AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E RADIOGRÁFICA DOS EFEITOS DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PROTEÇÃO DA OSTEONECROSE INDUZIDA POR BIFOSFONATOS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

Tayline Mroczek Pereira Pinto (PIBIC), Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco (Orientador), e-mail: gilsoncnf@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Geral.

Odontologia e Clínica odontológica.

Palavras-chave:
Antirreabsortivos, Cirurgia Bucal, Metabolismo ósseo, Osteonecrose.

Resumo
Os bifosfonatos (BF) são usados em desordens ósseas e podem gerar complicações como a osteonecrose. Diante disso, surgem novo fármacos, como Ranelato de Estrôncio (RE) que diminui a reabsorção e aumenta a formação óssea. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do fármaco RE sobre o tecido ósseo em ratas ovariectomizadas tratadas ou não com BF. Utilizou-se ratas Wistar divididas em 4 grupos: C (solução salina), BF (ácido zoledrônico), RE (625mg/Kg/dia de RE) e BF+RE (associação de BF e RE). A osteonecrose foi induzida pelo ácido zolendrônico e a exodontia foi realizada nos primeiros molares inferiores. Após eutanasia, as seguintes análises foram feitas: radiográfica e macroscópica. Os resultados apontam que o grupo RE macroscopicamente obteve uma cicatrização gradual assim como o grupo C. Já o grupo BF apresentou áreas de fenestração óssea e deiscência. Quando comparado radiograficamente por densidade de pixel, os grupos experimentais obtiveram diferença estatística ($p<0,05$) com o C mas não entre si. Assim, pode-se concluir que o Ranelato não causa quadros de osteonecrose, mas também não se demonstrou eficaz como agente profilático.

Introdução

As drogas antirreabsortivas são aquelas que atuam diretamente na homeostase óssea, reduzindo ou suprindo sua reabsorção e consequentemente sua renovação, tendo como células alvo os osteoclastos. Estes fármacos são administrados em desordens ósseas como: osteoporose, metástases ósseas, entre outras (YAMASHITA; MCCAULEY, 2012). As principais drogas desta classe são os bifosfonatos (BFs) que atuam sobre os osteoclastos de diversas formas, mas principalmente, através da inibição do recrutamento, redução do tempo de vida, veto das atividades da célula na superfície óssea e contribui para a apoptose (BARON; FERRARI; RUSSELL, 2011). Apesar dos benefícios, os BFs apresentam como efeito adverso a osteonecrose dos maxilares (ONM) (BENLIDAYI; GUZEL, 2013).

A Sociedade Acadêmica Americana de Cirurgiões Oral e Maxilo-Facial apresenta como definição para ONM como uma exposição de osso necrótico na região maxilo-facial, por mais de oito semanas, em pacientes sob o uso de BFs sem a prévia de realização de radioterapia, pode estar associada ou não à dor, à infecção (SILVERMAN; LANDESBERG, 2009). Com a presença desse efeito adverso, novas drogas vêm surgindo no mercado, como Ranelato de Estrôncio (RE)

que atua simultaneamente na diminuição da reabsorção e no aumento da formação óssea (OLIVEIRA, 2012).

Diante das evidências, o RE pode ser um agente de potencial interesse clínico para doenças onde há reabsorção óssea. 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 ou não com BF.

Materiais e Métodos

Após a aprovação do comitê de ética na experimentação animal sob o número de protocolo 031/2016, utilizou-se ratas Wistar entre 250 a 260 gramas de 90 dias, provenientes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). A indução da osteopenia foi obtida através do protocolo da ovariectomia (OVX) sugerido por Zarrow et al. (1964). Então os animais foram aleatorizados em quatro grupos: Controle (solução salina), BF (ácido zoledrônico), RE (625mg/Kg/dia de RE) e BF+RE (-associação de BF e RE).

