

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLOGIA**

ANA PAULA VILELA

**EFEITO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PROGRESSÃO DA PERDA
ÓSSEA ALVEOLAR E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.
ESTUDO *IN VIVO***

**PONTA GROSSA
2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISILOGIA**

ANA PAULA VILELA

**EFEITO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PROGRESSÃO DA PERDA
ÓSSEA ALVEOLAR E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.
ESTUDO *IN VIVO***

Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de mestrado em Ciências Biomédicas – Área de concentração em fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco.

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Regina Di Sordi

PONTA GROSSA

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Vilela, Ana Paula
V699 Efeito do ranelato de estrôncio na
progressão da perda óssea alveolar e
parâmetros cardiovasculares. Estudo in
vivo/ Ana Paula Vilela. Ponta Grossa,
2017.
51f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Biomédicas - Área de Concentração:
Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Gilson César
Nobre Franco.
Coorientadora: Prof^a Dr^a Regina de
Sordi.

1.Doença periodontal. 2.Periodontite.
3.Ranelato de estrôncio. I.Franco, Gilson
César Nobre. II. Sordi, Regina de. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências Biomédicas. IV. T.

CDD: 616.075

ANA PAULA VILELA

**EFEITO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PROGRESSÃO DA PERDA
ÓSSEA ALVEOLAR E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.
ESTUDO *IN VIVO***

Trabalho apresentado para a obtenção do título de mestre, realizado pela Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Aprovado em ____/____/____

Nota-----

Professor Doutor Gilson César Nobre Franco
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Professor Doutor Edmar Miyoshi
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Alessandro Hyczy Lisboa
Faculdade Cescage

**PONTA GROSSA
2017**

Dedico esse trabalho

Agradeço aos meus pais por me apoiarem incondicionalmente nas minhas decisões, por me ensinarem a correr atrás dos sonhos e nunca desistir, por mais difíceis que sejam os obstáculos.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço ao meu orientador Gilson César Nobre Franco, por todo o ensinamento, paciência e compreensão que teve comigo nesses dois anos.
- Agradeço as funcionárias do biotério, por me ajudarem a cuidar dos animais quando não pude estar presente.
- Agradeço a aluna de iniciação científica Lauryellen Padilha por me ajudar nas análises do projeto mesmo em horários noturnos, por toda paciência e por dividir comigo todo seu conhecimento.
- Agradeço a aluna de mestrado Paula Vargas Sanchez, por estar sempre à disposição para quando eu precisava, por me ensinar com toda paciência algumas metodologias e por sua amizade.
- Agradeço a minha irmã Cristiana Vilela Calixto e ao meu cunhado Abraham Lincon Calixto, por todo incentivo em realizar o mestrado e por todos os conselhos ao longo desses dois anos.
- Agradeço a toda minha família por todo amor e compreensão quando eu não pude estar presente.

RESUMO

A doença periodontal (DP) pode ser caracterizada como uma doença inflamatória crônica na qual há destruição dos tecidos de suporte do dente. Em sua patogênese, a presença de um biofilme desencadeia uma resposta imuno-inflamatória local, com a produção de mediadores pró-inflamatórios e ativação celular, consequentemente reabsorção óssea e degradação do colágeno. Sobre a terapêutica da DP, constantes estudos acadêmicos têm sido realizados na busca por alternativas de tratamento. Neste contexto, o ranelato de estrôncio (RE), fármaco atualmente empregado na terapêutica da osteoporose, representa um alvo de estudo, uma vez que possui propriedades biológicas sobre o tecido ósseo, tais como diminuição efetiva da reabsorção e aumento da neoformação óssea. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do RE sobre a perda óssea alveolar induzida pelo método da ligadura em ratos. Em acréscimo, o perfil de segurança cardiovascular do RE foi assegurado pela avaliação da pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade vascular. Para estas finalidades, 30 ratos (Wistar / 200 - 300g) foram divididos em três grupos (n=10 animais/grupo): G1) Grupo Controle – Sem ligadura / Sem tratamento (placebo, NaCl 0,9%, via gavagem); G2) Grupo Ligadura – Com ligadura / Sem tratamento (placebo, NaCl 0,9%, via gavagem); G3) Grupo Ligadura + Ranelato de Estrôncio - Com ligadura / Com tratamento (RE, 625mg/kg/dia, via gavagem). A perda óssea alveolar foi induzida pelo método da ligadura e o tempo experimental foi de 15 dias. Após este período, os animais foram submetidos à: (1) Quantificação morfométrica da perda óssea alveolar; (2) Mensuração histológica (picrosírius) de colágeno tecidual; (3) Dosagem sérica de Fosfatase alcalina total e óssea e (4) Avaliação de parâmetros cardiovasculares (Pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade vascular). A análise estatística foi realizada pela comparação das médias entre os grupos por meio do teste paramétrico de ANOVA, seguido de post hoc Tukey. O nível de significância foi de 5%. No grupo em que os animais receberam tratamento de RE (G3) houve uma diminuição significativa da perda óssea alveolar, acompanhada de uma preservação das fibras de colágeno do periodonto. Em acréscimo, os níveis de fosfatase alcalina total e óssea apresentaram-se elevados no grupo G3. Não foram observadas alterações nos parâmetros cardiovasculares avaliados. Embora estudos adicionais sejam necessários, o resultados demonstram que o ranelato de estrôncio representa um fármaco eficaz e portanto promissor na terapêutica da DP, reduzindo a perda óssea alveolar e degradação do colágeno tecidual.

Palavras-chave: Doença periodontal, periodontite, ranelato de estrôncio.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) can be characterized as a chronic inflammatory disease in which there is destruction of the supporting tissues of the tooth. In its pathogenesis, the presence of a biofilm triggers a local immune-inflammatory response, with the production of pro-inflammatory mediators and cellular activation; consequently bone reabsorption and collagen degradation. Regarding the therapy of PD constant academic studies have been conducted in the search for alternative treatment. In this context, strontium ranelate (SR), drug currently used in the treatment of osteoporosis, represents a study target since it has biological properties on the bone tissue, such as effective reduction of reabsorption and increase of bone neoformation. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of SR on alveolar bone loss induced by the ligation method in rats. In addition, the cardiovascular safety profile of SE was ensured by the evaluation of blood pressure, heart rate and vascular reactivity. For these purposes, 30 rats (Wistar / 200-300g) were divided into three groups (n = 10 animals / group): G1) Control Group - No ligature / No treatment (placebo, 0.9% NaCl, via gavage); G2) Ligature group - With ligature / No treatment (placebo, 0.9% NaCl, via gavage); G3) Group Ligature + Strontium Ranelate - With ligation / With treatment (RE, 625mg / kg / day, via gavage). Alveolar bone loss was induced by the ligature method and the experimental time was 15 days. After this period, the animals were submitted to: (1) Morphometric quantification of alveolar bone loss; (2) Histological measurement (picosirius) of tissue collagen; (3) Total alkaline phosphatase serum dosage and (4) Evaluation of cardiovascular parameters (blood pressure, heart rate and vascular reactivity). Comparing the means between groups using the parametric ANOVA test, followed by Tukey post hoc, performed statistical analysis. The level of significance was 5%. In the group in which the animals received SE treatment (G3) there was a significant decrease in alveolar bone loss, accompanied by a preservation of the periodontal collagen fibers. In addition, the alkaline phosphatase total levels were elevated in the G3 group. No changes were observed in the cardiovascular parameters evaluated. Although, additional studies are required, the results demonstrate that strontium ranelate represents an effective and therefore promising drug in PD therapy, reducing alveolar bone loss and tissue collagen degradation.

Key words: Periodontal disease, periodontitis, strontium ranelate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Patogênese da doença periodontal.....	17
Figura 2: Modelo ilustrativo da osteoclastogênese por ligação de RANKL e RANK.	19
Figura 3: Modelo ilustrativo da inibição da osteoclastogênese por ligação de RANKL e OPG.	19
Figura 4: Esquema do processo inflamatório e medicamentos.....	22
Figura 5: Mecanismo de ação do ranelato de estrôncio sobre as células ósseas.. ..	26
Tabela 1: Divisão aleatória dos animais.....	28
Figura 6: Procedimento cirúrgico de ligadura.....	29
Figura 7: Procedimento da análise morfométrica da área dos três molares inferiores (mm ²).	32
Figura 8: Análise de Colágeno Tecidual.....	34
Figura 9: Efeitos do RE na resposta a agentes vasodiladores dependentes e independentes de endotélio em ratos com periodontite.	35
Figura 10: Efeito do RE sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em animais com periodontite induzida.	36
Figura 11: Efeito do RE sobre os níveis séricos de FAT na periodontite induzida em ratos.	37
Figura 12: Efeito do RE sobre os níveis séricos de FAO na periodontite induzida em ratos.	37
Figura 13: Efeito do RE sobre a perda óssea na periodontite induzida em ratos.	38
Figura 14: Efeito do RE na perda de fibras colágenas em animais com periodontite induzidas em ratos.....	39

LISTA DE SIGLAS

ACh- Acetilcolina
AINES- Anti-inflamatório não esteroide
AVE- Acidente Vascular Esquêmico
BF- Bifosfonatos
CaSR- Receptor extracelular de cálcio
cm²- Centímetros quadrados
COX 1- Ciclooxygenase 1
COX 2- Ciclooxygenase 2
EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
DP- Doença periodontal
EMA- *European Medicines Agency*
ERK1/2- *Extracellular signal-regulated kinases*
FAO- Fosfatase alcalina óssea
FAT- Fosfatase Alcalina Total
FDA- *Food and Drug Administration*
G1- Grupo Controle
G2- Grupo Ligadura
G3- Grupo ranelato de estrôncio
ICAM- Moléculas de adesão comunitária
IL-1- Interleucina 1
IL-3- Interleucina 3
IL-6- Interleucina 6
IPC- Índice periodontal comunitário
JAC- Junção amelocementária
Kg- Quilograma
LPS- Lipopolissacarídeo
mg- Miligrama
mm²- Milímetros quadrados
mmHg- Milímetros de mercúrio
MMP- Metaloproteinase de matriz
MRH- Moduladores da resposta do hospedeiro
nm- Nanômetro
nmol- Nanomolar
OMS- Organização Mundial de Saúde

OPG- Osteoprotegerina

PBS- Profundidade de bolsa

PGE2- Prostaglandina E2

PNCI- Perda no nível clínico de inserção

POA- Perda óssea alveolar

RANK- Receptor ativador de NF-kB

RANKL- Proteína ativadora de NF-kB

RE- Ranelato de estrôncio

SNP- Nitroprussiato de sódio

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

μ L - Microlitros

μ m – Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

B – Beta

α – Alfa

°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Definição e epidemiologia da DP	15
2.2. Patogenia da DP	15
2.3. Remodelação óssea na doença periodontal	17
2.4. Condições Sistêmicas relacionadas a DP	20
2.5. Tratamentos	21
2.6. Moduladores da resposta do hospedeiro	21
2.7. Ranelato de Estrôncio	24
3. OBJETIVOS	27
3.1 Geral	27
3.2. Específico	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Animais e considerações éticas	28
4.2. Divisão dos Grupos.....	28
4.3. Indução da DP	29
4.4. Gavagem com RE.....	30
4.5. Dia do sacrifício.....	30
4.6. Perfil de segurança cardiovascular	30
4.7. Dosagem de Fosfatase Alcalina Total e Óssea	31
4.8. Análise morfométrica da perda óssea alveolar	31
4.9. Análise de Colágeno Tecidual.....	33
4.10. Análise Estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Parâmetros Cardiovasculares	35
5.2. Fosfatase Alcalina Total e Óssea.....	36
5.3. Morfométrica	38
5.4. Colágeno Tecidual	38
6. DISCUSSÃO	40

7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

As doenças orais são um dos principais problemas de saúde mundial (BENATTI et al., 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as enfermidades buco-dentais mais freqüentes são: cárie dentária, doenças periodontais, câncer bucal, lesões congênitas e traumatismos físicos (BRASIL, 2001).

