de aumento de massa corpórea com o passar dos dias. No grupo de animais normais observou-se um aumento da curva de peso, sem nenhuma alteração, durante o experimento.

Tabela 2: Efeito do Ranelato de estrôncio (SR) sobre o leucograma dos ratos submetidos à periodontite:

LEUCÓCITOS TOTAIS					
	Dia 0	6h	2º dia	7º dia	11º dia
SALINA	14,9±1,1	17,0±1,6	12,3±1,0	19,1±1,4 [#]	13,8±1,4
SR 630 mg/kg	13,3±2,1	18,7±1,2	13,8±1,5	21,0±1,1 [#]	14,3±1,1
NEUTRÓFILOS					
	Dia 0	6h	2º dia	7º dia	11º dia
SALINA	2,9±0,3	9,5±1,1 [#]	3,2±0,4	5,3±1,1 [#]	2,8±0,3
SR 630 mg/kg	3,5±0,8	10,5±0,9 [#]	3,7±0,4	5,8±0,3 [#]	2,1±0,2
MONONUCLEARES					
	Dia 0	6h	2º dia	7º dia	11º dia
SALINA	12,0±0,8	7,3±0,8 [#]	8,7±0,7 [#]	13,6±0,5	11,0±1,1
SR 630 mg/kg	9,8±1,3	8,2±0,4	10,1±1,3	14,8±0,8 [#]	12,2±0,9

A periodontite foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundo molares superiores esquerdos dos ratos previamente anestesiados. Os animais receberam Salina (2 ml/kg-vo) ou SR (630 mg/kg-vo) 30 minutos antes da cirurgia e, após esta, diariamente durante 11 dias. Amostras sanguíneas foram coletadas da cauda dos animais antes da cirurgia, na 6ª h e no 2º, 7º e 11º dia. A seguir realizou-se a contagem do número total de leucócitos e contagem diferencial das células (neutrófilos e mononucleares). Os valores representam Média ± EPM das **respectivas dosagens bioquímicas** realizadas após a indução da periodontite. [#]p<0,05 representa diferenças estatísticas quando comparado ao valor basal do mesmo grupo. (Anova; Bonferroni).

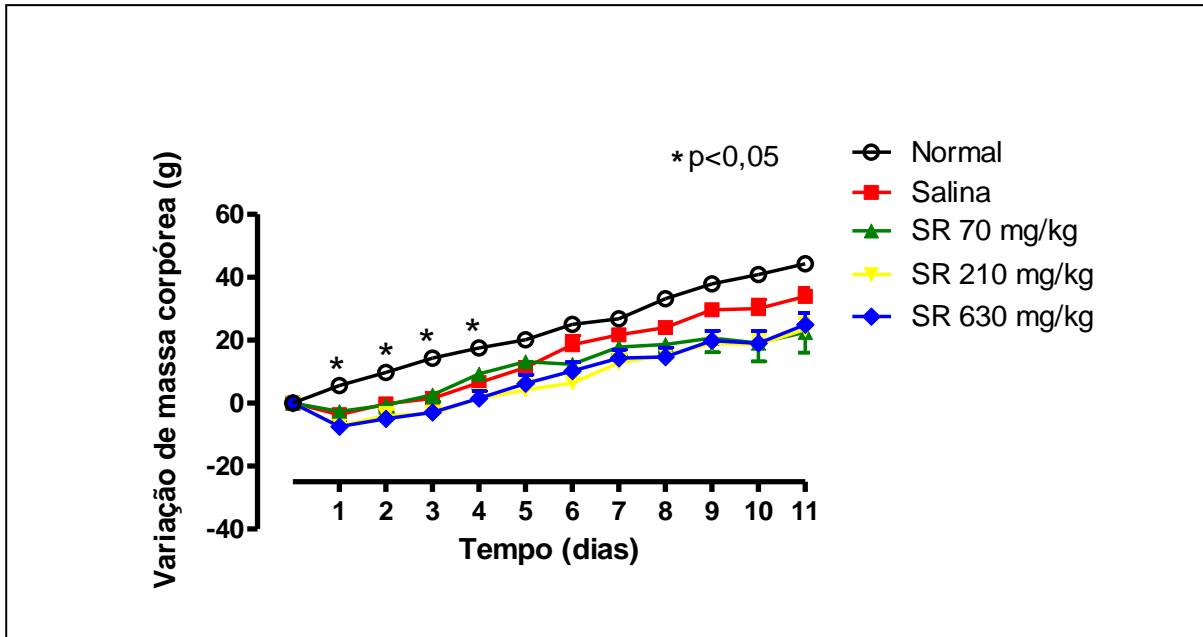


Figura 12: Efeito do Ranelato de estrôncio sobre a variação de massa corpórea de ratos submetidos à periodontite: A periodontite induzida pela inserção de fio de náilon em torno dos segundos molares dos ratos causou perda de massa corpórea, a qual não foi revertida de forma significativa pelo uso do SR (70, 210 e 630 mg/kg-vo). As massas corpóreas dos animais foram medidas antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante 11 dias. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas dos animais em relação à massa inicial. * $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas comparado ao grupo Salina. (Anova; Bonferroni).

c) Avaliação das alterações hepáticas e renais

Em ambos os grupos de animais, sem tratamento (Salina) e tratados com Ranelato de estrôncio, nas diferentes doses 70, 210 e 630 mg/kg, submetidos à 11 dias de periodontite, não foi observado nenhuma alteração nos níveis séricos de enzimas hepáticas (AST e ALT) e nem de uréia e creatinina (Tabela 3). Esses dados corroboraram aos achados histopatológicos de amostras do fígado e dos rins (dados não mostrados).

Tabela 3: Efeito do Ranelato de estrôncio (SR) nas dosagens séricas de ratos submetidos à periodontite.

	NORMAL	SALINA	SR 70 mg/kg	SR210 mg/kg	SR630 mg/kg
AST (U/l)	48,8 ± 3,5	55,4 ± 4,5	55,7 ± 4,5	54,7 ± 2,1	56,1 ± 4,2
ALT (U/l)	13,0 ± 0,7	11,9 ± 1,2	14,4 ± 1,0	12,8 ± 1,9	10,6 ± 1,4
URÉIA (mg/dl)	42,3 ± 2,2	44,7 ± 4,0	52,3 ± 2,0	47,7 ± 3,6	36,1 ± 1,9
CREATININA (mg/dl)	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,07 ± 0,1	1,0 ± 0,1

A periodontite foi induzida através da inserção cirúrgica de um fio de náilon 3.0 em torno dos segundo molares superiores esquerdos dos ratos previamente anestesiados. Os animais receberam Salina (2 ml/kg-vo) ou SR (70, 210 e 630 mg/kg-vo) 30 minutos antes da cirurgia e, após esta, diariamente durante 11 dias. Amostras sanguíneas foram coletadas a partir do plexo venoso orbital dos animais antes da cirurgia e no 11^o dia do experimento. A seguir foram centrifugados e coletado o sobrenadante para a realização das dosagens séricas de enzimas hepáticas (AST e ALT), uréia e creatinina Os valores representam Média ± EPM das respectivas dosagens bioquímicas realizadas antes (Normal) e após 11 dias de periodontite (Anova; Bonferroni).

1.3 Avaliação da resposta inflamatória do Ranelato de estrôncio em Modelos experimentais de inflamação

Foram utilizados 2 modelos experimentais clássicos de inflamação, Peritonite e Edema de Pata. O estímulo inflamatório, em ambos, foi induzido por carragenina, potente agente inflamatório. Para a indução da peritonite a substância inflamatória foi injetada na cavidade peritoneal e após 4 h foi coletado o fluido peritoneal para análise da migração de leucócitos.

No ensaio do edema de pata injetou-se a substância inflamatória na região central das patas direita dos ratos e observou-se a evolução do edema nos períodos de 1, 2, 3 e 4 h após o estímulo inflamatório.

1.3.1 Modelo de Peritonite

Na figura 13 pode-se observar que 4 h após o estímulo inflamatório por carragenina, a concentração de leucócitos totais na cavidade peritoneal aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) no grupo de animais sem tratamento (Salina) quando comparado ao grupo de animais normais, onde não houve indução inflamatória na cavidade peritoneal. Enquanto que na figura 14, verifica-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de neutrófilos na cavidade peritoneal de animais sem tratamento (Salina) em relação ao grupo de animais normais após o mesmo período.

