



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernanda Castanheira Gonçalves

**Influência do estrôncio não radioativo na prevenção do processo de
osteonecrose induzida por bisfosfonato**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Fernanda Castanheira Gonçalves

**Influência do estrôncio não radioativo na prevenção do processo de
osteonecrose induzido por bifosfonato**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em nome do programa Odontologia na Área de Periodontia

Orientador: Prof^a Dr^a Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

Araraquara

2018

Gonçalves, Fernanda Castanheira

Influência do estrôncio não radioativo na prevenção do processo de osteonecrose induzido por bifosfonato / Fernanda Castanheira Gonçalves. – Araraquara: [s.n.], 2018

57 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

1. Osteonecrose 2. Difosfonatos 3. Estrôncio 4. Extração dentária I. Título

Fernanda Castanheira Gonçalves

**Influência do estrôncio não radioativo na prevenção do processo de
osteonecrose induzido por bisfosfonato**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Periodontia

Presidente e orientador Profa. Dra Rosemary Adriana Chierici Marcantonio

2º Examinador Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

3º Examinador Profa. Dra. Karina Gonzalez Silvério Ruiz

Araraquara, 19 março de 2018

DADOS CURRICULARES

Fernanda Castanheira Gonçalves

NASCIMENTO: 28/12/1992 – Barretos/ SP

FILIAÇÃO:

José Mauro Gonçalves
Márcia Gonçalves Castanheira

2011-2015 CURSO DE GRADUAÇÃO

Universidade Estadual Paulista: “Julio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr

2016- 2018 PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA– Nível Mestrado

Universidade Estadual Paulista: “Julio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr

Dedico este trabalho à Deus, que tornou possível a realização de cada etapa de minha jornada. Aos meus pais e avós, Márcia e José Mauro, Horácio e Tereza, exemplos de dedicação, esforço, humildade e amor. Pais estes que abrem mão de suas vontades pela minha prosperidade e realização de meus sonhos. Aos meus irmãos Neto, Thiago e Nicolay pelo companheirismo, confiança depositados, durante toda a trajetória desta etapa. Aos meus tios, tias, primos e amigos que de certa forma dividem momentos passados por mim, e acreditam na minha competência e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente...

À Profa. Dra. Rosemary Adriana C. Marcantonio, minha orientadora, exemplo de professora, sinônimo de dedicação, competência, transmissão de conhecimentos, além de ser uma pessoa amiga com um coração muito grande. Me acolheu em meus primeiros passos desde a graduação, confiando em meu potencial e permitindo que me tornasse pesquisadora, saciando minhas dúvidas, anseios e compartilhando comigo conhecimentos não só em âmbito científico mas também conhecimentos e experiências que levarei comigo a vida inteira.

Aos Profs. Drs. Guilherme Oliveira e Cássio Scarduelli, pela oportunidade que me deram e pela confiança em meu trabalho depositado. Ótimos amigos, companheiros. Tenho orgulho de tê-los próximos a mim, pessoas exemplares que sempre levarei comigo.

Aos meus amigos de Mestrado Camila Marcantonio, Felipe Pinotti, José Rodolfo Spin, Carol Marcantonio, Mauricio Tinajero, pelos bons momentos, ajuda nas horas difíceis, angustias, descontrações e maravilhosos momentos de convivência que através de conselhos, ideias, transmissão de experiências e conversas foram os alicerces essenciais nessa jornada.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara-(FOAr-UNESP), na pessoa de sua diretora Profa. Dra. Edson Campos e vice diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato pela estrutura oferecida e acolhimento.

À todos os professores da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, que de certa forma sempre me puderam ajudar por meio da amizade, conversas, e

ensinamentos passados durante a graduação podendo-me fazer crescer profissionalmente.

Aos professores que participaram da qualificação Profa. Dra. Morgana, pelas dicas, críticas e elogios e especialmente ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri pelas dicas e críticas na qualificação e também por todo o apoio, paciência, experiência e conhecimentos compartilhados para me ajudar em meu trabalho. Aos professores convidados da banca examinadora Profa. Dra. Karina Gonzalez, Prof. Dr. Nicolau Conte Neto, Prof. Dr. Rubens Spin Neto, Profa. Dra. Daniela Zardim, Profa. Dra. Silvana Orrico juntamente com os demais suplentes pela disponibilidade e solicitude. Especialmente ao Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio por toda atenção, apoio, conhecimento e experiências compartilhadas e por toda confiança depositada em mim e em meu trabalho, sua ajuda foi essencial para chegarmos até aqui.

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia e do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Luana, Iza, Suleima, pela paciência, ajuda e confiança depositados.

Especialmente, a Claudinha por todos os ensinamentos, paciência, dedicação, conselhos e experiências trocadas e horas agradáveis compartilhadas durante todos esses anos.

Aos funcionários do setor de Pós-graduação Cristiano e José Alexandre pela atenção dada aos momentos que precisei.

Aos funcionários, em geral, da Faculdade de Odontologia de Araraquara- (FOAr-UNESP).

Aos amigos especiais, aos colegas da faculdade, da pós-graduação e colegas fora do ambiente institucional.

À CNPq pela oportunidade e sustentabilidade dada durante todo o projeto.

Gonçalves FC. Influência do estrôncio não radioativo na prevenção do processo de osteonecrose induzida por bisfosfonato. [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito preventivo da administração do Ranelato de Estrôncio sobre o processo de osteonecrose induzida por bisfosfonatos. Serão utilizados 60 ratos, divididos randomicamente em 6 grupos de acordo com os diferentes protocolos de administração dos medicamentos: Grupo CTR – Foi administrado soro fisiológico por injeção subcutânea diariamente por 60 dias, em seguida foi realizada uma cirurgia para extração dos primeiros molares inferiores, e posteriormente foi continuada a aplicação diária de soro por mais 30 dias; Grupo ALN – Foi administrado alendronato de sódio (1 mg/kg/dia) por via subcutânea durante 60 dias antes da extração dos primeiros molares inferiores e a mesma foi continuada por 30 dias após o procedimento cirúrgico; Grupo ALN/S – O alendronato foi administrado por 60 dias e após esse período foi feita a extração. Posteriormente, os animais receberam soro fisiológico por 30 dias; Grupo ALN/Sr – Foi administrado alendronato durante 60 dias e posteriormente foi interrompida a sua administração por 30 dias previamente a extração. Em seguida a extração, foi administrado o ranelato de estrôncio por 30 dias (625 mg/kg/dia) por gavagem; Grupo ALN /S60 – O alendronato foi administrado durante 60 dias e tiveram sua administração interrompida por 30 dias até o momento da extração. Posteriormente a extração foi administrado soro por mais 30 dias após a cirurgia.; Grupo ALN/Sr 60 – Foi administrado alendronato por 60 dias, e após esse período a administração do alendronato foi interrompida e foi administrado o ranelato de estrôncio, por 30 dias. Após esse período os dentes foram extraídos e a aplicação do ranelato de estrôncio foi continuada por mais 30 dias. Foram realizadas análises microtomográfica para

avaliação do volume do tecido reparado nos sítios de extração, análises histológica/estereométrica para avaliação da vitalidade do tecido ósseo formado e a presença de tecido ósseo necrótico, bem como avaliações dos achados histológicos relacionados com a remodelação óssea na região. Os resultados obtidos mostraram uma melhora nos efeitos colaterais da osteonecrose por bisfosfonatos, onde mesmo na presença de tecido necrótico ocorreu a formação da matriz de tecido ósseo na porção basal dos alvéolos.

Assim podemos concluir que a utilização do ranelato de estrôncio não alterou o aparecimento inicial de osteonecrose por bisfosfonato, embora tenha ocorrido um aumento da matriz colágena no processo de reparação dos alvéolos.

Palavras-chave: Osteonecrose. Difosfonato. Estrôncio. Extração dentária.

Gonçalves FC. Influence of non-radioactive strontium on the prevention of the osteonecrosis induced by bisphosphonate.[Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The aim of this study will be to evaluate the preventive effect on the administration of the Strontium Ranelate over the process of osteonecrosis induced by bisphosphonate. Sixty rats will allocate in 6 groups according to the different protocols of the medications administration: CTR– It will be apply daily a saline solution by subcutaneous injection for 60 days, then, a surgery will be made to remove the inferior molars and posteriorly the daily application of saline solution will be continued for 30 more days; ALN - administration of sodium alendronate (1mg/kg/day) by subcutaneous injection for 60 days before de extraction of the first inferior molars. The injections of sodium alendronate will continue for 30 days after the surgical procedure; ALN/S – Alendronate will be applying for 60 days and then, the extraction will be made. After that, the animals will receive saline solution for 30 days by daily injection; ALN/S60 – Alendronate will be apply for 60 days and then, the administration will be interrupted for 30 days before the surgery. A saline solution will be apply for 30 days after the tooth extractions; ALN/Sr Group – Alendronate will be apply for 60 days and posteriorly the administration will be interrupted for 30 days, before the extraction. After this, Strontium Ranelate will be apply for 30 days (625mg/kg/day) by gavage; ALN/Sr 60 Group – Alendronate will be apply for 60 days, and after that, this administration will be interrupted and the strontium ranelate will be apply for 30 days. After that period, the teeth will be extract and the strontium ranelate application will be continued for more 30 days. Micro CT analysis will be perform to evaluates the repaired tissue volume in the extraction sites. The descriptive histology and histometry will me perform to evaluates bone tissue vitality,

the presence of necrotic bone tissue, and the histological findings related to bone remodeling in tooth post-extraction sockets sites.

Key words: Osteonecrosis. Diphosphonates. Strontium. Tooth extraction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Geral	15
2.2 Específica	15
2.3 Hipóteses	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Material	16
3.2 Método	23
4 MATERIAL E MÉTODO	28
4.1 Comitê de Ética	28
4.2 Distribuição dos Animais	28
4.3 Procedimento Cirúrgico	30
4.4 Avaliação Radiográfica Tridimensional (Micro-CT)	32
4.5 Processamento Histológico	34
4.6 Análise Histológica e Estereométrica.....	34
4.6.1 Análise histológica	34
4.6.2 Análise estereométrica	34
4.7 Análise dos Resultados	35
5 RESULTADO	36
5.1 Características Clínicas	36
5.2 Características Microtomográfica.....	36
5.3 Análise Histológica	39
5.4 Análise Estereométrica.....	41
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	50

REFERÊNCIAS51

ANEXO A57

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos são medicamentos que alteram o metabolismo ósseo e tem sido utilizado em pacientes com osteoporose para inibir o processo de perda de densidade mineral óssea^{1, 2, 3}. Eles são considerados reguladores endógenos da mineralização óssea, possuem uma estrutura química semelhante à molécula de pirofosfato inorgânico, porém, se diferenciam devido a presença de uma ligação de fósforo-carbono-fósforo (P-C-P), que os torna resistentes a degradação biológica por serem resistentes a hidrólise^{4, 5}. Os bisfosfonatos atuam inibindo as células osteoclásticas, estabilizando assim a perda óssea ocasionadas por doenças metabólicas⁶. Seu local de ação se dá na superfície óssea no processo de reabsorção, devido a sua afinidade pelo cálcio, reduzindo a atividade osteoclástica e/ou induzindo a apoptose de osteoclastos, resultando em aumento da densidade mineral⁷. Além de sua comprovada ação sobre osteoclastos, vários estudos têm demonstrado a ação indireta dos bisfosfonatos em osteoblastos, impedindo o *turnover* ósseo ou neoformação óssea^{8, 9, 10}. Esses medicamentos podem ser administrados por via endovenosa (p.e. zoledronato), onde são consideradas drogas de efeito mais potentes, indicadas para tratamentos de rápida destruição óssea uma vez que eles são mantidos no organismo em uma alta biodisponibilidade, e por via oral (p.e. alendronato), indicadas para uso contínuo em pacientes com osteoporose, apresentando baixa biodisponibilidade¹¹.

No entanto, os bisfosfonatos, além de sua ação sobre a formação óssea podem apresentar problemas como alta permanência da droga ligada ao tecido ósseo, fraturas ósseas, lesões renais e gastrointestinais, risco de osteonecrose^{12, 13} e cânceres¹⁴. Devido a estes efeitos, alguns procedimentos odontológicos podem levar a lesões ósseas necrosantes em pacientes que fazem uso destes medicamentos^{15, 16, 17, 18}.

