

DAVILSON BRAGINE FERREIRA JUNIOR

**ALENDRONATO DE SÓDIO, RISEDRONATO SÓDICO,
ATORVASTATINA CÁLCICA E LOVASTATINA NA
REPARAÇÃO DE FRATURAS TIBIAIS EM RATAS COM
OSTEOPOROSE INDUZIDA PELA DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título *de
Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F383a
2007
ratas

Ferreira Júnior, Davilson Bragine, 1973-

Alendronato de sódio, risedronato sódico, atorvastatina
cálcica e lovastatina na reparação de fraturas tibiais em
com osteoporose induzida pela dexametasona / Davilson
Bragine Ferreira Júnior. – Viçosa, MG, 2007.
xiii, 35f. : il. ; 29cm.

Orientador: Aloísio da Silva Pinto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Osteoporose. 2. Fratura em ratos. 3. Alendronato.
4. Risedronato. 5. Atorvastatina. 6. Lovastatina.
7. Dexametasona. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 636.0885

DAVILSON BRAGINE FERREIRA JUNIOR

**ALENDRONATO DE SÓDIO, RISEDRONATO SÓDICO,
ATORVASTATINA CÁLCICA E LOVASTATINA NA
REPARAÇÃO DE FRATURAS TIBIAIS EM RATAS COM
OSTEOPOROSE INDUZIDA PELA DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título *de
Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de dezembro de 2007.

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Co-orientador)

Prof. Cláudio César Fonseca
(Co-orientador)

Prof^a Tânia Toledo de Oliveira

Prof. Luiz Gonzaga Pompermayer

Prof. Aloísio da Silva Pinto
(Orientador)

À meu pai **Davilson Bragine
Ferreira.**

À Iara **Félix Bragine Ferreira,**
minha mãe.

À minha querida avó, **Zenaida
Bragine Ferreira.**

À Roberta de Cássia Cardoso
Bragine Ferreira, minha esposa e
meu alicerce.

À meus filhos, anjinhos da casa,
Yuri e Sarah.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa que possibilitou meu aprendizado.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade e confiança.

Ao meu orientador e melhor amigo, Prof. ALOÍSIO DA SILVA PINTO.

Aos co-orientadores, Prof. RICARDO JUNQUEIRA DEL CARLO e Prof. CLÁUDIO CÉSAR FONSECA, pela especial atenção dispensada ao trabalho.

Ao grande amigo e colaborador Carlos Antonio Cardoso

À Gláucia Guimarães Amaral, pela colaboração efetiva durante a realização do trabalho.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

DAVILSON BRAGINE FERREIRA JUNIOR, filho de Davilson Bragine Ferreira e Iara Félix Bragine Ferreira, nasceu em 24 de outubro de 1973, em São Paulo, Estado de São Paulo.

Residente em Uberaba, interior do Estado de Minas Gerais, concluiu o Ensino Médio no Colégio Nossa Senhora das Graças em 1992, nesta mesma localidade.

Em janeiro de 1993, ingressou no curso de Odontologia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho em São José dos Campos, São Paulo, no qual se graduou em janeiro de 1998.

Em agosto de 2005, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária com área de concentração em Farmacologia, pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4

Artigo 1 - AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA, HISTOMORFOMÉTRICA E DE MARCADORES BIOQUÍMICOS NO USO DE ALENDRONATO DE SÓDIO, RISEDRONATO SÓDICO, ATORVASTATINA CÁLCICA E LOVASTATINA NA REPARAÇÃO DE FRATURAS EM TÍBIAS DE RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA

RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVO	10
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO	16
CONCLUSÕES	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

Artigo 2- AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA, BIOMECÂNICA E DA FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA NO USO DE ALENDRONATO DE SÓDIO, RISEDRONATO SÓDICO, ATORVASTATINA CÁLCICA E LOVASTATINA NA REPARAÇÃO DE FRATURAS EM TÍBIAS DE RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA

RESUMO	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO.....	25
OBJETIVO	26
MATERIAL E MÉTODOS	26
RESULTADOS ..	28
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CONCLUSÕES GERAIS	35

RESUMO

FERREIRA JÚNIOR, Davilson Bragine, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2007. **Alendronato de sódio, risedronato sódico, atorvastatina cálcica e lovastatina na reparação de fraturas tibiais em ratas com osteoporose induzida pela dexametasona.** Orientador: Aloísio da Silva Pinto. Co-orientadores: Ricardo Junqueira Del Carlo e Cláudio César Fonseca.

Este trabalho consistiu de um ensaio biológico com o objetivo de estudar as influências do bifosfonatos alendronato de sódio e risedronato sódico e das estatinas atorvastatina cálcica e lovasatatina na recuperação de fraturas de tíbias de ratas osteoporóticas induzida pelo glicocorticóide dexametasona, em ratas da raça Wistar, adultas, pesando 250 ± 20 g. O processo da indução da osteoporose consistiu na administração de dexametasona, na dose de 7,5 mg/kg de peso corporal, por via IM, uma vez por semana, durante quatro semanas, nos seis animais de todos os grupos, à exceção dos animais que constituiu o grupo controle (G1). Os animais do grupo 2 (G2), chamado osteoporótico, receberam apenas dexametasona. Após o período de indução da osteoporose, os animais de todos os grupos foram submetidos ao procedimento de fratura fechada das tíbias esquerdas, realizado por um médico veterinário. Imediatamente após a indução das fraturas, iniciou-se os tratamentos onde o grupo 3 (G3) recebeu alendronato de sódio na dose de 0,25mg/kg; o grupo 4 (G4) recebeu risedrnato de sódio na dose de 1 mg/kg ; o grupo 5 (G5) que recebeu atorvastatina cálcica na dose de 1,2 mg/kg e o grupo 6 (G6) que recebeu lovastatina na dose de 2mg/kg. Todas as substâncias foram administradas por via oral, diariamente. No período de 35dias, após o início dos tratamentos, foram coletados amostras de sangue para dosagens de cálcio, fósforo, albumina e proteínas totais no equipamento multiparamétrico de bioquímica Alizé com “kits” da marca BioMerieux, e fosfatase alcalina óssea no equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter com “kits” Ostase. Após o sacrifício, foi coletado a tíbia esquerda de cada animal que, uma vez fixados foram analisados morfometricamente, radiografados, submetidas e processado rotineiramente para obtenção das lâminas, cujos cortes foram corados Tricrômico de Masson, para estudo histológico em microscopia de luz. As tíbias direitas foram também coletadas para

realização de testes biomecânicos. Medidas de altura, largura e do calo ósseo das tíbias foram realizadas com auxílio de um paquímetro. Além disso, foram realizados aferições da densidade desses ossos, que ocorreram através da relação dos valores de pesagem e deslocamento de líquido em recipiente graduado. As tíbias esquerdas foram então radiografadas em perfil e a imagem obtida foi submetida a uma análise de densidade radiográfica através do programa Image Tool for Windows 3.0, por tons de cinza obtidos da imagem. As áreas das análises foram delimitadas em todas as imagens radiográficas das tíbias e só foram levadas em consideração para análise as áreas selecionadas. Testes de flexão, nas tíbias direitas foram realizados com o auxílio do aparelho Instron (Laboratório de Papel e Celulose do Departamento de Engenharia Florestal/UFV). Procedeu-se o cálculo percentual da densidade trabecular óssea, à partir da imagem amostral de osso trabecular, contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico equipado com câmara digital (TCL-984 P), analisada em monitor de microcomputador de 14 polegadas, utilizando-se da técnica de histomorfometria de contagem de pontos. O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos em seis repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste F ($p < 0,05$). Os grupos controles (G1 e G2) foram comparados entre si, por meio do teste F. Os grupos tratados (G3, G4, G5 e G6) foram comparados entre si, através do teste de Tukey à 5% de probabilidade. As comparações também foram realizadas entre os grupos tratados e os controles G1 e G2, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnett à 5% de probabilidade. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre o grupo controle (G1) e o grupo osteoporótico (G2), bem como, entre eles e os grupos tratados (G3, G4, G5 e G6) e, também, entre os grupos tratados entre si, em todos os períodos, quanto aos valores sérico de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea. Através da morfometria e histomorfometria foi possível constatar a indução da osteoporose com o glicorticóide, assim como a melhoria na densidade óssea, densidade trabecular óssea e espessura do calo ósseo em todos os grupos tratados prevalecendo o grupo tratado com alendronato de sódio que apresentou melhores resultados. Os resultados radiográficos e biomecânicos corroboram com os resultados histomorfométricos. Os resultados bioquímicos, principalmente fosfatase alcalina óssea, que permaneceram sem

diferenças significativas em todos os grupos, quando avaliados em conjunto com a morfometria, histomorfometria, radiografias e teste biomecânicos demonstram que prevaleceram as propriedades antirreabsortivas em relação as formadoras de osso em todos os grupos tratados. Apesar da prevalência das propriedades antirreabsortivas em todos os tratamentos, a morfometria, histomorfometria, radiografia e testes biomecânicos mostrou resultados equiparáveis à recuperação óssea do grupo normal, o que demonstra que os mesmos não interferem negativamente e sim positivamente no processo de recuperação de fraturas em animais osteoporóticos. Ressalva-se, no entanto, que estudos posteriores das dosagens, interações, biodisponibilidades, além dos efeitos toxicológicos dessas substâncias farmacológicas, fazem-se necessários.

ABSTRACT

FERREIRA JÚNIOR, Davilson Bragine, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December of 2007. **Alendronate of sodium, risedronate of sodium atorvastatin calcic and lovastatin in tibiais fractures in female rats with dexamethasone osteoporosis induced.** Adviser: Aloísio da Silva Pinto. Co-Advisers: Ricardo Junqueira Del Carlo and Cláudio César Fonseca.