Quando os animais foram tratados com Ranelato de estrôncio (630 mg/kg-vo) ou Dexametasona (1 mg/kg-sc) houve uma diminuição do número total de leucócitos, significativa para o último tratamento (figura 13) e diminuição significativa do número de neutrófilos quando os animais foram tratados com Ranelato de estrôncio (630 mg/kg-vo) e Dexametasona (1 mg/kg-sc) (figura 14), demonstrando uma redução no processo inflamatório. A diminuição do número de leucócitos foi de 20,3% e 44,9%, respectivamente (Tabela 4). A diminuição do número de neutrófilos foi de 31,2% e 60,9%, respectivamente (Tabela 5).

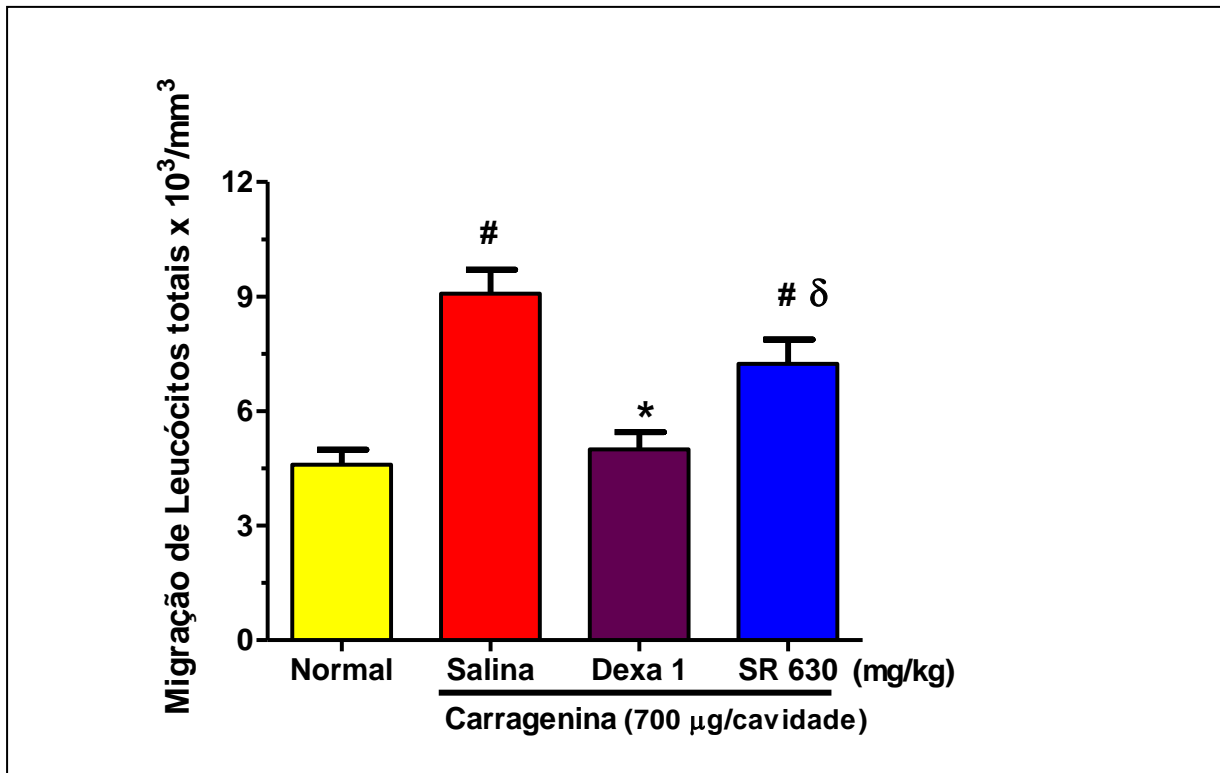


Figura 13: Efeito do SR na migração de leucócitos no fluido peritoneal induzida por carragenina em ratos: Salina (2 ml/kg-vo) ou SR (630 mg/kg-vo) foram injetados 1 h e Dexametasona [(DEXA) 1 mg/kg-sc] 30 minutos antes da administração da carragenina [(Cg) 700µg/cavidade-ip] para indução à peritonite. Os animais foram sacrificados 4 horas após o estímulo inflamatório por Cg. Observou-se que a Cg administrada foi capaz de aumentar, de forma significativa ($p < 0,05$) a migração de leucócitos totais para cavidade peritoneal e que DEXA foi capaz de diminuir, de forma significativa ($p < 0,05$) a migração de leucócitos totais para cavidade peritoneal. Cada grupo representa Média \pm EPM em animais normais, sem tratamento (Salina) e tratados com Ranelato de estrôncio (SR 630 mg/kg-vo) e Dexametasona (Dexa1 mg/kg-sc). #, δ , * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normal, dexa e salina, respectivamente; (Anova e Bonferroni).

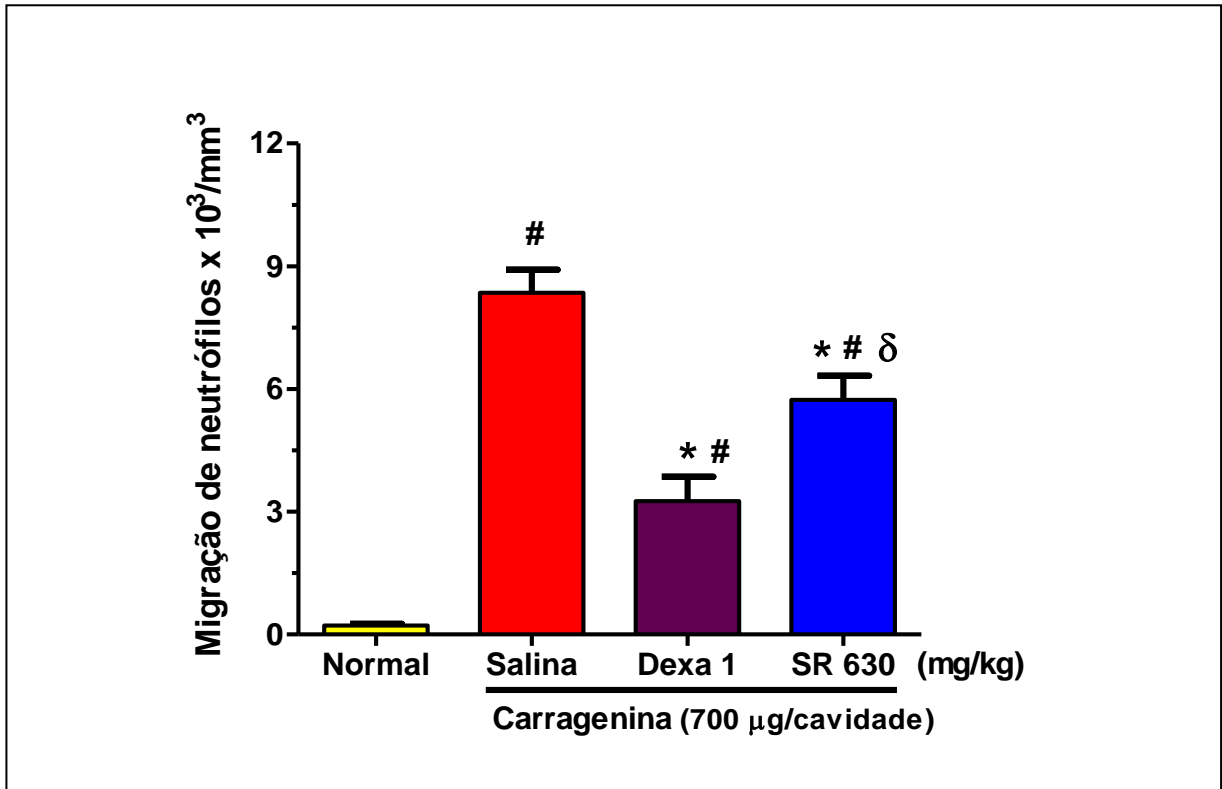


Figura 14: Efeito do SR na migração neutrofílica no fluido peritoneal induzida por carragenina. Salina (2 ml/kg-vo) ou SR (630 mg/kg-vo) foram injetados 1 h e Dexametasona [(DEXA) 1 mg/kg-sc] 30 minutos antes da administração da carragenina [(Cg) 700µg/cavidade-ip] para indução à peritonite. Os animais foram sacrificados 4 horas após o estímulo inflamatório por Cg. Observou-se que a Cg administrada foi capaz de aumentar, de forma significativa ($p < 0,05$) a migração neutrofílica para cavidade peritoneal e que DEXA e SR foram capazes de diminuir, de forma significativa ($p < 0,05$) a migração neutrofílica para cavidade peritoneal. Cada grupo representa Média \pm EPM em animais normais, sem tratamento (Salina) e tratados com Ranelato de estrôncio (SR 630 mg/kg-vo) e Dexametasona (Dexa1 mg/kg-sc). #, δ , * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo normal, dexa e salina, respectivamente; (Anova e Bonferroni).

