



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Efeitos combinados do ácido zoledrônico e do propranolol sobre a densidade óssea e marcadores bioquímicos de remodelação óssea em ratas osteopênicas submetidas à ovariectomia



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

^a Departamento de Farmacologia, Faculdade de Farmácia Al-Ameen, Bangalore, Índia

^b Laboratory for Integrative Multiscale Engineering Materials and Systems, Departamento de Engenharia Aeroespacial, Instituto Indiano de Ciência, Bangalore, Índia

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 1 de maio de 2014

Aceito em 21 de setembro de 2014

On-line em 7 de novembro de 2014

Palavras-chave:

Estudo com ratos

Osteoporose pós-menopáusia

Ácido zoledrônico

Propranolol

R E S U M O

Objetivos: Este estudo foi desenvolvido para investigar a eficácia e a segurança do ácido zoledrônico (ZOL) e do propranolol (PRO) como monoterapia e terapia combinada em um modelo de rato com osteoporose pós-menopáusia.

Métodos: Ratas Wistar fêmeas foram ovariectomizadas (OVX) ou submetidas à cirurgia simulada (placebo) aos três meses de idade. Doze semanas depois da cirurgia, as ratas foram divididas em seis grupos: (1) placebo + veículo; (2) OVX + veículo; (3) OVX + ZOL (100 µg/kg, dose única intravenosa); (4) OVX + ZOL (50 µg/kg, dose única intravenosa); (5) OVX + PRO (0,1 mg/kg, via subcutânea, cinco dias por semana); (6) OVX + ZOL (50 µg/kg, dose única intravenosa) + PRO (0,1 mg/kg, via subcutânea, cinco dias por semana) durante 12 semanas.

Depois do tratamento, testou-se a densidade óssea, a porosidade e a microarquitetura trabecular dos fêmures. Também foram avaliados marcadores bioquímicos séricos e urinários. **Resultados:** A terapia combinada com ZOL mais PRO foi mais eficaz em corrigir a diminuição do cálcio sérico e o aumento do nível sérico de fosfatase alcalina e fosfatase ácida resistente ao tartarato do que a monoterapia com ZOL ou PRO. Além disso, a terapia combinada com ZOL mais PRO foi mais eficaz em corrigir o aumento dos níveis urinários de cálcio, fósforo e creatinina do que a monoterapia com ZOL ou PRO. A terapia combinada com ZOL mais PRO também preservou a microarquitetura trabecular e a porosidade do osso cortical.

Conclusão: Os resultados sugerem que a terapia combinada com ZOL mais PRO pode ser a abordagem mais eficaz para o tratamento da osteoporose grave em humanos.

© 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.2014.09.006>

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

Additive effects of zoledronic acid and propranolol on bone density and biochemical markers of bone turnover in ovariectomized rats

A B S T R A C T

Keywords:

Rat model
Postmenopausal osteoporosis
Zoledronic acid
Propranolol

Objectives: The present study was designed to investigate further the efficacy and safety of zoledronic acid (ZOL) and propranolol (PRO) as monotherapy and combination therapy in a rat model of postmenopausal osteoporosis.

Methods: Female Wistar rats were ovariectomized (OVX) or sham-operated at 3 months of age. Twelve weeks post-surgery, rats were randomized into six groups: (1) sham + vehicle; (2) OVX + vehicle; (3) OVX + ZOL (100 µg/kg, i.v. single dose); (4) OVX + ZOL (50 µg/kg, i.v. single dose); (5) OVX + PRO (0.1 mg/kg, s.c. 5 days per week); (6) OVX + ZOL (50 µg/kg, i.v. single dose) + PRO (0.1 mg/kg, s.c. 5 days per week) for 12 weeks. After treatment, femurs were tested for bone density, porosity and trabecular micro-architecture. Biochemical markers in serum and urine were also determined.

Results: Combined treatment with ZOL plus PRO corrected decrease in serum calcium and increase in serum alkaline phosphatase and tartarate resistant acid phosphatase level better than single-drug therapy using ZOL or PRO. Moreover, combined treatment with ZOL plus PRO corrected increase in urine calcium, phosphorous and creatinine level better than single-drug therapy using ZOL or PRO. Combination therapy using ZOL plus PRO also preserved the trabecular micro-architecture and cortical bone porosity.

Conclusion: These data suggest that combined treatment with ZOL plus PRO could be more effective approach for treating severe osteoporosis in humans.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A osteoporose é uma doença degenerativa caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração das microestruturas dos ossos, o que aumenta o risco de fratura.¹ Na maior parte dos casos, a osteoporose se desenvolve sem sintomas e tem um curso progressivo. O diagnóstico oportuno e a seleção do tratamento ideal nos estágios apropriados da doença são essenciais para a eficácia do tratamento e a prevenção da osteoporose.

Os marcadores bioquímicos estão emergindo como uma das ferramentas de diagnóstico essenciais para rastrear a remodelação óssea durante a progressão de doenças ósseas. Esses marcadores são liberados no soro e na urina como resultado da formação e reabsorção óssea e oferecem uma visão geral da saúde do esqueleto. Além das técnicas de imagem invasivas, os marcadores bioquímicos são ferramentas muito eficazes para se fazerem estimativas e são indicativos de várias doenças do metabolismo ósseo. Em contraste com os métodos invasivos, como o teste mecânico dos ossos, os marcadores bioquímicos são convenientes de usar, baratos e não invasivos. Quando feitos e analisados corretamente, revelam-se uma potencial ferramenta para o diagnóstico e determinação do tratamento das doenças dos ossos.^{2,3}

O ácido zoledrônico (ZOL) é um difosfonato de terceira geração que contém nitrogênio. Esse agente mostrou reduzir significativamente o risco de fraturas em pacientes que o usam em dose única anual para o tratamento da osteoporose pós-menopáusia.⁴ Embora os agentes antirreabsorção como os bisfosfonatos sejam eficazes em reduzir a perda óssea, não são capazes de induzir a formação de osso novo.¹

