

REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS EM RISCO DE OSTEONECROSE DOS MAXILARES INDUZIDA POR MEDICAMENTOS, SUBMETIDOS A REGENERAÇÃO ÓSSEA COM ENXERTO XENÓGENO E B-TRIFOSFATO DE CÁLCIO (B-TCP)

Jonathan Ribeiro¹, Rodrigo Pereira², Caroline Kloh Braga³, Samara Kelly Oliveira⁴, Julia Maia⁵, Nicolas Homsí⁷

¹Doutor em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela FOA UNESP, Docente do curso de Graduação em Odontologia do UNIFESO. bucomaxilofacial@outlook.com

Estrada do Monan Pequeno, 77, Badu, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil
55 21 964793275
55 21 35873403

²Doutor em Implantodontia pela FOA UNESP, Docente do curso de Graduação em Odontologia do UNIFESO.

³Discente do do curso de Graduação em Odontologia do UNIFESO.

⁴Discente do do curso de Graduação em Odontologia do UNIFESO

⁵Discente do do curso de Graduação em Odontologia do UNIFESO.

⁶Doutor em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela FOA UNESP, Docente do curso de Graduação em Odontologia do ISNF-UFF.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a formação de lacunas ósseas em ratos em risco de OMIM, submetidos a exodontias e regeneração óssea com enxerto de osso xenógeno, e enxerto de β -trifosfato de cálcio (β -TCP).

Métodos: Foram utilizados 20 Ratos Wistar machos com 3 meses de idade, pesando 350 – 450g, submetidos a indução da Osteonecrose por uso de ácido zoledrônico (0,2mg/kg) durante 05 semanas. Na 7ª semana foi realizado a cirurgia de exodontia dos molares superiores direito e preenchimento do alvéolo com coágulo (controle), enxerto xenógeno (Grupo 2), e β -trifosfato de cálcio (β -TCP) (Grupo 3). A eutanásia foi realizada na 15ª semana. Foram realizadas análises morfométrica e estereológica. Foram utilizados os testes estatísticos ANOVA e Tukey, considerando-se um nível de significância de 5%.

Resultados: A análise quantitativa demonstrou que o Grupo 3 (BTCP) apresentou menor formação de lacunas ósseas e maior formação de tecido ósseo sadio quando comparado com os grupos 1 e 2 ($p < 0,05$).

Conclusão: Os resultados deste trabalho demonstram uma menor formação de lacunas ósseas quando utilizado BTCP para regeneração óssea dos alvéolos de ratos em risco de OMIM. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados até o desenvolvimento de um protocolo definitivo para prevenção desta complicação em humanos.

Palavras-chave: Bisphosphonatos, Osteonecrose, Enxerto ósseo.

ABSTRACT

Alveolar bone repair in rats at risk for Medication Related Osteonecrosis of the jaw undergoing bone regeneration with Xenogen graft and calcium β -triphosphate (β -TCP)

Objective: To evaluate the bone defect in rats with osteonecrosis in the region where the extraction was performed using only clot, xenogen bone graft, and calcium β -triphosphate (β -TCP) graft.

METHODS: Twenty male Wistar rats weighing 350-450 g were submitted to osteonecrosis induction for the use of zoledronic acid (0.2 mg / kg) for 5 weeks. In the 7th week, the maxillary right molar extraction and filling of the alveolus with clot (control), xenogene graft (Group 2) and calcium β -triphosphate (β -TCP) were performed (Group 3). Euthanasia was performed in the 15th week. Morphometric and stereological analyzes were performed. The ANOVA and Tukey statistical tests were used, considering a level of significance of 5%.

Results: Quantitative analysis showed that Group 3 (BTCP) presented less bone defect formation when compared to groups 1 and 2 ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this work were favorable for the use of BTCP for guided bone regeneration and prevention less manifestation of OMIM in rats. However, more studies need to be performed until the development of a protocol to prevent this complication

Keywords: Bisphosphonate. Osteonecrosis. Bone graft

INTRODUÇÃO

A expectativa de vida do brasileiro subiu para 75,8 anos, frente ao aumento da longevidade também aumenta a incidência de doenças da terceira idade, dentre elas a osteoporose e doenças oncológicas (IBGE, 2017).