Tabela 4: Efeito do Ranelato de estrôncio na migração de leucócitos induzida por carragenina.

Grupos	Dose e via de administração	Número de leucócitos totais x 10 ³	% de redução
Normal	-	4,59±0,39	-
Salina 0,9%	2 ml/kg-vo	9,08±0,635 #	-
Dexametasona	1 mg/kg-sc	5,00±0,45 *	44,9
Ranelato de estrôncio	630 mg/kg-vo	7,23±0,63 # ^δ	20,3

A peritonite foi induzida através da administração de Carragenina (700 µg/cavidade) no peritônio de ratos. Os animais receberam Salina (2 ml/kg-vo) e SR (630 mg/kg-vo) uma hora antes ou Dexametasona [(DEXA) 1 mg/kg-sc] 30 minutos do estímulo inflamatório induzido por Cg. O fluido peritoneal foi coletado após 4h a injeção de Cg para realização da contagem total de leucócitos. #, δ, * p < 0,05 quando comparado ao grupo normal, dexta e salina, respectivamente; (Anova e Bonferroni).

Tabela 5: Efeito do Ranelato de estrôncio na migração de neutrófilos induzida por carragenina.

Grupos	Dose e via de administração	Número de neutrófilos x 10 ³	% de redução
Normal	-	0,21±0,04	-
Salina 0,9%	2 ml/ kg-vo	8,34±0,56 #	-
Dexametasona	1 mg/kg-sc	3,25±0,59 * #	60,9
Ranelato de estrôncio	630 mg/kg-vo	5,73±0,58 * # ^δ	31,2

A peritonite foi induzida através da administração de Carragenina (700 µg/cavidade) no peritônio de ratos. Os animais receberam Salina (2 ml/kg-vo) e SR (630 mg/kg-vo) uma hora antes ou Dexametasona [(DEXA) 1 mg/kg-sc] 30 minutos do estímulo inflamatório induzido por Cg. O fluido peritoneal foi coletado após 4h da injeção de Cg. A seguir o fluido peritoneal foi centrifugado para realização da contagem do número de neutrófilos que migraram para cavidade peritoneal. #, δ , * p < 0,05 quando comparado ao grupo normal, dexta e salina, respectivamente; (Anova e Bonferroni).

1.3.2 Modelo de Edema de Pata

A figura 15 mostra que a administração da carragenina (700µg/pata) aumentou o volume de líquido deslocado pelas patas dos animais que receberam Salina, correspondendo ao desenvolvimento do edema de pata no decorrer das horas experimentais. O Ranelato de estrôncio na dose de 630 mg/kg foi capaz de reduzir o desenvolvimento do edema de pata em rato, induzido por carragenina, em 37,5%, 31,4%, 70,9%, 68,6% nos períodos de 1, 2, 3 e 4 h após o estímulo inflamatório, respectivamente. A dexametasona foi capaz de reduzir o desenvolvimento do edema em 49%, 68%, 74%, 81% nos períodos de 1, 2, 3 e 4 h após injeção de carragenina, respectivamente.

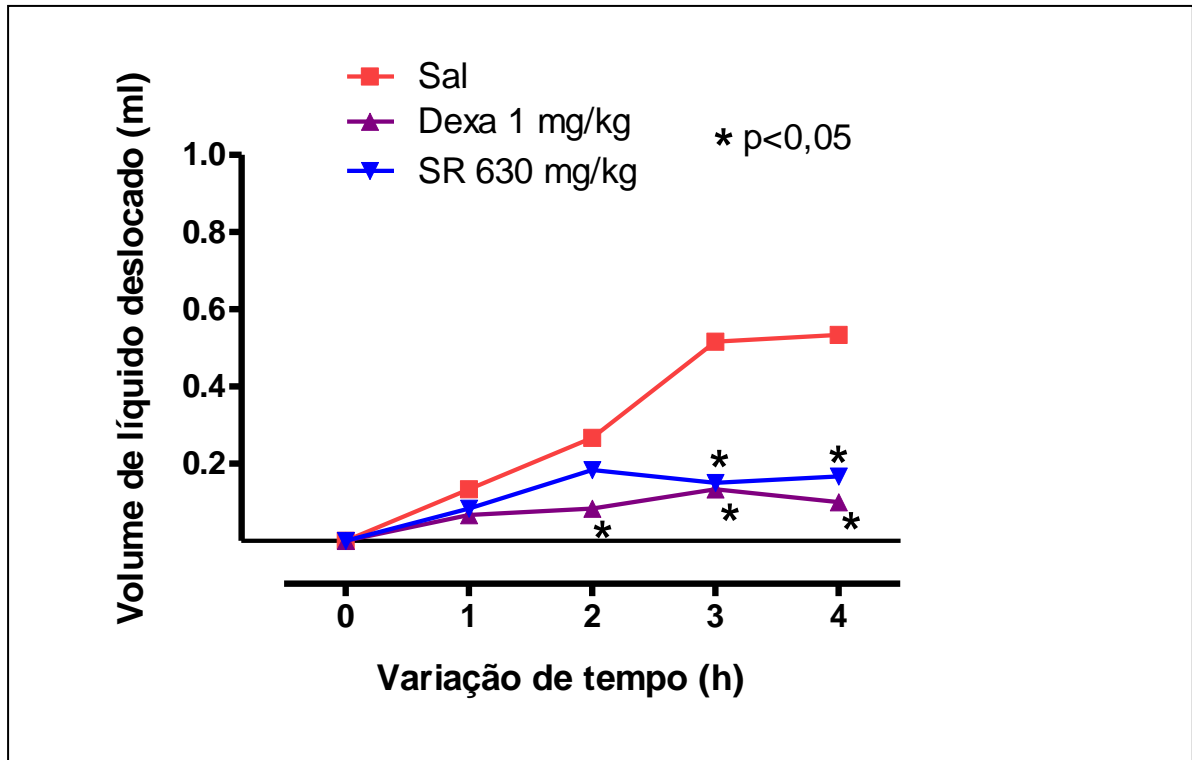


Figura 15: Efeito do SR no Edema de pata induzido por carragenina. Salina (2 ml/kg-vo) ou SR (630 mg/kg-vo) foram injetados 1 h e Dexametasona [(DEXA) 1 mg/kg-sc] 30 minutos antes da administração da carragenina [(Cg) 700µg/pata] para indução do edema de pata. Os animais tiveram sua patas medidas antes e com 1, 2, 3 e 4 horas após o estímulo inflamatório por Cg. A medida inicial do volume de líquido deslocado pelas patas foi utilizada como controle. Observou-se que a Cg administrada foi capaz de aumentar, de forma significativa ($p < 0,05$) o volume de líquido deslocado pelas patas dos animais de forma progressiva com o passar do tempo. DEXA e SR foram capazes de diminuir, de forma significativa ($p < 0,05$) o volume deslocado (edema de pata) a partir da 2ª e 3ª hora experimental, respectivamente. Cada ponto representa Média \pm EPM em animais sem tratamento (Salina) e tratados com Ranelato de estrôncio (SR 630 mg/kg-vo) e Dexametasona (Dexa1 mg/kg-sc). * $p < 0,05$ quando comparado ao salina; (Anova e Bonferroni).

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antirreabsortiva do Ranelato de estrôncio na perda óssea alveolar e provável atividade anti-inflamatória desse fármaco, visto que os mecanismos biológicos de perda óssea podem estar associados aos mecanismos biológicos da inflamação. Para isso, foi utilizado o modelo de periodontite induzida e modelos experimentais clássicos de inflamação em ratos.

O modelo de indução da periodontite por ligadura tem sido amplamente utilizado em investigações cujo principal objetivo está relacionado à perda óssea (LIMA *et al.*, 2000, 2004; SOUZA *et al.*, 2009; ALLAM *et al.*, 2009; TOKER *et al.*, 2009). Além disso, este modelo mimetiza as principais características observadas na periodontite em humanos. A ligadura inserida em torno do segundo molar superior ou primeiro molar inferior, como observado em diferentes estudos, tem um papel importante para início e progressão da perda óssea alveolar, pois atua como um corpo estranho, traumático e como um fator retentivo de placa bacteriana capaz de induzir uma resposta inflamatória e consequente destruição do tecido ósseo alveolar. Neste trabalho foi utilizado o modelo baseado em LIMA *et al.* (2000, 2004), no qual utiliza-se a maxila para o estudo, ou seja, a ligadura é inserida no segundo molar superior, onde nesta região as lesões ósseas são induzidas mais facilmente devido a própria constituição óssea menos compacta, quando comparada ao osso mandibular (LINDHE & KARRING, 1992; SOUZA *et al.*, 2005).