O impacto das doenças bucais é uma consideração importante quando se trata de economia, cerca de 10% das despesas de saúde pública nos países desenvolvidos estão relacionadas à assistência odontológica curativa (BENATTI et al., 2012). O tratamento da DP básico dito “convencional”, visando o debridamento mecânico periodontal para um controle do biofilme sub e supragengival, demonstra bons resultados na maioria dos casos. Porém em algumas situações, devido à forma agressiva da doença ou a não responsividade do paciente, a terapia não alcança êxito. Considerando que na patogênese da DP pode ocorrer uma resposta imuno-inflamatória exacerbada, atualmente considera-se o uso de coadjuvantes terapêuticos denominados de ‘Moduladores da Resposta Imuno-inflamatória do Hospedeiro (MRH)’ nos casos em que o tratamento convencional não obtém um resultado clínico satisfatório (COSTA et al, 2009).

Os MRHs auxiliam a terapêutica da DP por atuarem em vias imunoinflamatórias ativadas durante a progressão da doença. Atualmente, o único MRH aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso na DP é a doxíciclina em doses subantimicrobiana (20mg/2x dia). Porém, apesar de um excelente resultado como inibidor de metaloproteinase de matriz (MMPs) reduzindo os efeitos da inflamação e destruição tecidual, seu uso tem sido alvo de críticas por alguns autores, uma vez que pode estar relacionado ao processo de resistência bacteriana (LEE et al., 2004). Neste sentido, outros fármacos se tornaram alvos de estudo para esta finalidade, incluindo os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que apesar de seu resultado eficaz sobre a COX causaram distúrbios gastrointestinais e hipersensibilidade (DROUGANIS; HIRSCH, 2001) e os bifosfonatos (BF), que agem inibindo dos osteoclastos, diminuindo assim a

reabsorção óssea, porém casos de osteonecrose foram associados ao seu uso (BARBA-RECREO et al., 2014).

Devido as tentativas não bem sucedidas desses fármacos no tratamento da DP, há uma continua busca por um fármaco inovador. Atualmente uma nova droga tem sido promissora no tratamento de mulheres com osteoporose, trata-se do RE. Este medicamento parece promover duplo efeito sobre a remodelação óssea, simultaneamente diminuindo a reabsorção e aumentando a formação (OLIVEIRA et al., 2012). Li e colaboradores (2012) demonstraram em um estudo com implantes de titânio em ratas, em que foi administrado 625mg/kg/dia, o que levou a uma concentração de estrôncio no sangue correspondente à dose clínica de 2 g / dia, e essa mesma dose apresentou melhoras na microarquitetura ao redor dos implantes.

Embora o mecanismo de ação do RE não esteja completamente compreendido, autores sugerem que este fármaco pode atuar aumentando a replicação de células osteoprogenitoras, consequentemente os osteoblastos (FROMIGUÉ et al., 2009), inibindo a atividade dos osteoclastos (BUEHLER et al., 2001) e favorecendo sua apoptose (NARDONE; D'ASTA; BRANDI, 2014). Também parece atuar inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (DE MELO NUNES et al., 2015; LI et al., 2012).

A osteoporose e a periodontite são condições frequentes que afetam a massa óssea e compartilham fatores de risco, sendo a osteoporose caracterizada pela redução da massa óssea e destruição da microarquitetura óssea e a periodontite uma inflamação em resposta a um biofilme e sua evolução pode ocasionar a perda óssea alveolar (PENONI et al., 2016). Vários estudos clínicos associando a osteoporose pós-menopausa e a periodontite tem encontrado correlação positiva em seu mecanismo de reabsorção (WANG; MCCAULEY, 2016).

Considerando que o mecanismo biológico de destruição óssea apresentada na DP se assimila ao da osteoporose, torna-se plausível a hipótese que o RE poderia ser uma alternativa para a terapêutica da DP. Por esse motivo o presente estudo objetivou avaliar a resposta terapêutica do ranelato de estrôncio em ratos Wistar que apresentaram o quadro patológico de perda óssea

alveolar induzida. Em acréscimo, objetivou-se avaliar o perfil de segurança cardiovascular do RE.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Definição

A DP de maneira geral se desenvolve a partir da presença de microrganismos na área subgengival formando um biofilme bacteriano, desencadeando uma reação local imuno-inflamatória no hospedeiro. A evolução da doença pode levar a destruição do tecido gengival, ligamento periodontal e osso alveolar (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

A DP pode ser classificada de duas maneiras mediante ao grau de acometimento. A gengivite, caracterizada por uma inflamação aguda, onde o epitélio gengival encontra-se edemaciado e apresentando sangramento após o exame de sondagem, e a periodontite caracterizada pela forma crônica da doença se mostrando mais agressiva, pois devido a permanência do biofilme bacteriano e a resposta inflamatória contínua do hospedeiro, pode levar à perda de inserção pela destruição do tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar (ALMEIDA et al., 2006)

2.2. Patogenia da DP

A saúde bucal é considerada um estado de equilíbrio onde microrganismos potencialmente patogênicos que coexistem com o ambiente bucal do hospedeiro sem causar nenhum dano para ambos envolvidos (KINANE, 2001). Estudos já mostraram que mais de 500 espécies aeróbicas e anaeróbicas estão envolvidas nesse processo, sendo as principais: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Em resposta a esse acúmulo de microrganismos inicia-se um processo inflamatório no local. Com a liberação de Lipopolissacarídeos (LPS) presentes nas paredes das bactérias, moléculas de adesão celular específicas como por

exemplo a ICAM-1 no epitélio juncional auxiliam os movimentos dos neutrófilos para o sulco gengival, com o aumento da permeabilidade entre as células do epitélio além da entrada de neutrófilos ocorre também a entrada de macrófagos e linfócitos, seguidos pela formação de mediadores pró-inflamatórios (EX. prostaglandina E2 – PGE₂), da liberação de citocinas (EX. IL-1beta, TNF-alfa, IL-6) e ativação enzimática (Ex. Metaloproteinase de Matriz – MMPs). As MMPs são secretadas por uma variedade de células (neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos e osteoclastos) encontradas no periodonto. Essas enzimas são responsáveis pela destruição de matriz extracelular tecidual, com destaque ao colágeno. A medida que a inflamação prossegue o processo imunológico é iniciado ou reativado (ROY C. PAGE, 1998). Os macrófagos e linfócitos T presentes no processo inflamatório estão diretamente envolvidos com a reabsorção óssea, pois além expressarem mediadores de citocinas pró-inflamatórias também expressam RankL, responsáveis pela diferenciação e ativação de osteoclastos (RODRIGUES; PALIOTO, 2009). Figura 1

Adicionalmente, à medida que as camadas epiteliais vão sendo destruídas ocorre um novo crescimento epitelial em uma área mais apical juntamente com a formação de uma bolsa. Com a extensão da área contendo infiltrado inflamatório, haverá uma maior quantidade de células produzindo citocinas e enzimas com consequente aumento na reabsorção óssea.

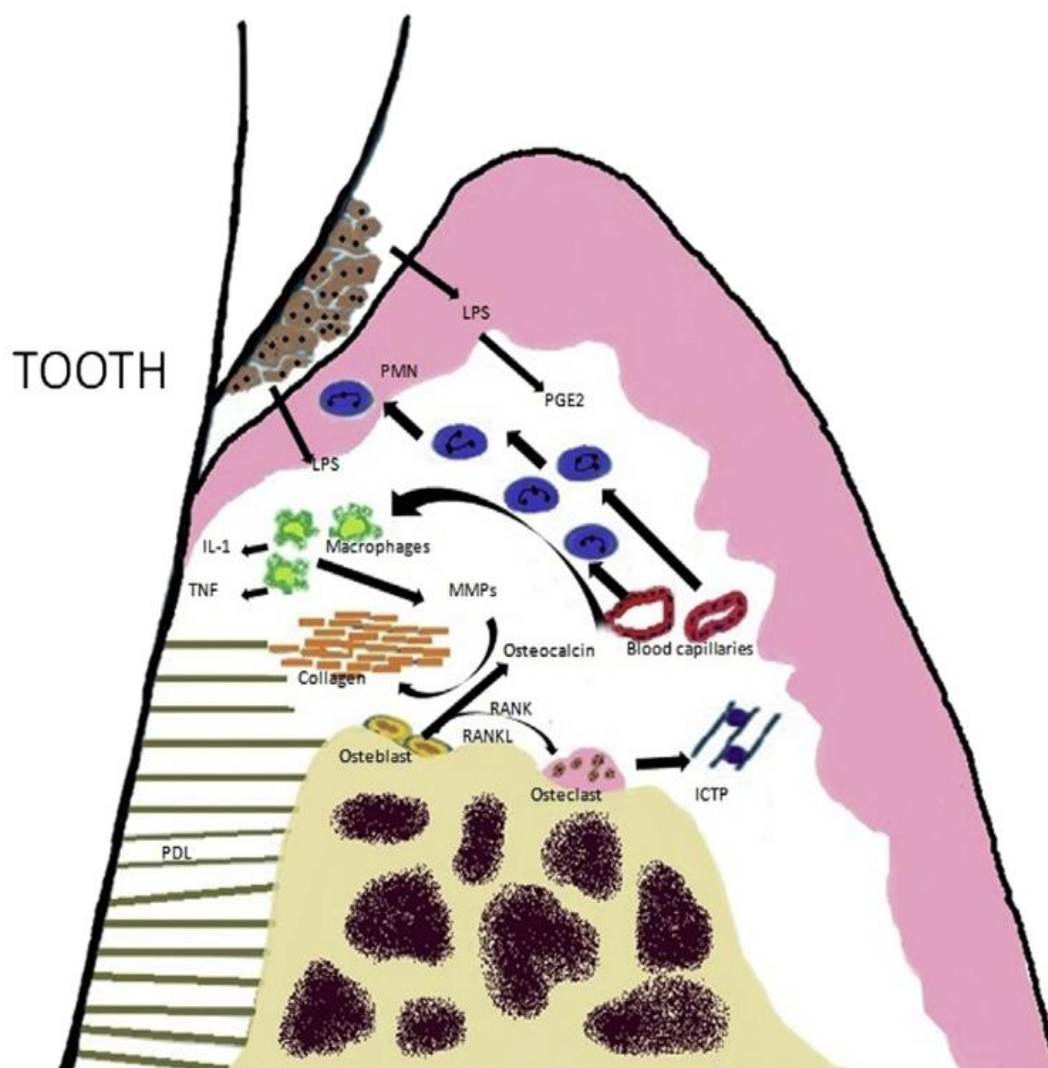


Figura 1: Patogênese da doença periodontal (GUPTA; GOVILA; SAINI, 2015)

2.3. Remodelação óssea na doença periodontal

Em condições fisiológicas normais ocorre um equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, o que promove uma homeostase, incluindo a integridade da arquitetura óssea. Em certas condições ósseas inflamatórias este equilíbrio é quebrado, podendo ocorrer um aumento predominante da formação como na osteopetrose ou um aumento da reabsorção como a osteoporose e periodontite (COCHRAN, 2008).

