



# Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona sobre a osteoporose induzida com dexametasona em ratas

Pinto, A.S.<sup>1\*</sup>; Oliveira, T.T.<sup>2</sup>; Nagem, T.J.<sup>3</sup>; Del Carlo, R.J.<sup>1</sup>; Fonseca, C.C.<sup>1</sup>; Moraes, G.H.K.<sup>2</sup>; Bragine, D.F.J.<sup>1</sup>; Cardoso, C.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa - 36571-000 - Viçosa - MG - Brasil;

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal de Viçosa - 36571-000 - Viçosa - MG - Brasil;

<sup>3</sup>Departamento de Química - Universidade Federal de Ouro Preto - 35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil.

Recebido 08/03/05 / Aceito 23/08/05

## RESUMO

O crescente aumento da prevalência da osteoporose tem sido considerado um grave problema de saúde pública no mundo. A osteoporose é uma doença caracterizada por diminuição da massa óssea, com consequente aumento do risco de fraturas, necessitando, portanto, de métodos preventivos e de tratamentos eficazes. O presente trabalho teve como objetivo verificar, comparativamente, os efeitos do bifosfonato alendronato de sódio, da estatina atorvastatina cálcica e do flavonóide ipriflavona sobre a osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas. Os efeitos desses fármacos foram avaliados pelos marcadores bioquímicos cálcio e fósforo sérico, fosfatase alcalina óssea e exame histomorfométrico. Os resultados obtidos a partir da análise dos marcadores bioquímicos não foram significativos, não fornecendo subsídios para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento da osteoporose. No entanto, a avaliação histomorfométrica permitiu a análise estática e dinâmica, bem como detecção de alterações teciduais na unidade metabólica óssea, particularmente, no osso trabecular. Verificou-se que os tratamentos testados determinaram resultados significativos no aumento da densidade trabecular óssea, destacando-se o bifosfonato que apresentou o melhor resultado, alcançando níveis de densidade trabecular óssea semelhantes aos dos animais intactos. Além disso, a histomorfometria se mostrou válida na detecção da osteoporose, podendo servir de modelo para o estudo de drogas sobre este distúrbio ósteo-metabólico.

*Palavras-chave:* Osteoporose, dexametasona, alendronato, atorvastatina, ipriflavona.

## ABSTRACT

*Effects of alendronate, atorvastatin and ipriflavone on dexamethasone-induced osteoporosis*

The prevalence of osteoporosis has been rising so fast that it is considered a serious public health problem around the world. The World Health Organization estimates that 200 million women and men suffer from osteoporosis worldwide. This disease is characterized by a decrease in bone mass, with a consequent increase in the risk of fracture. There is therefore a continual search for preventive methods and effective treatments. A comparative study was made of the effects of the bisphosphonate, sodium alendronate, the statin, atorvastatin calcium and the flavonoid, ipriflavone, on female rats with osteoporosis induced by the glucocorticoid, dexamethasone. The effects of these drugs were evaluated by assaying the biochemical markers, serum calcium and phosphorus and bone alkaline phosphatase, and by histomorphometric examination. The results of the biochemical assays were not significant and did not provide a basis for the diagnosis and monitoring of the osteoporosis. However, histomorphometric evaluation allowed both static and dynamic analysis to be performed and led to detection of tissue alterations in the bone metabolic unit, particularly in trabecular bone. All the tested treatments produced significant improvements in trabecular bone density. Bisphosphonate gave the best results, with trabecular bone densities reaching levels similar to those of healthy animals. In addition, histomorphometry was validated as a means of detecting osteoporosis, providing a model for the study of drugs used to treat this bone-metabolism disturbance.

*Keywords:* Osteoporosis, dexamethasone, alendronate, atorvastatin, ipriflavone.

\*Autor correspondente: Aloísio da Silva Pinto - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E: mail: aloísio@ufv.br, Fone: (31) 3899-2317.

## INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada por diminuição da quantidade de osso mineralizado, com alteração da microarquitetura óssea, induzindo aumento da fragilidade e maior risco de fraturas (Mundy, 2001a).

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 da secreção do hormônio do crescimento (GH), do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e esteróides gonadais (Lanna et al., 2003).

