



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Efeito combinado do ácido zoledrônico e do alfacalcidol no tratamento da osteoporose por desuso em ratos



Deepak Kumar Khajuria^{a,b,*}, Choudhary Disha^a, Rema Razdan^a e D. Roy Mahapatra^b

^a Departamento de Farmacologia, Al-Ameen College of Pharmacy, Bangalore, Índia

^b Departamento de Engenharia Aeroespacial, Laboratório de Materiais e Sistemas de Engenharia Multiescala Integrada, Indian Institute of Science, Bangalore, Índia

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 1 de maio de 2014

Aceito em 17 de agosto de 2014

On-line em 22 de outubro de 2014

Palavras-chave:

Osteoporose por desuso

Estudo com ratos

Ácido zoledrônico

Alfacalcidol

R E S U M O

Objetivos: O desuso pelo repouso no leito, pela imobilização de membros ou por missões espaciais provoca a perda óssea rápida. Fez-se este estudo para investigar os efeitos terapêuticos do ácido zoledrônico (ZOL), isoladamente e em combinação ao alfacalcidol (ALF), em um modelo de rato com osteoporose por desuso.

Métodos: Ratos Wistar machos de três meses foram submetidos à imobilização da pata tra-seira direita (IPTD) por 10 semanas para induzir a osteopenia; em seguida, foram divididos em quatro grupos: 1 – IPTD para controle positivo; 2 – IPTD mais ZOL (50 µg/kg, dose única intravenosa); 3 – IPTD mais ALF (0,5 µg/kg, via oral diariamente); 4 – IPTD mais ALF (0,5 µg/kg, via oral diariamente) mais ZOL (50 µg/kg, dose única intravenosa) por outras 10 semanas. Um grupo de ratos não imobilizados foi usado como controle negativo. No fim do tratamento, os fêmures foram removidos e testaram-se a porosidade do osso e suas propriedades mecânicas, além do peso seco e das cinzas do osso.

Resultados: A terapia combinada com ZOL mais ALF foi mais eficaz em reduzir a porosidade do osso do que a monoterapia com um dos fármacos administrado isoladamente em ratos submetidos à IPTD. No que diz respeito à melhoria da resistência mecânica da diáfise femoral média, o tratamento combinado com ZOL mais ALF foi mais eficaz do que a monoterapia com um dos fármacos administrado isoladamente. Além disso, a terapia combinada com ZOL mais ALF foi mais eficaz na melhoria do peso seco e das cinzas do osso do que a monoterapia com ZOL ou ALF em ratos submetidos à IPTD.

Conclusões: Esses dados sugerem que a terapia combinada com ZOL mais ALF representa uma opção terapêutica potencialmente útil para o tratamento da osteoporose por desuso.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

* Autor para correspondência.

E-mail: deepak.kumarkhajuria@yahoo.co.in (D.K. Khajuria).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.08.007>

0482-5004/© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Additive effect of zoledronic acid and alfacalcidol in the treatment of disuse osteoporosis in rats

A B S T R A C T

Keywords:

Disuse osteoporosis
Rat model
Zoledronic acid
Alfacalcidol

Objectives: Disuse by bed rest, limb immobilization or space flight causes rapid bone loss. We conducted the present study to investigate the therapeutic effects of zoledronic acid (ZOL), alone and in combination with alfacalcidol (ALF) in a rat model of disuse osteoporosis.

Methods: In the present study, 3-month-old male Wistar rats had their right hind-limb immobilized (RHLI) for 10 weeks to induce osteopenia, then were divided into four groups: 1- RHLI positive control; 2- RHLI plus ZOL (50 µg/kg, i.v. single dose); 3- RHLI plus ALF (0.5 µg/kg, oral gauge daily); 4- RHLI plus ALF (0.5 µg/kg, oral gauge daily) plus ZOL (50 µg/kg, i.v. single dose) for another 10 weeks. One group of non-immobilized rats was used as negative control. At the end of the treatment, the femurs were removed and tested for bone porosity, bone mechanical properties, and bone dry and ash weight.

Results: Combination therapy with ZOL plus ALF was more effective in decreasing bone porosity than each drug administered as monotherapy in RHLI rats. With respect to improvement in the mechanical strength of the femoral mid-shaft, the combination treatment of ZOL plus ALF was more effective than each drug administered as a monotherapy. Moreover, combination therapy using ZOL plus ALF was more effective in improving dry bone and ash weight, than single-drug therapy using ZOL or ALF in RHLI rats.

Conclusions: These data suggest that combination therapy with ZOL plus ALF represents a potentially useful therapeutic option for the treatment of disuse osteoporosis.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A carga mecânica é essencial para o funcionamento normal do tecido ósseo.¹ A manutenção da integridade do esqueleto, a massa óssea e a formação de osso nos membros que recebem descarga de peso são dependentes da gravidade.² A ausência de descarga de peso no esqueleto induzida pela imobilização prolongada por aparelho gessado ou tala, proteção contra o estresse decorrente da fixação de fraturas com placas, incapacidade ocasionada por uma doença crônica ou lesão medular ou ausência de peso associada a missões espaciais provoca uma diminuição da massa óssea tanto em modelos humanos quanto animais.^{2,3} A osteoporose por imobilização (desuso) provoca perda líquida de osso, como resultado de um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea.³ Por isso, é necessário considerar que a perda óssea decorrente da imobilização prolongada aumenta a suscetibilidade a fraturas em pacientes com lesões na medula espinal, idosos que necessitam de repouso no leito e astronautas durante missões espaciais prolongadas. Portanto, é essencial selecionar o tratamento ideal para o manejo eficaz da osteoporose por desuso.

Os difosfonatos inibem a reabsorção óssea conforme são seletivamente incorporados aos osteoclastos e interferem em sua ação de reabsorção.⁴ O ácido zoledrônico (ZOL) é um difosfonato de terceira geração que contém nitrogênio. É amplamente usado para a osteoporose induzida pela pós-menopausa e por glicocorticoides em seres humanos.⁵⁻⁸ Estudos com animais mostraram os efeitos do tratamento isolado com ZOL na osteoporose induzida pela imobilização.^{9,10} Embora agentes antirreabsorptivos, como os difosfonatos,

sejam eficazes na redução da perda óssea, não são capazes de induzir a formação de osso novo.^{7,10}

O alfacalcidol (1-alfa-hidroxitamina D₃ - ALF) é um análogo sintético da vitamina D, um hormônio que regula o cálcio e é frequentemente usado em diversos países no tratamento da osteoporose.^{9,11} O ALF reduz os níveis de hormônio da paratireoide, como resultado tanto do aumento na absorção de cálcio quanto da inibição da proliferação da glândula paratireoide. Também diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais contribuem para a ativação de osteoclastos. Além disso, o ALF estimula a formação e ação dos osteoblastos, o que leva a um aumento da formação óssea.¹²⁻¹⁵ Outros trabalhos demonstraram que a administração de ALF diminui o efeito da imobilização sobre o desenvolvimento de osteoporose.^{9,16}

