

ANÁLISE DOS EFEITOS DO RALOXIFENO NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATAS COM OSTEOPENIA.

Carla Liane Marsi, Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho, Levy Anderson César Alves, Aretha Graziela Vilela de Sousa, Rosilene Fernandes da Rocha. –Inter-áreas Patologia/Farmacologia– Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia – Campus de São José dos Campos.

Atualmente, 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, o processo de prevenção contra os males do envelhecimento deve fazer parte dos planos de qualquer indivíduo e ser adotado como instrumento fundamental para a melhoria da qualidade de vida dos cidadãos.

Dentre as alterações decorrentes da senescência, a perda de massa muscular, o enfraquecimento do sistema imunológico, o declínio da acuidade visual são marcantes, bem como doenças crônicas como hipertensão, artrite, diabetes e problemas vasculares.

Distúrbios sistêmicos como a osteoporose, uma patologia sistêmica e progressiva, caracterizada pelo desequilíbrio entre atividade osteoblástica e osteoclástica, sendo esta última predominante neste processo, podem eventualmente levar a uma perda de massa considerável e deterioração da microarquitetura óssea. Nesta patologia, a deficiência de estrógenos afeta, em geral, a massa óssea de mulheres após a menopausa, podendo resultar em uma perda de osso trabecular de até 50% seguida da perda de osso cortical em aproximadamente 30%. Sendo assim, a osteoporose leva à fragilidade óssea e aumenta riscos de fraturas (Loscalzo et al., 2002 e Szejnfeld 2000).

Considerando-se que a osteoporose estabelecida é de difícil reversão, a intervenção precoce pode prevenir a osteoporose na maioria das pessoas e a intervenção subsequente pode deter a progressão do processo, uma vez instalado. Vale ressaltar, que a terapia farmacológica tem por objetivo impedir a perda adicional de osso e diminuir a probabilidade de fraturas.

A literatura sugere que o raloxifeno possui efeitos positivos em pacientes osteoporóticos aumentando sua DMO e prevenindo a perda de massa óssea, apresentando além disso, efeitos similares ao estrogênio (Ammann et al, 2004 e Nisslein et al, 2003).

Dessa forma, este fármaco é indicado como alternativa para a terapia de reposição hormonal (TRH), trazendo vantagens adicionais para o sistema cardiovascular dos pacientes que fazem uso desse medicamento (Sliwinski et al, 2005), sendo este classificado como modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) de segunda geração, apresentando efeito tecido-específico nos órgãos alvo de ação do estrógeno.

O mecanismo de ação molecular do raloxifeno envolve alta afinidade de ligação com o receptor de estrógeno, provocando alteração conformacional na estrutura do receptor, sua dimerização e associação com elementos de resposta do DNA, sendo inclusive descritos sítios de ligação do DNA e elementos resposta específicos para o raloxifeno, distintos dos estrógenos. Em razão do cloridrato de raloxifeno apresentar conformação espacial específica para receptores do tipo alfa estrogênicos, este medicamento possui propriedade agonista no tecido ósseo e sistema cardiovascular e antagonista sobre o útero e mamas, uma vez que os receptores para estrógenos nestes últimos são do tipo beta. Sendo assim, recai sobre o raloxifeno a indicação em mulheres que têm intolerância aos estrógenos naturais, que sofrem de mastalgia ao utilizarem a terapia de reposição hormonal da menopausa (TRHM) e que não toleram a volta dos sangramentos vaginais (Orwoll et al.,1999). Além disso, há uma necessidade médica de se ter um agente com efeitos positivos similares ao estrógeno com ação sobre o osso e o sistema cardiovascular, mas que não apresente efeitos proliferativos nos tecidos reprodutivos, considerando pacientes com história familiar de câncer de mama e/ou neoplasias do colo uterino.

Por essa razão, nos propusemos a analisar comparativamente os efeitos do raloxifeno nas doses de 1mg/kg/dia e 3mg/kg/dia no processo de regeneração óssea de ratas com osteopenia, por meio de análises da densidade óptica radiográfica e variações de massa seca.

Para o presente estudo, foram utilizadas quarenta ratas, (*Rathus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com noventa dias de idade e peso aproximado de 250g, manipuladas de acordo com os Princípios Éticos para a experimentação Animal (CEP: Proc 009/2004-PA) da Faculdade de Odontologia do campus de São José dos Campos. Os animais experimentais foram divididos em quatro grupos de dez, sendo eles: (I) ratas normais (SHAM), (II) ratas ovariectomizadas, (III) ratas ovariectomizadas e tratadas com raloxifeno 1mg/kg/dia, (IV) ratas ovariectomizadas e tratadas com raloxifeno 3mg/kg/dia.