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. Enquanto o efeito sobre a atividade osteoblástica parece ser direto (Dietrich et al., 1979), seus efeitos sobre a atividade osteoclástica são resultantes da diminuição da absorção de cálcio intestinal, concomitantes com aumento da excreção urinária de cálcio, ambos como causas secundárias do hiperparatireoidismo (Hahn et al., 1979; Suzuki et al., 1983).

O estudo do tratamento da osteoporose ocasionada por terapia com glicocorticóides tem sido especialmente motivado, pois os mesmos, não raramente, são insubstituíveis para o tratamento médico de muitas e variadas enfermidades devido a seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (Polo, 2003).

Os agentes terapêuticos, 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, pode-se citar os bifosfonatos, que atuam ligando-se aos cristais de hidroxiapatita e acumulando-se no tecido ósseo (Jung et al., 1973; Fogelman et al., 1981). Podem, também, inibir diretamente múltiplas etapas na via do mevalonato para colesterol e lípidos isoprenóides, tais como geranyl difosfato, que são requeridos para a prenilação de várias proteínas que são importantes para a função do osteoclasto (Luckman et al., 1998). Além disso, 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

(Luckman et al., 1998). A apoptose dos osteoclastos estaria envolvida em trocas morfológicas, perda da membrana mitocôndrica e a ativação de proteases caspase-3, capazes de clivar substratos peptídicos (Benford et al., 2001).

Já entre os agentes formadores de osso, podemos citar as estatinas, atuando 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 (Mundy, 2001b).

Ainda, foi verificado que flavonóides previnem a perda de massa óssea em pacientes osteoporóticos e provoca “decréscimo do turnover” ósseo provocado por hipogonadismo (Gambacciani, 1994). Efeitos favoráveis à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos foi demonstrado por Katai et al. (1992) e Cheng et al. (1994), e inibição da reabsorção óssea também foi observado (Notoya et al., 1993; Albanese et al., 1994). O mecanismo envolvido na ação modulatória em células do tecido ósseo parece ter atividade antirreabsortiva (Azria et al., 1993; Passeri et al., 1995).

Ademais, foi mostrado que o flavonóide induziu aumento de 4,4% de massa óssea após tratamento de 12 meses em mulheres osteoporóticas e foi efetivo na prevenção da perda óssea (Cecchetti et al., 1995).

Tendo em vista o conhecimento do uso desses fármacos na osteoporose, o presente trabalho teve como finalidade estudar, comparativamente, o efeito do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona em ratas com osteoporose induzida com glicocorticóide, por meio da avaliação das concentrações séricas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina óssea e da análise microscópica da densidade trabecular óssea.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Fármacos:** O experimento consistiu de um ensaio biológico onde se verificaram os efeitos dos fármacos Alendronato Monossódico Trihidratado em solução oral a 0,2mg/ml (Galena), Atorvastatina C cálcica em suspensão oral a 1mg/ml (Citalor®-Pfizer) e Ipriflavona em suspensão oral a 25mg/0,3 ml (Galena).

**Animais:** No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas 120 ratas da raça Wistar, adultas, pesando aproximadamente  $250 \pm 20$ g, procedentes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Após a chegada ao Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV – MG, os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo cada uma seis animais, em um ambiente climatizado, com ciclo de claro-escuro de 12 horas, recebendo água e ração comercial (Labcil®), *ad libitum*.

**Procedimento:** Nestas condições, após período de adaptação de sete dias, teve início o processo de indução da osteoporose, que consistiu na administração do glicocorticóide dexametasona (Aziium Solução®-Schering-Plough S/A), por via intramuscular, na dose de 7 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas, nos animais de todos os grupos, à exceção dos animais que constituíram o grupo controle, denominado G1, que

receberam solução de NaCl à 0,9%, via intramuscular.