O propranolol (PRO), um antagonista beta-adrenérgico não seletivo, está sob investigação e agora é considerado um potencial fármaco para a cicatrização óssea, mais especificamente para o tratamento da osteoporose. Em um estudo com animais, uma dose mais baixa de PRO, um betabloqueador não seletivo, demonstrou aumentar a massa óssea em diferentes modelos experimentais de disfunções ósseas.⁴⁻¹⁰ Os resultados de alguns estudos epidemiológicos anteriores confirmam a hipótese de que o uso de betabloqueadores está associado a uma diminuição no risco de fraturas.¹¹⁻¹³ Rodrigues et al. demonstraram que o PRO suprime a reabsorção óssea pela inibição da osteoclastogênese, bem como dos marcadores de inflamação.¹⁴ Esse resultado é apoiado por um achado anterior que mostrou que o propranolol estimula a osteoprotegerina (OPG) nos osteoblastos.¹⁵ A capacidade de estimular os osteoblastos, enquanto suprime os osteoclastos, torna o PRO uma opção atraente e exclusiva para a terapia antirreabsorção para a osteoporose. O PRO, que poderia impedir diretamente a perda óssea e a alteração biomecânica, ao aumentar a formação de osso e diminuir sua reabsorção, pode ser o próximo agente anabólico para o tratamento da osteoporose.^{4,5,14,15}

Combinações de agentes anabolizantes e antirreabsorção têm o potencial de melhorar a densidade e força dos ossos, mais do que qualquer outro agente isolado.¹⁶ Como a perda óssea induzida pela ovariectomia envolve tanto o aumento da reabsorção óssea quanto a diminuição da formação óssea, parece óbvio visar à perda óssea induzida pela ovariectomia com um regime de tratamento antirreabsorção e anabólico ósseo combinado, como com ZOL e PRO. Já se mostrou previamente que a terapia combinada com ZOL e PRO pode melhorar as propriedades mecânicas da coluna vertebral e do fêmur

e preservar a microarquitetura trabecular em um modelo de rato com osteoporose pós-menopáusia.⁴ À luz desses resultados, este estudo foi desenhado para avaliar adicionalmente a atividade antiosteoporótica e a segurança da terapia combinada com ZOL e PRO em um modelo de rato com osteoporose pós-menopáusia. Foram avaliados os parâmetros conforme descrito a seguir: (1) medição da porosidade do osso femoral direito; (2) medição do peso seco, do volume e da densidade do osso femoral; (3) parâmetros bioquímicos séricos e urinários; (4) estudo histopatológico do osso femoral esquerdo.

Materiais e métodos

Fármacos, produtos químicos e outros materiais

O ZOL foi obtido dos laboratórios Naprod Life Sciences (Maharashtra, Índia). O PRO, a cetamina, a xilazina e o xileno foram obtidos dos laboratórios Aurobindo Pharma (Hyderabad, Índia), Glaxo Smithkline Pharmaceuticals (Mumbai, Índia), Neon Pharma (Mumbai, Índia), Indian Immunologicals (Hyderabad, Índia) e S.D. Fine Chemicals (Mumbai, Índia), respectivamente.

Foram obtidas suturas Ethicon Crômico 3/0 e suturas Ethicon Mersilk 3/0 da Johnson & Johnson Ltd., Baddi, Himachal Pradesh, Índia.

Animais experimentais

Foram incluídas no estudo ratas Wistar fêmeas saudáveis de 12 semanas de idade, criadas em laboratório. 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 fornecidos 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 de idade, as ratas foram submetidas à ovariectomia sob anestesia com cetamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg; via intraperitoneal), de acordo com o método descrito por Khajuria et al.¹⁷ As ratas submetidas à operação simulada (placebo) foram operadas sem a remoção dos ovários. Três meses depois da ovariectomia (idade = seis meses), os animais foram divididos em seis grupos de seis animais cada. Um grupo de ratas ovariectomizadas (OVX) foi deixado sem tratamento (OVX não tratado). Tanto os grupos OVX não tratado quanto OVX placebo foram usados como controle. Dois dos grupos OVX foram tratados com uma dose intravenosa única de ZOL de 50 μ g/kg (grupo ZOL 50) e 100 μ g/kg (grupo ZOL 100), administrada na veia da cauda, por meio de uma injeção intravenosa lenta de 30 segundos, sob anestesia inalatória leve. Um grupo submetido à OVX foi tratado com PRO a uma dose de 0,1 mg/kg, injetada por via subcutânea cinco dias por semana, durante 12 semanas. Foi iniciado tratamento do grupo OVX remanescente com terapia combinada de 50 μ g/kg de ZOL e 0,1 mg/kg de PRO (ZOL 50 + PRO). As injeções

subcutâneas cinco dias por semana feitas nos grupos OVX tratados com PRO e ZOL 50 + PRO exigiram algum manejo dos animais e impuseram a eles algum estresse. Portanto, além dos grupos de controle positivo e negativo, os grupos OVX tratados com ZOL (100 μ g/kg e 50 μ g/kg, em dose única intravenosa) também receberam administração de veículo por via subcutânea (soro fisiológico, cinco dias por semana) durante 12 semanas. As doses de medicação usadas neste experimento foram selecionadas a partir de estudos anteriores com modelos de ratos com osteoporose.⁴

No fim do experimento (animais com aproximadamente seis meses de idade), as ratas foram anestesiadas com éter e seu sangue foi coletado a partir do plexo retro-orbital. A seguir, o soro centrifugado foi coletado e mantido a -20° C, até a análise. No fim do estudo, todos os grupos foram mortos por uma overdose de anestesia. Em todas as ratas, os fêmures foram excisados e submetidos à remoção de gordura e tecidos conjuntivos. Os fêmures direitos foram embebidos em gaze com soro fisiológico e congelados a -20° C para ser submetidos a testes da porosidade e densidade óssea. Em todas as ratas, os fêmures esquerdos foram removidos e submetidos à remoção de gordura e tecidos conjuntivos e imediatamente fixados em formol a 10% durante 48 horas a 4° C.

