



Projeto apresentado à UnG para solicitação de bolsa de Iniciação Científica

(PIBIC – Rodada I – 2018)

**Efeitos do ranelato de estrôncio na perda óssea induzida por ligadura
em ratas com deficiência de estrógeno**

Guarulhos

2018

Resumo

O objetivo do presente estudo será avaliar os efeitos do ranelato de estrôncio, medicamento com ações anti-reabsortivas e de formação óssea concomitante utilizado no tratamento de osteoporose, na perda óssea induzida por ligadura em ratas com deficiência de estrógeno. Quarenta e oito ratas Wistar (24 ratas por grupo/8 por tempo experimental) foram alocadas em um dos seguintes grupos: 1- ovariectomia e administração de solução salina por gavage; 2- ovariectomia e administração de 625 mg/kg/dia de ranelato de estrôncio por gavage. A administração do ranelato de estrôncio ou solução salina foi iniciada em 14 dias após os procedimentos de ovariectomia/ovariectomia simulada e se estendeu até o final do experimento. Vinte e um dias após a ovariectomia/ovariectomia simulada os animais foram submetidos à colocação de ligadura em um dos primeiros molares inferiores enquanto o primeiro molar contralateral foi deixado sem ligadura e funcionou como um controle para a perda óssea induzida pela ligadura. Os animais foram eutanasiados em 10, 20 e 30 dias após a colocação da ligadura. As mandíbulas foram removidas e processadas para obtenção de espécimes descalcificados contendo os primeiros molares inferiores que serão destinados à análises histométricas. Análises histométricas incluirão as medidas da perda óssea e densidade óssea na região de bifurcação. Na análise estatística, os resultados serão primeiramente submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Em seguida, os dados histométricos serão comparados por testes paramétrico (Análise de Variância) ou não-paramétrico (Kruskal-Wallis) e, em caso de diferenças, por seus respectivos testes *post hoc*. Comparações entre os dentes com e sem ligadura serão realizadas pelo teste t pareado ou Wilcoxon. Um nível de significância de 5% será adotado para todas as análises.

Palavras-chave: osteoporose, ranelato de estrôncio, histometria, periodontite.

1. Introdução e justificativa

Osteoporose é uma doença que resulta clinicamente na fragilidade óssea e aumento do risco de fraturas, devido a deficiência de massa óssea e alteração de sua microarquitetura. Os principais tipos de osteoporose incluem a osteoporose pós-menopausa, a osteoporose por desuso e a osteoporose induzida por glicocorticóides (Rachner et al. 2011). Na osteoporose pós-menopausa, os efeitos sinérgicos da carência de estrógeno e do aumento da produção do hormônio folículo-estimulante estimulam a reabsorção óssea, favorecendo a súbita perda de massa óssea, essencial para o início e progressão da osteoporose. Em geral, evidências científicas demonstram que o estrógeno é capaz de inibir a reabsorção óssea por meio de ações diretas sobre os osteoclastos, mas também indiretamente pela modulação dos osteoblastos, osteócitos e regulação das células T auxiliares envolvidas na formação e atividade dos osteoclastos (Faenza et al. 2013). Os efeitos diretos do estrógeno sobre os osteoclastos incluem a indução da apoptose e inibição da formação dessas células. Especificamente, este hormônio inibe a osteoclastogênese diminuindo a capacidade de resposta das células precursoras de osteoclastos ao ligante do receptor de ativação nuclear κ B (RANKL), uma citocina reconhecida por desempenhar importante papel no desenvolvimento dos osteoclastos (Srivastava et al. 2001). Além disso, o estrógeno inibe a diferenciação osteoclástica estimulada por RANKL em monócitos humanos, induzindo o receptor de estrógeno- α (ER- α) a se ligar à proteína BCAR1. O complexo BCAR1/ER- α , por sua vez, sequestra o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), conduzindo à diminuição da ativação do fator de transcrição NF- κ B e comprometendo a osteoclastogênese induzida por RANKL (Robinson et al. 2009). Especialmente em roedores, a ovariectomia é considerada o modelo pré-clínico mais comum para a compreensão da patofisiologia de eventos associados à menopausa e à osteoporose pós-menopáusia. A ovariectomia consiste no processo em que os ovários são excisados cirurgicamente, resultando em um estado de privação de estrógeno que aumenta a remodelação óssea e provoca perda de massa óssea (Komori 2015).