O grupo controle iniciou-se a administração de solução salina e o grupo RE a administração de 625mg/Kg/dia de RE pelo método de gavagem, por oito semanas. Também foram realizadas uma aplicação semanal intraperitoneal 0,4 mg / kg de ácido zoledrônico nos grupos BF e BF+RE. E setenta e dois dias depois, o grupo BF+RE iniciou-se a gavagem diária com RE, pressupondo um tratamento profilático, até o dia da eutanásia.

Depois da terapia farmacológica, sob efeito de anestesia geral, todos os animais foram submetidos à exodontia nos primeiros molares inferiores. A eutanásia foi realizada por sobredose anestésica de xilazina e quetamina e então as hemimandíbulas esquerdas foram dissecadas, removidos os tecidos moles e fixadas em formol a 10% durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em álcool absoluto para a realização da análise visual e radiográfica.

Nas analises macroscópicas, as hemimandíbulas foram fotografadas com o sistema USB Digital Microscope e realizada a análise do aspecto ósseo. E as análises radiográficas foram obtidas no “scanner” Digora onde visualizou áreas de sequestros ósseos, raízes residuais, remodelação óssea e cicatrização gradual no alvéolo pós exodontia (JABBOUR et al., 2014; SILVA et al., 2015). Para a análise das radiografias semi-quantitativas foi utilizado o programa ImageJ.

Foram realizadas estatísticas descritiva e analítica 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

A partir da avaliação macroscópica das hemimandíbulas, os grupos C e RE mantiveram suas corticais ósseas intactas, seguindo as etapas de cicatrização gradual. Enquanto o grupo BF apresentou 90% (n=9) de defeitos ósseos, decorrentes do atraso no processo cicatricial, sendo 70% (n=7) de fenestrações e 20% (n=2) de deiscência. O grupo BF+RE também apresentou defeitos ósseos sendo 40% (n=4) de fenestrações e 10% (n=1) deiscência. Através do teste exato de Fisher para dados qualitativos nominais verificou-se diferença estatística entre o grupo BF e os demais grupos para a variável fenestração ($p<0,05$).

O grupo BF apresentava sinais de osteonecrose com a presença de fenestrações, como resultado de possíveis trajetos fistulares, e deiscência, o que mostra que os métodos utilizados para a indução de necrose foram eficazes. Já os

grupos C e RE apresentaram um padrão de cicatrização gradual, sem defeitos ósseos presentes.

Na análise radiográfica qualitativa verificou que em todos os grupos houve fraturas de raízes, considerada uma das maiores dificuldades da técnica. No que diz respeito aos sequestros ósseos, o grupo BF apresentou 70% (n=7), enquanto o grupo BF+RE apresentou 50% (n=5), apenas o grupo BF apresentou diferença significativa quando comparado com os grupos C e RE. Quando se analisou a cicatrização gradual, os grupos C e RE apresentaram grande semelhança, já o grupo BF+RE se assemelha mais com o grupo BF. Porem, a diferença estatística encontrada entre os grupos C, RE e BF+RE não é tanto quanto comparado com o grupo BF.

As radiografias do grupo BF e BF+RE apresentaram quadros de sequestros ósseos, também considerados indícios de necrose do tecido ósseo (JABBOUR et al., 2014). Já os grupos C e RE apresentaram um padrão de cicatrização gradual, sem a presença de necrose nos grupos, como Bain et al (2009) através de seu experimento encontrou, sinais de prevenção na perda óssea e na deterioração da microarquitetura óssea. Em relação à reparação óssea, Brüel et al (2011) demonstrou que o RE estimula a formação do calo ósseo nos períodos iniciais na reparação, enquanto nesta pesquisa o grupo RE apesar da tendência ao aumento de osteócitos não obteve diferença significativa com o grupo controle.

As médias obtidas da região alveolar (área do alvéolo excluindo sequestros ósseos, e restos radiculares) após exodontia mostraram uma diferença de densidade, entre o grupo controle e os demais grupos. Os grupos RE, BF e BF+RE apresentaram um osso mais denso, ou seja, com maior radiopacidadade.