Análise bioquímica do soro e urina

Os níveis séricos e urinários de cálcio e fósforo inorgânico, a creatinina urinária e a atividade da fosfatase alcalina foram estimados por kits disponíveis comercialmente (Autospan, Span Diagnostics Ltd. Surat, Índia) com um autoanalisador (Artos Semi-autoanalyzer, Swemed Biomedicals Pvt. Ltd, Bangalore, Índia). A atividade da fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) sérica foi determinada por um método baseado no nitrofenol, conforme descrito por Janckila et al.¹⁸

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 o método descrito por Khajuria et al.⁶ Em resumo, para a análise radiográfica, 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).

Medição do peso seco, volume e densidade do osso

Depois das radiografias, o fêmur direito de todos os animais foi desidratado 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 do osso foi mensurado com uma balança digital (Contech CA-124, Contech Instruments Ltd., Mumbai, Índia). O volume e a densidade dos ossos foram medidos de acordo com o procedimento descrito por Khajuria et al.⁶

Histopatologia óssea

Os fêmures esquerdos foram submetidos à remoção dos tecidos moles e colocados em solução descalcificante [ácido

Tabela 1 – Critérios para a avaliação do escore histopatológico usado para avaliar o grau de osteoporose

Escore	Integridade da cartilagem articular do quadril	Estrutura do osso trabecular	Quantidade de osso trabecular (% da área de interesse)
0	Cartilagem completa	Normal	90-100
1	Cartilagem completa	Parcialmente reduzida	60-90
2	Cartilagem parcialmente completa	Marcadamente reduzida	30-60
3	Cartilagem ausente	Ausente	0-30

clorídrico a 8% (37% v/v) e ácido fórmico a 10% (89% v/v) em solução salina tamponada com fosfato] durante 24 horas a 37° C, desidratados em etanol a 95% (v/v) e embebidos em parafina. Foram cortadas seções horizontais de 5 mm de espessura da extremidade proximal da diáfise, embebidas em parafina, coradas com hematoxilina-eosina e examinadas por microscopia óptica. As cabeças do fêmur (área entre a cartilagem articular do quadril e a cartilagem metafisária) foram avaliadas quanto à qualidade e densidade do osso trabecular, de acordo com o escore apresentado na [tabela 1](#). A integridade da cartilagem é considerada um índice adicional da qualidade do osso, porque a osteoporose é também responsável por uma deterioração da cartilagem e os tratamentos que restauram a integridade óssea também são capazes de, indiretamente, preservar um bom trofismo da cartilagem.¹⁹

Avaliação da segurança dos diferentes tratamentos

O estudo geral da toxicidade foi feito de acordo com as boas práticas de laboratório (BPL) e com as diretrizes da OCDE (Organization for Economic Co-operation and Development) para testes de produtos químicos, com algumas modificações. Foram estudados as mudanças de comportamento, os parâmetros físicos (peso corporal, ingestão de alimentos e água) e a lesão local (dano ou necrose tecidual no local da injeção, inflamação e outros sinais anormais) durante todo o período de tratamento. Também foi registrada a mortalidade – se houvesse alguma morte – em todos os grupos. No fim do tratamento, foi feita uma análise hematológica e bioquímica (testes de função hepática e testes de função renal). A análise bioquímica do soro foi feita com um analisador químico semi-automático e kits para transaminase glutâmico oxalacética

(TGO) sérica e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) sérica da Agappe Diagnostics Ltd. Kerala, Índia. Foram estimados outros parâmetros, como o nitrogênio da ureia sanguínea (Autospan, Span Diagnostics Ltd. Surat, Índia), a proteína total e a creatinina (Agappe Diagnostics Ltd. Kerala, Índia), à procura de sinais de nefrotoxicidade.

Análise estatística

Todos os dados foram expressos como a média ± 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. Em todos os casos, foi selecionada uma probabilidade de erro inferior a 0,05 como critério para a significância estatística. Os gráficos foram elaborados com o programa Graph Pad Prism (versão 5.0 para Windows).

Resultados

Efeitos sobre os parâmetros bioquímicos séricos

A concentração sérica de cálcio foi significativamente menor no grupo OVX do que no grupo placebo ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos grupos que receberam monoterapia em relação ao grupo OVX. No entanto, o nível sérico de cálcio no grupo ZOL 50 + PRO foi significativamente mais elevado do que no grupo OVX ($p < 0,05$). Os níveis séricos de fósforo finais não foram significativamente diferentes entre os grupos placebo e OVX. Do mesmo modo, não houve alterações nos níveis séricos de fósforo entre os diversos tratamentos farmacológicos ([tabela 2](#)).

Tabela 2 – Efeitos do ácido zoledrônico e do propranolol, isolados ou em combinação, nos níveis séricos de cálcio (Ca), fósforo inorgânico (Pi), fosfatase alcalina (ALP) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) em ratas submetidas à OVX

Grupo	Ca (mg/dL)	Pi (mg/dL)	ALP (UI/L)	TRAP (U/L)
Placebo	9,03 ± 0,13 ^a	6,77 ± 0,41	74,85 ± 3,88 ^c	0,31 ± 3,02 ^c
OVX	7,99 ± 0,29	6,30 ± 0,38	155,7 ± 14,47	1,18 ± 10,12
OVX + ZOL 100	8,03 ± 0,58	6,43 ± 0,25	108,2 ± 9,65 ^{b,d}	0,72 ± 9,05 ^{b,d}
OVX + ZOL 50	8,31 ± 0,51	6,55 ± 0,42	105,01 ± 8,13 ^{b,d}	0,66 ± 10,18 ^{c,d}
OVX + PRO	8,11 ± 0,21	6,53 ± 0,44	103,36 ± 6,14 ^{b,d}	0,63 ± 14,99 ^{c,d}
OVX + ZOL 50 + PRO	9,13 ± 0,82 ^a	6,90 ± 0,32	80,03 ± 10,13 ^c	0,41 ± 10,1 ^c

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

^a $p < 0,05$.