O efeito adverso dos bisfosfonatos sobre a indução de osteonecrose dos maxilares tem levado a busca por medicamentos de via de ação óssea diferente, como os compostos a base de Estrôncio (Sr), tais como o Ranelato de Estrôncio, Carbonato de Estrôncio e o Cloreto de Estrôncio. Eles que são citados na literatura como novos agentes antiosteoporóticos, em virtude de sua capacidade de minimizar o risco de fraturas ósseas em mulheres pós-menopausa¹⁹. Ao contrário dos agentes antiosteoporóticos mais comuns, que agem aumentando a formação óssea (através

de hormônios para-tireóideos, por exemplo), ou inibindo a reabsorção óssea (como os bisfosfonatos, por exemplo), os compostos em que apresentam estrôncio tem a eficiência em agir tanto nos mecanismos de reabsorção, quanto na formação óssea. Embora os mecanismos de ação do estrôncio não estejam inteiramente esclarecidos, estudos atuais tem mostrado um avanço na descoberta de suas ações ²⁰. Estudos in vitro vem mostrando que o estrôncio promove a indução da apoptose de osteoclastos devido sua capacidade semelhante a do cálcio, ou seja, de ativar os receptores sensíveis ao cálcio (CaR) ²¹, atuando assim no processo de reabsorção óssea. Já no processo de formação óssea, atuam em diferentes receptores distintos ao cálcio, ativando moléculas sinalizadoras que irão promover um aumento do recrutamento e diferenciação de células pré-osteoblásticas ²², como também promovem um aumento de protaglandinas E2 (PGE2) que são capazes de estimular a diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos ²³. Outra maneira em que participam e favorecem a formação óssea é sua tendência em aumentar a fosfatase alcalina (enzima que marca a diferenciação osteoblástica) e a expressão de osteocalcina (OCN) e sialoproteína (BSP), e ao mesmo tempo reduzir os marcadores de diferenciação de osteoclastos ²⁴.

Estudos clínicos e pré-clínicos ^{25,26,1,17} tem investigado o efeito de diferentes terapias sobre o tratamento ou a prevenção da osteonecrose dos maxilares induzidas por bisfosfonatos. Os resultados não tem apresentado efeitos relevantes, havendo com isso a necessidade de estudos que avaliem novos medicamentos, como a administração de ranelato de estrôncio.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do ranelato de estrôncio no processo de osteonecrose induzida por bifosfonato em ratos.

2.2 Específico

Os objetivos específicos serão avaliar em condições de osteonecrose, o efeito do ranelato de estrôncio sobre a reparação tecidual, utilizando as análises:

1. Histológica
2. Estereométrica
3. Microtomográfica

2.3 Hipóteses

H0- A utilização do ranelato de estrôncio não altera o processo de osteonecrose por bisfosfonato.

H1: A utilização do ranelato de estrôncio altera o processo de osteonecrose por bisfosfonato.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bisfosfonato

Marx et al.²⁵, avaliaram os fatores de risco, o reconhecimento, a prevenção e o tratamento de osteonecrose em mandíbula devido ao uso de bisfosfonato. Foram revisados 119 casos de tratamentos com bisfosfonatos relacionados à exposição óssea. Os pacientes apresentavam doenças como mieloma múltiplo, câncer de mama metastático, câncer de próstata metastático e osteoporose. Eles receberam diferentes tipos de terapia com bisfosfonatos: 32 receberam pamidronato dissódico, 48 ácido zoledrônico, 36 começaram a terapia com pamidronato e posteriormente ácido zoledrônico e 3 receberam alendronato de sódio. O tempo previsto para a indução de uma exposição clínica óssea e seus sintomas foram de 14,3 meses para os pacientes que receberam pamidronato dissódico, 9,4 meses para ácido zoledrônico, 12,1 meses para quem recebeu os dois e 3 anos para quem recebeu alendronato de sódio. Foram encontrados exposição óssea assintomática em 37 pacientes, 82 apresentaram dor, 28 desenvolveram mobilidade dental e 21 apresentaram fístulas intra ou extra orais. Foi observado que alguns fatores precipitaram o aparecimento da exposição óssea, como extração dentária em 37,8% dos casos, periodontite avançada em 28,6%, instalação de implantes em 11,2%, tratamento de canal em 0,8% e espontâneos em 25,2% dos casos. Oitenta e um pacientes apresentaram exposições ósseas apenas na mandíbula, 33 na maxila e 5 ocorreram em ambos os maxilares. Assim, os autores concluíram que não é possível a completa prevenção dessa complicação, portanto a terapia dental antes do uso destes medicamentos pode reduzir a incidência e que a antibioticoterapia juntamente com a clorexidina é um método efetivo no controle da dor quando ocorre exposição óssea sintomática.

Roelofs et al.⁷, revisaram a farmacologia dos bisfosfonatos em relação a estrutura química e sua potência anti-reabsortiva. Os autores encontraram que os bisfosfonatos contendo nitrogênio atuam intracelularmente pela inibição da farnesil difosfato sintase, uma enzima da via do mevalonato, prevenindo assim a prenilação de pequenas proteínas de sinalização GTPase necessárias para a função celular normal. Os bisfosfonatos que carecem de um nitrogênio na estrutura química não

inibem a prenilação da proteína e têm um modo de ação diferente, que parece envolver principalmente a formação de metabólitos citotóxicos nos osteoclastos. Assim, concluíram que os bisfosfonatos são inibidores altamente eficazes da reabsorção óssea que afetam seletivamente os osteoclastos in vivo, mas também podem ter efeitos diretos sobre outros tipos de células, tais como células tumorais, mas suas propriedades antitumorais exatas ainda precisam ser esclarecidas.

Russel et al.⁵, forneceram informações sobre a nossa compreensão atual de como bisfosfonatos atuam no processo de remodelação óssea e destacaram as propriedades que podem ajudar a explicar algumas das diferenças clínicas observadas por meio de revisões de literatura. Revisaram as informações sobre o mecanismo de ação dos bisfosfonatos, onde destacaram que os efeitos farmacológicos clássicos dos bisfosfonatos parecem ser o resultado de duas propriedades-chave: a afinidade pelo mineral ósseo e seus efeitos inibitórios sobre os osteoclastos. Os bisfosfonatos contendo nitrogênio (alendronato, risedronato, ibandronato e zoledronato) resultam da inibição da enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS) em osteoclasto, que é uma enzima chave na via mevalonato, onde geram lipídeos isoprenóides para a modificação pós-tradução de pequenas proteínas de ligação a GTPase que são essenciais para a função dos osteoclastos e concluíram que cada tipo de bisfosfonato tem um perfil único que pode ajudar a explicar as possíveis diferenças entre eles, em termos de velocidade, duração e forma de ação.

Estilo et al.²⁷, realizaram um estudo retrospectivo de pacientes com a doença do metabolismo ósseo tratados com bisfosfonato intravenoso para categorizar os fatores de risco associado com a osteonecrose de maxilares e os resultados clínicos desta condição. Foram selecionados 310 pacientes que apresentava mieloma múltiplo, câncer de mama e câncer de próstata e estavam sendo tratados com bisfosfonato intravenoso, destes, apenas 35 pacientes apresentaram osteonecrose dos maxilares. Os autores observaram que fatores como o tipo de câncer, duração da terapia com bisfosfonato, tratamento com pamidronato seguido com ácido zoledrônico, presença associada de osteoartrite, artrite reumatoide e doenças hematológicas estiveram associada ao aumento do risco de osteonecrose dos maxilares. As características clínicas observadas em todos os casos de osteonecrose foram, exposição óssea não vital e algumas assintomática como: nos pacientes que relatavam dor os tecidos moles circundantes apresentavam-se

eritematosos e inflamados, lesões medindo 1,5mm de diâmetro, dormência, inchaço, supuração e mobilidade dentária. Um paciente desenvolveu fistula extra oral, dois pacientes fraturaram a mandíbula, a maioria dos pacientes tinham realizado anteriormente um procedimento dental cirúrgico no local da osteonecrose. Apenas em 14 pacientes foram diagnosticados com osteonecrose espontânea. Os autores observaram nesse estudo que a mandíbula foi o local mais comum de osteonecrose entre os pacientes.

Conte-Neto et al.²⁸, relataram dois casos de osteonecrose em mandíbula relacionado com bisfosfonatos em pacientes com artrite reumatoide e conduziram uma revisão de literatura sobre os casos clínicos semelhantes. Ambas as pacientes eram do sexo feminino e faziam uso oral de 10 mg de alendronato semanalmente por mais de 3 anos. Foram detectadas lesões com exposição óssea e secreção purulenta na região posterior de mandíbula sem nenhum tipo de fator predisponente. O tratamento realizado consistiu em antibióticos e enxaguatórios bucais com clorexidina, debridamento cirúrgico e posterior interrompimento das drogas. Após estes procedimentos houve remissão completa das lesões. Os autores concluíram a importância da necessidade dos reumatologistas estarem cientes do potencial risco de desenvolvimento da osteonecrose induzida por bisfosfonatos e realizarem trabalhos preventivos com cirurgiões dentistas para evitar ou detectar precocemente as lesões.

Kang et al.²⁹, desenvolveram um modelo de indução da osteonecrose em mandíbula através da indução de doença periapical em ratos tratados com doses elevadas de bisfosfonatos. Foram utilizados 35 ratos que receberam intraperitonealmente injeções de solução salina ou injeções de ácido zoledrônico (200ug/kg), 3 vezes por semana até uma semana antes da indução de lesão periapical. Posteriormente foram realizadas exposições pulpares nos primeiros e segundo molares inferiores esquerdos e o tratamento com ácido zoledrônico foi realizado por até 7 semanas. Após a eutanásia, as amostras obtidas foram avaliadas histologicamente e radiograficamente. Os autores demonstraram que as lesões periapicais foram maiores em ratos tratados com bisfosfonatos, sendo observado um espessamento da lamina dura, deposição óssea, aumento da densidade trabecular, osteonecrose, migração epitelial e exposição óssea. 88% dos animais tratados que apresentavam osteonecrose em doença periapical, em apenas 33% houve exposição óssea, demonstrando que a osteonecrose precede a exposição óssea. Os

autores concluíram que esses dados reforçam a importância da doença dentária no desenvolvimento da osteonecrose em mandíbula.

Longato et al.³⁰, reportaram um caso clínico onde avaliaram a relação da osteonecrose de mandíbula em paciente com artrite reumatoide tratada com alendronato 70mg/semana, cálcio e vitamina D diariamente por 3 anos. A paciente desenvolveu abscesso nos dentes inferiores, acompanhada por aumento de marcadores inflamatórios que não reduziram mesmo com o uso de antibioticoterapia, induzindo a alteração da articulação sinovial, aumento progressivo de inchaço e dores nas articulações. A paciente foi submetida a extração dentária da região afetada sob terapia antibiótica com amoxicilina. O exame histológico da área mostrou a presença de necrose óssea e o acúmulo de bactérias. A tomografia computadorizada mostrou rarefação do osso trabecular com uma grande lesão osteonecrótica no osso mandibular. Os autores concluíram através das análises clínicas e histológicas que a osteonecrose dos maxilares foi induzida pelo tratamento com alendronato, e assim substituíram por ranelato de estrôncio por ser uma droga anti-fratura capaz de ativar osteoblastos.

Molon et al.¹⁶, investigaram se as lesões osteonecróticas poderiam se desenvolver em áreas de infecção perirradicular dos maxilares de camundongos utilizando medicamentos anti-reabsortivos com ações farmacológicas distintas. Foram selecionados 66 ratos, divididos em 4 grupos: Grupo VEH- receberam por via intraperitoneal injeções com solução salina, Grupo ZA- 100ug/kg de ácido zoledrônico três vezes por semana, Grupo RANK-Fc - 10 mg/kg de RANK-Fc (composto de domínio extracelular de RANK) três vezes por semana e Grupo OPG-Fc - 10 mg/kg de OPG-Fc (composto pelos domínios de ligação RANKL da osteoprotegerina ligados a porção Fc da IgG) uma vez por semana. Todos os medicamentos foram administrados durante 12 semanas. Os maxilares desses animais foram avaliados por meio de análises histológicas e tomográficas. Os resultados no micro CT demonstraram que os ratos tratados com VEH tiveram morfologia óssea alterada, com áreas osteolíticas em volta das raízes, vários animais tratados com RANK-Fc, OPG-Fc e ZA apresentaram lesões líticas semelhantes ao grupo VEH, embora a extensão da perda óssea foi significativamente inferior, mas não observaram diferença na aparência óssea radiográfica nos grupos RANK-Fc, OPG-Fc ou ZA. Em relação à perda óssea, foi observado que no grupo VEH houve um maior aumento de perda óssea em relação

aos demais grupos. Nos sítios saudáveis dos grupos RANK-Fc, OPG-Fc e ZA observou-se um aumento semelhante em volume ósseo em relação ao grupo VEH, os sítios doentes tratados com antirreabsortivos mostraram aumento adicional em volume ósseo em comparação com os locais saudáveis dos mesmos animais ou sítios doentes do grupo VEH. Na análise histológica observou-se que em locais saudáveis, em todos os grupos, o osso alveolar e o epitélio juncional apresentaram-se com características de normalidade, nos animais tratados com VEH encontraram um abundante infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos e linfócitos e foi acompanhado por perda óssea acentuada, mas nenhuma evidência de osteonecrose foi encontrada. Nos grupos com antirreabsortivos apresentaram perda óssea comparada aos sítios saudáveis, áreas de osteonecrose presente, lacunas osteocíticas vazias, em várias amostras o osso necrótico não estava coberto por mucosa oral sendo exposto a cavidade oral. Este modelo feito em ratos induzindo a osteonecrose espontânea indica fortemente o papel central dos osteoclastos na fisiopatologia da osteonecrose em maxilares e sugerem a importância de início da infecção e inflamação juntamente com a administração de medicamentos antirreabsortivos, apoiando a importância central da infecção/inflamação em combinação com a inibição da função osteoclástica para o aparecimento de osteonecrose em maxilares.