Um grande avanço na compreensão da reabsorção óssea foi a identificação de citocinas envolvidas diretamente na diferenciação e ativação de osteoclastos, denominado sistema RANKL-RANK-OPG (Proteína ativadora de NF- κ B, Receptor ativador de NF- κ B e Osteoprotegerina) (KAJIYA et al., 2010).

RANK pertencente à família do TNF, é um receptor de membrana, expresso em células da linhagem dos monócitos e macrófagos incluindo os precursores dos osteoclastos, linfócitos B e T e fibroblastos (COCHRAN, 2008).

RANKL também pertencente à família do TNF é uma proteína importante e necessária para a osteoclastogênese, produzida por fibroblastos (gengivais, do ligamento periodontal e sinoviais), osteoblastos e linfócitos T. Este é considerado como a chave reguladora da osteoclastogênese, pois a ligação do RANKL com RANK presentes nas células precursoras do osteoclastos leva a diferenciação destes em osteoclastos, por meio da fusão entre elas, gerando células multinucleadas (WILLIAM J. BOYLE, W. SCOOT SIMONET, 2003) Figura 2.

OPG, proteína solúvel expressa por osteoblastos e células do estroma ósseo, funciona como receptor e tem propriedades antagônicas ao RANKL atuando como um regulador negativo da osteoclastogênese, como um falso receptor para RANKL impedindo deste modo a ativação e diferenciação de osteoclastos. (WILLIAM J. BOYLE, W. SCOOT SIMONET, 2003). Figura 3.

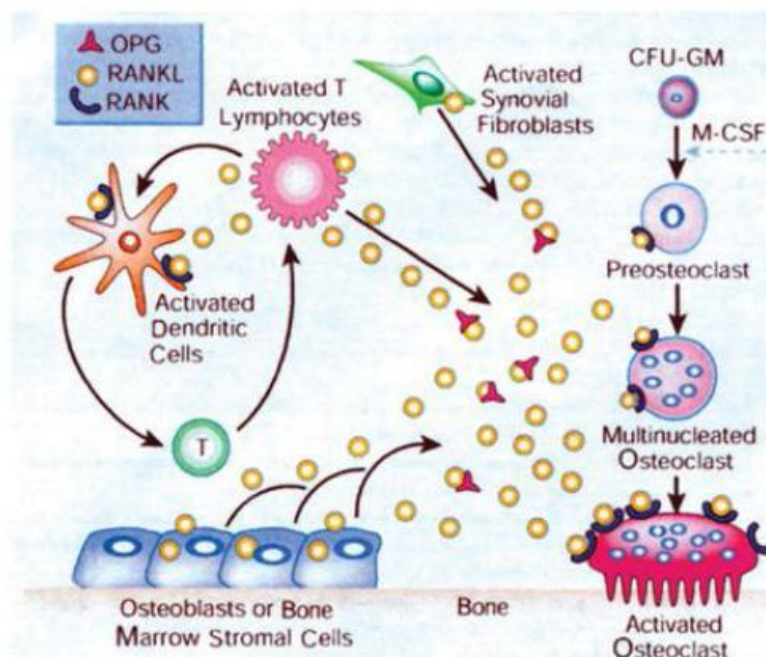


Figura 2: Modelo ilustrativo da osteoclastogênese por ligação de RANKL e RANK. Com o excesso de células no tecido inflamado ocorre uma maior produção de RANKL, este se liga com RANK, fazendo a ativação dos osteoclastos com consequente reabsorção óssea. (COCHRAN, 2008).

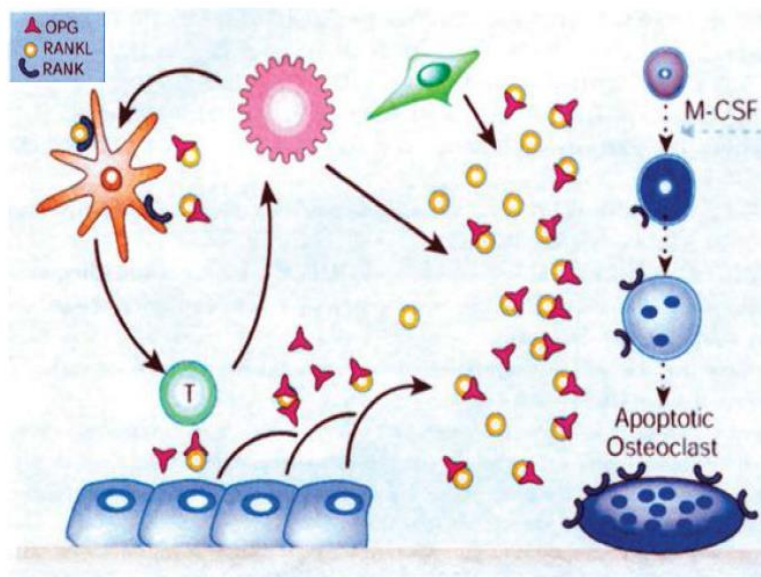


Figura 3: Modelo ilustrativo da inibição da osteoclastogênese por ligação de RANKL e OPG: Com maior proporção de OPG ocorre sua ligação com RANKL impedindo que RANK se ligue com RANKL, não ocorrendo a ativação dos osteoclastos consequentemente impedindo a reabsorção. (COCHRAN, 2008).

O balanço na produção entre RANKL/OPG é o responsável pela remodelação óssea. Se houver um desequilíbrio deste balanço com maior biodisponibilidade de RANKL, ocorrerá uma maior ativação de osteoclastos com consequente aumento da reabsorção óssea. A superregulação de RANKL ou sub-regulação de OPG tem sido relacionada com várias doenças, incluindo osteoporose, artrite reumatoide e periodontite (COCHRAN, 2008)

2.4. Condições Sistêmicas relacionadas a DP

O tratamento da DP vem sendo muito discutido. Por se tratar de uma doença infecciosa crônica causada predominantemente por bactérias Gram-negativas, onde as mesmas possuem uma alta capacidade invasiva e de toxicidade considerável, a DP pode ser a responsável pelo surgimento ou agravamento de várias doenças (BORGES et al., 2007).

Roy (1998) em um estudo sobre a DP, demonstrou que a área de tecido inflamado ocupado por um portador de periodontite crônica pode chegar a 72 cm², área equivalente a palma de uma mão aberta. Por esse motivo alguns autores têm associado a DP com doenças sistêmicas, tais como: diabetes mellitus, doença cardiovascular, infecções respiratórias, artrite reumatoide e parto prematuro (DENTINO et al., 2013).

Essa relação da DP com as doenças sistêmicas pode ser compreendida por dois motivos principais, primeiro: que os patógenos presentes no tecido inflamado podem alcançar a corrente sanguínea e colonizar outras partes do corpo, principalmente em pacientes com a imunidade comprometida e segundo: pela grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias como por exemplo: a IL-1 e TNF- α que induzem a adesão e a agregação plaquetária, além de conduzirem a formação de células lipídicas e a deposição do colesterol nos vasos sanguíneos podendo ser responsáveis por um acidente vascular cerebral (AVC), o aumento da PGE-2 pode induzir contrações uterinas e induzir um parto prematuro entre outros. Fatores de risco como tabagismo, sedentarismo, dieta inadequada, estresse, idade avançada, sexo masculino, hospedeiro

imunodeprimido, predisposição genética, outras doenças sistêmicas e pobre higiene oral, podem contribuir ou agravar as condições da DP (ROY C. PAGE, 1998).

Autores consideram que a DP e os efeitos sistêmicos possuem um relacionamento íntimo, onde os produtos gerados como consequência da DP podem originar ou agravar doenças sistêmicas e estas quando já instaladas no indivíduo podem alterar seu sistema imunológico gerando uma pré-disposição para a DP (GULATI et al., 2013)

2.5. Tratamentos

Em relação ao tratamento da DP, o seu objetivo principal é o controle da infecção. Desta forma, o tratamento básico visa o debridamento periodontal para um controle do biofilme sub e supra gengival. A terapia periodontal não cirúrgica demonstra bons resultados na maioria dos casos, porém em algumas situações, devido a forma agressiva da doença ou a não responsividade do paciente a terapia convencional não alcança êxito. Com base nisso, e considerando a patogênese da doença, o uso coadjuvante de medicamentos denominados Moduladores da Resposta Imuno-inflamatória do Hospedeiro (MRH) podem ser indicados na prática clínica (DENTINO et al., 2013).

2.6. Moduladores da resposta do hospedeiro

Os MRH são medicamentos envolvidos no controle da resposta inflamatória exacerbada observada na evolução da DP, restaurando assim a homeostase do tecido. Dentre os mais conhecidos estão os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), as tetraciclinas (Doxiciclinas) e os bifosfonatos. (Figura 4).

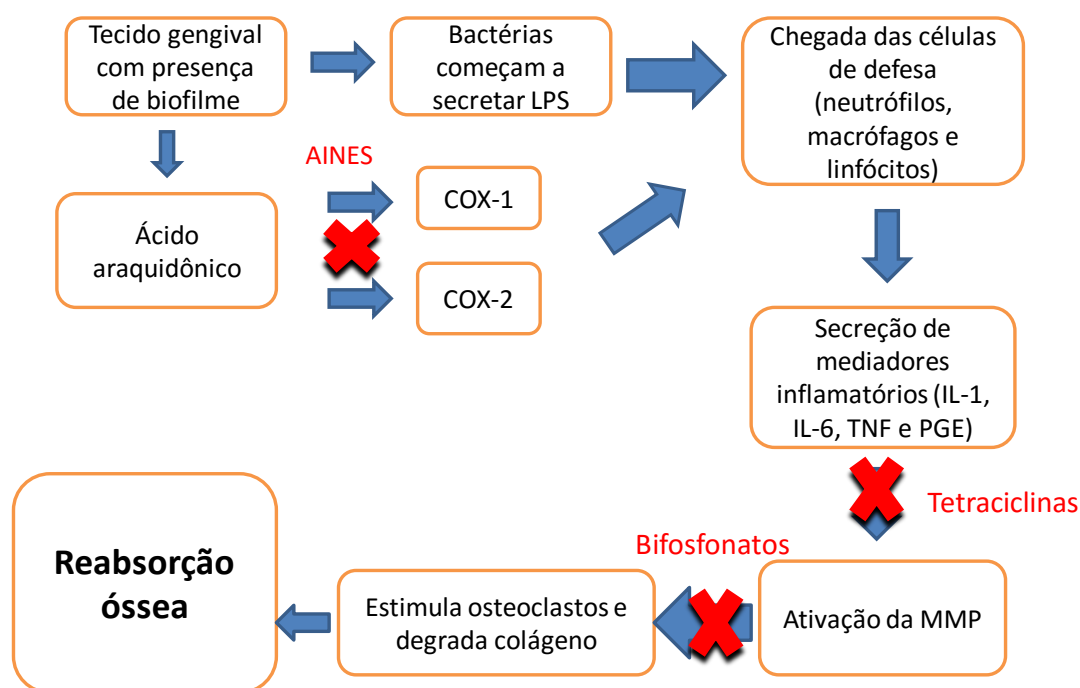


Figura 4: Esquema do processo inflamatório e medicamentos (fonte: a autora).