Evidências atuais indicam que a periodontite não é uma doença infecciosa convencional, mas sim uma doença inflamatória desencadeada pela resposta imune do hospedeiro frente ao biofilme periodontal associado a microorganismos patogênicos (TAUBMAN *et al.*, 2007). O acúmulo de placa microbiana na superfície dentária adjacente aos tecidos gengivais promove o contato das células do sulco e epitélio juncional com produtos derivados de bactérias. As células epiteliais são ativadas pelas substâncias microbianas, e liberam citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores químicos da inflamação. Estes mediadores, por sua vez, iniciam uma resposta inflamatória no interior dos tecidos contribuindo para a destruição dos tecidos de suporte periodontal (PAGE & KORNMAN, 1997). Complementando, utilizou-se neste estudo modelos clássicos de

inflamação, como peritonite e edema de pata, que são comumente empregados para a descoberta e avaliação de agentes com ação anti-inflamatória. O agente flogístico utilizado em ambos os modelos foi a carragenina, substância capaz de promover intensa ação quimiotática de neutrófilos, produzindo um exsudado rico em proteínas com um grande número de células de defesa, além da liberação de mediadores tais como Histamina, Serotonina, Bradicinina, Substância P, Fator de Agregação Plaquetária, e Prostaglandinas via ciclooxigenase (DI ROSA *et al.*, 1971; LO *et al.*, 1982; HWANG *et al.*, 1986; GILLIGAN *et al.*, 1994)

Com a finalidade de compreender melhor os fatores relacionados à destruição dos tecidos periodontais e às abordagens farmacológicas de interesse para o controle e prevenção destes danos teciduais, utilizou-se o Ranelato de estrôncio. Este fármaco foi recentemente desenvolvido como um novo tratamento para osteoporose; seu mecanismo de ação possibilita um papel único no metabolismo ósseo e que o destaca dentre outros agentes antirreabsortivos como os bisfosfonatos que agem diminuindo a reabsorção óssea e não possuem nenhum efeito sobre a massa óssea, bem como a teriparatida que possui apenas características anabólicas, enquanto o Ranelato de estrôncio (SR) atua diminuindo a reabsorção, ao mesmo tempo em que aumenta a formação óssea, levando assim a um processo de remodelação a favor da osteogênese (CORTET, 2009). De fato, um estudo *in vitro* mostrou que o SR estimulou a formação de pré-osteoblastos, conseqüentemente, aumentou a síntese e a atividade de células da matriz óssea (CANALIS *et al.*, 1996), além de diminuir a diferenciação de osteoclastos (BONELY *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram pela primeira vez o efeito do SR na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos. Observou-se por análise morfométrica que o SR foi capaz de reduzir a perda óssea alveolar de forma dose-dependente e significativa ($p < 0,05$) a partir da dose intermediária utilizada (210 mg/kg) quando comparado aos animais não tratados (Salina).

Além disso, corroborando os achados macroscópicos, observou-se por análise histológica das maxilas de animais tratados com Ranelato de estrôncio (630 mg/kg) uma diminuição da perda de tecido ósseo alveolar e cemento radicular, e menor infiltrado celular na região interproximal de primeiro e segundo molares

(região desafiada). A escolha da dose utilizada para a análise microscópica levou em consideração uma equivalência entre os níveis séricos encontrados no homem após administração da mesma substância em dose disponível comercialmente e a dose correspondente em ratos, a partir de cálculo determinado em estudo realizado por AMMANN, *et al.* (2006).

A redução da perda óssea observada nas análises macro e microscópicas provavelmente ocorreu pelo duplo efeito do SR no metabolismo ósseo, aumento da formação óssea via CaSR e produção local de PGE₂, e simultaneamente, diminuição da reabsorção óssea através do aumento dos níveis de OPG (MARIE, 2007). Pesquisas recentes também evidenciam o aumento da replicação de osteoblastos e diminuição da apoptose dessas células por mecanismos independentes dos CaSR (FROMIGUÉ *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com AHMET-CAMCIOGLU *et al.* (2009) que observaram prevenção da perda óssea tanto ao nível de osso trabecular, no corpo vertebral, quanto ao nível de osso cortical, no fêmur de ratas ovariectomizadas, decorrente de perda óssea induzida pela deficiência de estrógeno.

Considerando que os processos de formação e reabsorção óssea são fenômenos co-dependentes que estão associados à remodelação óssea. O predomínio de um desses processos sobre o outro resulta em ganho ou perda de massa óssea. O estudo desses eventos pode ser avaliado através da utilização de marcadores bioquímicos como osteocalcina, fosfatase alcalina total, fosfatase alcalina óssea (isoforma da fosfatase alcalina total) e pró-peptídeos do colágeno tipo I que representam o processo de formação óssea, enquanto hidroxiprolina urinária, fosfatase ácida tartarato resistente, moléculas ligadoras de colágeno tipo I representam a reabsorção óssea (SARAIVA *et al.*, 2005; BURTIS *et al.*, 2006; MCPHERSON, 2007).

Os resultados obtidos através das análises morfométrica e histológica em conjunto podem ser corroborados pelo efeito do SR nos níveis séricos de Fosfatase Alcalina total (FA_t) e Fosfatase Alcalina Óssea (FA_o). A administração do Ranelato de estrôncio durante 11 dias de periodontite foi capaz de aumentar

significativamente ($p < 0,05$) os níveis séricos de FAt a partir da dose intermediária utilizada, assim como observado na análise morfométrica. Adicionalmente, na avaliação dos níveis séricos da isoforma óssea da fosfatase alcalina, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) a partir da menor dose utilizada de 70 mg/kg do Ranelato de estrôncio, sobretudo por ser um marcador mais específico.

O fato de não ter sido observada proteção significativa da perda óssea alveolar quando da utilização da menor dose do Ranelato de estrôncio à análise morfométrica e, por outro lado, constatado aumento significativo dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea nessa mesma dose, pode ser explicado pela sensibilidade deste marcador bioquímico a pequenas variações (SARAIVA *et al.*, 2005; BURTIS *et al.*, 2006; MCPHERSON, 2007).

Esses achados estão de acordo com o estudo realizado por HOTT *et al.* (2003) em que foi utilizado modelo de perda óssea induzida por imobilização de membros posteriores em ratos, observando-se além do aumento dos níveis séricos de fosfatase alcalina, uma diminuição de hidroxiprolina na urina. Adicionalmente, foi observado em ensaio clínico com mulheres osteoporóticas que o SR, de fato, aumentou os níveis de FAO e reduziu os níveis de Telopectídeo C (CTX), um marcador de reabsorção óssea (REGINSTER *et al.*, 2005).

Considerando que a resposta inflamatória subjacente à periodontite envolve citocinas inflamatórias a favor da osteoclastogênese (GRAVES, 2008), especificamente TNF- α e IL1- β que podem induzir apoptose de osteoblastos (JILKA *et al.*, 1998; TSUBOI *et al.*, 1999), e como recentemente demonstrado na periodontite experimental em macacos que a injeção local de bloqueadores dos receptores para TNF e IL1 reduziram em 80% o recrutamento de células inflamatórias nas proximidades do osso, além de reduzir a perda óssea de forma significativa (ASSUMA *et al.*, 2010), no presente trabalho avaliou-se o efeito do SR na expressão da marcação para TNF- α e IL1- β .

Observou-se, através de uma avaliação qualitativa, a reação imunohistoquímica para detecção de TNF- α e IL-1 β no periodonto de animais submetidos à periodontite durante 11 dias. Na análise, verificou-se que em animal tratado com Ranelato de estrôncio (630 mg/kg-vo), houve redução da expressão da

marcação dessas citocinas inflamatórias, sugerindo um outro mecanismo de participação do Ranelato de estrôncio na redução da atividade osteoclástica, por redução de mediadores inflamatórios. Assim, sugere-se que o SR pode atuar interferindo na produção ou liberação de citocinas, tais como TNF- α e IL1- β , as quais estimulam reabsorção óssea por induzir proliferação de células progenitoras de osteoclastos e, indiretamente, estimular osteoclastos maduros à atividade reabsortiva (THOMPSON *et al.*, 1987; MANOLAGAS 1995), especula-se portanto, uma possível atividade anti-inflamatória do SR, entretanto, são necessários outros ensaios experimentais envolvendo a participação de citocinas para esclarecer o papel do SR na redução de citocinas inflamatórias.