This work consisted of a biological test with the objective to study the influences of the bifosfonates alendronate of sodium and sodic risedronate and of the statins calcic atorvastatine and lovasatatine in the recuperation of fractures of shin-bones of osteoporotics rats induced by the dexamethasone, in rats of the race Wistar, adults, weighing 250 ± 20 g. The process of the induction of the osteoporosis consisted of the administration of dexamethasone, of the dosis of 7,5 mg / kg of physical weight, for road IM, once weekly, during four weeks, of six animals of all the groups, with the exception of the animals that there appointed the control group (G1). The animals of the group 2 (G2), called osteoporotics, received only dexamethasone. After the period of induction of the osteoporosis, the animals of all the groups were subjected to the proceeding of shut fracture of the leftt shin-bones, carried out by a veterinary doctor. Immediately after the induction of the fractures, one began the treatments where the group 3 (G3) received alendronate of sodium in the dosis of 0,25mg/kg; the group 4 (G4) received risedronate of sodium in the dosis of 1 mg / kg; the group 5 (G5) that received calcic atorvastatine in the dosis of 1,2 mg / kg and the group 6 (G6) what it received lovastatine in the dosis of 2mg/kg. All the substances were administered by oral road, daily. In the period of 35 days, after the beginning of the treatments, samples of blood were collected for dosages of calcium, phosphorus, albumin and total proteins in the multiparametric equipment of biochemistry Alizé with “kits“ of the mark BioMerieux, and phosphatase alkaline bone in the equipment of quimioluminescence Access Immunoassay System of Beckman Coulter with “ kits “ Ostase. After the sacrifice, there was collected the left shin-bone of each animal what, once fixed they were morfometric analysed, X-rayed and when it was prosecuted for getting the blades, which parliament Masson Tricrômico was colored, for hitological

study in light microscopy. The right shin-bone was collected to subject to biomechanical tests. All's measures of height, width and of the bone callus of the shin-bones they were carried out with help of a paquimeter. Besides, there were carried out gauging of the density of these bones, which took place through the relation of the values of weighing and dislocation of liquid in graduated container. The left shin-bones were X-rayed then in profile and the obtained image was subjected to an analysis of radiografic density through the program Image Tool he will be Windows 3.0, for tones of ash obtained of the image. The areas of the analyses were delimited in all the radiografic images of the shin-bones and only the selected areas were taken into account for analysis. Tests of flexing, in the right shin-bones they were carried out with the help of the appliance Instron (Laboratory of Paper and Cellulose of the Department of Engineering Florestal/UFV). One proceeded the percentage calculation of the density trabecular bone, from the image amostral of trabecular bone, contained in the region subcondral, of each histological cut, in optical microscope equipped with digital camera (TCL-984 P), analysed in monitor of microcomputer of 14 inches, making use of the technique of histomorfometric of counting of points. The biological test was carried out according to delineation completely casualizado, with six treatments in six repetitions. The obtained results were subjected to the variance analysis and to the test F ($p < 0,05$). Control the groups (G1 and G2) they were compared between you, through the test F. The treated groups (G3, G4, G5 and G6) were compared between you, through the test of Tukey to 5 % of probability. The comparisons also were carried out between the treated groups and the controls G1 and G2, being that, for the same thing, the test of Dunnet was applied to 5 % of probability. The results did not show significant differences between the group control (G1) and the osteoporotic group (G2), as well as, between them and the treated groups (G3, G4, G5 and G6) and, also, between the groups treated between you, in all the periods, as for the values silken of calcium, phophorus and phosphatase alkaline bone. Through the morfometric and histomorfometric was possible the induction of the osteoporse noted with the glucorticoid, as well as the improvement in the bone density, density trabecular bone and thickness of the bone callus in all the treated groups when the group is prevailing treated with alendronate of sodium that

presented better results. The results radiografics and biomechanical tests corroborate with the histomorfometric results. The biochemical results, principally phosphatase alkaline bone, what remained without significant differences in all the groups, when valued together with the morfometric, histomorfometri, radiografic and biomechanical test demonstrate what prevailed the properties antirreabsortives in relation the forming ones of bone in all the treated groups. In spite of the predominance of the properties antirreabsortives in all the treatments, the morfometric, histomorfometric, X-ray and biomechanical tests showed comparable results to the bone recuperation of the normal group, which demonstrates what same do not interfere negatively and which positively in the process of recuperation of fractures in osteoporotics animals. Is excepted, however, which subsequent studies of the dosages, interactions, biodisponibility, besides the toxicological effects of these pharmacological substances, make to themselves necessary.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos recentes anos, tem ocorrido uma mudança da importância relativa sobre a prevalência e severidade das desordens músculo-esqueléticas, que tem acometido milhões de pessoas à incapacidade e sofrimento em todo mundo. Dentre estas desordens, destaca-se a osteoporose, a mais comum das doenças ósseas em adultos, sobretudo na velhice. De uma maneira geral, com o relativo aumento do desenvolvimento sócio-econômico e, em conseqüência, aumento da expectativa de vida, o número de pessoas mais idosas tem aumentado. Desta forma, o número de pacientes osteoporóticos cresce na mesma proporção na população mundial, o que tem emergido como um problema de saúde pública, visto os elevados custos para a sociedade (MARCUS, 2003).

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada por uma diminuição da quantidade de osso normalmente mineralizado, juntamente com alteração da microarquitetura do osso, o que induz a um aumento da fragilidade e um maior risco de fratura (MENDONZA, 2003).

Segundo POLO (2003), a osteoporose generalizada deve ser considerada como uma síndrome, que pode ser ocasionada por grande número de fatores. Ela pode ser dividida em 2 grupos: primária, na qual as causas fundamentais não são bem conhecidas, e secundária, cujos elementos etiopatogênicos são bem definidos, dentre eles, o uso prolongado de glicocorticóides.

Os glicocorticóides inibem a produção, proliferação, maturação e atividade dos osteoblastos além de incrementarem a apoptose de osteoblastos maduros e osteócitos. Os glicocorticóides também interferem na formação da matriz óssea ao inibirem a expressão do gene do colágeno tipo I e estimularem a expressão de colagenase 3 por osteoblastos e condrócitos (MENDOZA, 2003).

Em relação aos osteoclastos, os glicocorticóides possuem ação direta, estimulando a diferenciação de seus precursores na medula óssea, assim como estimulando sua união com as superfícies ósseas (POLO, 2003).

Os efeitos dos glicocorticóides sobre o tecido ósseo podem ser devido a inúmeros fatores, incluindo aumento da eliminação de cálcio renal e diminuição da absorção de cálcio intestinal. Um balanço negativo de cálcio devido a mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal é responsável pelo hiperparatireoidismo

secundário em pacientes tratados com glicocorticóide (REID, 1997). Embora os mecanismos precisos permaneçam obscuros, a eliminação urinária aumentada de cálcio, que ocorre em resposta ao glicocorticóide, provavelmente é uma consequência da reabsorção tubular diminuída (REID e IBBERTSON, 1987; REID, 1997). Isto pode ser um efeito a longo prazo, uma vez que, uma única dose de prednisolona aumenta os níveis de cálcio do soro, mas não altera significativamente o nível de cálcio urinário (YONEMURA et al., 1999).

Acredita-se que o hiperparatireoidismo secundário acelera o desenvolvimento de osteoporose induzida por glicocorticóide. Efeito estimulatório direto de glicocorticóides sobre a síntese e secreção de paratormônio tem sido observado *in vitro*: administração de dexametasona aumenta a secreção de hormônio de células paratireóides em culturas bovinas e secreção de hormônio estimulada por cortisol em culturas de glândulas de paratireóide de rato (AU, 1976; SUGIMOTO et al., 1989).

Hormônios sexuais desempenham um papel importante na regulação do metabolismo ósseo. Os estrógenos, bem como os andrógenos, tem mostrado inibir os osteoblastos de liberar fatores de estimulação local da osteoclastogênese. Todavia, diminuição na concentração desses hormônios na circulação aumenta a formação de precursores de osteoclastos no osso e, assim, o número de osteoclastos maduro (JILKA et al., 1992; WEINSTEIN et al., 2000). Concentrações baixas de esteróides sexuais na circulação em mulheres, após a menopausa ou ovariectomizadas, levam ao aumento da perda óssea. Entretanto, reposição hormonal pode prevenir essas mudanças. Na ausência de reposição hormonal, a osteoporose pode se desenvolver como um resultado de uma redução na formação óssea e estimulação na reabsorção óssea (DUCY et al., 2000; SCHOT e SCHUURS, 1990; WEINSTEIN et al., 2000). O efeito inibitório dos glicocorticóides sobre a síntese e secreção de hormônios sexuais contribui para a osteoporose induzida por glicocorticóides.

Os agentes biomedicinais, que podem ser utilizados no tratamento da osteoporose, de acordo com suas propriedades farmacológicas, podem ser divididos em anti-reabsortivos e agentes formadores de osso (KIM et al., 2003).

Dentre os agentes anti-reabsortivos utilizados no tratamento da osteoporose podemos citar o cálcio (LLOYD et al., 1993), a vitamina D (HEIKINHEIMO et al., 1992), o estrogênio (WEISS et al., 1980), os moduladores seletivos de receptor de estradiol, como exemplo, o raloxifeno (ETTINGER et al., 1999), a calcitonina (ETTINGER et al., 1999) e, principalmente, os bifosfonatos (MEYER et al., 1973).

Em relação aos agentes formadores de osso temos: o fluoreto (RIGGS et al., 1990), androgênio (HARRISON, 1996), hormônio da paratireóide (ROSEN e BILEZIKIAN, 2001), os flavonóides (CECCHETTIN et al., 1995) e, mais recentemente, as estatinas (MAHLEY e BERSOT, 2001).

Apesar das alternativas terapêuticas, atualmente aprovadas para tratamento da osteoporose, um grande número de pacientes sofre cirurgias de osteossíntese e substituição de articulação, que tem como causas, fraturas decorrentes da perda de densidade óssea diretamente relacionada com osteoporose primária ou osteoporose secundária (HENCH, 1998).

Os agentes farmacológicos usados para controlar a osteoporose atuam por diminuir a taxa de reabsorção óssea, portanto lentificando a taxa de perda óssea, ou por promover formação óssea. As únicas drogas correntemente aprovadas nos Estados Unidos para uso em osteoporose são aquelas que diminuem a reabsorção. Visto que remodelação óssea é um processo acoplado, drogas anti-reabsortivas terminam também diminuindo a taxa de formação óssea. Assim, terapia anti-reabsortiva não pode levar a substanciais ganhos em densidade mineral óssea. Aumentos em densidade mineral óssea, que tipicamente são vistos durante os primeiros anos de terapias anti-reabsortivas, representam uma constrição do espaço de remodelamento para um novo nível de estado estável, após o qual a densidade mineral óssea alcança um platô. Uma consequência deste fenômeno é a tentativa terapêutica em osteoporose, a qual deve ser de suficiente duração para determinar se um aumento na densidade mineral óssea representa algo mais do que uma simples redução no espaço de remodelamento (BORELLI, 1998).

O alendronato de sódio, um bifosfonato que atua como agente anti-reabsortivo, tem demonstrado ser um dos mais potentes fármacos deste grupo, sendo largamente utilizado na prevenção da reabsorção óssea sistêmica na osteoporose (ALTUNDA & GURSOY, 2005).

O potencial de reparação de uma fratura óssea depende de variáveis relacionadas ao paciente, localização e tratamento empregado. O tratamento deve criar condições biológicas e mecânicas que favoreçam a reparação, influenciando fatores determinantes na organização e o processo final de consolidação da fratura (MULLER et al, 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUNDA, H.; GURSOY ,B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 99:285-291, 2005.

AU, W.Y. Cortisol stimulation of parathyroid hormone secretion by rat parathyroid glands in organ culture. **Science**, 193(4257):1015-1017, 1976.

