AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PROTEÇÃO DA OSTEONECROSE INDUZIDA POR BIFOSFONATOS. ESTUDO EM RATAS OVARIECTOMIZADAS.

Gabrielle Delfrate (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Gilson Cesar Nobre Franco (Orientador), e-mail: gilsoncnf@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de ciências biológicas e da saúde.

Ciências da saúde, Farmácia.

Palavras-chave: Antirreabsortivos, Osteoporose, Osteonecrose.

Resumo

Algumas terapias medicamentosas como a dos bifosfonatos (BF), usados comumente para osteoporose, podem interferir na remodelação óssea pós procedimentos endodonticos, gerando complicações como a osteonecrose. Portanto, novas drogas antirreabsortivas têm sido preconizadas frente ao tratamento de patologias benignas ósseas, é o caso do ranelato de estrôncio (RE). Esse fármaco atua na diminuição da reabsorção e no aumento da remodelação do osso. O presente estudo visa avaliar os efeitos desta droga sobre o tecido ósseo em ratas ovariectomizadas (ovx) tratadas, ou não, com BF. Para tanto, foram utilizadas ratas Wistar, divididas em 4 grupos: 1 - C (solução salina), 2 - RE (RE), 3 – ON (BF) , 4 - RE profilático (BF e RE). A osteonecrose foi induzida por aplicação de ácido zolendrônico e exodontia do primeiro molar inferior direito. Após a eutanásia, a hemimandibula direita foi analisada. Os valores encontrados passaram por análises estatísticas descritivas e analíticas, com nível de significância de α=0,05. O RE não mostrou efeito na proteção nem na indução de osteonecrose de mandíbula.

Introdução

Alguns fármacos para osteoporose, como os bifosfonatos (BFs), podem influenciar no processo de reparo ósseo, diminuindo a vascularização e a renovação celular local, esses fatores comprometem a homeostase óssea e levam a complicações como a osteonecrose (ON) (GLUECK, 2003). A ON dos maxilares associada aos BFs (OMAB) é uma entidade clínica caracterizada por uma região de osso exposto, na área maxilofacial, que persiste mais de oito semanas sem cicatrizar, em pacientes que fizeram ou fazem uso de BF (RUGGIERO et al., 2009). O ranelato de estrôncio (RE) é uma droga mais recente, utilizada na osteoporose pós-menopausa, este fármaco possui grande influência na remodelação óssea atuando simultaneamente na diminuição da reabsorção e no aumento da formação do osso. (OLIVEIRA et al., 2012). Na literatura há relatos de indução de ON por BF, mas não seu possível tratamento com RE, por isso o presente trabalho visa avaliar os efeitos desta droga sobre o tecido ósseo em ratas ovariectomizadas, tratadas com BF.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas ratas Wistar provenientes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), aprovadas pelo Comitê de Ética na experimentação animal

da UEPG com número do protocolo: 6908/2016. A indução da osteopenia através de ovariectomia foi baseada em Zarrow (1964). O método de escolha do modelo de osteonecrose em ratas foi descrito por Biasotto (2010).
Os animais foram divididos em 4 grupos: C (solução salina); RE (gavagem com ranelato de estrôncio); BF (aplicação IP de ácido zoledrônico) e REP (ácido zoledrônico e ranelato de estrôncio). A terapia farmacológica foi mantida por 8 semanas. O grupo C começou a gavagem de solução salina 30 dias após a ovariectomia (OVX), juntamente com o grupo RE, que iniciou o tratamento com 625mg/kg/dia com ranelato de estrôncio, o equivalente a 2g/dia em humanos (Reagan-shaw, Nihal e Ahmad (2007).
Os grupos BF e REP receberam 1 aplicação semanal IP 0,4 mg/kg, conforme metodologia de Keskinruzgar et al. (2016). Os medicamentos foram aplicados após o jejum de 2 horas antes da aplicação e o animal permaneceu desta maneira uma hora após a aplicação. Depois de 72 dias da OVX, o grupo REP também começou a receber gavagem diária com RE.
Sob efeito de anestesia geral, todos os animais foram submetidos à exodontia do primeiro molar inferior direito e na ferida cirúrgica alveolar foi realizado um defeito ósseo com broca de aço inoxidável sob contínua irrigação com solução salina (HOWIE, 2015).
Após a eutanásia, realizada por sobredose anestésica, a hemimandíbula direita foi dissecada e descalcificada em ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) 9%. Depois de 30 dias, o material foi desidratado, difanizado e impregnado com parafina usando sistema semi-fechado (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL). Foram realizados cortes sagitais em blocos de parafina e as lâminas foram corada com hematoxilina e eosina, três áreas de cada lâmina foram fotografadas em aumento de 200 x, utilizando microscópio binocular Olympus.
Foi utilizado o programa ImageJ para quantificar o número de vasos sanguíneos, osteócitos, lacunas vazias e osteoclastos, além da análise qualitativa da presença ou ausência de osteonecrose. Durante as análises histológicas, mais de oito lacunas vazias adjuntas sem osteócitos foram consideradas ON (PACHECO et al., 2015).