Dada a importância de se avaliar a segurança de uso do SR e determinar possíveis alterações sistêmicas associadas à farmacocinética, fígado e rins, órgãos responsáveis pela metabolização e excreção dos fármacos, respectivamente, foram avaliados após utilização do SR.

Constatou-se neste estudo que a administração de Ranelato de estrôncio (70, 210 e 630 mg/kg) não promoveu alterações hepáticas e nem renais significantes quando comparada aos animais sem tratamento, através de análise bioquímica para verificar atividade das transaminases (AST e ALT) e níveis séricos de uréia e creatinina, respectivamente. Uma vez demonstrada que alterações sutis, mesmo consideradas normais, foram detectadas, análises histológicas dos fígados e rins (dados não mostrados) foram realizadas. De fato, quando consideradas em conjunto, ambas as análises bioquímicas e histológicas confirmaram que o tratamento durante 11 dias com Ranelato de estrôncio, não foi capaz de causar quaisquer sinais significantes de toxicidade nesses órgãos, confirmando a segurança de seu uso no que se refere especificamente a hepato e a nefrotoxicidades.

Adicionalmente, considerando como referência a massa corporal obtida no início do estudo antes da indução da periodontite, observou-se que a variação de massa corpórea dos animais submetidos à periodontite diminuiu ($p < 0,05$) nos primeiros quatro dias após indução da doença e, após esse período, observou-se aumento contínuo até o 11º dia do experimento. Esse fato, possivelmente se deve à realização do próprio procedimento de indução da doença que resulta em um trauma

local, dificultando a alimentação dos animais especialmente nos primeiros dias após a colocação do fio, visto que a partir de 4 dias, os animais tendem a ganhar peso, muito embora não mais acompanhe a curva de peso de animais normais. O Ranelato de estrôncio administrado durante o mesmo período não foi capaz de reverter tal perda inicial de massa corporal. Além disso, tem sido sugerido que o fato de animais submetidos à periodontite apresentarem redução da perda de massa corpórea está relacionado ao efeito analgésico do fármaco administrado, permitindo que estes animais se alimentem melhor (LIMA, 1999). Dessa forma, sugere-se que o SR não exibiu tal efeito analgésico.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por DELANNOY *et al.* (2002) que demonstraram não haver sinais de toxicidade nem alterações no peso de ratos, mesmo quando utilizada altas doses diárias do Ranelato de estrôncio, administradas por via oral (200, 600 e 1.800 mg/kg), durante 104 semanas.

Em adição, culturas celulares do ligamento periodontal tratadas com SR em concentrações inferiores a 20 mg/ml não apresentaram citotoxicidade *in vitro*, onde foi sugerido a utilização do SR para tratamento de reabsorções dentárias (ER KURSAT *et al.*, 2008).

Na periodontite em humanos pode-se observar através de análise histológica, um infiltrado inflamatório composto de células como linfócitos e macrófagos. Os neutrófilos também estão presentes neste infiltrado inflamatório, muito embora a maioria dessas células migre através dos tecidos epitelial e conjuntivo para alcançar bactérias presente no biofilme dental (KORNMAN & PAGE, 1997), além de destruir bactérias os neutrófilos também destroem colágeno e outros componentes da matriz extracelular contribuindo para a perda progressiva de inserção dental (PIHLSTROM *et al.*, 2005). Sabe-se que a regulação e migração de leucócitos do vaso para os tecidos afetados são determinadas por diferentes tipos de moléculas expressas nos leucócitos e nas superfícies endoteliais, como selectinas, imunoglobulinas (ICAM e VCAM), integrinas e glicoproteínas, e por outras células induzidas por citocinas pró-inflamatórias com propriedades quimiotáticas, como interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 α (IL-1 α), Prostaglandina E₂ (PGE₂), metaloproteinases de matriz (MMP) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (GEMMELL *et al.*, 2001).

Considerando que a periodontite experimental pode alterar o leucograma de ratos (LIMA, 1999), avaliou-se o leucograma dos animais tratados com SR (630 mg/kg). Observou-se, em ambos os grupos experimentais, Salina e SR (630 mg/kg), tendência de aumento do número de leucócitos logo após a 6ª h, e leucocitose no 7º dia experimental, sendo ambos os aumentos sustentados por neutrófilos. Esse fato pode ser explicado pelo trauma local decorrente da colocação do fio, o que gerou uma resposta inflamatória aguda. Como o fio não foi removido, houve um novo pico de leucocitose, refletindo uma agudização do processo não resolvido. Com relação aos números de mononucleares, estes também estiveram aumentados ($p < 0,05$) logo após a colocação do fio e permaneceram assim até o 2º dia experimental em animais sem tratamento, enquanto que em animais tratados, esse aumento foi observado no 7º dia. Observou-se que o SR alterou a contagem de mononucleares, diminuindo o número dessas células após a indução da doença, porém, no 7º dia não foi capaz de reduzir mononucleares quando comparado aos animais sem tratamento. Tem sido demonstrado que o isótopo radioativo de estrôncio (Sr-89) foi capaz de induzir uma depleção do número de monócitos (OGHISO *et al.*, 1988), enquanto que o Ranelato de estrôncio, composto por um isótopo estável, não causou redução dessas células nos períodos finais observados. Pode-se sugerir, portanto, que o SR, através do estrôncio, interfira em células mononucleares em oposição ao isótopo radioativo (Sr-89).

De acordo com os resultados discutidos anteriormente, observa-se que o SR apresentou uma redução significativa na perda óssea alveolar, seja por uma análise direta como verificada na morfometria e microscopia das hemimaxilas ou por análise indireta através de marcador bioquímico de formação óssea. Tal efeito deve-se aos mecanismos já mencionados do SR por atuar em receptores sensores de cálcio, aumentando a osteogênese, e por aumentar os níveis de OPG inibindo a osteoclastogênese. Além disso, sugere-se sua participação na interferência em citocinas inflamatórias, tais como IL1- β e TNF- α , haja vista o SR ter promovido redução da marcação de sua expressão.

Sabe-se que o modelo de indução da periodontite por ligadura em ratos apresenta algumas limitações, como a especificidade microbiana, fatores ambientais, genéticos e outros presentes na doença em humanos. Assim,

consideraram-se as características de resposta inflamatória subjacente ao processo de reabsorção óssea. Dessa forma, achou-se oportuno avaliar o efeito do SR em outros modelos experimentais, considerados clássicos para investigação de agentes com capacidade anti-inflamatória. Para tanto, o SR foi utilizado de forma aguda nos modelos de peritonite e de edema de pata em ratos, ambos induzido por carragenina, um potente agente inflamatório.

Durante a peritonite experimental há um aumento no transporte de substâncias plasmáticas, além de migração celular. Essas mudanças podem ser explicadas pela vasodilatação dos capilares na membrana peritoneal e pela abertura de poros, causados por mediadores celulares e inflamatórios, como neutrófilos e prostaglandina E_2 , respectivamente (KREDIET *et al.*, 1987). A migração de neutrófilos circulante para os tecidos afetados é uma marca da reação inflamatória aguda e envolve diversos mediadores como citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-12, IFN γ), quimiocinas, eicosanóides, leucotrienos e liberação de C5a (CUNHA *et al.*, 2005).

Embora o Ranelato de estrôncio (630 mg/kg) não tenha sido capaz de impedir picos de leucocitose observados na análise do leucograma, como descrito anteriormente, ele foi efetivo, ao inibir ($p < 0,05$) a migração neutrofilica para cavidade peritoneal induzida por carragenina, sugerindo alguma interferência na transmigração dos neutrófilos, seja pela inibição da expressão de moléculas de adesão em leucócitos ou da superfície endotelial, ou ainda, pela inibição de mediadores químicos relacionados.

Classicamente, os efeitos inflamatórios induzidos pela carragenina no edema de pata, evoluem de forma crescente, atingindo o valor máximo três ou quatro horas após o estímulo. Neste modelo, a resposta inflamatória envolve três fases distintas: a primeira fase compreende o período de 0 a 90 minutos e está relacionada à liberação de histamina e serotonina, a segunda fase que varia de 90 a 150 minutos envolve a liberação de cininas, enquanto que na terceira fase, que compreende o período de 150 a 360 minutos, ocorre participação de prostaglandinas (DI ROSA *et al.*, 1971; CRUNKHON & MEACOCK, 1971). Assim, histamina e serotonina são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular inicial, e

prostaglandinas sustentam essa resposta vascular máxima durante a terceira fase da inflamação.

