

Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas

Aloísio da Silva Pinto^{1*}, Tânia Toledo de Oliveira², Ricardo Junqueira Del Carlo¹, Tanus Jorge Nagem³, Cláudio César Fonseca¹, George Henrique Kling de Moraes², Davilson Bragine Ferreira Junior¹, Carlos Antonio Cardoso¹

¹ Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, ² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, ³ Departamento de Química, Universidade Federal de Ouro Preto

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência das combinações: bifosfonato (alendronato de sódio) + estatina (atorvastatina cálcica), bifosfonato (alendronato de sódio) + flavonóide (ipriflavona) e estatina (atorvastatina cálcica) + flavonóide (ipriflavona) em ratas com osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona. As influências das associações dessas substâncias foram pesquisadas pela análise de testes dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea, tais como, cálcio e fósforo sérico, fosfatase alcalina óssea e por exames histomorfométricos, caracterizando a densidade trabecular óssea. Através da avaliação da densidade trabecular óssea foi possível verificar o aumento da mesma em todos os tratamentos efetuados. Ressaltando-se, ainda, que as associações contendo alendronato de sódio apresentaram elevadas taxas de restauração tecidual óssea, alcançando valores superiores aos do grupo dos animais normais. Os marcadores bioquímicos não apresentaram resultados estatisticamente significativos, não fornecendo subsídios para o diagnóstico e acompanhamento 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.

Unitermos

- Osteoporose
- Dexametasona
- Alendronato
- Atorvastatina
- Ipriflavona
- Associação de fármacos

*Correspondência:

A.S. Pinto
Departamento de Veterinária
Universidade Federal de Viçosa
Av. P H Rolfs, s.n
36571-000 - Viçosa, MG - Brasil
E-mail: aloisio@ufv.br

INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma desordem metabólica do tecido ósseo, com perda de massa e redução da densidade, acompanhada por danos na microarquitetura, aumentando os riscos de fratura (Lindsay, 1993), atingindo milhões de pessoas no mundo todo.

Os glicocorticóides estão associados com perda óssea e subsequente aumento de fraturas em humanos. Ba-

lanço negativo de cálcio devido a mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal é responsável pelo hiperparatireoidismo secundário em pacientes tratados com glicocorticóide. 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, Ibbertson, 1987; Reid, 1997).

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 bovinas em cultura de glândulas de paratireóide de rato (Au, 1976; Sugimoto *et al.*, 1989).

Os glicocorticóides modificam a atividade metabólica e proliferativa das células ósseas. Eles inibem a osteoblastogênese e osteoclastogênese e reduzem a meia vida dos osteoclastos. Eles também são potentes repressores da função osteoblástica e provavelmente estimuladores da maturação dos osteoclastos. Em conjunto, estas mudanças conduzem à osteoporose, principalmente devido à formação óssea reduzida, já que o aumento na reabsorção óssea parece estar menos envolvido (Patschan, Loddenkemper, Buttgerit, 2001).

Ratos têm sido recentemente usados como um modelo animal para estudos de osteoporose devido ao seu pequeno tamanho, facilidade de manipulação e por possuírem muitas características semelhantes às de humanos no que se refere ao tecido ósseo. Entretanto, estudos relativos a efeitos de glicocorticóides sobre os ossos de rato têm sido controversos. Estudos têm mostrado que, após tratamento com glicocorticóides, ratos apresentaram aumento na massa óssea, outros, de outro modo, observaram diminuição na massa óssea e outros mantiveram inalterada a massa óssea (Thorndike, Turner, 1998).

Recentemente, Santos (2004) conseguiu induzir osteoporose com a administração de dexametasona, em ratos machos intactos e castrados, bem como em fêmeas intactas e ovariectomizadas da raça Wistar.

As estatinas são os agentes mais efetivos na terapia das dislipidemias, sendo bem toleradas, disponíveis para uso oral e estimulam a formação de quantidades substanciais de osso, aumentando as chances destas substâncias serem utilizadas no tratamento de pacientes com osteoporose (Yamamoto *et al.*, 1984).

As estatinas aumentam significativamente a taxa de formação óssea em animais, devido a seus efeitos promotores sobre o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), que conduz à diferenciação osteoblástica e à formação óssea. Ocorre aumento da transcrição do gene do BMP-2, sendo este o provável mecanismo responsável pelos seus efeitos (Mundy, 2001).

