

# **ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO RALOXIFENO E DO RISEDRONATO NA REPARAÇÃO ÓSSEA DE RATAS COM OSTEOPENIA.** Aretha Graziela Vilela de Sousa, Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho, Levy Anderson César Alves, Mari Eli Leonelli de Moraes, Rosilene Fernandes da Rocha. - Inter-áreas – Patologia/Farmacologia – Departamento de Biociência e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia – Campus de São José dos Campos.

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 remodelação do tecido ósseo é afetada pela falta de hormônios gonadais, e a deficiência de estrógeno afeta, em geral, a massa óssea de mulheres após a menopausa, (Loscalzo et al., 2002). Por essa razão, as terapias farmacológicas de reposição hormonal ou com substâncias estabilizadoras do processo reabsortivo, têm por objetivo impedir a perda adicional de osso e diminuir a probabilidade de futuras fraturas.

Os bisfosfonatos, conhecidos desde o século XIX, são frequentemente utilizados no tratamento de várias doenças ósseas. Entre eles temos o risedronato sódico considerado um dos mais potentes bisfosfonatos disponíveis no mercado, em função de sua alta afinidade pelo tecido ósseo e alta potência de anti-reabsortiva (Szejnfeld, 2004). São análogos sintéticos do pirofosfato, potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Ao se fixarem na área da borda em escova destas células, inibem a ação de desmineralização óssea enzimática (Oliveira, 2003).

O risedronato liga-se à hidroxiapatita do tecido ósseo e inibe a sua reabsorção, mediada pelos osteoclastos. A renovação óssea é reduzida, enquanto a atividade osteoblástica e a mineralização óssea são preservadas. Os estudos pré-clínicos com risedronato demonstraram potente atividade antiosteoclástica e anti-reabsortiva, com aumento da massa óssea e da força esquelética biomecânica de modo dose-dependente. Alguns autores sugerem que os bisfosfonatos trabalham inibindo a formação, o recrutamento, e a atividade do osteoclasto ou induzindo a apoptose deste tipo celular (Peters et al, 2001).

Por outro lado, refere-se na literatura atual, o uso de “SERMs”, moduladores seletivos dos receptores de estrogênios, e entre estes o raloxifeno (subgrupo do tamoxifeno), utilizado para prevenção e tratamento da osteoporose. O referido fármaco é classificado como “SERM” de segunda geração, apresentando efeito tecido-específico nos órgãos alvo de ação do estrógeno. Este composto tem ação agonista no osso e sistema cardiovascular e ação antagonista na mama e útero (Otomo et al, 2004). Sua seletividade tecidual ocorre devido a diversos mecanismos de interação com diferentes receptores de estrógenos, distribuição diferencial destes receptores nos diversos tecidos-alvo, além da diversidade de co-fatores protéicos transcricionais, bem como da conformação de receptores após a ligação do raloxifeno (Sliwinski et al, 2005).

Os mecanismos pelos quais os SERMs têm efeito antagonista/agonista de forma seletiva dos tecidos ainda não são completamente conhecidos. Alguns estudos sugerem que o raloxifeno é capaz de estimular as vias estrogênicas por meio do receptor específico. Os receptores de estrógeno pertencem a uma grande família de receptores nucleares. Dois subtipos de receptores de estrógeno, ER $\alpha$  e ER $\beta$ , foram identificados podendo interagir com elementos de resposta nos genes alvos. O receptor alfa predomina nos órgãos reprodutores (mama e útero), enquanto que o receptor beta predomina no osso e sistema cardiovascular. O raloxifeno parece interagir com receptor beta, ativando múltiplas funções transcricionais, mas não é capaz de ativá-las via receptor alfa, podendo ser este um dos mecanismos pelos quais este fármaco exerce ação diferencial nos tecidos (Genant et al, 2004).

Diante das perspectivas de utilização dos medicamentos relacionados em situações clínicas onde haja a necessidade de estimulação de neoformação óssea em pacientes portadores de osteopenia e/ou osteoporose, em diferentes áreas da odontologia, objetivou-se neste estudo analisar, por meio da densidade óptica radiográfica e das variações das massas secas de tíbias, os efeitos do risedronato e do raloxifeno na reparação óssea de ratas osteopênicas.

