

Área de conhecimento 4.02.99 – Odontologia

IMPACTO DA TERAPIA CRÔNICA COM BISFOSFONATOS NA ESTRUTURA DENTÁRIA: ANÁLISE COMPOSICIONAL E MICROESTRUTURAL

Monique Abreu Pauli¹, Natália Cristina Trentin Bordignon², Georgia Martini Ribeiro², Mariana Comparotto Minamisako³, Rogério de Oliveira Gondak^{*4}

1. Acadêmica do Curso de Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde (CCS-UFSC)
2. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC
3. Cirurgiã-dentista do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON Florianópolis)
4. Docente do Departamento de Patologia (PTL-UFSC) *Orientador.

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar *in vitro* a influência da terapia com bisfosfonatos (BFs) na composição e estrutura dentária. Foi realizada análise de fibras colágenas por meio de coloração de Tricrômio de Masson e Picrosirius-Hematoxilina Red sob luz polarizada e teste de microdureza por meio do teste de Knoop em amostras de dentes de pacientes desprovidos de alterações sistêmicas (n=12) e sob terapia com BFs superior a 6 meses (n=12). As fibras foram analisadas de maneira qualitativa (integridade baixa: Grau 0; moderada: Grau 1; alta: Grau 2). A análise microscópica com a coloração de Picrosirius Red acusou perda na integridade de colágeno nas amostras sob terapia com BFs (36,3% foram classificados como Grau 0 e 63,7% como Grau 1). Com a análise da coloração de Tricrômio de Masson, observou-se que 9,1% das amostras submetidas a BFs obtiveram Grau 0, 45,45% obtiveram Grau 1 e 45,45% apresentaram Grau 2. O teste de Knoop acusou a média de $53,87 \pm 17,24$ kgf/mm², similar a dentes hígidos.

Autorização legal: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), sob o número de parecer de 3.761.322.

Palavras-chave:

Medicamentos antirreabsortivos; dentes; microscopia.

Apoio financeiro: Este estudo foi financiado pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Trabalho selecionado para a JNIC: O presente trabalho foi selecionado para apresentação na 74ª Reunião Anual da SBPC pela Coordenadoria do Programa Institucional de Iniciação Científica e Tecnológica (PIICT) da Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPEQS) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Introdução

Os bisfosfonatos (BFs) são compostos químicos que se aderem fortemente aos cristais de hidroxiapatita do tecido ósseo, inibindo formação, agregação e dissolução desses cristais (CREMERS; PAPAPOULOS, 2011; PELAZ et al., 2015). O principal efeito biológico dos BFs é a inibição da atividade dos osteoclastos diretamente, promovendo sua apoptose e diminuindo seu recrutamento; e indiretamente, inibindo a secreção de prostaglandina e interleucina pelos osteoclastos, bloqueando sua estimulação (CLÉZARDIN; GLIGOROV; DELMAS, 2000).

Os BFs que possuem nitrogênio em sua composição incluem os alendronatos, pamidronatos, zoledronatos, risedronatos e ibandronatos. Existem, também, classes de BFs não nitrogenados, incluindo etidronato e clodronato (SOARES et al., 2016). Estes compostos podem ser administrados por via oral ou intravenosa, e são úteis para tratamento de distúrbios esqueléticos como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita e doenças metastáticas ósseas (BARONCELLI; BERTELLONI, 2014). Estas drogas têm sido utilizadas para aumentar a densidade óssea e reduzir a taxa de fratura óssea na osteoporose, tratar hipercalcemia severa causada por reabsorção óssea, reduzir calcificações existentes e prevenir ossificações ectópicas em condições associadas a calcificações heterotópicas, reduzir lesões osteolíticas e dor óssea em pacientes com displasia fibrosa óssea e osteomielite focal crônica recorrente (BARONCELLI; BERTELLONI, 2014).

Apesar dos conhecimentos acerca dos mecanismos terapêuticos e das consequências dos BFs no tecido ósseo, pouco se sabe sobre o efeito destes medicamentos na estrutura dental.

O objetivo do trabalho foi avaliar, *in vitro*, a influência da utilização da terapia com BFs na composição e estrutura dentária. Os objetivos específicos foram determinar a microdureza dos dentes sob efeito de BFs, analisar a integridade da rede de fibras colágenas pelas colorações histoquímicas de Masson e Picrosirius-Red sob luz polarizada e correlacionar os resultados encontrados com os dados existentes na literatura.