A atividade farmacológica da dexametasona já é bem conhecida, potente anti-inflamatório inibidor de ciclooxigenases, o que permite sua utilização como parâmetro anti-inflamatório em vários modelos experimentais. Os resultados do presente ensaio mostraram que a dexametasona inibiu o desenvolvimento do edema a partir da 2ª hora experimental. O Ranelato de estrôncio (630 mg/kg) apresentou atividade anti-edematogênica ($p < 0,05$) na terceira e quarta hora experimental, associada portanto com a terceira fase da inflamação mediada por prostaglandinas. Esses resultados sugerem que o Ranelato de estrôncio pode estar interferindo na síntese ou liberação de prostaglandinas.

Entretanto, tem sido demonstrado, em estudo *in vitro* utilizando células indiferenciadas da medula óssea de ratos, que o Ranelato de estrôncio pode agir sobre essas células, aumentando a diferenciação osteogênica através da ativação de COX-2 e, conseqüente produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) (CHOUHDARY *et al.*, 2007). Este fato pode parecer intrigante quando consideramos que PGs, especialmente PGE₂, estão envolvidas na indução da destruição tecidual na periodontite (OFFENBACHER *et al.*, 1986) e os resultados desse estudo mostrarem que o SR reduz perda óssea na periodontite experimental e ainda, reduziu edema de pata no período em que o edema é mediado por prostaglandinas. Sabe-se que as PGs são expressas em diversos tecidos e podem desempenhar funções fisiológicas como proteção da mucosa gástrica, controle do fluxo sanguíneo renal e hemostasia, e no tecido ósseo, especialmente a PGE₂, promove aumento da formação óssea em resposta ao estímulo mecânico em animais e humanos (CARVALHO, 2007).

O que pode explicar esses dados um tanto contraditórios, quando considerados os resultados obtidos neste trabalho e os achados relacionados com estudos *in vitro*, que evidenciam o papel do SR no aumento da osteogênese pela ativação de PGE₂ via COX-2, é que deve existir um limite aceitável desses níveis para regulação fisiológica do metabolismo osso, assim, uma super ativação ou produção de PGE₂ estará envolvida em processos patológicos de reabsorção, como ocorre nas doenças inflamatórias associada à perda óssea, como na periodontite, e

sob essas condições o SR talvez tenha uma ação de resposta contrária frente aos níveis exacerbados de PGE₂.

Em suma, os dados apresentados nesse estudo sugerem que o Ranelato de estrôncio além de seu mecanismo antirreabsortivo via receptor sensor de cálcio e aumento dos níveis de OPG, sugere-se também que o SR possa interferir na inibição da síntese ou liberação de mediadores inflamatórios, não apenas porque demonstramos diminuição da perda óssea alveolar em modelo de periodontite, mas também porque demonstramos seu provável efeito anti-inflamatório em modelos clássicos de resposta inflamatória. Entretanto, estudos pormenorizados são necessários para entendermos o nível de interferência do Ranelato de estrôncio nos tecidos, através de novos ensaios, bem como utilização de outra substância indutora de inflamação. Logo, parece interessante investir em pesquisas para tentar elucidar mecanismos biológicos do SR quanto sua ação em mediadores inflamatórios.

CONCLUSÃO

O SR exibiu efeito antirreabsortivo demonstrado pelas análises morfológica e histológica do osso alveolar, e pelo aumento da atividade osteoblástica avaliada por meio de dosagem bioquímica de fosfatase alcalina óssea no modelo de periodontite.

O SR exibiu efeito anti-inflamatório dada a sua capacidade de reduzir a marcação da expressão de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , na periodontite experimental, além de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e o edema de pata induzidos por carragenina.

A utilização do SR durante 11 dias não causou alterações sistêmicas importantes, considerando a avaliação do leucograma, da variação de massa corpórea, ou das funções hepática e renal dos animais.

REFERÊNCIAS

- AHMET-CAMCIOGLU, N; OKMAN-KILIC, T; DURMUS-ALTUN, G; EKUKLU, G; KUCUK, M. Effects of strontium ranelate, raloxifene and misoprostol on bone mineral density in ovariectomized rats. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 147 (2), p. 192-4, 2009.
- ALBANDAR, JM; RAMS, TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. **Periodontol** 2000, v. 29, p. 7-10, 2002.
- ALBANDAR, JM. Epidemiology and Risk Factors of Periodontal Diseases. **Dent Clin N Am**, v. 49 (3), p.517–532, 2005.
- ALLAM, E; DRAZ, A; HASSAN, A; NEAMAT, A; GALAL, M; WINDSOR, LJ. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in ligature-induced periodontitis in osteoporotic and non-osteoporotic rats. **J Periodontal Res**, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2009.01210.x
- AMMANN, P; SHEN, V; ROBIN, B; MAURAS, Y; BONJOUR, JP; RIZZOLI, R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. **J Bone Miner Res**, v. 19, p.2012-20, 2004.
- AMMANN, P. Strontium Ranelate: A physiological approach for an improved bone quality. **Bone**, v. 38 (2 - Suppl 1), p. 15-8, Feb 2006.
- ASSUMA, R; OATES, T; COCHRAN, D; AMAR, S; GRAVES, DT. IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Inflammatory Response and Bone Loss in Experimental Periodontitis. **J Immunol**, V. 160, P. 403-409, 1998.
- ASTDR. Toxicological profile for strontium. U.S. **Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, 2004.
- BARON R; TSOUDEROS Y. In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. **Eur J Pharmacol**, v. 450 (1), p. 11-7. 2002.
- BONNELYE, E; CHABADEL, A; SALTEL, F; JURDIC, P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*. **Bone**, v. 42, p. 129-38, 2008.
- BOYLE, WJ; W. SIMONET, S; LACEY, DL. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**. v. 423, p. 337-42, 2003.
- BRENNAN, TC; RYBCHYN, MS; GREEN, W; ATWA, S; CONIGRAVE, AD; MASON, RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **Br J Pharmacol.**, v 157 (7), p.1291-300, 2009.

BUEHLER, J; CHAPPUIS, P; SAFFAR, JL; TSOUDEROS, Y; VIGNERY, A. Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). **Bone**, v. 29, p. 176–79, 2001.

BURTIS, CA; ASHWOOD, ER; BRUNS, DE. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. 4.ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006.

CANALIS, E; HOTT, M; DELOFFRE, P; TSOUDEROS, Y; MARIE, PJ. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. **Bone**, v. 18 (6), p. 517-23, 1996.

CARVALHO, TLL. Efeito dos anti-inflamatórios não-esteroidais convencionais e seletivos para COX-2 sobre o reparo ósseo. **Acta ortop. bras**, v.15(3), 2007.

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

CHANG, W; TU, C; CHEN, T; KOMUWES, L; ODA, Y; PRATT, S; MILLER, S; SHOBACK, D. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. **Endocrinology**, v. 40, p. 5883–93, 1999.

CHAPUY, MC; MEUNIER, PJ. Prevention and treatment of osteoporosis. **Aging (Milano)**, v.7, p.164–73, 1995.

CHATTOPADHYAY, N; QUINN, SJ; KIFOR, O; YE, C; BROWN, EM. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. **Biochemical pharmacology**, v.74, p.438–47, 2007.

CHEN, FM; JIN, Y. Periodontal Tissue Engineering and Regeneration: Current Approaches and Expanding Opportunities. **Tissue Eng Part B Rev**, 2010. DOI:10.1089/ten.teb.2009.0562.

CHOUDHARY, S; HALBOUT, P; ALANDER, C; RAISZ, LG; PILBEAM, CC. Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: Involvement of prostaglandins. **J Bone Miner Res**, v. 22 (7), p.1002–10, 2007.

COCHRAN, DL. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. **J Periodontol**, v. 79 (8 Suppl), p.1569-76, 2008.

CORTET, B. Strontium ranelate: new perspectives for the management of osteoporosis. **Rheumatology**, v.48 (Suppl 4), p.iv1–iv2, 2009.

CRUNKHON, P; MEACOCK, SCR. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenan. **British Journal of Pharmacology**, v.42 (3), p.392–402, 1971.

CUNHA, TM; VERRI JR, WA; SILVA, JS; POOLE, S; CUNHA, FQ; FERREIRA, SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.102 (5), p.1755–60, 2005.

DAHL, SG; ALLAIN, P; MARIE, PJ; MAURAS, Y; BOINVIN, G, AMANN, P; TSOUDEROS, Y; DELMAS, PD; CHRISTIANSEN, C. Incorporation and Distribution of Strontium in Bone. **Bone**. v.28 (4), p.446–53, 2001.

DELANNOY, P; BAZOT, D; MARIE, PJ. Long-Term Treatment With Strontium Ranelate Increases Vertebral Bone Mass Without Deleterious Effect in Mice. **Metabolism**. v.51 (7), p.906-11, 2002.

