

Efeitos do risedronato na reparação óssea de ratos machos e fêmeas com osteopenia ***Effects of risedronate in bone repair of male and female rats with osteopenia***

Carolina Ricomini PIAI

Cirurgiã-dentista – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Valéria Abrantes Pinheiro CARVALHO

Professor Assistente – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

Cristina WERKMAN

Mestranda – Programa de Pós-Graduação – Área de Concentração em Biopatologia Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

Ana Lia ANBINDER

Professor Assistente – Departamento de Odontologia – Universidade de Taubaté - UNITAU

Rosilene Fernandes da ROCHA

Professor – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar histomorfológica e morfometricamente a ação do risedronato na reparação óssea de ratos com osteopenia. Utilizaram-se trinta ratos machos e trinta fêmeas castrados e após um mês deste procedimento, confeccionou-se um defeito ósseo de 3mm de diâmetro nas tíbias direitas dos animais. Estes foram divididos em quatro grupos: I (machos controle); II (machos tratados); III (fêmeas controle); IV (fêmeas tratadas). Administrou-se nos grupos II e IV, após execução do defeito, 0,1mg/Kg/dia de risedronato na água de beber, durante cinco dias e nos grupos I e III, somente água. O sacrifício dos animais ocorreu sete, 14 ou 28 dias após a realização do defeito. Os cortes histológicos foram analisados qualitativa e quantitativamente. Os dados obtidos na histomorfometria foram submetidos à análise estatística (ANOVA e Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) que revelou um maior preenchimento ósseo nos ratos machos, sobretudo aos sete e 28 dias, independente da utilização do medicamento. Evidenciou-se, ainda, maior grau de maturação do osso neoformado nos ratos machos. Concluiu-se que o tratamento com risedronato mostrou-se ineficaz na reparação óssea e que a diminuição hormonal causou maior prejuízo ao processo de neoformação óssea em fêmeas quando comparado aos efeitos da deficiência hormonal em machos.

UNITERMOS

Osteoporose; regeneração óssea; risedronato; osteopatias metabólicas; ratos

INTRODUÇÃO

A população brasileira acima dos 65 anos é a que mais cresce e tende a elevar-se nas próximas décadas, ao contrário do que ocorre com outros grupos etários. Sendo assim, medidas de prevenção contra os males do envelhecimento, bem como estudo de novos tratamentos que proporcionem melhor qualidade de vida ao

idoso, representam uma preocupação atual, sobretudo por parte dos profissionais da saúde.

A perda de massa muscular, o enfraquecimento do sistema imunológico, doenças crônicas como hipertensão, artrite, diabetes e problemas vasculares são importantes indicadores do declínio metabólico no processo do envelhecimento. De acordo com Harrison⁸ (1996) e Castro & Uyeno⁴ (2000), a osteoporose é a

mais comum das doenças ósseas metabólicas e causa importante de morbidade do idoso, caracterizando-se por baixa massa óssea e deterioração da microarquitura do esqueleto, levando à acentuada fragilidade deste tecido e conseqüente aumento do risco de fraturas. Durante muitos anos, a preocupação com a osteoporose foi direcionada principalmente para a população do sexo feminino.

Segundo López⁹ (2000), Delmas⁵ (2000), Sahni et al.¹⁴ (1993) e Mönkkönen et al.¹¹ (1990), inúmeras substâncias como cálcio, calcitonina, isoflavonas, raloxifeno e bisfosfonatos têm sido ministradas na tentativa de se estabelecer uma conduta terapêutica eficaz na inibição da atividade reabsortiva óssea com o mínimo de efeitos adversos para o paciente. Dentre as substâncias citadas, as maiores reduções dos riscos de fraturas têm sido reportadas ao uso dos bisfosfonatos, segundo Sagraes¹³ (2003). Sendo assim, o impacto positivo da terapia hormonal pós-menopausa na prevenção e controle da osteoporose feminina, bem como os numerosos estudos objetivando o aprimoramento desta terapia, delegaram a um segundo plano a importância desta doença no sexo masculino. Somente nos últimos anos é que vem se observando maior preocupação a este respeito, refletindo a importância que a osteoporose relacionada à andropausa vem adquirindo em termos de saúde pública, segundo Anderson¹ (1998).