Metodologia

Foram selecionados para esta pesquisa 24 dentes humanos oriundos de pacientes atendidos na

Clínica Odontológica da UFSC e Serviço de Odontologia do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON), extraídos e armazenados em solução de formol a 10% até a data do experimento. Os dentes com indicação de exodontia foram doados pelos pacientes através da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras foram divididas em 2 grupos: grupo controle (dentes de pacientes desprovidos de alterações sistêmicas) e grupo experimental (dentes de pacientes sob terapia com BFs superior a 6 meses). Os dados dos pacientes, incluindo nome, idade, sexo, doença base e estadiamento, presença de osteonecrose e cárie de radiação, medicamentos em uso, alterações clínicas e radiológicas foram extraídos de prontuários e fichas clínicas.

Procedeu-se a descalcificação das amostras através da utilização de EDTA a 10% e pH 7,4. Os fragmentos dentais imersos em EDTA foram armazenados individualmente em Eppendorfs e a solução foi substituída periodicamente. A microtomia das amostras para confecção de lâminas histológicas foi realizada com auxílio de um micrótomo.

Para análise de fibras colágenas, os dentes foram corados com coloração especial de Tricrômio de Masson e Picosirius-Hematoxilina Red. Procedeu-se com desparafinização as lâminas histológicas em xilol, hidratação em álcool 99%, 95%, 70% e lavagem em água corrente, secagem e aplicação dos reagentes dos corantes. Após repetirem-se os processos de lavagem e secagem, seguiu-se com desidratação em série de álcool ascendente (70%, 95%, 99%) até o xilol. As fibras colágenas foram analisadas de maneira qualitativa (baixa integridade ou escore 0, moderada integridade ou escore 1, alta integridade ou escore 2). As lâminas coradas com Pricosirius foram também analisadas em microscópio de luz refletida polarizada.

Referente à análise da microdureza, os dentes foram seccionados com discos de corte em fatias de 3 mm oriundas da dentina e esmalte da porção coronária e da porção radicular. As amostras foram incluídas em uma base de resina acrílica e em seguida foram polidas com lixas de carbetto de silício em diferentes granulações (400, 600, 800 e 1200, sob irrigação constante). O polimento final foi realizado com pastas à base de alumina com granulação decrescente (0,3; 0,1 e 0,05 μm) em discos para polimento. Entre o uso de cada lixa e pasta, os espécimes foram lavados em água corrente e ao fim, lavados em ultrassom por 10 minutos.

O teste de dureza de Knoop foi aplicado por intermédio do equipamento HMV *Micro Hardness Tester* acoplado a um microcomputador e software específico para análise das imagens. Foram medidos 3 pontos distintos em cada amostra, gerando assim uma média de dureza e leitura com a objetiva de 40x. A carga utilizada foi de 100 gf e o tempo de endentação de 10 segundos. O resultado da dureza Knoop foi obtido pela razão entre a carga aplicada no endentador em kgf e a área projetada em mm^2 .

Resultados e Discussão

O sexo feminino foi predominante entre os pacientes sob uso de BFs (71,42%). Todos os pacientes em terapia antirreabsortiva faziam uso de Pamidronato (100%), e 14,7% faziam uso de terapia combinada com Pamidronato e Alendronato. Todas as doenças-base que levaram ao uso de BFs eram neoplásicas, sendo 57,15% mieloma múltiplo e 42,85% câncer de mama. A faixa de idade dos pacientes variou de 47 a 80 anos, sendo a idade média entre eles de 61 anos. Outras modalidades de tratamento foram implementadas juntamente à terapia com BFs, como radioterapia (57,14%) e quimioterapia (14,28%). A descalcificação das amostras levou um tempo médio de 60 a 90 dias para ocorrer por completo.

As fibras colágenas são responsáveis por formar a estrutura da matriz extracelular, fornecendo suporte e formato às células e tecidos, e participam também em diferentes fases do desenvolvimento na papila de germes dentários humanos, inclusive atuando como um guia na progressão da mineralização tecidual (ABRAHÃO et al., 2006; HILLMANN; GEURTSSEN, 1997). A análise de colágeno a partir da coloração de tricrômio de Masson no grupo experimental revelou os seguintes escores: grau 0 (baixa integridade) em 9,1% das amostras, grau 1 (moderada integridade) em 45,45% e grau 2 (alta integridade) em 45,45% (Figura 1). Além disso, foi possível visualizar que a dentina coronária apresentou menor preservação de colágeno quando comparada a dentina radicular. Houve maior integridade do colágeno na dentina secundária do que na primária. Casos que apresentaram lesão cariiosa interferiram na condição do colágeno coronário. Não se observou relação entre a dose de BFs administrada ou tempo de uso com as variações de graus obtidos.