Recreo et al.¹⁵, testaram um modelo experimental reprodutível que se relaciona diretamente com o desenvolvimento da osteonecrose através da associação da extração dentária com a administração crônica de bisfosfonato. Foram selecionados 20 ratos machos que foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: nesses ratos foram injetados semanalmente o ácido zoledrônico, no grupo I e II – o medicamento foi injetado 3 vezes por semana intraperitoneal, no grupo III - 1 vez por semana intravenosa e no grupo controle, foram injetados solução salina intraperitoneal 3 vezes por semana. Após 8 semanas de administração dos medicamentos, foram extraídos três molares superiores do lado direito dos grupos I, III e IV, sendo sacrificados na semana seguinte. Em seguida, foram realizadas análises histológicas da maxila para verificar a presença de focos de osteonecrose, número de osteoclastos, vascularização, reabsorção óssea e presença de abscesso. Os grupos tratados com ácido zoledrônico apresentaram graus variáveis de osteonecrose e desorganização trabecular no exame radiográfico. Os autores conseguiram demonstrar um novo modelo animal de osteonecrose dos maxilares

depois da administração de ácido zoledrônico que teve como fator desencadeante a extração dental, obtendo uma mudança óssea similar ou superior aos estudos anteriores.

Krstevska et al.³¹, avaliaram a incidência de osteonecrose nos maxilares em 296 pacientes (150 homens e 146 mulheres) que apresentam mieloma múltiplo e foram tratados com bisfosfonatos orais e injetáveis, como: pamidronato, ibandronato e ácido zoledrônico. A incidência de osteonecrose em maxilares ocorreu em 12 pacientes, sendo que 8 desses receberam tratamento com ácido zoledrônico e os 4 pacientes restantes foram tratados com combinações de bisfosfonatos sem ácido zoledrônico. A duração média de efeitos adversos foram de 13 a 26 meses.

Molon et al.³², investigaram se a descontinuação da medicação anti-reabsorção (ácido zoledrônico ou OPG-Fc) altera as características de osteonecrose em mandíbula de ratos. Utilizaram 48 camundongos que foram tratados de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo Veículo (VEH) - foram administradas injeções intraperitoneais de solução salina duas vezes por semana; Grupo OPG - foram administrados 10 mg/kg de OPG-Fc duas vezes por semana e no Grupo ZA - foram administrados 200mg/kg de ácido zoledrônico duas vezes por semana, em todos os grupos os medicamentos foram administrados durante 11 semanas e foram feitas perfurações nos 1º e 2º molares inferiores direitos expondo canais radiculares resultado uma necrose pulpar e consequente infecção periapical na terceira semana e os molares esquerdos foram mantidos intactos. Após a indução da doença periapical os animais continuaram com seus medicamentos por mais 6 ou 10 semanas e depois interrompido. Posteriormente, foi coletado sangue no momento da exposição dos canais radiculares e após 11 semanas de tratamento e na segunda, quarta, sexta e décima semana após a interrupção dos antirreabsortivos. Foram realizadas análises microtomográfica e histológica. Analisando os níveis séricos de TRACP-5b relataram que o grupo VEH apresentou um pequeno declínio ao longo do tempo e nos grupos ZA ou OPG-Fc diminuíram significativamente confirmando a inibição da função de osteoclastos. A interrupção de OPG-Fc inverteu as características radiográficas de osteonecrose mandibular. Nas áreas com doença periapical, no grupo VEH foi observado perda da altura da crista alveolar e perda óssea da região apical em torno dos molares, já no grupo com antirreabsortivos a perda óssea foi menor e associada com grandes áreas de aposição óssea periosteal. A descontinuação de OPG-Fc reverteu esse

efeito caracterizando um aumento ósseo significativo. Histologicamente, nos grupos PPG-fc e ZA observaram deposição óssea periosteal, lacunas de osteócito vazias, áreas osteonecróticas e exposição óssea, mesmo com a interrupção de ZA essas características não obtiveram alteração, já com a interrupção de OPG-Fc houve reversão destas características. No grupo VEH, as áreas de osteonecrose e osso exposto foram significativamente diminuídos e se tornaram quase ausentes. Em conclusão, observaram que a interrupção do tratamento com medicação anti-reabsorção altera os achados radiográficos e histológicas de forma diferente em camundongos, mas depende do tipo de agente antirreabsortivo, a descontinuação de OPG-Fc inibidor de RANKL inverte as características de osteonecrose, já a interrupção de ZA não altera essas características.

Tanaka et al.³³, desenvolveram um modelo de osteonecrose usando bisfosfonato oral para osteoporose em ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas 36 ratas que foram submetidas ou não a ovariectomia. As ratas foram divididas em grupos: ovariectomizadas e não ovariectomizadas, 12 ratas ovariectomizadas e 12 ratas não ovariectomizadas receberam administração de alendronato 1mg/kg semanalmente por 4 semanas e o restante receberam solução salina como grupo controle. Foram medidos os níveis sorológicos de C-telopeptido ligado ao colágeno tipo III da medula óssea da mandíbula e fêmur, para analisar o metabolismo ósseo, e as áreas de osteonecrose foram avaliadas histologicamente. O soro C-telopeptido de colágeno reticular tipo III foi significativamente aumentados no grupo ovariectomizado em comparação ao não ovariectomizado, e foram significativamente reduzidos depois da administração de alendronato. Uma extensa osteonecrose da mandíbula e fêmur nos grupos que foram administrados alendronato em relação ao grupo que não sofreu ovariectomia. Os autores concluíram que o modelo desejado de osteonecrose em ratas ovariectomizadas induzidos por bisfosfonatos foi obtido com sucesso.

Kim et al.³⁴, investigaram o potencial papel das micro-trincas na patogênese da osteonecrose dos maxilares relacionadas com bisfosfonatos através de um modelo animal. Foram utilizados 24 ratas ovariectomizadas que foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Grupo bisfosfonatos onde foram injetados subcutaneamente 100 µg/kg de ácido zoledrônico e grupo controle, onde os animais receberam administração de solução salina (0.9% NaCl) semanalmente, e após 6 semanas foram realizadas extrações dos terceiros molares. Após as extrações continuaram a administração dos medicamentos por mais 8 semanas e em seguida

foram eutanasiados. Os animais foram avaliados quanto a presença de microfissuras na região da extração dentária por microtomografia computadorizada e análise histológica, onde observaram a dimensão óssea, número de fissuras, comprimento das fendas, densidade das fendas e densidade da superfície das fendas. Os resultados obtidos foram que os animais do grupo controle tiveram cicatrização normal e tanto o número de fissuras quanto ao comprimento das fendas no grupo bisfosfonato foram maiores que o controle. Das 19 ratas que receberam bisfosfonato, 13 apresentaram osteonecrose nos maxilares. Em relação a densidade das fendas e densidade da superfície das fendas foi verificado que esses valores foram maiores em animais que apresentavam osteonecrose o que indica que o acúmulo de fissuras não reparadas está significativamente relacionado com o desenvolvimento de osteonecrose induzida por bisfosfonato. Ainda que sejam necessárias mais pesquisas para determinar a patogênese da osteonecrose relacionada com bisfosfonato, esses autores concluíram que o seu uso, ao longo do tempo, pode deteriorar o funcionamento biomecânico e a integridade fisiológica óssea, contribuindo para a patogênese de osteonecrose em maxilares relacionados com o consumo de bisfosfonatos.

3.2 Ranelato de Estrôncio

Buehler et al³⁵, investigaram o efeito do estrôncio na remodelação óssea em macacos adultos. Utilizaram 31 macacos (15 adultos machos e 16 fêmeas), que foram divididos randomicamente em 4 grupos (8 animais por grupo), que foram tratados diariamente com 100, 275 ou 750 mg/kg de ranelato de estrôncio ou soro fisiológico por gavagem durante 26 semanas. Antes do tratamento e no dia da eutanásia foram colhidos sangue por punção aortica para determinação do estrôncio no soro. Foram realizados testes bioquímicos e análises histomorfométricas de índices de formação óssea e reabsorção em áreas padronizadas do osso alveolar. O tratamento com ranelato de estrôncio diminuiu os índices histomorfométricos da reabsorção óssea (superfície e número de osteoclastos) com um efeito significativo na dose mais alta testada. Em contraste com este efeito inibitório sobre a reabsorção óssea, o ranelato de estrôncio manteve a formação óssea. Embora tenha havido uma maior quantidade de osteóide, o ranelato de estrôncio, mesmo com a dose mais elevada, não teve efeito deletério no volume ósseo trabecular do osso alveolar. Esses achados mostram que o ranelato de estrôncio diminui os índices de

reabsorção óssea enquanto mantém a formação óssea no osso alveolar em macacos, indicando que esse agente tem um potencial clínico interessante na prevenção e tratamento da osteoporose.

Maïmoun et al.³⁶, avaliaram se a administração do ranelato de estrôncio pode melhorar a osseointegração de implantes de titânio em ratos. Foram inseridos implantes de titânio na tíbia de 30 ratos, após a implantação os animais receberam oralmente 625 mg/kg ranelato de estrôncio ou veículo salino por 5 dias/semana durante 8 semanas. Após este período os animais foram eutanaziados e os implantes foram analisados pelo parâmetro de força de remoção. Os resultados demonstraram que o ranelato de estrôncio aumentou significativamente a força de retirada dos implantes em relação ao grupo controle e isso foi associada com uma melhoria na microarquitetura do osso ao redor do implante tanto no osso cortical como na dureza das áreas trabeculadas. Os autores concluíram que o ranelato de estrôncio aumentou a fixação mecânica do implante, suportando a hipótese dos possíveis benefícios do ranelato de estrôncio em cirurgias ortopédicas e cirurgias dentais visando a melhora da osseointegração.

Querido et al.³⁷, descreveram os efeitos do ranelato de estrôncio na interação com células osteoblásticas com diferentes superfícies de titânio, para compreender o potencial da droga na melhoria dos implantes ósseos. Implantes receberam tratamento com uma concentração de 0,12 e 0,5 Mm de ranelato de estrôncio em cultura de células. Analisou-se a resposta das células à droga em substratos de titânio com topografias de superfície obtidas usando o condicionamento ácido, processamento de eletro-erosão e jateamento. Os resultados demonstraram que as concentrações das drogas aumentaram a proliferação de células osteoblásticas em todos as superfícies, aumentaram a atividade da fosfatase alcalina e a produção de matriz mineralizada com características típicas de tecido ósseo. Portanto, concluíram, que o ranelato de estrôncio melhorou a interação de células osteoblásticas com os substratos de titânio, aumentou também a proliferação celular, a diferenciação de osteoblastos em células maduras e o aumento da produção de matriz mineralizada, colocando o ranelato de estrôncio como um reforço no sucesso clínico de implantes ósseos em paciente que apresentam osteoporose.

Chen et al.³⁸, compararam os efeitos do Alendronato (ALN), ranelato de estrôncio (SR) e ácido zoledrônico (ZOL), na osseointegração de implantes em ratas ovariectomizadas. Utilizaram 60 ratas, sendo que 48 foram ovariectomizadas (OVX) e

divididas em quatro grupos: Grupo OVX (OVX + veiculo), Grupo ALN (OVX + alendronato), SR (OVX + Ranelato de Estrôncio), ZOL (OVX + ácido zoledrônico), e o restante representaram o grupo controle. Após quatro semanas da ovariectomia inseriram os implantes bilateralmente nas tíbias de todos os ratos. Em seguida, foram administrados ALN- 7mg/kg/semana, SR- 500 mg/kg/dia, ZOL- uma dose intravenosa 0,1 mg/kg e veiculo (OVX). Doze semanas após a implantação dos implantes os ratos foram eutanaziados. Foram realizadas análises histológica e biomecânica do fêmur e da tíbia e o tipo de integração osso-implante. Observaram um significativo aumento de contato entre o osso e implante nos grupos ALN, SR e ZOL quando comparados com o grupo OVX, aumento da densidade mineral óssea nos grupos ALN, SR, ZOL. Os testes biomecânicos que avaliaram a força máxima de retirada dos implantes não encontraram diferenças significativas entre os grupos. Os autores concluíram que as ratas ovariectomizadas tiveram uma perda óssea rápida, já a administração de ZOL, ALN e SR teve uma melhor osseointegração comparados com o grupo OVX e os grupos ALN e SR tiveram efeitos positivos na osseointegração.

Panahifar et al.³⁹, visualizaram regiões ósseas que sofreram mineralização patológica e/ou remodelação durante a osteoartrite tratados com estrôncio não radioativo. Nesse estudo utilizaram 16 ratos, onde induziram a osteoartrite pós-traumática cirurgicamente. Os animais começaram a receber estrôncio (154mg/kg) diariamente após o procedimento cirúrgico ou em curto prazo (10 dias antes da eutanásia). Realizaram imagens microtomográficas in vivo durante 12 semanas para avaliar alterações ósseas micro-estruturais. Avaliaram a distribuição do estrôncio em 2 e 3 dimensões por meio de uma micro-análise de elétrons. Observaram considerável formação precoce de osteócitos ao redor dos ligamentos e das margens das superfícies articulares, seguidas de esclerose subcondral. Assim concluíram que o estrôncio foi fortemente incorporado pela mineralização dos osteócitos às 4, 8 e 12 semanas após a cirurgia, enquanto o osso subcondral apenas incorporou estrôncio entre a 8^a e 12^a semana. Este estudo mostrou a esclerose progressiva da superfície óssea no período de 12 semanas após a cirurgia, e tem demonstrado promover a formação óssea e inibir a reabsorção óssea. Porém uma melhor compreensão da distribuição do estrôncio no processo de artrite ajudaria a entender sua utilidade para o tratamento dessa doença.