Dentro deste contexto, estudos farmacológicos sugerem que os bisfosfonatos, cuja ação mostra-se eficaz em mulheres, poderiam ter efeitos similares no tratamento da osteoporose masculina. Dentre os fármacos desta classe, o risedronato sódico, que é um piridinil bisfosfonato desenvolvido para o tratamento e prevenção da osteoporose pós-menopausa ou aquela induzida pelo uso crônico de corticosteróides, tem apresentado, em estudos como os de Mortensen et al.¹² (1995) e de Watts et al.²¹ (2004), maior potência de ação, melhor tolerância em sua administração por via oral e menores efeitos colaterais quando comparado a outras substâncias da mesma classe. Além disso, este medicamento apresenta alta afinidade pelo tecido ósseo e alta potência de anti-reabsorção, de acordo com Sietsema et al.¹⁷ (1989).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados trinta ratos machos e trinta fêmeas com sessenta dias de idade e peso aproximado de 250g, manipulados de acordo com os Princípios

Éticos para a Experimentação Animal e alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP.

Os animais foram divididos em quatro grupos, sendo I: machos controle; II: machos tratados; III: fêmeas controle; IV: fêmeas tratadas. Cada um dos grupos foi subdividido em três, de acordo com os períodos de observação (7, 14 e 28 dias).

Inicialmente, todos os animais foram castrados sob efeito de anestesia via intramuscular promovida pelo uso da associação de Rompun- Bayer do Brasil (cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina), com Francotar- Virbac do Brasil (cetamina-base), na proporção de 1:0,5ml respectivamente e na dose de 0,1ml/100gr.

Após trinta dias, confeccionou-se defeito ósseo monocortical na tíbia direita de cada animal com o uso de broca trefina de 3,0mm de diâmetro. Para este procedimento, os ratos foram anestesiados utilizando a mesma metodologia anterior. Depois da realização do defeito cirúrgico, aos animais dos grupos II e IV foi administrado por via oral, 0,1mg/kg/dia de risedronato adicionados à água de beber, durante cinco dias e aos grupos I e III, apenas água.

Todos os ratos foram sacrificados por superdosagem anestésica após sete, 14 ou 28 dias da realização da lesão óssea, sendo a tíbia removida e fixada em formol a 10%.

As peças ósseas foram descalcificadas em solução de EDTA a 4,13%, processadas segundo técnica de rotina para coloração com hematoxilina-eosina (H.E.) e os cortes analisados histológica e morfometricamente à microscopia de luz. A análise da quantidade de matriz óssea neoformada foi realizada por planimetria por contagem de pontos. Para a contagem, utilizou-se um sistema teste-padrão quadrangular composto por um retículo de 81 pontos resultantes das intersecções entre linhas verticais e horizontais, o qual foi superposto à imagem histológica observada em aumento original de 200x. A quantidade de tecido ósseo neoformado, em porcentagem de área, foi obtida pela razão entre número de pontos incidentes sobre a matriz óssea e número total de pontos do retículo aplicado.

Os dados obtidos na análise histomorfométrica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, em seguida, Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), segundo Vieira¹⁹ (1999).

RESULTADOS

Análise Histológica

No período de sete dias, nos ratos machos dos grupos I e II (Figuras 1A e 1B) observou-se que o defeito ósseo foi completamente preenchido por trabéculas ósseas imaturas com grandes espaços medulares. Além disso, as mesmas mostraram-se distribuídas uniformemente na região de reparação óssea. Nas fêmeas, neste mesmo período de observação (Figuras 2A e 2B), a região do defeito foi quase totalmente preenchida por tecido conjuntivo fibroso, com escassas trabéculas na região periférica e profunda do defeito.