BORELLI, A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: CARVALHO FILHO, E.T.; PAPALÉO NETO, M. **Geriatría: Fundamentos, Clínica e Terapêutica**. 2ª ed. São Paulo : Atheneu.1998. p.297-307.

CECCHETTIN, M.; BELLOMETTI, S.; CREMONESI, G.; SOLIMENO, L.P.; TORRI, G. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. **Biomed & Pharmacoth**, 49:465-468, 1995.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, 289(5484):1501-1504, 2000.

ETTINGER, B.; BLACK, D.M.; MITLAK, B.H.; KNICKERBOCKER, R.K.; NICKELSEN, T.; GENANT, H.K.; CHRISTIANSEN, C.; DELMAS, P.D.; ZANCHETTA, J.R.; STAKKESTAD, J.; GLUER, C.C.; KRUEGER, K.; COHEN, F.J.; ECKERT,S.; ENSRUD, K.E.; AVIOLI, L.V.; LIPS,P.; CUMMINGS, S.R. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: result from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. **Jama**, 282:637-645, 1999.

HARRISON, T.R. **Medicina Interna**. 13ª ed. Rio de Janeiro : McGraw-Hill Interamericana, 1996. 2285p.

HEIKINHEIMO, R.J.; INKOVAARA, J.A.; HARJU, E.J.; HAAVISTO, M.V.; KAARELA, R.H.; KATAJA, J.M.; KOKKO, A.M.L.; KOLHO, L.A.; RAJALA, S.A. Annual injection of vitamin D and fractures of aged bones. **Calcif Tissue Int**, 51: 105-110, 1992.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, 19:1419–1423, 1998.

JILKA, R.L.; HANGOC, G.; GIRASOLE, G.; PASSERI, G.; WILLIAMS, D.C.; ABRAMS, J.S.; BOYCE, B.; BROXMEYER, H.; MANOLAGAS, S.C. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. **Science**, 257(5066):88-91, 1992.

KIM, S.; LEE, M.; RHEE, M. Studies on the Effects of Biomedical Agents on Serum Concentration of Ca²⁺, P and ALP Activity in Osteoporosis-Induced Rats. **J Vet Sci**, 4(2):151-154, 2003.

LLOYD, T.; ANDON, M.B.; ROLLINGS, N.; MARTEL, J.K.; LANDIS, J.R.; DEMERS, L.M.; EGGLI, D.F.; KIESELHORST, K.; KULIN, H.E. Calcium supplementation and bone mineral density in adolescent girls. **Jama**, 270:841-844, 1993.

MAHLEY, R.W.; BERSOT, T.P. Drug therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10^aed. New York: McGraw-Hill. 2001. p.971-1002.

MARCUS, R.; WANG, O.; SATTERWHITE, J.; MITLAK, B. The skeletal response to teriparatide is largely independent of age, initial bone mineral density, and prevalent vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis. **J Bone Miner Res**, 18:18-23, 2003.

MENDONZA, M.I.H. Clasificación de la Osteoporosis. Factores de Riesgo. Clínica y Diagnóstico Diferencial. **An Sist Sanit Nav**, 26(3):29-52, 2003

MEYER, J.L. e NANCOLLAS, G.H. The influence of multidentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxiapatite. **Calcif Tissue Res**, 13:295-303, 1973.

MULLER S.S., CURCELLI E.C., SARDENBERG T., ZUCCON A., JUNIOR J.L.C., PADOVANI C.R., Analise Clínica e Biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. **Acta Ortop Brás**, 12(4):197-204, 2004.

POLO, R.G. Osteoporosis inducida por glicocorticóides. **An Sist Sanit Navar**, 3:63-80, 2003.

REID, I.R. Glucocorticoid osteoporosis-mechanisms and management. **Eur J Endocrinol**, 137(3):209-217, 1997.

REID, I.R. e IBBERTSON, H.K. Evidence for decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. **Horm Res**, 27(4):200-204, 1987.

RIGGS, B.L.; HODGSON, S.F.; O'FALLON, W.M.; CHAO, E.Y.S.; WAHNER, H.W.; MUHS, J.M.; CEDEL, S.L.; MELTON, L.J.I. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. **N Engl J Med**, 322:802-809, 1990.

RITTER, C.; MORRISSEY, J.; SLATOPOLSKY, E.; MARTIN, K.J. Combined effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on parathyroid hormone secretion in cultured bovine parathyroid cells. **Endocrinology**, 125(2):638-641, 1989.

ROSEN, C.J. e BILEZIKIAN, J.P. Anabolic therapy for osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, 86:957-964, 2001.

SCHOT, L.P.; SCHUURS, A.H. Sex steroids and osteoporosis: effects of deficiencies and substitutive treatments. **J Ster Biochem Mol Biol**, 37(2):167-182, 1990.

SUGIMOTO, T.; BROWN, A.J.; RITTER, C.; MORRISSEY, J.; SLATOPOLSKY, E.; MARTIN, K.J. Combined effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on parathyroid hormone secretion in cultured bovine parathyroid cells. **Endocrinology**, 125(2):638-641, 1989.

WEINSTEIN, R.S.; JILKA, R.L.; PARFITT, A.M.; MANOLAGAS, S.C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. **J Clin Invest**, 102(2):274-282, 2000.

WEISS, N.S.; URE, C.L.; BALLARD, J.H.; WILLIAMS, A.R.; DALING, J.R. Decreased risk of fractures of the hip and lower forearm with postmenopausal use of estrogen. **N Engl J Med**, 303:1195-1198, 1980.

YONEMURA, K.; HISHIDA, A.; KIMURA, M.; WATANABE, T.; KUMAGAI, H. Prednisolone induces an increase in serum calcium concentration: possible involvement of the kidney, the bone, and the intestine. **Calcif Tissue Int**, 65(4):267-271, 1999.

Artigo 1 - AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA, HISTOMORFOMÉTRICA E DE MARCADORES BIOQUÍMICOS NO USO DE ALENDRONATO DE SÓDIO, RISEDRONATO SÓDICO, ATORVASTATINA CÁLCICA E LOVASTATINA NA REPARAÇÃO DE FRATURAS EM TÍBIAS DE RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA

RESUMO

BRAGINE, Davilson Ferreira Junior, M.S.; Universidade Federal de Viçosa; Dezembro de 2007. **Alendronato de sódio, risedronato sódico, atorvastatina cálcica e lovastatina na reparação de fraturas tíbiais em ratas com osteoporose induzida pela dexametasona.** Orientador: Aloísio da Silva Pinto. Conselheiros: Ricardo Junqueira Del Carlo e Cláudio César Fonseca.

A osteoporose é uma doença caracterizada por diminuição da massa óssea, com conseqüente aumento da incidência de fraturas, necessitando de métodos preventivos e de tratamentos eficazes para as mesmas. Tem sido demonstrado que a osteoporose influencia negativamente os processos curativos depois de uma fratura.

Alguns estudos demonstram que, não somente a osteoporose, mas fármacos com propriedades anti-reabsortivas, promovem a não consolidação de fraturas, presumivelmente pelo desequilíbrio de atividade osteoblástica e osteoclástica ocasionadas por esses fármacos.

O presente trabalho teve como objetivo verificar, comparativamente, os efeitos de alendronato de sódio, risedronato sódico, atorvastatina cálcica e lovastatina na reparação de fraturas em ratas osteoporóticas induzidas com dexametasona. Os efeitos desses fármacos foram analisados pelos marcadores bioquímicos cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, fosfatase alcalina e exame histomorfométrico de densidade trabecular óssea. Além disso, foi realizada morfometria através das medidas de comprimento, espessura, diâmetro do calo ósseo e densidade das tíbias dos animais. Através da morfometria e histomorfometria foi possível constatar a indução da osteoporose com o glicocorticóide, assim como a melhoria na densidade óssea, densidade trabecular óssea e diâmetro do calo ósseo em todos os grupos tratados. Os resultados bioquímicos, principalmente fosfatase alcalina óssea, que permaneceram sem diferenças significativas em todos os grupos, quando avaliados em conjunto com a morfometria e histomorfometria demonstram que prevaleceram as propriedades anti-reabsortivas em relação às formadoras de osso dos fármacos em todos os grupos tratados.

ABSTRACT

BRAGINE, Davilson Ferreira Junior, M.S.; Universidade Federal de Viçosa; December, 2007. **Alendronate of Sodium, Risedronate of Sodium, Atorvastatin Calcic and Lovastatin in tibiais fractures on female rats with Dexamethasone Osteoporosis Induced.** Adviser: Aloísio da Silva Pinto. Committee Members: Ricardo Junqueira Del Carlo and Cláudio César Fonseca.

Osteoporosis is an illness characterized for reduction of the bone mass, with consequent increase of the incidence of breakings, needing preventive methods and efficient treatments for the same ones. He has been demonstrated that osteoporosis influences the processes negative dressings after a breaking.

Some studies demonstrate that not only osteoporosis, but drugs with antiresorptives properties promotes not the consolidation of breakings for imbalance of osteoblastic and osteoclastic activity caused by this type of grug

The present work had as objective to verify, comparatively, the effect of alendronate of sodium, risedronate of sodium, atorvastatine calcic and lovastatine in the repairing of breakings in induced osteoporotics rats with dexamethasone. The effect of these drugs had been analyzed by the biochemists markers calcium, phosphorus, albumin, proteins, alkaline phosphatase and histomorphometric examination of bone trabecular density. Moreover, morphometric tests were did through the measures of lenght, thickness, bone callus diameter and tibias density of the animals. Through morphometric and histomorphometric tests it was possible to evidence the induction of osteoporosis with glucorticoid, as well as the improvement in the bone density, bone trabecular density and thickness of the bone callus in all treated groups. The biochemists results, mainly bone alkaline phosphatase, who had remained without significant differences in all the groups, when evaluated in set with morphometric and histomorphometric results demonstrated that treated groups had prevailed the antiresorptive properties in relation to bone formation in all treated groups.

1 – INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma desordem metabólica do tecido ósseo, em que há perda de massa óssea, redução da densidade, juntamente com alteração da microarquitetura do osso, o que leva ao aumento da fragilidade e risco de fraturas (MENDONZA, 2003).

Dentre as causas mais comuns de osteoporose, está o hipercortisolismo crônico, com ação direta dos glicocorticóides sobre as paratireóides e as células ósseas, alterações da produção de prostaglandinas, citocinas, interleucinas, alterações de secreção de hormônio de crescimento, do fator de crescimento semelhante à insulina e esteróides gonadais (LANNA et al., 2003).