Na expectativa de controlar as manifestações clínicas destas doenças, nos últimos anos, tornou-se corrente o uso de medicamentos antirreabsortivos, que inibem a atividade osteoclástica, que é responsável pela reabsorção óssea e têm se mostrado eficazes na redução da dor e na prevenção de metástases ósseas, além de novas drogas anti-angiogênicas para o tratamento de lesões malignas (RUGGIERO et al., 2009) Apesar dos seus benefícios, uma importante complicação denominada de Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamentos vem sendo observada nos pacientes que utilizam estes medicamentos, que se caracteriza clinicamente por exposições e sequestros ósseos na região bucomaxilofacial (RUGGIERO et al., 2009; MARX, 2014).

Marx (2003) descreve em seus relatos 36 casos de ocorrência de lesões osteonecroticas dos maxilares, associadas ao uso de pamidronato e do zoledronato, drogas que pertencem à classe dos bifosfonatos, inibidoras da reabsorção óssea, alertando sobre o risco de uma crescente epidemia desta patologia. Desde então inúmeras pesquisas tem sido desenvolvidas com o objetivo de entender os fatores de risco e minimizar a ocorrência da Osteonecrose dos Maxilares Induzida por Medicamento (OMIM).

A avaliação do tempo de tratamento com este fármaco, a via de administração oral ou venosa, e o estudo de marcadores biológicos como o CTX e o TRACP – 5b representam aspectos importantes na avaliação pré-operatória do paciente usuário de medicamentos indutores de osteonecrose, como tentativa de prever o risco de ocorrência desta

complicação (RUGGIERO et al., 2009; MARX, 2014)

Quando a OMIM atinge estágios mais avançados, o seu tratamento se torna cada vez mais difícil e com risco aumentado para a morbidade para os pacientes, que podem ser submetidos desde sequestrectomias via acesso intrabucal até grandes ressecções envolvendo a mandíbula, maxila e osso zigomático (MARX, 2009)

Após aproximadamente 15 anos dos primeiros relatos da OMIM, e de uma série de novas pesquisas com teriparatida, que é uma forma recombinante do hormônio da paratireoide; um agente metabólico efetivo no crescimento ósseo e usado no tratamento de alguns tipos de osteoporose, hormônio utilizado para induzir um aumento ósseo generalizado através do seu uso intermitente que ativa osteoblastos e osteoclastos resultando em tal efeito; com a finalidade de minimizar sua ocorrência (OMIM), o uso indiscriminado dos medicamentos causadores para pacientes em tratamento de osteoporose, somado com o inadequado conhecimento dos cirurgiões dentistas no manejo desses pacientes, faz com que ainda exista um crescente na ocorrência de OMIM (CAMPISI et al., 2014; SCHWARTZ, 2015; PELAZ et al., 2015).

OBJETIVO

Avaliar a formação de defeitos ósseos (lacunas) em alvéolos de ratos em risco de OMIM, que foram submetidos a exodontia e regeneração óssea guiada.

METODOLOGIA

O presente trabalho foi iniciado após a aprovação pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Odontologia de Araçatuba com parecer final de número 00940-2017.

Animais

Ratos wistar machos com 2 meses de idade foram mantidos em biotério próprio da

UNESP sob temperatura de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro-escuro (6:00-18:00h) controlados. Eles receberam ração e água ad libitum. Aos 3 meses de idade, com aproximadamente 350-450g, os animais foram randomicamente divididos em três grupos (TABELA 1). Foi induzida previamente a Osteonecrose em todos os grupos utilizando o bifosfonato (Ácido Zoledrônico) intravenoso (IV) através da veia caudal, uma vez por semana durante 5 semanas de maneira

ininterrupta, onde decorridas 7 semanas do início da indução, foram realizadas as exodontias do 1o molar superior direito de todos os animais. No grupo 1 o alvéolo foi mantido com coágulo, no grupo 2 foi utilizado enxerto xenógeno (Lumina Bone[®], Criteria, São Paulo, Brasil). No grupo 3 o alvéolo foi preenchido com β - trifosfato de cálcio (ChronOS, Synthes, Suíça).