As tetraciclina são um grupo de antibióticos de amplo espectro, eficazes contra microrganismos aeróbios e anaeróbios, Gram-negativas e Gram-positivas. Em acréscimo a essa propriedade antimicrobiana estudos demonstram que as tetraciclina com destaque para a doxiciclina, são capazes de inativar as MMPs, grupo enzimático que participa da destruição tecidual e óssea, observadas na progressão da DP. Porém em decorrência do longo período de tratamento preconizado para essa terapia (usualmente de 9 meses a 1 ano), há a possibilidade de desenvolvimento e seleção de resistência bacteriana (FERNANDES et al., 2010). Devido a constatação desse efeito, foi aprovada em 1998 pela FDA (*Food and Drugs Administration*) a utilização de dose subantimicrobiana de doxiciclina (20mg) como um agente modulador da resposta do hospedeiro para tratamento da doença periodontal (LEE et al., 2004).

Os AINEs são atualmente o grupo farmacológico mais prescrito e utilizado em todo o mundo. O mecanismo de ação baseia-se na inibição

competitiva da ciclooxigenase (COX), enzima relacionada com a clivagem do ácido araquidônico em prostanoide. Sendo a PGE2 o prostanoide mais correlacionado com a severidade da doença, devido ao importante papel que exerce no processo de reabsorção do osso alveolar (NASSAR et al., 2003).

Os primeiros estudos desenvolvidos para tratamento da DP foram com AINES, estes por sua vez obtiveram grande sucesso quanto a diminuição da progressão da doença. Em um estudo feito por Drouganis e Hirsch (2001) com uma população de fumantes portadores de DP, tratados com aspirina 300mg/dia por dois anos como terapia adjunta ao tratamento convencional, observou-se uma diminuição da perda óssea alveolar satisfatória quando do uso da aspirina. Porém também foram observados efeitos gastrointestinais, os quais tornam o seu uso questionado.

Devido a impossibilidade de tratar a DP com AINES tradicionais, novos estudos foram feitos para se avaliar os efeitos de inibidores seletivos de COX-2 sobre a progressão da doença periodontal. Holzhausen e colaboradores (2002) em estudo com DP induzida em ratos, previamente tratados com diferentes doses de celecoxibe, observaram uma melhora nos parâmetros relacionados com a doença, incluindo uma redução da perda óssea alveolar. Porém, apesar de sua eficácia observada, o uso prolongado destes fármacos (seletivos de COX-2) foi associado com o surgimento de alterações cardiovasculares, incluindo um aumento no risco para o infarto e AVC (VARDAR et al., 2005).

Os BF foram sintetizados no século XIX por cientistas alemães para serem utilizados em patologias como mieloma múltiplo, osteoporose e metástase óssea de tumores originados principalmente de mama, pulmão e próstata. Os BF têm sua composição química dois átomos de fósforo ligados a um átomo de carbono. Esta estrutura possui uma resistência a hidrólise enzimática e lhes permite alta taxa de ligação a superfície de cristais de hidroxiapatita, sendo sua principal ação a inibição da atividade dos osteoclastos. O fato da DP ter como característica principal a perda óssea alveolar, sugere que os BF seriam uma boa escolha para o tratamento da DP (SANTOS et al., 2008).

Muitos estudos feitos até o momento discutem a possibilidade de uma maior incidência de osteonecrose maxilar em pacientes usuários de BF (SANTOS et al., 2008; SOARES et al., 2012). O que mostra Lopes e

colaboradores, (2009) em um estudo de casos de pacientes que faziam uso de BF orais que apresentaram uma incidência de 0,7/100.000/pessoas/ano de osteonecrose de mandíbula. Maior incidência de osteonecrose também comprovada por Santos (2008), em estudo de casos com pacientes que faziam uso de BF orais para diversas patologias.

Devido à dificuldade de encontrar um tratamento ideal, onde os riscos não superem os benefícios existe uma constante procura por um novo fármaco que atinja as expectativas.

2.7. Ranelato de Estrôncio

Atualmente uma nova droga tem sido promissora no tratamento de mulheres com osteoporose pós menopausa, trata-se do RE. Composto por dois átomos de estrôncio e uma molécula orgânica de ácido ranélico este medicamento tem chamado a atenção de pesquisadores por se tratar do único medicamento com duplo efeito exclusivo sobre a remodelação óssea, simultaneamente diminuindo a reabsorção e aumentando a formação, sendo seu uso na prática clínica para o tratamento da osteoporose aprovado pela EMA (*European Medicines Agency*) em outubro de 2004 (KIRSCHNECK et al., 2015).

Estudos afirmam que existem cinco fatores envolvidos na incorporação do estrôncio: dose, níveis plasmáticos de RE, duração do tratamento, sexo e localização esquelética. Após a administração oral do RE os íons de estrôncio são liberados do seu transportador orgânico no intestino e são absorvidos no gastrointestinal por mecanismos semelhantes ao cálcio (OLIVEIRA et al., 2012).

Embora o mecanismo de ação pelo qual o RE atua sobre o metabolismo ósseo não esteja completamente compreendido, hipóteses sugerem que o seu efeito pode estar relacionado com a interação do mesmo com canais de Ca^{2+} (ER et al., 2008). Relata-se que o estrôncio pode atuar em parte ativando o receptor extracelular de cálcio (CaSR), um membro da família de receptores acoplados à proteína G que responde ao cálcio extracelular e outros cátions com afinidade diferente. Um análogo dos CaSR é expresso em células ósseas e portanto pode desempenhar um papel em osteoblastos. Em vários tipos de células, a ativação

do CaSR pelo cálcio ativa a via de sinalização ERK1 / 2 (*Extracellular signal-regulated kinases*) conduzindo a uma maior replicação e diferenciação celular. Isto aumenta a possibilidade de que o estrôncio, um agonista de CaSR, possa melhorar a replicação dos osteoblastos através da ativação da CaSR e da via de sinalização ERK1 / 2. A sobrevivência dos osteoblastos é outro mecanismo importante que controla osteoblastogênese e formação óssea. Considerando que a apoptose dos osteoblastos tem sido implicado na osteoporose, medicamentos com características de replicação de osteoblastos é apontada como uma terapia significativa para o tratamento da doença (FROMIGUÉ et al., 2009; MARIE, 2007).

Adicionalmente a esses mecanismos o RE também parece atuar sobre o metabolismo ósseo regulando o balanço RANK-RANKL-OPG. A razão RANKL / OPG é, portanto, um equilíbrio essencial que controla osteoclastogênese e reabsorção óssea. Notavelmente, o aumento de RANKL / OPG induzido pela deficiência de estrogênio resulta na aceleração da reabsorção óssea e da perda óssea em mulheres pós-menopausa. Assim, moléculas que modulam a razão RANKL / OPG podem corrigir distúrbios na osteoclastogênese. Curiosamente, dados in vitro recentes indicam que o ranelato de estrôncio regula a expressão de RANKL e aumenta a expressão de OPG em células osteoblásticas humanas primárias in vitro, diminuindo assim a razão RANKL / OPG. Portanto, esses dados sugerem que o ranelato de estrôncio poderia reduzir osteoclastogênese e reabsorção óssea modulando a razão RANKL / OPG (MARIE, 2007).

Ainda sobre o balanço RANK-RANKL-OPG, em um estudo feito com modelos de artrite induzida em ratas e tratadas com RE, verificou-se que os animais que receberam tratamento com RE apresentaram uma diminuição nas quantidades de MMP, IL-1 e TNF- α , citocinas diretamente envolvidas no processo de reabsorção óssea, podendo sugerir que o efeito do RE na reabsorção óssea está relacionado com a diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias (DE MELO NUNES et al., 2015).

O mecanismos citados acima podem ser observados na figura 5 abaixo.

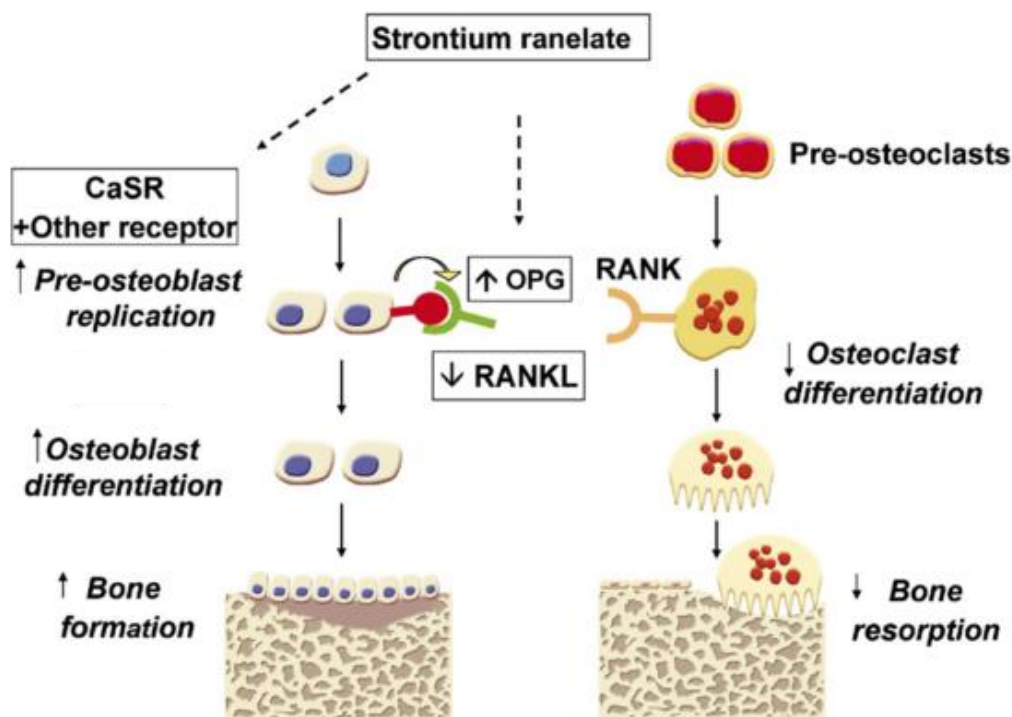


Figura 5: Mecanismo de ação do ranelato de estrôncio sobre as células ósseas. RE estimula a replicação de osteoblastos por ativação de canais de cálcio. Em contraste com a formação o RE pode inibir a atividade dos osteoclastos por aumentar o número de OPG, impedindo a ligação de RANK com RANKL, não ocorrendo então a diferenciação dos osteoclastos impedindo a reabsorção óssea (MARIE, 2007).