Após o período de indução, os animais foram distribuídos, de forma aleatória, em cinco grupos de vinte e quatro, sendo: grupo controle (G1), composto dos que não foram submetidos à aplicação do corticosteróide dexametasona; grupo 2 (G2), que receberam apenas dexametasona; grupo 3 (G3), que receberam a dexametasona e iniciaram o tratamento diário com alendronato de sódio na dose de 0,2mg/kg (dose de 10mg preconizada para humanos); grupo 4 (G4), que receberam a dexametasona e iniciaram o tratamento diário com atorvastatina cálcica na dose de 1,2mg/kg (dose de 80mg preconizada para humanos) e grupo 5 (G5), com animais que receberam a dexametasona e tratamento diário com ipriflavona na dose de 100mg/kg, dose esta utilizada em ratas intactas ou ovariectomizadas (Yamazaki, 1986; Arjmandi et al., 2000). Todas as substâncias foram administradas por via oral.

À partir da data de início do tratamento, aos 7, 14, 21 e 28 dias, seis animais de cada grupo foram anestesiados por administração, via intramuscular, de 0,1 ml da solução anestésica de cloridrato de tiletamina (25mg/mL) e cloridrato de zolazepam (25mg/mL) (Zoletil 50®-Virbac). **Métodos Bioquímicos:** Foram coletados, então, de cada animal, 5ml de amostra de sangue, por punção na veia cava caudal, com o objetivo de dosar as concentrações séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea. Para a realização das dosagens de cálcio e fósforo, foi utilizado o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica Alizé, bem como “kits” da marca BioMerieux. Já para a dosagem da fosfatase alcalina óssea (FAO), utilizou-se o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter, assim como “kits” Ostase, específico para dosagem desta enzima, também da mesma indústria.

**Método Histológico:** Logo após o sacrifício dos animais, procedeu-se a dissecação do fêmur direito de cada animal, que foi coletado, tomando-se o cuidado de se manter a região epifisária, colocado em formol tamponado à 10%, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, descalcificado em solução de ácido fórmico/citrato de sódio, incluído em parafina e processado rotineiramente para estudo histológico em microscopia de luz.

Foram obtidos três cortes, de cada fêmur, de quatro micrômetros (4 mm) de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Estes cortes foram obtidos de forma seriada, montados sobre lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV.

Para cálculo da densidade ocupada por osso trabecular, foi obtida uma imagem amostral de osso trabecular, contida na região subcondral, de cada corte histológico, 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 grátula 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. Realizaram-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. **Análise Estatística:** O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com 5 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 e G5) 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.

## RESULTADOS

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 1, não houve diferença significativa entre os grupos controle (G1) e o grupo osteoporótico (G2), quanto aos valores médios de cálcio sérico, expressos em mg/dL, em todos os períodos avaliados e também entre eles e os grupos tratados (G3, G4 e G5), respectivamente. Em relação aos tratamentos efetuados, observa-se, também, que não ocorreu, *per si*, diferença significativa dos valores nos diversos períodos testados.

Na Tabela 2, são apresentados os resultados de fósforo sérico, expressos em mg/dL, onde se observa que os tratamentos não modificaram os valores médios de

maneira significativa em relação aos grupos controles (G1) e (G2) e também entre si.

Os valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO), mostrados na Tabela 3, não apresentaram variações significativas entre os grupos controle (G1) e osteoporótico (G2) e também entre os grupos tratados entre si e entre os tratados e os grupos G1 e G2, respectivamente.

A Tabela 4 apresenta a quantificação dos resultados histológicos, que nos permite determinar a osteoporose através da visualização da morfologia trabecular óssea, assim como da extensão da perda óssea e das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo (Abe et al., 1999).

A Figura 1 apresenta cortes histológicos da região do terço proximal do fêmur direito dos animais, onde se observa diminuição trabecular óssea, identificada principalmente pela menor espessura das trabéculas ósseas no grupo osteoporótico (Figura 1B) e, em contraste, uma maior área de medula óssea neste grupo, em relação ao grupo controle (Figura 1A). Quanto aos grupos tratados, foi observado que aos 14 dias (Figura 1C), no grupo que recebeu alendronato de sódio, a espessura das trabéculas ósseas foi significativamente maior, ainda sendo permitido a observação de espaços intertrabeculares, preenchidos pela medula óssea. Aos 28 dias de tratamento (Figura 1D), observou-se que a densidade trabecular óssea foi maior que aos 14 dias, em contraste com menores espaços intertrabeculares, preenchidos por medula óssea, cuja evolução tornou-se semelhante àquela observada nos animais do grupo controle (Figuras 1D e 1A), ratificada pelos valores médios de densidade trabecular óssea indicados na Tabela 4.