Aos 14 dias de observação nos ratos machos (Figuras 1C e 1D), verificou-se a presença de trabéculas ósseas volumosas e imaturas, distribuídas por toda a extensão do defeito ósseo, tanto no grupo controle quanto no tratado. Nas fêmeas dos grupos III e IV (Figuras 2C e 2D), constatou-se, no período em questão, o preenchimento da loja óssea por trabéculas celularizadas e mais numerosas na porção superficial.

No período de 28 dias, houve preenchimento de toda a extensão superficial e profunda do defeito, por tecido ósseo maduro, nos ratos machos (Figura 1E e 1F). Nas fêmeas dos grupos III e IV, a região do defeito foi totalmente preenchida por tecido ósseo apenas na porção superficial, onde este tecido mostrou-se bem organizado e com espessura significativa (Figura 2E e 2F).

Os aspectos histológicos, referentes aos períodos acima relacionados, não apresentaram alterações teciduais relevantes frente à utilização do risedronato, tanto em ratos machos como em fêmeas.

Análise Histomorfométrica

Os resultados estatísticos mostraram que houve maior preenchimento ósseo nos ratos machos, estatisticamente significante aos sete e 28 dias, independente da utilização do medicamento. Evidenciou-se, também, maior grau de maturação do osso neoformado nos ratos machos quando comparados às fêmeas (Figura 3).

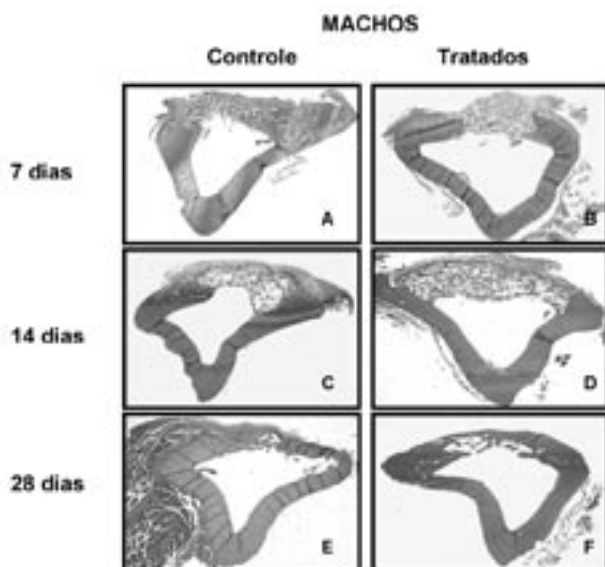


FIGURA 1- Cortes transversais das tíbias de ratos machos. Aumento original 25x- HE.

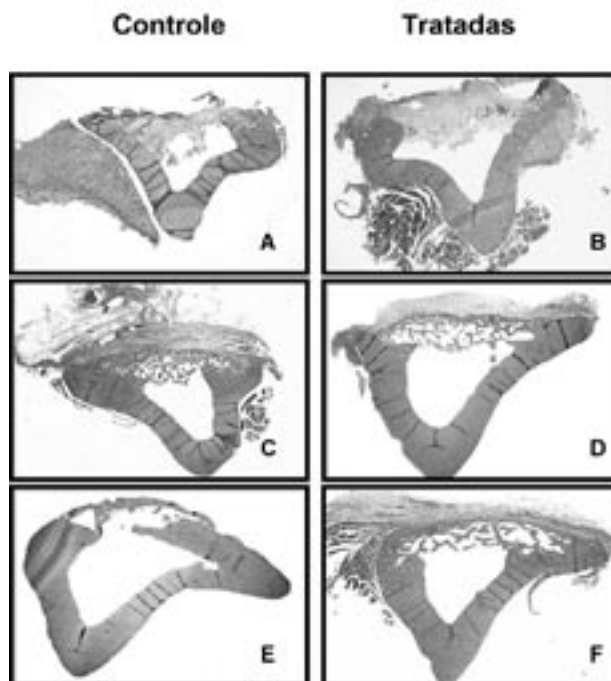


FIGURA 2- Cortes transversais das tíbias de ratos fêmeas. Aumento original 25x- HE.