GRUPO	BIOMATERIAL	NÚMERO DE ANIMAIS
1	X (Coágulo)	6
2	Xenógeno	6
3	BTCP	6

Tabela 1. Distribuição de animais por Grupos e Biomateriais utilizados.

Os grupos ficaram determinados como: Grupo controle (G1, n = 6): Exodontia do primeiro molar superior direito e preenchimento do alvéolo com coágulo de ratos em risco de OMIM; Grupo dois (G2, n = 6): Exodontia do primeiro molar superior direito e preenchimento do alvéolo com enxerto xenógeno, de ratos em risco de OMIM; Grupo três (G3, n= 6): Exodontia do primeiro molar superior direito e preenchimento do alvéolo com BTCP, de ratos em risco de OMIM;

Indução da OMIM

O Ácido Zoledrônico (BLAZTERE[®]) foi aplicado por via intravenosa uma vez por semana por 5 semanas à partir dos 3 meses de idade. As doses administradas foram de 0,04 mg de ácido zoledrônico em solução salina (0,2 mg/ml). Visto que não existe um protocolo considerado unanimidade para indução de OMIM pelo uso de bifosfonatos em modelo animal, e considerando as diferenças de metabolismo entre as duas espécies.

Extração Dentária

Os primeiros molares superiores direitos foram extraídos de todos os grupos, na 7^a semana após o início do protocolo de indução. O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia geral com injeção intraperitoneal (IP) de Ketamina 90 mg/kg + Xilazina 10 mg/kg, onde os animais foram colocados na posição de decúbito dorsal em mesa de operação personalizada. Um Descolador de Molt n° 9 foi usado para separar a inserção gengival e luxar o dente (Fig.1), após a exodontia, foi realizada um descolamento de tecidos moles da região que corresponde ao alvéolo onde encontrava-se o elemento extraído, com intuito de auxiliar na manutenção do coágulo ou biomaterial no interior do alvéolo (Fig.3 e 4), em seguida, foi realizada a sutura, utilizando fio de seda 4-0. Para realização de analgesia pós-operatória foi administrado Dipirona 400 mg/kg por injeções subcutâneas a cada 12h por 48 horas, e cefalexina 15mg/kg de 12/12h por 03 dias.



Figura 1. Primeiro Molar superior direito extraído do animal do Grupo 3.

Eutanásia

Na 15ª semana do início do tratamento, todos os animais foram submetidos a eutanásia com injeção IP de ketamina (180 mg/kg) e xilasina (20 mg/kg), seguidos de deslocamento cervical. Foi realizado uma ressecção em bloco da região alveolar para análise histológica e futura análise imuno-histoquímica.

Análise Histológica

A análise foi realizada na região de interesse, que corresponde à área entre a raiz

mesio palatina do segundo molar superior direito em direção à anterior (onde foi extraído o primeiro molar) - sentido ântero posterior (Fig. 2); determinamos esta região, como sendo a região de interesse devido ao fato de ser o local anatômico onde encontrava-se o primeiro molar superior direito, que foi extraído, causando assim um trauma no local, que favoreceria o desenvolvimento de osteonecrose neste sítio.