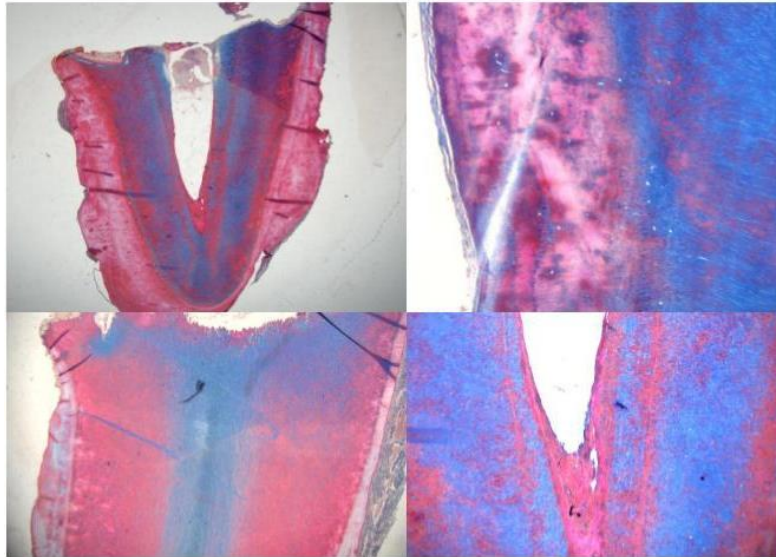


Figura 1: Imagens das lâminas histológicas coradas com tricrômio de Masson de amostras dentais de pacientes usuários de bisfosfonatos (Magnificação 5x, 10x, 20x e 40x).

Nas lâminas histológicas coradas com Picrosirius–Hematoxilina Red visualizou-se o colágeno pela coloração vermelha. No entanto, ao ser analisada sob microscopia sob luz polarizada, o colágeno tipo I foi identificado pela cor amarela ou laranja, enquanto que o colágeno tipo III foi identificado pela coloração esverdeada. Nesta pesquisa, o estudo das fibras colágenas a partir da coloração de Picrosirius Red permitiu demonstrar que em todas as amostras do grupo experimental houve uma perda na integridade tanto do colágeno I como II (Figura 2). O conteúdo pulpar e a dentina secundária mostraram um predomínio uniforme de fibras do tipo I e III (coloração amarelada e esverdeada, respectivamente, birrefringente na polarização), enquanto a dentina primária revelou um padrão menos organizado de distribuição das fibras, com a presença focal de colágeno tipo III (coloração esverdeada birrefringente na polarização), especialmente nas áreas peritubulares. Quanto a classificação da integridade do colágeno, avaliada em microscopia, sob polarização das lâminas histológicas coradas em picrosirius red, 36,3% dos casos foram classificados como grau 0 (baixa integridade) e 63,7% como grau 1 (moderada integridade).

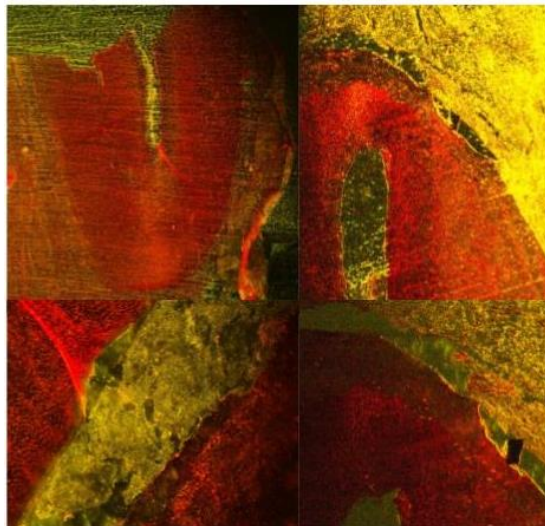


Figura 2: Imagens das lâminas histológicas coradas com Picrosirius-Red sob luz polarizada de amostras dentais de pacientes usuários de bisfosfonatos (Magnificação 5x, 10x, 20x e 40x).

O estudo de Santinoni e colaboradores, 2020, relatou um aumento na taxa de maturação das fibras colágenas em dentes de ratos expostos à terapia com alendronato (SANTINONI et al., 2020). No presente estudo, como desfecho, sugere-se associação entre distúrbios no colágeno dental sob influência dos BFs, visto que todas as amostras do grupo experimental analisadas demonstraram perda na integridade do colágeno quando analisadas sob luz polarizada. Considerando-se que os bisfosfonatos inibem a atividade dos osteoclastos e conseqüentemente afetam a remodelação e regeneração dos ossos, e que as fibras colágenas possuem papel importante na mineralização necessária para tais reparos ósseos, é possível compreender melhor a associação encontrada neste trabalho.