Embora o RE seja um medicamento promissor no tratamento da osteoporose, em 2012 com a criação do EMA (*Committee at the European Medicines Agency*), para avaliar relatórios de segurança regularmente e através destes observou um sinal de aumento da incidência de infarto do miocárdio. Esta análise de dados cardiovasculares levou a EMA a recomendar uma mudança na indicação de ranelato de estrôncio, que agora está restrito a pacientes com osteoporose grave para os quais o tratamento com outros medicamentos não é possível. Uma nova contraindicação foi também adicionada em pacientes com hipertensão não controlada e aqueles com histórico estabelecido, atual ou passado de cardiopatia (REGINSTER, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do RE sobre a perda óssea alveolar induzida pelo método da ligadura em ratos

3.2. Específico

- Avaliar o efeito do RE na POA através da análise morfométrica.
- Avaliar o efeito do RE sobre as fibras colágenas através da análise de colágeno com coloração de picrosirius red 19.
- Avaliar o efeito do RE sobre a formação óssea através da análise dos níveis de FAO e FAT.
- Avaliar a influência do RE sobre parâmetros de vasodilatação, pressão arterial e frequência cardíaca.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e considerações éticas

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, machos), provenientes do biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) (Ponta Grossa/Paraná-Brasil), com idade de 7 semanas e peso de 200 a 300 gramas. O protocolo do estudo foi submetido ao Comitê de Ética na Experimentação animal da UEPG N° 07552 e seu início se deu somente após a aprovação do mesmo. A manipulação dos animais seguiu as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e a lei 11794, de 8 de outubro de 2008. O delineamento experimental seguiu a diretriz Arrive Guidelines(KILKENNY et al., 2010).

4.2. Divisão dos Grupos

Os animais foram divididos de forma aleatória conforme o quadro 1 abaixo:

Grupo	Ligadura	Tratamento RE (625mg/kg)
Controle	Não	Não
Ligadura	Sim	Não
Ligadura + RE	Sim	Sim

Tabela 1: Divisão aleatória dos animais (fonte: a autora).

4.3. Indução da DP

Para induzir a perda óssea alveolar, os ratos foram primeiramente anestesiados IM com ketamina (90 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg). Um fio de algodão foi colocado ao redor do primeiro molar inferior do animal (direito e esquerdo) na região subgengival, para facilitar o acúmulo bacteriano conforme a metodologia de Branco de Almeida (2012 (Figura 7).

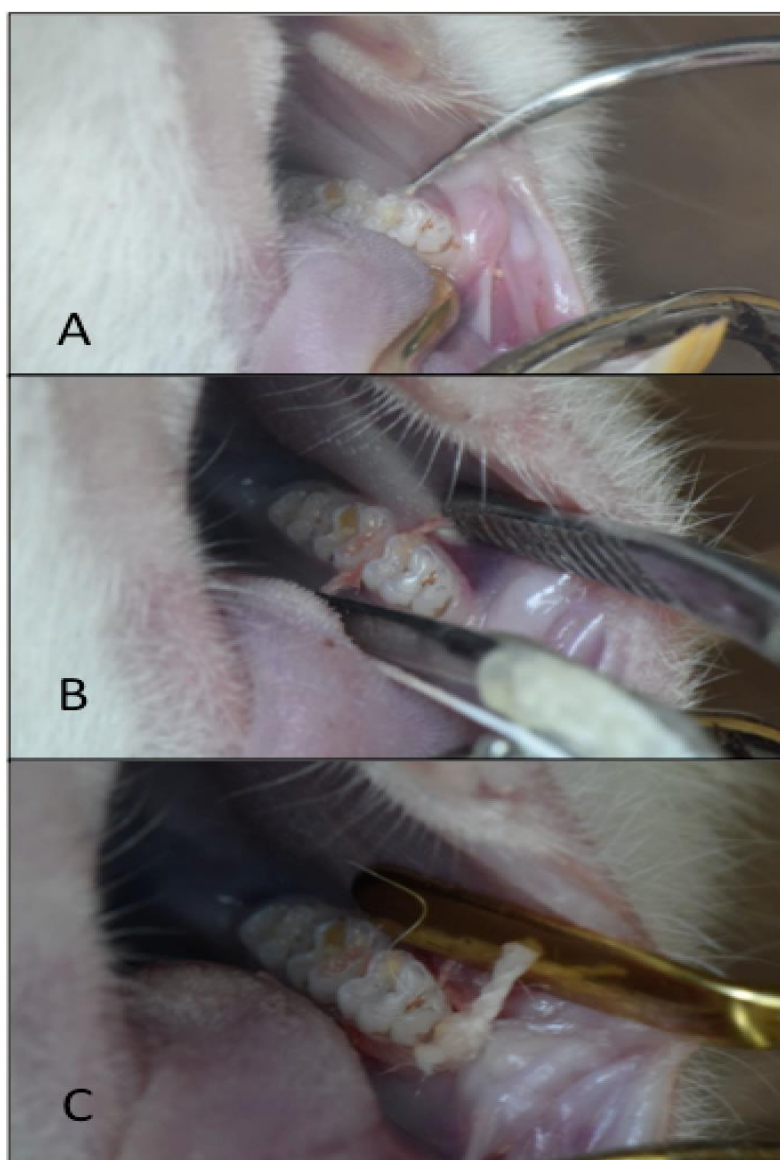


Figura 6: Procedimento cirúrgico de ligadura: (A) Primeiro Molar inferior; (B) Inserção do fio de algodão na região interproximal entre o primeiro e segundo molar; (C) Método de ligadura finalizado.

4.4. Gavagem com RE

Logo após a colocação da ligadura os animais receberam 625 mg/kg/dia por 15 dias a contar do dia do procedimento. Seguindo as orientações da bula do medicamento Protos® 2 horas antes da administração do medicamento era retirado a água e a ração dos animais e devolvidas 2 horas após a gavagem do RE.

4.5. Dia do sacrifício

No dia do sacrifício os animais passaram pela avaliação de parâmetros cardiovascular (pressão e frequência cardíaca) e uma amostra de sangue foi coletada para o exame de fosfatase alcalina total (FAT) e fosfatase alcalina óssea (FAO). Suas hemimanbíbulas foram retiradas, a esquerda armazenadas em formol 10% para a análise da quantificação de colágeno e a direita armazenada em álcool 70% para análise morfológica.

Os animais foram sacrificados sob anestesia geral após 15 dias da aplicação da ligadura, de acordo com os protocolos de (HOLZHAUSEN et al., 2002).

4.6. Perfil de segurança cardiovascular

Os animais foram anestesiados com uma mistura contendo ketamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), injetados via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (37° C). Para facilitar a respiração espontânea, todos os animais foram submetidos à traqueostomia. Na sequência, a veia femoral foi localizada e foi realizada a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso venoso foi usado para administração dos compostos que foram utilizados neste estudo. Posteriormente a artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos

adjacentes. Foi feita então a inserção de um catéter de polietileno (Angiocath®, número 19), devidamente heparinizado, o qual foi firmemente amarrado na artéria e conectado a um transdutor de pressão acoplado ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Após um período de 30 minutos de estabilização, a reatividade vascular para acetilcolina e nitroprussiato de sódio foi avaliada através da injeção de 3nmol/kg. Os valores de pressão arterial média (em mmHg) e de frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados em um computador por um software de integração (ChartPro7®). Ao final do experimento os animais foram sacrificados por sobre dosagem anestésica.

4.7. Dosagem de Fosfatase Alcalina Total e Óssea

Uma amostra de sangue foi coletada primeiramente para a dosagem de FAT que compreende as isoformas entérica, hepática e óssea. Posteriormente uma alíquota de 100µl foi aquecida em banho-maria à 56°C por 10 minutos para a obtenção da atividade da fosfatase alcalina não óssea e em seguida transferida para um banho de gelo. A atividade da fosfatase não óssea (termoestável) foi medida em espectrofotômetro a 30°C e absorbância de 450 nm. A fração óssea foi determinada indiretamente pela subtração da FAT - fosfatase não óssea. O método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor a metodologia seguiu as orientações do laboratório fabricante (LABTEST ®).

4.8. Análise morfométrica da perda óssea alveolar

As hemimandíbulas foram retiradas do álcool 70%, fervidas por aproximadamente 30 minutos e deixadas mergulhadas overnight solução de H₂O₂ 10 volumes. Após estarem secas foram submergidas por aproximadamente 3 minutos em solução de azul de metileno 1% (para identificação da junção amelo-cementária). As peças foram posicionadas sobre uma lâmina de vidro com cera utilidade, com a face lingual para cima,

objetivando-se o maior paralelismo possível entre as cúspides e entre as raízes linguais e vestibulares. A imagem foi captada com o emprego de uma lupa estereoscópica em aumento de 20X, digitalizada e realizada a mensuração da distância da junção amelo-cementária e crista óssea alveolar (pelo longo eixo das raízes mesial e mésio-lingual-face lingual) dos molares pelo software Image J 1.48.

Para cada hemimandíbulas foi verificada a área de perda óssea, compreendida entre JAC e o reborde osso alveolar (Figura 7).

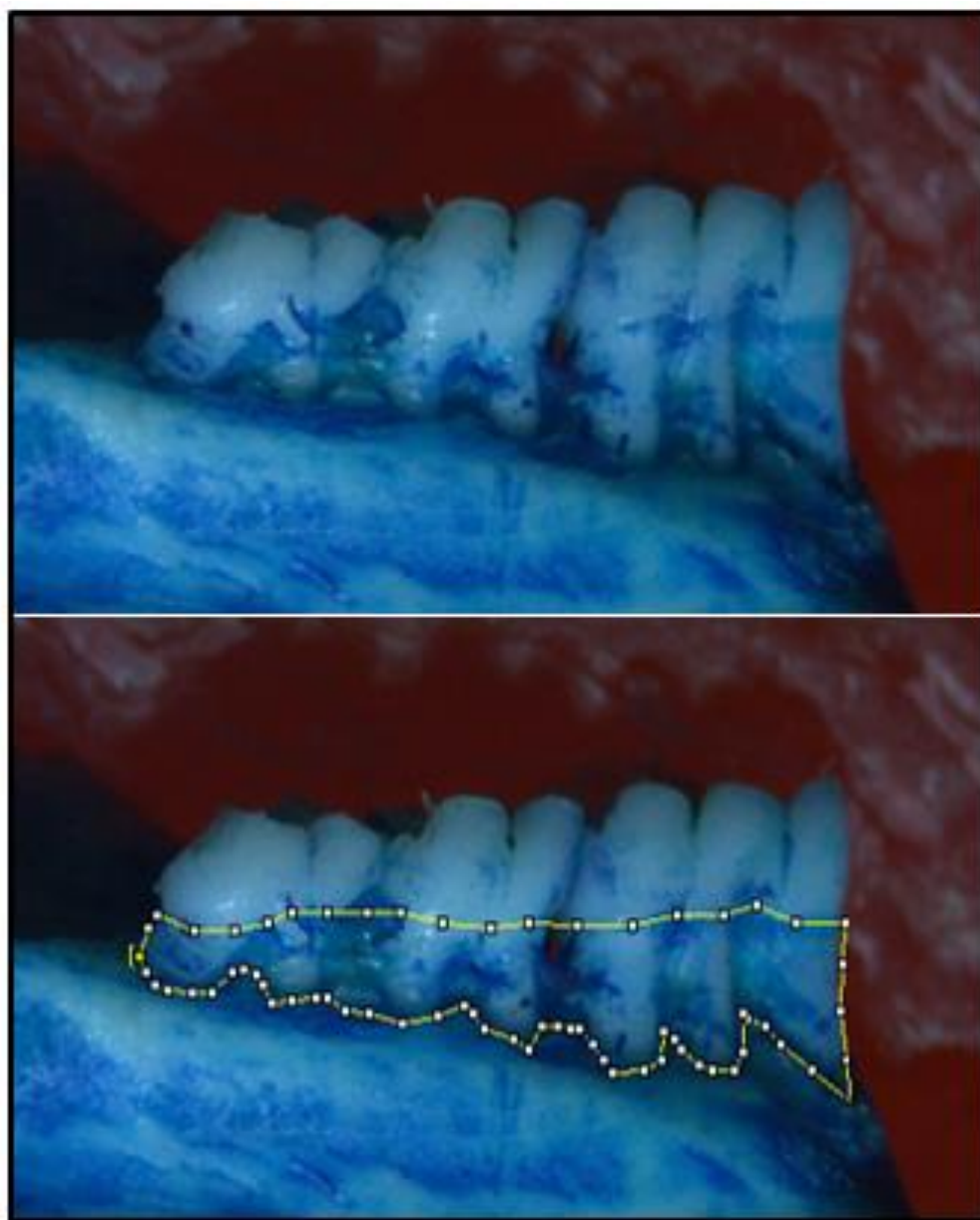


Figura 7: Procedimento da análise morfométrica da área dos três molares inferiores (mm^2): (A) Molares inferiores corados, (B) perda óssea entre JAC e o reborde ósseo.