O ZOL e o ALF estão disponíveis comercialmente na Índia. O ZOL é conhecido por inibir a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos,^{9,12,17} enquanto o ALF exerce tanto efeitos anabolizantes quanto antirreabsorção sobre o esqueleto.^{13,18,19} Acredita-se que a combinação de dois medicamentos seja um tratamento mais eficaz do que uma terapia única para a osteoporose; a combinação de difosfonatos e de um fármaco anabolizante ósseo tem sido usada clinicamente para a osteoporose pós-menopáusia.^{20,21} Dado que a perda óssea induzida pela imobilização envolve tanto o aumento da reabsorção óssea quanto a redução da formação óssea,³ parece óbvio tratar a perda de massa óssea induzida pela imobilização com um regime de tratamento antirreabsorção e anabolizante ósseo combinado, como com o ZOL e o ALF. Os efeitos da terapia combinada com ZOL e ALF foram previamente estudados em ratas ovariectomizadas,¹⁷ mas esse regime de tratamento não foi pesquisado em modelo de ratos com osteoporose por

desuso. Por conseguinte, o objetivo deste estudo é investigar a eficácia do agente anabolizante do tecido ósseo ALF, do agente antirreabsorção óssea ZOL e da combinação desses dois agentes no tratamento da osteopenia induzida pela imobilização em ratos. Em razão dos diferentes mecanismos de ação do ZOL e do ALF, a hipótese do estudo é que a combinação de ZOL com ALF facilitaria maiores melhorias nas propriedades dos ossos do que uma das duas intervenções isolada. Foram avaliados os seguintes parâmetros; (1) propriedades mecânicas da diáfise média de fêmures imobilizados (direito) e não imobilizados (esquerdo); (2) medida da porosidade de fêmures imobilizados (direito) e não imobilizados (esquerdo), (3) medição do peso seco e das cinzas de fêmures imobilizados (direito) e não imobilizados (esquerdo).

Materiais e métodos

Fármacos, produtos químicos e outros materiais

O ZOL e o ALF foram obtidos dos laboratórios Naprod Life Sciences (Maharashtra, Índia) e GlaxoSmithKline Pharmaceuticals (Mumbai, Índia), respectivamente. A cetamina, a xilazina e o xileno foram obtidos dos laboratórios Neon Pharma (Mumbai, Índia), Indian Immunologicals (Hyderabad, Índia) e S.D. Fine chemicals (Mumbai, Índia), respectivamente.

Animais experimentais

Foram incluídos no estudo ratos Wistar machos de 12 semanas de idade, com de 170 a 180 g. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com comida e água fornecidas à vontade. Os experimentos foram feitos de acordo com as diretrizes do CPCSEA (Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals), depois de obtida uma autorização ética do Institutional Animal Ethical Committee.

Metodologia do estudo pré-clínico

Aos três meses, a pata posterior direita dos ratos foi imobilizada contra o abdome sob anestesia com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal, de acordo com um novo método de imobilização de membros posteriores descrito por Khajuria et al.⁹

Os ratos foram divididos em cinco grupos (seis ratos por grupo). 1 – grupo não imobilizado (controle negativo); 2 – IPTD (controle positivo) por 20 semanas; 3 – IPTD por 10 semanas e, em seguida, IPTD mais ZOL (50 μ g/kg, em dose única intravenosa) por mais 10 semanas; 4 – IPTD por 10 semanas e, em seguida, IPTD mais ALF (0,5 μ g/kg, por via oral diariamente) por mais 10 semanas; 5 – IPTD durante 10 semanas, em seguida, IPTD mais ALF (0,5 μ g/kg, por via oral diariamente) mais ZOL (50 μ g/kg, em dose única intravenosa) durante mais 10 semanas. A dose oral diária em caso de grupos com IPTD tratados com ALF e ZOL mais ALF exigiu algum manejo dos animais e criou algum estresse para eles. Portanto, o grupo não imobilizado (controle negativo) e os grupos IPTD (controle positivo) e IPTD mais ZOL receberam administração de veículo (soro fisiológico comum) por via oral durante 10 semanas. Todos

os ratos submetidos à IPTD foram alojados em gaiola individual de polipropileno (tamanho: 421 \times 290 \times 190 mm, com intervalo de 7 mm entre as grades) durante o período do experimento. As doses de medicação usadas neste experimento foram selecionadas a partir de um estudo anterior feito pelos autores, conduzido em modelos de ratos com osteoporose pós-menopáusia.¹⁷ No fim do tratamento experimental, todos os grupos foram eutanasiados por uma overdose de anestesia. Em todos os ratos, as patas imobilizadas (direita) e não imobilizadas (esquerda) foram excisadas e submetidas à remoção de gordura e tecidos conjuntivos. Os fêmures foram embebidos em gaze com soro fisiológico e congelados a -20° C até análise posterior. Tanto os fêmures imobilizados (direito) quanto não imobilizados (esquerdo) foram usados para a medição da porosidade do osso, das propriedades biomecânicas, do comprimento do fêmur, do peso seco e das cinzas dos fêmures.

Peso corporal e comprimento femoral final

O peso corporal (expresso em gramas) foi monitorado no início e no fim do experimento. O comprimento do fêmur foi medido com um paquímetro.

Medição da porosidade do osso por radiografia

Os fêmures direitos de todos os animais foram radiografados com o aparelho Fox-Rayzor, que é um sistema de inspeção por raios-X portátil equipado com a ferramenta de software Calculate Histogram, de acordo com um método previamente descrito na literatura.²² Em resumo, para a análise das radiografias do fêmur dos ratos, o fêmur foi dividido em quatro áreas iguais, que incluíram a epífise femoral distal (R1), a diáfise femoral (R2 e R3) e a epífise femoral proximal (R4).

Testes biomecânicos de resistência óssea

As propriedades mecânicas da diáfise média do fêmur foram medidas por meio do teste de flexão de três pontos, com um aparelho de ensaio universal (BISS Makron, Bangalore, Índia). A resistência do fêmur foi avaliada pelo teste de flexão de três pontos, conforme descrito anteriormente.²² Resumidamente, os fêmures foram removidos do congelador a -20° C e re-hidratados em soro fisiológico durante quatro horas à temperatura ambiente. O peso hidratado dos ossos foi determinado com uma balança digital de quatro casas decimais. O comprimento dos ossos foi medido com um paquímetro. As amostras foram colocadas em dois suportes, que foram separados por uma distância de 12 mm e dobrados até a fratura, abaixando a cruzeta posicionada no meio da diáfise a uma velocidade constante de 0,033 mm/s. A partir da curva carga-deslocamento, foram obtidos o pico de carga (N), a rigidez máxima (N/mm) e a dureza (mJ). A resistência máxima (tensão) e o módulo de elasticidade foram obtidos das curvas de carga-deformação levantadas por meio de equações descritas previamente na literatura.²²

Medição do peso seco e das cinzas do fêmur

Depois de se fazer o teste de flexão de três pontos, os fêmures de todos os animais foram desidratados com etanol e a

gordura foi removida com éter dietílico. A seguir, deixou-se que os ossos secassem ao ar livre e o peso seco foi mensurado com uma balança digital. Em seguida, os fêmures secos foram queimados e reduzidos a cinzas a 900° C, durante cinco horas, e o peso de cinzas foi quantificado.