Catalano et al.⁴⁰, realizaram uma análise retrospectiva da resposta da densidade mineral óssea (DMO) ao ranelato de estrôncio (SrR) em 108 mulheres que receberam o medicamento como tratamento para osteoporose pós-menopausa. Essas mulheres foram tratadas com SrR (2g/dia), colecalferol 25.000 UI e carbonato de cálcio (2x/semana) em um período de 18 meses. O SrR foi associado a uma melhora da densidade mineral óssea na coluna lombar e não teve mudanças significativas em relação ao colo do fêmur. Assim, concluíram que o aumento do nível de vitamina D está associada com o aumento de DMO em resposta ao tratamento com SrR em mulheres com osteoporose pós menopausa.

Komrakova et al.⁴¹, investigaram o potencial impacto do ranelato de estrôncio na cicatrização óssea pós fratura em pacientes com osteoporose. Foram utilizados 48 ratos ovariectomizados e 12 intactos e após 8 semanas, foi realizada uma osteotomia transversal bilateral da tíbia. Os ratos OVX foram divididos em 4 grupos: OVX, SR (625 mg/kg/dia) aplicado após a OVX até a osteotomia, SR aplicados após a osteotomia, SR aplicado durante todo o período. Após 5 semanas, foram feitas análises biomecânicas, histológica, micro tomográfica e expressão gênica. O tratamento com SR aumentou a densidade mineral óssea, fração de volume ósseo, BMD cortical e volume, áreas de calo e densidade, fosfatase alcalina no soro, mRNA de fosfatase ácida, formação de calos em 2 semanas e cura em 3 semanas, e diminuição do ativador de OPG osteoprotegerina/ ativador do receptor nuclear kB comparado com o grupo OVX. Concluíram que o Ranelato de estrôncio tem um efeito positivo na cicatrização óssea osteoporótica em ratos e o tratamento com estrôncio pois proporcionou um aumento da densidade mineral óssea .

Morabito et al.⁴², avaliaram os efeitos do Ranelato de Estrôncio no densidade óssea mineral, marcadores de remodelação óssea e inibidores de sinalização de WNT (esclerostina e DKK-1). Foram selecionadas 24 mulheres com osteoporose para receber diariamente Ranelato de Estrôncio ou placebo em adição a carbonato de cálcio e vitamina D. Após 24 meses foram avaliados a densidade mineral óssea da lombar e colo de fêmur, marcadores de remodelação óssea (C-terminal telopeptido do tipo porcolagenol – CTX, específica da fosfatase alcalina), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), esclerotina e DKK-1. Encontraram um aumento da BMD da coluna, redução dos níveis de CTX e esclerotina, aumento de BSAP e IGF-1 e redução de dores nas costas após 18 meses. Já o grupo placebo não observaram mudanças significativas. Revelaram pela primeira vez que os

efeitos do Ranelato de Estrôncio em tratamento da osteoporose melhorou a densidade mineral óssea, marcadores de remodelação óssea normalizada e redução dos níveis séricos de esclerotina.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal da FOAr-UNESP (CEUA – processo 27-2015)(ANEXO A).

4.2 Distribuição dos Animais e Grupos

Foram utilizados 60 ratos *Rattus Norvegicus*, variação *albinus*, Holtzman, machos, adultos, de aproximadamente 10 semanas de idade, com massa corporal entre 190-210 gramas, mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP), alimentados com ração sólida e com acesso a água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental, luz e temperatura controladas, sendo que suas gaiolas foram identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e período.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos com 10 animais em cada grupo (Figura 1). Os grupos foram divididos em:

Grupo controle (CTR): administração diária de soro fisiológico por injeção subcutânea durante 90 dias, com início 60 dias antes da extração dos primeiros molares inferiores. Após este período os animais foram eutanasiados.

Grupo alendronato (ALN): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia ²⁸ durante 90 dias com início 60 dias antes da cirurgia para a extração dos dentes. Após 30 dias das extrações os animais foram eutanasiados.

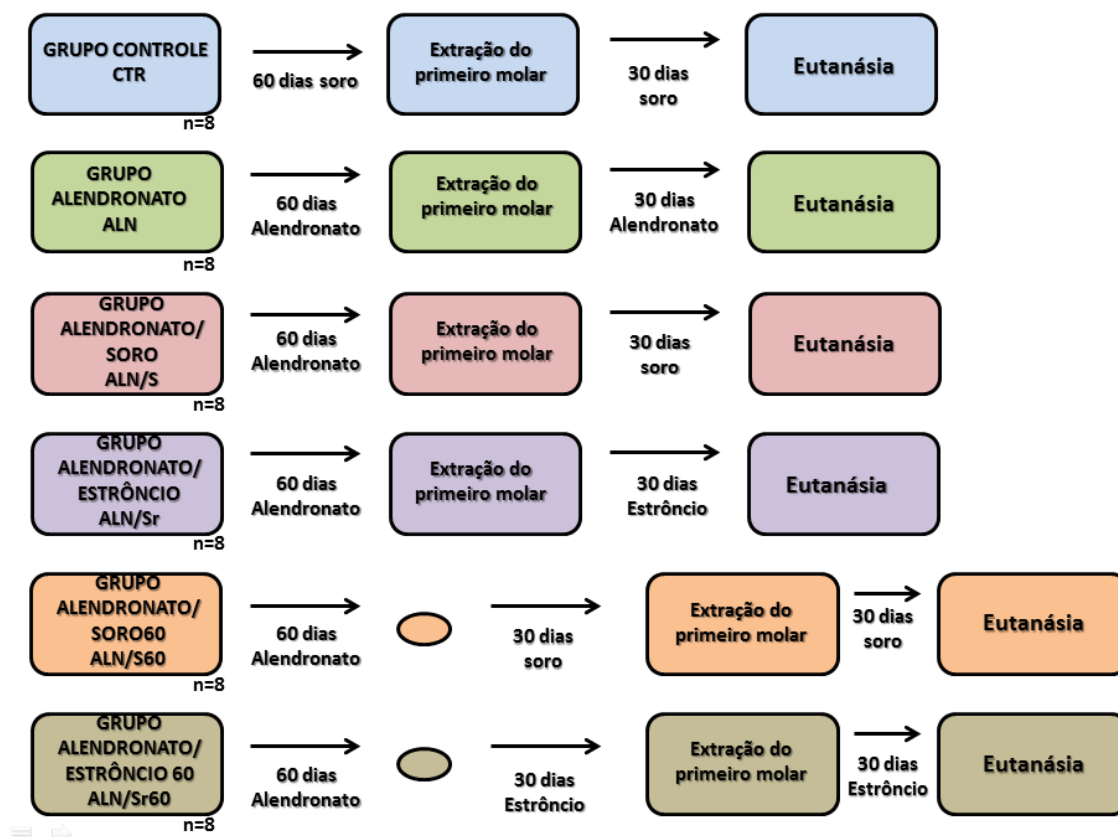
Grupo alendronato/SORO (ALN/S): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia durante 60 dias e realizado a extração. A partir do procedimento cirúrgico os animais receberam administração diária de injeção subcutânea de soro fisiológico durante 30 dias onde os animais foram eutanasiados.

Grupo alendronato/estrôncio (ALN/Sr): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia durante 60 dias. No dia das extrações dos dentes foi iniciado a administração de Ranelato de Estrôncio (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil) administrado 625 mg/kg/dia ^{43, 44, 41} por gavagem diariamente e depois de 30 dias os animais foram eutanasiados.

Grupo alendronato/SORO 60(ALN/S60): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia durante 60 dias. A administração deste medicamento foi interrompida 30 dias antes da cirurgia para a extração dos dentes. Após 30 dias das extrações os animais foram eutanasiados, durante este período os animais foram submetidos a administração subcutânea de soro fisiológico.

Grupo alendronato/estrôncio 60 (ALN/Sr60): administração de alendronato (ALN) (ALCON Laboratório, São Paulo, SP, Brasil) aplicado diariamente por injeção subcutânea de 1 mg/kg/dia durante 60 dias, após este período foi iniciado a administração de Ranelato de Estrôncio (Protos®, Laboratórios Servier do Brasil) aplicado 625 mg/kg/dia por gavagem diariamente durante 60 dias. 30 dias após o início da administração do ranelato de estrôncio os dentes foram extraídos e os animais foram eutanasiados após 30 dias.

Figura 1 - Esquema de distribuição dos animais nos grupos e períodos

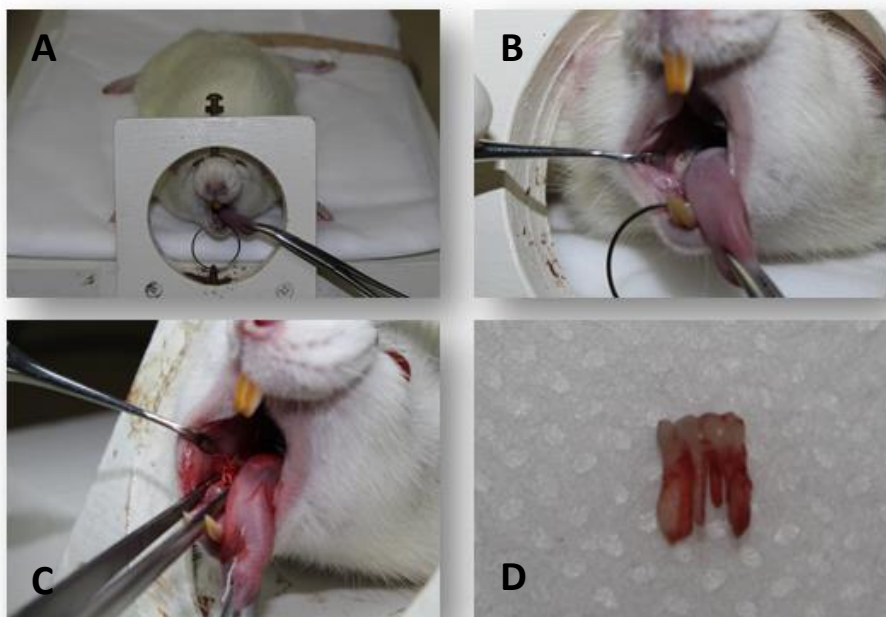


Fonte: Elaboração própria

4.3 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente. Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica. Com o auxílio de uma pinça hemostática seguramos a língua do rato e a mandíbula para estabilização, com uma sonda exploradora o tecido gengival ao redor dos primeiros molares foram delicadamente afastados, posteriormente, utilizando um Hollemback Carver onde os dentes foram luxados e avulsionados totalmente ou divididos em dois segmentos (mesial e distal) e removidos separadamente ²⁸ (Figura 2). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único profissional treinado.

Figura 2 – Procedimento cirúrgico: extração do primeiro molar inferior bilateralmente.



A- Os ratos foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica. B e C – Com o auxílio de uma pinça hemostática foi realizada a estabilização da língua e da mandíbula, sonda exploradora foi utilizada para o afastamento dos tecidos gengivais em torno do dente e o Hollemback Carver foi utilizado para luxação e posterior avulsão dos dente. D- Primeiro Molar Inferior do rato contendo 4 raízes (mesial, distal, palatina e lingual)

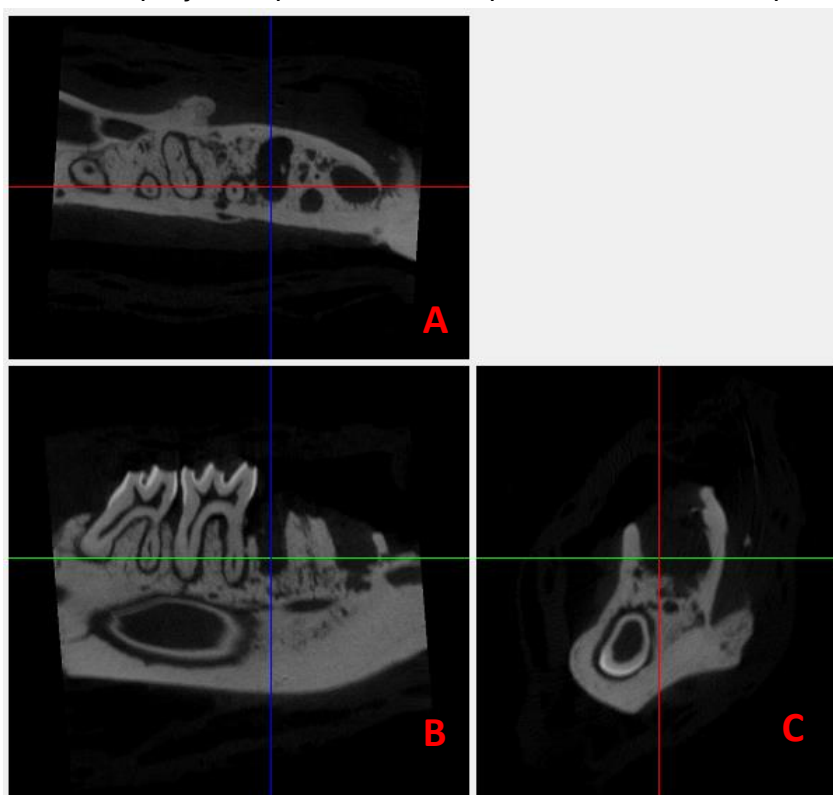
Fonte: Arquivo pessoal do autor

Após o procedimento de extração dental os animais receberam uma dose intramuscular de penicilina associada à estreptomicina (Pentabiótico pequeno porte, FortDodge, Brasil) na dosagem 0,1 ml/kg de peso e 5mg/kg de dipirona sódica intramuscular (Febrax, Lema Injex Biologic, Brasil). Após os períodos experimentais de cada grupo os animais foram eutanasiados e foram obtidas as peças da região dos primeiros molares que foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e armazenadas em álcool 70%. Estas peças foram avaliadas através de análise radiográfica tridimensional (Micro-CT) e análises histológica e estereométrica.