Tabela 1 - Valores médios de cálcio sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Cálcio mg/dL	DP	Varição % em relação G1	Varição % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	13,65 A	± 0,42	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	13,80 A	± 0,65	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	14,08 a	± 0,44	3,17	2,05
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	13,47 a	+ 1,30	-1,34	-2,42
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	13,45 a	± 0,55	-1,47	-2,54
14 Dias	G1 Controle	13,37 A	± 0,37	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	13,05 A	± 0,19	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	12,98 a	± 0,57	-2,87	-0,51
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	13,30 a	+ 0,54	-0,50	1,92
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	13,18 a	+ 0,35	-1,37	1,02
21 Dias	G1 Controle	13,00 A	± 0,42	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	13,22 A	± 0,82	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	12,93 a	± 0,67	-0,51	-2,14
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	13,05 a	+ 0,58	0,38	-1,26
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	13,39 a	+ 0,29	3,00	1,31
28 Dias	G1 Controle	13,65 A	+ 0,44	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	13,60 A	± 0,43	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	13,27 a	± 0,67	-2,78	-2,45
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	13,70 a	± 0,61	0,36	0,73
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	13,68 a	+ 0,54	0,22	0,58

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ).

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Atorvastatina e ipriflavona na osteoporose

Tabela 2 - Valores médios de fósforo sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Fósforo mg/dL	DP	Variação % em relação G1	Variação % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	7,93 A	± 0,748	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	8,12 A	+ 0,461	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	8,30 a	± 0,784	4,64	2,22
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,84 a	+ 0,583	-1,13	-3,43
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,92 a	+ 0,359	-0,13	-2,46
14 Dias	G1 Controle	7,22 A	+ 0,606	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,58 A	+ 0,272	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,31 a	± 0,853	1,25	-3,63
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,20 a	+ 0,738	-0,18	-4,99
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,37 a	± 0,815	2,08	-2,84
21 Dias	G1 Controle	7,49 A	± 0,481	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,69 A	± 0,682	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,57 a	± 0,795	1,07	-1,56
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,78 a	± 1,015	3,87	-1,17
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,57 a	± 0,666	1,06	-1,56
28 Dias	G1 Controle	7,70 A	± 0,582	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,37 A	+ 0,645	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,57 a	± 0,596	-1,69	2,71
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,49 a	+ 0,563	-2,73	1,63
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,41 a	+ 0,54	-3,77	0,54

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

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tabela 3 - Valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO) em pg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	FAO pg/dL	DP	Variação % em relação G1	Variação % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	0,042 A	+ 0,018	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,053 A	± 0,026	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	0,039 a	+ 0,011	-5,40	-26,18
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	0,056 a	± 0,03	34,41	4,89
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	0,064 a	+ 0,039	52,70	19,16
14 Dias	G1 Controle	0,041 A	± 0,018	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,040 A	± 0,02	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	0,036 a	± 0,016	-12,76	-11,12
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	0,043 a	± 0,016	4,90	6,87
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	0,047 a	+ 0,031	16,13	18,31
21 Dias	G1 Controle	0,050 A	± 0,022	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,059 A	+ 0,024	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	0,058 a	± 0,016	15,39	-1,57
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	0,043 a	+ 0,025	-15,49	-27,91
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	0,041 a	± 0,023	-18,66	-30,61
28 Dias	G1 Controle	0,065 A	+ 0,02	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,060 A	± 0,019	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	0,061 a	± 0,027	-5,55	1,78
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	0,060 a	+ 0,024	-7,99	-0,85
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	0,050 a	± 0,025	-23,02	-17,04