Análise estatística

Todos os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão (DP). Para todos os dados, as comparações entre os diferentes tratamentos foram analisadas pelo Anova one-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças entre o lado imobilizado e o não imobilizado foram comparadas com o Wilcoxon signed-rank test. Em todos os casos, uma probabilidade de erro inferior a 0,05 foi selecionada como critério para a significância estatística. Os gráficos foram elaborados com o programa Graph Pad Prism (versão 5.0 para Windows).

Resultados

Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso corporal e comprimento do fêmur

Dez semanas depois da IPTD, os pesos corporais foram significativamente mais baixos nos animais do grupo IPTD (controle positivo) e dos grupos de tratamento submetidos à IPTD, em comparação com o grupo normal não imobilizado. Essa diferença tornou-se maior no fim do experimento (IPTD por outras 10 semanas). No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas nos pesos observados entre qualquer um dos grupos de tratamento ativo e o grupo IPTD (controle positivo) (tabela 1).

Não houve diferenças significativas no comprimento dos fêmures imobilizados (direito) entre o grupo de controle positivo ($39,89 \pm 1,3$ mm), grupo ZOL ($40,23 \pm 4,7$ mm), grupo ALF ($39,78 \pm 8,4$ mm), grupo ZOL + ALF ($40,69 \pm 10,4$) e grupo controle normal ($41,09 \pm 2,2$ mm). Além disso, não houve diferenças estatisticamente significativas entre o lado

imobilizado (direito) e o não imobilizado (esquerdo) (dados não mostrados).

Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porosidade do osso

A imagem de raios-X mostra a diferença na intensidade de transmissão de raios-X de acordo com a porosidade do espécime. A intensidade da transmissão de raios-X é diretamente proporcional à porosidade. Os efeitos da IPTD e do tratamento subsequente com todas as intervenções terapêuticas sobre a porosidade do fêmur direito foram medidos por imagem de raios-X, como mostrado na figura 1. A intensidade dos raios-X no grupo IPTD (controle positivo) em R1 (epífise distal), R2 (diáfise distal), R3 (diáfise proximal) e R4 (epífise proximal) foi significativamente maior do que no grupo normal não imobilizado, o que indica que a imobilização provocou um aumento na porosidade óssea nessas áreas.

Depois de 10 semanas de tratamento, todos os tratamentos ativos (individuais e combinados) conseguiram diminuir a porosidade óssea em ratos submetidos à IPTD. Os valores da intensidade da transmissão de raios-X em R1 (epífise distal do fêmur) nos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF foi menor do que no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,001$). Do mesmo modo, os valores da intensidade da transmissão de raios-X em R2 (diáfise do fêmur distal) nos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF foi menor do que no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,01$, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Similarmente, os valores da intensidade da transmissão de raios-X em R3 (diáfise femoral proximal) nos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF foi menor do que no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente). Além disso, os valores da intensidade da transmissão de raios-X em R4 (epífise femoral proximal) nos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF foi menor do que no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Em contraste, a intensidade de transmissão de raios-X no grupo ZOL + ALF foi significativamente mais baixa do que nos grupos ZOL e ALF nas regiões R1, R2, R3 e R4 ($p < 0,05$).

Efeito dos diferentes tratamentos sobre as propriedades mecânicas da diáfise femoral média

A figura 2 mostra o pico de carga, a rigidez máxima, a dureza, a resistência máxima e o módulo de elasticidade na diáfise femoral, respectivamente. Os testes de flexão de três pontos do fêmur direito indicaram que a IPTD causou reduções significativas no pico de carga, na rigidez máxima, na dureza, na resistência máxima e no módulo de elasticidade em comparação com o grupo normal não imobilizado ($p < 0,001$).

Nos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF, o pico de carga do fêmur foi significativamente maior do que no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Do mesmo modo, nos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF, a rigidez máxima do fêmur foi significativamente maior do que no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). A dureza do fêmur nos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF foi significativamente maior do que no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,01$, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). Em todos os tratamentos individuais, a dureza

Tabela 1 – Efeitos dos diferentes tratamentos sobre o peso corporal

Grupo	Peso corporal	
	Pré-tratamento (g)	Pós-tratamento (g)
Controle normal	253,2 \pm 10,65 ^a	320,1 \pm 13,39 ^a
IPTD (controle positivo)	230,1 \pm 18,22	216,6 \pm 9,01
IPTD + ZOL	229,4 \pm 11,22	218,0 \pm 10,19
IPTD + ALF	232,8 \pm 17,15	223,4 \pm 12,18
IPTD + ZOL + ALF	225,8 \pm 13,34	212,6 \pm 11,13

O pré-tratamento mostra os dados relativos ao dia anterior ao início do tratamento. O pós-tratamento mostra dados do último dia de tratamento. Os dados são expressos como a média \pm DP ($n = 6$), avaliados pelo Anova one-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

^a $p < 0,001$, comparado com o grupo IPTD (controle positivo). Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).