Periodontite é uma doença causada pelo biofilme dental, formado por bactérias específicas, que desencadeiam um processo imunoinflamatório destrutivo irreversível nos tecidos periodontais (Socransky & Haffajee 2005). Embora o biofilme tenha seu papel bem estabelecido como fator etiológico determinante da periodontite, evidências científicas indicam que características ambientais e sistêmicas, designadas como

indicadores (ex.: osteoporose, estresse, obesidade) ou fatores de risco (ex.: diabetes melito e tabagismo) podem interferir negativamente no curso dessas doenças, levando geralmente à exacerbação da perda dos tecidos de proteção e sustentação dos dentes (Heitz-Mayfield 2005). Logo, a perda óssea é uma característica comum de ambas doenças, periodontite e osteoporose. Estudos clínicos realizados em diferentes populações têm sugerido associação positiva entre os parâmetros clínicos utilizados para diagnóstico das doenças periodontais (como, por exemplo, profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, perda óssea alveolar, número de dentes perdidos por periodontite) e os parâmetros utilizados para diagnóstico de osteoporose (como, por exemplo, densidade óssea mineral). De maneira geral, esses estudos indicaram que mulheres com osteoporose, osteopenia ou densidade óssea mineral reduzida apresentaram maior risco de periodontite quando comparadas às mulheres saudáveis (Tezal et al. 2000, Mohammad et al. 2003, Yoshihara et al. 2004, Al Habashneh et al. 2010, Pepelassi et al. 2012, Passos et al. 2013, Iwasaki et al. 2013, Singh et al. 2014, Chang et al. 2014, Kim et al. 2014, Lin et al. 2015, Lohana et al. 2015, Lee et al. 2015, Juluri et al. 2015, Huang et al. 2016, Richa et al. 2016). Corroborando esses estudos clínicos, diversos estudos em ratas utilizando os modelos de ovariectomia e periodontite induzida por ligadura demonstraram que a perda óssea alveolar, o número de células marcadas por fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; um marcador de osteoclastos), a expressão de RANKL e osteoprotegerina (OPG) apresentaram-se exacerbados nos animais com deficiência de estrógeno, quando comparados aos animais estrógeno-suficientes (Duarte et al. 2004, Amadei et al. 2011, Bezerra et al. 2013, Luo et al. 2014, Xu et al. 2015, Dai et al. 2016).

Baseado na alta prevalência e incidência de osteoporose, especialmente em mulheres na pós-menopausa, e nas consequências deletérias dessa doença para o tecido ósseo, existe uma busca continua por medicamentos capazes de tratar a osteopenia e a osteoporose de forma efetiva, com mínimas contra-indicações, máxima tolerabilidade e melhor risco/benefício. Dentre os diversos medicamentos propostos para essa finalidade terapêutica disponíveis no mercado e testados em pesquisas científicas, está o ranelato de estrôncio. Ranelato de estrôncio é uma droga composta por uma porção orgânica (ácido ranélico) e de dois átomos de estrôncio não-radioativos estáveis, que se tornou uma excelente alternativa para tratamento de osteoporose após evidências de casos de osteonecrose na mandíbula e fraturas atípicas do fêmur pelo uso prolongado de bisfosfonatos (Reginster et al. 2003, Querido et al. 2016). Além disso, o interesse pelo

anelato de estrôncio no tratamento da osteoporose aumentou nos últimos anos pois foi demonstrado que o mesmo, quando comparado as demais drogas, apresenta uma ação bastante peculiar que consiste na estimulação da formação óssea pelos osteoblastos simultaneamente à inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos, ou seja, possui propriedades anti-reabsorção e anabólica concomitantemente. Além de afetar o funcionamento das células ósseas, o anelato de estrôncio apresenta ainda efeito direto na mineralização óssea, devido a semelhança química entre o estrôncio e o cálcio (Querido et al. 2016). A capacidade do anelato de estrôncio em estimular a multiplicação de células osteoprogenitoras e a formação de colágeno bem como a síntese de proteínas não-colágenas por osteoblastos são evidências que caracterizam esse medicamento como um agente de formação óssea. Além disso, estudos em culturas de células demonstraram que a incubação de osteoclastos com anelato de estrôncio induziu uma inibição dose-dependente da atividade de reabsorção óssea, propriedade compatível com um agente antirreabsortivo (Reginster et al. 2003).

