



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**



AUGUSTO BARROS GREGOLIN

**Doxiciclina em dose subantimicrobiana (SDD) como um potencial
medicamento para tratamento de doenças osteometabólicas**

**Ribeirão Preto
2022**

AUGUSTO BARROS GREGOLIN

Doxiciclina em dose subantimicrobiana (SDD) como um potencial medicamento para tratamento de doenças osteometabólicas

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Professor Doutor Vinicius Pedrazzi

Ribeirão Preto

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Vinícius Pedrazzi, meu coordenador e orientador, e aos Professores Fellipe Augusto Tocchini de Figueiredo e Tatiane Cristina Dotta, que foram co-orientadores deste projeto e fizeram tudo isso possível.

Agradeço meus colegas, tanto da turma 91, minha turma de ofício, quanto da turma 92, turma que me adotou e acolheu de forma incrível. Ambos sempre estiveram presentes nos piores e também nos melhores momentos da minha graduação, e por isso sou extremamente grato.

Agradeço aos meus amigos, vizinhos e irmão da República Volúpia, e a todos que por ali passaram durante esses 6 lindos anos vividos. Conheci pessoas e profissionais incríveis, que marcaram minha vida e estavam presentes nela para sempre.

Agradeço a todos os professores e funcionários, que ao longo dos anos me ensinaram a amar essa profissão e levar essa faculdade incrível pro resto da minha vida.

Por fim, um agradecimento à todos os meus familiares, em especial, para meus pais e meu irmão, que são meu chão, meu céu e meu mar, que proporcionaram essa experiência e tornaram possível a realização deste sonho, sem eles, nada disso seria possível.

RESUMO

Considerada uma doença esquelética muito comum, a osteoporose é caracterizada pela baixa densidade óssea nos tecidos humanos. Maiores cuidados devem ser levados em consideração nestes pacientes, uma vez que a formação óssea defeituosa leva à deterioração da microestrutura do osso trabecular e aumenta a porosidade cortical, a fragilidade óssea e a possibilidade de fratura, além de possível osteonecrose mandibular quando tratada com bisfosfonatos. Este estudo tem por objetivo avaliar e comparar o efeito da doxiciclina em dose subantimicrobiana (SDD) em ratas osteopênicas, com o risedronato de sódio, medicamento padrão ouro utilizado nesta enfermidade. Para tanto, 21 ratas Wistar foram divididas em 3 grupos (n=7): C – Controle; DOX – Doxiciclina 30 mg/kg/dia e RIS – Risedronato de sódio 30 mg/kg/mês. As ratas, com cerca de 80 dias de idade, passaram pelo procedimento de indução de osteopenia, por meio de cirurgia de ovariectomia. Após 90 dias de indução, foram submetidas ao tratamento com DOX ou RIS, ambos por 60 dias, e após este período todos os animais foram induzidos à morte. Os ossos fêmures foram removidos cuidadosamente e submetidos à análise de densitometria óssea. Após teste estatístico de modelo linear multivariado, notou-se que para valores de BMD houve uma melhor relevância medicamentosa em DOX ($2,07 \pm 0,1$) quando comparamos a C ($1,78 \pm 0,2$) e, também houve diferença estatística entre C ($1,78 \pm 0,2$) vs. RIS ($2,03 \pm 0,1$). E para valores de BMC tem-se diferença significativa entre DOX ($18,8 \pm 2$) vs. C ($16,5 \pm 2,2$). Desta forma, conclui-se que o medicamento doxiciclina em doses subantimicrobianas representa uma diferença relevante na qualidade do tecido ósseo.

Palavras-chave: Doxiciclina, Osteoporose, Risedronato de Sódio, Bisfosfonatos

ABSTRACT

Considered a common skeletal disease, the osteoporosis is characterized by the low bone density and low bone mass content in the human body. We have to watch out and take care of those patients, considering their insufficient bone formation leads to the trabecular bone damage, increasing their cortical porosity, bone fragility and the risk of bone fracture, further on the possibility of developing osteonecrosis in mandibular areas, if the osteoporosis is treated long-termly with bisphosphonates. The goal of this study is to evaluate and compare the effects of Subantimicrobial Dose Doxycycline (SDD) and Sodium Risedronate in osteopenic ovariectomized Wistar rats. We used 21 rats, divided into 3 distinct groups (N=7): C- Control; DOX- Doxycycline 30mg/kg/day; RIS- Sodium Risedronate 30mg/kg/month. The rats were 80 days old when they were submitted to the osteopenic induction through the bilateral ovariectomy. 90 days after the procedure, the rats were exposed to a DOX RIS treatment for 60 days, until they were induced to die by an anesthetic overdose. The femur bones of the rats were carefully removed and submitted to the bone densitometry analysis. After the multivariate linear model statistical test, we analyzed the data provided and we noticed that, for BMD values, the DOX had a more significant relevance ($2,07 \pm 0,1$) when compared to C ($1,78 \pm 0,2$), and also there was noticed a statistical difference between C ($1,78 \pm 0,2$) vs. RIS ($2,03 \pm 0,1$). For BMC values, we can see a significant difference between DOX ($18,8 \pm 2$) vs. C ($16,5 \pm 2,2$). Therefore, we can conclude that the Subantimicrobial Dose Doxycycline (SDD) presents a relevant increase in the bone density, content and quality.

Keywords: Doxycycline, Osteoporosis, Sodium Risedronate, Bisphosphonate

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Procedimento de ovariectomia.....	14
3.2 Administração de Doxiciclina	15
3.3 Administração de Risedronato de Sódio.....	15
3.4 Indução de morte e colheita das amostras usadas para análises.....	16
3.5 Avaliação da Densitometria Óssea	16
3.6 Análise estatística e disseminação dos dados	17
4. RESULTADOS.....	18
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
8. ANEXO.....	29

1. INTRODUÇÃO

Diversos fatores podem levar a perda de um ou mais dentes na cavidade bucal, tais como lesões de cárie, doenças periodontais, traumas e doenças sistêmicas como diabetes, e doenças osteometabólicas como osteoporose (DE MEDEIROS et al., 2018)

A osteoporose é uma condição esquelética, caracterizada pela perda óssea, seja por massa ou volume, de um osso mineralizado. Tal perda de densidade, torna o osso em questão mais susceptível à fraturas ósseas (GLASER AND KAPLAN, 1997; KARAGUZEL; HOLICK, 2010).