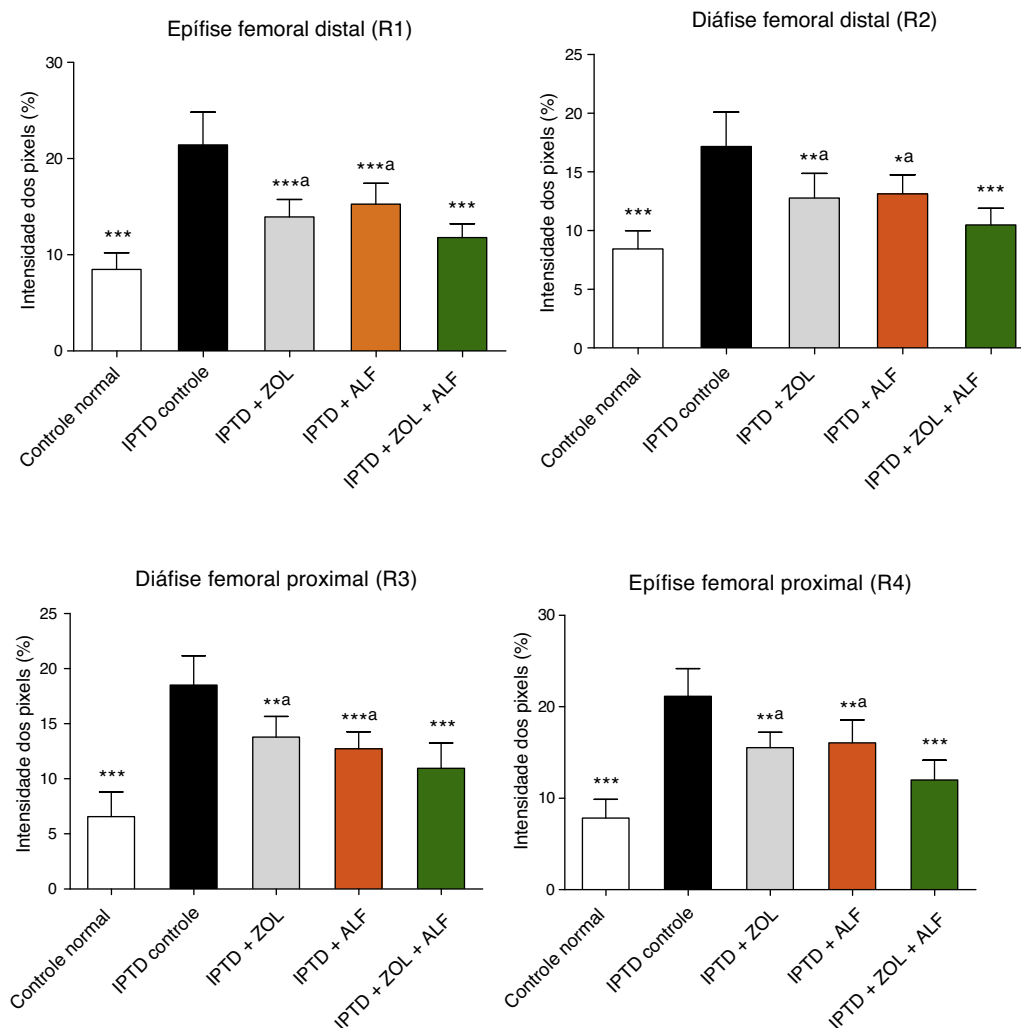


Figura 1 – Efeito do ácido zoledrônico e do alfacalcidol, isolados ou em combinação, sobre a porosidade femoral. Porosidade óssea em R1: epífise femoral distal, R2: diáfise femoral distal, R3: diáfise femoral proximal, R4: epífise femoral proximal. Os dados são expressos como a média \pm DP (n = 6), avaliados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$, comparado com o grupo IPTD (controle positivo); ^a $p < 0,05$, comparado com o grupo ZOL + ALF. Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).**

foi significativamente mais baixa do que no grupo ALF + ZOL ($p < 0,05$). Além disso, nos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF, a resistência máxima do fêmur foi significativamente maior do que no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,001$). Nos grupos ZOL e ALF, a resistência máxima era significativamente menor do que no grupo ZOL + ALF ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Além disso, o módulo de elasticidade dos grupos ZOL, ALF e ZOL + ALF foi significativamente maior quando comparado com o grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Em todos os tratamentos individuais, o módulo de elasticidade foi significativamente mais baixo do que no grupo ZOL + ALF ($p < 0,05$).

Comparação do efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso seco e das cinzas dos fêmures imobilizados e não imobilizados em ratos

A IPTD induziu a uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$) no peso seco e das cinzas dos fêmures imobilizados dos ratos controle (grupo IPTD) em comparação

com os ratos controle normais não imobilizados (tabela 2). No fêmur da pata traseira direita imobilizada de ratos tratados com terapias individuais e combinadas, o peso da biomassa seca e das cinzas foi significativamente maior do que no grupo IPTD (controle positivo). No fêmur da pata traseira direita imobilizada de ratos tratados com ZOL + ALF, o peso seco foi significativamente maior do que nos grupos ZOL ou ALF ($p < 0,05$ no grupo ALF). Além disso, no fêmur da pata traseira direita imobilizada de ratos tratados com ZOL + ALF, o peso das cinzas era significativamente maior do que nos grupos tratados com ZOL ou ALF ($p < 0,05$ no grupo ALF). Nos fêmures esquerdos não imobilizados não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos submetidos a tratamentos isolados ou combinados e o grupo normal não imobilizado.

Comparação entre a pata não imobilizada (esquerda) e a imobilizada (direita) dentro de um mesmo grupo