4.9. Análise de Colágeno Tecidual

As hemimandíbulas foram removidas e submergidas em formalina tamponada a 10%. Para o processo de descalcificação as mesmas foram submergidas em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (trocado a cada dois dias) por aproximadamente 60 dias e incluídas em parafina. Foram feitos 5 cortes (4 μ m) semi-seriadas na direção mesiodistal e corados com picrosirius red 19. As imagens das secções foram obtidas por microscopia de polarização copiada e digitalizada a 500X de ampliação.

Em primeiro lugar, as imagens das fibras de colágeno que exibiam tonalidade vermelha foram selecionadas utilizando um software de processamento Photoshop CS6. As imagens selecionadas foram então transferidas para outro software de imagem, Image J em que foram binarizadas, e a porcentagem de área preenchida por fibras de colágeno foi calculado (Figura 8).

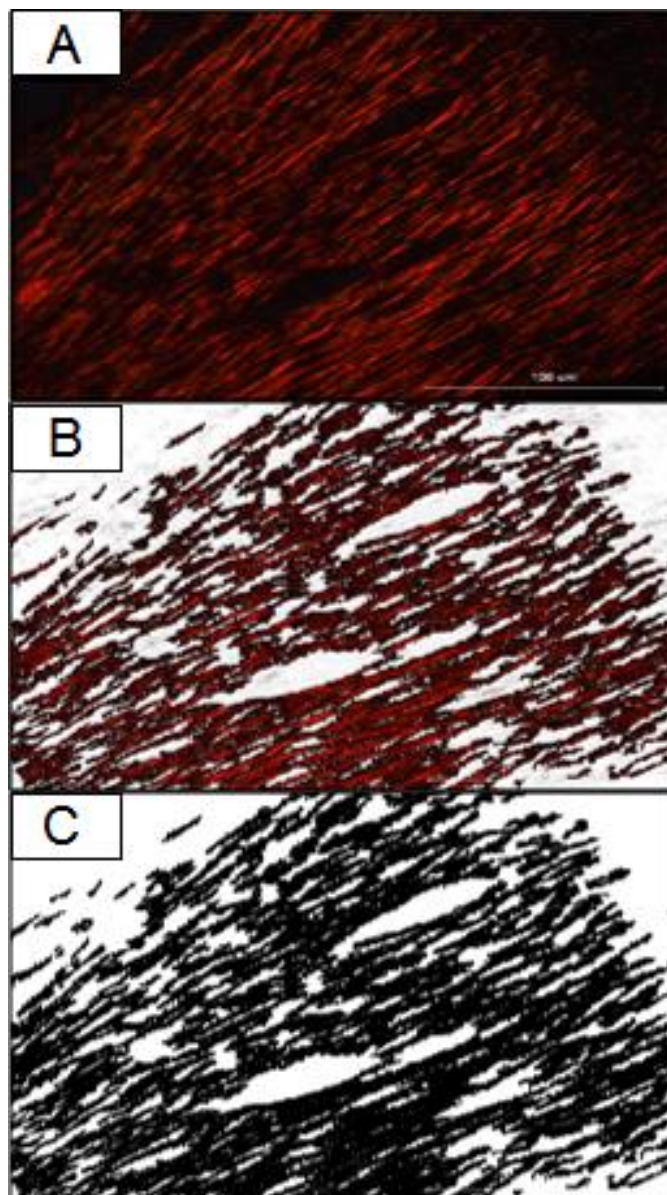


Figura 8: Análise de Colágeno Tecidual: (A) Imagem obtida pela microscopia de polarização; (B) Imagem com as fibras de colágeno com tonalidade vermelha selecionada pelo software Photoshop CS6; (C) Imagem binarizadas no software Image J.

4.10. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise exploratória com o auxílio do software GraphPad Prim 5, para determinação da melhor análise estatística dos dados. Visto que os dados seguiram um padrão de normalidade, optou-se pelo teste paramétrico utilizando o ANOVA, seguido de Tukey para análise estatística. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Cardiovasculares

Foram avaliadas as respostas a agentes vasodilatadores dependentes (ACh) e independentes (SNP) de endotélio. Não houve diferença entre os grupos nas respostas vasodilatadoras dos agentes estudados (Figura 9). Adicionalmente, a indução de periodontite nos animais e a administração de RE não alterou a pressão arterial ou a frequência cardíaca (Figura 10).

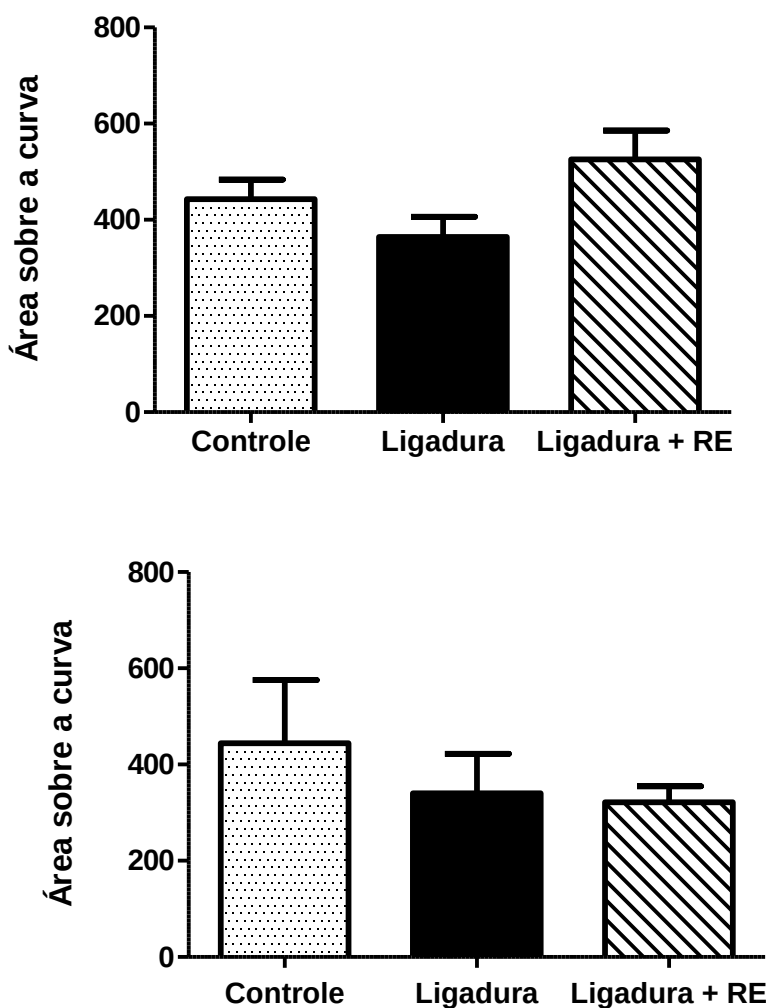


Figura 9: Efeitos do RE na resposta a agentes vasodilatadores dependentes e independentes de endotélio em ratos com periodontite. Não foram apresentadas diferenças significativas entre os grupos quando administradas doses de ACh (painel A) e nitroprussiato (painel B) (ANOVA $p > 0,05$).

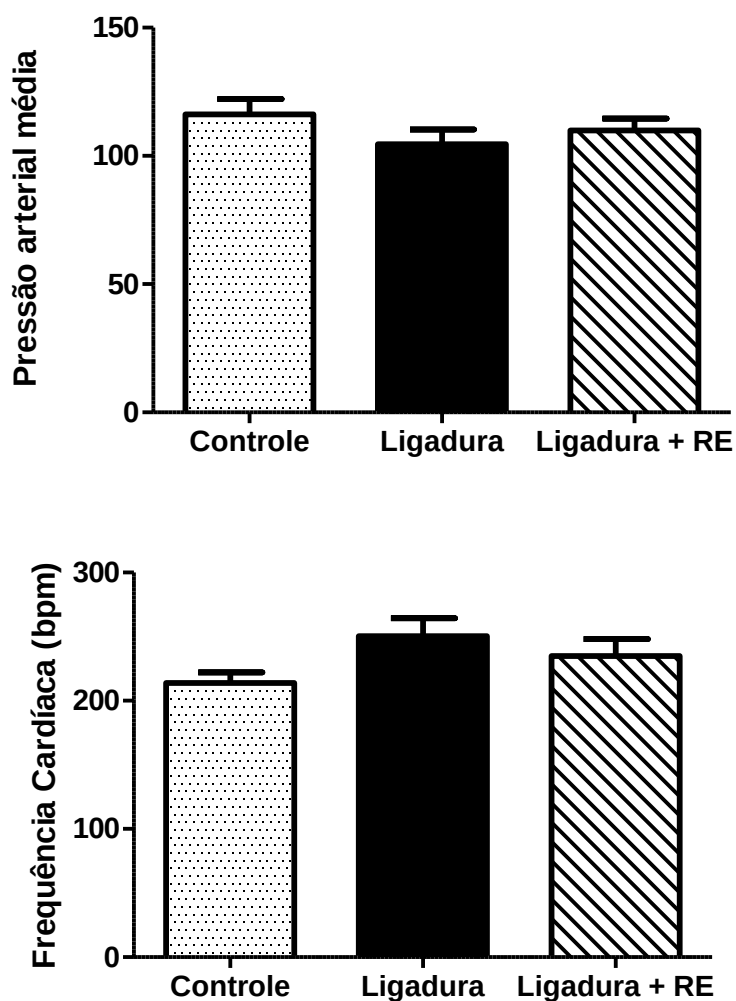


Figura 10: Efeito do RE sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em animais com periodontite induzida. Não foi apresentada diferença significativa entre os grupos quanto a pressão arterial e frequência cardíaca (ANOVA $p > 0,05$).

5.2. Fosfatase Alcalina Total e Óssea

Na avaliação dos efeitos do ranelato de estrôncio, observou-se um aumento significativo nos níveis séricos de FAT nos animais tratados com RE quando comparados com os grupos Controle e Ligadura (Figura 11). A análise de FAO também se apresentou valores aumentados para os animais tratados

com RE quando comparados com os grupos Controle e Ligadura sugerindo que o aumento de FAT era equivalente aos valores de FAO (Figura 12).