Por sua vez, a osteopenia, é uma fase antecessora à osteoporose e pode ser conhecida também pelos termos “perda de massa óssea” ou “baixa densidade óssea”, e diz respeito à redução da massa do osso, que é gradual, e se não controlada por meio de exercícios e alimentação, pode acarretar em um quadro de osteoporose (KARAGUZEL; HOLICK, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o diagnóstico é feito a partir do exame de densitometria óssea, que nos mostra a Densidade Mineral Óssea (DMO) e massa dos ossos em comparação com os padrões de idade e sexo pré-definidos, ou então por fraturas causadas por fragilidade no quadril, coluna, fêmur, punho, úmero, pelve e costelas. O exame mede o Desvio Padrão (DP) da densidade mineral óssea a partir da absorciometria de raios-x de dupla energia (DXA). Os resultados podem ser comparados com a tabela estabelecida pela OMS: Normalidade: DMO menor ou igual a 1 DP; Osteopenia: DMO entre 1 e 2,5 DP; Osteoporose: DMO maior ou igual a 2,5 DP; Osteoporose Severa: quando são identificadas 1 ou mais fraturas por fragilidade óssea (GLASER AND KAPLAN, 1997).

A osteoporose é mais comum em mulheres e pode ser dividida em duas categorias: primária e secundária. A osteoporose primária ainda pode ser dividida em três subgrupos: osteoporose pós menopausa (tipo I), causada necessariamente em mulheres, quando estas apresentam deficiência de estrógeno no metabolismo; osteoporose relacionada a idade (tipo II), acomete homens e mulheres; osteoporose idiopática (tipo III) acomete homens e mulheres. A osteoporose secundária, por sua vez, é causada por outras doenças (tais como hipotireoidismo, artrite reumatoide, doenças hepáticas ou intestinais, hipergonadismo, câncer, síndrome de Cushing ou

até alcoolismo) ou então pelo uso de medicamentos a longo prazo (anticoagulantes, anticonvulsivantes e corticoides) e também pode acometer tanto homens quanto mulheres (GLASER AND KAPLAN, 1997; SRIVASTAVA; DEAL, 2002)

Desde os anos 70, os medicamentos de primeira escolha no tratamento da osteoporose visando a prevenção de fraturas ósseas são os bisfosfonatos (DÍAZ-GUERRA; IGLESIAS; MIGUEL, 2018; KENDLER et al., 2018). Estes, farmacologicamente, funcionam inibindo a reabsorção óssea, pois causam a apoptose dos osteoclastos (células responsáveis pela descalcificação), como resultado, tal inibição da atuação dos osteoclastos, gera um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, reduzindo a perda óssea, assim como o risco de fraturas verticais, e melhorando a densidade mineral óssea (KENDLER et al., 2018). No geral, os bisfosfonatos são classificados por suas estruturas químicas e podem ser divididos em três gerações, cada qual com diferentes potências e características. De acordo com suas estruturas, os bisfosfonatos podem ser: não nitrogenados (1ª geração) ou nitrogenados (2ª e 3ª geração) (KUŽNIK et al., 2020).

Os não nitrogenados aprovados clinicamente são: clodronato, etidronato e tiludronato; enquanto os nitrogenados podem ser encontrados como: alendronato, ibandronato e pamidronato (2ª geração) risedronato e zoledronato (3ª geração) (KUŽNIK et al., 2020).

Apesar de ser um medicamento de primeira escolha e confiável para o tratamento da osteoporose, este, dependendo do tempo de uso e do bifosfonato escolhido, pode apresentar efeitos colaterais não muito agradáveis, como por exemplo a fratura da haste do fêmur, ou então uma osteonecrose da mandíbula (KUŽNIK et al., 2020). A osteonecrose é caracterizada por uma exposição óssea na região maxilo-facial e pela persistência desta por no mínimo 8 semanas. A incidência estimada para que esta condição aconteça é entre 1 a 10,000 e 1 a 100,000 pacientes/ano (GIGER; CASTAGNER; LEROUX, 2013; RIZZOLI et al., 2013; WATTS; DIAB, 2010). Normalmente a osteonecrose acontece em pacientes que tomam altas doses do medicamento e também pode estar atrelada à má higiene oral, radio e quimioterapia e uso de corticosteroides, sendo muito rara, mas de difícil tratamento (GHONEIMA et al., 2010; MCCLUNG et al., 2013).

Nos anos 50, cientistas tentavam modificar a tetraciclina, por conta de sua instabilidade química, nessas tentativas, foi descoberto que o grupo 6-hidroxi poderia ser removido da tetraciclina, resultando no grupo 6-deoxitetraciclina, grupo portador

de propriedades farmacocinéticas únicas e com atividade antibacteriana melhorada em relação ao anterior (CUNHA; SIBLEY; RISTUCCIA, 2012). Apenas em 1962 Schach von Wittenau registrou uma maneira de dissociar a α -6-deoxitetraciclina em um produto isolado, este grupo, seria conhecido como “doxiciclina” (CUNHA; SIBLEY; RISTUCCIA, 2012).