Os bifosfonatos aprovados no tratamento da osteoporose reduzem o risco de fraturas em locais, tais como, o colo do fêmur e vértebra lombar (CAULEY et al., 2003). Apesar disso, um grande número de pacientes sofrem cirurgias de osteossíntese e substituição de articulação, que tem como causas, fraturas decorrentes da perda de densidade óssea diretamente relacionada com osteoporose primária ou osteoporose secundária (HENCH, 1998). O alendronato de sódio, um bifosfonato que atua como agente antirreabsortivo tem demonstrado ser um dos mais potentes fármacos deste grupo, sendo largamente utilizado na prevenção da reabsorção óssea sistêmica na osteoporose (ALTUNDA & GURSOY, 2005).

O potencial de reparação de uma fratura óssea depende de variáveis relacionadas ao paciente, localização e tratamento empregado. O tratamento deve criar condições biológicas e mecânicas que favoreçam a reparação, influenciando fatores determinantes na organização e o processo final de consolidação da fratura (MULLER et al., 2004).

A regeneração óssea, após fratura e osteossíntese, é um processo complexo, não completamente compreendido, particularmente quando a osteoporose está presente (NAMKUNG-MATTHAI et al., 2001). Tem sido demonstrado que a osteoporose influencia negativamente os processos curativos depois de uma fratura (KUBO et al., 1999). Estudos de UUSITALO et al. (2005) verificaram menor densidade trabecular óssea e menor resistência biomecânica em lesões induzidas em fêmures de camundongos devido a osteopenia ocasionada pela imobilização.

Utilizando alendronato de sódio, estudos de ALTUNDA & GÜVENER (2004) verificaram menor redução de perda de estrutura óssea em alvéolos após extração dentária em ratos normais, e LEHMAN et al. (2004), também observaram a não consolidação de

fraturas da coluna vertebral, em coelhos normais, presumivelmente pelo desequilíbrio de atividade osteoclástica e osteoblástica que este fármaco causa.

Muito embora o uso seja maior dos fármacos anti-reabsortivos, principalmente os bifosfonatos no tratamento da osteoporose, os agentes biotecnológicos que podem ser utilizados nesse tratamento, de acordo com suas propriedades farmacológicas, podem ser divididos em anti-reabsortivos e agentes formadores de osso (KIM et al., 2003).

As estatinas, tais como a lovastatina (LI et al., 2003), sinvastatina (MAEDA et al., 2001), atorvastatina (PINTO et al., 2006), cerivastatina e pravastatina (MUNDY et al., 1999), que atuam como agentes formadores de osso têm demonstrados efeitos benéficos na prevenção e tratamento da osteoporose por causa dos efeitos potenciais no aumento da diferenciação de células progenitoras ósseas.

2 - OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo verificar, comparativamente, os efeitos de alendronato de sódio, risedronato sódico, atorvastatina cálcica e lovastatina na reparação de fraturas em ratas osteoporóticas induzidas com dexametasona. Os efeitos desses fármacos foram analisados pelos marcadores bioquímicos cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, fosfatase alcalina e exame histomorfométrico de densidade trabecular óssea. Além disso, foi realizada morfometria através das medidas de comprimento, espessura, diâmetro do calo ósseo e densidade das tíbias dos animais.

3 – MATERIAIS E METODOS

Foram utilizadas 36 ratas da raça Wistar, adultas, pesando em média 250 ± 20 g, procedentes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e alimentadas com ração padronizada comercial para ratos de laboratório e água *ad libitum* durante todo experimento.

Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em gaiolas de polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável em forma de grade, contendo, em cada uma, seis animais. Os animais foram mantidos em um ambiente climatizado à

temperatura média de 22° C, com período de luz de 12 horas e as gaiolas higienizadas três vezes por semana.

Após uma semana, período de adaptação, teve início o processo de indução da osteoporose com a administração do glicocorticóide dexametasona, por via intramuscular, na dose semanal de 7,5 mg/Kg de peso corporal, durante quatro semanas, nos animais de todos os grupos, à exceção de 6 animais que permaneceram como grupo controle (SOUTHARD et al., 2000).

Após o período de indução da osteoporose, os animais de todos os grupos foram submetidos ao procedimento de fratura completa, de forma fechada, realizada por um médico veterinário, onde cada animal recebeu, como medicação pré-anestésica, acepromazina na dose de 0,1mg/Kg por via intramuscular, seguida de anestesia dissociativa com tiletamina-zolazepam, completando com infiltração de 0,75mL de anestésico local lidocaína à 2%. Ainda, foi realizada a analgesia pós-operatória, obtida com administração via oral de morfina 0,4mg/Kg a cada seis horas, durante os três primeiros dias após o procedimento cirúrgico.

A fratura foi realizada manualmente por flexão forçada, objetivando-se obter traço horizontal no terço médio das tíbias esquerdas com mobilização do perióstio (POZENATO et al., 2004).

Imediatamente após o procedimento de fratura, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais de seis animais. O grupo 1 (G1), ou grupo controle, foi composto por ratas normais submetidas somente ao procedimento de fratura; o grupo 2 (G2) composto por animais que foram submetidos ao uso de glicocorticóide e ao procedimento de fratura; o grupo 3 (G3) constituído de ratas submetidas ao uso do glicocorticóide, procedimento de fratura e tratamento posterior com alendronato de sódio 0,25mg/Kg (ALTUNDA & GÜVENER, 2004); o grupo 4 (G4) composto de ratas submetidas ao uso de glicocorticóide, procedimento de fratura e tratamento posterior com risedronato sódico à 1mg/Kg (OLIVEIRA et al., 2004); o grupo 5 (G5) composto de ratas submetidas ao uso de glicocorticóide, procedimento de fratura e tratamento com atorvastatina cálcica 1,2mg/Kg (PINTO et al., 2006) e o grupo 6 (G6) composto de ratas submetidas ao uso de glicocorticóide, procedimento de fratura e tratamento com lovastatina 2mg/Kg, (STANISLAUS et al., 2002). Todas as substâncias foram administradas por via oral, diariamente, durante 30 dias.

Aos 35 dias após o procedimento de fratura e início dos tratamentos, os animais foram submetidos à eutanásia com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 50mg/Kg).

Através de dissecação do tecido muscular com manutenção do periósteo, as tíbias esquerdas foram coletadas e colocadas em formol 10% neutro tamponado, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, foram descalcificadas e processadas rotineiramente para estudo histológico.

O exame histológico foi realizado em cortes de ossos corados com Tricrômico de Masson e foi aplicado o método de cálculo planimétrico por contagem de pontos para avaliação da densidade trabecular óssea.

Para cálculo da densidade ocupada por osso trabecular, foi obtida uma imagem amostral de osso trabecular, contido na região subcondral, de cada corte histológico da tíbia, em microscópio óptico equipado com câmara digital (TCL-984 P). Estas imagens foram analisadas em monitor de microcomputador de 14 polegadas, com aumento final de 50 vezes. Uma gráticula composta por 494 interseções, distando 1cm cada uma, foi aplicada sobre a imagem, sendo uma área de 100 interseções isolada para a mensuração. Estas interseções foram computadas como pontos coincidentes à trabecula óssea ou ao espaço intertrabecular. Realizou-se 3 repetições, sendo, assim, para cada animal, computados um total de 300 pontos, perfazendo, portanto, 1800 pontos por grupo de 6 animais de cada tratamento. Desta forma, obteve-se o percentual da densidade trabecular óssea dos animais experimentais.

Medidas de comprimento, espessura e diâmetro do calo ósseo das tíbias foram realizadas com auxílio de um paquímetro. Além disso, foram realizadas aferições da densidade desses ossos, que ocorreram através da relação dos valores de pesagem e deslocamento de líquido em recipiente graduado.

Para avaliação dos marcadores bioquímicos, imediatamente antes dos animais serem eutanasiados, foram coletados, através de punção da veia cava caudal, 5mL de amostra de sangue para a dosagem dos níveis séricos de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea (FAO).

As dosagens sorológicas de cálcio, fósforo, albumina e proteínas totais foram realizadas utilizando o Aparelho Multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), bem como “kits” específicos da marca Biolab, sendo os resultados expresso em mg/dL.

Para as dosagens sorológicas de fosfatase alcalina óssea foi utilizado o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter, assim como “kits” Ostase, específico para dosagem da FAO, também da mesma indústria.

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos em 6 repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste F ($p < 0,05$). Os grupos controle (G1 e G2) foram comparados entre si por meio do teste F. Os grupos tratados (G3, G4, G5 e G6) foram comparados entre si, através do teste de Tukey, à 5% de probabilidade. As comparações dos grupos tratados com o controle (G1) e o osteoporótico (G2) também foram realizadas, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnett à 5% de probabilidade.

4 - RESULTADOS

A tabela 1 apresenta as medidas de comprimento, espessura e diâmetro do calo ósseo formado nas tíbias. Apresenta, também, a densidade dos ossos, que foi obtida através da relação dos valores de pesagem e deslocamento de líquido em recipiente graduado.

Tabela 1- Valores médios de comprimento, espessura, diâmetro do calo ósseo (DCO) e densidade das tíbias de ratas submetidas a diferentes tratamentos.

Grupos	Comprimento (cm)	Espessura(cm)	DCO (cm)	Densidade(g/cm ³)
G1 Controle	3,17 ±0,132 A	0,21 ±0,039 A	0,37 ±0,078 A	1,35 ±0,072 A
G2 Glicocorticóide	3,26 ±0,38 A	0,20± 0,058 A	0,27 ±0,069 B	1,25 ±0,058 B
G3 Alendronato	3,27 ±0,095 a	0,20 ±0,071 a	0,42 ±0,037 a	1,42 ±0,121 a
G4 Risedronato	3,30 ±0,211 a	0,20 ±0,026 a	0,37 ±0,055 a	1,40 ±0,144 a
G5 Atorvastatina	3,15 ±0,110 a	0,22 ±0,056 a	0,34 ±0,029 a	1,37 ±0,077 a
G6 Lovastatina	3,29 ±0,102 a	0,22 ±0,039 a	0,36 ±0,092 a	1,37 ±0,140 a

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste F (P < 0,05).

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os resultados obtidos na tabela 1, demonstram que os valores de comprimento e espessura não diferiram significativamente entre si. Em relação aos resultados dos calos ósseos, os valores do grupo glicocorticóide (G2) diferem do grupo controle (G1), demonstrando a influência da dexametasona sobre o processo de reparação óssea. Os resultados obtidos de densidade apresentam valores estatisticamente significativos entre o grupo controle (G1) e o grupo glicocorticóide (G2), indicando alteração do metabolismo ósseo, que coaduna com o quadro de osteoporose. Entre os tratamentos efetuados, não se observou diferença significativa entre eles.

Na tabela 2 são apresentados os resultados quantitativos do exame histomorfométrico, que nos permitiu determinar a osteoporose através da visualização da morfologia trabecular.

