

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BISFOSFONATOS NITROGENADOS E NÃO NITROGENADOS EM OSSOS CURTOS E LONGOS: ESTUDO *IN VIVO*

LUÍSE DOS SANTOS FERREIRA¹; LAUREN FRENZEL SCHUCH²; STEPHANIE JOANA ROMAN MARTELLI³; MELISSA FERES DAMIAN⁴; ANA CAROLINA UCHOA VASCONCELOS⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – luiseferreira1@gmail.com

²Universidade Estadual de Campinas – laurenfrenzel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – sjmartelli@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – melissaferesdamian@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – carolinauv@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os Bisfosfonatos (BFs) são drogas indicadas para prevenção e tratamento de doenças caracterizadas por excessiva reabsorção óssea, como a osteoporose, osteogênese imperfeita, doença de Paget, mieloma múltiplo, e metástases ósseas de tumores sólidos. O uso BFs, introduzido no mercado farmacêutico na década de 70, é muito popular, e estima-se que, aproximadamente, 30 milhões sejam prescritos anualmente, apenas nos EUA (J Oral Maxillofac Surg, 2007). Os BFs apresentam diferentes potências e mecanismo de ação sendo, desta forma, classificados em compostos que apresentam ou não nitrogênio na sua composição molecular. O clodronato é exemplo de BF não nitrogenado e ácido zoledrônico é um BF nitrogenado (Oyhanart, 2015).

Um efeito colateral associado ao uso desse medicamento teve seu primeiro caso relatado em 2003 (Marx, 2003) e hoje é conhecida como osteonecrose dos maxilares associada ao uso de medicamentos (MRONJ). Uma condição clínica que acomete, exclusivamente, os ossos maxilares e que deve ser conhecida pelos cirurgiões-dentistas para diagnóstico e manejo adequados (Migliorati, 2019).

O objetivo do presente estudo foi comparar, através de parâmetros imaginológicos e histomorfométricos o efeito do ácido zoledrônico e do clodronato em osso curto (mandíbula) e longo (tibia) para investigar a ação de BFs com diferentes mecanismo de ação na estrutura de ossos com taxas metabólicas distintas.

2. METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA / PUC-RS) em abril de 2009 (Aprovação nº 09/00083), e os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais para o cuidado e utilização de animais.

Foram incluídas 34 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, *Wistar cepa*), com idade média de 120 dias e peso médio de 230g. Os animais foram alocados aleatoriamente em 3 grupos, de acordo com o BF usado: (1) grupo ZA - 12 animais foram tratados com ácido zoledrônico (Novartis Pharma AG, Basel, Suíça) 0,6 mg / kg, a cada 28 dias por via intraperitoneal (i.p.); (2) grupo CL - 12 animais tratados com clodronato (Jenahexal Pharma GmbH, Turíngia, Alemanha), 20 mg / kg, a cada 28 dias, via i.p. (Vasconcelos et.al., 2012); e (3) grupo controle - 10 animais receberam solução salina (cloreto de sódio a 0,9%). Os animais foram eutanasiados sob anestesia profunda com isoflurano (Cristália, Porto Alegre, RS, Brasil) em local apropriado a anestesia, após 120 dias da administração dos medicamentos. As

amostras foram examinadas para determinar a presença/ausência de lesão óssea macroscópica. Depois, as mandíbulas e as tibias esquerdas foram dissecadas e fixadas por 24 h em 10% tamponado formalina (TopGlass, Porto Alegre, RS, Brasil).

As amostras foram submetidas a tomografia computadorizada cone beam, utilizando um tomógrafo Prexion 3D (Terarecon, San Mateo, CA, EUA). As mandíbulas e tibias foram colocadas em caixas plásticas, imersas em formalina para atenuar a radiação. As caixas foram posicionadas na máquina de forma a ter uma altura ideal para a varredura tomográfica. Os seguintes parâmetros técnicos foram aplicados: 90 kVp, 4 mA, resolução de voxel 0,1 mm, 37s e um campo de visão de 56 × 52 mm (FOV).