4.4 Avaliação por Análise Radiográfica Tridimensional (Micro-CT)

As peças armazenadas em álcool 70%, foram primeiramente submetidas a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 18 μ m de espessura (50Kv e 500 μ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstruídas pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstituídas e selecionadas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital)(Figura 3).

Figura 3 – Adequação do posicionamento padrão das amostras pelo software Data Viewer.



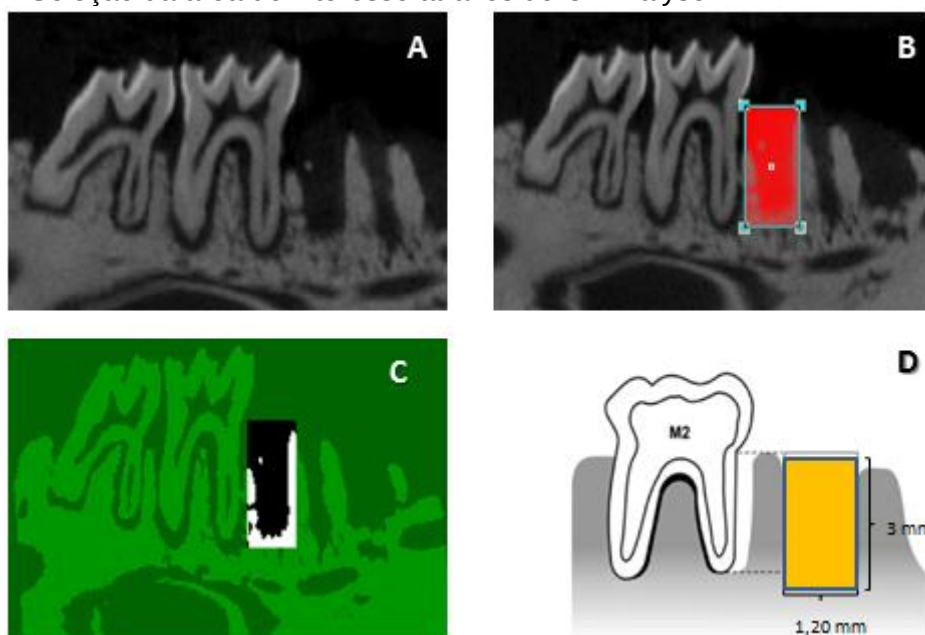
A: imagem no sentido transaxial, B: imagem no sentido coronal , C: imagem no sentido sagital

Fonte: Elaboração própria

Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida uma área de interesse na região de extração dos primeiros molares (ROI). O software CTAn analisa e mede a imagem de acordo com a escalas de cinza (thershold). O threshold utilizado na análise foi definido ⁴⁵ de 65-180 tons de cinza que possibilitaram o volume de osso na região (Figura 4).

A área de interesse (ROI) foi determinada com os mesmos parâmetros para todas as imagens de todos os grupos com a dimensão de 1,20X3,00mm, onde foi delimitada uma área quadrangular onde a dimensão vertical abrangeu uma região relativa a distância da junção cimento-esmalte da raiz mesial do segundo molar (CEJ) até a sua porção apical e a distância horizontal foi definida entre as superfícies ósseas mesial e distal do tecido ósseo do alvéolo distal referente ao primeiro molar extraído (Figura 4).

Figura 4 – Seleção da área de interesse através do CTAnalyser.



A: posicionamento adequado das imagens. B: determinação da área de interesse (ROI) dentro dos parâmetros seleccionados. C: imagem binária obtida no software para o cálculo do volume de tecido mineralizado dentro da área de interesse (threshold 65-180 tons de cinza). D: parâmetros utilizados para seleção do ROI

Fonte: Elaboração própria

A porcentagem (%) de tecido mineralizado na região de interesse foi definida a partir da quantidade de tecido mineralizado (BV) em relação a área total do ROI (TV).

$$\text{Porcentagem de tecido mineralizado} = \text{BV} \times 100/\text{TV}$$

4.5 Processamento Histológico

Após a fixação das peças em formaldeído a 4%, estas foram lavadas em água corrente por 12 horas e colocadas em solução de EDTA para descalcificação por um período de 8 semanas, com trocas semanais a cada 48 horas. Foram realizados cortes seriados de 4µm de espessura no sentido vestibulo/lingual ao longo eixo do dente. As lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e PicroSirius Red.

4.6 Análises Histológica e Estereométrica

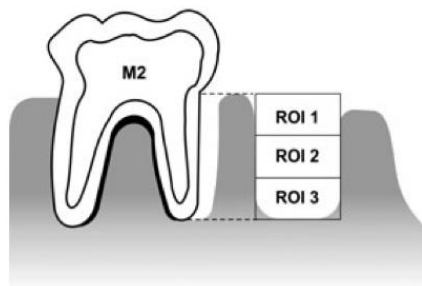
4.6.1 Análise histológica

A análise microscópica foi realizada por um único examinador através da avaliação dos cortes histopatológicos corados. As lâminas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha), para observações morfológicas das estruturas periodontais da região do primeiro molar inferior. Foi realizada por um examinador treinado (LCS).

4.6.2 Análise estereométrica

A análise estereométrica foi realizada utilizando os métodos empregados por Conte Neto et al,²⁸. Foram realizadas medições na região relativa a raiz distal do primeiro molar (M1), delimitando uma área quadrangular, que se estendeu desde o nível da junção cimento/esmalte (CEJ) do segundo molar (M2) até a porção apical do M2 e entre a mesial e distal superfícies de osso alveolar. Esta área foi dividida em 3 seções (coronária – ROI 1; mediana – ROI 2; apical – ROI 3) (Figura 5).

Figura 5 - Esquema da definição do ROI para análise estereométrica.



ROI 1: na porção mais coronária do alvéolo, ROI 2: na porção mediana do alvéolo, ROI 3: na porção apical do alvéolo

Fonte: Conte Neto et al ²

As imagens das seções ROI 1, ROI 2, ROI 3 dos cortes microscópicos foram capturadas utilizando-se câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz comumente transmitida e objetiva de 40x (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemanha). A determinação da densidade volumétrica (%) de osso necrótico, osso vital, matriz de tecido conjuntivo, fibroblasto (identificados como células fusiformes ou estreladas, núcleo ovóide ou alongado), células inflamatórias e de outras estruturas (NDA) foi feita com auxílio de um programa analisador de imagens Fiji ImageJ (National Institutes of Health, USA) por um examinador treinado e cego para os grupos. Foram analisados 3 cortes por defeito, que representaram no sentido vestibulo/lingual a porção vestibular, média e lingual, a intervalos de 12 cortes. A quantificação foi feita com auxílio de uma grade de 75x75 pixels com 252 pontos de intersecção posicionadas em cortes.

4.7 Análise dos Resultados

Os dados obtidos nas análises das imagens do microtomógrafo e da estereometria foram numéricos e devido a isso foram submetidos a análise da distribuição dos dados pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Como os dados se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central, foi aplicado o teste paramétrico de one-way Anova complementado pelo teste de Tukey para comparação dos dados de BV/TV entre os grupos. O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para execução da análise estatística. Todos os testes foram aplicados ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADO

5.1 Características Clínicas

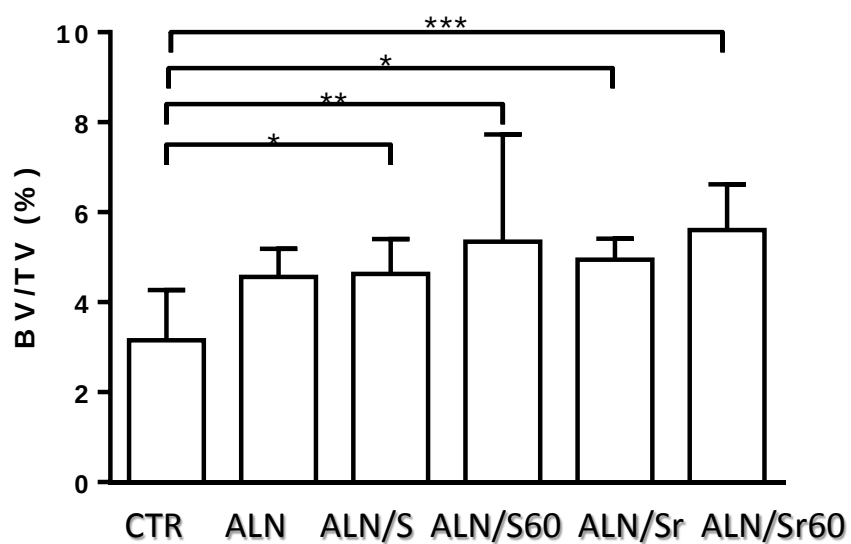
No momento da extração dos primeiros molares, os animais que receberam alendronato apresentaram, no momento da extração, maior dificuldade para remoção dos dentes, onde o procedimento de luxação foi difícil como se o dente estivesse anquilosado. Muitos dentes apresentaram a tábua óssea vestibular aderida ou quebravam suas raízes dentro dos alvéolos, impossibilitando a remoção, o que levou a perda de muitas amostras. No período de pós-operatório, muitos animais apresentaram fístulas extra-orais, edema na região da extração, osso exposto com supuração, perda de peso devido a dificuldade de mastigação e alguns foram a óbito por estarem bem enfraquecidos.

Os animais do grupo controle (que não receberam alendronato) não apresentaram dificuldade na extração, durante a luxação os dentes foram facilmente extraídos.

5.2 Análise Microtomográfica

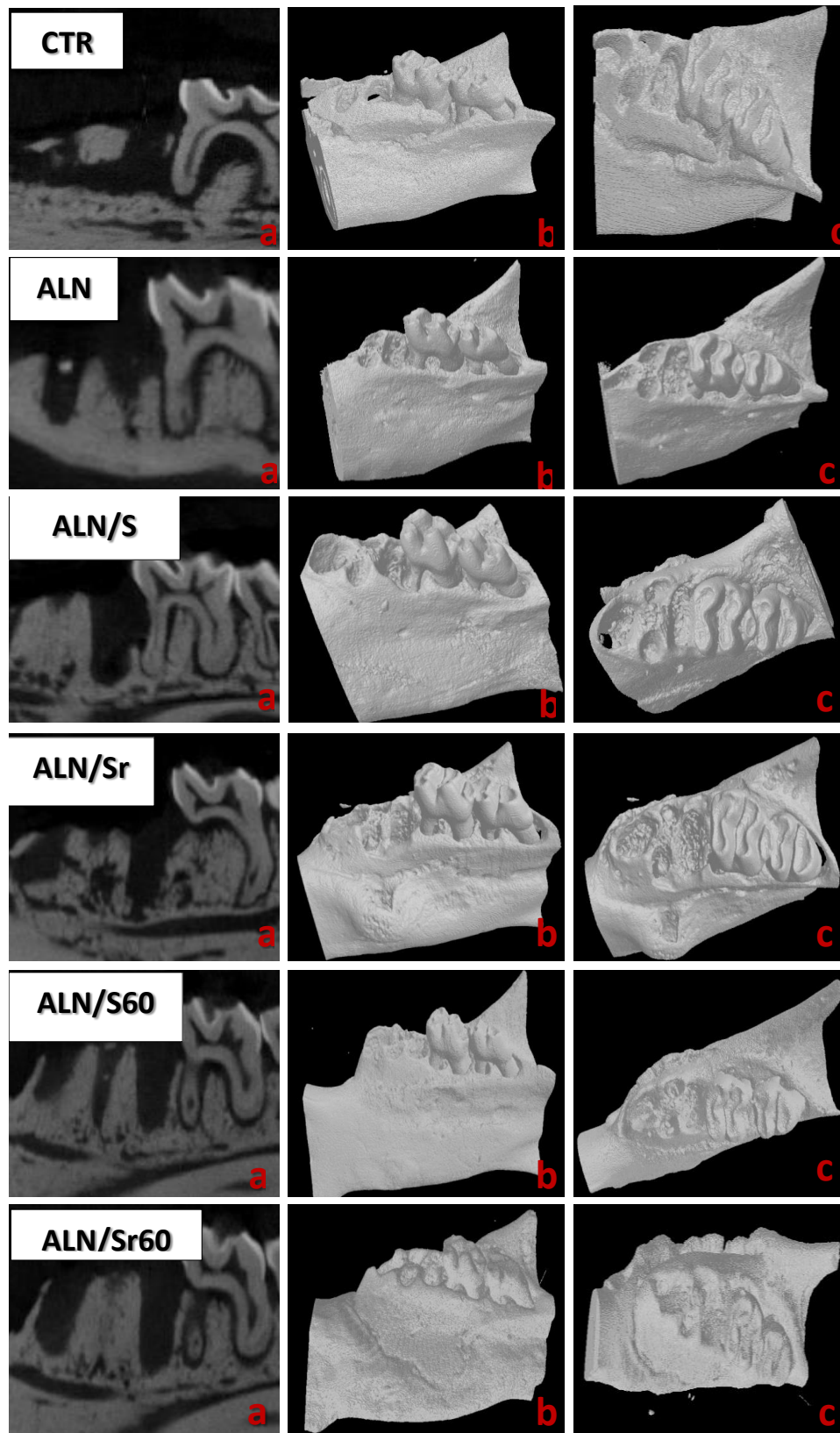
Os resultados da análise microtomográfica (Figura 6) demonstraram que os animais do grupo controle apresentaram menores volumes de tecidos mineralizados em relação aos animais dos outros grupos (Gráfico 1). Os grupos em que foram administrados ranelato de estrôncio como tratamento, não apresentaram diferenças estatísticas significativas com os grupos onde somente foram administrados alendronato com ou sem sua interrupção (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Dados de média e desvio padrão de Volume ósseo (VO)/Volume total dos tecidos presentes (AT) (%) de todos os grupos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ - One-way Anova complementado pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaboração própria

Figura 6 - Imagens para avaliação microtomográfica representativas dos grupos.