Tabela 2 – Valores médios de densidade trabecular óssea em pontos percentuais e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo glicocorticóide G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos.

Grupos	Densidade Trabecular Óssea %	Variação % em relação a G1	Variação % em relação a G2
G1 Controle	65,1 ±2,48 A	-----	-----
G2 Glicocorticóide	44,0 ±3,57 B	-----	-----
G3 Alendronato	72,8 ±2,78 a	11,83*	65,45**
G4 Risedronato	69,5 ±3,08 a	6,76	57,95**
G5 Atorvastatina	63,0 ±5,09 b	-3,22	43,18**
G6 Lovastatina	69,3 ±4,08 a	6,45	57,5**

Letra A difere de B pelo Teste F ($P < 0,05$)

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

* Estatisticamente diferente do controle (G1) pelo teste de Dunnet ($P < 0,05$)

** Estatisticamente diferente do grupo glicocorticóide (G2) pelo teste de Dunnet ($P < 0,05$)

Os resultados da densidade trabecular óssea possibilitou a constatação da indução osteoporótica, pois os valores do grupo tratado apenas com dexametasona (G2) apresentaram-se diminuídos significativamente, quando comparado ao grupo controle (G1). A variação em porcentagem em relação a G2, de todos os grupos, apresentou positivo, indicando o sucesso na reconstituição óssea. Observa-se também, que o tratamento efetuado com alendronato apresentou maior eficácia em restaurar o tecido trabecular ósseo. Estes resultados comprovam a eficácia das substâncias farmacológicas do grupo dos bifosfonatos, bem como do grupo das estatinas, em relação as influências sobre o metabolismo ósseo.

Verificamos pelos resultados obtidos através da tabela 3 que os tratamentos medicamentosos não alteraram significativamente os valores de cálcio, fósforo, albumina e fosfatase alcalina óssea séricos em relação àqueles dos animais do grupo glicocorticóide (G2) e também dos animais do grupo controle (G1).

Por outro lado, os valores de proteínas totais do grupo glicocorticóide (G2) diferem significativamente do grupo controle (G1), demonstrando a atividade da dexametasona sobre o metabolismo protéico.

Tabela 3- Valores médios de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, e fosfatase alcalina óssea séricos de ratas submetidas a diferentes tratamentos.

Grupos	Cálcio mg/dL	Fósforo Mg/dL	Albumina g/dL	Proteínas totais g/dL	Fosfatase Alcalina pg/dL
G1 Controle	10,52±0,26A	7,76± 0,76A	4,67± 0,45A	82,35±4,36A	0,067 ± 0,030 A
G2 Glicocorticóide	10,96±0,19A	7,37± 0,63A	4,52 ± 0,06A	76,28±1,49B	0,060 ± 0,023 A
G3 Alendronato	10,51±0,25a	7,81 ± 0,41a	4,61 ± 0,37a	83,02±5,46a	0,063 ± 0,032 a
G4 Risedronato	10,57±0,64a	7,55 ± 0,65a	4,32 ± 0,26a	79,72±3,46a	0,060 ± 0,024 a
G5 Atorvastatina	10,88±0,61a	7,59 ± 0,46a	4,63 ± 0,62a	79,09±3,25a	0,061 ± 0,031 a
G6 Lovastatina	10,67±0,65a	7,91 ± 0,35a	4,69 ± 0,39a	81,35±3,28a	0,060 ± 0,025 a

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P < 0,05).

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

5- DISCUSSÃO

Segundo BRANDLI et al. (1991), a indução da osteoporose pelos glicocorticóides resulta da supressão da atividade de formação óssea dos osteoblastos, combinado com o aumento da atividade de reabsorção óssea pelos osteoclastos. Ainda, o processo pelo qual o glicocorticóide pode induzir a osteoporose pode ser explicado pelo balanço negativo de cálcio devido a mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal com conseqüente diminuição dos níveis séricos de cálcio, que acaba levando ao hiperparatireoidismo secundário (BIKLE et al., 1993; REID, 1997). Embora os mecanismos precisos permaneçam obscuros, a eliminação urinária aumentada de cálcio que ocorre em resposta ao glicocorticóide, provavelmente é uma conseqüência da reabsorção tubular diminuída (REID, 1997). Isto pode ser um efeito a longo prazo, uma vez que, uma única dose de prednisolona aumenta os níveis de cálcio do soro, mas não altera significativamente o nível de cálcio urinário (YONEMURA et al., 1999).

A diminuição da formação do calo ósseo pode ser observada porque os glicocorticóides modificam a atividade metabólica e proliferativa das células ósseas, inibindo a osteoblastogênese. Eles também são potentes repressores da função osteoblástica e provavelmente estimuladores da maturação dos osteoclastos (PATSHAN et al., 2001).

Conseqüentemente ao hiperparatireoidismo secundário, diminuição da osteoblastogênese e estimulação da função osteoclástica justifica a diminuição da densidade óssea e a densidade trabecular óssea.

Segundo PINTO et al. (2004), em estudo experimental com ratas adultas tratadas com dexametasona na dose semanal de 7mg/kg durante cinco semanas, através da análise da densidade trabecular óssea em exame histomorfométrico, foi possível constatar a indução da osteoporose.

A osteoporose tem demonstrado grande efeito negativo na reparação biológica de fraturas. Portanto, grande número de experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, têm sido direcionados na intenção de melhorar o desempenho celular e fisiológico, objetivando o metabolismo ósseo ideal (normal) em contraposição a esta patologia metabólica e degenerativa (LEHMAN et al., 2004). Tendo em vista, principalmente, a reparação tecidual óssea, a propriedade formadora de osso, demonstrada principalmente pelo aumento dos níveis de fosfatase alcalina óssea, e não somente anti-reabsortiva de um fármaco, teria fundamental importância na recuperação de uma fratura (FINI et al., 2004).

Terapias atuais têm demonstrado que os bifosfonatos representam um conveniente e efetivo modo de tratar a perda óssea, através da sua efetiva ação de inibição da atividade osteoclástica. Quimicamente, os bifosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato, nos quais o átomo de fósforo se liga ao carbono, formando ligações p-c-p e são mais resistentes à hidrólise química e enzimática (HAMDY, 1993).

Os bifosfonatos contendo nitrogênio como risedronato, alendronato, pamidronato e ácido zoledrônico e os não nitrogenados como clodronato e etidronato causam apoptose de osteoclastos de coelhos. A apoptose dos osteoclastos estaria envolvida em trocas morfológicas, perda da membrana mitocondrial e a ativação de proteases caspase-3, capazes de clivar substratos peptídicos (BENFORD et al., 2001).

Segundo FOGELMAN et al. (1981), estes fármacos atuam ligando-se a cristais hidroxiapatitas e acumulam-se no tecido ósseo, exercendo, assim, inibição da reabsorção osteoclástica e inibição da desmineralização óssea, propriedades essas que o caracterizam como agente anti-reabsortivo (VITTE et al., 1996). Podem inibir diretamente múltiplas etapas na via do mevalonato para colesterol e lípidos isoprenóides, tais como geranylgeranyl difosfato, que são requeridos para a prenilação de várias proteínas que são importantes para a função do osteoclasto (LUCKMAN et al., 1998).

Estudos recentes, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm demonstrado que os bifosfonatos, além de sua conhecida propriedade anti-reabsortiva, atuam promovendo atividade osteoblástica e, conseqüentemente, formação de tecido ósseo. Estudos de

KNOCH et al. (2005), em cultura de células de medula óssea humana tratadas com os bifosfonatos alendronato, risedronato e zoledronato, evidenciaram a proliferação celular e diferenciação osteogênica determinada por, além da contagem de células, aumento dos níveis de fosfatase alcalina.

Segundo IM et al. (2004), os bifosfonatos alendronato e risedronato, tanto em cultura de células trabeculares ósseas humanas, como em cultura de células de linhagem osteoblástica mg-63, demonstraram através de testes de fosfatase alcalina e cadeias de polimerase transcriptase reversa promoção de significativo aumento no número de células, assim como diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos.

Estudos de LEEM et al. (2002), com a lovastatina, verificaram aumento da atividade de fosfatase alcalina óssea, mineralização de matriz óssea e osteogênese de células ósseas *in vitro*.

As estatinas, como inibidoras da reabsorção óssea, possui um mecanismo de ação semelhante aos bifosfonatos nitrogenados, inibindo a 3-hidroxi-3glutaril-coenzima A, diminuindo a síntese hepática de colesterol, bloqueando assim o metabolismo do mevanolato (MAEDA et al., 2003).

Segundo MUNDY (2001), as estatinas podem causar ganho substanciais de tecido ósseo devido a seus efeitos promotores sobre o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), o qual conduz a diferenciação osteoblástica e a formação óssea. Ocorre aumento da transcrição do gene do BMP-2, sendo este o provável mecanismo responsável pelos seus efeitos.

ECKARDT et al. (2005), em estudo experimental em coelhos, verificaram após sete semanas da indução de fraturas nas tíbias, que o grupo que recebeu deposição interfragmentar de 200 mg de proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (RHBMP-2), apresentaram significativo ganho ósseo em relação ao grupo controle.

Estudos de SCHMIDMAIER et al. (2002), com implantes de titânio recobertos com BMP-2, utilizados na estabilização intramedular de fratura de tíbias de ratos, mostraram evidências radiológicas do melhor progresso de consolidação do calo ósseo em relação ao grupo controle. Ainda, a histomorfometria demonstrou, no grupo tratado com BMP-2, progresso na remodelação do calo ósseo com significativo aumento da mineralização e diminuição da cartilagem da região do calo adjacente ao periósteo.

6 - CONCLUSÕES

Através da morfometria e histomorfometria foi possível constatar a indução da osteoporose com o glicorticóide, assim como a melhoria na densidade óssea, densidade trabecular óssea e espessura do calo ósseo em todos os grupos tratados, destacando o grupo tratado com alendronato de sódio que apresentou melhores resultados.

Os resultados bioquímicos, principalmente fosfatase alcalina óssea, que permaneceram sem diferenças significativas em todos os grupos, quando avaliados em conjunto com a morfometria e histomorfometria demonstram que prevaleceram as propriedades anti-reabsortivas em relação às formadoras de osso em todos os grupos tratados.

Apesar da prevalência das propriedades anti-reabsortivas em todos os tratamentos, a morfometria e histomorfometria mostraram resultados equiparáveis à recuperação óssea do grupo normal, o que demonstra que os mesmos não interferem negativamente e, sim, positivamente no processo de recuperação de fraturas em animais osteoporóticos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUNDA, H.; GURSOY ,B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 99:285-291, 2005.

ALTUNDA, H.; GÜVENER, O. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 33:286–293, 2004.

BENFORD, H.L.; MCGOWAN, N.W.A.; HELFRICH, M.H.; NUTALL, M.E.; ROGER, M.J. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3-activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone**, 28(5):465-473, 2001.