Recentemente, um único estudo desenvolvido por Karakan et al. (2016) testou os efeitos de diferentes doses de anelato de estrôncio na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos estrógeno-suficientes. De acordo com os autores, esse medicamento, principalmente em doses mais elevadas de 625mg/kg/dia e 900mg/kg/dia, foi capaz de aumentar o número de osteoblastos, reduzir o número de osteoclastos e a atividade de RANKL bem como diminuir a perda óssea alveolar. Entretanto, os mecanismos moleculares de ação local do anelato de estrôncio no processo de perda óssea alveolar da periodontite foi pouco explorado neste estudo. Além disso, não existem dados na literatura sobre os possíveis benefícios desse fármaco na perda óssea alveolar em um quadro de depleção de estrógeno ou osteoporose. Logo, dada a escassez de dados na literatura sobre esse assunto, o presente estudo se justifica pela relevância em aprofundar os conhecimentos sobre o impacto do anelato de estrôncio na periodontite induzida em condições de deficiência de estrógeno.

2. Proposição

O objetivo do presente estudo será avaliar os efeitos do ranelato de estrôncio na perda óssea induzida por ligadura em ratas com deficiência de estrógeno, por meio de análises histométricas.

Obs.: Este estudo de iniciação científica é parte de um projeto prévio de uma aluna de mestrado.

3. Material e métodos

3.1 Princípios éticos

Com o objetivo de guiar a utilização prudente de animais na experimentação, o presente projeto foi desenhado respeitando as diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) e os princípios 3Rs. As diretrizes ARRIVE foram delineadas para melhorar as pesquisas usando animais, maximizando as informações publicadas e minimizando estudos desnecessários. Os princípios 3Rs, por sua vez, sintetizam em três palavras o Princípio Humanitário da Experimentação Animal: *replacement*, *reduction* e *refinement*. Assim, respeitando o Princípio da Redução (*Reduction*), o número de animais que foi utilizado neste projeto foi o menor possível, mas de maneira a alcançar um poder estatístico adequado. Para isso, conforme descrito abaixo, foi realizado um cálculo amostral prévio para determinar o número mínimo de animais a serem incluídos em cada grupo. Além disso, respeitando o Princípio de Aprimoramento (*Refinement*) que se preocupa em conduzir pesquisas sem causar dor e sofrimento aos animais, as ratas foram submetidas à procedimentos menos invasivos possíveis, e foram manejadas por uma pessoa treinada (orientador responsável) e receberam monitoramento direto da dor pós-operatória por meio de analgésicos e avaliação do comportamento (ver item 3.8). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais de Experimentação da Universidade Guarulhos (CEUA-UNG).

3.2 Cálculo amostral

O tamanho ideal da amostra para assegurar potência adequada para esse estudo foi calculado considerando dados obtidos do estudo de Karakan et al. (2016) que utilizou o modelo de periodontite induzida por ligadura e o tratamento com ranelato de estrôncio. Baseado neste estudo, o cálculo amostral considerou uma diferença de 100µm de perda óssea alveolar nos dentes com ligadura de animais controle (sem tratamento) e animais submetidos ao tratamento com 625mg/Kg/dia de ranelato de estrôncio, e um desvio padrão de 50 µm. Com base neste cálculo, foi observado que 6 ratas por grupo por tempo experimental seriam necessárias para proporcionar uma potência de 95%, com um α de 0,05. No entanto, considerando a possibilidade de perda de animais durante o experimento, 8 ratas foram incluídas em cada grupo em cada tempo experimental.

3.3 Seleção dos animais

Foram utilizadas 48 ratas Wistar com idade de 75 dias e peso aproximado de 250g que foram adquiridas no Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP). Antes do início do experimento, os animais foram aclimatizados ao ambiente do biotério da Universidade Guarulhos (UNG) por um período de 5 dias. Todos os animais foram mantidos durante o período experimental em gaiolas plásticas individuais sob as mesmas condições ambientais e receberam água e ração *ad libitum*. Todos os grupos permaneceram em períodos alternados de luz e escuridão (12/12 horas).

3.4 Grupos experimentais e delineamento do estudo

No início do estudo, os animais foram alocados aleatoriamente em um dos seguintes grupos experimentais:

OVX (n=24 por grupo/8 por tempo experimental): Animais que receberam OVX e solução salina.