Bifosfonatos são análogos sintéticos de pirofosfato caracterizados por ligações de P-C-P e são mais resistentes à hidrólise química e enzimática. Esses compostos exercem efeitos de inibição da reabsorção osteoclástica e inibição da mineralização óssea (Fleisch *et al.*, 1970; Meyer, Nancollas, 1973). A ligação de bifosfonatos aos minerais do tecido ósseo leva à supressão da reabsorção

óssea induzida por osteoclastos, tendo uma ação direta mediada por osteoblastos com atividade antiabsortiva (Sahni *et al.*, 1993). 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).

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 está envolvida em trocas morfológicas, perda da membrana mitocondrial e na ativação de proteases caspase-3, capazes de clivar substratos peptídicos (Benford *et al.*, 2001).

Os flavonóides compõem ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, possuem série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os sistemas biológicos (Peterson, Dwyer, 1998).

Verificou-se que flavonóides previnem a perda de massa óssea em pacientes osteoporóticos e provoca decréscimo no *turnover* ósseo provocado por hipogonadismo (Gambacciany *et al.*, 1994). Efeitos favoráveis à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos foram demonstrados por Katai *et al.* (1992) e Cheng *et al.* (1994) e inibição da reabsorção óssea também foi observada (Notoya *et al.*, 1993; Albamese *et al.*, 1994). O mecanismo envolvido na ação modulatória em células do tecido ósseo parece ter atividade antiabsortiva (Azria *et al.*, 1993; Passeri *et al.*, 1995).

Mostrou-se que flavonóide foi capaz de induzir aumento de massa óssea após tratamento de 12 meses em mulheres osteoporóticas e efetivo em prevenir perda óssea (Cecchetti *et al.*, 1995).

Segundo Cortet (2004), terapia combinada apresenta-se como recurso considerável para aumentar os efeitos terapêuticos em pacientes com doenças crônicas. Combinações de fármacos são frequentemente utilizadas para tratar hipertensão arterial, diabetes melitus não insulino-dependente ou artrite reumatóide. Já na osteoporose, poucos dados são disponíveis sobre regimes de combinação de fármacos (Harris *et al.*, 2001).

Tendo em vista a busca de alternativas mais eficazes no controle e, principalmente, no tratamento da osteoporose estabelecida, o presente experimento foi idealizado na tentativa de tratar a osteoporose induzida por glicocorticóide através da combinação de bifosfonato + estatina, bifosfonato + flavonóide e estatina + flavonóide.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fármacos

O experimento consistiu de um ensaio biológico, em que se verificaram os efeitos das associações das substâncias alendronato monossódico triidratado em solução oral (Galena), atorvastatina cálcica em suspensão oral (Citalor®-Pfizer) e ipriflavona em suspensão oral (Galena).

Animais

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas 120 ratas da raça Wistar, adultas, pesando aproximadamente 250 ± 20 g de peso, 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 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 (Azium 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 a 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), que não foi submetido à aplicação do corticosteróide dexametasona; grupo osteoporótico (G2), que recebeu apenas dexametasona; grupo 3 (G3), que recebeu a dexametasona e tratamento diário com alendronato de sódio na dose de 0,1 mg/kg (metade da dose preconizada para humanos) + atorvastatina cálcica na dose de 0,6 mg/kg (metade da dose preconizada para humanos); grupo 4 (G4), que recebeu a dexametasona e tratamento diário com alendronato de sódio na dose de 0,1 mg/kg + ipriflavona na dose de 50 mg/kg, metade da dose utilizada em ratas intactas ou ovariectomizadas (Yamazaki, 1986; Arjmandi, 2000) e, grupo 5 (G5), que recebeu a dexametasona e tratamento

diário com atorvastatina cálcica na dose de 0,6 mg/kg + ipriflavona na dose de 50 mg/kg. Todas as substâncias foram administradas por via oral.

A 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 (25 mg/mL) e cloridrato de zolazepam (25 mg/mL) (Zoletil 50®-Virbac).

Métodos Bioquímicos

Foram coletados, então, de cada animal, 5 mL de amostra de sangue, por punção na veia cava caudal, com o objetivo de dosar os níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea. Para a realização das determinações de cálcio e fósforo, foi utilizado o autoanalisador multiparamétrico de bioquímica Alizé, bem como “kits” da marca BioMerieux. Já na determinação da fosfatase alcalina óssea, utilizou-se o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter, assim como “kits” Ostase, específicos para dosagem desta enzima, também da mesma indústria.