DELMAS, PD. Clinical effects of strontium ranelate in women with postmenopausal osteoporosis. **Osteoporos Int.**, v.16 (Suppl 1), p.S16–S19, 2005.

DIMAI, HP. Strontiumranelat – ein neues Konzept zur Behandlung der Osteoporose. **Wien Klin Wochenschr**, v.117 (21-22), p. 728-38, 2005.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v.104 (1), p.15-29, 1971.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J Pharm Pharmacol**, v. 24, p. 89-102, 1972.

ER, K; POLAT, ZA; ÖZAN, F; TASDEMIR, T; SESER, U; S, SISO. Cytotoxicity Analysis of Strontium Ranelate on Cultured Human Periodontal Ligament Fibroblasts: A Preliminary Report. **J Formos Med Assoc**, v. 107(8), p. 609-615, 2008.

European Medicines Agency Press Office (2007) EMEA recommends changes in the product information for Protelos/Osseor due to the risk of severe hypersensitivity reactions. EMEA/417458/2007.

European Medicines Agency (2009) EMEA Strontium ranelate. Summary of product characteristics. (site:www.emea.europa.eu/humandocs/.../protelos/emea-combined-h560pt.pdf.)

FONSECA, JE. Rebalancing bone turnover in favour of formation with strontium ranelate: implications for bone strength. **Rheumatology**, v.47 (Suppl 4), p. iv17–iv19, 2008.

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

GARDNER, DL. Production of arthritis in the rabbit by the local injection of the mucopolysaccharide caragheenin. **Ann Rheum Dis**, v. 19, p. 369-376, 1960.

GEMMELL, E; CARTER, CL; SEYMOUR, GJ. Chemokines in human periodontal disease tissues. **Clin Exp Immunol**, v. 125 (1), p.134–141, 2001.

GILLIGAN, JP; LOVATO, SJ; ERION, MD; JENG, AY. Modulation of carrageenan induced hind paw edema by substance P. **Infammation**, v. 18, p. 285–92, 1994.

- GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol**, v. 79(8 Suppl), p. 1585-1591, 2008.
- GROSSI, SG; ZAMBON, JJ., HO, AW; KOCH,G; DUNFORD, RG; MACHTEI, EE; NORDERYD,O. M. & GENCO, RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. **Journal of Periodontology**, v.65 (3), p. 260–7, 1994.
- HARA, CM; KLEIN, JÚNIOR, MH; MORAES, JRE de; MORAES, FR de; PAULILLO, AC. Cinética das alterações vasculares e celulares na peritonite induzida pela carragenina em *Gallus gallus*. Efeito de drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 31(3/4), p.173-180, 1994.
- HERMAN, S; KRÖNKE, G; SCHETT, G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. **Trends in Molecular Medicine**.p.245-53, 2008.
- HOTT, M; DELOFFRE, P; TSOUDEROS, Y; MARIE, PJ. S12911-2. Reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. **Bone**, v.33 (1), p.115–123, 2003.
- HURTEL-LEMAIRE, AS; MENTAVERRI, R; CAUDRILLIER, A; COURNARIE, F; WATTEL, A; KAMEL, S; TERWILLIGER, EF; BROWN, EM; BRAZIER, M. The Calcium-sensing Receptor Is Involved in Strontium Ranelate-induced Osteoclast Apoptosis. **The journal of biological chemistry**, v. 284, p.575–84, 2009.
- HWANG, SB; LAM, MH; LI, CL; SHEN, TY. Release of platelet activation factor and its involvement in the first phase of carrageenin-induced rat foot edema. **Eur J Pharmacol.**, v. 120, p. 33–41, 1986.
- JILKA, RL; WEINSTEIN, RS; BELLIDO, T; PARFITT, AM; MANOLAGAS, SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. **J Bone Miner Res**, v. 13, p. 793-802, 1998.
- JONVILLE-BERA, AP; CRICKX, B; AARON, L; HARTINGH, I; UTRET-LECA, E. Strontium ranelate-induced DRESS syndrome: first two case reports. **Allergy**, v. 64, p.658-659, 2009.
- KORNMAN, KS. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. **J Periodontol**, v. 79 (Suppl 8), p. 1560-8, 2008.
- KREDIET, RT; ZUYDERHOUDT, FMJ; BOESCHOTEN, EW; ARISZ, L. Alterations in the peritoneal transport of water and solutes during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Eur. J. Clin. Investig.** v.17, p.43–52, 1987.
- KUHR A, POPA-WAGNER A, SCHMOLL H, SCHWAHN C, KOCHER T. Observation on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v.39, p 101-106, 2004.

LEE, HY; LIE, D; LIM, KS; THIRUMOORTHY, T; PANG, SM. Strontium ranelate-induced toxic epidermal necrolysis in a patient with post-menopausal osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 20, p. 161–162, 2009.

LIMA, V. Efeito de moduladores da produção de citocinas (clorpromazina, pentoxifilina, talidomida e dexametasona) na doença periodontal experimental induzida por corpo estranho em ratos. 1999. L711e. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

LIMA, V; BEZERRA, MM; ALENCAR, VBM; VIDAL, FDP; ROCHA, FAC; BRITO, GAC; RIBEIRO, RA. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci**, v. 108 p. 123-129, 2000.

LIMA, V; VIDAL, FDP; ROCHA, FAC; BRITO, GAC; RIBEIRO, RA. Effects of TNF- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J Periodontol**, v. 75 (1), p. 156-162, 2004.

LIMA, V. Evidências da participação de TNF- α e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5- fluoracil e metatrexato em animais. 2004. L711e. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LIU, JM; KUNG, AW; PHENG, CS. Efficacy and safety of 2 g/day of strontium ranelate in Asian women with postmenopausal osteoporosis. **Bone**, v.45 (3), p.460-5, 2009.

LO, TN; ALMEIDA, AP; BEAVEN, MA. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 221 (1), p. 261-7, 1982.

MARIE, PJ. Strontium as therapy for osteoporosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5 (6), p. 633–6, 2005.

MARIE, PJ. Strontium ranelate: A novel mode of action optimizing bone formation and resorption. **Osteoporos Int**, v. 16 (Suppl 1), p. S7–S10, 2005.

MARIE, PJ. Strontium ranelate: New insights into its dual mode of action. **Bone**, v.40 (5 – Suppl 1), p. S5–S8, 2007.

MARIE, PJ; AMMANN, P; BOIVIN, G; REY, C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Calcif Tissue Int**, v. 69 (3), p. 121-9, 2001.

MARIE, PJ; HOTT, M; MODROWSKI, D; DE POLLAK, C; GUILLEMAIN, J; DELFFRE, P; TSOUDEROS, Y. An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. **J Bone Miner Res**, v.8 (5), p. 607–15, 1993.

MEUNIER, PJ; ROUX, C; ORTOLANI, S; DIAZ, CURIEL, M; COMPSTON, J; MARQUIS, P; CORMIER, C; ISAIA, G; BADURSKI, J; WARK, JD; COLLETTE, J; REGINSTE, JY. Effects of long-term strontium ranelate treatment on vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis. **Osteoporos Int**, v. 20 (10), p. 1663–73, 2009.

MEUNIER, PJ; ROUX, C; SEEMAN, E; ORTOLANI, S; BADURSKI, JE; SPECTOR, TD; CANNATA, J; BALOGH, A; LEMMEL, EM; PORS-NIELSEN, E; RIZZOLI, R; GENANT, HK; REGINSTE, JY. The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. **N Engl J Med**, v. 350 (5), p. 459-68, 2004.

MEUNIER, PJ; SLOSMAN, DO; DELMAS, PD; SEBERT, JL; BRANDI, ML; ALBANESE, C; LORENC, R; PORS-NIELSEN, S; DE VERNEJOU, MC; ROCES, A; REGINSTER, JY. Strontium Ranelate: Dose-Dependent Effects in Established Postmenopausal Vertebral Osteoporosis- A 2-Year Randomized Placebo Controlled Trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87 (5), p. 2060–6, 2002.

MODROWSKI, D; MIRAVET, L; FEUGA, M; MARIE, PJ. Increased proliferation of osteoblast precursor cells in estrogen-deficient rats. **Am J Physiol**, v. 264, p. E190–196, 1993.

MOSS, DW; WHITBY, LGA. Simplified heart-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin. Chim. Acta**, v. 61(1), p. 63-71, 1975.

MUNRO, JM. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. **Eur Heart J**, v. 14, p.72-77,1993.

MUSETTE, P; BRANDI, ML; CACOUB, P; KAUFMAN, JM; RIZZOLI, R; REGINSTER, JY. Treatment of osteoporosis: recognizing and managing cutaneous adverse reactions and drug-induced hypersensitivity. **Osteoporos Int**, 2009. DOI 10.1007/s00198-009-1097-5.