OVX e tratamento com ranelato de estrôncio (n=24 por grupo/8 por tempo experimental): Animais que receberam OVX e 625mg/Kg/dia de ranelato de estrôncio.

O período experimental compreendeu 51 dias. No dia 0, foi realizada a OVX. Em 14 dias após OVX foi iniciado o tratamento com ranelato de estrôncio ou solução salina, que se estendeu até o final do experimento. No 21º dia após OVX, um dos primeiros molares inferiores receberam a ligadura. Em 10, 20 e 30 dias após a colocação da ligadura, os animais foram eutanasiados.

3.5 Ovariectomia

Os animais foram pesados e receberam, via intraperitoneal, 75mg/Kg de cloridrato de quetamina (Francotar®; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil) e 10mg/kg de cloridrato de xilazina (Virbaxil®; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil). Após completa sedação, as ratas foram submetidas à excisão cirúrgica bilateral dos ovários que foi realizada por meio de um acesso dorsal conservador. Para isso, foi feita uma incisão dorsal de aproximadamente 8mm nos tecidos epitelial e muscular. Em seguida, os ovários foram exteriorizados, removidos e o tecido remanescente foi atado com fio reabsorvível 4-0 (Vicryl, Ethicon®, Johnsons do Brasil SA, São José dos Campos, SP, Brasil), em seguida o tecido muscular e o tecido epitelial também foram suturados com fio

reabsorvível 4-0. O sucesso da ovariectomia foi confirmado no final do experimento por meio da verificação da atrofia dos cornos uterinos.

3.6 Administração dos medicamentos

Os animais do grupo tratado com ranelato de estrôncio receberam 625mg/Kg/dia do medicamento, diluído em solução salina, por meio de gavagem. Essa dose foi escolhida baseado em dois estudos prévios em ratos (Maïmoun et al. 2010, Karakan et al. 2016) que demonstraram que a mesma é capaz de afetar positivamente a formação de tecido ósseo. Além disso, essa dose condiz com uma concentração de estrôncio no sangue próxima a exposição humana à uma dose terapêutica de 2g/dia (Maïmoun et al. 2010).

A administração do fármaco e da solução salina no grupo controle foi iniciada no 14º após a OVX e se estendeu até o final do experimento. Logo, os animais foram tratados com o ranelato de estrôncio/solução salina por 37 dias.

3.7 Colocação da ligadura

Em 21 dias após OVX, os animais foram submetidos à colocação da ligadura em um dos primeiros molares inferiores. O período de 21 dias pós-OVX foi escolhido pois, de acordo com Wronski et al. 1987, esse período é suficiente para que a depleção dos níveis de estrógeno em ratas induza um quadro de osteoporose.

Os animais receberam uma ligadura em um dos primeiros molares inferiores para induzir o acúmulo do biofilme, sendo este um modelo de indução de periodontite experimental. Um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ligadura é capaz de abrigar várias espécies bacterianas periodontais (Duarte et al. 2010). O molar que recebeu a ligadura foi escolhido de maneira aleatória por meio de um sorteio no momento da colocação das mesmas. Um fio de algodão foi adaptado na região cervical do primeiro molar selecionado e foi atado um nó na região mesial. Esse fio foi mantido até a eutanásia dos animais. O primeiro molar contralateral não recebeu a ligadura e servirá como controle para demonstrar a capacidade da ligadura em induzir a perda óssea alveolar.

3.8 Procedimentos pós-operatórios

Os animais foram medicados imediatamente após a OVX. Os mesmos receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular (Pentabiotico pequeno porte,

Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda., São Paulo, SP, Brasil; 1ml/kg) e como analgésico 10 mg/kg cloridrato de tramadol, de 12 em 12 horas por 72 horas. Nenhuma restrição de movimentação foi imposta aos animais após a cirurgia, os quais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o período experimental. Os animais foram monitorados em 2hs, 12hs, 24hs, 48hs e 72hs pós-cirurgia por meio de avaliação clínica da presença de dor e angústia em relação aos seguintes aspectos: vocalização, lambar a ferida cirúrgica, falta de asseio, piloereção, ausência de comportamento exploratório, perda de peso e desidratação, postura arqueada, movimentos tensos, passos lentos, contorção e contração corpórea, inapetência, letargia, movimentos de queda ou cambaleante, inchaço e secreção na região cirúrgica (Feijó et al. 2010, Zegre Cannon et al. 2011). Quando algum desses sinais/sintomas foram observados, o tratamento analgésico foi estendido por mais 24 ou 48 horas. Não foi necessária medicação após a colocação da ligadura.