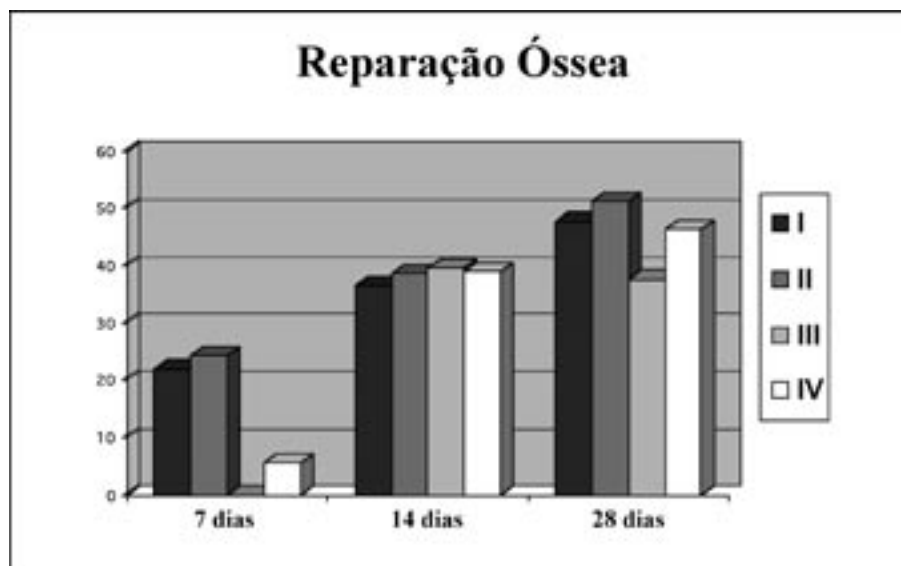


FIGURA 3 - Gráfico das médias de área óssea (%) nos períodos analisados.

DISCUSSÃO

A osteoporose é uma doença que provoca sérios danos como fraturas, perda de densidade óssea principalmente em mulheres após a menopausa, caracterizando-se como um problema de saúde pública. Ocorre, também, no sexo masculino, porém tem sido pouco estudada.

Atualmente, existem várias substâncias disponíveis no mercado para o tratamento da osteoporose, como calcitonina, isoflavonas, raloxifeno e bisfosfonatos, porém em sua grande maioria, apresentam efeitos colaterais indesejáveis. Os bisfosfonatos constituem uma classe de medicamentos amplamente utilizados pelos profissionais da saúde no tratamento desta patologia. Entre os diversos tipos, o risedronato é um dos que apresenta menores efeitos colaterais, de acordo com Szejnfeld¹⁸ (2000).

No presente trabalho, estudou-se a reparação óssea em ratos machos e fêmeas com osteopenia, tratados com risedronato na dose de 0,1mg/kg/dia, durante cinco dias consecutivos. Verificou-se maior formação óssea nos animais machos castrados, corroborando os achados de Salgado¹⁵ (2002) que estudou ratos machos castrados ou não e tratados com o medicamento em questão durante um mês na dose de 0,1mg/ Kg/dia.

De acordo com Szejnfeld¹⁸ (2000), doses padronizadas e reduzidas, associadas ao período limitado de

administração do risedronato, podem ter sido causas da ineficácia do medicamento frente ao reparo, não estimulando o processo de neoformação almejado neste estudo.

Boyce et al.³ (1995) verificaram que a remodelação óssea trabecular de cães beagle fêmeas apresentou taxa de reabsorção diminuída para as doses de 0,5 e 2,5mg/kg/dia de risendronato, administradas durante dois meses. Watts et al.²⁰ (2003) concluíram que o tratamento de mulheres na pós-menopausa com 5mg/dia de risedronato durante um ano reduziu o risco de fraturas em 62%. McClung¹⁰ (1997), que estudou administração diária de risedronato durante dezoito meses, demonstrou um aumento significativo da densidade óssea tanto em mulheres na fase inicial da pós-menopausa quanto naquelas em estágio tardio deste processo.