Método Histológico

Logo após o sacrifício dos animais, através de anestesia profunda, procedeu-se à dissecação e foi coletado fêmur direito de cada animal, mantendo-se a região epifisária, sendo posteriormente colocado em formol tamponado a 10%, durante 72 horas para fixação. Posteriormente, o osso foi 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 Fm) de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Estes cortes foram obtidos de forma seriada, montados sobre lâmina 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 graticula composta por 494 interseções, distando 1 cm 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, computado 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 a 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 a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da densidade trabecular óssea, que caracteriza o estado metabólico que se encontra o tecido ósseo dos animais experimentais, são apresentados na Tabela I.

Segundo Junqueira, Carneiro, Kelley (1986), o estudo histomorfométrico determina, com elevado grau de acuidade, o remodelamento ósseo, precisando a extensão da perda óssea e das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo e, assim, capacita para identificar o estado osteoporótico do osso.

Segundo os valores percentuais de densidade trabecular óssea mostrados, o grupo G2 (osteoporótico), tratado apenas com o glicocorticóide dexametasona, apresenta diminuição de valores médios, que foram estatisticamente significativos, quando comparados com aqueles do grupo controle G1, em todos os períodos avaliados, demonstrando, assim, indução osteoporótica com o tratamento instituído.

TABELA I - 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. (%)	Variação (%) em relação G1	Variação(%) em relação G2
7 Dias	G1 Controle	60,00 A + 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	43,78 B + 0,509	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	33,11 b + 4,671	-44,81*	-24,37**
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	44,78 a + 5,419	-25,37*	2,28
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	40,89 ab + 1,262	-31,85*	-6,60
14 Dias	G1 Controle	59,80 A + 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	40,78 B + 1,895	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	55,11 b + 2,009	-7,84*	35,15**
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	64,33 a + 1	7,57*	57,77**
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	44,67 c + 3,215	-25,30*	9,54**
21 Dias	G1 Controle	61,02 A + 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	37,00 B + 1,155	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	64,33 b + 2	5,42*	73,87**
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	70,00 a + 0,333	14,72*	89,19**
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	46,44 c + 2,715	-23,89*	25,53**
28 Dias	G1 Controle	61,58 A + 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	41,56 B + 2,269	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	77,11 a + 2,795	25,22*	85,56**
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	81,44 a + 3,835	32,25*	95,99**
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	52,56 b + 1,018	-14,65*	26,47**

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

Aos sete dias de tratamento, os valores percentuais dos grupos tratados, G3 com bifosfonato + estatina, G4 com bifosfonato e flavonóide e G5 com estatina e flavonóide, encontravam-se diminuídos, apresentando significação estatística em relação ao grupo controle G1, demonstrando que o tratamento prévio com o glicocorticóide tinha induzido a baixa densidade óssea e, neste período, os tratamentos não a tinham modificado.

Observa-se aos 14 dias que todos os tratamentos efetuados mostram valores positivos de densidade, que os diferenciam significativamente do grupo G2, sendo que, neste período, já se percebe destacada eficácia das associações bifosfonato + estatina (G3) com 35,15% de variação e, principalmente, de bifosfonato + flavonóide (G4), que apresentou 57,77% em relação ao grupo osteoporótico. Este último grupo, o G4, já apresenta, neste período, valor de densidade trabecular óssea superior àquele do grupo controle (G1), significativo.

Os resultados mostrados no período de 21 dias reve-

lam que, além do grupo G4, também o grupo G3 apresenta valor acima daquele mostrado para o grupo controle G1. Em relação ao grupo G2, as variações percentuais positivas são da ordem de 73,87% do grupo G3 e de 89,19% do grupo G4. O grupo G5, tratado com estatina + flavonóide, neste período, apresenta diferença significativa de 25,53% em relação ao grupo G2, mas o valor (-23,89%), ainda é inferior ao do grupo controle G1.