As imagens tomográficas foram visualizadas e avaliadas por um examinador calibrado e cego usando o software Osirix 7.0 (OsiriX, <http://www.osirix-viewer.com>) que definiu a região de interesse (RI) em cada osso. Para cada mandíbula, uma RI anterior e posterior foram determinadas. Na tibia, foram estabelecidas RIs em regiões superior e inferior do osso cortical, na parte central da diáfise (Figura 1). Os valores de densidade óssea (DO) foram obtidos na imagem do plano sagital para todas as RIs, usando a ferramenta Point, em unidades Hounsfield (HU). Para cada região, cortes consecutivos foram analisados e então, o valor médio de DO foi obtido, para a mandíbula combinando a região anterior e posterior de cada espécime, e para tibia, combinando a cortical superior e inferior.

Todas as mandíbulas e tibias foram descalcificadas em ácido nítrico a 10% com ureia após exposição tomográfica. As mandíbulas eram hemi-seccionado, e o lado esquerdo foi selecionado para análise. Posteriormente, foram segmentadas de forma a ter um fragmento anterior e posterior, os quais foram embebidos em parafina separadamente. As tibias foram seccionadas no ponto médio do eixo sagital, e cada fragmento foi parafinado individualmente. Os blocos de parafina foram cortados em 4 μ m cortes e corados com hematoxilina e eosina (H&E).

A análise histomorfométrica foi realizada a partir das sessenta e oito lâminas histológicas obtidas das mandíbulas e 34 lâminas obtidas das tibias. Todas as lâminas foram digitalizadas por meio de um microscópio óptico Leica DM3000, conectado a uma Câmera Leica DFC7000 T e um computador AMD Phenon II X4 de 3,4 GHz com Software Leica Application Suite (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). As imagens foram capturadas usando uma objetiva de 10x e armazenadas em formato Tagged Image Format File (TIFF). No total, foram obtidas 255 imagens para as mandíbulas e 710 imagens para as tibias. Um examinador calibrado e cego, usando o software Adobe Photoshop CC C (Adobe Systems, San Jose, CA, USA), analisou as imagens. O tecido ósseo presente em cada campo foi selecionado, usando ferramentas de seleção, e quantificados usando o valor de pixel do Histograma. Em seguida, considerando o valor médio de pixel para cada espécime, uma proporção de volume ósseo (VO) foi obtida, correspondendo a proporção da área total da imagem ocupada exclusivamente por tecido ósseo (Mahl, 2009).

Para a calibração do examinador, na análise tomográfica foram usadas 10 imagens aleatorias e na análise histológica, 20 imagens histológicas aleatórias em 2 momentos diferente. Os resultados foram submetidos a um teste t pareado e coeficiente de correlação de Pearson, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) e forte correlação ($r > 0,9$). A comparação entre os BFs e o grupo controle, para cada osso, foi feito por meio de ANOVA, em um nível de significância de 5%. O teste t de Student foi usado para comparar os diferentes ossos, mandíbula e tibia, com um

significado nível de 5%. A análise estatística foi realizada com o Software Stata 15.0 (StataCorp, College Station, TX, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No exame macroscópico, nenhum dos ossos exibiu lesões ósseas visíveis. Os resultados da avaliação tomográfica são apresentados na Tabela 1. Não houve diferença estatisticamente significante na DO entre os grupos de BFs ou entre a mandíbula e a tibia. Ou seja, a DO não foi alterada pelo tipo ósseo ou pelo tipo de bisfosfonato administrado.

Os resultados da avaliação histomorfométrica da proporção VO são apresentados na Tabela 2. O VO entre os BFs e o grupo controle não apresentou diferença significativa. Ou seja, o tratamento com ácido zoledrônico ou clodronato não afetou o VO. Estes resultados podem indicar que os BFs alteram o metabolismo do osso cortical, possivelmente suprimindo a remodelação óssea intracortical nesses ossos (GÖNEN, 2018). No entanto, comparando os dois ossos, as mandíbulas no grupo controle apresentaram maior VO do que as tíbias do mesmo grupo. É possível pensar que o grupo controle - sem tratamento com bisfosfonato - a vitalidade óssea é mantida (Vasconcelos et al, 2012).