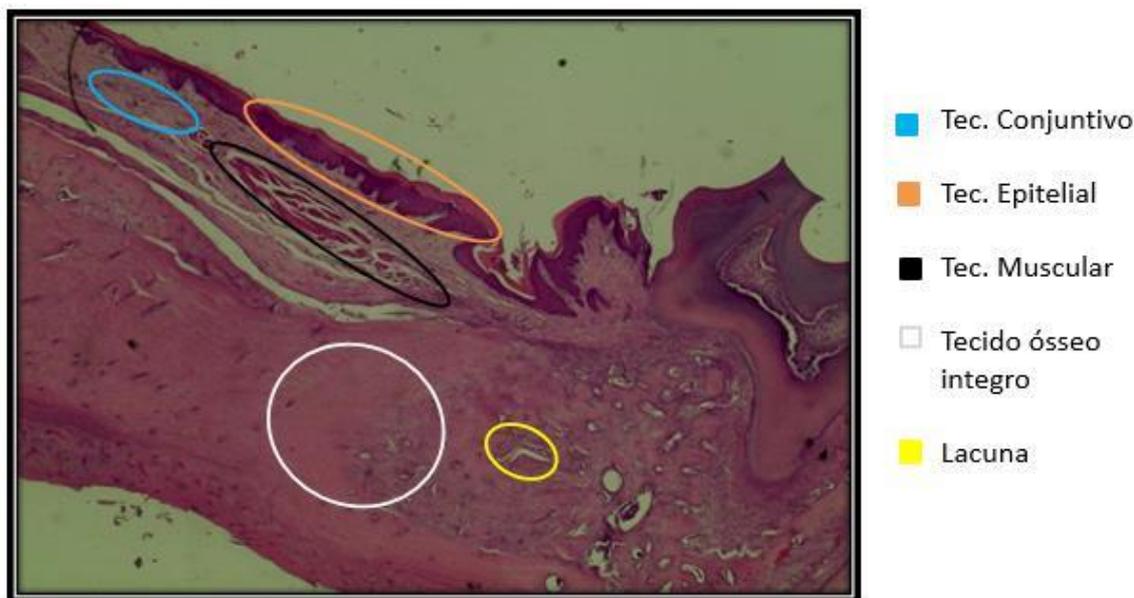


Figura 2. Corte histológico evidenciando as áreas de interesse de análise.

Foram mensuradas as porcentagens de lacunas por meio da grade de Merz. Utilizando quatro grades retangulares com 100 pontos/grade sobre as imagens, a quantificação foi realizada. O cálculo da porcentagem de cada item analisado foi alcançado quantificando a presença de cada tipo de tecido em cada ponto da grade., obtendo dessa forma uma média da porcentagem tecidual relativa de cada item de todas as amostras. (Figura 3)

Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism® 7.04 (La Jolla, CA, USA). Foi realizado a análise descritiva e tabulação dos dados com as médias obtidas de cada grupo, seguido de uma análise de variância (ANOVA), e teste de comparação de médias de Tukey para averiguar a diferença entre os 3 grupos. O nível de significância adotado para todos os testes foi de $p < 0,05$.