Quando se observam os resultados obtidos no período de 28 dias, o grupo G5, praticamente, mantém o valor alcançado no período anterior (26,47%) em relação ao grupo G2, mas inferior, ainda, ao do grupo G1 (-14,65%). Porém, os valores de densidade trabecular óssea obtidos com os tratamentos efetuados nos grupos G4 e G5 são altamente positivos. Em relação ao G1, grupo de animais normais, a diferença percentual positiva foi de 25,22% para o grupo G3 e de 32,25% para o grupo G4. Outrossim, quando se compara com o grupo G2, osteoporótico, a diferença percentual do grupo G3 é de 85,56% e do grupo G4 é de 95,99%.

A Figura 1 apresenta cortes histológicos da região

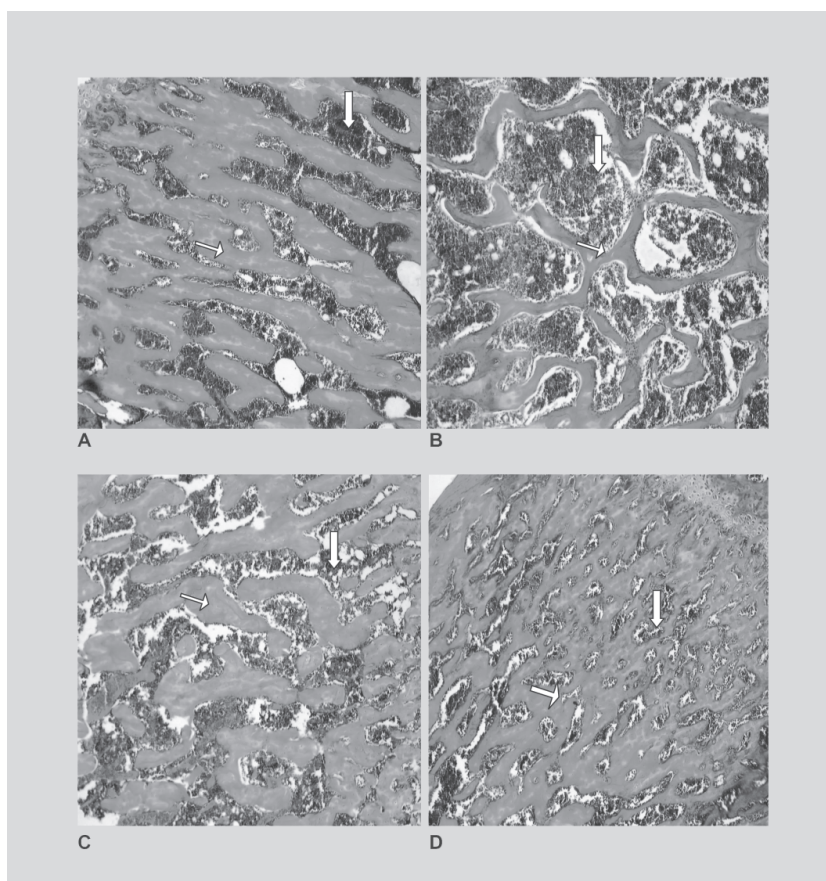


FIGURA 1 – Osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de fêmur de ratas. HE. 100X. **A**, Grupo Controle (G1). **B**, Grupo Osteoporótico (G2), (Glicocorticóide). **C**, Grupo Tratado 14 Dias (G4), (Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona). **D**, Grupo Tratado 28 Dias (G4), (Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona). Seta Larga – região medular óssea. Seta Estreita – trabécula óssea.

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 (Fig. 1B) e, em contraste, maior área de medula óssea neste grupo, em relação ao grupo controle (Fig. 1A). Quanto aos grupos tratados, foi observado que aos 14 dias (Fig. 1C), no grupo que recebeu alendronato de sódio + ipriflavona, 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 (Fig. 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 a tornou significativamente superior àquela observada nos animais do grupo controle (Figs. 1D e 1A), ratificada pelos valores médios de densidade trabecular óssea indicados na Tabela I.

A análise dos resultados de cálcio e fósforo sérico mostrou, durante todo o experimento, tanto os níveis de cálcio como os de fósforo sérico não sofreram variações significativas em relação ao grupo controle, ao grupo osteoporótico, bem como entre os tratados.