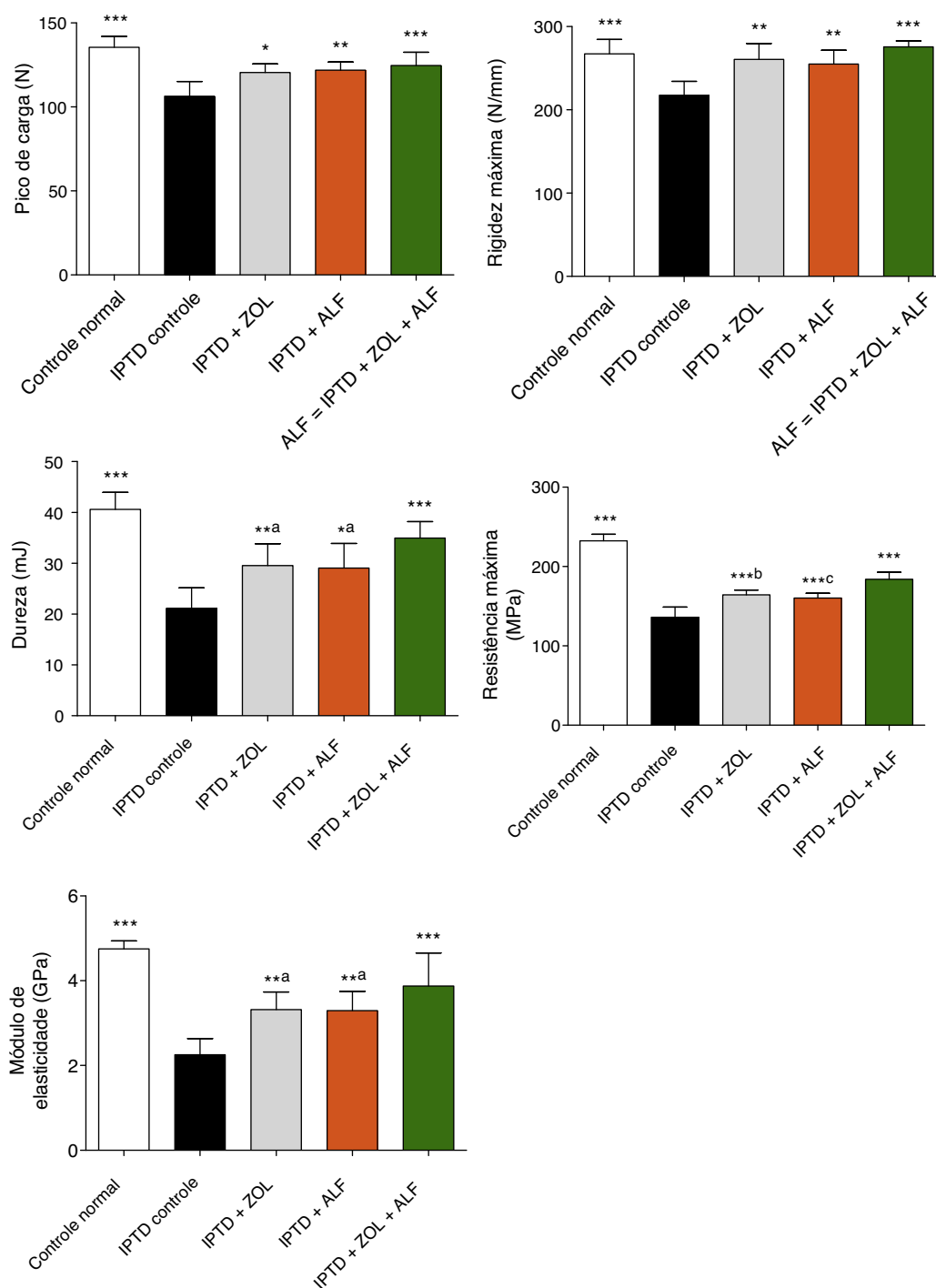


Figura 2 – Efeitos do ácido zoledrônico, alfacalcidol ou ácido zoledrônico mais alfacalcidol sobre a resistência mecânica da diáfise média do fêmur. A diáfise foi submetida ao teste de flexão de três pontos até a falha, que forneceu dados sobre o pico de carga, a rigidez máxima, a dureza, a resistência máxima e o módulo de elasticidade. Os dados são expressos como a média \pm DP ($n = 6$), avaliados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado com o grupo IPTD (controle positivo); ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$, comparado com o grupo ZOL + ALF. Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).

A porosidade do osso e as propriedades mecânicas das patas esquerda e direita estão representadas como diagramas de barras nas [figuras 3 e 4](#), respectivamente. O asterisco indica que houve diferença estatisticamente significativa entre as patas esquerda e direita dentro de um mesmo grupo. Nas

regiões R1, R2, R3 e R4, a intensidade de transmissão de raios-X no lado imobilizado (direito) pareceu significativamente mais elevada do que no lado não imobilizado (esquerdo) no grupo IPTD (controle positivo) ($p < 0,001$). Do mesmo modo, nas regiões R1, R2, R3 e R4, a intensidade de transmissão de raios-X

Tabela 2 – Efeitos da imobilização e dos diferentes tratamentos sobre o peso seco e das cinzas do fêmur

Grupo	Fêmur esquerdo não imobilizado		Fêmur direito imobilizado	
	Peso do osso seco (mg/osso)	Peso das cinzas do osso (mg/osso)	Peso do osso seco (mg/osso) ^a	Peso das cinzas do osso (mg/osso) ^a
Controle normal	630,7 ± 8,1	381,4 ± 7,7	639,8 ± 12,2 ^b	385,7 ± 9,4 ^b
IPTD (controle positivo)	620,5 ± 10,9	368,9 ± 4,3	543,9 ± 15,5	321,5 ± 11,5
IPTD + ZOL	622,1 ± 18,1	379,1 ± 7,2	593,7 ± 13,7 ^{b,c}	351,7 ± 9,8
IPTD + ALF	627,5 ± 12,1	382,4 ± 9,6	583,5 ± 9,4 ^{b,c}	349,5 ± 7,6 ^{b,c}
IPTD + ZOL + ALF	640,7 ± 14,8	392,2 ± 13,6	619,1 ± 12,1 ^b	369,9 ± 9,4 ^b

Os dados são expressos como a média ± DP (n=6), avaliados pelo Anova one-way, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

^a Indica, para o parâmetro, uma diferença significativa dos tratamentos ativos entre os dois casos.

^b p < 0,001, comparado com o grupo IPTD (controle positivo); patas.

^c p < 0,05, comparado com o grupo ZOL + ALF.

no lado imobilizado (direito) pareceu significativamente mais elevada do que no lado não imobilizado (esquerdo) nos grupos submetidos à IPTD tratados com ZOL ou ALF (p < 0,05). Em contraste, o grupo IPTD tratado com ZOL + ALF mostrou proteção completa contra a osteoporose por desuso nas regiões R1, R2,

R3 e R4, conforme indicado pelos valores de intensidade de transmissão de raios-X (fig. 3).

Na diáfise femoral média (teste de flexão de três pontos), o efeito da imobilização foi muito pronunciado nos grupos submetidos à IPTD (controle positivo); ou seja, o lado imobilizado

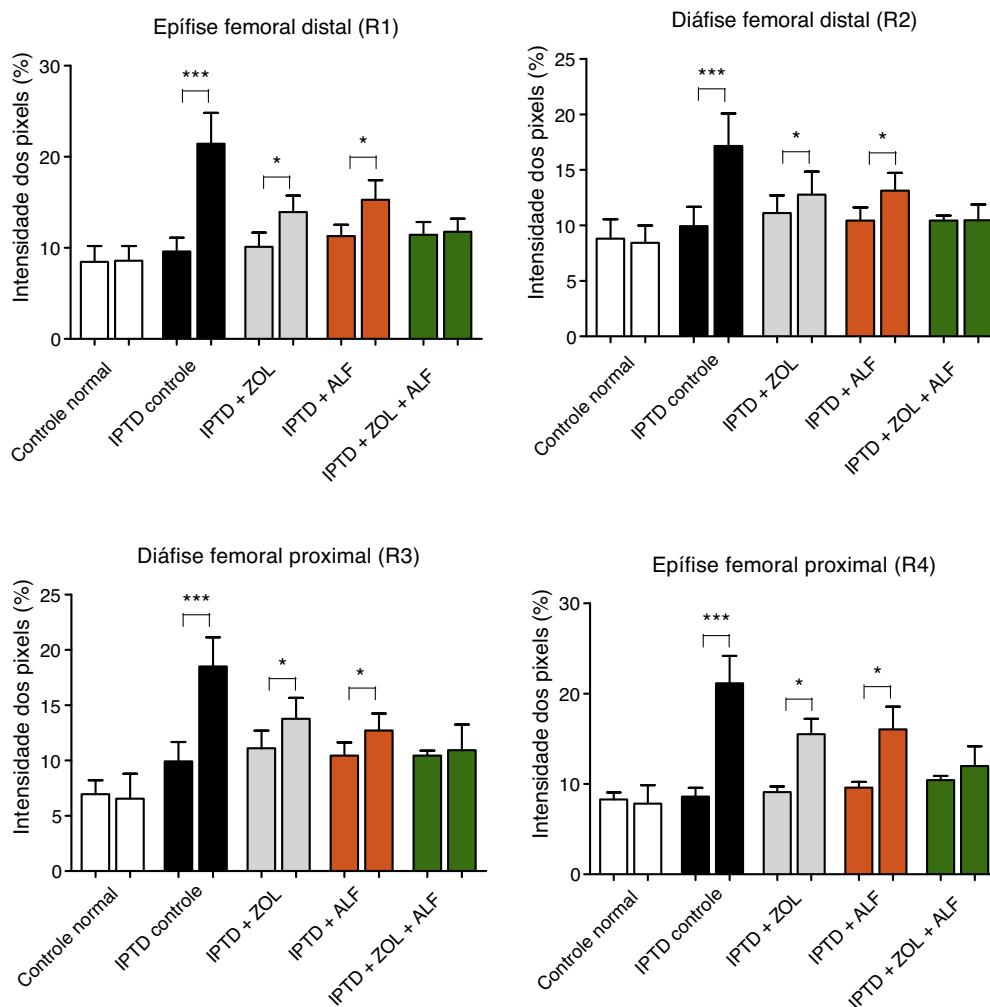


Figura 3 – Porosidade do fêmur do lado não imobilizado (barra da esquerda) e do lado imobilizado (barra da direita) dentro de um mesmo grupo. O asterisco indica a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre o lado não imobilizado e o lado imobilizado (média ± DP). Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).