BIKLE, D.D.; HALLORAN, B.; FONG, L.; STEINBACH, L.; SHELLITO, J. Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone. **J Clin Endocrinol Met**, 76(2):456-61, 1993.

BRANDLI, D.W.; GOLDE, G.; GREENWALD, M.; SILVERMAN, S.T. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a cross-sectional study. **Steroids**, 56:518-523, 1991.

CAULEY, J.A.; ROBBINS, J.; CHEN, Z.; CUMMINGS, S.R.; JACKSON, R.D.; LACROIX, A.Z. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the women's health initiative randomized trial. **Jama**, 290:1729–1738, 2003.

ECKARDT, H.; CHRISTENSEN, K.S.; LIND, M.; HANSEN, E.S.; HALL, D.W.R.; HVID, I. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. **Int J Care Injured**, 36: 489-494, 2005.

FINI, M.; GIAVARESI, G.; TORRICELLI, P.; BORSARI, V.; GIARDINO, R.; NICOLINI, A.; CARPI, A. Osteoporosis and Biomaterial Osteointegration, **Biomed & Pharmacoth**, 58:487-493 (2004)

FOGELMAN, I.; PEARSON, D.W.; BESSENT, R.G.; TOFE, A.J.; FRANCIS, M.D. A comparison of skeletal uptake of three diphosphonates by whole body retention. **J Nucl Med**, 22:880-883, 1981.

HAMDY, N.A.T. Role of bisphosphonates in metabolic bone diseases. **Trends endocrinol Metab**, 4:19-25, 1993.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, 19:1419–1423, 1998.

IM, G.; QURESHI, S.A.; KENNEY, J.; RUBASH, H.E.; SHANBHAG, A.S. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials**, 25:4105–4115, 2004.

KIM, S.; LEE, M.; RHEE, M. Studies on the effects of biomedical agents on serum concentration of Ca²⁺, P and ALP activity in osteoporosis-induced rats. **J vet sci**, 4(2):151-154, 2003.

KNOCH, F.; JAQUIERY, C.; KOWALSKYA, M.; SCHAEREN, S.; ALABRE, C.; MARTIN, I.; RUBASH, H.E.; SHANBHAG, A.S. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, 26:6941–6949, 2005.

KUBO, T.; SIGA, T.; HASHIMOTO, J.; YOSHIOKA, M.; HONJIO, H.; URABE, M. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model by ovariectomy and low calcium diet. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 68(5–6):197–202, 1999.

LANNA, C.M.M.; MONTENEGRO, R.M.; PAULA, F.J.A. Fisiopatologia da osteoporse induzida por glicocorticóide. **Arq Bras Endocrinol Met**, 47(1):9-18, 2003.

LEEM, K.; PARK, S.Y.; LEE, D.H.; KIM, H. Lovastatin increases longitudinal bone growth and bone morphogenetic protein-2 levels in the growth plate of Sprague–Dawley rats. **Eur J Pediatr**, 161:406–407, 2002.

LEHMAN, R.A.; KUKLO, T.R.; FREEDMAN, B.A.; COWART, J.R.; MENSE, M.G.; RIEW, D. The Effect of alendronate sodium on spinal fusion: a rabbit model. **The Spine J**, 4:36-43, 2004.

LI, X.; CUI, Q.; KAO, C.; WANG, G.J.; BALIANA, G. Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR γ 2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. **Bone**, 33:652-659, 2003.

LUCKMAN, S.P.; HUGHES, D.E.; COXON, F.P.; GRAHAM, R.; RUSSELL, G.; ROGERS, M.J. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of gtp-binding proteins, including *ras*. **J Bone Miner Res**, 13:581-589, 1998.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, 144(2):681-692, 2003.

MAEDA, T.; MATSUNUMA, A.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Simvastatin Promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 280:874–877, 2001.

MENDONZA, M.I.H. Classificação de la Osteoporosis. Factores de Riesgo. Clínica y Diagnóstico Diferencial. **An Sist Sanit Navar**, 26(3):29-52, 2003.

MULLER, S.S.; CURCELLI, E.C.; SARDENBERG, T.; ZUCCON, A.; JUNIOR, J.L.C.; PADOVANI, C.R. Análise Clínica e Biomecânica do efeito do diclofenaco sódico na consolidação da fratura da tíbia no rato. **Acta Ortop Bras**, 12(4):197-204, 2004.

MUNDY, G.R. Statins and their potential for osteoporosis. **Bone**, 29(6):495-497, 2001.

MUNDY, G.R.; GARRETT, R.; HARRIS, S.; CHAN, J.; CHEN, D.; ROSSINI, G.; BOYCE, B.; ZHAO, M.; GUTIERREZ, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, 286:946–1949, 1999.

NAMKUNG-MATTHAI, H.; APPELYARD, R.; JANSEN, J.; LIN, H.; MAASTRICHT, S.; SWAIN, M. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone**, 28(1):80–86, 2001.

OLIVEIRA, L.A.A.; GUARNIERO, R.; RODRIGUES, C.J.; SANTANA, P.J.; BATISTA, M.A. Avaliação do efeito do Risedronato Sódico na consolidação de fraturas: estudo experimental em ratos. **Acta Ort Bras**, 12(2):1-17, 2004.

PATSCHAN, D.; LODDENKEMPER, K.; BUTTGEREIT, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Bone**, 29(6):498-505, 2001.

PINTO, A.S.; OLIVEIRA, T.T.; DEL CARLO, R.J.; NAGEM, T.J.; FONSECA, C.C.; MORAES, G.H.K.; FERREIRA, D.B.J.; CARDOSO, A.C. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Rev Bras Cienc Farm**, 42:99-107, 2006.

POZENATO, L.C.; SANTANA, P.J.; GUARNIERO, R.; OLIVEIRA, L.A.A.; DOMINGUES, I.J.B.L. Efeitos da ipriflavona sobre a consolidação de fraturas em ratas com desnutrição protéica: trabalho experimental. **Rev Bras Ort**, 39(7):390-397, 2004.

REID, I.R. Glucocorticoid osteoporosis-mechanisms and management. **Eur J Endocrinol**, 137(3):209-17, 1997.

SCHMIDMAIER, G.; WILDEMANN, B.; CROMME, F.; KANDZIORA, F.; HAAS, N.P.; RASCHKE, M. Bone Morphogenetic Protein-2 Coating of Titanium Implants Increases Biomechanical Strength and Accelerates Bone Remodeling in Fracture Treatment: A Biomechanical and Histological Study in Rats. **Bone**, 30(6):816-822, 2002.

SOUTHARD, T.E.; SOUTHARD, K.A.; KRIZAN, K.E.; HILLIS, S.L.; HALLER, J.W.; KELLER, J.; VANNIER, M.W. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 89:244-249, 2000.

STANISLAUS, R.; GILGA, A.G.; SINGH, A.K.; SINGH, I. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by lovastatin. **Nerosci Lett**, 333:167-170, 2002.

UUSITALO, H.; RANTAKOKKO, J.; VUORIO, E.; ARO, H.T. Bone defect repair in immobilization-induced osteopenia: a pQCT, biomechanical, and molecular biologic study in the mouse femur. **Bone**, 36:142-149, 2005.

VITTE, C.; FLEISH, H.; GUENTHER, H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, 137:2324-2333, 1996.

YONEMURA, K.; HISHIDA, A.; KIMURA, M.; WATANABE, T.; KUMAGAI, H. Prednisolone induces an increase in serum calcium concentration: possible involvement of the kidney, the bone, and the intestine. **Calcif Tissue Int**, 65(4):267- 271, 1999.

Artigo 2 - AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA, BIOMECÂNICA E DA FOSFATASE ALCALINA ÓSSEA NO USO DE ALENDRONATO DE SÓDIO, RISEDRONATO SÓDICO, ATORVASTATINA CÁLCICA E LOVASTATINA NA REPARAÇÃO DE FRATURAS EM TÍBIAS DE RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA

RESUMO

BRAGINE, Davilson Ferreira Junior, M.S.; Universidade Federal de Viçosa; Dezembro de 2007. **Alendronato de sódio, risedronato sódico, atorvastatina cálcica e lovastatina na reparação de fraturas tíbiais em ratas com osteoporose induzida pela dexametasona.** Orientador: Aloísio da Silva Pinto. Conselheiros: Ricardo Junqueira Del Carlo e Cláudio César Fonseca.

A osteoporose é uma doença caracterizada por diminuição da massa óssea, com conseqüente aumento da incidência de fraturas, necessitando de métodos preventivos e de tratamentos eficazes para as mesmas. Tem sido demonstrado que a osteoporose influencia negativamente os processos curativos depois de uma fratura. Alguns estudos demonstram que não somente a osteoporose, mas fármacos com propriedades anti-reabsortivas promovem a não consolidação de fraturas, presumivelmente pelo desequilíbrio de atividade osteoblástica e osteoclástica ocasionadas por esse tipo de fármaco. O presente trabalho teve como objetivo verificar, comparativamente, os efeitos de alendronato de sódio, risedronato sódico, atorvastatina cálcica e lovastatina na reparação de fraturas em ratas osteoporóticas induzidas com dexametasona. Os efeitos desses fármacos foram avaliados por análise de densidade radiográfica óssea, testes biomecânicos e pelo marcador bioquímico fosfatase alcalina óssea. Através da densidade radiográfica óssea e resistência biomecânica à fratura, foi possível constatar melhoria na qualidade estrutural e resistência óssea em todos os grupos tratados, destacando os grupos tratados com bifosfonatos que apresentaram melhores resultados. O resultado dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea, que permaneceram sem diferenças significativas em todos os grupos, quando avaliados em conjunto com densidade radiográfica óssea e resistência biomecânica à fraturas, demonstram que prevaleceram as propriedades anti-reabsortivas em relação às formadoras de osso em todos os grupos tratados.

ABSTRACT

BRAGINE, Davilson Ferreira Junior, M.S.; Universidade Federal de Viçosa; December 2007. **Alendronate of Sodium, Risedronate of Sodium, Atorvastatin Calcic and Lovastatin in tibiais fractures on female rats with Dexamethasone Osteoporosis Induced.** Adviser: Aloísio da Silva Pinto. Committee Members: Ricardo Junqueira Del Carlo and Cláudio César Fonseca.