3.9 Eutanásia

Após 10, 20 e 30 dias da colocação da ligadura, 8 animais por grupo por tempo experimental foram eutanasiados por meio da administração de uma dose excessiva de anestésico. Para isso, foi utilizada uma associação de pentobarbital sódico (dose: 100 mg/kg) e lidocaína (dose: 10mg/mL) pela via intraperitoneal. As mandíbulas foram removidas e fixadas em formol neutro tamponado 10% por 48 horas.

3.10 Avaliações histométricas.

Preparo histológico

Os blocos contendo os primeiros molares inferiores com e sem ligadura e os tecidos circundantes serão destinados ao preparo histológico descalcificado para posteriores avaliações histométricas.

Após a fixação em solução de formol neutro tamponado 10% por 48 horas e posterior lavagem em água destilada por 24 horas a 4°C, esses espécimes serão descalcificados em uma solução de EDTA a 4,13% em tampão tris-HCl pH 7,4 a 4°C por um período de aproximadamente 60 dias. Em seguida, esses espécimes serão desidratados em uma série crescente de solução de álcool etílico (60 - 100%), sob constante agitação. As peças serão então diafanizadas em xilol, infiltradas com parafina e incluídas em blocos de parafina. Desses blocos, serão realizadas secções seriadas até que a raiz vestibular desapareça e a região inter-radicular seja nitidamente exibida. Uma

vez que a região de bifurcação esteja totalmente visível serão obtidos 6 cortes histológicos de cerca de 5 µm de espessura, que serão corados por hematoxilina e eosina (HE) para as análises histométricas.

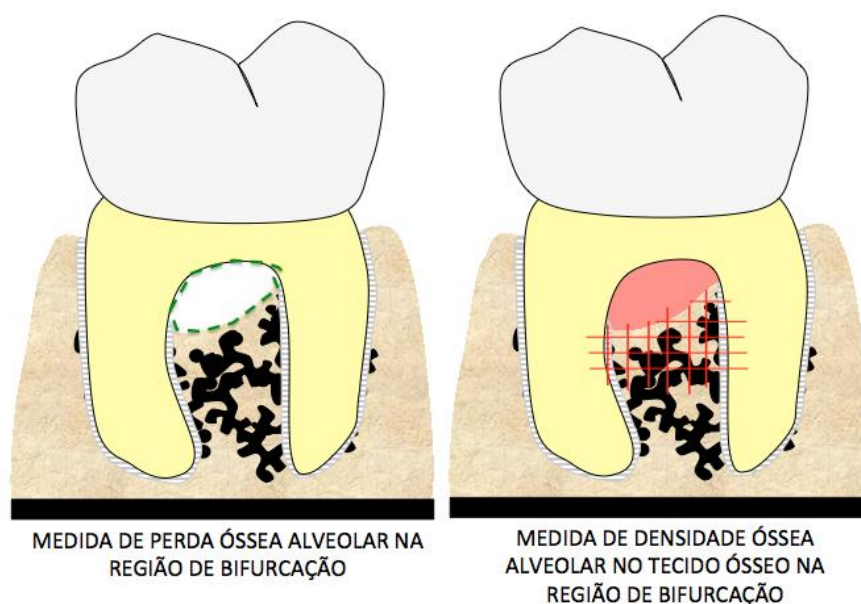
Calibração do examinador

Durante todas as avaliações histométricas, o examinador não saberá a qual grupo a imagem pertence (cegamento). O examinador será submetido à exercícios de calibração para todas as medições antes da avaliação das imagens pertencentes a esse estudo. A calibração intra-examinador será obtida após o mesmo examinar duas vezes 10 secções histológicas de imagens não pertencentes a esse estudo, em um intervalo de 48 horas entre as medições. O examinador será considerado calibrado se atingir uma reprodutibilidade para cada medição superior a 90%, após aplicação do teste de correlação intra-classe.