A doxiciclina é um antibiótico (posologia de 100mg/dia) e um inibidor de metaloproteinases de matriz (MMPs), inclusive abaixo da dose antimicrobiana (doxiciclina em dose subantimicrobiana – Subantimicrobial Dose Doxycycline – SDD) (posologia de 20g duas vezes ao dia). Esta última opção, sendo usada para periodontite crônica e inflamações crônicas da pele, agindo como droga anti-inflamatória (GOLUB et al., 1995; TAN et al., 2011). Seu uso pode ser realizado continuamente por 9 meses, garantindo o não surgimento de resistência microbiana à doxiciclina (CATON; RYAN, 2011)

As tetraciclinas possuem 4 anéis aromáticos, possuindo características quelantes de metais bivalentes em condições fisiológicas (PALM et al., 2008). De acordo com PALM et al., 2008, foram testadas as afinidades e associações da tetraciclina em diferentes metais bivalentes, estes: cálcio, zinco, magnésio, bário, estrôncio, ferro, manganês, cobre, zinco, cobalto, níquel e cádmio. Seguidos os testes, os resultados mostraram que os metais bivalentes com maior afinidade são respectivamente: bário, estrôncio, cádmio, cálcio, magnésio, cobre, manganês e zinco (ferro, níquel e cobalto tiveram afinidade cerca de 5 vezes menor que o zinco). Com isso, podemos concluir que a tetraciclina tem muito mais afinidade por outros metais antes de cálcio e zinco, porém, em condições fisiológicas, nenhum desses metais se apresenta em maior concentração no organismo, portanto, são os metais que encontramos associados à tetraciclina (PALM et al., 2008).

Os metais cálcio, zinco e magnésio possuem características químicas em comum, e a doxiciclina pode ser utilizada como agente quelante destes metais. Assim, por saber que a doxiciclina se deposita em matrizes ósseas, há grandes chances dela se depositar associada à alguns desses íons, aumentando a mineralização óssea. (BOULOS; KNOEPP; RUBIN, 2007; DEMPSTER, 2008; PAUTKE et al., 2010).

Além disso, por ser conhecida desde os anos 50, a doxiciclina já tem seus efeitos colaterais bem conhecidos, e também por ser um medicamento de baixo custo, uma grande vantagem quando comparado aos medicamentos de última geração para o tratamento da osteoporose, que em sua maioria são caros e com adversidades

desconhecidas (FIGUEIREDO, 2017)

Com isso se espera que o uso do medicamento doxiciclina nas doses subantimicrobianas (dose não antimicrobiana ou *Subantimicrobial Dose Doxycycline* – SDD) possa ser uma alternativa de melhor prognóstico no tratamento de pacientes acometidos por doenças osteometabólicas.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar o efeito do medicamento doxiciclina em dose subantimicrobiana de 30 mg/kg/dia em ratas osteopênicas, com o risedronato de sódio de 30 mg/kg/mês, medicamento padrão ouro utilizado nesta enfermidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética para uso de animais em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), que segue os parâmetros internacionais sobre uso e manipulações animais, tendo sido aprovado (processo nº: 2018.1.845.58-1) (Anexo 1). No biotério da FORP existe um protocolo estrito de manutenção da saúde animal durante todo o experimento, este protocolo consiste em ciclo 12h claro/12h escuro, em temperatura regulada por ar condicionado com ciclos de frio/calor que variam restritamente entre 23,5°C a 24,1°C. Existe a presença de exaustão de ar que funcionam por um período de 15 minutos/hora que geram uma troca de ar que está em torno de 1050 m³ de ar. No máximo 4 fêmeas foram alojadas em cada gaiola de plástico com grade superior em aço inoxidável em dimensões de 41cm-34cm16cm (altura), conferindo 1394 cm² espaço e a alimentação foi normal *ad libitum* (Figura 1).

Todos os animais foram avaliados diariamente para a saúde, alimentação, água e gaiolas limpas, além da qualidade do ar e temperatura. A água foi fornecida *ad libitum* através de garrafa de vidro, rolha e tubo com cânula. Três vezes por semana estas garrafas foram limpas sob lavagem abundante com água e sabão.

Vinte e uma ratas Wistar fêmeas em torno de 35 dias de vida (ou 90 g) foram obtidas a partir da colônia do biotério central do campus da USP de Ribeirão Preto e alocadas no biotério da FORP-USP. Após o recebimento das ratas, estas foram pesadas e posteriormente divididas aleatoriamente em 3 grupos compostos cada um por 7 ratas (n=7). Logo após a distribuição dos grupos, as ratas passaram pelo período de aclimação com o ambiente por cerca de 45 dias. Os grupos foram definidos da seguinte maneira:

- Grupo 1: C – Controle;
- Grupo 2: DOX – Doxíciclina 30 mg/kg/dia;
- Grupo 3: RIS – Risedronato de sódio 30 mg/kg/mês.

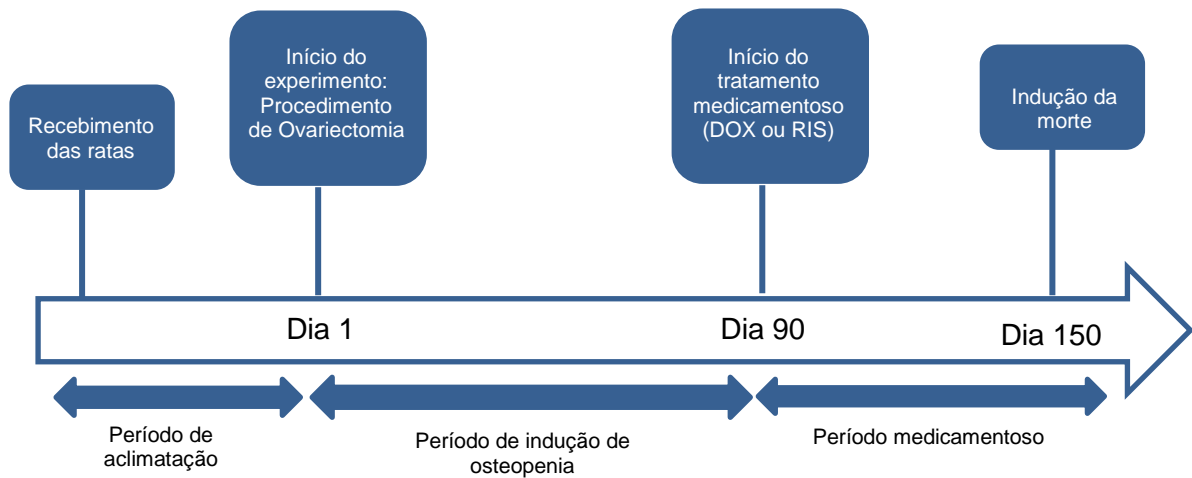
Os procedimentos experimentais dos grupos foram iniciados com 80 dias de vida, uma vez que as fêmeas alcançam a maturidade sexual com esta idade e sabe-