Osteoporosis is an illness characterized for reduction of the bone mass, with consequent increase of the incidence of breakings, needing preventive methods and efficient treatments for the same ones. He has been demonstrated that osteoporosis influences the processes negative dressings after a breaking. Some studies demonstrate that not only osteoporosis, but drugs with antiresorptive properties promotes not the consolidation of breakings for imbalance of osteoblastic and osteoclastic activity caused by this type of drug. The present work had as objective to verify, comparatively, the effect of alendronate of sodium, risedronate of sodium, atorvastatine calcic and lovastatine in the repairing of breakings in induced osteoporotics rats with dexamethasone. The effect of these drugs had been analyzed by bone radiographic density, biomechanical tests and the biochemist marker bone alkaline phosphatase. Through the bone radiographic density and biomechanic resistance to fracture was possible improvement noted in the structural quality and bone resistance in all the treated groups prevailing those treated with bifosfonatos which presented better results. The results of bone alkaline phosphatase serum, what remained without difference significant in all the groups, when valued together with bone radiographic density and to fractures they demonstrated resistance biomechanics what prevailed the antiresorptive properties in relation the bone formation in all the treated groups.

1 - INTRODUÇÃO

A osteoporose é definida como uma desordem esquelética caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura tissular do osso, aumentando sua fragilidade e, conseqüentemente, o risco de fraturas (DERVIS, 2005).

A formação óssea pelos osteoblastos e reabsorção óssea pelos osteoclastos ocorre continuamente no tecido ósseo. Formação óssea e reabsorção usualmente estão em balanço, e a osteoporose ocorre quando a quantidade de massa óssea, assim como a qualidade da mesma são reduzidas perante o excesso de reabsorção em relação à formação (TAMURA et al., 2004).

A osteoporose pode ser classificada em primária e secundária, sendo que a osteoporose induzida por glicocorticoíde é a forma mais comum da osteoporose secundária (POLO, 2003).

Os bifosfonatos são reconhecidos pela sua propriedade inibidora da atividade osteoclástica (KNOCH et al., 2005). Tanto em mulheres pós-menopausa com osteoporose, quanto em pacientes com osteoporose induzida com glicocorticóide, os bifosfonatos têm demonstrado significantes ganhos de densidade mineral óssea (LIBERMAN et al., 1995). Eles foram os principais responsáveis, nas últimas décadas, pela diminuição da incidência de fraturas relacionadas à osteoporose (SHAPIRO et al., 1995). Apesar da eficácia demonstrada pelos bifosfonatos no tratamento da osteoporose, ainda há uma incidência alta de fraturas decorrentes da osteoporose, havendo uma necessidade de melhor compreensão dos efeitos desses fármacos na consolidação de fraturas ósseas (LEHMAN et al., 2004).

Os bifosfonatos, através de suas propriedades anti-reabsortivas, não seriam capazes de restabelecer o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea necessários para a formação do calo ósseo e posterior consolidação da fratura. Torna-se, preponderante, a importância de um medicamento com propriedades anabólicas a ser utilizado na recuperação de fraturas ósseas em pacientes osteoporóticos (LI et al., 2003).

As estatinas, tais como, a lovastatina (LI et al., 2003), sinvastatina (MAEDA et al., 2001), atorvastatina (PINTO et al., 2006), cerivastatina e pravastatina (MUNDY et al., 1999), que atuam como agentes formadores de osso têm demonstrados efeitos benéficos na prevenção e tratamento da osteoporose por causa dos efeitos potenciais no aumento da diferenciação de células progenitoras ósseas.

2 - OBJETIVO

O presente estudo teve como finalidade verificar, comparativamente, os efeitos de alendronato de sódio, risedronato sódico, atorvastatina cálcica e lovastatina na reparação de fraturas em ratas osteoporóticas induzidas pela dexametasona. Os efeitos desses fármacos foram avaliados através das densidades ósseas radiográficas, teste biomecânico, verificando a força e a flexão limítrofe à ruptura, bem como atividade osteoblástica pela análise dos níveis séricos do marcador bioquímico fosfatase alcalina óssea.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 36 ratas da raça Wistar, adultas, pesando em média 250 ± 20 g, procedentes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e alimentadas com ração padronizada comercial para ratos de laboratório e água *ad libitum* durante todo experimento.

Os animais permaneceram em gaiolas de polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável em forma de grade, contendo, em cada uma, seis animais. Foram mantidos em um ambiente climatizado à temperatura média de 22° C, com período de luz de 12 horas e as gaiolas higienizadas três vezes por semana.

Após uma semana, período de adaptação, teve início o processo de indução da osteoporose com a administração do glicocorticóide dexametasona, por via intramuscular, na dose semanal de 7,5 mg/Kg de peso corporal, durante quatro semanas, nos animais de todos os grupos, à exceção de 6 animais que permaneceram como grupo controle (SOUTHARD et al., 2000).

Após o período de indução da osteoporose, os animais de todos os grupos foram submetidos ao procedimento de fratura completa de forma fechada, realizada por um médico veterinário, onde cada animal recebeu, como medicação pré-anestésica, acepromazina na dose de 0,1mg/kg por via intramuscular, seguida de anestesia dissociativa com tiletamina-zolazepam, completando com infiltração de 0,75mL de anestésico local de lidocaína à 2%. Ainda, foi realizada a analgesia pós-operatória, obtida com administração via oral de morfina 0,4mg/Kg a cada seis horas, durante os três primeiros dias após o procedimento cirúrgico.

A fratura foi realizada manualmente por flexão forçada, objetivando-se obter traço horizontal no terço médio das tíbias esquerdas com mobilização do periósteo (POZENATO et al., 2004).

Imediatamente após o procedimento de fratura, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais de seis animais. O grupo 1 (G1), ou grupo controle, foi composto por ratas normais submetidas somente ao procedimento de fratura; o grupo 2 (G2) composto por animais que foram submetidos ao uso de glicocorticóide e ao procedimento de fratura; o grupo 3 (G3) constituído de ratas submetidas ao uso do glicocorticóide, procedimento de fratura e tratamento posterior com alendronato de sódio 0,25mg/kg (ALTUNDA e GÜVENER, 2004); o grupo 4 (G4) composto de ratas submetidas ao uso de glicocorticóide, procedimento de fratura e tratamento posterior com risedronato sódico à 1mg/kg (OLIVEIRA et al., 2004); o grupo 5 (G5) composto de ratas submetidas ao uso de glicocorticóide, procedimento de fratura e tratamento com atorvastatina cálcica 1,2mg/kg (PINTO, 2006) e o grupo 6 (G6) composto de ratas submetidas ao uso de glicocorticóide, procedimento de fratura e tratamento com lovastatina 2mg/kg (STANISLAUS et al., 2002). Todas as substâncias foram administradas por via oral, diariamente, durante 30 dias.

Aos 35 dias após o procedimento de fratura e início dos tratamentos, os animais foram submetidos à eutanásia com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 50mg/kg).

Através de dissecação do tecido muscular com manutenção do periósteo, as tíbias esquerdas e direitas foram coletadas e colocadas em formol 10% neutro tamponado, durante 72 horas para fixação.

As tíbias esquerdas foram então radiografadas, dispostas lateralmente sobre a prancha, e a figura obtida foi submetida a uma análise de densidade radiográfica através do programa Image Tool for Windows 3.0, por tons de cinza obtidos da figura. As áreas das análises foram delimitadas em todas as figuras radiográficas das tíbias e só foram levadas em consideração para análise as áreas selecionadas.

Teste biomecânico, nas tíbias direitas, foi realizado com o auxílio do aparelho Instron (Laboratório de Papel e Celulose do Departamento de Engenharia Florestal/UFV).

Para avaliação do marcador bioquímico fosfatase alcalina óssea (marcador de atividade osteoblástica), imediatamente antes dos animais serem eutanasiados, aos 35 dias após o procedimento de fratura, foram coletados, através de punção da veia cava caudal,

5ml de amostra de sangue para a dosagem dos níveis de fosfatase alcalina óssea (FAO). Nessa dosagem, foi utilizado o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter, assim como “kits” Ostase, específico para dosagem da FAO, também da mesma indústria.

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos em 6 repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste F ($p < 0,05$). Os grupos controle (G1 e G2) foram comparados entre si por meio do teste F. Os grupos tratados (G3, G4, G5 e G6) foram comparados entre si, através do teste de Tukey à 5% de probabilidade. As comparações dos grupos tratados com o controle (G1) e o osteoporótico (G2), também foram realizadas, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnett à 5% de probabilidade.

4 - RESULTADOS

Na tabela 1, podemos visualizar a densidade óssea radiográfica expressa em valores obtidos pela diferença de tons de cinza, onde notamos diferenças significativas em todas as regiões avaliadas, quando comparamos o grupo controle (G1) com osteoporótico (G2), que apresenta menor densidade radiográfica, inclusive na cortical óssea. Quando estudamos os grupos tratados, visualizamos uma diferença significativa dos tratados com estatinas (G5 e G6), com os tratados com bifosfonatos (G3 e G4), quando avaliamos a região da fratura, uma diferença que perdura nas outras regiões avaliadas apesar dessas não apresentarem significância estatística.

Tabela 1- Valores médios das densidades ósseas radiográficas expressas em valores obtidos pela diferença de tons de cinza.

Grupos	Densidade Região Epifisária	Densidade Região da Fratura	Densidade Cortical
G1 Controle	115,8 ± 7,60 A	118,2 ± 5,54 A	122,2 ± 4,32 A
G2 Glicocorticóide	104,8 ± 5,12 B	103,2 ± 7,16 B	104,8 ± 6,30 B
G3 Alendronato	110,8 ± 2,39 a	113,2 ± 10,94 a	121,6 ± 9,86 a
G4 Risedronato	110,4 ± 4,56 a	119,8 ± 6,06 a	117,6 ± 3,97 a
G5 Atorvastatina	109,1 ± 4,06 a	104,4 ± 3,36 b	111,8 ± 4,97 a
G6 Lovastatina	109,1 ± 5,83 a	107,1 ± 7,48 b	115,6 ± 4,83 a

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste F (P < 0,05).

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Quando avaliamos a tabela 2, que expressa os valores médios da força limítrofe à ruptura em Newton e flexão limítrofe à ruptura em mm das tíbias no teste de carga, verificamos diferença significativa em relação ao grupo controle (G1) e osteoporótico(G2). Verificamos também que, apesar da não significância estatística, observa-se uma tendência dos grupos tratados com estatinas (G5 e G6) apresentarem menor resistência à fratura, embora maior flexão.

Tabela 2- Valores médios da força expressa em Newton (N) e flexão em milímetro (mm) imediatamente à ruptura das tíbias no teste de carga .

Grupos	Força Limítrofe à Ruptura (N)	Flexão Limítrofe à Ruptura (mm)
G1 Controle	105,18 ± 13,51 A	0,71 ± 0,12 A
G2 Glicocorticóide	83,57 ± 5,64 B	0,70 ± 0,09 A
G3 Alendronato	113,4 ± 10,08 a	0,69 ± 0,07 a
G4 Risedronato	111,03 ± 9,92 a	0,72 ± 0,11 a
G5 Atorvastatina	107,85 ± 10,18 a	0,84 ± 0,13 b
G6 Lovastatina	109,37 ± 10,03 a	0,82 ± 0,12 b

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste F (P < 0,05).