Foram realizadas estatísticas descritivas e analíticas com modelos paramétricos (ANOVA) e não paramétricos (Kruskal-Wallis) de acordo com a distribuição dos dados. O nível de significância adotado foi de 5% (α=0,05).

Resultados e Discussão

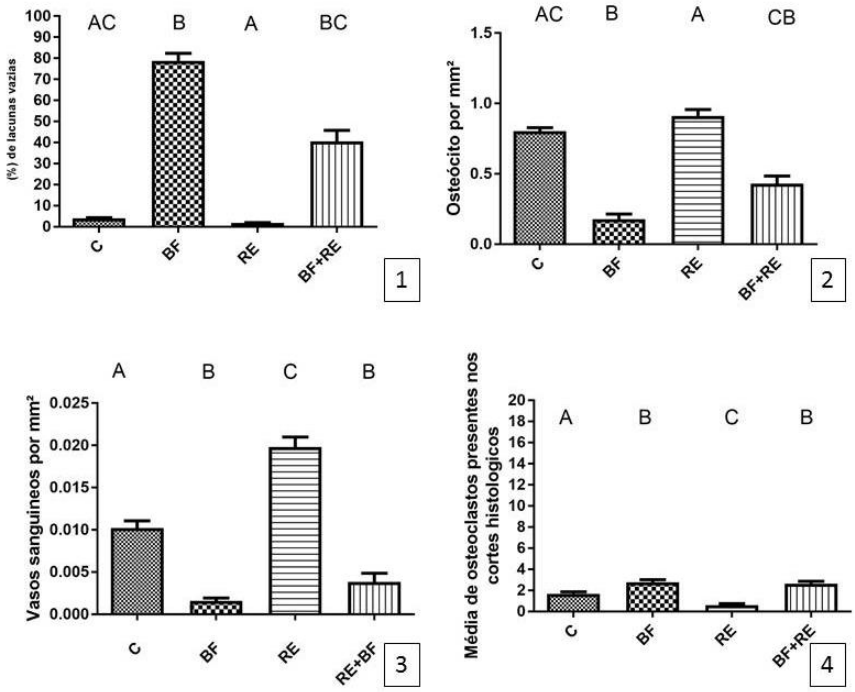


Figura 1 - 1. Avaliação da % de lacunas vazias presentes no osso alveolar, os grupos BF e REP apresentaram maior quantidade de lacunas vazias. 2. Razão entre o número de osteócitos e a área óssea total, o grupo RE apresentou a maior contagem de osteócitos. 3. Razão entre o número de vasos sanguíneos e a área óssea, aumento significativo de vasos sanguíneos no grupo RE. 4. Média do número de osteoclastos presentes nos cortes histológicos, aumento de osteoclastos nos grupos BF e REP.

Os resultados revelam que o RE não proporcionou diferença significativa na profilaxia da osteonecrose. Uma hipótese é que a forte incorporação dos BFs na matriz óssea impede que o RE exerça seu efeito no osso neoformado. Díaz, et al. (2016) demonstrou em seu estudo que a administração de bifosfonato (alendronato) seguida de ranelato de estrôncio produz o mesmo efeito no osso que a administração do BF sozinho.