^b $p < 0,01$.

^c $p < 0,001$, em comparação com o grupo OVX.

^d $p < 0,05$, em comparação com o grupo ZOL 50 + PRO.

Todos os grupos, exceto o placebo, foram submetidos à ovariectomia.

Tabela 3 – Efeitos do ácido zoledrônico e do propranolol, isolados ou em combinação, sobre os níveis urinários de cálcio (Ca), fósforo inorgânico (Pi) e creatinina (Cr) em ratas submetidas à OVX

Grupo	Ca (mg/dL)	Pi (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Placebo	20,10 ± 7,16 ^c	3,86 ± 0,33 ^c	1,22 ± 0,81 ^c
OVX	48,33 ± 11,07	5,58 ± 0,88	3,14 ± 0,97
OVX + ZOL 100	34,03 ± 17,58 ^{a,d}	4,36 ± 0,56 ^{a,d}	1,82 ± 0,49 ^{b,d}
OVX + ZOL 50	36,31 ± 11,98 ^{a,d}	4,15 ± 0,59 ^{a,d}	1,67 ± 0,46 ^{b,d}
OVX + PRO	33,22 ± 12,81 ^{a,d}	4,05 ± 0,74 ^{a,d}	1,76 ± 0,39 ^{b,d}
OVX + ZOL 50 + PRO	28,15 ± 9,02 ^c	3,68 ± 0,42 ^c	1,13 ± 0,34 ^c

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

^a p < 0,05.

^b p < 0,01.

^c p < 0,001, em comparação com o grupo OVX.

^d p < 0,05, em comparação com o grupo ZOL 50 + PRO.

Todos os grupos, exceto o placebo, foram submetidos à ovariectomia.

No fim do experimento, os níveis séricos de fosfatase alcalina foram significativamente maiores no grupo OVX do que no grupo placebo (p < 0,001). Em contraste, o nível sérico de fosfatase alcalina foi significativamente inferior em todos os grupos de monoterapia quanto comparados com o grupo OVX (p < 0,05). Do mesmo modo, o nível sérico de fosfatase alcalina no grupo ZOL 50 + PRO foi significativamente mais baixo do que no grupo OVX (p < 0,01). Além disso, os níveis séricos de fosfatase alcalina no grupo ZOL 50 + PRO foram significativamente menores do que nos grupos ZOL 100, ZOL 50 e PRO (p < 0,05, [tabela 2](#)). A ovariectomia induziu a renovação óssea elevada em ratos e um aumento nos níveis séricos de TRAP no grupo controle OVX, em comparação com o grupo controle placebo (p < 0,001). Os grupos ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO apresentaram níveis séricos de TRAP significativamente menores em comparação com o grupo OVX (p < 0,01, p < 0,001, p < 0,001 e p < 0,001, respectivamente). Além disso, foram observadas reduções significativas nos níveis séricos de TRAP no grupo ZOL 50 + PRO em comparação com os grupos ZOL 100, ZOL 50 e PRO (p < 0,05).

Efeitos nos níveis urinários de cálcio, fósforo e creatinina

Os perfis de excreção urinária de cálcio, fósforo e creatinina do grupo placebo, grupo OVX e ratas OVX tratadas com as diferentes intervenções terapêuticas são apresentados na [tabela 3](#). Foi observado um aumento significativo na excreção urinária de cálcio no grupo controle OVX em comparação com o grupo placebo (p < 0,001). Os grupos ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO tinham níveis significativamente diminuídos de excreção urinária de cálcio (p < 0,01, p < 0,01, p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente). Do mesmo modo, observou-se um aumento significativo na excreção urinária de fósforo no grupo controle OVX em comparação com o grupo placebo (p < 0,001). Os grupos ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO tinham excreção urinária de fósforo significativamente diminuída (p < 0,01, p < 0,01, p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente). Similarmente, observou-se um aumento significativo na excreção urinária de creatinina no grupo controle OVX em comparação com o grupo placebo (p < 0,001). Os grupos ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO tinham excreção urinária de creatinina significativamente diminuída (p < 0,01, p < 0,01, p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente). Além disso, foram

observadas reduções significativas nos níveis urinários de cálcio, fósforo e creatinina no grupo ZOL 50 + PRO em comparação com os grupos ZOL 100, ZOL 50 e PRO (p < 0,05; [tabela 3](#)).

Medição do peso seco, volume e densidade do osso

A [tabela 4](#) resume os efeitos da OVX e do tratamento de ratas submetidas à OVX com ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO sobre o peso seco do osso, volume ósseo e peso seco por volume de osso (densidade) do fêmur direito. O peso seco do fêmur de animais controle submetidos à OVX foi significativamente menor do que o dos animais controle placebo (p < 0,001). Os grupos ZOL 100, ZOL 50 e PRO apresentaram valores mais elevados de peso seco do que o grupo OVX (p < 0,05, p < 0,01 e p < 0,01, respectivamente). Do mesmo modo, o grupo ZOL 50 + PRO apresentou valores mais elevados de peso seco do fêmur do que o grupo OVX (p < 0,001). O volume do fêmur no grupo OVX foi significativamente mais elevado do que no grupo placebo (p < 0,05). Essa conclusão se baseia no ganho de peso corporal observado no grupo OVX. Não foram observadas diferenças significativas no volume ósseo em nenhuma das intervenções terapêuticas em comparação com o grupo OVX ([tabela 4](#)). No que diz respeito à massa óssea, o grupo OVX apresentou valores significativamente mais baixos de densidade do fêmur do que os animais do grupo placebo (p < 0,001). Isso indica que a densidade da massa óssea é diminuída pela ovariectomia. Os valores nos grupos que usaram bisfosfonatos (ZOL 100 e ZOL 50) e no grupo PRO foram maiores do que no grupo OVX (p < 0,01, p < 0,001 e p < 0,001, respectivamente). Similarmente, os valores foram significativamente mais elevados no grupo ZOL 50 + PRO em comparação com o grupo OVX (p < 0,001). O peso seco e a densidade do osso no grupo ZOL 50 + PRO foram significativamente mais elevados do que nos grupos ZOL 100, ZOL 50 e PRO (p < 0,05).