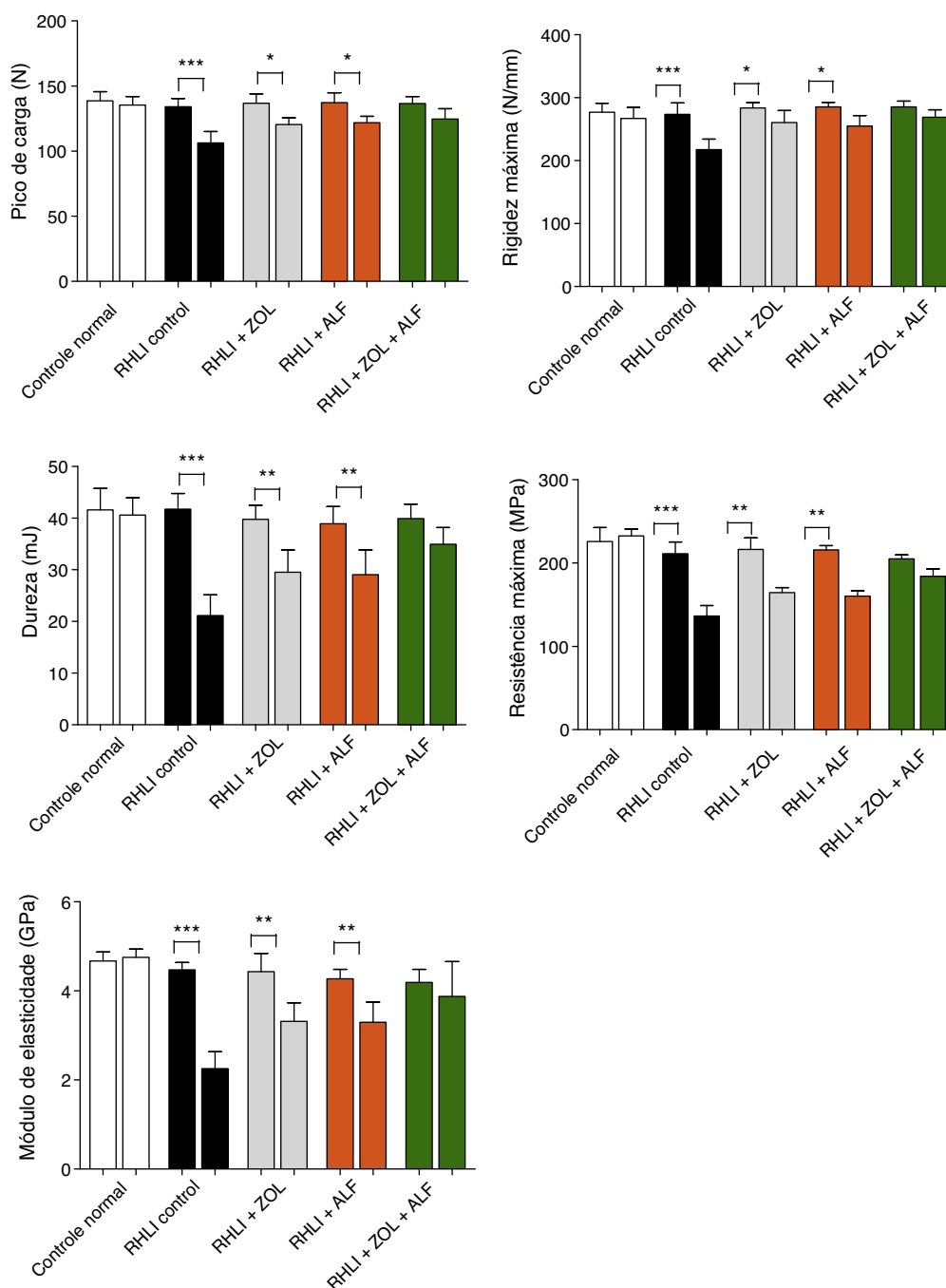


Figura 4 – Propriedades mecânicas do lado não imobilizado (barra da esquerda) e do lado imobilizado (barra da direita) dentro de um mesmo grupo. A diáfise femoral foi submetida ao teste de flexão de três pontos até a falha, o que forneceu dados sobre o pico de carga, a rigidez máxima, a dureza, a resistência máxima e o módulo de elasticidade. O asterisco indica a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre o lado não imobilizado e o lado imobilizado (média ± DP). Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).

(direito) apresentou valores significativamente menores nos parâmetros de resistência, incluindo o pico de carga, a rigidez máxima, a dureza, a resistência máxima e o módulo de elasticidade, do que o lado não imobilizado (esquerdo) ($p < 0,001$). Do mesmo modo, nos grupos submetidos à IPTD tratados com ZOL ou ALF, o lado imobilizado (direito) apresentou valores

de parâmetros de resistência significativamente menores ($p < 0,01$), incluindo um menor pico de carga, rigidez máxima, dureza, resistência máxima e módulo de elasticidade do que o lado não imobilizado (esquerdo). Em contraste, o grupo submetido à IPTD tratado com ZOL + ALF mostrou proteção completa contra a imobilização (fig. 4).

Discussão

Que se tem conhecimento, os efeitos combinados dos agentes antirreabsorção e anabolizantes sobre o esqueleto ainda não foram especialmente avaliados em modelos de rato com osteoporose por desuso. O presente estudo foi feito para esclarecer a eficácia da administração combinada de ZOL e ALF na qualidade geral do osso em ratos submetidos à IPTD. Os resultados deste estudo mostraram que a monoterapia com ZOL e ALF é capaz de neutralizar a perda óssea em um modelo de rato com osteoporose por desuso. A propriedade antiosteoporótica do ZOL mais a combinação com o ALF parece ser mais eficaz quando comparada com a monoterapia com ZOL ou ALF. Assim, confirmaram-se os efeitos benéficos da administração combinada de ZOL e ALF para o tratamento da osteoporose por desuso em ratos.

O peso corporal do grupo normal foi maior do que o do grupo IPTD (controle positivo). Isso pode ter sido decorrente da anestesia administrada durante o processo de imobilização. A alimentação diminuída e a mobilidade geral reduzida são outros possíveis fatores que podem ter contribuído de modo secundário para o desenvolvimento de um menor peso corporal e da perda de massa óssea. Estudos anteriores demonstraram uma diminuição semelhante no peso corporal depois da IPTD.^{9,23} O comprimento do fêmur no membro imobilizado não foi significativamente diferente daquele do fêmur não imobilizado intacto do mesmo rato, o que sugere que o crescimento longitudinal do osso não é retardado nesses animais. Portanto, é mais provável que neste caso estejamos lidando com a osteoporose pela imobilização, em vez do simples atraso no crescimento.