se que a maturidade óssea é adquirida somente com 10 meses de idade (ou 300 dias de vida) (JEE; YAO, 2001). As ratas foram submetidas à indução de osteopenia/osteoporose por 90 dias. Posteriormente, foi iniciado o tratamento medicamentoso por 60 dias com Doxiciclina (Doxiciclina qsp 20 g, BioQUANTI, Farmácia de manipulação de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) na concentração de 30 mg/kg/dia e Risedronato de Sódio (Actonel chronos 35 mg, Sanofi Aventis, Paris, França) na concentração de 30 mg/kg/mês para os grupos expostos ao medicamento. Após o tratamento medicamentoso, foram induzidas a morte anestésica normal seguida de inalação gradativa de CO₂, conforme fluxograma do experimento que segue abaixo (Figura 2).

Figura 1 – Alojamento das ratas fêmeas nas gaiolas em procedimento de pesagem



Figura 2 – Fluxograma da linha do tempo experimental dos procedimentos que foram adotados no presente estudo



3.1 Procedimento de ovariectomia

Os animais passaram pelo procedimento cirúrgico de ovariectomia com o peso ao redor de 150 g (cerca de 80 dias). Inicialmente foram anestesiados com Xilazina (relaxante muscular) e Ketamina (anestésico) na concentração 10 mg/kg e 100 mg/kg de peso do animal respectivamente, seguido de tricotomia entre o rebordo costal inferior e o início da pelve e posteriormente submetido à antissepsia da área, acesso cirúrgico e divulsão do tecido. Logo em seguida realizou-se a evisceração do corno ovariano e ligadura no mesmo para que não haja sangramento pós-operatório (Figura 3). O mesmo procedimento foi realizado no lado oposto para que houvesse a excisão de ambos os ovários (VASCONCELLOS et al., 2014), seguido de aplicação de Pentabiótico (Zoetis, Parsippany-Troy Hills, Nova Jersey, EUA) dose única após a cirurgia. A osteopenia ocorre 90 dias após o procedimento cirúrgico, uma vez que houve achados significativos com esta idade (WRONSKI et al., 1989; WRONSKI; CINTRÓN; DANN, 1988). Neste momento, os animais receberam a Doxiciclina (Doxiciclina qsp 20 g, BioQUANTI, Farmácia de manipulação de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) na concentração de 30 mg/kg/dia por 60 dias ou Risedronato de Sódio (Actonel chronos 35 mg, Sanovi Aventis, Paris, França) na concentração de 30 mg/kg/mês.

Figura 3 – Rata fêmea após procedimento de ovariectomia



3.2 Administração de Doxiciclina

A doxiciclina (Doxiciclina qsp 20 g, BioQUANTI, Farmácia de manipulação de Ribeirão Preto/SP, Brasil) foi administrada nas ratas na água de beber (água destilada), conforme estudo de Issa et al. (2015), por 60 dias e foi realizada a manutenção de acordo com um gráfico diário do quanto foi ingerido de água em cada caixa. A dose de 30 mg/kg/dia foi baseada em estudos previamente publicados (BRIEST et al., 2003; CASTRO et al., 2012; GUIMARAES et al., 2011; THARAPPEL et al., 2016).

3.3 Administração de Risedronato de Sódio

O Risedronato de Sódio (Actonel chronos 35 mg, Sanofi Aventis, Paris, França) foi administrado nas ratas na concentração de 30 mg/kg/mês, em água destilada, com base em Piai et al. (2005), Sousa et al. (2007) e Paliologo et al. (2015). Para garantir os efeitos do medicamento no presente estudo e o tempo comparável de administração ao da doxiciclina (60 dias), o grupo modificou o método para uma dose por mês durante 2 meses, sendo a primeira administrada dentro de 2 dias após o início da administração da doxiciclina, a segunda 30 dias após, e uma última dose, 2 dias

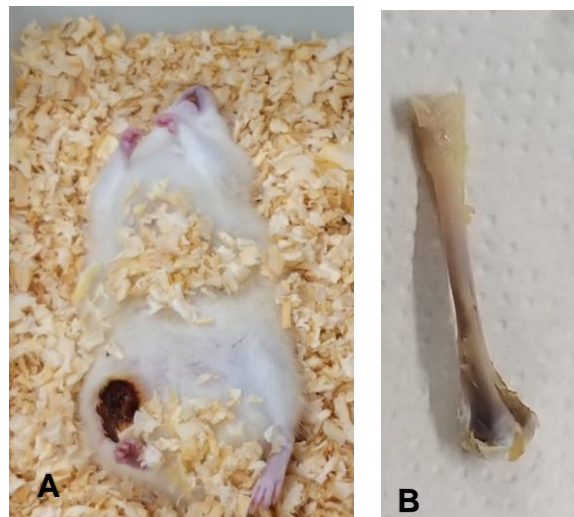
antes da indução de morte, resultando em 3 doses no total. Na noite anterior à cada administração do risedronato de sódio, os alimentos foram removidos para que os animais recebessem o medicamento em jejum.

3.4 Indução de morte e colheita das amostras usadas para análises

A indução de morte das ratas ocorreu em 60 dias após o início da administração de doxiciclina ou risedronato, ou seja, 150 dias (aproximadamente 5 meses) após o início dos trabalhos com os animais e ocorreu por overdose anestésica composta por administração intraperitoneal de Ketamina 100 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg, complementado com inalação gradativa até 40% de CO₂.

Previamente ao momento da indução da morte os pesos das ratas foram devidamente anotados, e os ossos fêmures foram extirpados cuidadosamente (Figura 4) e submetidos a análise de densitometria óssea (FMRP-USP).