É provável que o uso diário, crônico e intermitente de risedronato em doses mais elevadas que a utilizada neste estudo possa afetar consideravelmente o reparo ósseo de maneira mais efetiva que o uso de doses reduzidas por um curto período de tempo. Esta possibilidade também pode ser embasada pelos resultados de Silva¹⁶ (2000) que avaliou a ação do alendronato sódico na reparação em tíbias de ratas ovariectomizadas, tratadas com doses de 0,25, 0,5 e 0,75mg/Kg/dia e concluiu que os melhores resultados foram obtidos com a dosagem de 0,5mg/Kg, confirmando que a ação dos bisfosfonatos é dose-dependente.

De acordo com nossos resultados, o risedronato não estimulou a reparação óssea, vindo ao encontro dos achados de Fayad ⁶ (2001) que estudou outros bisfosfonatos (alendronato e clodronato) em ratos machos, não obtendo resultados efetivos no processo de reparação óssea. Fernandes ⁷ (2002) também demonstrou que a reparação óssea em mandíbulas de coelhos não foi estimulada sob a ação do alendronato sódico.

A análise estatística desta pesquisa mostrou uma crescente e uniforme porcentagem de área óssea no decorrer dos períodos analisados. Além disso, houve diferença significativa entre os sexos nos períodos de sete e 28 dias, sendo que os machos de ambos os grupos (controle e tratado) apresentaram maior taxa de neoformação óssea em relação às fêmeas. De acordo com esta análise, a presença do risedronato não influenciou a reparação óssea. Por outro lado, constatou-se que a redução de estrogênio prejudicou de forma significativa a reparação do tecido ósseo em fêmeas, quando comparada aos efeitos da queda dos níveis de testosterona, cuja diminuição não representou danos relevantes à neoformação óssea em machos, confirmando a importância da manutenção da taxa de estrogênio no sexo feminino na pós-menopausa.

Os achados acima mencionados concordam com as observações clínicas de Borelli ² (1998) e com Anderson ¹ (1998), que relacionam a existência de fatores de diversas origens interagindo na osteoporose senil mas-

culina, como fumo, uso abusivo de álcool, terapia com corticosteróides, sedentarismo, aliados à observação de que apenas um número reduzido de homens desenvolve osteoporose associada ao hipogonadismo.

Somente investigações futuras e mais abrangentes, permitirão avaliar diferentes tempos de administração e variações de dosagens do risedronato no decorrer do tratamento, fornecendo assim, maiores subsídios para a análise dos mecanismos de ação deste fármaco e dos fatores que influenciam no processo de reparação óssea em portadores de reduzida massa óssea de ambos os sexos.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições experimentais desta pesquisa, pôde-se concluir que:

- a) o risedronato não exerceu efeito estimulador sobre a reparação óssea;
- b) a análise histológica revelou que o grau de organização estrutural e a maturação do tecido ósseo nos ratos machos (controle e tratado) foi superior ao das fêmeas (controle e tratada);
- c) a redução de estrogênio causou maior prejuízo ao processo de neoformação óssea em fêmeas quando comparado aos efeitos do déficit de testosterona em machos.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate histological and histomorphometrically the effects of risedronate in the process of bone repair of rats with osteopenia. Thirty male and thirty female rats were castrated and, a surgical bone defect of 3mm in diameter was made on the right tibia one month after this procedure. The animals were divided into four groups: I (male control); II (male treated); III (female control); IV (female treated). The groups II and IV were treated with 0.1mg/Kg/day of risedronate in water for five days after bone surgery and the animals of groups I and III received only water. The animals were sacrificed 7, 14 or 28 days after surgery. The tibiae were analyzed histological and histomorphometrically. The results obtained were submitted to statistical analysis, ANOVA and Tukey Test ($p \leq 0.05$), that showed a higher level of bone repair of the male rats, mainly after 7 and 28 days, in both control and treated groups. The new bone tissue in male rats was more mature than in the female. It was concluded that the treatment with risedronate was not effective on bone repair and that the decline of hormonal rates affected the bone regeneration more in female than in male animals.