Observou-se um aumento proeminente na porosidade do osso em R1, R2, R3 e R4 depois da imobilização da pata traseira direita. O aumento da porosidade do osso nas regiões R1, R2, R3, R4 do fêmur do rato em razão da falta de descarga de peso na pata traseira direita foi suprimido pelo tratamento com ZOL, ALF e ZOL + ALF. Na análise da porosidade óssea do fêmur de rato com a imagem por raios-X, verificou-se que a terapia combinada com ZOL + ALF foi estatisticamente superior à monoterapia com ZOL ou ALF na supressão do aumento da porosidade óssea decorrente da IPTD. Isso indica que a terapia combinada com ZOL + ALF engrossa e fortalece o osso cortical.

Deve-se observar que nos ratos tratados com ZOL, ALF e ZOL + ALF, o peso seco e das cinzas do fêmur direito imobilizado foi significativamente maior do que no grupo IPTD (controle positivo). Além disso, nos animais tratados com terapia combinada (ZOL + ALF), o peso seco e das cinzas do fêmur direito imobilizado foi significativamente maior do que nos grupos ZOL ou ALF. Esses resultados mostram que o tratamento combinado com ZOL + ALF é benéfico em aumentar a massa óssea do fêmur do rato, que estava diminuída em decorrência da IPTD.

As propriedades mecânicas do osso estão relacionadas com a densidade, arquitetura, conectividade e mineralização óssea.²³ A imobilização resulta em redução das propriedades mecânicas,^{9,24} o que foi observado neste estudo. Neste experimento, as propriedades mecânicas do osso femoral de ratos diminuíram no grupo IPTD (controle positivo) quando

comparados com o grupo controle normal não imobilizado, o que sugere um aumento da fragilidade do osso cortical de ratos submetidos à IPTD. Os resultados do teste de flexão de três pontos de ratos tratados com ZOL, ALF e ZOL + ALF indicam um maior pico de carga máxima, rigidez, energia (dureza), resistência à flexão e módulo de elasticidade em comparação com os ratos do grupo IPTD (controle positivo). A terapia combinada com ZOL 50 + ALF foi estatisticamente superior à monoterapia com ZOL ou ALF no aumento da dureza da diáfise média do fêmur, da resistência máxima e do módulo de elasticidade.

A comparação entre a pata não imobilizada (esquerda) e a imobilizada (direita) dentro de um mesmo grupo mostrou que as propriedades ósseas foram melhoradas por todas as intervenções terapêuticas, mas a osteopenia marcada induzida pela IPTD não foi completamente corrigida com a monoterapia com ZOL ou ALF. Em contraste, o tratamento combinado com ZOL + ALF mostrou proteção completa contra a osteoporose por desuso, o que sugere que a terapia combinada tem uma vantagem terapêutica sobre ambos os fármacos em monoterapia para o tratamento da osteoporose por desuso.

O tratamento para a osteoporose tem sido dominado por agentes antirreabsorção, principalmente os difosfonatos (risedronato, alendronato, ibandronato, pamidronato, ácido zoledrônico etc.), que impedem uma perda óssea adicional na osteoporose já estabelecida, mas não alteram a massa óssea nem repõem o osso já perdido.^{7,10,25} Nesta pesquisa experimental, preferiu-se o ZOL em detrimento dos outros difosfonatos disponíveis na Índia. O ZOL tem várias vantagens sobre os outros difosfonatos: (1) a vantagem óbvia do ZOL sobre os outros difosfonatos é seu elevado nível de adesão, que é possível em razão de sua aplicação em ambiente controlado com infusão uma vez por ano administrada sob supervisão médica. Considerando as baixas taxas de adesão dos difosfonatos orais, isso é um avanço médico significativo;²⁶ (2) os difosfonatos orais não são facilmente absorvidos pelo intestino e apresentam biodisponibilidade variável. Portanto, é necessária a administração de altas doses por via oral, que causam efeitos adversos como a esofagite;⁷ (3) verificou-se que em condições susceptíveis de estimular a ligação do difosfonato ao osso, o ZOL tem a maior afinidade de ligação com a hidroxiapatita óssea entre todos os outros difosfonatos;²⁷ (4) o custo do ZOL é comparável ao custo anual dos difosfonatos orais e é mais barato do que o outro difosfonato intravenoso (ibandronato), que é administrado a cada três meses.²⁷ No entanto, as administrações parenterais de difosfonatos têm mostrado uma fase aguda de resposta, hipocalcemia e hiperparatireoidismo secundário, dor musculoesquelética, complicações renais, osteonecrose da mandíbula e eventos oculares em alguns casos.^{7,27,28} Os resultados do nosso estudo anterior mostraram que uma dose mais baixa de ZOL (50 µg/kg, em dose única intravenosa) apresenta efeitos benéficos e promissores semelhantes no tratamento da osteoporose em comparação com a dose terapêutica de ZOL (100 µg/kg, em dose única intravenosa) em ratos com deficiência de estrogênio.²⁹ Por conseguinte, para reduzir o risco de reações adversas conhecidas ao ZOL, optou-se por uma dose mais baixa de ZOL (50 µg/kg, dose única intravenosa).

O ALF é usado para tratar a osteoporose porque exerce tanto efeitos anabolizantes quanto antirreabsorção sobre o esqueleto.^{13,18,19} Entretanto, as doses mais elevadas de ALF podem aumentar o risco de hipercalcemia ou hipercalcúria. Por outro lado, o tratamento com ZOL pode causar hipocalcemia pela supressão da reabsorção de osso.¹⁷ Os diferentes mecanismos do ZOL e do ALF sugerem que a terapia combinada com ambos os medicamentos pode eliminar ou minimizar o risco de apresentar as reações adversas conhecidas descritas previamente quando esses dois fármacos foram administrados isoladamente. Com base nos achados de estudos prévios e atuais, propõe-se que a terapia combinada com ZOL + ALF atua ao aumentar a formação óssea (por meio da estimulação da formação e ação dos osteoblastos) e diminuir a reabsorção óssea (por meio da indução da apoptose dos osteoclastos) e reequilibra, assim, o *turnover* ósseo em favor da formação de osso, um efeito que resulta em um aumento da massa e resistência óssea. Isso possivelmente pode explicar como a terapia combinada com ZOL + ALF foi mais eficaz do que a monoterapia com ALF ou ZOL no aumento da massa óssea e resistência em ratos submetidos à IPTD.