A – imagem 2D da área de extração do primeiro molar; B- imagem 3D em plano vestibular da mandíbula; C- imagem 3D em plano oclusal da mandíbula
 Fonte: Elaboração própria

5.3 Análise Histológica

Os grupos que foram tratados com alendronato associados ou não ao ranelato de estrôncio, apresentaram na região dos septos interdental e interradicular do primeiro molar inferior, áreas com tecido ósseo necróticos, reconhecidos por suas lacunas vazias e circundados por tecido amorfo (Figura 7). Nos grupos tratados com ranelato de estrôncio (ALN/Sr e ALN/Sr60) (Figura 7: 4a-c e 6a-c, respectivamente), observa-se áreas com necrose, entretanto, estavam presentes áreas de mineralização, conservação de osteócitos, com ausência ou poucas áreas de reabsorção. Nesses casos, na porção basal do alvéolo observou-se tecido de granulação e grandes áreas sugestivas de deposição de matriz óssea, a qual sugestiva de matriz colágena, o que foi confirmada com a coloração das lâminas com PicroSirius Red (Figura 8).

Os animais tratados com Alendronato (ALN, ALN/S60 e ALN/S)(Figura 7 : 2a-c, 3a-c, 5a-c), apresentavam na região basal do osso alveolar acentuada reabsorção óssea intrinsecamente associadas às áreas necróticas. As áreas de reabsorção estavam ocupadas por tecido amorfo e um intenso infiltrado inflamatório na sua maioria mononucleares adjacente ao alvéolo dental. O tecido de granulação presente nos alvéolos apresentou-se imaturo, com abundante infiltrado leucocitário e neoformação de vasos sanguíneos suportados por delgada trama de feixes de fibras de colágeno, porém, com tecido necrótico na superfície da região.

O grupo CTR (Figura 7 : 1a-c) apresentou formação de tecido de granulação dentro da normalidade, ocupando toda a ferida cirúrgica. O tecido ósseo subjacente em reparação apresentava-se com osteócitos íntegros e ausência de osteoclastos. Em alguns cortes pode-se observar fragmentos de tecido ósseo externo a ferida cirúrgica e, nesse caso a espícula óssea se apresentava necrótica, porém com uma reparação dentro da normalidade.

Figura 7 - Corte histológico vestibulo-lingual (HE) da região de alvéolo nos diferentes grupos. Aumento de 2,5X as imagens a dos diferentes grupos, aumento de 10x nas imagens b e 20x nas imagens c. A identificação das estruturas celulares são: 2M – segundo molar; ON – osso necrótico; OV- osso vital, IF – células inflamatórias; TA- tecido amorfo; TG- tecido de granulação com fibras colágenas

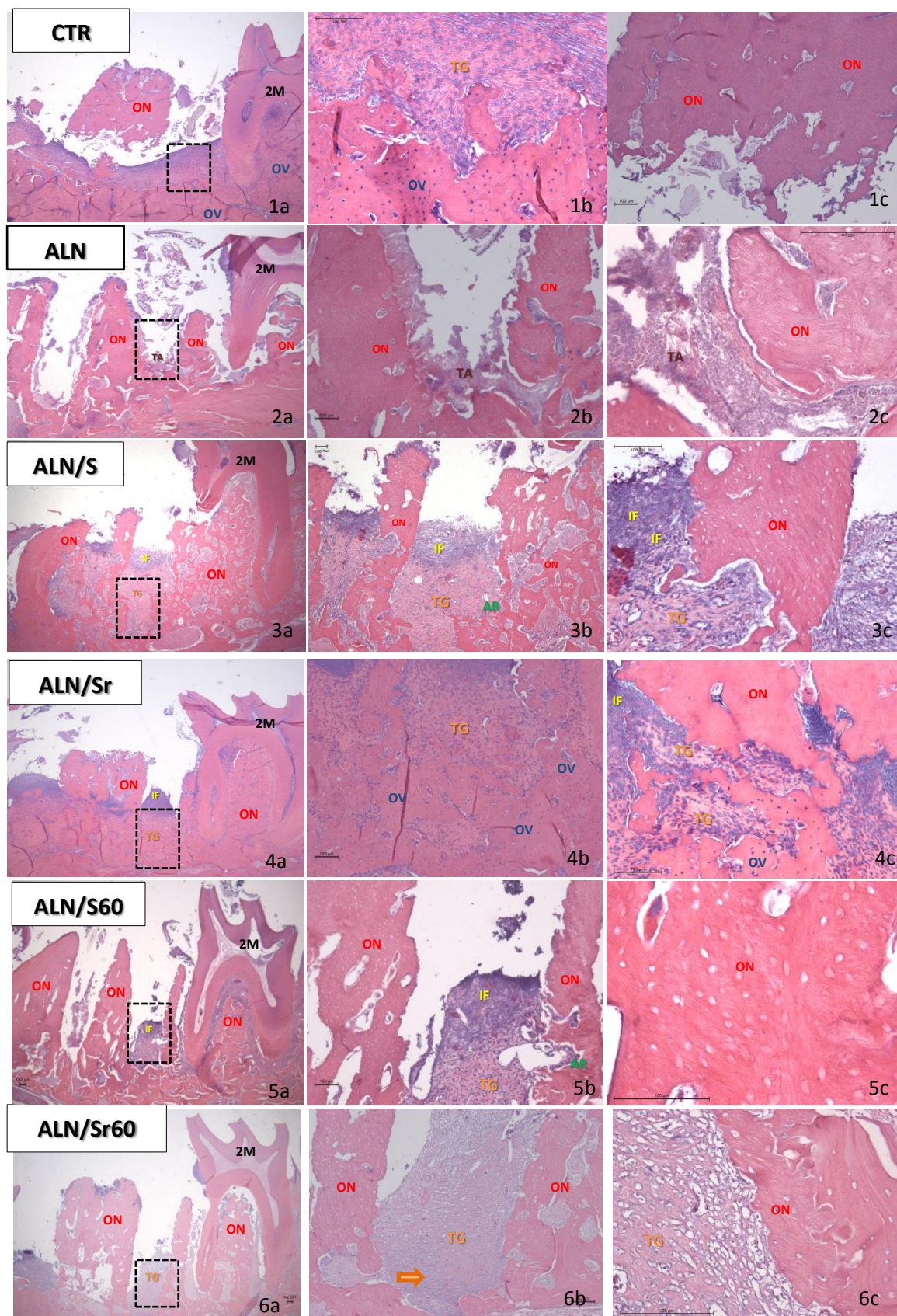
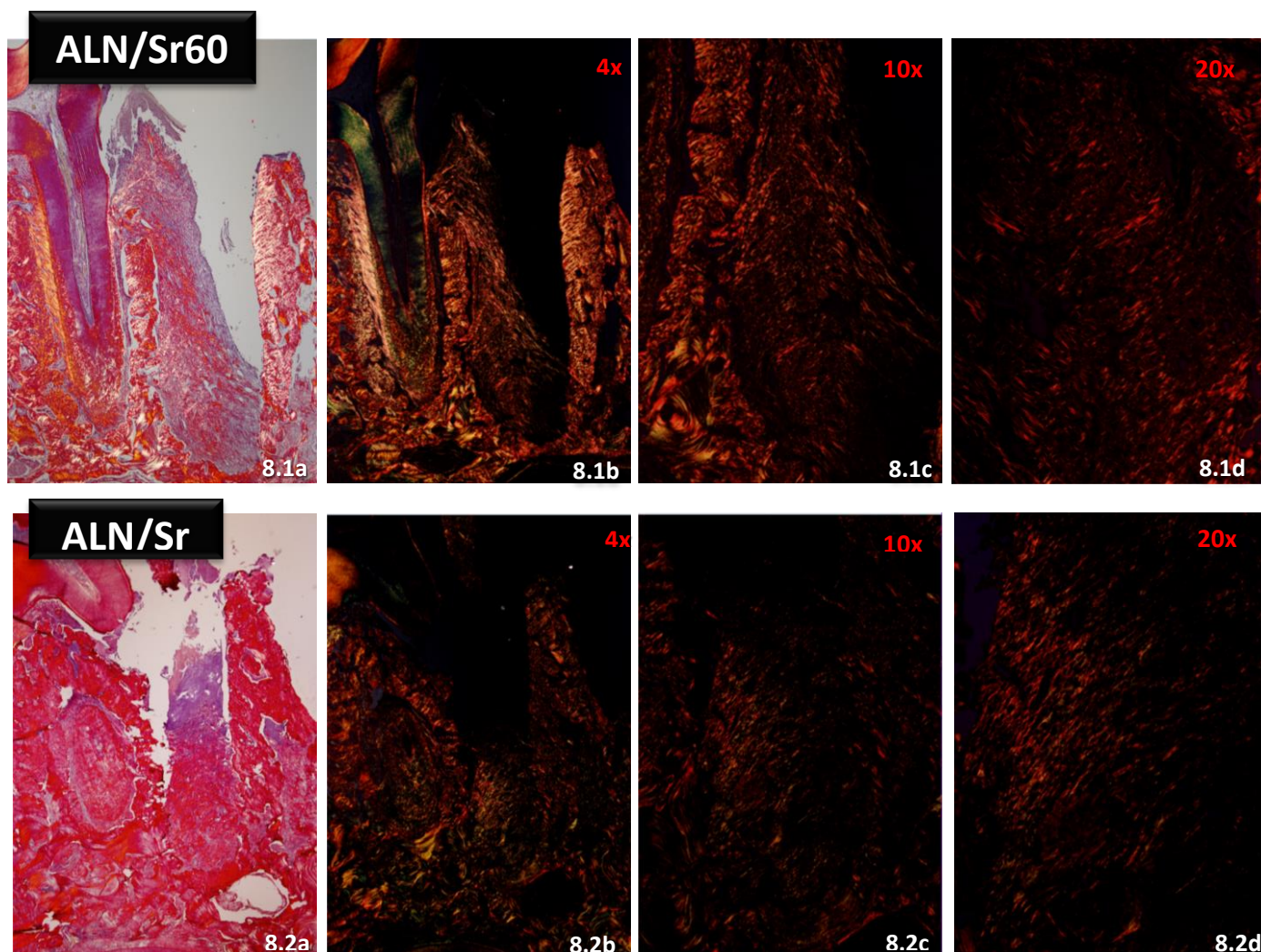


Figura 8 - Corte histológico com a coloração PicroSirius Red dos grupos Alendronato/Estrôncio e Alendronato/Estrôncio60 para a confirmação da neoformação de matriz óssea.



A – Coloração Picrosirius Red - aumento de 4x; B, C, D - Microscópio de polarização: B – aumento de 4x; C – aumento de 10x; D – aumento de 20x

Fonte: Elaboração própria

5.4 Análise Estereométrica

Não houve diferenças entre os grupos e dentro de cada grupo com relação a quantidade de células inflamatórias (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão da porcentagem de células inflamatórias nas diferentes regiões de interesse no alvéolo do primeiro molar inferior em todos os grupos (%).

Grupo/Componente	ROI 1	ROI 2	ROI 3
CTR	13.33±9.07	33.10±34.81	31.59±29.27
ALN	7.87±19.28	14.68±23.59	21.56±28.67
ALN/S	13.73±18.89	23.17±24.59	0.00±0.00
ALN/S60	9.28±20.76	13.73±15.78	9.92±22.18
ALN/Sr	18.10±19.22	21.75±28.60	11.27±24.32
ALN/Sr60	8.17±18.28	24.21±22.05	12.06±13.95

Fonte: Elaboração própria

Foi verificado que houve uma maior quantidade de osso necrótico no grupo ALN em comparação aos grupos CTR e ALN/S no ROI 2. Também foi verificado uma maior quantidade de osso necrótico no grupo CTR em comparação aos grupos ALN/S, ALN/Sr e ALN/Sr60 no ROI 3. O grupo CTR apresentou maior quantidade de osso necrótico no ROI 3 do que no ROI 2 (Tabela 2).