O teste de dureza de Knoop denunciou um valor médio de 53,87kgf/mm² (DP 17,24) dos dentes de pacientes sob uso de BFs e dos pacientes sem doenças-base. Esta média é similar ao valor de normalidade encontrado na literatura (CHUENARROM; BENJAKUL; DAOSODSAI, 2009; FUENTES et al., 2004). Quando comparado a demais estudos da mesma temática na literatura, tal resultado apresenta-se divergente em trabalhos cuja amostra consta de dentes em fase de secreção de tecido mineralizado dental, nos quais foi possível visualizar redução no valor de microdureza do teste de Knoop (ESPIRITO SANTO et al., 2007). No entanto, o desfecho que obtivemos mostra-se similar aos de estudos cuja terapia com bisfosfonatos foi realizada após o período de conclusão da odontogênese, como é o caso do trabalho de Nelson-Filho e colaboradores (2016), que mostrou que o uso sistêmico de alendronato não afetou a microdureza de Knoop e a permeabilidade do esmalte após ataque ácido em dentes de roedores (NELSON-FILHO et al., 2016). Considerando o exposto, destaca-se a importância da realização de estudos com metodologia aplicada a pacientes pediátricos em terapia de BFs, para avaliar a hipótese de alterações morfológicas e estruturais nesta população.

Conclusões

Diante dos desfechos encontrados na presente pesquisa podemos concluir que a terapia crônica com BFs esteve associada à perda de integridade das fibras colágenas nos tecidos dentais de pacientes sob uso desse medicamento. A microdureza dos tecidos dentais, no entanto, não se mostrou alterada, mesmo em pacientes em terapia antirreabsortiva. Novos estudos e metodologias rigorosas são indicados a fim de aprimorar os conhecimentos acerca desta temática.

Referências bibliográficas

- ABRAHÃO, I. J. et al. Collagen analysis in human tooth germ papillae. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 3, p. 208–212, 2006.
- BARONCELLI, G. I.; BERTELLONI, S. The use of bisphosphonates in pediatrics. **Hormone research in paediatrics**, v. 82, n. 5, p. 290–302, 2014.
- CHUENARROM, C.; BENJAKUL, P.; DAOSODSAI, P. Effect of indentation load and time on knoop and vickers microhardness tests for enamel and dentin. **Materials Research**, v. 12, n. 4, p. 473–476, 2009.
- CLÉZARDIN, P.; GLIGOROV, J.; DELMAS, P. **Mechanisms of action of bisphosphonates on tumor cells and prospects for use in the treatment of malignant osteolysis** *Revue du Rhumatisme (Edition Francaise)*, 2000.
- CREMERS, S.; PAPAPOULOS, S. Pharmacology of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 42–49, jul. 2011.
- ESPIRITO SANTO, A. R. et al. Amelogenin- and enamelysin (Mmp-20)-deficient mice display altered birefringence in the secretory-stage enamel organic extracellular matrix. **Connective tissue research**, v. 48, n. 1, p. 39–45, 2007.
- FUENTES, V. et al. Tensile strength and microhardness of treated human dentin. **Dental Materials**, v. 20, n. 6, p. 522–529, 2004.
- HILLMANN, G.; GEURTSSEN, W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. **Cell and tissue research**, v. 289, n. 1, p. 145–154, jul. 1997.
- NELSON-FILHO, P. et al. Enamel permeability and resistance to acid challenges after systemic use of sodium alendronate: a study in rat teeth. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 7, p. 1647–1654, 2016.
- PELAZ, A. et al. Epidemiology, pharmacology and clinical characterization of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. A retrospective study of 70 cases. **Acta otorrinolaringologica espanola**, v. 66, n. 3, p. 139–147, 2015.
- SANTINONI, C. S. et al. Topical sodium alendronate combined or not with photodynamic therapy as an adjunct to scaling and root planing: Histochemical and immunohistochemical study in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 55, n. 6, p. 850–858, 2020.
- SOARES, A. P. et al. Effects of Pamidronate on Dental Enamel Formation Assessed by Light Microscopy, Energy-Dispersive X-Ray Analysis, Scanning Electron Microscopy, and Microhardness Testing. **Microscopy and Microanalysis**, v. 22, n. 3, p. 640–648, 2016.