A ausência de qualquer diferença entre grupos e ossos no presente estudo pode ser parcialmente explicado por (1) dose de BF e período de administração, (2) falta de avaliações de pontos de tempo diferentes e (3) uso de animais adultos.

Tabela 1. Análise tomográfica. Quantificação da densidade óssea (DO), em Unidades Hounsfield (HU).

Grupo	N	Média mandíbula(DP)	Média tibia (DP)	
Ácido zoledrônico (AZ)	12	1619.32 (99.66)	1569.67 (199.56)	**p = 0.449
Clodronato	12	1567.59 (143.54)	1598.81 (145.48)	**p = 0.602
Grupo controle	10	1550.54 (136.85)	1612.22 (238.65)	**p = 0.487
*p = 0.419		*p = 0.871		

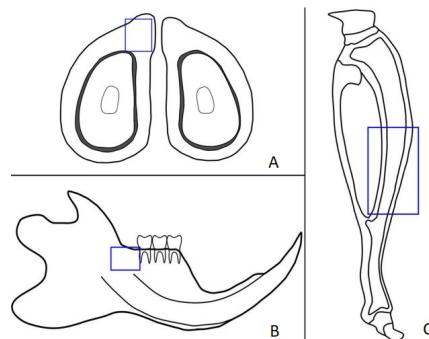
DP, desvio padrão; p, valor de p; *Teste ANOVA, comparação entre os grupos BF e controle, para cada osso; ** Teste t de Student, comparação entre ossos diferentes, para cada grupo de drogas.

Tabela 2. Análise histomorfométrica. Proporção (%) de volume ósseo (VO).

Grupo	N	Mandíbula(%)	Tibia (%)	
Ácido zoledrônico (AZ)	12	66.92 (7.52)	59.41 (10.51)	**p = 0.056
Clodronato	12	66.27 (17.32)	55.93 (10.27)	**p = 0.089
Grupo controle	10	68.11 (8.98)	55.75 (14.25)	**p = 0.032
*p = 0.939		*p = 0.698		

DP, desvio padrão; p, valor de p; *Teste ANOVA, comparação entre os grupos BF e controle, para cada osso; ** Teste t de Student, comparação entre ossos diferentes, para cada grupo de drogas.

Figura 1. Diagrama esquemático da quantificação de densidade óssea (DO). A: RI mandíbula anterior. B: RI mandíbula posterior. C: RI tibia.



4. CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados, concluímos que (1) a densidade óssea não foi alterada pelo tipo ósseo ou pelo tipo de BF administrado, e (2) o tratamento com ácido zoledrônico ou clodronato não afetou o volume ósseo na mandíbula ou tíbia dos grupos de teste.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 3, p. 369-76, 2007.

OYHANART, S. R.; ESCUDERO, N. D.; MANDALUNIS, P. M. Effect of alendronate on the mandible and long bones: an experimental study in vivo. **Pediatr Res**, v. 78, n. 6, p. 618-25, 2015.

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. In: (Ed.). **J Oral Maxillofac Surg**. United States, v.61, p.1115-7, 2003.

MIGLIORATI, C. A.; BRENNAN, M. T.; PETERSON, D. E. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 2019, n. 53, 2019.

VASCONCELOS, A. C. et al. Comparison of effects of clodronate and zoledronic acid on the repair of maxilla surgical wounds - histomorphometric, receptor activator of nuclear factor-kB ligand, osteoprotegerin, von Willebrand factor, and caspase-3 evaluation. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 9, p. 702-12, 2012.

MAHL, C.; FONTOURA, F.; BORELLI, P.; SILVA, I.; FONTANELLA, V. Mandible's radiographic and histomorphometric assessment in female rats medicated with glucocorticoid and biphosphonate. **Rev Facul Odontol Porto Alegre**, 50:16–19, 2009.

GÖNEN, Z. B. et al. Osseous changes in patients with medication-related osteonecrosis of the jaws. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 47, n. 1, p. 20170172, 2018.