Tabela 2 - Média e desvio padrão da porcentagem de osso necrótico nas diferentes regiões de interesse no alvéolo do primeiro molar inferior em todos os grupos (%)

Grupo/Componente	ROI 1	ROI 2	ROI 3
CTR	2.61±5.85a,b	1.90±4.25b	47.46±31.52#a
ALN	20.11±28.88	32.80±29.79*	31.75±22.66
ALN/S	3.88±3.30	0.31±0.70	4.44±6.31
ALN/S60	0.00±0.00	12.94±11.24	15.32±18.81
ALN/Sr	8.41±7.71	7.61±16.16	7.61±17.04
ALN/Sr60	4.20±5.89	10.71±11.39	2.85±6.38

*Maior quantidade de osso necrótico do que no grupo CTR e ALN/S no ROI 2; #Maior quantidade de osso necrótico do que nos grupos ALN/S, ALN/Sr e ALN/Sr60. One-way Anova complementado por Tukey. Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo. Repeated Measurements Anova complementado pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração própria

Não houve diferenças entre os grupos em relação a quantidade de matriz de tecido conjuntivo. Entretanto, foi verificado que no grupo ALD/Sr60 houve maior quantidade de matriz de tecido conjuntivo no ROI 3 em comparação ao ROI 1 (Tabela 3).

Tabela 3 - Média e desvio padrão da porcentagem de matriz de tecido conjuntivo nas diferentes regiões de interesse no alvéolo do primeiro molar inferior em todos os grupos (%).

Grupo/Componente	ROI 1	ROI 2	ROI 3
CTR	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ALN	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ALN/S	5.63±12.60	29.05±25.22	30.00±26.85
ALN/S60	0.00±0.00	23.17±31.94	21.98±21.94
ALN/Sr	13.81±17.87	11.75±14.14	18.17±19.28
ALN/Sr60	1.98±4.43b	5.79±12.96a,b	27.30±18.52a

Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo. Repeated Measurements Anova complementado pelo teste de Tukey
Fonte: Elaboração própria

Com relação a quantidade de fibroblastos, foi observado que o grupo ALN/Sr60 apresentou maior quantidade dessas células em comparação aos grupos CTR e ALN no ROI 3 (Tabela 4).

Tabela 4 - Média e desvio padrão da porcentagem de fibroblastos nas diferentes regiões de interesse no alvéolo do primeiro molar inferior em todos os grupos (%).

Grupo/Componente	ROI 1	ROI 2	ROI 3
CTR	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ALN	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ALN/S	0.63±1.42	6.66±9.12	4.76±6.81
ALN/S60	0.00±0.00	5.47±6.97	2.61±2.71
ALN/Sr	4.28±8.29	1.11±2.48	1.74±3.90
ALN/Sr60	0.71±1.59	2.77±6.21	8.81±6.30*

*Maior quantidade de fibroblastos do que nos grupos CTR e ALN no ROI 3- One-way Anova complementado por Tukey.

Fonte: Elaboração própria

Foi verificado que o grupo ALN/Sr apresentou maior quantidade de osso vital do que os grupos CTR, ALN, ALN/S e ALN/S60 no ROI 2 e do que os grupos CTR e ALN no ROI 3 (Tabela 5).

Tabela 5 - Média e desvio padrão da porcentagem de osso vital nas diferentes regiões de interesse no alvéolo do primeiro molar inferior em todos os grupos (%).

Grupo/Componente	ROI 1	ROI 2	ROI 3
CTR	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
ALN	0.00±0.00	0.00±0.00	12.37±19.70
ALN/S	0.07±0.17	3.25±7.27	14.13±13.36
ALN/S60	0.00±0.00	2.69±5.19	29.60±27.04
ALN/Sr	9.52±21.30	34.76±27.78*	50.08±23.70#
ALN/Sr60	5.71±12.78	9.52±16.39	27.46±16.43

*Maior quantidade de osso vital do que nos grupos CTR, ALN, ALN/S e ALN/S60 no ROI 2; # Maior quantidade de osso vital do que nos grupos CTR e ALN no ROI 3 - One-way Anova complementado por Tukey.

Fonte: Elaboração própria

Não houve diferenças entre os grupos com relação ao NDA. Em todos os grupos, com exceção do grupo ALN/S, houve maior quantidade de NDA no ROI 1 em comparação ao ROI 3 (Tabela 6).

Tabela 6 - Média e desvio padrão da porcentagem de NDA regiões de interesse no alvéolo do primeiro molar inferior em todos os grupos (%).

Grupo/Componente	ROI 1	ROI 2	ROI 3
CTR	84.05±12.83a	65.00±36.75a,b	20.95±20.21b
ALN	72.02±36.14a	52.51±37.00a	34.33±35.58b
ALN/S	76.03±28.83	37.54±47.24	46.67±45.18
ALN/S60	90.71±20.76a	41.98±35.96 a,b	20.48±23.87b
ALN/Sr	45.87±33.76a	23.02±28.90a,b	11.11±13.75b
ALN/Sr60	79.21±21.43a	46.98±25.32b	21.51±26.09b

Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo. Repeated Measurements Anova complementado pelo teste de Tukey

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

O bisfosfonato é um medicamento antirreabsortivo comumente utilizado em pacientes que apresentam doenças no metabolismo ósseo, devido sua alta capacidade e eficiência na estabilização da perda óssea patológica⁴⁶ acarretada por essas doenças, porém o seu uso crônico a longo do tempo esta associado a osteonecrose dos maxilares pós procedimentos cirúrgicos, o que vem causando preocupações aos cirurgiões dentistas. Devido a esse efeito adverso, vários estudos tem buscado novos medicamentos para tratamentos ou terapias das enfermidades onde atualmente são indicados os bisfosfonatos^{25, 26, 47, 17}. Entre eles, o Ranelato de Estrôncio tem apresentado resultados promissores^{35, 40, 41} na diminuição da perda de densidade mineral óssea, se diferenciando por atuar em uma via do metabolismo ósseo diferente do bisfosfonato.

Os bisfosfonatos possuem capacidade seletiva de aderir ao osso mineralizado consequentemente impedindo a reabsorção óssea por meio de efeitos intracelulares agindo diretamente na via de sinalização do mevalonato, inibindo a via farnesil-pirofosfato que coíbe a prenilação das proteínas de ligação responsáveis pela sobrevivência dos osteoclastos⁵. Em razão desse fato, estudos vêm relatando que o aparecimento de lesões necróticas após procedimentos cirúrgicos em maxilares acontece em consequência dos tecidos ósseos com o excesso de bisfosfonato não apresentarem capacidade de executar o aumento da demanda nos processos remodelação óssea em ocorrências de infecções ou traumas que ocorreriam naturalmente após a cirurgia, favorecendo o desenvolvimento de osteonecrose⁴⁸.

Diferentemente do bisfosfonatos, o Ranelato de Estrôncio apresenta um potencial de atuar nos mecanismos de reabsorção óssea conjuntamente com os mecanismos de formação óssea. Sua maneira de agir inibindo a reabsorção é induzindo a apoptose de osteoclasto, por meio da ativação dos receptores sensíveis ao cálcio (CaR) encontradas em células esqueléticas e não esqueléticas, ou agir em receptores distintos do cálcio, ativando células sinalizadoras que promove o aumento, diferenciação e atividade de células pré-osteoblásticas e simultaneamente permite o aumento de prostaglandina E2 (PGE2), que apresenta a capacidade de diferenciar os pré-osteoblastos em osteoblastos. Outra maneira de atuar no metabolismo ósseo esta relacionada à sua competência de gerar um aumento dos níveis de osteoprotegerina (OPG), aumentando a ligação RANK/OPG,

consequentemente inibindo a ativação da via de sinalização de sobrevivência dos osteoclastos impedindo assim a osteoclastogênese^{23,38,49}.

Os resultados do presente estudo demonstraram, que a administração de bisfosfonato apresenta-se eficiente na estabilização da perda óssea patológica, ou seja, possuem efeitos positivos sobre o reparo e estabilização de tecido ósseo em alvéolos pós extração cirúrgica. Esses dados foram supostamente confirmados pela análise microtomográfica, onde a presença de tecido mineralizado nos grupos em que foram administrados alendronato ou associação de alendronato/estrôncio apresenta-se maior em relação ao grupo controle, em que não foi administrado esse medicamento⁵¹. Apesar de relatarmos uma estabilização de tecido mineralizado pós-extração não conseguimos, somente com essa análise, determinar a procedência dos tecidos mineralizados encontrados.

Através da análise histológica, foi possível determinar a diferenciação dos tecidos e o processo de reparação presentes nos alvéolos. De acordo com o protocolo de Conte-Neto et al.²⁸, foi possível estabelecer o processo de osteonecrose nos grupos em que foram administrados alendronato, caracterizado pela presença de tecido ósseo necrótico no processo alveolar, septo interdental e interradicular, superfície reabsorvida com lacunas ósseas vazias, ou seja com ausência de osteócitos⁵² e também presença de tecido inflamatório⁵³. A diferença histológica entre os grupos se caracterizou pela presença do tratamento ou terapia com ranelato de estrôncio, onde foi possível observar que além da presença de tecido necrótico no septo interdental e interradicular esses tecidos eram mais densos em comparação aos outros grupos, o que pode ser explicado pela capacidade do estrôncio de depositar sobre os cristais de hidroxiapatita e a longo prazo substituir o cálcio, permanecendo ligado ao tecido ósseo²³. Por outro lado, abaixo do tecido necrótico, na porção basal do alvéolo observa-se tecido de granulação e áreas de matriz óssea, com ausências ou diminutas áreas de reabsorção, confirmando seu duplo efeito no metabolismo ósseo descritos por Maire et al.²³, que relatou que o estrôncio é capaz de atuar na reabsorção óssea através da diminuição de osteoclastos e também na formação óssea por meio da diferenciação de osteoblastos, promovendo um turnover ósseo a favor da neoformação óssea. Nos grupos em que foi realizadas a interrupção do alendronato antes ou após a cirurgia, também foi observado a presença de tecido de granulação com a presença de feixes de fibras colágenas além da presença de tecido ósseo necrótico. Já o grupo Controle, onde não foi

administrado nenhum tipo de medicamento, apresentou reparação dentro da normalidade, com a presença de tecido de granulação, porém presença de fragmentos de tecido ósseo necrótico, espículas ósseas que se apresentavam necróticas, na região do alvéolo, altura óssea de tecido ósseo alveolar mais baixa em relação em outros grupos, característica essa observada também por Aguirre et al.⁵¹ que avaliou em ratos os efeitos dos bisfosfonatos na reparação alveolar pós extração.

A seleção dos 3 tipos de ROIs correspondentes ao alvéolo distal do primeiro molar extraído foi estabelecida de acordo com Conte-Neto et al.²⁸, foi realizada de maneira a comparar os tecidos presentes no interior do alvéolo pós extração em relação a altura de tecido ósseo nos dentes presentes. Os dados obtidos estão de acordo com os achados histológicos, no ROI 1 em todos os grupos dificilmente foram encontrados algum tipo de tecido, os mais comuns encontrados eram tecidos necróticos ou infiltrado inflamatório, que podem ser explicados por Koss et al.⁵⁴ que descreve que a exposição óssea causada por bisfosfonatos permite aumento da adesão de bactérias e consequente necrose óssea. Na região apical, ROI 2 e ROI 3, observamos que os grupos em que foram administrados alendronato ou alendronato/estrôncio apresentaram uma maior quantidade de tecidos inflamatório, mineralizado ou matriz óssea em comparação ao grupo controle que pode ser explicado por uma estabilização da perda óssea patológica, porém a composição dos tecidos presentes na reparação se diferenciam entre os grupos, onde o grupo controle apresentou uma maior quantidade de tecido necrótico em relação aos demais grupos e os grupos em que foram administrados estrôncio além de tecido necrótico apresentaram quantidades significativas de matriz de tecido conjuntivo. A presença de tecido necrótico chamou atenção no grupo controle, estes achados podem estar relacionados com a presença espículas ósseas, que foram deixadas no momento da extração.