As ratas dos grupos II, III e IV foram ovariectomizadas e após trinta dias da ovariectomia, foram confeccionadas lesões de 3mm de diâmetro até o limite da medula óssea no terço proximal da tíbia com auxílio de broca esférica nº 6 em motor de baixa rotação, sob irrigação constante com soro fisiológico (NaCl 0,9%). Em seguida, ao grupo III foi administrado 1mg/kg/dia de raloxifeno e ao grupo IV 3mg/kg/dia do mesmo fármaco. Após 7 e 28 dias de tratamento, os animais foram sacrificados em grupos de 5, por período experimental. As tíbias esquerdas foram secas por 24 horas em estufa a 60° C (Ke et al., 1998) e pesadas em balança analítica de precisão (Micronal B600). Os dados obtidos pós-pesagem foram submetidos a análise estatística por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

No que se refere ao ganho de massa óssea das tíbias, analisadas pós-desidratação, não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais comparados dentro de um mesmo período experimental (fig.01).

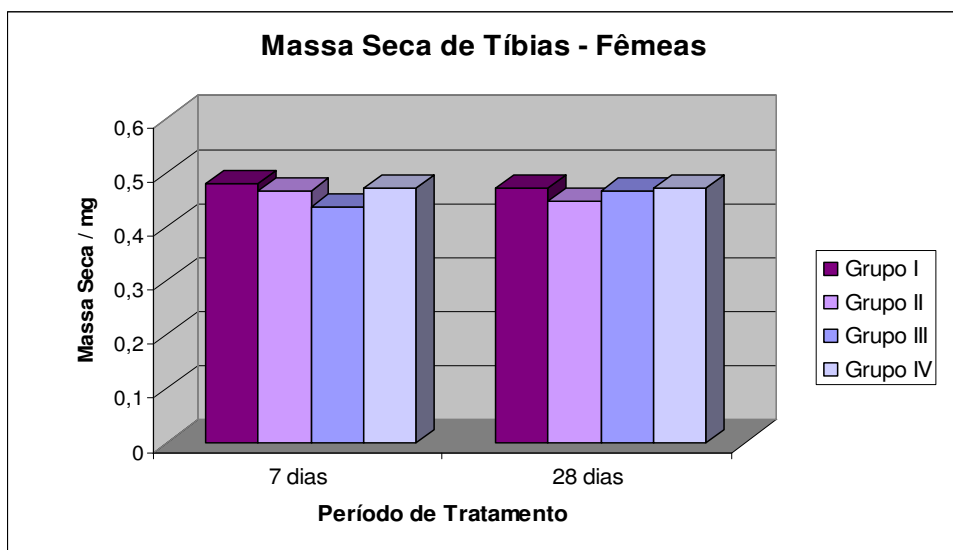


Figura 01- Gráfico comparativo dos valores de massa seca das tíbias dos grupos experimentais I, II, III e IV.

As tíbias direitas foram removidas para avaliação densidade radiográfica e procedeu-se, em seguida, a análise radiográfica. Para as incidências radiográficas dos ossos em questão, foi utilizado o aparelho de raios X digital 765 DC® Gendex com 65 kVp, 7mA, e 0,032s de tempo de exposição. Para captação das imagens, utilizou-se um sistema de radiografia digital direto, que emprega o dispositivo de carga acoplada (CCD): o RVG (*Trophy Radiologie, Vincennes, Toulouse, France*). Este sistema digital foi acoplado a um computador Pentium III com 1,4 GHz, 128Mb de memória, HD 40Gb, Monitor LG de 17". O sensor CCD foi fixado à uma mesa com o cilindro do aparelho de raios X posicionado a uma distância focal de 40cm, com feixe central de raios X incidindo perpendicularmente ao sensor. As análises de densidade ópticas das imagens obtidas foram estabelecidas utilizando-se recursos do programa *Image Tool 2.03*®, por meio de histograma. Foram analisadas três regiões das áreas centrais de cada defeito ósseo, sendo que o registro da densidade óptica de cada região foi expresso em valores numéricos, fornecidos pelo histograma, em *pixels*, na tela do monitor, por meio de um gráfico

bidimensional, o qual se baseia numa escala de 254 possíveis tonalidades de cinza, mais o preto absoluto valendo zero, e o branco absoluto valendo 255 (Morosolli, 2004).

Os resultados obtidos proporcionaram a análise comparativa das leituras ópticas dos grupos, utilizando-se método estatístico descritivo por meio da análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, com o objetivo de calcular a diferença mínima significativa entre duas médias ao nível de 5%. Aos vinte e oito dias de reparação os grupos I e IV apresentaram valores de densidade radiográfica superiores e estatisticamente significantes em relação aos sete dias de reparação (Fig. 02).