Para o presente trabalho, foram utilizados quarenta ratos fêmeas, (*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). Estes foram divididos em quatro grupos de dez animais: (I) ratos normais (SHAM); (II) ratos ovariectomizadas; (III) ratas ovariectomizadas e tratadas com Risedronato 1mg/kg/dia; (IV) ratas ovariectomizadas e tratadas com Raloxifeno 1mg/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 risedronato e ao grupo IV 1mg/kg/dia de raloxifeno. 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 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 períodos de sete e vinte e oito dias para um mesmo protocolo terapêutico (fig.01).

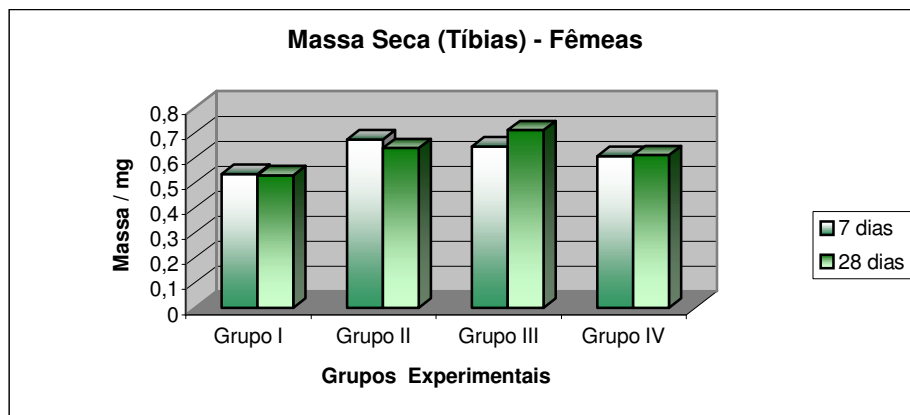
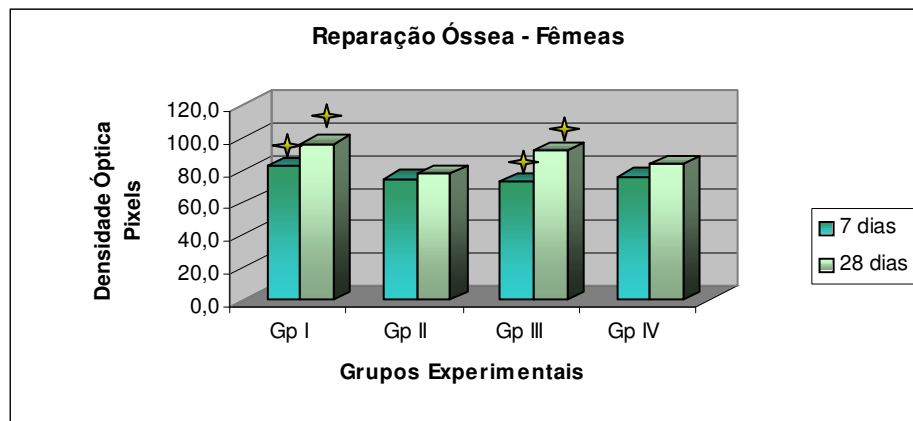


Figura 01- Gráfico comparativo dos valores de massa seca das tíbias de mesmo grupo, nos períodos de observação de sete e vinte e oito dias.

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).