Conforme citado por Guyton, Hall (2002), os níveis séricos de cálcio e fósforo devem ser avaliados conjuntamente, visto que as concentrações de um influenciam diretamente as do outro. O cálcio possui um mecanismo de regulação fisiológica, que estreita os limites do seu nível plasmático, não permitindo variações além de 2,4 mmol/L, em que qualquer tentativa de alterações da concentração plasmática deste íon é corrigida dentro de minutos a horas, o que é feito em grande parte pelo hormônio paratireoide.

Segundo Motta (2003), na osteoporose não são encontradas alterações dos níveis séricos de cálcio e fósforo. Estudos realizados por Cecchetti *et al.* (1995) também não encontraram diferenças significativas nos níveis séricos de cálcio ou fósforo durante o tratamento da osteoporose de mulheres na pós-menopausa.

Os valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO) não apresentaram variações significativas, quando comparados com o grupo controle e osteoporótico, assim como também entre os grupos tratados.

A fosfatase alcalina óssea é o marcador de formação óssea mais frequentemente 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 imunoenaios específicos, apresentando baixa reação cruzada. A medida da isoforma ósseo-específica tem vantagens sobre a FA,

uma vez que, além de não sofrer influências hepáticas, é mais sensível a pequenas variações no *pool* circulante (Saraiva, Castro, 2002). Além da não-significância estatística, 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). Apesar da não-significância no presente ensaio, Kim, Lee, Rhee (2003) encontraram diferenças significativas de valores médios de FAO entre ratas normais, osteoporóticas e osteoporóticas tratadas.

A terapia de combinação possui considerável aceitação como meio de aumentar os benefícios do tratamento em pacientes com doenças crônicas, tais como, hipertensão arterial, diabetes ou artrite reumatóide. Em relação à osteoporose, poucos estudos foram realizados com regimes de combinações de fármacos e avaliações seguras têm sido confiadas em densidade mineral óssea (DMO) usada como um marcador, ao contrário do que em resultados clínicos (Harris *et al.*, 2001). Prudência, por conseguinte, é a postura que deve ser adotada, quando se tiver que interpretar dados sobre este procedimento terapêutico (Cosman *et al.*, 2001).

À exceção de suplementos de cálcio e vitamina D, os quais são usualmente administrados a pacientes de grupo-placebo em experimentos terapêuticos de larga escala, existe forte razão teórica para combinar um inibidor de reabsorção óssea e um que aumente a formação óssea. Todavia, dados sobre este propósito são débeis e os resultados de recentes estudos são desapontadores (Black *et al.*, 2003). A maioria dos estudos tem focalizado sobre combinações de inibidores de reabsorção óssea (Cortet, 2004).

A combinação de um bifosfonato com a terapia de substituição hormonal pode parecer sem importância, visto que estes dois tratamentos têm mecanismos de ação similares sobre o osso. Contudo, o sítio de ação, provavelmente, não é o mesmo (Cortet, 2004). Um estudo de alendronato em combinação com o estrogênio, em mulheres, por um período de um ano, constatou ganho ósseo significativo (Lindsay *et al.*, 1999). Bone *et al.* (2000) verificaram que o tratamento simultâneo de alendronato com estrogênio foi mais efetivo do que as substâncias isoladas, após 2 anos de terapia, sendo o ganho em densidade mineral óssea de 8,3% versus 6% e 6%, respectivamente.

No presente trabalho, por sua vez, as associações utilizadas alendronato + atorvastatina, alendronato + ipriflavona e atorvastatina + ipriflavona causaram ganho em densidade mineral óssea estatisticamente significativo, porém, com valores da ordem de até 95,99%.

CONCLUSÕES

A histomorfometria e a histopatologia permitiram 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 o sucesso da indução da osteoporose pelo glicocorticóide, bem como acompanhar o processo de evolução do tecido ósseo provocado pelas associações dos fármacos.

Os marcadores bioquímicos cálcio e fósforo sérico e a fosfatase alcalina óssea não apresentaram resultados que determinassem o diagnóstico da osteoporose, bem como a avaliação das alterações de remodelação óssea.

Todas as combinações testadas apresentaram efeitos positivos nos animais osteoporóticos. Outrossim, devemos destacar a maior eficácia das associações realizadas com o bifosfonato alendronato de sódio, que apresentaram restauração da densidade do tecido trabecular ósseo, cujos valores foram superiores, inclusive, aos dos animais normais.