UNITERMS

Osteoporosis; bone regeneration; risedronate; bone diseases, metabolic; rats

AGRADECIMENTO

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

1. Anderson FH. Osteoporosis in men. *J Clin Prac* 1998; 52(3): 176-80.
2. Borelli A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: Carvalho Filho ET, Papaléo Netto M. *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica*. São Paulo: Atheneu; 1998; 22: 297-307.
3. Boyce RW, Paddock CL, Gleason JR, Sietsema WK, Eriksen EF. The effects of risedronate on canine cancellous bone remodeling: tree-dimensional kinetic reconstruction of remodeling site. *J Bone Miner Res* 1995; 10(2): 211-21.
4. Castro ML, Uyeno, MNO. Osteoporose no homem. In: Bandeira F. *Osteoporose*. Rio de Janeiro: Medsi; 2000; 9: 145-63.
5. Delmas PD. How does antiresorptive therapy decrease the risk of fracture in women with osteoporosis? *Bone* 2000; 27(1): 1-3.
6. Fayad MVL. Reparação óssea sob ação de duas formulações de bisfosfonatos: estudo comparativo radiográfico e histológico. São José dos Campos; 2001. [Dissertação de Mestrado- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos].
7. Fernandes, RG. Estudo da reparação óssea na mandíbula de coelhos sob a ação do alendronato sódico e da sua associação com a hidroxiapatita. São José dos Campos; 2002. [Dissertação de Mestrado- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos].
8. Harrison TR. *Medicina interna*. Rio de Janeiro: Macgraw-Hill Interamericana; 1996.
9. López FJ. New approaches to the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4(4): 383-93.
10. McClung MR. Risedronate increases BMD at the hip, spine and radius in postmenopausal women with low bone mass. *J Bone Res* 1997; 15: 955.
11. Mönkkönen J, Koponen HM, Ylitalo P. Comparison of the distribution of three bisphosphonates in mice. *Pharmacol Toxicol* 1990 Apr.; 66(4): 294-8.
12. Mortensen L, Bekker P, DiGenaro J, Axelrod D, Charles P, Johnston Jr C. Prevention of early postmenopausal bone loss by risedronate. One year follow up data [abstract]. *Bone* 1995; 17 (6): 607.
13. Sagraves R. Evaluating therapeutic modalities for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ann Pharmacother* 2003; 37(5): 744-6.
14. Sahni M, Guenter HL, Fleisch H, Collin P, Martín TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993 May; 91(5): 2004-11.
15. Salgado CSC. Desenvolvimento de osteopenia experimental em ratos machos e tratamento com risedronato. São José dos Campos; 2002. [Dissertação de Mestrado- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos].
16. Silva CMOM. Avaliação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos. São José dos Campos; 2000. [Dissertação de Mestrado- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos].
17. Sietsema WK, Ebetino FH, Salvagno AM, Bevan JA. Antiresorptive dose response relationships across three generations of bisphosphonates. *Drugs Exp Clin Res* 1989; 15 (9): 389-96.
18. Szejnfeld VL. Bisfosfonatos. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000.
19. Vieira S. *Estatística experimental*. São Paulo: Atlas; 1999.
20. Watts NB, Josse RG, Hamdy RC, Huges RA, Manhart Md, Barton I et al. Risedronate prevents new vertebral fractures in postmenopausal women at high risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(2): 542-9.
21. Watts NB, Worley K, Solis A, Doyle J, Sheer, R. Comparison of risedronate to alendronate and calcitonin for early reduction of nonvertebral fracture risk: results from a managed care administrative claims database. *J Manag Care Pharm* 2004; 10(2): 142-51.

Recebido em: 01/10/04

Aprovado em: 23/11/04

Carolina Ricomini PIAI

Rua: Eulália Silva, no 223 – apto 21

Jardim Faculdade – Sorocaba – SP

CEP – 18.030-230

Tel: (15)233.3969

E-mail – carolpiai@itelefonica.com.br