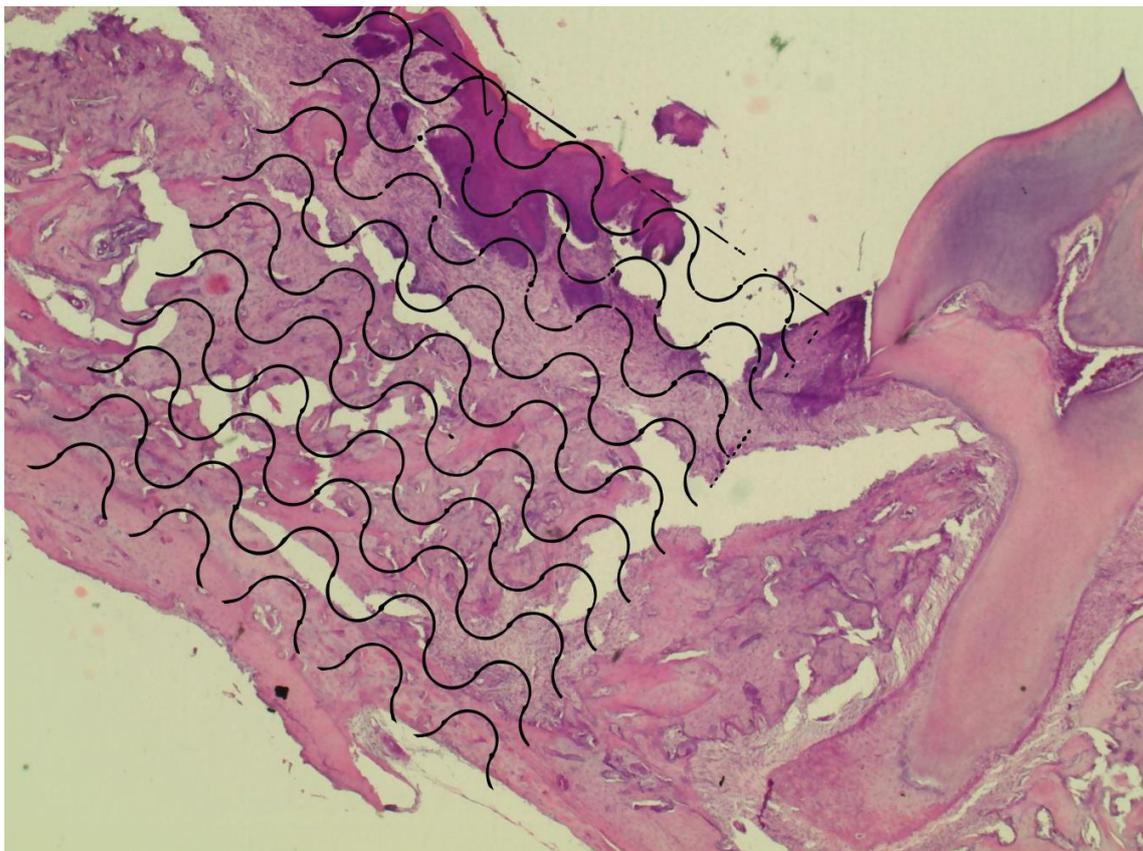


Figura 3. Grade Merz posicionada para análise dos pontos de interesse em animal do Grupo Controle.

RESULTADOS

Após a contagem manual utilizando a grade de Merz foi obtido a porcentagem de Lacunas ósseas de cada grupo, e realizado uma análise comparativa entre eles (Figura 8-10). O grupo 1 apresentou 32% de lacunas, o grupo 2, 27%, e o grupo 3, 18%.

Para análise comparativa das áreas de lacunas ósseas, foi realizado o teste ANOVA e

o teste de Tukey. O gráfico 1 demonstra os resultados da variável lacuna, onde há uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos 3 (BTCP) e 1 (Controle), e os grupos 3 (BTCP) e 2 (Enxerto Xenógeno), já entre os grupos 2 e 1 o teste indica que não há diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,3293$).