Na contagem de osteócitos por mm², foi observado uma tendência ao aumento na quantidade de osteócitos no grupo RE. Bakker, Zandieh-Doulabi e Klein-Nulend (2013) afirma os benefícios do aumento do número de osteócitos, para reduzir fraturas, ou seja para a manutenção de uma microarquitetura forte e saudável. O grupo tratado com RE também apresentou um aumento significativo no número de vasos sanguíneos, o que corrobora com o estudo de Zhipeng, et al. (2014), que constatou que estrôncio com polifosfato de cálcio pode acelerar a expressão de fatores de crescimento angiogênico (como VEGF e bFGF) em cultura *in vitro* de células osteoblasticas e endoteliais, fator importante para a regulação da remodelação do osso e reparo de fraturas.

Além disso, o grupo RE apresentou uma diminuição na quantidade de osteoclastos, Takahashi et al (2003) afirmou que o RE é capaz de diminuir a diferenciação e atividade dos osteoclastos in vitro, como demonstrado pela redução na expressão de marcadores da função dos osteoclastos. Essas características histológicas podem explicar, em parte, porque o RE é um tratamento antirreabsortivo que não causa quadros de osteonecrose.

Conclusões

Diante dos resultados, conclui-se que o tratamento isolado com ranelato de estrôncio não induziu casos de osteonecrose em ratas osteopenicas, entretando, a droga não se demonstrou eficaz na prevenção dessa condição clínica quando administrado junto com o bifosfonato ácido zoledrônico.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Gilson Franco e ao meu co-orientador Leomar Mecca, por me ensinarem e confiarem em mim. Agradeço as minhas colegas de IC Jessica e Tayline por toda a ajuda. E agradeço a CAPES e CNPQ pelo apoio à pesquisa.

Referências

BAKKER, A. D.; ZANDIEH-DOULABI, B.; KLEIN-NULEND, J.. Strontium Ranelate affects signaling from mechanically-stimulated osteocytes towards osteoclasts and osteoblasts. **Bone,** [s.l.], v. 53, n. 1, p.112-119, mar. 2013.

BIASOTTO, M., et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Italy, v. 39, n. 5, p. 390–396, may. 2010.

DÍAZ, D. H. et al. Sequential administration of alendronate and strontium ranelate: histomorphometry and boné biomechanics in ovariectomized animals. **Acta Odontol. Latinoam,** Spain, v. 29, n. 2, p. 168-177, sep. 2016.

GLUECK, C.J.; FREIBERG, R.A.; WANG, P. Role of thrombosis in osteonecrosis. **CurrHematol Rep,** [s.l.], v. 2, n. 5, p. 22-417, sep. 2003.

HOWIE, R.N. et al. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. **PLOSone**, USA, v. 10, n. 7, p. 1-16, jul. 2015.

OLIVEIRA, J.P. et al. Strontium is incorporated in different level into bones and teeth of rats treated with strontium ranelate. **Calcified tissue international**, Brasil, v. 91, n. 3, p. 186-195, jul. 2012.

PACHECO, V. N. et al. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats–a blind randomized controlled trial. **International Journal of Experimental Pathology**, Brasil, v. 96, n. 4, p. 255-260, 2015.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The Faseb Journal**, USA, v. 22, n. 3, p. 659-661, out. 2007.

RUGGIERO, S.L. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws--2009 update. **J Oral Maxillofac Surg,** USA, v. 67, n. 5, p. 2-12, mai. 2009.

TAKAHASHI, N.; SASAKI, T.; TSOUDEROS, Y.; SUDA, T. S12911–2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. **J Bone Miner Res,** Japan, v. 18, n. 6, p. 1082–1087, jun. 2003

ZARROW, M.X.; YACHIM, J.M.; MCCARTHY, J.L.; SANBOM, R.D. Experimental Endocrinology: a sourcebook of basic techniques. **New York: Academic Press**, London, p. 39-40, 1964.

ZHIPENG, G., et al. Effects of strontium-doped calcium polyphosphate on angiogenic growth factors expression of co-culturing system in vitro and of host cell in vivo. **The Royal Society of Chemistry,** China, v. 4, n. 6, p. 2783-2792, 2014.