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

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

Tabela 4 - Valores médios de densidade trabecular óssea em pontos percentuais e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Dens %	DP	Varição % em relação G1	Varição % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	60,00 A ±	2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	43,78 B +	0,509	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	45,78 a +	3,595	-23,70*	4,57
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	40,89 a +	1,388	-31,85*	-6,60
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	41,00 a ±	3,283	-31,67*	-6,35
14 Dias	G1 Controle	59,80 A ±	2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	40,78 B +	1,895	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	54,11 a ±	4,018	-9,51*	32,70**
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	45,56 b ±	1,018	-23,81*	11,72**
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	43,78 b ±	1,711	-26,79*	7,36
21 Dias	G1 Controle	61,02 A +	2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	37,00 B +	1,155	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	60,67 a ±	4,041	-0,57	63,96**
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	51,00 b ±	4,163	-16,42*	37,84**
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	51,00 b ±	1,528	-16,42*	37,84**
28 Dias	G1 Controle	61,58 A +	2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	41,56 B ±	2,269	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	64,56 a ±	3,289	4,84	55,35**
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	55,44 b ±	2,835	-9,97*	33,42**
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	49,56 b +	1,072	-19,52*	19,25**

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

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnet (P<0,05) em cada período.

\*\*Estatisticamente diferente do grupo G2 pelo teste de Dunnet (P<0,05) em cada período.

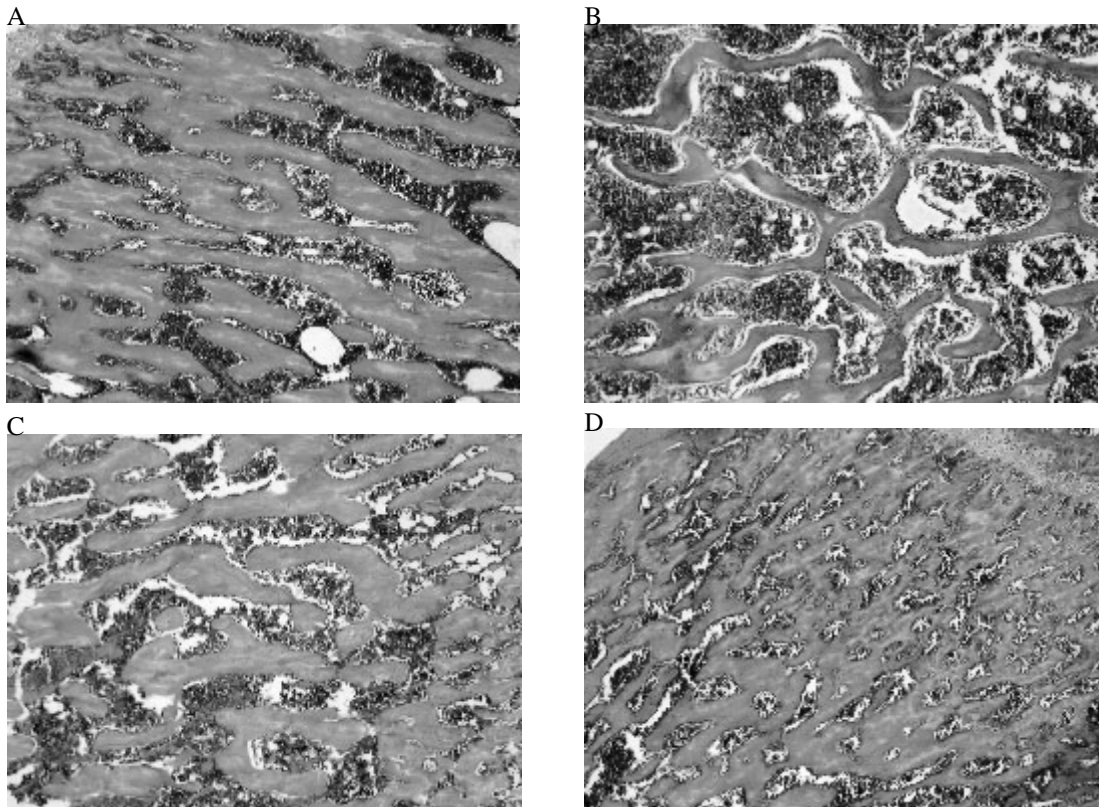


FIGURA 1 – Osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de fêmur de ratas. HE. 100X. **A**, Grupo Controle (G1). **B**, Grupo Osteoporótico (G2), (Glicocorticóide). **C**, Grupo Tratado 14 Dias (G3), (Glicocorticóide + Alendronato). **D**, Grupo Tratado 28 Dias (G3), (Glicocorticóide + Alendronato).