Este estudo tem várias limitações: (1) os ratos são animais quadrúpedes e, por conseguinte, experimentam um padrão de carga diferente daquele dos seres humanos; (2) o padrão de remodelação óssea no rato é diferente daquele dos seres humanos; (3) neste estudo, foi usado um modelo de rato em crescimento. Assim, os ganhos relacionados com a maturação da massa óssea não podem ser ignorados em ratos submetidos à IPTD; (4) Além disso, o efeito do ZOL e do ALF sobre a porosidade cortical, o que pode ser observado em ratos envelhecidos submetidos à IPTD, não foi avaliado. Por conseguinte, os resultados deste estudo não podem ser extrapolados para seres humanos com osteoporose por desuso primária. Assim, são necessários mais estudos para confirmar os efeitos benéficos da administração combinada de ZOL e ALF sobre a massa óssea em ratos submetidos à IPTD.

Conclusões

Este estudo *in vivo* inicialmente mostrou que a terapia combinada com ZOL + ALF é altamente eficaz na melhoria das propriedades do osso em um modelo de ratos com osteoporose por desuso. Isso sugere que a terapia combinada tem uma vantagem terapêutica sobre a monoterapia com ZOL ou ALF no tratamento da osteoporose por desuso induzida pela inatividade mecânica. Assim, esse regime combinado pode ser de interesse para avaliação adicional por ensaios clínicos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Sr. B. K Jain, da Naprod Life Sciences, Maharashtra, Índia, por fornecer amostras grátis do ácido zoledrônico. Os autores também agradecem a contribuição do Sr. Vijay Kumar e do Sr. Manish Kumar Priyadarshi, do

Departamento de Engenharia Aeroespacial, Instituto Indiano de Ciência, pela feitura das imagens de raios-X e dos testes de flexão de três pontos.

REFERÊNCIAS

- Li CR, Zhang GW, Niu YB, Pan YL, Zhai YK, Mei QB. Antiosteoporosis effect of Radix Scutellariae extract on density and microstructure of long bones in tail-suspended sprague-dawley rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013:753703.
- Barou O, Lafage-Proust MH, Martel C, Thomas T, Tirode F, Laroche N, et al. Bisphosphonate effects in rat unloaded hindlimb bone loss model: three-dimensional microcomputed tomographic, histomorphometric, and densitometric analyses. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;291:321-8.
- Waters DJ, Caywood DD, Turner RT. Effect of tamoxifen citrate on canine immobilization (disuse) osteoporosis. *Vet Surg*. 1991;20:392-6.
- Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*. 2008;19:733-59.
- Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 2007;356:1809-22.
- Lambrinoudaki I, Vlachou S, Galapi F, Papadimitriou D, Papadias K. Once-yearly zoledronic acid in the prevention of osteoporotic bone fractures in postmenopausal women. *Clin Interv Aging*. 2008;3:445-51.
- Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Drugs for the management of osteoporosis: a review. *Rev Bras Reumatol*. 2011;51:365-82.
- Reid DM, Devogelaer JP, Saag K, Roux C, Lau CS, Reginster JY, Papanastasiou P, et al. Zoledronic acid and risedronate in the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis (Horizon): a multicentre, double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. *Lancet*. 2009;373:1253-63.
- Khajuria DK, Disha C, Razdan R, Mahapatra DR, Vasireddi R. Prophylactic effects of propranolol versus standard therapy on a new model of disuse osteoporosis in rats. *Sci Pharm*. 2014;82:357-74.
- Vegger JB, Nielsen ES, Brüel A, Thomsen JS. Additive effect of PTH (1-34) and zoledronate in the prevention of disuse osteopenia in rats. *Bone*. 2014 [Epub ahead of print].
- Shiraishi A, Miyabe S, Nakano T, Umakoshi Y, Ito M, Mihara M. The combination therapy with alfacalcidol and risedronate improves the mechanical property in lumbar spine by affecting material properties in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009;10:66.
- Khajuria DK, Disha C, Razdan R, Mahapatra DR. Comparative evaluation of zoledronic acid, alfacalcidol, and propranolol in pharmacological correction of experimental osteoporosis. *Lat Am J Pharm*. 2013;32:968-76.
- Erben RG. Vitamin D analogs and bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;2:59-69.
- Schacht E, Dukas L, Richey F. Combined therapies in osteoporosis: bisphosphonates and vitamin D-hormone analogs. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007;7:174-84.
- de Nijs RN, Jacobs JW, Lems WF, Laan RF, Algra A, Huisman AM, et al. Alendronate or alfacalcidol in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*. 2006;355:675-84.
- Izawa Y, Makita T, Hino S, Hashimoto Y, Kushida K, Inoue T, et al. Immobilization osteoporosis and active vitamin D:

- effect of active vitamin D analogs on the development of immobilization osteoporosis in rats. *Calcif Tissue Int.* 1981;33:623-30.
17. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Zoledronic acid in combination with alfacalcidol has additive effects on trabecular microarchitecture and mechanical properties in osteopenic ovariectomized rats. *J Orthop Sci.* 2014 [Epub ahead of print].
 18. Iwamoto J, Matsumoto H, Takeda T, Sato Y, Xu E, Yeh JK. Effects of alendronate and alfacalcidol on the femoral bone mass and bone strength in orchidectomized rats. *Chin J Physiol.* 2008 Dec 31;51:331-7.
 19. Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Yeh JK. Effect of risedronate on the cortical and cancellous bone mass and mechanical properties in ovariectomized rats: a comparison with the effects of alfacalcidol. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2006;52:393-401.
 20. Frediani B, Allegri A, Bisogno S, Marcolongo R. Effects of combined treatment with calcitriol plus alendronate on bone mass and bone turnover in postmenopausal osteoporosis: two years of continuous treatment. *Clin Drug Invest.* 1998;15:235-44.
 21. Malavolta N, Zanardi M, Veronesi M, Ripamonti C, Gnudi S. Calcitriol and alendronate combination treatment in menopausal women with low bone mass. *Int J Tissue React.* 1999;21:51-9.
 22. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR, Bhat MR. Osteoprotective effect of propranolol in ovariectomized rats: a comparison with zoledronic acid and alfacalcidol. *J Orthop Sci.* 2013;18:832-42.
 23. Faibish D, Ott SM, Boskey AL. Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;443:28-38.
 24. Mosekilde L, Thomsen JS, Mackey MS, Phipps RJ. Treatment with risedronate or alendronate prevents hind-limb immobilization-induced loss of bone density and strength in adult female rats. *Bone.* 2000;27:639-45.
 25. Shirke SS, Jadhav SR, Jagtap AG. Methanolic extract of *Cuminum cyminum* inhibits ovariectomy-induced bone loss in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008;233(11):1403-10.
 26. Schumann SA, Hickner J. Annual zoledronic acid infusion lowers risk of fracture, death. *J Fam Pract.* 2007;56:1013-6.
 27. Papapoulos SE. Bisphosphonates: how do they work? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22:831-47.
 28. Su K, Shi X, Varshney RR, Wang D. Transplantable delivery systems for in situ controlled release of bisphosphonate in orthopedic therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8:113-26.
 29. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. The combination therapy with zoledronic acid and propranolol improves the trabecular microarchitecture and mechanical property in an rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Osteoporos.* 2014, 2014:586431.