Figura 4 – Rata após indução da morte e procedimento de extirpação do osso que foi analisado. A: Rata após extirpação do osso. B: Osso fêmur

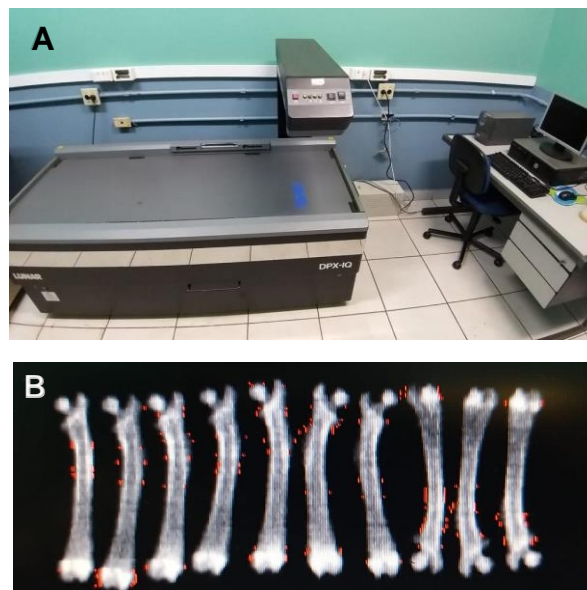


3.5 Avaliação da Densitometria Óssea

Os ossos fêmures foram mantidos em freezer -20 °C na solução de Ringer até o momento do exame densitométrico por meio do equipamento Densitômetro *Dual-Energy de Raios-X*, DPX-Alpha, Lunar (Lunar, Madison, WI, Estados Unidos), no

laboratório de biomecânica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Para a técnica radiográfica, os ossos foram adequadamente imobilizados numa mesa apropriada e posicionados de forma que o filme ficasse paralelo à área de interesse e a incidência de raios-X perpendicular a esta área. Foram coletadas as informações sobre Conteúdo de Massa Óssea (*BMC-Bone Mass Content*) e Densidade Mineral Óssea (*BMD-Bone Mineral Density*) (Figura 5).

Figura 5 – Análise de densitometria óssea. A: Equipamento Densitômetro *Dual-Energy de Raios-X*, DPX-Alpha, Lunar. B: Momento da análise de densitometria óssea.



3.6 Análise estatística e disseminação dos dados

O teste estatístico foi executado com o programa SPSS 11 sob o modelo linear, multivariado.

4. RESULTADOS

Na tabela 1 estão demonstradas as análises estatísticas e os modelos usados para as análises de densitometria óssea.

Tabela 1. Comparação de BMD, BMC, Peso Total, Comprimento do osso fêmur e Comprimento da cabeça do fêmur em pares, demonstrando a relevância medicamentosa ignorando os grupos de indução de osteopenia ($p \leq 0,05$).

	C	DOX	RIS	Valor de p
BMD (g/mm²)	1,78 ($\pm 0,2$) a,b	2,07 ($\pm 0,1$) a	2,03 ($\pm 0,1$) b	a $p < 0,008$ b $p < 0,019$
BMC (mg)	16,5 ($\pm 2,2$) a	18,8 (± 2) a	18,3 (± 2)	a $p < 0,045$
Peso Total – g	390 (± 20)	410 (± 32)	392 (± 22)	
Comprimento do osso fêmur (mm)	37,9 ($\pm 3,1$)	38 ($\pm 2,8$)	38 ($\pm 3,2$)	
Comprimento cabeça do fêmur (mm)	8,2 ($\pm 0,1$)	8,2 ($\pm 0,35$)	8,3 ($\pm 0,3$)	

Por meio da tabela, onde temos os resultados globais dos tratamentos medicamentosos, podemos notar que para BMD temos uma melhor relevância medicamentosa em valores absolutos quando comparamos C vs. DOX e, também existe diferença estatística entre C vs. RIS. Porém ao analisar os valores de BMC tem-se diferença significativa entre C vs. DOX apenas. Este resultado demonstra que o medicamento doxiciclina em doses subantimicrobianas representa uma diferença relevante na qualidade do tecido ósseo.

5. DISCUSSÃO

Nota-se, neste trabalho, que para valores de BMD houve uma melhor relevância medicamentosa em Doxiciclina (DOX) quando comparamos ao grupo controle (C) e também houve diferença estatística entre C e o Residronato de Sódio (RIS). Para valores de BMC, nota-se-se diferença significativa entre a DOX e C.

O Residronato de Sódio, bem como grande parte dos bisfosfonados, é um medicamento padrão ouro para o tratamento de doenças osteometabólicas e vem sendo empregado desde meados de 1970 (DÍAZ-GUERRA; IGLESIAS; MIGUEL, 2018; KENDLER et al., 2018). Mesmo sendo o medicamento de primeira escolha para a doença, este pode apresentar efeitos indesejáveis, uma vez que o tratamento dessa condição não é simples, requer tempo e uso contínuo do remédio, além claro de acompanhamento nutricional e físico, garantindo que haja melhora no prognóstico do paciente, caso não haja esse esforço por traz, há uma probabilidade do surgimento de efeitos colaterais, tais como fragilidade óssea, fraturas na haste do fêmur, e a osteonecrose no fêmur, base do quadril, ou até mesmo na mandíbula (GHONEIMA et al., 2010; KUŽNIK et al., 2020).

Outro fator a ser questionado, é seu funcionamento farmacológico, este, que baseia-se na inibição da reabsorção óssea, através da apoptose de células osteoclásticas, gerando um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, reduzindo a perda de conteúdo e densidade óssea, assim como o risco de fraturas e complicações causadas (KENDLER et al., 2018). No entanto, com o uso a longo prazo e contínuo do medicamento, não se sabe como funciona o balanceamento entre osteoclastos e osteoblastos e se este seria positivo, ou negativo, como mostra o estudo de ANG et al., 2012, onde são testados ratos de dois distintos grupos, um submetido à ovariectomia, e outro grupo Sham (placebo), esses dois grupos foram tratados de duas maneiras diferentes, sendo o primeiro o tratamento com altas doses de risedronato de sódio (2,4 µg/kg) e com doses baixas do medicamento (0,24 µg/kg), durante 4 dias seguidos pré cirurgia, e a cada 3 dias até completar 15 dias. O resultado constatado foi que, foram achados íons cálcio na matriz óssea em ambas as doses, porém, a qualidade e deposição óssea foram melhores no grupo tratado com baixas doses (ANG et al., 2012).