## DISCUSSÃO

Na tentativa de desenvolver um modelo experimental, Santos (2004) conseguiu induzir osteoporose com a administração de dexametasona, uma vez por semana, durante 4 semanas, em ratos, machos intactos e castrados e fêmeas intactas e ovariectomizadas, da raça Wistar, com a mesma dose empregada neste trabalho. Como prevenção e garantia da efetiva indução da osteoporose e prosseguimento do protocolo experimental, a aplicação do glicocorticóide, no presente estudo, se estendeu por mais uma semana.

Sabe-se que o cálcio é o principal cátion divalente encontrado no tecido ósseo, principalmente na forma de cristais de hidroxiapatita, sendo estes cristais um dos responsáveis pela resistência e dureza do tecido ósseo. O tratamento com glicocorticóide, nas condições experimentais deste trabalho, levaria a um estado característico de osteoporose, quando se observa fragilidade da microarquitetura óssea, (Hahn et al., 1979; Suzuki et al., 1983; Mundy, 2001a). Neste caso, poder-se-ia esperar uma diminuição dos níveis totais do íon cálcio no tecido ósseo. Portanto, pode-se explicar os níveis não significativos deste cátion na corrente sanguínea, devido, possivelmente, ao elevado metabolismo e controle homeostático bastante rigoroso do sistema endócrino nestes animais, que afeta sua absorção pelo intestino e sua excreção pelo rim e que regula o grande reservatório esquelético de onde o elemento é retirado nos momentos de necessidade (Borelli, 1998; Kim et al., 2003).

Como a osteoporose se caracteriza por uma redução da massa óssea, particularmente a osteoporose secundária, devendo ocorrer reabsorção numa velocidade que ultrapassa a da formação óssea, tanto o cálcio como o fósforo é perdido, possivelmente com desenvolvimento de hipercalcúria e hiperfosfatúria, devido à menor taxa de reabsorção renal destes íons. Assim, se explicaria os níveis de fósforo não diferenciados entre os diversos tratamentos, considerando a velocidade da regulação homeostática destes animais (Deyhim et al., 2003). Ainda, ressalve-se que, em humanos, os níveis séricos de cálcio e fósforo são, geralmente, esperados normais na osteoporose, sem qualquer alteração da relação entre mineral e matriz (Borelli, 1998).

A fosfatase alcalina óssea é o marcador de formação óssea mais freqüentemente utilizado (Bikle, 1997; Vieira, 1999). A FAO é uma isoforma da fosfatase alcalina total (FA), que apesar da semelhança estrutural com essa, pode ser detectada através de imunoensaios específicos, apresentando baixa reação cruzada. A medida da isoforma óssea-específica tem vantagens sobre a FA, uma vez que além de não sofrer influências hepáticas, é mais sensível a pequenas variações do *pool* circulante (Saraiva & Lazzaretti-Castro, 2002).

Além da não significância, os valores médios de FAO, em todos os grupos, no presente estudo, estiveram abaixo da curva de calibração, sugerindo que ocorreu reação de identidade parcial entre antígeno e anticorpo (Holme & Peck, 1998). Devido a alta sensibilidade analítica do kit utilizado para dosagens de humanos, por não existir no mercado similar para a espécie analisada, foi suposto que

os valores obtidos estariam dentro da faixa de dosagem do especificado pelo fabricante. Mas como as dosagens foram realizadas e as avaliações destes valores foram posteriores, manteve-se os resultados, tendo em vista a aplicabilidade deste parâmetro na avaliação de "turnover ósseo". Apesar da não significância, obtida neste ensaio, Kim et al. (2003) encontrou diferenças significativas de valores médios de FAO entre ratas normais, osteoporóticas e osteoporóticas tratadas.