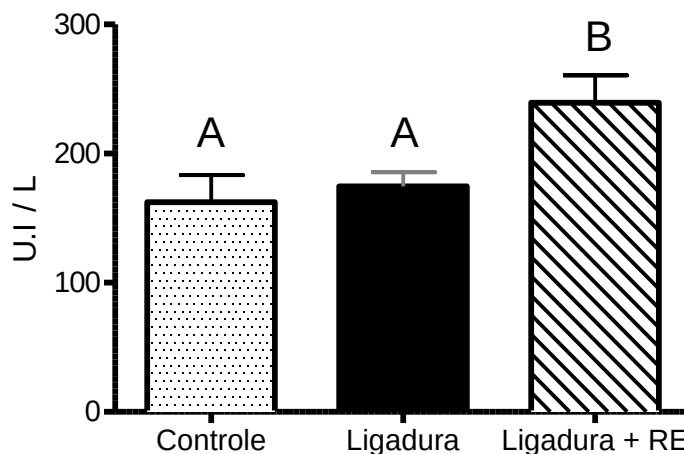


Figura 11: Efeito do RE sobre os níveis séricos de FAT na periodontite induzida em ratos. As letras A e B no topo de cada coluna indicam diferença estatística entre elas. (A versus B $p < 0,05$) (ANOVA – Tukey).

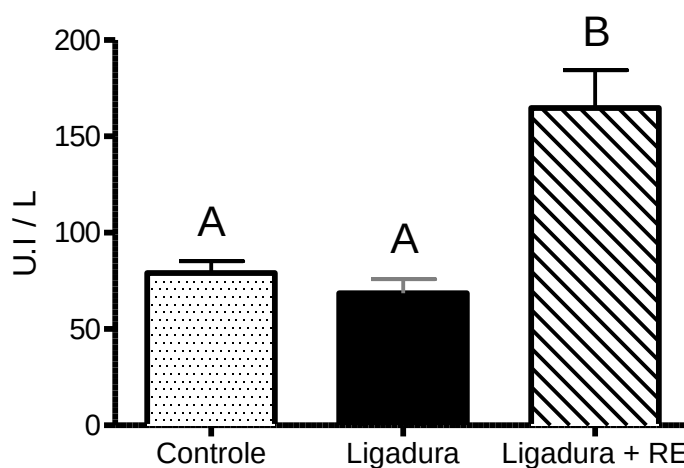


Figura 22: Efeito do RE sobre os níveis séricos de FAO na periodontite induzida em ratos. As letras A e B representam diferença significativa entre os grupos (A versus B, $p < 0,05$) (ANOVA-Tukey).

5.3. Morfométrica

A análise morfométrica das hemimandíbulas dos animais submetidos a DP e submetidos a gavagem por 15 dias nos mostrou que o grupo que recebeu RE e o grupo controle mantiveram uma menor reabsorção óssea quando comparados com o grupo Ligadura (Figura 13).

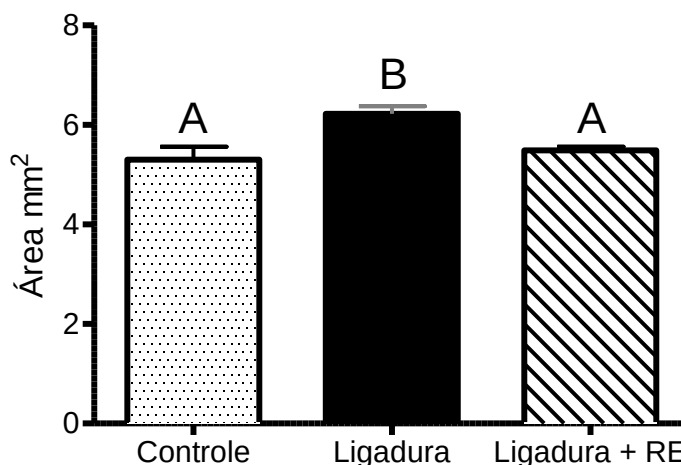


Figura 33: Efeito do RE sobre a perda óssea na periodontite induzida em ratos. As letras A e B representam diferenças significativas entre as colunas (A versus B, $p < 0,05$) (ANOVA – Tukey).

5.4. Colágeno Tecidual

A análise quantitativa das fibras de colágeno na região mesial entre o primeiro e segundo molar dos animais nos mostrou que o grupo tratado com RE sugeriu uma preservação das fibras quando comparados com o grupo Ligadura e o grupo controle (Figura 14).

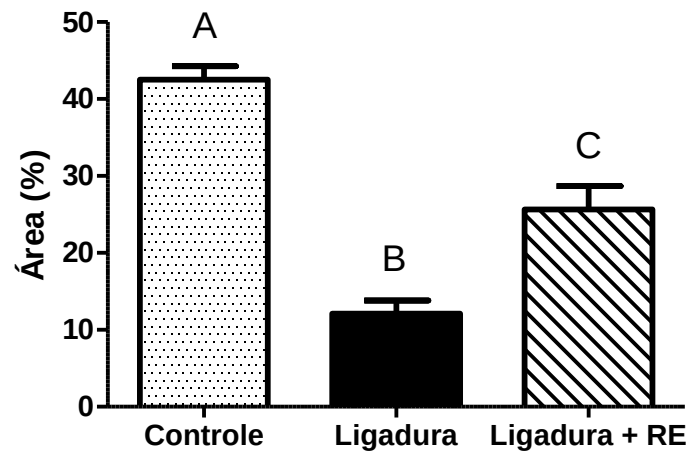


Figura 44: Efeito do RE na área tecidual ocupada por fibras colágenas em animais com periodontite induzidas em ratos. As letras A, B e C no topo de cada coluna indicam diferença significativa entre elas (A versus B, $p < 0,05$; A versus C, $p < 0,05$; B versus C, $p < 0,05$) (ANOVA-Tukey).

6. DISCUSSÃO

Atualmente há mais de 2.000 artigos na área da periodontia utilizando modelos animais (KANTARCI; HASTURK; VAN DYKE, 2015). O rato é o animal mais utilizado para estudar a patogênese da DP, pois a estrutura tecidual da área periodontal e suas patologias se assemelham as observadas em seres humanos (AGUIRRE et al., 2012). Na literatura são reportados vários métodos para a indução da DP como: a inserção de um fio de algodão ao redor do primeiro molar (ligadura), a aplicação local de LPS e a inoculação periodontopatógenos. Sendo o método de ligadura o mais utilizado pelos pesquisadores (ABE; HAJISHENGALLIS, 2013).

Nosso estudo seguiu a técnica de ligadura e a dose de RE utilizada baseou-se no estudo de Ammann e colaboradores (2004) onde realizaram dois experimentos, o primeiro com 334 ratas divididas em três grupos e tratadas com RE 225 mg/kg, 450 mg/kg e 900 mg/kg respectivamente e o segundo experimento com 30 fêmeas e 20 machos e tratados com 625 mg/kg, ambos os experimentos com duração de tratamento de 2 anos, observou-se que a concentração sanguínea da dose de 625 mg/kg nos animais equivalia a 2 gr/dia, posologia utilizada no tratamento de osteoporose em adultos.

Considerando que os processos de reabsorção e a formação fazem parte da remodelação óssea e qualquer desequilíbrio para ambos os lados pode resultar no ganho ou perda de massa óssea, os marcadores do metabolismo ósseo são de grande importância, podendo nos mostrar um desequilíbrio de ambas as partes (SANTOS et al., 2010), além de permitir uma melhor avaliação das drogas anabólicas e antirreabsortivas utilizadas nos tratamentos de doenças ósseas (SOUSA et al., 2010).

Inicialmente o presente estudo avaliou a FAT e FAO mediante a análise sanguínea. Como resultado apresentou um aumento significativo das concentrações de FAT acompanhada da FAO indicando atividade osteoblástica aumentada nos animais tratados com RE na periodontite induzida quando comparados com os animais controle. Estes achados estão de acordo com estudo realizado por Hott e colaboradores (2003) em um modelo animal de perda óssea induzida por imobilização de membros inferiores durante 10 dias, os

animais que receberam tratamento com RE, apresentaram um aumento dos níveis de FAT. Estes resultados também foram confirmados no estudo de Marie (2007), com modelos de osteoporose utilizando ratas ovariectomizadas e obtiveram concentrações aumentadas de FAO acompanhadas da melhora da massa óssea com consequente melhora da microarquitetura, sugerindo que o RE pode evitar fraturas espontâneas nos casos de osteoporose grave.

Também no estudo de Kirschneck et al,(2015) realizado com 48 ratos, submetidos a uma ancoragem ortodôntica por quatro semanas, 24 deles tratados com RE e os outros 24 com placebo, resultados mostraram que os animais tratados com RE tiveram 40% menos movimento dentário ou seja 40% menos reabsorção óssea em relação aos outros animais, adicionalmente a esses resultados também foi observado um aumento nos níveis de FAO, indicando que além da diminuição da reabsorção obteve-se também uma melhora na atividade osteoblástica.

Corroborando com os resultados Sanchez (2015), em um estudo de caso com uma mulher pós menopausa, após 3 meses de tratamento com RE observou aumento nos níveis de FAT, osteocalcina e de densidade óssea, o que significa que o RE consegue melhorar a arquitetura óssea mesmo em pouco tempo de tratamento. O fato do RE manter a arquitetura óssea em perfeito estado favorece a adesão dos osteoblastos, o que não ocorre em outras drogas por serem somente antirreabsortivas (SHI et al., 2016).

Por esse motivo, a EMA (*European Medicines Agency*) aprovou em 2004 o RE para tratamento da osteoporose sendo considerada uma droga anticatabólica e anabólica diante da remodelação óssea (BONNELYE et al., 2008).

No presente estudo utilizamos a metodologia morfométrica para avaliar a POA e como resultado os animais que receberam tratamento com RE apresentaram uma menor POA quando comparados com os outros grupos. Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados no estudo Li e colaboradores (2012), com implantes de titânio aplicados no fêmur de ratas ovariectomizadas e tratadas por 12 semanas, os animais tratados com RE apresentaram um aumento no número de osteoblastos e diminuição dos osteoclastos, consequentemente uma menor reabsorção óssea acompanhada de formação.

Vários estudos realizados com diferentes amostras sugeriram resultados positivos para o tratamento com RE, como é o caso do estudo realizado em macacos adultos para a investigação de remodelação óssea alveolar, onde foram administrados seis meses de RE, que os resultados mostraram uma redução significativa dos índices de reabsorção, mantendo os de formação óssea alveolar (BUEHLER et al., 2001)

Corroborando com os resultados obtidos sobre a POA o presente estudo avaliou a quantidade de fibras de colágeno presentes na região mesiodistal do segundo molar inferior utilizando a metodologia de picrosirius. Os resultados apresentaram uma preservação das fibras de colágeno nos animais que receberam tratamento com RE. Resultados semelhantes encontrados por Ahmet-Camciogluet e colaboradores (2009) onde observaram que o uso de RE favorece a prevenção da perda óssea tanto nível de osso trabecular no corpo vertebral quanto ao nível cortical no fêmur de ratas ovariectomizadas decorrente da perda óssea induzida por diminuição de estrógeno. Em acréscimo, Buehler e colaboradores (2001) avaliando a perda óssea alveolar em macacos constataram que além de inibir a atividade dos osteoclastos e estimular as de osteoblastos também apresentou resultados de que o RE pode estimular a síntese de colágeno.