Avaliações histométrica

As 6 secções histológicas coradas por hematoxilina e eosina (HE) por animal serão digitalizadas por meio de um programa de computador (NIS Elements - Nikon Instruments Inc). A área de perda óssea inter-radicular (mm²) na região de bifurcação dos primeiros molares serão obtidas por meio de uma ferramenta deste programa, apta à realizar medições de área. Para a medida de densidade óssea, um retículo quadriculado disponibilizado por esse programa será primeiramente sobreposto sobre a imagem. Em seguida, será realizada a contagem das intersecções totais desse retículo e a contagem das intersecções coincidentes com tecido ósseo. Finalmente, a densidade óssea será calculada pela razão entre o número de intersecções coincidentes com osso e o número de intersecções totais presentes no retículo (Figura 1).

Figura 1



3.9 Análise Estatística

Será calculada uma média para cada animal dos valores obtidos das análises histométricas. Em seguida, os dados serão arranjados nos diferentes grupos e submetidos à um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para escolha de métodos estatísticos paramétricos ou não-paramétricos. Os diferentes grupos e tempos experimentais serão comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ou Análise de Variância e, seus respectivos testes *pos-hoc* serão aplicados em caso de diferenças. Comparações entre os dentes com e sem ligadura serão realizadas pelo teste-t pareado ou Wilcoxon. Para todas as análises será adotado um nível de significância de 5%.

Cronograma das atividades

Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Preparo histológico	*	*	*	*	*	*						
Digitalização das imagens					*	*	*					
Histometria						*	*	*	*	*		
Análises estatísticas										*	*	
Preparo do material para publicação											*	*
Relatório Final												*

RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se com esse projeto verificar se a administração de ranelato de estrôncio é capaz de diminuir ou impedir a perda óssea induzida por ligadura em ratas com deficiência de estrógeno.

Referências Bibliográficas

- Al Habashneh R, Alchalabi H, Khader YS, Hazza'a AM, Odat Z, Johnson GK. Association between periodontal disease and osteoporosis in postmenopausal women in Jordan. *J Periodontol*. 2010 Nov;81(11):1613-21.
- Amadei SU, Souza DM, Brandão AA, Rocha RF. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. *Braz Oral Res*. 2011 Nov-Dec;25(6):538-43.
- Bezerra JP, de Siqueira A, Pires AG, Marques MR, Duarte PM, Bastos MF. Effects of estrogen deficiency and/or caffeine intake on alveolar bone loss, density, and healing: a study in rats. *J Periodontol*. 2013 Jun;84(6):839-49.
- Chang WP, Chang WC, Wu MS, Pai JT, Guo YC, Chen KC, Liu ME, Chiu WT, Hung KS. Population-based 5-year follow-up study in Taiwan of osteoporosis and risk of periodontitis. *J Periodontol*. 2014 Mar;85(3):e24-30.
- Dai J, Ma Y, Shi M, Cao Z, Zhang Y, Miron RJ. Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2016 Apr;20(3):581-8.
- Duarte PM, Tezolin KR, Figueiredo LC, Feres M, Bastos MF. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol*. 2010 Feb;55(2):142-7.
- Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Humberto Nociti F Jr. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004 Apr;39(2):107-10.
- Faienza MF, Ventura A, Marzano F, Cavallo L. Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:575936.
- Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre – EDPUCRS, pg 198.
- Heitz-Mayfield LJ. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:196-209.
- Huang YF, Chang CT, Liu SP, Muo CH, Tsai CH, Hong HH, Shen YF, Wu CZ. The Impact of Oral Hygiene Maintenance on the Association Between Periodontitis and Osteoporosis: A Nationwide Population-Based Cross Sectional Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Feb;95(6):e2348.
- Iwasaki M, Taylor GW, Nakamura K, Yoshihara A, Miyazaki H. Association between low bone mineral density and clinical attachment loss in Japanese postmenopausal females. *J Periodontol*. 2013 Dec;84(12):1708-16.
- Juluri R, Prashanth E, Gopalakrishnan D, Kathariya R, Devanoorkar A, Viswanathan V, Romanos GE. Association of Postmenopausal Osteoporosis and Periodontal Disease: A

Double-Blind Case-Control Study. *J Int Oral Health*. 2015 Sep;7(9):119-23.

Karakan NC, Akpınar A, Göze F, Poyraz Ö. Investigating the Effects of Systemically Administred Strontium Ranelate on Alveolar Bone Loss Histomorphometrically and Histopathologically on Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol*. 2016 Sep 12:1-17.

Kim JW, Kong KA, Kim HY, Lee HS, Kim SJ, Lee SH, Sim KW, Kim MR, Lee JH. The association between bone mineral density and periodontitis in Korean adults (KNHANES 2008-2010). *Oral Dis*. 2014 Sep;20(6):609-15.