Ao se analisar a densidade por pixel excluindo os sequestros ósseos, os grupos RE, BF e BF+RE obtiveram semelhança, e diferença estatística com grupo C. Os três grupos apresentavam um processo de reparo mais radiopaco, com maior densidade, que no caso do grupo RE mostrou-se benéfico, assim como Li et al (2011) demonstrou que o tratamento com RE otimiza a osteointegração de implantes, pois esse tratamento proporcionou aumento da densidade óssea na região do implante e aumento na área de contato com implante. Já nos grupos BF e BF+RE sua densidade não foi considerada benéfica (SILVA et al., 2015; JANG; KIM; CHA, 2015), pois ambos apresentavam necrose óssea.

Conclusões

Diante dos resultados, concluímos que o tratamento isolado com ranelato de estrôncio não induziu casos de osteonecrose em ratas osteopênicas, entretando, a droga não se demonstrou eficaz na prevenção dessa condição clínica quando administrado junto com o bifosfonato. Mais estudos pré-clínicos devem ser realizados utilizando outros protocolos de utilização do ranelato de estrôncio, como alteração da dose e tempo de administração.

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo amor e incentivo. Ás minhas amigas de iniciação cientifica Jessica e Gabrielle. Ao meu co-orientador Leo pela sua dedicação e confiança nessa minha trajetória. Ao meu orientador Prof. Gilson, que me deu a oportunidade de ingressar na área de pesquisa. À CAPES e a CNPQ pelo apoio financeiro.

Referências

BAIN, S. D. et al. Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. **Osteoporosis International,** [s.l.], v. 20, n. 8, p.1417-1428, ago. 2009.

BARON, R.; FERRARI, S.; RUSSELL, R. G. G. Denosumab and bisphosphonates: Different mec+A1:A35hanisms of action and effects. **Bone**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.677-692, abr. 2011.

BENLIDAYI, L. C.; GUZEL, R. Oral Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw: A Challenging Adverse Effect. **Isrn Rheumatology,** [s.l.], v. 2013, n.16 p.1-6, mai. 2013.

BRÜEL, A. et al. Strontium Is Incorporated into the Fracture Callus but Does Not Influence the Mechanical Strength of Healing Rat Fractures. **Calcified Tissue International,** [s.l.], v. 88, n. 2, p.142-152, fev. 2011.

JABBOUR, Z et al. Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions. **Oral Oncology,** [s.l.], v. 50, n. 5, p.485-490, mai. 2014.

JANG, H.; KIM, J.; CHA, I.. Development of animal model for Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). **Maxillofacial Plastic And Reconstructive Surgery,** [s.l.], v. 37, n. 1, p.1-7, 25 jul. 2015.

LI, Y. et al. Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. **Clinical Oral Implants Research,** [s.l.], v. 23, n. 9, p.1038-1044, nov. 2011.

OLIVEIRA, J. P. et al. Strontium Is Incorporated in Different Levels into Bones and Teeth of Rats Treated with Strontium Ranelate. **Calcified Tissue International,** [s.l.], v. 91, n. 3, p.186-195, jul. 2012.

SILVA, P. G. B. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives Of Oral Biology,** [s.l.], v. 60, n. 9, p.1237-1245, set. 2015.

SILVERMAN, S. L.; LANDESBERG, R.. Osteonecrosis of the Jaw and the Role of Bisphosphonates: A Critical Review. The American **Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 122, n. 2, p.33-45, fev. 2009.

YAMASHITA, J.; MCCAULEY, L. K. Antiresorptives and Osteonecrosis of the Jaw. **Journal Of Evidence Based Dental Practice,** [s.l.], v. 12, n. 3, p.233-247, set. 2012.

ZARROW, M. X., et al. **Experimental Endocrinology: a sourcebook of basic techniques**. Academic Press, New York, 137 p. 1964.