Tendo em vista tais resultados, selecionamos a administração de pequenas doses, tanto do Risedronato de Sódio (30mg/kg/mês, sendo administradas 3 doses totais ao longo do estudo de 60 dias), quanto da Doxíciclina em Dose Subantimicrobiana (SDD) (30mg/kg/dia durante 60 dias) e, para que possamos entender a pesquisa, é necessária a análise dos resultados e tabelas apresentados no mesmo, bem como todo o embasamento e análise feitos anteriormente.

No presente estudo, foram avaliados três grupos distintos (n=7), nos quais todos foram submetidos ao mesmo procedimento, a ovariectomia, apresentando diferentes resultados para cada categoria desejada. Assim como no estudo de W. S. S. JEE, W. YAO, realizado em 2001, nota-se que após os 90 dias de ovariectomia, tanto o comprimento do osso do fêmur (mm), quanto o comprimento da cabeça do fêmur (mm), não apresentam mudanças estatisticamente significantes, diferente da massa e densidade óssea (BMC e BMD), apresentando valores significativos (JEE; YAO, 2001).

Quanto ao peso das ratas em questão, nota-se que não houve grande diferença entre os grupos, enquanto C e RIS apresentam diferença de apenas 2g entre si, podemos notar que o grupo DOX teve certo aumento de peso, condizendo com o estudo de MITAZAKI et al., 2016.

Analisando o estudo de NORDSLETTEN et al., 1994, que diz respeito sobre o desenvolvimento femoral de ratas osteopênicas ovariectomizadas, observamos pelos resultados que, o Conteúdo Mineral Ósseo, está intimamente ligado ao conteúdo de íons Cálcio no organismo. Nele, observou-se que o conteúdo total de Cálcio no fêmur das ratas do grupo controle era entre 37 a 40% maior em relação ao grupo que foi submetido a ovariectomia.

De acordo com o estudo de PALM et al., 2008, as tetraciclina (doxíciclina no caso em questão), apresentam características quelantes de metais bivalentes em condições fisiológicas, ou seja, ela pode até apresentar maior afinidade a outros metais bivalentes, como Bário, Estrôncio, porém, nenhum deles se encontra em maior concentração fisiologicamente quando comparados a Cálcio e Zinco (PALM et al., 2008), estando esses, presentes tanto no sistema sanguíneo, quanto depositados em sítios ósseos associados à tetraciclina, indicando o processo de mineralização óssea (BOULOS; KNOEPP; RUBIN, 2007; DEMPSTER, 2008; PAUTKE et al., 2010). Dados que nos levam a crer no potencial positivo da doxíciclina para o tratamento de condições osteometabólicas.

A osteopenia sofrida pelos ratos ovariectomizados, está atrelada à falta de estrógeno causada pelo procedimento, uma vez que o hormônio tem relação direta com o funcionamento dos osteoclastos, modulando suas células e as levando a apoptose, portanto, se há falta de estrógeno no organismo, há um desbalanceamento celular, contribuindo para o aumento do número de osteoclastos, e, conseqüentemente, o aumento da área de reabsorção óssea (SALEH et al., 2020).

Estudos nos mostram que as tetraciclina, uma vez ligadas à íons metálicos (por conta de suas características quelantes), apresentam grande afinidade aos tecidos ósseos, causada pelas forças de Van der Waals, mais especificamente, as pontes de hidrogênio, gerando a chamada apatita óssea, e fortalecendo-a. Outro fator importante do medicamento é sua habilidade de inibir a colagenase, diminuindo a reabsorção óssea, além de aumentar a ação do procolágeno nos mRNA, aumentando o número de osteoblastos ativos no organismo (SHI et al., 2020).

Corroborando com o estudo citado acima, podemos observar características diferentes da doxiciclina que também mostram-se satisfatórias no balanceamento das células ósseas, como notamos no estudo in vitro de ZHOU; ZHANG, 2010, onde os ossos controle apresentam maior imunomarcção em relação aos ossos expostos a doxiciclina, escancarando que doses de 30mg/kg/dia (assim como em nosso estudo) resultou na inibição da ação osteoclástica nos ossos dos fêmur das ratas Wistar (ZHANG et al., 2007; ZHOU; ZHANG; ZHANG, 2010).

Analisando o trabalho de FOLWARCZNA, realizado em 2003, vemos que em ratos com osteopenia induzida por ovariectomia bilateralizada, o uso da doxiciclina causou efeitos nocivos aos ossos do fêmur das ratas (FOLWARCZNA; PYTLIK; JANIEC, 2003). Assim como FOWLKES, que demonstrou em seu trabalho que a doxiciclina aplicada em ração para ratos machos com osteopenia induzida por diabetes (dose não específica, de 28-92mg/kg/dia, durante 10 dias), não apresentou efeitos nocivos aos ossos, tampouco efeitos positivos de remineralização ou de diminuição da reabsorção causada pela diabetes (FOWLKES et al., 2015).