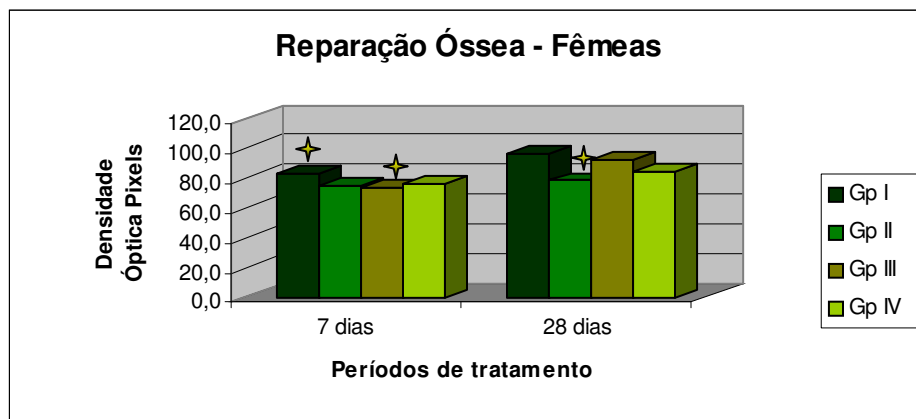
Os resultados obtidos proporcionaram a análise comparativa das leituras ópticas dos grupos, utilizando-se método estatístico descritivo por meio da análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, com o objetivo de calcular a diferença mínima significante entre duas médias ao nível de 5%. Dentro de

mesmo grupo experimental, considerando os períodos de sete e vinte e oito dias de observação, evidenciou-se o aumento estatisticamente significativo, nos grupos I e III, das médias de densidade radiográfica das regiões de reparação óssea analisadas de sete para vinte e oito dias (fig.02). Também de acordo com a figura 2, pôde-se observar a inexistência de diferença estatística significativa nos grupos II e IV, no que se refere à progressão de ganho de massa óssea.



**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.

Por outro lado, a análise comparativa entre os grupos com sete dias de observação mostrou diferença estatisticamente significativa das médias da densidade óptica radiográfica entre os grupos I e III, sendo este valor inferior no grupo III (fig.3). Aos vinte e oito dias de observação do processo de reparação óssea nos animais experimentais, constatou-se que o grupo II apresentou média de densidade radiográfica inferior e estatisticamente diferente dos grupos I, III e IV. Deve-se ressaltar que os grupos I, III e IV apresentaram superioridade quantitativa e semelhança estatística entre si no que se refere às médias de radiopacidade (fig.3).



**Figura 3 –** Gráfico comparativo das médias de densidade óptica radiográfica (*pixels*) entre os grupos I, II, III e IV.

Diante das análises realizadas no trabalho em questão e dentro das condições experimentais do mesmo, pôde-se concluir que o raloxifeno e o risedronato, nas doses empregadas, aceleram o processo de reparação óssea, sobretudo aos 28 dias de observação, sendo esse efeito semelhante ao grupo SHAM.

## Referências Bibliográficas

1. GENANT, H. K. et al. Treatment with raloxifene for 2 years increases vertebral bone mineral density as measured by volumetric quantitative computed tomography. **Bone**, p. 1164-1168, 2004.
2. LOSCALZO J; GRIGGS R; CARPENTER C. C. **Medicina Interna Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara; p. 589-95, 2002.
3. 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 (CO<sub>2</sub>) e broca em fêmures de ratos**. Tese (Mestrado) – Departamento de Radiologia. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2004.
4. OLIVEIRA, L. A. A. **Avaliação do efeito dos risedronato sódico na consolidação das fraturas: Estudo experimental em ratos**. Tese (doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2003.
5. OTOMO, H. et al. Regulation of mineral-to-matrix ratio of lumbar trabecular bone in ovariectomized rats treated with risedronate in combination with or without vitamin K<sub>2</sub>. **J Bone Miner Metab**, v. 5, n. 22, p. 404-14, 2004.
6. PETERS, M. L; LEONARD, M; LICATA, A. A. Papel do Alendronato e do Risedronato no tratamento e prevenção da osteoporose. **Cleve Clin J Med**, n.68, p. 945-951, 2001.
7. SLIWINSKI, L. et al. Differential effects of genistein, estradiol and raloxifene on rat osteoclasts in vitro. **Pharmacological Reports**, n. 57, p. 352-359, 2005.
8. SZEJNFELD, V. L. Osteoporose. **Revista Brasileira Medicina**, v. 7, n. 61, p. 417-281, 2004.

**Bolsa:** FAPESP