Em relação aos valores médios de densidade trabecular óssea, expressos em pontos percentuais, mostrados na Tabela 4, verificou-se que o grupo controle (G1) diferencia significativamente do grupo osteoporótico (G2) em todos os períodos, ficando caracterizado, por estes resultados, que o tratamento com o glicocorticóide dexametasona, nas condições deste experimento, foi capaz de induzir o distúrbio ósteo-metabólico, denominado osteoporose, nos animais. Observa-se que, no período de 7 dias, os resultados dos grupos dos animais tratados, apresentaram diminuição da variação percentual significativas em relação ao grupo controle (G1), sem mudança, no entanto, de variação significativa em relação ao grupo osteoporótico (G2), o que denota que os animais sofreram, de fato, indução osteoporótica e que, os diversos tratamentos, ainda não tinham afetado o seu metabolismo ósseo.

Aos 14 dias de tratamento, se observou variação percentual de densidade trabecular óssea significativa em relação ao grupo osteoporótico (G2), o grupo G3, tratado com alendronato de sódio e o grupo G4, tratado com atorvastatina cálcica. Embora o grupo G5, tratado com ipriflavona, não tenha alcançado valores percentuais significativos, mostrou tendência de aumento.

Quando se observaram os resultados do período de 21 dias, verificou-se que todos os tratamentos já causaram mudanças do metabolismo ósseo dos animais de maneira significativa, quando comparado com o grupo osteoporótico G2, demonstrando a eficácia dos fármacos. Ressalte-se que, em relação ao grupo controle G1, não mais ocorreu diferença com o grupo G3, tratado com alendronato de sódio, demonstrando, assim, a potência deste fármaco e sua capacidade de restaurar as trabéculas ósseas.

Ademais, os resultados obtidos no período de 28 dias, corroboram aqueles alcançados no período anterior, em que o alendronato de sódio consegue ser o mais efetivo, seguido do tratamento efetuado com a atorvastatina cálcica. Embora o tratamento com ipriflavona tenha apresentado o menor efeito, vê-se que o mesmo apresentou resultado positivamente significativo em relação ao grupo osteoporótico G2.

Os marcadores bioquímicos utilizados não permitiram o diagnóstico da osteoporose, bem como a avaliação das alterações de remodelação óssea.

A histomorfometria, ao contrário, permitiu análise estática e dinâmica, bem como detecção de alterações teciduais na unidade metabólica óssea, particularmente, no osso trabecular. Através da análise da densidade trabecular óssea, foi possível constatar a eficácia da indução da osteoporose pelo glicocorticóide, bem como acompanhar o processo de restauração tecidual óssea provocado pelos

fármacos.

As substâncias alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona apresentaram efeitos significativos nos animais osteoporóticos, ratificando, portanto, a sua aplicabilidade na prevenção durante tratamento com glicocorticóide ou no tratamento da osteoporose estabelecida. Devemos destacar, no entanto, a maior eficácia do bifosfonato alendronato de sódio, que apresentou restauração do tecido trabecular ósseo dos animais osteoporóticos, comparável aos dos animais intactos.