Porosidade do osso

Os efeitos da OVX e o subsequente tratamento com ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO sobre a porosidade do fêmur direito foram medidos por imagens radiográficas. A intensidade da transmissão de raios-X do grupo OVX em R1 (epífise distal), R2 (diáfise: distal), R3 (diáfise: proximal) e R4 (epífise proximal) foi significativamente maior do que no grupo placebo,

Tabela 4 – Efeitos do ácido zoledrônico e do propranolol, isolados ou em combinação, sobre o peso seco, volume e densidade do osso em ratas submetidas à OVX

Grupo	Peso seco (mg)	Volume (mL)	Densidade (g/mL)
Placebo	615,2 ± 26,20 ^b	0,31 ± 0,03 ^a	1,98 ± 0,02 ^c
OVX	488,7 ± 25,20	0,37 ± 0,04	1,31 ± 0,05
OVX + ZOL 100	601,6 ± 33,40 ^{a,d}	0,37 ± 0,03	1,63 ± 0,03 ^{c,d}
OVX + ZOL 50	626,6 ± 20,90 ^{b,d}	0,37 ± 0,02	1,69 ± 0,04 ^{c,d}
OVX + PRO	630,7 ± 19,40 ^{b,d}	0,36 ± 0,04	1,75 ± 0,03 ^{c,d}
OVX + ZOL 50 + PRO	674,2 ± 22,30 ^c	0,35 ± 0,03	1,90 ± 0,06 ^c

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

^a p < 0,05.

^b p < 0,01.

^c p < 0,001, em comparação com o grupo OVX.

^d p < 0,05, em comparação com o grupo ZOL 50 + PRO.

Todos os grupos, exceto o placebo, foram submetidos à ovariectomia.

o que indica um aumento induzido pela OVX na porosidade nessas áreas. Depois de 12 semanas de tratamento, todos os tratamentos ativos levaram a uma diminuição na porosidade óssea dos animais submetidos à OVX. Os valores da intensidade de transmissão de raios-X em R1 nos grupos ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO foram significativamente menores do que no grupo OVX (p < 0,05, p < 0,01, p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente). A intensidade da transmissão de raios-X do

grupo ZOL 50 + PRO foi significativamente mais baixa do que nos grupos ZOL 100, ZOL 50 e PRO em R1 (p < 0,01, p < 0,05 e p < 0,05, respectivamente). Além disso, os valores de intensidade de transmissão de raios-X nas regiões R2, R3 e R4 dos grupos ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO foram menores do que no grupo OVX (p < 0,05, p < 0,05, p < 0,05 e p < 0,001, respectivamente). A intensidade de transmissão de raios-X do grupo ZOL 50 + PRO foi significativamente mais baixa do que

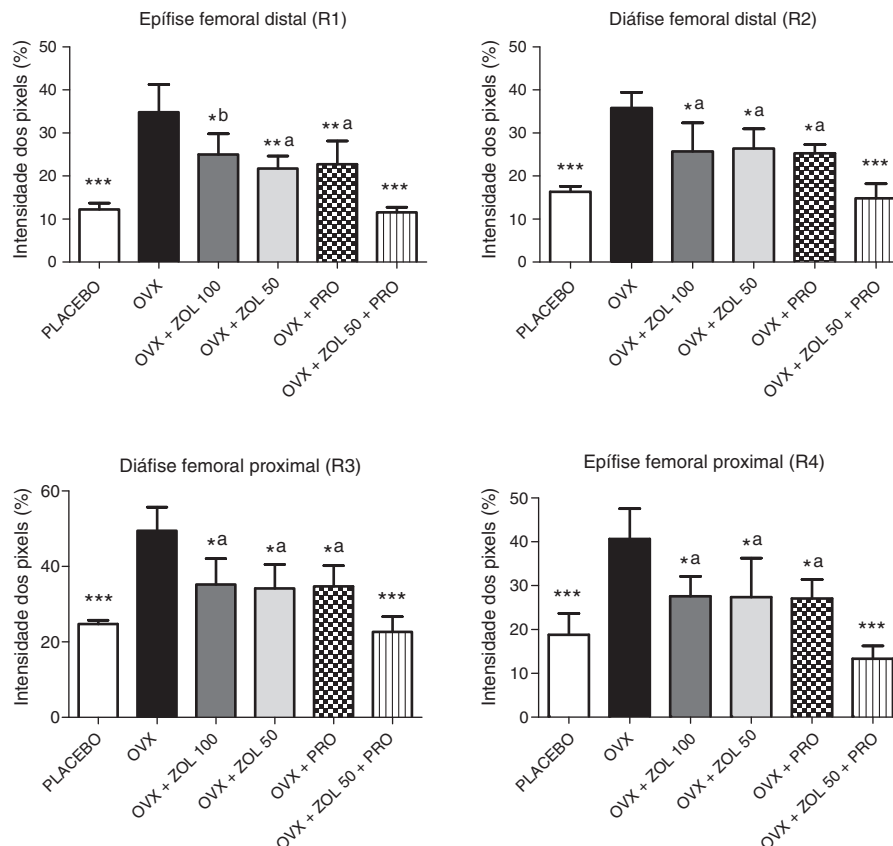


Figura 1 – Efeitos do ácido zoledrônico e do propranolol, isolados ou em combinação, sobre a porosidade femoral de ratas ovariectomizadas. Porosidade do osso em R1: epífise femoral distal (gráfico a), R2: diáfise femoral distal (gráfico b), R3: diáfise femoral proximal (gráfico c), R4: epífise femoral proximal (gráfico d). Os dados são expressos como a média ± DP (n = 6), avaliados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01; *p < 0,001, em comparação com o grupo OVX; ^ap < 0,05; ^bp < 0,01, em comparação com o grupo ZOL mais PRO.**