Os resultados demonstraram, portanto, a capacidade desses tratamentos, não só, na preservação, mas também, na restauração do tecido ósseo. Assim, a possível utilização das combinações desses fármacos durante o tratamento prolongado com glicocorticóide ou no tratamento da osteoporose estabelecida parece bastante promissora. Entretanto, estudos das dosagens, interações, biodisponibilidades, além dos efeitos tóxicos dessas substâncias farmacológicas, a longo prazo, fazem-se necessários.

ABSTRACT

Effects of combined treatment of alendronate of sodium, calcic atorvastatin and ipriflavone in osteoporosis induced with dexamethasone in female rats

The objective of this work was to study the influence of the combinations: biphosphonate (alendronate of sodium) + statin (calcic atorvastatin), biphosphonate (sodium alendronate) + flavonoid (ipriflavone) and statin (calcic atorvastatin) + flavonoid (ipriflavone) in female rats with osteoporosis induced by the glucocorticoid dexamethasone. The influence of the combinations of those drugs was observed through tests of the biochemical markers of bone remodeling, such as, levels of serum calcium and phosphorus and bone alkaline phosphatase and through histomorphometric exam, visualizing the bone trabecular density. Through the evaluation of the bone trabecular density it was

possible to verify the clear increase in any group of treated animals. The combinations with biphosphonate presented high rates of bone tissue restoration, reaching higher values than those of normal animals. The results obtained with biochemical markers were not statistically significant and did not subsidies the diagnosis and the follow of the osteoporosis. However, the histomorphometric evaluation allowed us the static and dynamic analyses as well as detection of tissue alterations in the bone metabolic unit, particularly in the trabecular bone.

UNITERMS: Osteoporosis. Dexamethasone. Alendronate. Atorvastatin. Ipriflavone. Drug combinations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANESE, C.B.; CUDD, A.; ARGENTINO, L.; ZAMBONIN-ZALLONE, A.; MACINTYRE, I. Ipriflavone directly inhibits osteoclasts activity. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 199, p. 930-936, 1994.
- ARJMANDI, B.H.; BIRNBAUM, R.S.; JUMA, S.; BARENGOLTS, E.; KUKREJA, S.C. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevents bone loss by different mechanisms. *Calcif. Tissue Int*, v. 66, p. 61-65, 2000.
- AU, W.Y. Cortisol stimulation of parathyroid hormone secretion by rat parathyroid glands in organ culture. *Science*, v. 193, n. 4257, p. 1015-1017, 1976.
- AZRIA, M.; BEHHAR, C.; COOPER, S.; LAC, K. Effect of ipriflavone on osteoclasts motility and resorption *in vitro* in vivo studies. *Calcif. Tissue Int.*, v. 52, p. 16-20, 1993.
- 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*, v. 28, n. 5, p. 465-473, 2001.
- BIKLE, D.D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. *Am. J. Med.*, v. 103, p. 427-436, 1997.
- BLACK, D.M.; GREESPAN, S.L.; ENSRUD, K.E.; PALERMO, L.; MCGOWAN, J.A. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, v. 349, p. 1207-1215, 2003.