NAKASHIMA, T; KOBAYASHI, Y; YAMASAKI, S; EUGUCHI, K; SASAKI, H; SAKAI, H. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: Modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275 (3) p.768-775, 2000.

NEEDLEMAN, I; MCGRATH, C; FLOYD, P; BIDDLE, A. Impact of oral health on the life quality of periodontal patients. **J Clin Periodontol**, v. 31(6), p. 454-457, 2004.

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

NIELSEN, SP. The biological role of strontium. **Bone**, v. 35, p. 583-588, 2004.

O'DONNELL, S; CRANNEY, A; WELLS, GA; ADACHI, JD; REGINSTER, JY. Strontium ranelate for preventing and treating postmenopausal osteoporosis. **Cochrane Database Syst Rev**, 2006 Jul 19;3:CD005326.

OFFENBACHER, S; KATZ, V; FERTIK, G; COLLINS, J; BOYD, D; MAYNOR, G; MCKAIG, R; BECK, J. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **J Periodontol**, v. 67, p. 1103-1113, 1996.

OGHISO, Y; KUBOTA, Y; TAKAHASHI, S; SATO, H. Effect of 89 Sr-induced monocytopenia on splenic and pulmonary alveolar macrophage populations in a normal steady state. **J Radiat Res**, v. 29(3), p. 189-202, 1988.

PAGE, RC; KORNMAN, KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 9–11, Jun 1997.

PERNICOVA, I; MIDDLETON, ET; AYE, M. Rash, strontium ranelate and DRESS syndrome put into perspective. European Medicine Agency on the alert. **Osteoporos Int**, v. 19, p. 1811–12, 2008.

PIHLSTROM, PB; MICHALOWICZ, BS; JOHNSON, NW. Periodontal diseases. **Seminar**, v. 366, p. 1809-1820, 2005.

PI, M; QUARLES, LD. A novel cation-sensing mechanism in osteoblasts is a molecular target for strontium. **J Bone Miner Res**, v. 19 (5) , p. 862-869, May 2004.

PRESHAW, PM; SEYMOUR, RA; HEASMAN, PA. Current concepts in periodontal pathogenesis. **Dent Update**, v. 31 (10), p. 570-2, 574-8, Dec 2004.

QUARLES, LD. Cation sensing receptors in bone: A novel paradigm for regulating bone remodeling? **J Bone Miner Res**, v. 12, p. 1971–1974; 1997.

RANKIN, JA. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clin Issues**, v. 15 (1), p. 3-17, 2004.

REGINSTER, JY; SEEMAN, E; DE VERNEJOUL, MC; ADAMI, S; COMPSTON, J; PHENEKOS, C; DEVOGELAER, JP; CURIEL, MD; SAWICKI, A; GOEMAERE, S;. SORENSEN, OH; FELSEBERG, D; MEUNIER, PJ. Strontium Ranelate Reduces the Risk of Nonvertebral Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, p. 2816–2822, 2005.

ROBBINS & COTRAN; FAUSTO, N; KUMAR, VINAY; ABBAS, A K. **Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. 7.ed. Sarvier; 2005.

ROSA-RAÑAL, M; DE LA CRUZ, DA; LORENA-RUBIO, Y; LARREA, F. New paradigms in the regulation of bone metabolism. **Rev Invest Clin**, v. 53 (4), p. 362-369, 2001.

ROUX, C; FECHTENBAUM, J; KOLTA, S; ISAIA, G; ANDIA, JBC, DEVOGELAER, JP. Strontium ranelate reduces the risk of vertebral fracture in

young postmenopausal women with severe osteoporosis. **Ann Rheum Dis**, v. 67, p. 1736–1738, 2008.

SARAIVA, GL; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46(1), p. 72-78, 2002.

SCHEIBER, LB II; TORREGROSA, L. Evaluation and treatment of postmenopausal osteoporosis. **Semin Arthritis Rheum**, v. 27, p. 245–261, 1998.

SERVICE, RF. Tissue engineers build new bone. **Science**, v. 289 (5484), p. 1498-1500, Sep 2000.

SHEIHAM, A; NETUVELI, GS. Periodontal diseases in Europe. **Periodontol 2000**, v. 29, p. 104–121, 2002.

SHOBACK, D; CHEN, T H; PRATT, S; LATTYAK, B. Thapsigargin stimulates intracellular calcium mobilization and inhibits parathyroid hormone release. **J Bone Miner Res**, v. 10, p. 743–750, 1995.

SHIVKAR, Y M; KUMAR, VL. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators Inflamm**, v. 12 (5), p. 299-302, 2003.

SKORYNA, SC. Effects of oral supplementation with stable strontium. **Can Med Assoc J**, v. 125, p. 703–712, 1981.

SOUZA, DM; ROSA, LP; RICARDO, LH; MORAES, LC; ROCHA, RF. Avaliação óssea alveolar de *Rattus norvegicus* por meio dos métodos Radiográfico e Morfométrico. **Cienc Odontol Bras**. v 8 (4), p. 77-84, 2005.

SOUZA, DM; RICARDO, LH; KANTOSKI, KZ; ROCHA, RF. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. **Braz Oral Res**, v. 23 (3), p. 326-32, Jul-Sep 2009.

SOUZA, GEP; FERREIRA, SH. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Action**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SPRINGER, TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76 (2), p.301-314, 1994.

TAKAHASHI, N; SASAKI, T; TSOUDEROS, Y; SUDA, TS. 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. **J Bone Miner Res**, v. 18, p. 1082–7, 2003

TAUBMAN, MA; KAWAI, T; HAN, X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. **J Clin Periodontol**, v. 34, p. 367-369, 2007.

TOKER, H; OZDEMIR, H; EREN, K; OZER, H; SAHIN, G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 80 (4), p. 672-8, Apr 2009.

TOURNIS, S. Improvement in bone strength parameters. The role of strontium ranelate. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 7 (3), p. 266-267, 2007.

TSUBOI, M; KAWAKAMI, A; NAKASHIMA, T; MATSUOKA, N; URAYAMA, S; KAWABE, Y; FUJIYAMA, K; KIRIYAMA, T; AOYAGI, T; MAEDA, K; EGUCHI, K. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. **J Lab Clin Med**, v. 134, p. 222-231, 1999.

UCHÔA, F de T, da SILVA TG, de LIMA MDO C, GALDINO SL, PITTA IDA R, DALLA COSTA T. Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate. **J Pharm Pharmacol**, v. 61(3), p. 339-345, 2009.

UCKUN, FM; TIBBLES, H; OZER, Z; QAZI, S; VASSILEV, A. Anti-inflammatory activity profile of JANEX-1 in preclinical animal models. **Bioorg Med Chem**, v. 16 (3), p. 1287-1298, 2008. Epub 2007 Oct 24. 2008

VALVERDE, P. Pharmacotherapies to manage bone loss-associated diseases: a quest for the perfect benefit-to-risk ratio. **Curr Med Chem.**, v. 15 (3), p. 284-304, 2008.

VANDERLINDE, FA; LANDIM, HF; COSTA, EA; GALDINO, PM; MACIEL, MAM; ANJOS, GC; MALVAR, DC; CÔRTEZ, WS; ROCHA, FF. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L. **Braz J Pharm Sci**, v. 45 (3), p. 437-442, 2009.

VINEGAR, R; TRUAX, JF; SELPH, JL. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Fed Proc.**, v. 35(13), p. 2447-56, 1976.

VINEGAR, R; TRUAX, JF; SELPH, JL; JOHNSTON, PR; VENABLE, AL; MCKENZIE, KK. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed Proc**, v. 46 (1), p. 118-126, 1987.

WAHL, SM; FELDMAN, GM; MCCARTHY, JB. Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. **J Leukoc Biol**, v. 59 (6), p. 789-796, 1996.

WEBER, C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. **J Mol Med**, v. 81 (1), p. 4-19, 2003.

WINTER, CA; RISLEY, EA; NUSS, GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 111, p. 544-547, 1962.

ZANIN, MT; FERREIRA, SH. Relationship between oedema and plasma exudation in rat paw carrageenin inflammation. **Agents Actions**, v. 8 (6), p. 606-609, 1978.

ZHU, L; ZAIDI, S; PENG, Y; ZHOU, H; MOONGA, BS; BLESIOUS, A; DUPLIN-ROGER, I; ZAIDI, M; SUN, L. Induction of a program gene expression during osteoblast differentiation with strontium ranelate. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 355 (2), p. 307–311, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)