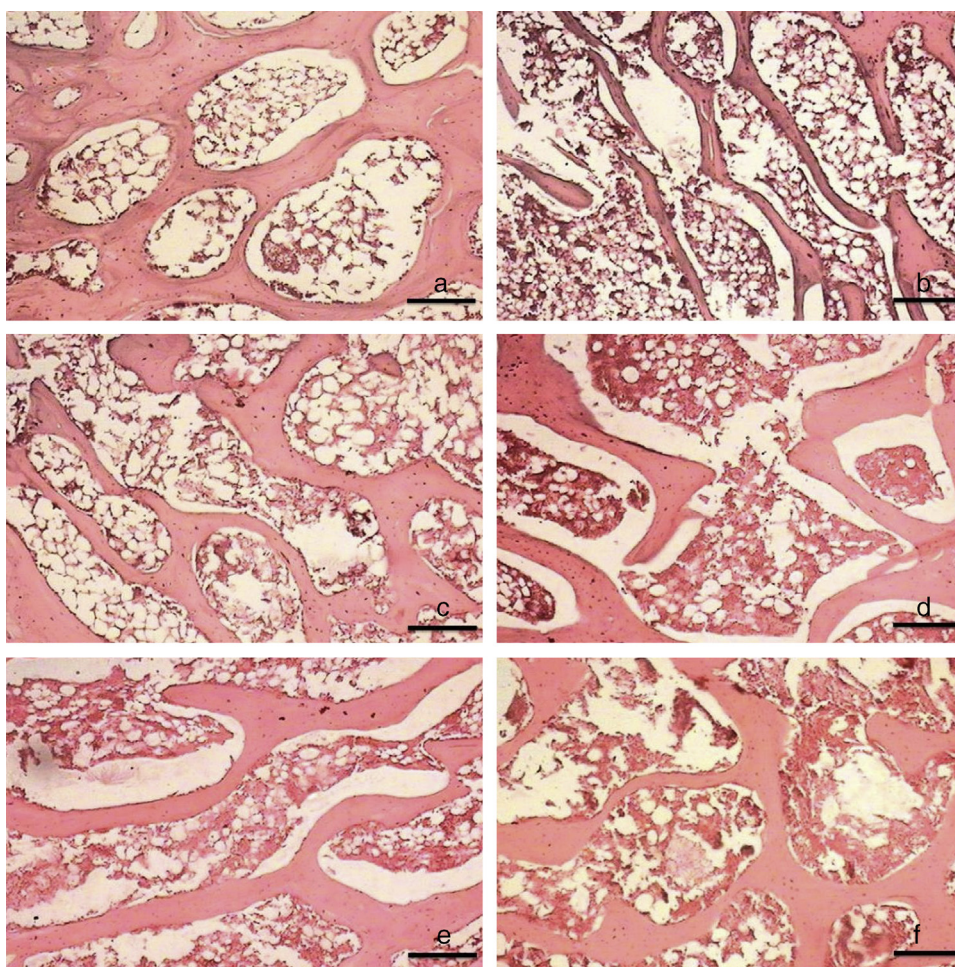


Figura 2 – Efeitos do ácido zoledrônico e do propranolol, isolados ou em combinação, sobre a microarquitetura trabecular femoral em ratas ovariectomizadas. (a) placebo; (b) grupo OVX; (c) grupo OVX + ZOL 100; (d) grupo OVX + ZOL 50; (e) grupo OVX + PRO; (f) grupo OVX + ZOL 50 + PRO. Coloração H & E; Barra de escala = 100 (μm). As imagens foram feitas em ampliação de 50 \times .

a de todos os tratamentos individuais nas regiões R2, R3 e R4 ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos submetidos à monoterapia nas regiões R1, R2, R3 e R4. Esses resultados indicam que a terapia combinada com ZOL 50 + PRO é benéfica para a massa óssea – tanto do osso trabecular quanto cortical – que estava diminuída pela OVX (fig. 1).

Efeito dos tratamentos sobre a histopatologia óssea

As seções de cabeça do fêmur foram examinadas à procura de quaisquer alterações histopatológicas. Os animais do grupo placebo apresentaram compactação normal da diáfise e trabéculas competentes (fig. 2a). Os animais submetidos à OVX mostraram trabéculas com afinamento esparsa e uniforme, com tendência ao desaparecimento e perda da conectividade, que resultou em espaços intertrabeculares alargados (fig. 2b). Também foram observadas proliferações cartilaginosa na área de placas amolecidas de ilhotas focais a restritas. A histopatologia do osso (fig. 2c-f) revelou um efeito importante do ZOL 100, ZOL 50, PRO e ZOL 50 + PRO sobre a osteoporose indu-

zida pela ovariectomia. O escore histológico (fig. 3) dos grupos avaliados de acordo com os critérios é mostrado na tabela 1. A avaliação histopatológica dos animais tratados com quaisquer intervenções terapêuticas mostrou uma restauração da arquitetura dos ossos cortical e trabecular, com matriz óssea bem organizada.