Apesar de ambos os estudos andarem contra a vertente do que esperamos, podemos explicar tais resultados negativos de forma simples. Os resultados obtidos por FOLWARCZNA, 2003, não foram satisfatórios, uma vez que os animais não apresentavam osteopenia estabelecida; de acordo com seus colaboradores, as ratas receberam o medicamento por 4 semanas, de modo concomitante ao estabelecimento da osteopenia, enquanto, no vigente estudo, esperamos 90 dias até o estabelecimento

da osteopenia, para então, depois do aparecimento da condição sistêmica, iniciarmos o tratamento com doses subantimicrobianas da doxiciclina, durante 60 dias, explicando a diferença entre o trabalho citado. Por sua vez, se analisarmos o estudo de FOWLKES, 2015, e colaboradores, não foram observados resultados, sejam eles vantajosos ou desvantajosos, e isso se dá pelo fato da administração da doxiciclina ter sido feita de forma não específica e em ração, se diferenciando do nosso estudo, uma vez que a ingestão da droga foi feita em água destilada, cuidadosamente calculada e seguindo fielmente a quantidade de mg/kg/dia de cada animal, escancarando o porque de resultados divergentes.

Vale salientar, que, o uso de doses subantimicrobianas da doxiciclina, mostrou-se não agir de forma anti-microbiana, não afetando a flora da pele, uma vez que as tetraciclina (doxiciclina e minociclina, especificamente) são usadas em microdoses para o tratamento de doenças crônicas de pele (EDITOR et al., 2009; SKIDMORE et al., 2015).

Para o estudo em questão, 150 dias após o início de quaisquer trabalhos com os animais, estes foram induzidos a morte, através da administração intraperitoneal de Ketamina 100mg/kg e Xilazina 10mg/kg, causando uma overdose anestésica, complementada por inalação gradativa até 40% CO₂. Após a indução de morte, todos os dados foram anotados, e os fêmures das ratas foram removidos cuidadosamente, para avaliarmos os mesmos através da densitometria óssea. Os ossos foram mantidos em freezer a -20°C até que fosse realizada a análise densitométrica, que aconteceu no laboratório de biomecânica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), através do equipamento Densitômetro *Dual-Energy de Raios-X, DPX-Alpha e Lunar*, nos fornecendo valores de Conteúdo Mineral Ósseo (BMC) e Densidade Mineral Óssea (BMD).

Nos aspectos BMC (*Bone Mineral Content*) e BMD (*Bone Mineral Density*), notamos que ambos os resultados do grupo DOX e RIS apresentam resultados satisfatórios em relação a C. Quando se fala em Densidade Mineral Óssea, percebe-se que RIS apresentou um bom resultado ($2,03 \pm 0,1$) em relação à C ($1,78 \pm 0,2$), ficando atrás do grupo DOX, que apresentou excelentes resultados ($2,07 \pm 0,1$), lembrando que todas as medidas foram feitas em g/mm². Tratando-se do Conteúdo Mineral Ósseo, também comparado na tabela 1, notamos que resultados dos grupos DOX ($18,8 \pm 2$) e RIS ($18,3 \pm 2$) em relação a C ($16,5 \pm 2,2$) também são satisfatórios (todas as medidas em mg). Ou seja, a partir do estudo realizado, e da análise e

interpretação de estudos prévios, percebe-se que os resultados apontam a DOX com melhores e mais significantes resultados em relação ao RIS e C.

6. CONCLUSÃO

Levando em consideração os modelos experimentais empregados, a metodologia usada e todo o embasamento em trabalhos anteriores, podemos concluir que de fato a ovariectomia causou efeitos negativos nos ossos das ratas Wistar, levando-as a desenvolverem osteopenia. Valores do comprimento do fêmur, comprimento da cabeça do fêmur e peso das ratas não foram influenciados pelo tipo de droga administrada. Todavia, ambas as medicações se mostraram eficientes em relação ao grupo controle no quesito Densidade Mineral Óssea e Conteúdo Mineral Ósseo, sendo o grupo tratado com doxiciclina em doses subantimicrobianas, o que apresentou melhores resultados, representando assim uma diferença relevante na qualidade do tecido ósseo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANG, G. W. et al. Low-dose Risedronate Sodium Protects Bone Cells after Abrupt Oestrogen Withdrawal. p. 1761–1774, 2012.
- BOULOS, P. R.; KNOEPP, S. M.; RUBIN, P. A. D. Green bone. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n. 3, p. 380–386, 2007.
- BRIEST, W. et al. Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts. **Cardiovascular Research**, v. 57, n. 2, p. 379–387, 2003.
- CASTRO, M. M. et al. Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 162–168, 2012.
- CATON, J.; RYAN, M. E. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p. 114–120, 2011.
- CUNHA, B. A.; SIBLEY, C. M.; RISTUCCIA, A. M. Review: Doxycycline. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 4, n. 2, p. 115-135 2012,
- DE MEDEIROS, F. C. F. L. et al. Dental implants in patients with osteoporosis: a systematic review with meta-analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 4, p. 480–491, 2018.
- DEMPSTER, D. W. Histomorphometric Analysis of Bone Remodeling. **Principles of Bone Biology, Two-Volume Set**, v. 1, p. 447–463, 2008.
- DÍAZ-GUERRA, G. M.; IGLESIAS, S. G.; MIGUEL, G. A. Treatment of osteoporosis: osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women. Osteoporosis in men. **Medicine (Spain)**, v. 12, n. 60, p. 3506–3514, 2018.
- EDITOR, S. et al. QUESTIONS • CHALLENGES • CONTROVERSIES Use of Oral Doxycycline for Community-acquired Staphylococcus aureus (CA-MRSA) Infections. v. 2, n. 4, p. 45–50, 2009.
- FIGUEIREDO, F. Estudo da ação da Doxiciclina em diferentes modelos de osteopenia. 2017.
- FOLWARCZNA, J.; PYTLIK, M.; JANIEC, W. EFFECTS OF DOXYCYCLINE ON DEVELOPMENT OF CHANGES IN HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS OF BONES INDUCED BY BILATERAL OVARIECTOMY IN RATS. p. 433–441, 2003.