Ademais, demonstrou-se que os parâmetros bioquímicos testados não foram úteis para fins diagnósticos, mas a histomorfometria se mostrou válida na detecção da osteoporose, podendo servir de modelo para o estudo de novas drogas sobre este distúrbio ósteo-metabólico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe T, Sato K, Miyakoshi N, Kudo T, Tamura Y, Tsuchida T, Kasukawa Y. Trabecular remodeling processes in the ovariectomized rat: modified node-strut analysis. *Bone* 1999; 24(6):591-596.
- Albanese CB, Cudd A, Argentino L, Zamboni-Zallone A, Macintyre I. Ipriflavone directly inhibits osteoclast activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:930-936.
- Arjmandi BH, Birnbaum RS, Juma S, Barengolts E, Kukreja SC. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevents bone loss by different mechanisms. *Calcif Tissue Int* 2000; 66:61-65.
- Azria M, Behhar C, Cooper S, Lac K. Effect of ipriflavone on osteoclast motility and resorption in vitro and in vivo studies. *Calcif Tissue Int* 1993; 52:16-20.
- Benford HL, McGowan NWA, Helfrich MH, Nutall ME, Roger MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3-activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone* 2001; 28(5):465-473.
- Bikle DD. Biochemical markers in the assessment of bone disease. *Am J Med* 1997; 103:427-436.
- Borelli A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: Carvalho Filho ET, Papaléo Neto M. *Geriatría: Fundamentos, Clínica e Terapêutica*. 2ª. ed. São Paulo: Atheneu; 1998. p.297-307.
- Brandli DW, Golde G, Greenwald M, Silverman ST. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a cross-sectional study. *Steroids* 1991; 56:518-523.
- Cecchetti M, Bellometti S, Cremonesi G, Solimeno LP, Torri G. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. *Biomed & Pharmacother* 1995; 49:465-468.
- Cheng SL, Zhang SF, Nelson TL, Warlow PM, Civitelli R. Stimulatory of human osteoblasts differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. *Calcif Tissue Int* 1994; 55:356-362.
- Deyhim F, Stoecker BJ, Bruswitz GH, Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutr Res* 2003; 23:123-130.
- Dietrich JW, Canalis EM, Maina DM, Raisz LG. Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology* 1979; 104:715-721.
- Fogelman I, Pearson DW, Bessent RG, Tofe AJ, Francis MD. A comparison of skeletal uptake of three diphosphonates by whole body retention. *J Nucl Med* 1981; 22:880-883.
- Gambacciani M, Spinetti A, Piaggese L, Cappagli B, Taponco F, Manetti P, Weiss C, Tetei GC, La Commare P, Facchini V. Ipriflavone prevents the bone loss mass reduction in premenopausal women treated with gonadotropin hormone-releasing hormone agonists. *Bone Miner* 1994; 26:19-26.
- Hahn TJ, Halstead LR, Teitelbaum SL, Hahn BH. Altered mineral metabolism in glucocorticoid induced osteopenia. Effect of 25 hydroxyvitamin D administration. *J Clin Invest* 1979; 64:655-665.
- Holme DJ, Peck H. *Analytical Biochemistry*. Singapore: Longman Singapore Publishers; 1998. 488p.
- Jung A, Bisaz S, Fleisch H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates on hydroxyapatite crystals. *Calcif Tissue Res* 1973; 11:269-280.
- Katai Y, Kawase T, Nakano T, Mikuni-Tabagaki Y, Saito S. Effects of ipriflavone and estrogen on the differentiation and proliferation of osteogenic cells. *Calcif Tissue Int* 1992; 51:11-15.
- Kim S, Lee M, Rhee M. Studies on the Effects of Biomedical Agents on Serum Concentration of Ca<sup>2+</sup>, P and ALP Activity in Osteoporosis-Induced Rats. *J Vet Sci* 2003; 4(2):151-154.
- Lanna CMM, Montenegro RM, Paula FJA. Fisiopatologia da Osteoporose Induzida por Glicocorticóide. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; 47(1):9-18.
- Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13:581-589.
- Mundy GR. Osteoporosis: pathophysiology and non-pharmacological management. *Best Pract & Res Clin Rheumatol* 2001a; 15(5):720-745.
- Mundy GR. Statins and their potential for osteoporosis. *Bone* 2001b; 29(6):495-497.
- Notoya K, Yoshida K, Taketomi S, Yamazaki I, Kumegawa M. Inhibitory effects of ipriflavone on osteoclast-mediated bone resorption and new osteoclast-mediated formation in long-term cultures of mouse unfractionated bone cells. *Calcif Tissue Int* 1993; 53:206-209.
- Passeri M, Biondi D, Dall'aglio E, Pedrazoni M, Bufalino L, Castiglione GN, Di Peppe C, Abate G. Effects of 2-year therapy with ipriflavone in elderly women with established osteoporosis. *Ital J Min Electrolyte Metab* 1995; 9:137-144.

- Polo RG. Osteoporosis inducida por glicocorticóides. *An Sist Sanit Navar* 2003; 3:63-80.
- Santos PS. *Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose* [Dissertação] Mestrado em Medicina Veterinária, Viçosa: Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, 50p, 2004.
- Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002; 46(1):72-78.
- Suzuki Y, Ichikawa Y, Saito E, Homma M. Importance of increased urinary calcium excretion in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. *Metabolism* 1983; 32:151-156.
- Vieira JG. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 1999; 43:415-422.
- Yamazaki I. Effect of ipriflavone on the response of uterus and thyroid to estrogen. *Life Sci* 1986; 38:757-764.