Avaliação da segurança

Todos os animais acompanhados sobreviveram durante o período de estudo. Além disso, não foram observados sinais nem sintomas clínicos adversos durante o período experimental. Não houve diferenças significativas no consumo de comida e água entre os grupos tratados e o grupo controle (dados não mostrados). Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal entre os controles submetidos à OVX e os grupos tratados durante o período de estudo (dados não mostrados). Não foram detectadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos; a hemoglobina, a contagem total de eritrócitos e a contagem total de leucócitos foram semelhantes em todos os grupos de tratamento (tabela 5).

Tabela 5 – Efeitos do ácido zoledrônico e do propranolol, isolados ou em combinação, sobre parâmetros bioquímicos diversos de ratas submetidas à OVX

Grupo	Hemoglobina (g %)	Contagem total de eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Contagem total de leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
Placebo	15,17 \pm 1,42	5,98 \pm 0,89	5,92 \pm 0,96
OVX	13,98 \pm 1,96	5,87 \pm 0,97	5,81 \pm 1,11
OVX + ZOL 100	14,44 \pm 2,11	6,12 \pm 1,13	6,09 \pm 1,22
OVX + ZOL 50	14,85 \pm 2,01	5,73 \pm 0,68	5,89 \pm 0,50
OVX + PRO	15,01 \pm 1,63	5,83 \pm 1,17	5,77 \pm 0,88
OVX + ZOL 50 + PRO	14,11 \pm 1,36	5,79 \pm 0,70	5,97 \pm 1,09

Os dados são expressos como a média \pm DP (n = 6). Todos os grupos, exceto o placebo, foram submetidos à ovariectomia.

Tabela 6 – Efeitos do ácido zoledrônico e do propranolol, isolados ou em combinação, sobre proteína sérica total, creatinina, nitrogênio da ureia sanguínea, transaminase glutâmico oxalacética (TGO) sérica e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) sérica

Grupo	Proteína sérica total (g/dL)	Creatinina (mg/dL)	Nitrogênio da ureia sanguínea (mg/dL)	TGP (U/L)	TGO (U/L)
Placebo	6,90 \pm 0,18	0,66 \pm 0,02	18,03 \pm 1,42	24,81 \pm 1,70	34,76 \pm 1,45
OVX	6,17 \pm 0,04	0,73 \pm 0,03	17,73 \pm 2,09	25,63 \pm 1,67	33,22 \pm 1,78
OVX + ZOL 100	6,32 \pm 0,15	0,71 \pm 0,02	17,38 \pm 0,95	24,25 \pm 1,71	33,19 \pm 2,25
OVX + ZOL 50	6,03 \pm 0,67	0,69 \pm 0,01	16,45 \pm 3,64	23,49 \pm 2,80	32,17 \pm 2,85
OVX + PRO	6,47 \pm 0,13	0,73 \pm 0,01	18,60 \pm 2,42	25,15 \pm 1,46	34,80 \pm 3,48
OVX + ZOL 50 + PRO	6,41 \pm 0,12	0,74 \pm 0,05	18,84 \pm 2,88	25,27 \pm 2,70	33,81 \pm 0,44

Não foram observadas alterações significativas nos níveis de proteína total, creatinina e nitrogênio da ureia sanguínea nos grupos submetidos à monoterapia ou terapia combinada quando comparados ao grupo controle. Não houve aumento significativo nos níveis séricos de TGP e TGO em intervenção terapêutica alguma, quando comparado com o grupo controle (tabela 6).

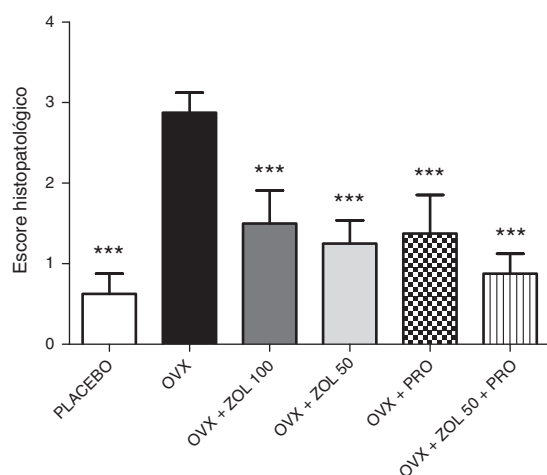


Figura 3 – Efeitos do ácido zoledrônico e do propranolol, isolados ou em combinação, sobre o escore histopatológico. Os dados são expressos como a média \pm DP (n = 6), avaliados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. *p < 0,001, em comparação com o grupo OVX. Todos os grupos, exceto o grupo placebo, foram submetidos à ovariectomia.**

Discussão

Os resultados deste estudo pré-clínico mostram claramente que a terapia combinada com ZOL mais PRO foi capaz de neutralizar a perda óssea em um modelo de rato com osteoporose pós-menopáusia. Esses resultados apoiam os resultados encontrados em nossa pesquisa anterior, que indicou que a adição de PRO à terapia antirreabsorção com ZOL é claramente superior a qualquer intervenção isolada.⁴

Já se sabe que a taxa de perda óssea subsequente à deficiência de estrogênio pode ser avaliada indiretamente com o uso de marcadores bioquímicos de remodelação óssea estabelecidos.²⁰ Foram observados redução da massa óssea, alterações no metabolismo do cálcio e valores significativamente menores de cálcio sérico em mulheres na pós-menopausa.^{21,22} Neste estudo, a terapia combinada com ZOL mais PRO corrigiu completamente a diminuição nos níveis séricos de cálcio e indica que esse tratamento compensa as alterações ocorridas no cálcio.