A dose e o período de alendronato necessários para o desenvolvimento de osteonecrose foram estabelecidos por trabalhos na literatura como Conte-Neto et al.²⁸. Já para o Ranelato de Estrôncio foi utilizado uma dosagem terapêutica de acordo com Mierzwa et al.⁴³, Lavet et al.⁴⁴, Komrakova et al.⁵⁵, para o tratamentos de doenças relacionadas ao tecido ósseo. No período da extração, para estimular o processo de osteonecrose, os grupos em que foram administrados alendronato apresentaram uma maior dificuldade cirúrgica, aumento do tempo cirúrgico e

aumento das fraturas radiculares, fato esse também observado por Conte Neto et al.²⁸, característica clínica também observada por Bruce et al.⁵⁶, Malkawi et al.⁵⁷ onde afirmaram que a capacidade do bisfosfonato em aumentar a densidade óssea e consequentemente aumentar a dificuldade da extração. Após o procedimento cirúrgico como previsto por Estilo et al.²⁷, Conte-Neto et al.⁵⁸, foi possível observar clinicamente principalmente nos grupos em que foram administrados somente alendronato a presença de inchaço na região posterior inferior e até mesmo o aparecimento de fistula extra oral e supuração, confirmando o diagnóstico de osteonecrose. A ferida cirúrgica após 30 dias da extração apresentava-se aberta, osso exposto, característica de osteonecrose que pode ser explicado por Kobayashi et al.⁵⁹, Landesberg et al.⁶⁰, onde relatam o efeito dos bisfosfonatos na inibição da migração de células epiteliais normais o que interferem diretamente na cicatrização da ferida e consequente aparecimento das exposições ósseas em alvéolos.

A dosagem de estrôncio utilizada é para o tratamento de doenças relacionadas ao metabolismo ósseo e não especificamente para o tratamento de osteonecrose, portando ainda é necessária estudos em relação a este fato, que possam ajustar a dosagem do estrôncio para que possa chegar a uma concentração ideal para esse tipo de tratamento. Por outro lado, esse protocolo de estudo embora tenha simulado um período de administração crônica em animais, com doses elevadas para indução de osteonecrose em procedimentos cirúrgicos, os animais apresentavam-se saudáveis, e o medicamento é utilizado em pacientes que apresentam alteração patológica no metabolismo ósseo podendo trazer diferenças nos resultados.

Os resultados da administração de ranelato de estrôncio no tratamento ou terapia da osteonecrose causada pela utilização de bisfosfonatos, demonstraram uma melhora nos efeitos colaterais da osteonecrose, onde, mesmo na presença de tecido necrótico ocorreu a formação de matriz de tecido ósseo na porção basal dos alvéolos.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos podemos concluir que a utilização do ranelato de estrôncio não alterou o aparecimento inicial da osteonecrose por bisfosfonato, embora tenha ocorrido um aumento de matriz col nos alvéolos que receberam o medicamento. Mais estudos pré-clínicos devem ser realizados utilizando outros protocolos de utilização do ranelato de estrôncio, como alteração da dose e tempo de administração.

REFERÊNCIAS*

1. Tolia M, Zygogianni A, Kouvaris JR, Meristoudis C, Margari N, Karakitsos P, et al. The key role of bisphosphonates in the supportive care of cancer patients. *Anticancer Res.* 2014; 34(1): 23–37.
2. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;142:155–70.
3. Neto NC, de Souza Bastos A, Chierici-Marcantonio RA, Marcantonio E. Is rheumatoid arthritis a risk factor for oral bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Med Hypotheses.* 2011; 77(5): 905–11.
4. Choudhary M, Ahmed AA, Williamson JG. Sole bladder metastasis from breast cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2003; 23(2): 212.
5. Russell RGG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A, Hulley PA, et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sc.* 2007; 111(7): 209-57.
6. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 2000; 88(3): 2961–78.
7. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ, Boyce, Roodman, et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 pt2):6222–31.
8. Viereck V, Emons G, Gründker C, Lauck V, Hofbauer LC, Frosch KH, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 291(3): 680–6.
9. Maruotti N, Corrado A, Neve A, Cantatore FP. Bisphosphonates: Effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012; 68(7): 1013–8.
10. Ohe JY, Kwon YD, Lee HW. Bisphosphonates modulate the expression of OPG and M-CSF in hMSC-derived osteoblasts. *Clin Oral Investig.* 2012;16(4):1153–9.
11. Gracis S. Prosthetic and biomechanical factors affecting bone remodeling

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- around implants. *Eur J Esthet Dent*. 2013; 8(2): 314-33.
12. Zhang X, Hamadeh IS, Song S, Katz J, Moreb JS, Langaee TY, et al. Osteonecrosis of the Jaw in the United States Food and Drug Administration's Adverse Event Reporting System (FAERS). *J Bone Miner Res*. 2016;31(2):336–40.
 13. Nicolatou-Galitis O, Papadopoulou E, Sarri T, Boziari P, Karayianni A, Kyrtsolis MC, et al. Osteonecrosis of the jaw in oncology patients treated with bisphosphonates: prospective experience of a dental oncology referral center. *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(2):195–202
 14. Orozco C, Maalouf NM. Safety of bisphosphonates. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012;38(4):681–705.
 15. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid – related osteonecrosis of the jaws. experimental model with dental extractions in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42(6):744–50.
 16. De Molon RS, Shimamoto H, Bezouglaia O, Pirih FQ, Dry SM, Kostenuik P, et al. OPG-Fc but not zoledronic acid discontinuation reverses osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice. *J Bone Miner Res*. 2015;30(9):1627–40.
 17. Yanik S, Aras MH, Erkiliç S, Bozdağ Z, Demir T, Çetiner S. Histopathological features of bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw in rats with and without vitamin d supplementation. *Arch Oral Biol*. 2016;65:59–65.
 18. Kang P, Xie X, Tan Z, Yang J, Shen B, Zhou Z, et al. Repairing defect and preventing collapse of femoral head in a steroid-induced osteonecrotic of femoral head animal model using strontium-doped calcium polyphosphate combined BM-MNCs. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(2):80.
 19. Pemmer B, Hofstaetter JG, Meirer F, Smolek S, Wobrauschek P, Simon R, et al. Increased strontium uptake in trabecular bone of ovariectomized calcium-deficient rats treated with strontium ranelate or strontium chloride. *J Synchrotron Radiat*. 2011;18(6):835–41.
 20. Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents Osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2011;22(6):1659–67.
 21. Wu Y, Adeeb SM, Duke MJ, Munoz-Paniagua D, Doschak MR. Compositional and material properties of rat bone after bisphosphonate and or strontium

- ranelate drug treatment. *J Pharm Pharm Sci*. 2013;16(1):52-64.
22. 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*. 1996;18(6):517–23.
 23. Marie PJ. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18(Suppl 1):11–5.
 24. Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T. S12911-2 Inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res*. 2003;18(6):1082–7.
 25. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005;63(11):1567–75.
 26. Dincă O, Zurac S, Stăniceanu F, Bucur B, Bodnar DC, Vlădan C, et al. Clinical and histopathological studies using fibrin-rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(3):961–4.
 27. Estilo CL, Van Poznak CH, Williams T, Bohle GC, Lwin PT, Zhou Q, et al. Osteonecrosis of the maxilla and mandible in patients with advanced cancer treated with bisphosphonate therapy. *Oncologist*. 2008;13(8):911–20.
 28. Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S. Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(1):65–73.
 29. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res* 2014;28(7):1631–40.
 30. Longato L, Cavalli L, Marcucci G, Metozzi A, Giusti F, Brandi ML, et al. Osteonecrosis of the jaw in a patient with rheumatoid arthritis treated with an oral aminobisphosphonate: a clinical case report. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2013;10(2):139–41.
 31. Krstevska S, Stavric S, Cevrevska L, Georgjievski B, Karanfilski O, Sotirova T, et al. Osteonecrosis of the jaw after bisphosphonates treatment in patients with multiple myeloma. *Med Arch*. 2015;69(6):367.
 32. de Molon RS, Cheong S, Bezouglaia O, Dry SM, Pirih F, Cirelli JA, et al. Spontaneous osteonecrosis of the jaws in the maxilla of mice on antiresorptive

- treatment: A novel ONJ mouse model. *Bone*. 2014;68:11–9.
33. Tanaka J, Kokuryo S, Yoshiga D, Tsurushima H, Sakaguchi O, Habu M, et al. An osteonecrosis model induced by oral bisphosphonate in ovariectomised rats. *Oral Dis*. 2015;21(8):969–76.
 34. Kim JW, Landayan MEA, Lee JY, Tatad JCI, Kim SJ, Kim MR, et al. Role of microcracks in the pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Clin Oral Investig*. 2016;20(8):2251–8.
 35. 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*. 2001;29(2):176–9.
 36. Maïmoun L, Brennan TC, Badoud I, Dubois-Ferriere V, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone*. 2010;46(5):1436–41.
 37. Querido W, Farina M, Anselme K. Strontium ranelate improves the interaction of osteoblastic cells with titanium substrates: Increase in cell proliferation, differentiation and matrix mineralization. *Biomater*. 2015;5:e1027847.
 38. Chen B, Li Y, Yang X, Xu H, Xie D. Zoledronic acid enhances bone-implant osseointegration more than alendronate and strontium ranelate in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*. 2013;24(7):2115–21.
 39. Panahifar A, Cooper DML, Doschak MR. 3-D localization of non-radioactive strontium in osteoarthritic bone: role in the dynamic labeling of bone pathological changes. *J Orthop Res*. 2015;33(11):1655–62.
 40. Catalano A, Morabito N, Di Stefano A, Morini E, Basile G, Faraci B, et al. Vitamin D and bone mineral density changes in postmenopausal women treated with strontium ranelate. *J Endocrinol Invest*. 2015;38(8):859–63.
 41. Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, et al. The impact of strontium ranelate on metaphyseal bone healing in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(4):391–401.
 42. Morabito N, Catalano A, Gaudio A, Morini E, Bruno LM, Basile G, et al. Effects of strontium ranelate on bone mass and bone turnover in women with thalassemia major-related osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2016;34(5):540–6.
 43. Mierzwa AGH, Campos JF, Jesus MF, Nader HB, Lazaretti-Castro M, Reginato RD. Different doses of strontium ranelate and mechanical vibration modulate

- distinct responses in the articular cartilage of ovariectomized rats. *Osteoarthr Cartil.* 2017;25(7):1179–88.
44. Lavet C, Mabilieu G, Chappard D, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate stimulates trabecular bone formation in a rat tibial bone defect healing process. *Osteoporos Int.* 2017;28(12):3475–87.
 45. Zhao Y, Robson Brown KA, Jin ZM, Wilcox RK. Trabecular level analysis of bone cement augmentation: a comparative experimental and finite element study. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(10):2168–76.
 46. Adachi JD SK. Two year effect of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* 2001;44(1):202–11.
 47. Ikeda T, Kuraguchi J, Kogashiwa Y, Yokoi H, Satomi T, Kohno N. Successful treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the Jaw (BRONJ) patients with sitafloxacin: new strategies for the treatment of BRONJ. *Bone.* 2015;73:217–22.
 48. Woo S Bin, Mawardi H, Treister N. Comments on “Osteonecrosis of the jaws in intravenous bisphosphonate use: proposal for a modification of the clinical classification.” *Oral Oncol.* 2009;45(8):740.
 49. Blake GM, Fogelman I. Strontium ranelate: a novel treatment for postmenopausal osteoporosis: a review of safety and efficacy. *Clin Interv Aging.* 2006;1(4):367–75.
 50. Jee JH, Lee W, Lee B Do. The influence of alendronate on the healing of extraction sockets of ovariectomized rats assessed by in vivo microcomputed tomography. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(2):47–53.
 51. Aguirre J, Altman M, Vanegas S, Franz S, Bassit A, Wronski T. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis.* 2010;16(7):674–85.
 52. Cantatore FP, Acquista CA, Pipitone V. Evaluation of bone turnover and osteoclastic cytokines in early rheumatoid arthritis treated with alendronate. *J Rheumatol.* 1999;26(11):2318–23.
 53. Diaz-Borjon A, Seyler TM, Chen NL, Lim SS. Bisphosphonate-associated arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2006;12(3):131–3.
 54. Kos M. WITHDRAWN: Bisphosphonates promote jaw osteonecrosis through

- facilitating bacterial colonisation. *Med Hypotheses*. 2011;77(2):214–5.
55. Komrakova M, Weidemann A, Dullin C, Ebert J, Tezval M, Stuermer KM, et al. The impact of strontium ranelate on metaphyseal bone healing in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(4):391–401.
 56. Bruce RA, Frederickson GC, Small GS. Age of patients and morbidity associated with mandibular third molar surgery. *J Am Dent Assoc*. 1980;101(2):240–5.
 57. Malkawi Z, Al-Omiri MK, Khraisat A. Risk indicators of postoperative complications following surgical extraction of lower third molars. *Med Princ Pract*. 2011;20(4):321–5.
 58. Neto NC, de Souza Bastos A, Chierici-Marcantonio RA, Marcantonio E. Is rheumatoid arthritis a risk factor for oral bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Med Hypotheses*. 2011;77(5):905–11.
 59. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(2):165–75.
 60. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 66(5):839–47.

ANEXO A – Comitê de Ética



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"INFLUÊNCIA DO ESTRÔNCIO NÃO RADIOATIVO E DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE NO PROCESSO DE OSSEONECROSE INDUZIDA POR BISFOSFONATOS"**, protocolo nº 27/2015, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Rosemary Adriana Chierici Marcantonio** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 29/02/2015.

Vigência do Projeto	Junho/2018
Espécie/linhagem	Rato – Holtzmann
Nº de animais	80
Peso/Idade	180-210g – 8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara



Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data da defesa (prorrogado por mais 2 anos a partir de 2020)

(Direitos de publicação reservado ao autor)
Araraquara, 19 de março de 2018

Fernanda Castanheira Gonçalves