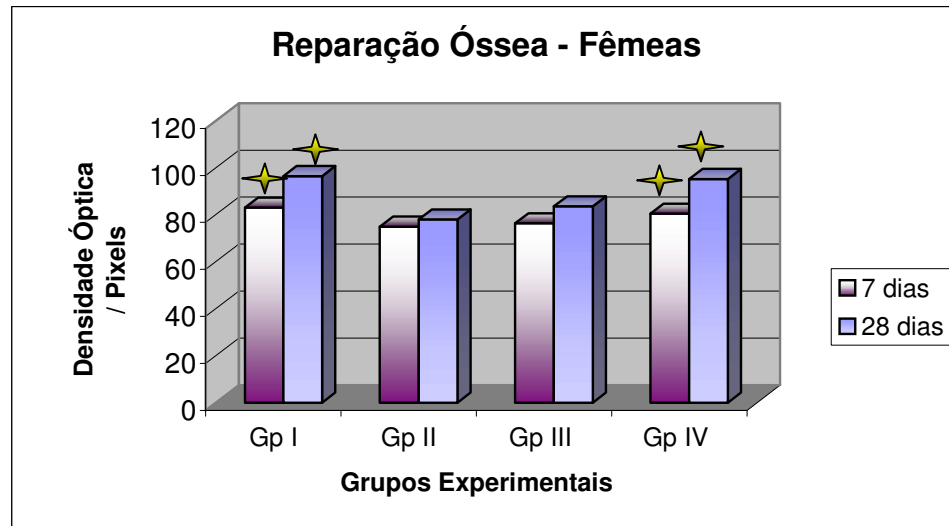


Figura 2 - Comparação das médias de densidade óptica radiográfica (*pixels*) da região central do defeito ósseo cirúrgico nos períodos experimentais de sete e vinte e oito dias.

Além disso, a comparação entre os grupos mostrou que os grupos I e IV apresentaram aumento de média de densidade radiográfica estatisticamente significante aos vinte e oito dias de tratamento em relação aos grupos II e III, sendo semelhantes entre si (Fig 03).

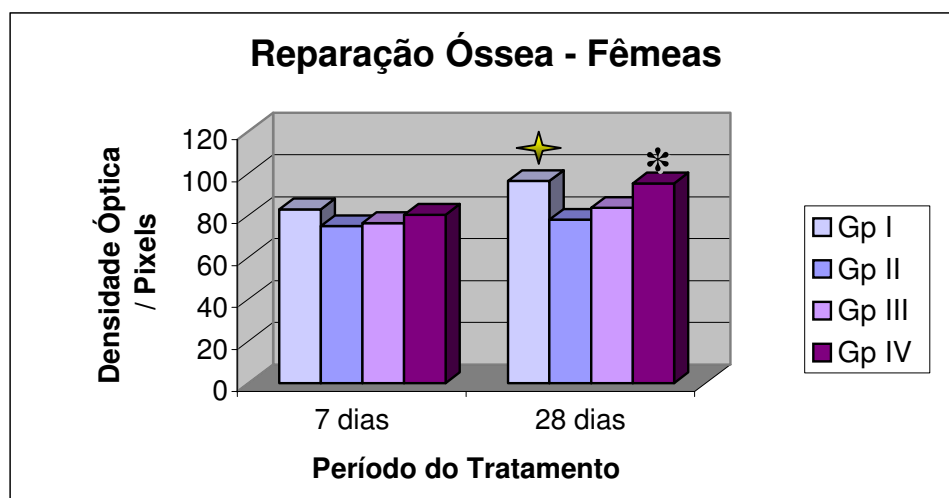


Figura 03 – Gráfico comparativo das médias de densidade óptica radiográfica (*pixels*) entre os grupos I, II, III e IV.

Após as análises dos resultados obtidos no presente trabalho, pôde-se concluir que o

raloxifeno na dose de 3mg/kg/dia foi eficaz na estimulação da reparação óssea em ratas osteopênicas, sendo semelhante ao grupo SHAM e que o efeito deste medicamento, dentro das condições experimentais desta pesquisa, mostrou-se dose-dependente.

Referências Bibliográficas:

1. AMMANN P. et al. A new selective estrogen receptor modulator HMR-3339 fully corrects bone alterations induced by ovariectomy in adult rats. **Bone**, p.153-161, 2004.
2. MOROSOLLI, A.R.C. **Análise da cronologia da reparação óssea por meio da densidade óptica em imagens radiográficas digitais diretas nas osteotomias realizadas com radiação laser de dióxido de carbono (CO2) e broca em fêmures de ratos**. Dissertação. (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Radiologia Odontológica) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos campos, 2004.
3. NISSLEIN T, FREUDENSTEIN J. Effects of an isopropanolic extract of Cimicifuga racemosa on urinary crosslinks and other parameters of bone quality in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **J Bone Miner Metab**, v. 6, n. 21, p.370-6, 2003.
4. SLIWINSKI L. et al. Differential effects of genistein, estradiol and raloxifene on rat osteoclasts *in vitro*. **Pharmacological Reports**, n. 57, p.352-359, 2005.
5. LOSCALZO J, GRIGGS R, CARPENTER C. **Cecil medicina interna básica**. Rio de Janeiro, Guanabara. p. 589-95, 2002.
6. ORWOLL E, et al. Alendronate treatment of osteoporosis in men. **J Bone Res**, v. 11, n. 14, p.184, 2000.
7. SZEJNFELD VL. **Osteoporose: Diagnóstico e Tratamento**. Sarvier; SãoPaulo, 2000.
8. KE H.Z. et al. Effects of CP-336,156, a New, Nonsteroidal Estrogen Agonist/Antagonist, on Bone, Serum Cholesterol, Uterus, and Body Composition in Rats Models. **Endocrinology**, v. 4, n. 139, p. 2068-76, Abr, 1998.