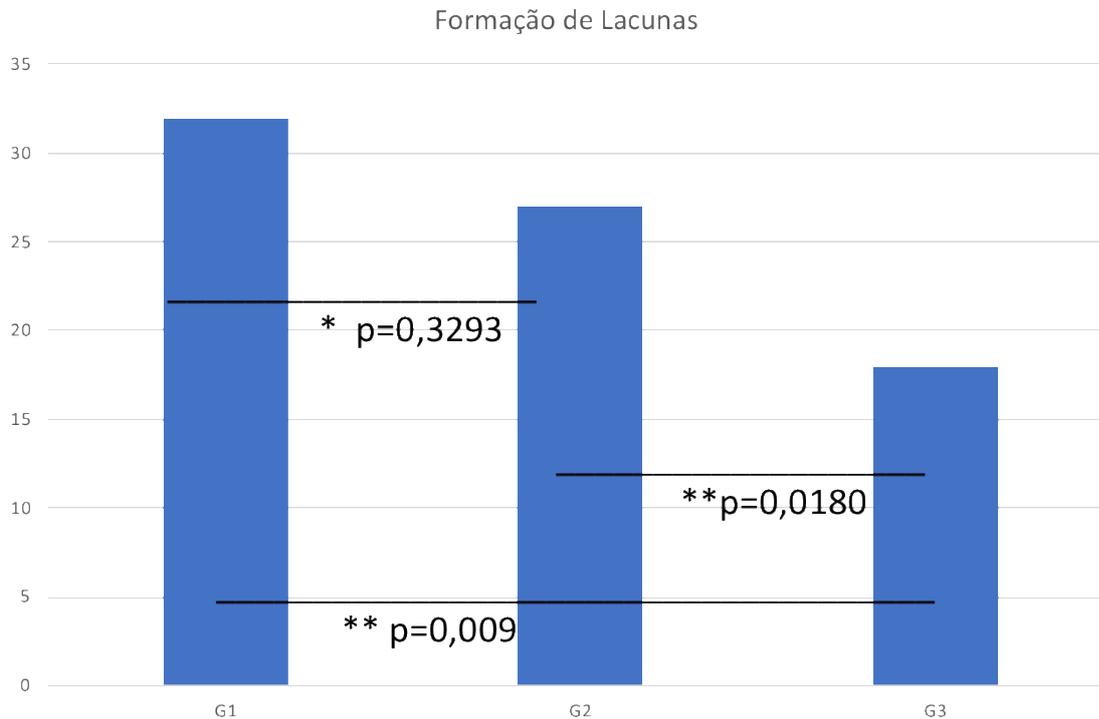


Gráfico 1: Avaliação comparativa da formação de lacunas. (*) sem diferença estatística significativa entre os grupos. (**) diferença estatística significativa entre os grupos.

DISCUSSÃO

Os primeiros relatos da OMIM começaram a partir de 2003 onde ainda pouco se sabia sobre esta patologia, mas desde então muito se evoluiu neste tema, e após 14 anos existem protocolos bem estabelecidos para cada fase da doença, métodos de prevenção com exames laboratoriais, assim como a identificação de novos medicamentos associados à OMIM (MARX, 2003; MARX, CILLO e ULLOA, 2007; MARX, 2014). Apesar de toda evolução, o manejo da OMIM ainda se baseia na prevenção, pois não existe um método de tratamento definitivo capaz de reverter a osteonecrose quando a doença já está instalada, o que gera uma alta morbidade para estes pacientes (VOSS et al., 2017).

Mesmo com a ampla divulgação no meio científico das complicações da OMIM, ainda existe uma crescente na ocorrência desta

patologia (MARX, 2014). O uso indiscriminado de bifosfonatos para tratamento da osteoporose pelos médicos, e a falta de conhecimento no manejo da OMIM por parte do cirurgião dentista representam o maior problema para o aumento na ocorrência destes casos.(EDWARDS et al., 2008; SCHWARTZ, 2015).

Na busca de novos métodos de prevenção desta complicação, este trabalho realizou um modelo experimental para indução da OMIM utilizando biomateriais, para evitar a manifestação clínica desta patologia em ratos. Os resultados obtidos indicaram que a aplicação dos biomateriais após a extração esteve diretamente relacionado com a menor formação de lacunas no grupo 3 (BTCP).

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram uma menor formação de lacunas ósseas quando utilizado BTCP para regeneração óssea dos

alvéolos de ratos em risco de OMIM. No entanto, mais estudos necessitam ser realizados até o desenvolvimento de um protocolo definitivo para prevenção desta complicação em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EDWARDS B J. et al. Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Lancet Oncol*, v. 9, n.12, p.1166-1172, 2008.

IBGE. Expectativa de vida do brasileiro sobe para 75,8 anos, 2017. Disponível em: < Agência de Notícias.ibge.gov.br> Acesso em: 15 de jun. de 2018 às 13:57.

MARX R.E, Cillo J.E, Ulloa J.J. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.65, n.12, p.2397-410, 2007.

MARX R.E. A decade of bisphosphonate bone complications: what it has taught us about bone

physiology. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v.29, n.2, p.247-258, 2014.

MARX R.E. Reconstruction of defects caused by bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.67, n.5, p.107-119, 2009.

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

SCHWARTZ H.C. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.73, n.3, p.377, 2015.

VOSS P J. et al. Treatment of stage II medication-related osteonecrosis of the jaw with necrosectomy and autologous bone marrow mesenchymal stem cells. *Odontology*, v.105, n.4, p.484-493, 2017.