- FOWLKES, J. L. et al. Bone Reports Effects of long-term doxycycline on bone quality and strength in diabetic male DBA / 2J mice. **BONR**, v. 1, p. 16–19, 2015.
- GHONEIMA, A. A. et al. Bisphosphonates treatment and orthodontic considerations. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2010.
- GIGER, E. V.; CASTAGNER, B.; LEROUX, J. C. Biomedical applications of bisphosphonates. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 2, p. 175–188, 2013.
- GLASER AND KAPLAN. **Glaser and Kaplan 1997.pdf**, 1997.
- GOLUB, L. M. et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)- type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 22, n. 2, p. 100–109, 1995.
- GUIMARAES, D. A. et al. Doxycycline Dose-dependently Inhibits MMP-2-Mediated Vascular Changes in 2K1C Hypertension. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 108, n. 5, p. 318–325, 2011.
- ISSA, J. P. M. et al. The effect of simvastatin treatment on bone repair of femoral fracture in animal model. **Growth Factors**, v. 33, n. 2, p. 139–148, 2015.
- JEE, W. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 1, n. 3, p. 193–207, 2001.
- KARAGUZEL, G.; HOLICK, M. F. Diagnosis and treatment of osteopenia. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 237–251, 2010.
- KENDLER, D. L. et al. Effects of teriparatide and risedronate on new fractures in post-menopausal women with severe osteoporosis (VERO): a multicentre, double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 230–240, 2018.
- KUŹNIK, A. et al. Bisphosphonates—much more than only drugs for bone diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 866, n. October, 2020.
- MCCLUNG, M. et al. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: Benefits, risks, and drug holiday. **American Journal of Medicine**, v. 126, n. 1, p. 13–20, 2013.
- MITAZAKI, S. et al. Apocynin reduced doxycycline-induced acute liver injury in ovariectomized mice. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 357–363, 2016.
- NORDSLETTEN, L. et al. Calcified Tissue The Development of Femoral Osteopenia in Ovariectomized Rats Is Not Reduced by High Intensity Treadmill Training : A Mechanical and Densitometric Study. p. 436–442, 1994.
- PALIOLOGO, T. et al. Effects of swimming associated with risedronate in osteopenic bones: An experimental study with ovariectomized rats. **Micron**, v. 78, p. 40–44,

2015.

PALM, G. J. et al. Specific binding of divalent metal ions to tetracycline and to the Tet repressor/tetracycline complex. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1097–1110, 2008.

PAUTKE, C. et al. Tetracycline Bone Fluorescence: A Valuable Marker for Osteonecrosis Characterization and Therapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n. 1, p. 125–129, 2010.

PIAI, C. R. et al. Efeitos do risedronato na reparação óssea de ratos machos e fêmeas com osteopenia. **Ciênc. odontol. bras**, v. 8, n. 3, p. 77–82, 2005.

RIZZOLI, R. et al. Cancer-associated bone disease. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 12, p. 2929–2953, 2013.

SALEH, N. et al. Novel approach for pathogenesis of osteoporosis in ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoporosis. **Experimental Gerontology**, v. 137, n. April, p. 110935, 2020.

SHI, C. et al. Recent advances in bone-targeted therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, 2020

SKIDMORE, R. et al. Effects of Subantimicrobial-Dose Doxycycline in the Treatment of Moderate Acne. v. 139, 2015.

SOUSA, A. G. V. DE et al. Efeitos da terapia de reposição hormonal com raloxifeno e risedronato na reparação óssea de ratas com osteopenia. **Brazilian Dental Science**, v. 10, n. 3, p. 81–89, 2007.

SRIVASTAVA, M.; DEAL, C. Osteoporosis in elderly: Prevention and treatment. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 18, n. 3, p. 529–555, 2002.

TAN, K. R. et al. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: Report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 4, p. 517–531, 2011.

THARAPPEL, J. C. et al. Doxycycline shows dose-dependent changes in hernia repair strength after mesh repair. **Surgical Endoscopy**, v. 30, n. 5, p. 2016–2021, 2016.

VASCONCELLOS, L. M. R. DE et al. Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAIs): A histomorphometric study in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 2, p. 575–580, 2014.

WATTS, N. B.; DIAB, D. L. Long-term use of bisphosphonates in osteoporosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 4, p. 1555–1565,

2010.

WRONSKI, T. J. et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcified Tissue International**, v. 45, n. 6, p. 360–366, 1989.

WRONSKI, T. J.; CINTRÓN, M.; DANN, L. M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**, v. 43, n. 3, p. 179–183, 1988.

ZHANG, C. et al. Inhibiting wear particles-induced osteolysis with doxycycline. v. 28, n. 10, p. 1603–1610, 2007.

ZHOU, X.; ZHANG, P.; ZHANG, C. Tetracyclines Inhibit Rat Osteoclast Formation and Activity In Vitro and Affect Bone Turnover in Young Rats In Vivo. p. 163–171, 2010.

8. ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 022/2019

Ribeirão Preto, 26 de fevereiro de 2019.

Ref. processo nº 2018.1.845.58.1

Senhor(a) Pesquisador(a),

Retificando o Of. CEUA 012/2019, informamos que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, até **01/04/2022**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldégan
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr(a).

Prof. Dr. Vinicius Pedrazzi
Departamento de Materiais Dentários e Prótese
desta Faculdade

./aafn



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Graduação

Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

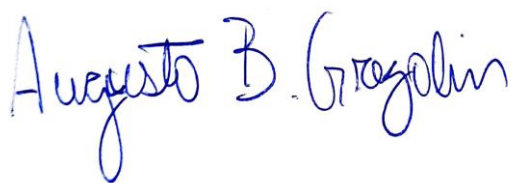
Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

<u>DADOS PESSOAIS</u>	
Nome: Augusto Barros Gregolin	
Nº USP: 9790026	Período: 9º período
Telefone de contato: (19) 99248-4449	E-mail USP: augusto.gregolin@usp.br
<u>INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</u>	
Nome do Orientador(a): Vinícius Pedrazzi	
Departamento: DMDP	
Área de conhecimento: Pesquisa Clínica	
Subárea: Terapêutica	
<u>MODALIDADE</u>	
Modalidade:	
Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional	
<u>ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)</u>	

Eu, Prof(a). Dr(a). Prof. Dr. Vinicius Pedrazzi, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.



Augusto Barros Gregolin



Prof. Dr. Vinicius Pedrazzi