Komori T. Animal models for osteoporosis. *Eur J Pharmacol*. 2015 Jul 15;759:287-94.

Lee JH, Lee JS, Park JY, Choi JK, Kim DW, Kim YT, Choi SH. Association of Lifestyle-Related Comorbidities With Periodontitis: A Nationwide Cohort Study in Korea. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Sep;94(37):e1567.

Lin TH, Lung CC, Su HP, Huang JY, Ko PC, Jan SR, Sun YH, Nfor ON, Tu HP, Chang CS, Jian ZH, Chiang YC, Liaw YP. Association between periodontal disease and osteoporosis by gender: a nationwide population-based cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Feb;94(7):e553.

Lohana M, Suragimath G, Abbayya K, Varma S, Zope S, Kale V. A Study to Assess and Correlate Osteoporosis and Periodontitis in Selected Population of Maharashtra. *J Clin Diagn Res*. 2015 Jun;9(6):ZC46-50.

Luo K, Ma S, Guo J, Huang Y, Yan F, Xiao Y. Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:316134.

Maïmoun L, Brennan TC, Badoud I, Dubois-Ferriere V, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone*. 2010 May;46(5):1436-41.

Mohammad AR, Hooper DA, Vermilyea SG, Mariotti A, Preshaw PM. An investigation of the relationship between systemic bone density and clinical periodontal status in postmenopausal Asian-American women. *Int Dent J*. 2003 Jun;53(3):121-5.

Passos JS, Vianna MI, Gomes-Filho IS, Cruz SS, Barreto ML, Adan L, Rösing CK, Cerqueira EM, Trindade SC, Coelho JM. Osteoporosis/osteopenia as an independent factor associated with periodontitis in postmenopausal women: a case-control study. *Osteoporos Int*. 2013 Apr;24(4):1275-83.

Pepelassi E, Nicopoulou-Karayianni K, Archontopoulou AD, Mitsea A, Kavadella A, Tsiklakis K, Vrotsos I, Devlin H, Horner K. The relationship between osteoporosis and periodontitis in women aged 45-70 years. *Oral Dis*. 2012 May;18(4):353-9.

Querido W, Rossi AL, Farina M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron*. 2016 Jan;80:122-34.

Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011;377:1276–1287.

Reginster JY, Deroisy R, Jupsin I. Strontium ranelate: a new paradigm in the treatment

of osteoporosis. *Drugs Today (Barc)*. 2003 Feb;39(2):89-101.

Richa, R Y, Puranik MP, Shrivastava A. Association between osteoporosis and periodontal disease among postmenopausal Indian women. *J Investig Clin Dent*. 2016 Jun 24. doi: 10.1111/jicd.12223.

Robinson LJ, Yaroslavskiy BB, Griswold RD, Zadorozny EV, Guo L, Tourkova IL, Blair HC. Estrogen inhibits RANKL-stimulated osteoclastic differentiation of human monocytes through estrogen and RANKL-regulated interaction of estrogen receptor-alpha with BCAR1 and Traf6. *Exp Cell Res*. 2009 Apr 15;315(7):1287-301.

Singh A, Sharma RK, Siwach RC, Tewari S, Narula SC. Association of bone mineral density with periodontal status in postmenopausal women. *J Investig Clin Dent*. 2014 Nov;5(4):275-82.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 2005; 38: 135-187.

Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):8836-40.

Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol*. 2000 Sep;71(9):1492-8.

Wronski TJ, Schenck PA, Cintrón M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1987 Mar;40(3):155-9.

Xu XC, Chen H, Zhang X, Zhai ZJ, Liu XQ, Zheng XY, Zhang J, Qin A, Lu EY. Effects of oestrogen deficiency on the alveolar bone of rats with experimental periodontitis. *Mol Med Rep*. 2015 Sep;12(3):3494-502.

Yoshihara A, Seida Y, Hanada N, Miyazaki H. A longitudinal study of the relationship between periodontal disease and bone mineral density in community-dwelling older adults. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):680-4.

Zegre Cannon C, Kissling GE, Goulding DR, King-Herbert AP, Blankenship-Paris T. Analgesic effects of tramadol, carprofen or multimodal analgesia in rats undergoing ventral laparotomy. *Lab Anim (NY)*. 2011 Mar;40(3):85-93.