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Na tabela 3, que apresenta os valores médios de fosfatase alcalina óssea (marcador de atividade anabólica óssea) em pg/dL, verificamos que não houve diferença significativa entre qualquer grupo, demonstrando não ter preponderado atividade anabólica nos tratamentos.

Tabela 3- Valores médios de fosfatase alcalina óssea séricos de ratas submetidas a diferentes tratamentos.

Grupos	Fosfatase Alcalina pg/dL
G1 Controle	0,067 ± 0,030 A
G2 Glicocorticóide	0,060 ± 0,023 A
G3 Alendronato	0,063 ± 0,032 a
G4 Risedronato	0,060 ± 0,024 a
G5 Atorvastatina	0,061 ± 0,031 a
G6 Lovastatina	0,060 ± 0,025 a

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P < 0,05).

Médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

5 - DISCUSSÃO

Comparando os animais osteoporóticos com o grupo controle, verificamos diferenças tanto na menor densidade radiográfica apresentado pelos mesmos, assim como menor resistência à fraturas, demonstrando que a osteoporose influencia negativamente os processos curativos depois de uma fratura (KUBO et al., 1999). Estudos de UUSITALO et al. (2005), verificaram menor densidade trabecular óssea e menor resistência biomecânica em lesões induzidas em fêmures de camundongos devido à osteopenia ocasionada pela imobilização.

A osteoporose tem demonstrado grande efeito negativo na reparação biológica de fraturas. Portanto, grande número de experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, têm sido direcionados na intenção de melhorar o desempenho celular e fisiológico, objetivando o metabolismo ósseo ideal (normal) em contraposição a esta patologia metabólica e degenerativa (LEHMAN et al., 2004). Considerando a reparação tecidual óssea, a propriedade formadora de osso, demonstrada principalmente pelo aumento dos níveis de

fosfatase alcalina óssea, e não somente a ação anti-reabsortiva de um fármaco, teria fundamental importância na recuperação de uma fratura (FINI et al., 2004).

Segundo MUNDY (2001), as estatinas podem causar ganho substanciais de tecido ósseo, devido a seus efeitos promotores sobre o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), o qual conduz a diferenciação osteoblástica e a formação óssea. Ocorre aumento da transcrição do gene do BMP-2, sendo este o provável mecanismo responsável pelos seus efeitos.

Ao compararmos os resultados dos grupos tratados com estatinas, com os outros grupos, verificamos que apesar de resultados positivos em relação à resistência à fraturas e densidade radiográfica óssea, as estatinas atuaram como inibidoras da reabsorção óssea, pois possuem um mecanismo de ação semelhante aos bifosfonatos nitrogenados, inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, diminuindo a síntese hepática de colesterol, bloqueando assim o metabolismo do mevanolato (MAEDA et al., 2003).

Em relação ao grupo tratado com bifosfonatos, apesar de estudos recentes, tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstrarem que os bifosfonatos, além de sua conhecida propriedade anti-reabsortiva, também atuam promovendo atividade osteoblástica e, conseqüentemente, formação de tecido ósseo (KNOCH et al., 2005).

A maior densidade radiográfica apresentada pelos grupos tratados com bifosfonatos, assim como maior resistência à fraturas e não diferença dos níveis de fosfatase alcalina óssea, corroboram com a predominância de propriedades anti-reabsortivas desses fármacos.

Segundo FOGELMAN et al. (1981), estes fármacos atuam ligando-se a cristais hidroxiapatitas e acumulam-se no tecido ósseo, exercendo assim inibição da reabsorção osteoclástica e inibição da desmineralização óssea, propriedades essas que o caracterizam como agente anti-reabsortivo (VITTE et al., 1996).

6 - CONCLUSÕES

Através da densidade radiográfica óssea e resistência biomecânica à fratura, foi possível constatar melhoria na qualidade estrutural e resistência óssea em todos os grupos tratados, destacando os grupos tratados com bifosfonatos que apresentaram melhores resultados.

Os resultados dos níveis séricos de fosfatase alcalina óssea, que permaneceram sem diferenças significativas em todos os grupos, quando avaliados em conjunto com densidade radiográfica óssea e resistência biomecânica à fraturas, demonstram que prevaleceram as propriedades anti-reabsortivas em relação às formadoras de osso em todos os grupos tratados.

Apesar da prevalência das propriedades anti-reabsortivas em todos os tratamentos, a avaliação da densidade radiográfica óssea e resistência a fraturas ósseas mostraram resultados equiparáveis à recuperação óssea do grupo normal, o que demonstra que os mesmos não interferem negativamente e, sim, positivamente no processo de recuperação óssea em animais osteoporóticos.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUNDA, H.; GÜVENER, O. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 33:286–293, 2004.

DERVIS, E. Oral implications of osteoporosis. **Oral Surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol and Endodo**, 100(3):349-356, 2005.

FINI, M.; GIAVARESI, G.; TORRICELLI, P.; BORSARI, V.; GIARDINO, R.; NICOLINI, A.; CARPI, A. Osteoporosis and Biomaterial Osteointegration. **Biomed & Pharmacoth**, 58:487-493 (2004)

FOGELMAN, I.; PEARSON, D.W.; BESSENT, R.G.; TOFE, A.J.; FRANCIS, M.D. A comparison of skeletal uptake of three diphosphonates by whole body retention. **J Nucl Med**, 22:880-883, 1981.

KNOCH, F.; JAQUIERY, C.; KOWALSKYA, M.; SCHAEAREN, S.; ALABRE, C.; MARTIN, I.; RUBASH, H.E.; SHANBHAG, A.S. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, 26:6941–6949, 2005.

KUBO, T.; SIGA, T.; HASHIMOTO, J.; YOSHIOKA, M.; HONJIO, H.; URABE, M. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model by ovariectomy and low calcium diet. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 68(5–6):197–202, 1999.

LEHMAN, R.A.; KUKLO, T.R.; FREEDMAN, B.A.; COWART, J.R.; MENSE, M.G.; RIEW, D. The effect of alendronate of sodium on spinal fusion: a rabbit model. **The Spin J**, 4:36-43, 2004.

LI, X.; CUI, Q.; KAO, C.; WANG, G.J.; BAILAN, G. Lovastatin inhibit adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR γ 2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. **Bone**, 33:652-659, 2003.

LIBERMAN, U.H.; WEISS, S.R.; BROLL, J. Effects of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. **N Engl J Med**, 333:1437-1443, 1995.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, 144(2):681-692, 2003.

MAEDA, T.; MATSUNUMA, A.; KAWANE, T., HORIUCHI, N. Simvastatin Promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 280:874–877, 2001.

MUNDY, G.R. Statins And Their Potential For Osteoporosis. **Bone**, 29(6):495-497, 2001.

MUNDY, G.R.; GARRETT, R.; HARRIS, S.; CHAN, J.; CHEN, D.; ROSSINI, G.; BOYCE, B.; ZHAO, M.; GUTIERREZ, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, 286:946-1949, 1999.

OLIVEIRA, L.A.A.; GUARNIERO, R.; RODRIGUES, C.J.; SANTANA, P.J.; BATISTA, M.A. Avaliação do efeito do Risedronato Sódico na consolidação de fraturas: estudo experimental em ratos. **Acta Ort Brás**, 12(2):1-17, 2004.

PINTO, A.S.; OLIVEIRA, T.T.; DEL CARLO, R.J.; NAGEM, T.J.; FONSECA, C.C.; MORAES, G.H.K.; FERREIRA, D.B.J.; CARDOSO, A.C. Efeitos de tratamento combinado dealendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona, na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Rev Bras Cienc Farm**, 42:99-107, 2006.

POLO, R.G. Osteoporosis inducida por glicocorticóides. **An Sist Sanit Navar**, 3:63-80, 2003.

POZENATO, L.C.; SANTANA, P.J.; GUARNIERO, R.; OLIVEIRA, L.A.A.; DOMINGUES, I.J.B.L. Efeitos da ipriflavona sobre a consolidação de fraturas em ratas com desnutrição protéica: trabalho experimental. **Rev Bras Ort**, 39(7):390-397, 2004.

SHAPIRO, D.R.; TOMPSON, D.E.; KAMPF, D.B. Non-vertebral fracture incidence in patients treated with alendronate. **J Bone Miner Res**, 10:150-155, 1995.

SOUTHARD, T.E.; SOUTHARD, K.A.; KRIZAN, K.E.; HILLIS, S.L.; HALLER, J.W.; KELLER, J.; VANNIER, M. W. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 89:244-249, 2000.

STANISLAUS, R.; GILGA, A.G.; SINGH, A.K.; SINGH, I. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by lovastatin. **Neurosci Lett**, 333:167-170, 2002.

TAMURA, Y.; UKINAGA, H.; TAKAMI, H. Glicocorticóide induce osteoporosis. **Biomed & Pharmacoth**, 58:500-504, 2004.

UUSITALO, H.; RANTAKOKKO, J.; VUORIO, E.; ARO, H.T. Bone defect repair in immobilization-induced osteopenia: a pQCT, biomechanical, and molecular biologic study in the mouse femur. **Bone**, 36:142-149, 2005.

VITTE, C.; FLEISH, H.; GUENTHER, H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, 137:2324-2333, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

Através da morfometria e histomorfometria foi possível constatar a indução da osteoporose com o glicocorticóide, assim como a melhoria na densidade óssea, densidade trabecular óssea e espessura do calo ósseo em todos os grupos tratados, destacando o grupo tratado com alendronato de sódio que apresentou melhores resultados.

Através da densidade radiográfica óssea e testes de resistência biomecânica à fratura foi possível constatar melhoria na qualidade estrutural e resistência óssea em todos os grupos tratados, prevalecendo os grupos tratados com bifosfonatos que apresentaram melhores resultados.

Os resultados bioquímicos, principalmente de fosfatase alcalina óssea, que permaneceram sem diferenças significativas em todos os grupos, quando avaliados em conjunto com a morfometria, histomorfometria, radiografias e testes biomecânicos, demonstram que prevaleceram as propriedades anti-reabsortivas em relação às formadoras de osso em todos os grupos tratados.

Apesar da prevalência das propriedades anti-reabsortivas em todos os tratamentos, a morfometria, histomorfometria, avaliação radiográfica e teste biomecânico demonstraram resultados equiparáveis à recuperação óssea do grupo normal, o que demonstra que os mesmos não interferem negativamente e, sim, positivamente no processo de recuperação óssea em animais osteoporóticos.

Ressalva-se, no entanto, que estudos posteriores das dosagens, interações, biodisponibilidades, além dos efeitos toxicológicos dessas substâncias farmacológicas, fazem-se necessários.