- BONE, H.G.; GREESPAN, S.L.; MCKEEVER, C.; BELL, N.; DAVIDSON, M.; DOWNS, R.W. Alendronate and estrogen effects in postmenopausal women with low bone mineral density. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 85, p. 720–726, 2000.
- 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. Pharmacother.*, v. 49, p. 465-468, 1995.
- CHENG, S.L.; ZHANG, S.F.; NELSON, T.L.; WARLOW, P.M.; CIVITELLI, R. Stimulatory of human osteoblasts differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. *Calcif. Tissue Int.*, v. 55, p. 356-362, 1994.
- CORTET, B. Combination therapy for osteoporosis. *J. B. Spin.*, v. 71, p. 363-364, 2004.
- COSMAN, F.; NIEVES, J.; WOELFERT, L.; FORMICA, C., GORDON, S., SHEN, V. Parathyroid hormone added to established hormone therapy: effects on vertebral fracture and maintenance of bone mass after parathyroid hormone withdrawal. *J. Bone. Miner. Res.*, v. 16, p. 925–931, 2001.
- FLEISCH, H.; RUSSEL, R.G.G.; BISAZ, S.; MUHLBAUER, R.C.; WILLIAMS, D.A. The inhibitory effect of diphosphonates on the formation of calcium phosphate crystal in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 1, p. 12-18, 1970.
- GAMBACCIANY, M.; SPINETTI, A.; PIAGGESI, L.; CAPPAGLI, B.; TAPONCO, F.; MANETTI, P.; WEISS, C.; TETEI, G.C.; LA COMMARE, P.; FACCHINI, V. Ipriflavone prevents the bone loss mass reduction in premenopausal women treated with gonadotropin hormone-releasing hormone agonists. *Bone Miner.*, v. 26, p. 19-26, 1994.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.
- HARRIS, S.T.; ERIKSEN, E. F.; DAVIDSON, M.; ETTINGER, M. P.; MOFFETT, A. H.; BAYLINK, D. J. Effect of combined risedronate and hormone replacement therapies on bone mineral density in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.86, p. 1890-1897, 2001.
- HOLME, D.J.; PECK, H. *Analytical biochemistry*. Singapore, Longman Singapore Publishers, 1998. 488 p.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R.O. *Basic histology*. 5.ed. Philadelphia: Prentice-Hall International Inc., 1986. 518 p.
- KATAI, Y.; KAWASE, T.; NAKANO, T.; MIKUNITABAGAKI, Y.; SAITO, S. Effects of ipriflavone and estrogen on the differentiation and proliferation of osteogenic cells. *Calcif. Tissue Int.*, v. 51, p. 11-15, 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.*, v. 4, n. 2, p. 151-154, 2003.
- LINDSAY R. Prevention and treatment of osteoporosis. *Lancet*, v. 341, p. 801-805, 1993.
- LINDSAY, R.; COSMAN, F.; LOBO, R.A.; WALSH, B.W.; HARRIS, S.T.; REAGAN, J.E. Addition of alendronate to ongoing hormone replacement therapy in the treatment of osteoporosis: a randomized, controlled clinical trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 84, p. 3076-3081, 1999.
- 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.*, v. 13, p. 581-589, 1998.
- MEYER, J.L.; NANCOLLAS, G.H. The influence of multidentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxiapatite. *Calcif. Tissue Res.*, v. 13, p. 295-303, 1973.
- MOTTA, V.T. *Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações*. 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. 419 p.
- MUNDY, G.R. Statins and their potential for osteoporosis. *Bone*, v. 29, n. 6, p. 495-497, 2001.
- 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.*, v. 53, p. 206-209, 1993.

- PASSERI, M.; BIONDI, D.; DALL'AGLIO, E.; PEDRAZONI, M.; BUFALINO, L.; CASTIGLIONE, G.N.; DI PEPPE, C.; ABATE, G. Effects of 2-year therapy with ipriflavone in elderly women with established osteoporosis. *Ital. J. Min. Electrolyte. Metab.*, v. 9, p. 137-144, 1995.
- PATSCHAN, D.; LODDENKEMPER, K.; BUTTGEREIT, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*, v. 29, n. 6, p. 498-505, 2001.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nut. Res.*, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.
- REID, I.R. Glucocorticoid osteoporosis-mechanisms and management. *Eur. J. Endocrinol.*, v. 137, n. 3, p. 209-217, 1997.
- REID, I.R.; IBBERTSON, H.K. Evidence for decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. *Horm. Res.*, v. 27, n. 4, p. 200-204, 1987.
- SAHNI, M.; GUENTHER, H.L.; FLEISCH, H.; MARTIN, T.J. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J. Clin. Invest.*, v. 91, p. 2004-2011, 1993.
- SANTOS, P. S. *Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose*. 2004. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- SARAIVA, GL.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002.
- 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*, v. 125, n. 2, p. 638-641, 1989.
- THORNDIKE, E.A.; TURNER, A. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front. Biosci.*, Tampa, v. 3, p.17-26, 1998.
- VIEIRA, J.G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 43, p. 415-422, 1999.
- YAMAMOTO, A.; YAMAMURA, T.; YOKOYAMA, S.; SUDO, H.; MATSUZAWA, Y. Combined drug therapy - cholestyramine and compactine - for familial hypercholesterolemia. *J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, v. 22, p. 493-497, 1984.
- YAMAZAKI, I. Effect of ipriflavone on the response of uterus and thyroid to estrogen. *Life Sci.*, v. 38, p. 757-764, 1986.

Recebido para publicação em 23 de março de 2005.
Aceito para publicação em 06 de janeiro de 2006.