Adicionalmente, Shi e colaboradores (2016) em análise sobre a quantidade de fraturas em ratas observou que houve uma diminuição no número de fraturas e uma melhora na massa óssea trabecular e cortical e manteve inalterada a quantidade fibras colágenas, considerou as fibras um determinante da qualidade intrínseca do osso.

Embora o RE seja uma droga promissora no tratamento de osteoporose, observou-se o aumento do risco de IAM em pacientes que utilizavam este fármaco. Isto levou a Agencia de Medicamentos Europeia (EMA) a adicionar contra indicações ao uso de RE em pacientes com pressão arterial descontrolada, pacientes com história de doença isquêmica cardíaca, doença arterial periférica ou doença vascular cerebral (REGINSTER, 2014).

Vale ressaltar que os pacientes que utilizam RE geralmente são idosos (portanto, muitos apresentam morbididades) e utilizam este fármaco por longos períodos de tempo para o tratamento da osteoporose (REGINSTER, 2014)

Assim, uso deste fármaco pode estar associado ao aumento do risco de IAM nestas condições. No presente estudo utilizamos ratos jovens submetidos ao tratamento com RE por apenas 2 semanas. Entretanto, devido à importância dos efeitos adversos cardiovasculares, foram realizadas análises de alguns parâmetros como a determinação da pressão arterial média, frequência cardíaca, e resposta a agentes vasodilatadores dependentes e independentes de endotélio (acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhuma das análises realizadas, indicando que o RE não parece apresentar risco cardiovascular na dose e no tempo de tratamento avaliados. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Cooper, Fox e Borer (2014) onde não foram encontradas evidências de risco aumentado de IAM em pacientes com osteoporose que utilizam o RE.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que o RE exerceu um efeito protetor sobre a POA na análise morfométrica, acompanhada de uma preservação das fibras colágenas, além de ter apresentado um aumento dos marcadores FAT e FAO indicando atividade osteoblástica, podendo ser uma possível estratégia terapêutica no tratamento da periodontite.

REFERÊNCIAS

ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 394, n. 1–2, p. 49–54, 2013.

AGUIRRE, J. I. et al. Enhanced alveolar bone loss in a model of non-invasive periodontitis in rice rats. **Oral Diseases**, v. 18, n. 5, p. 459–468, 2012.

AHMET-CAMCIOGLU, N. et al. Effects of strontium ranelate, raloxifene and misoprostol on bone mineral density in ovariectomized rats. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 147, n. 2, p. 192–194, 2009.

ALMEIDA, R. F. et al. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 22, p. 379–390, 2006.

AMMANN, P. et al. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. **Journal of bone and mineral research**, v. 19, n. 12, p. 2012–20, 2004.

BARBA-RECREO, P. et al. Zoledronic acid - Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 6, p. 744–750, 2014.

BENATTI, B. B. et al. bone resorption and RANKL expression during experimental periodontitis in rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 3, p. 340–346, 2012.

BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Journal Bone**, v. 42, n. 1, p. 129–138, 2008.

BORGES, P. K. DE O. et al. Prevalence and characteristics associated with metabolic syndrome in Japanese-Brazilians with and without periodontal disease. **Caderno Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 657–668, 2007.

BRANCO-DE-ALMEIDA, L. S. et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. **Journal**

of periodontology, v. 83, n. 5, p. 664–71, 2012.

BRASIL, M. D. S. DO. **Projeto SB2000: condições de saúde bucal da população brasileira no ano 2000: manual do examinador**. Brasília: [s.n.].

BUEHLER, J. et al. Strontium ranelate inhibits bone resorption while maintaining bone formation in alveolar bone in monkeys (*Macaca fascicularis*). **Bone**, v. 29, n. 2, p. 176–179, 2001.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal Periodontol**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1569–1576, 2008.

COOPER, C.; FOX, K. M.; BORER, J. S. Ischaemic cardiac events and use of strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis: A nested case-control study in the CPRD. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 2, p. 737–745, 2014.

COSTA, N. R. DE A.; TERRA E SOUZA, L. H.; VIEIRA, P. A. DE A.; RIBEIRO J.; NOE, V. L.; SILVA, C. A terapia de desinfecção total da boca no tratamento periodontal. **Revista. Dental. Press. Periodontal Implantol**, v. 3, p. 81–88, 2009.

DE MELO NUNES, R. et al. Strontium ranelate analgesia in arthritis models is associated to decreased cytokine release and opioid-dependent mechanisms. **Inflammation Research**, v. 64, n. 10, p. 781–787, 2015.

DENTINO, A. et al. Principles of periodontology. **Periodontology 2000**, v. 61, n. 1, p. 16–53, 2013.

DROUGANIS, A; HIRSCH, R. Low-dose aspirin therapy and periodontal attachment loss in ex- and non-smokers. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, p. 38–45, 2001.

ER, K. et al. Cytotoxicity analysis of strontium ranelate on cultured human periodontal ligament fibroblasts: A preliminary report. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 107, n. 8, p. 609–615, 2008.

FERNANDES, L. A. et al. Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 18, n. 6, p. 635–40, 2010.

FROMIGUÉ, O. et al. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-

independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 8 B, p. 2189–2199, 2009.

GULATI, M. et al. Essentials of periodontal medicine in preventive medicine. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 9, p. 988–994, 2013.

GUPTA, A.; GOVILA, V.; SAINI, A. Proteomics - The research frontier in periodontics. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 5, n. 1, p. 46–52, 2015.

HOLZHAUSEN, M. et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **The Journal of periodontology**, v. 73, n. 9, p. 1030–1036, 2002.

HOTT, M. et al. S12911-2 reduces bone loss induced by short-term immobilization in rats. **Journal Bone**, v. 33, n. 1, p. 115–123, 2003.

KAJIYA, M. et al. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. **Journal of Oral Microbiology**, v. 2, n. 2010, p. 1–16, 2010.

KANTARCI, A.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T. E. Animal models for periodontal regeneration and peri-implant responses. **Periodontology 2000**, v. 68, n. 1, p. 66–82, 2015.

KILKENNY, C. et al. **Guia publicação com animais_ARRIVE in portuguese-1.pdf**, 2010.

KINANE, D. F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 25, n. 1, p. 8–20, 2001.

KIRSCHNECK, C. et al. Strontium ranelate improved tooth anchorage and reduced root resorption in orthodontic treatment of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 744, p. 67–75, 2015.

LEE, J.-Y. et al. Effect of subantimicrobial dose doxycycline as an effective adjunct to scaling and root planing. **Journal of periodontology**, v. 75, n. 11, p. 1500–8, nov. 2004.

LI, Y. et al. Effects of strontium ranelate on osseointegration of titanium implant in osteoporotic rats. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 9, p. 1038–1044, 2012.

LOPES, I. et al. Osteonecrose da mandíbula associada ao uso de bifosfonatos. **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 5, p. 181–185, 2009.

MARIE, P. J. Strontium ranelate: New insights into its dual mode of action. **Journal Bone**, v. 40, n. 5 SUPPL., p. 5–8, 2007.

NARDONE, V.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L. Pharmacological management of osteogenesis. **Clinics**, v. 69, n. 6, p. 438–46, 2014.

NASSAR, C. et al. “Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento de doença periodontal induzida: avaliação radiográfica em ratos”. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 32, p. 125–130, 2003.

OLIVEIRA, J. P. et al. Strontium is incorporated in different levels into bones and teeth of rats treated with strontium ranelate. **Calcified Tissue International**, v. 91, n. 3, p. 186–195, 2012.

PAGE, R. C; Pathobiology Systemic. **Annals of Periodontology**, v. 3, n. 1, p. 109–120, 1998.

PENONI, D. C. et al. Association of osteoporosis and bone medication with the periodontal condition in elderly women. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 5, p. 1887–1896, 2016.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809–1820, 2005.

REGINSTER, J.-Y. Cardiac concerns associated with strontium ranelate. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 13, n. 9, p. 1209–13, 2014.

RODRIGUES, A. Z.; PALIOTO, D. B. Estratégias terapêuticas e potenciais alvos para modulação da resposta do paciente. **Revista de Periodontia**, v. 19, n. 1, p. 14–21, 2009.

SANCHEZ, J. A. Normalization of bone mineral density after five years of treatment with strontium ranelate. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 12, n. 3, p. 251–252, 2015.

SANTOS, P. S. S. et al. Osteonecrose maxilar em pacientes portadores de doenças neoplásicas sob uso de bisfosfonatos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 6, p. 0–3, 2008.

SANTOS, V. R. et al. Isolation and characterization of gingival fibroblasts positive for alkaline phosphatase in patients with chronic periodontitis and drug-induced gingival hyperplasia Isolamento e caracterização de fibroblastos gengivais positivos. **Revista Odonto Ciência**, v. 25, n. 1, p. 54–58, 2010.

SHI, C. et al. Strontium Ranelate Reduces the Fracture Incidence in a Growing Mouse Model of Osteogenesis Imperfecta. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 5, p. 1003–1014, 2016.

SOARES, G. M. S. et al. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 20, n. 3, p. 295–309, 2012.

SOUSA, I. O. DE et al. Respostas dos marcadores de curto prazo a teriparatida e ranelato de estrôncio em pacientes com osteoporose previamente tratados com bisfosfanatos. Short-term bone marker responses to teriparatide and strontium ranelate in patients with osteoporosis previ. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 54, n. 2, p. 244–9, 2010.

VARDAR, S. et al. Individual and Combined Effects of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor and Omega-3 Fatty Acid on Endotoxin- Induced Periodontitis in Rats. **Journal of periodontology**, n. January, p. 99–106, 2005.

WANG, C. W. (JEFF); MCCAULEY, L. K. Osteoporosis and Periodontitis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 14, n. 6, p. 284–291, 2016.

WILLIAM J. BOYLE, W. SCOOT SIMONET, D. L. L. Osteoclast differentiation and Activation. **Nature**, v. 423, n. May, p. 337–342, 2003.

Anexo A

Ata de defesa realizada no dia 24/02/17

Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS — ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLÓGIA E FISIOPATOLOGIA, NUMERO DA ATA 02/2017, DA MESTRANDA ANA PAULA VILELA REALIZADO NO DIA 24 DE FEVEREIRO DE 2017, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e quatro dias de fevereiro de dois mil e dezessete, às 14h00min na sala 115, Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do Professor Dr. Gilson Cesar Nobre Franco reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda Ana Paula Vilela na linha de pesquisa; Fisiopatologia do Metabolismo e do Sistema Imune, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Professor **Dr. Edmar Miyoshi (UEPG/PR)** e Professor Dr. Alessandro Hyczy **Lisbôa (Cescage/Pr)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: "Efeito do ranelato de estrôncio na progressão da perda óssea alveolar e sobre parâmetros cardiovasculares. Estudo *in vivo*". Encerrado a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como 11JJ(iQ6D9i considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim Não

Novo título: _____

Gilson Cesar Nobre Franco 1- (DEBIO - UEPG)- Presidente

Edmar Miyoshi 2- (DEFAR - UEPG) — Titular

Alessandro Hyczy Lisbôa 3- (CESCAGE - Pr) — Titular

Ponta Grossa, 24 de fevereiro de 2017.