O grupo ZOL mais PRO foi estatisticamente superior na diminuição da fosfatase alcalina sérica nas ratas submetidas à OVX. Além disso, a terapia combinada com ZOL mais PRO foi estatisticamente superior a quaisquer tratamentos individuais em suprimir o aumento na quantidade de TRAP sérica. Esses resultados sugerem que o tratamento com ZOL mais PRO melhora a perda óssea decorrente da ovariectomia, tanto pela estimulação da formação de osso quanto pela inibição da reabsorção óssea. Os indivíduos que passam por perda rápida de osso têm concentrações elevadas de marcadores de reabsorção óssea, em comparação com aqueles que perdem osso lentamente.²³ As ratas deste estudo submetidas à OVX tiveram uma perda urinária aumentada de cálcio,

fósforo e creatinina, em comparação com o grupo placebo. Mas essas respostas foram significativamente reduzidas nas ratas submetidas à OVX que receberam tratamento com ZOL mais PRO. Isso sugere que essa redução significativa na excreção urinária de cálcio, fósforo e creatinina pode ser atribuída à diminuição da reabsorção óssea ou ao aumento da formação óssea ou a ambos. Vale lembrar que a terapia combinada com ZOL mais PRO foi estatisticamente superior a quaisquer outras intervenções terapêuticas em suprimir o aumento nos valores urinários de cálcio, fósforo e creatinina.

Na análise da porosidade do fêmur de ratos com imagens radiográficas, verificou-se que a terapia combinada com ZOL mais PRO foi estatisticamente superior à monoterapia com ZOL ou PRO em suprimir o aumento da porosidade óssea decorrente da ovariectomia. Isso indica que a terapia combinada com ZOL mais PRO engrossa e fortalece o osso cortical. Os resultados do peso seco e da densidade do fêmur estimados diretamente foram consistentes com os da porosidade femoral encontrada nas imagens radiográficas. Neste estudo, os animais submetidos à OVX apresentaram uma redução significativa no peso seco e na densidade do fêmur, semelhante à observada em mulheres osteoporóticas com deficiência de estrogênio. É interessante notar que nos animais tratados com monoterapia e terapia combinada os valores de peso seco e densidade do fêmur foram significativamente maiores do que no grupo OVX. Além disso, nos animais tratados com terapia combinada de ZOL mais PRO, os valores de peso seco e densidade femoral foram significativamente maiores do que nos grupos ZOL ou PRO. Esses resultados demonstraram que a terapia combinada com ZOL mais PRO é benéfica em aumentar a massa de osso femoral que estava diminuída em decorrência da ovariectomia em ratos.

A análise histopatológica do osso das ratas submetidas à OVX mostrou diminuição na quantidade e espessura das trabéculas e no alargamento dos espaços intertrabeculares, o que sugere que foi induzida perda óssea nessas ratas, pela diminuição na formação e pelo aumento na reabsorção óssea. Os exames histopatológicos também revelaram a propriedade antiosteoporótica da terapia combinada, como demonstrado pela recuperação do osso trabecular no grupo tratado com ZOL mais PRO em comparação ao grupo OVX. Como resultado, a terapia combinada com ZOL mais PRO pode atuar tanto na estrutura do colágeno quanto na reabsorção óssea. Isso, por sua vez, pode reduzir fraturas não vertebrais (por exemplo, fratura de quadril), que são o tipo de fratura de maior relevância clínica na população idosa.

Os testes de toxicidade geral que usam modelos apropriados podem ajudar a definir os riscos de eventos adversos e a projetar protocolos de monitoramento clínico com desfechos claros. A fim de investigar possíveis desfechos tóxicos de terapias individuais e combinadas, foram estimados parâmetros físicos, hematológicos e bioquímicos. Não foram observados sinais de toxicidade com quaisquer das doses de quaisquer intervenções terapêuticas usadas neste estudo. Não foi observada mortalidade em nenhum dos grupos tratados. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos permaneceram inalterados em todos os níveis de dosagem nos grupos tratados com monoterapia e terapia combinada em relação ao controle. A partir dos resultados deste estudo, infere-se que a

monoterapia e a terapia combinada com ZOL e PRO não são tóxicas para os animais experimentais.

Conclusões

Os resultados deste estudo demonstram que a terapia combinada ZOL (agente antirreabsorção) e PRO (agente anabólico) pode representar uma nova abordagem eficaz para tratar ou reverter a osteoporose grave em seres humanos. Assim, esse regime combinado pode ser de interesse para a avaliação adicional por meio de estudos clínicos, a fim de representar uma opção terapêutica potencialmente útil para pacientes com osteoporose. Além disso, o PRO pode ser um potencial novo agente anabolizante do tecido ósseo para prevenção/tratamento da osteoporose e pode ser usado isoladamente ou em associação com os bisfosfonatos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. B. G. Shivananda, Diretor da Faculdade de Farmácia Al-Ameen, pelo constante incentivo, pela infraestrutura e por todas as outras instalações essenciais para a conclusão deste trabalho. Os autores também são gratos 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 Priydarshi, do Departamento de Engenharia Aeroespacial, Instituto Indiano de Ciência, pelos testes com imagens de raios-X.

REFERÊNCIAS

1. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Drugs for the management of osteoporosis: a review. *Rev Bras Reumatol.* 2011;51:365-82.
2. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005;26:97-122.
3. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover part II: clinical applications in the management of osteoporosis. *Clin Biochem Rev.* 2006;27:123-38.
4. 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.
5. Bonnet N, Benhamou C, Malaval L, Goncalves C, Vico L, Eder V. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *J Cell Physiol.* 2008;217:819-27.
6. 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.
7. 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.
8. Khajuria DK, Disha C, Razdan R, Vasireddi R. Prophylactic effects of propranolol versus standard therapy on a new model of disuse osteoporosis in rats. *Sci Pharm.* 2013;82:357-74.
 9. Levasseur R, Sabatier JP, Potrel-Burgot C, Lecoq B, Creveuil C, Marcelli C. Sympathetic nervous system as transmitter of mechanical loading in bone. *Joint Bone Spine.* 2003;70:515-9.
 10. Kondo H, Nifuji A, Takeda S, Ezura Y, Rittling SR, Denhardt DT, et al. Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *J Biol Chem.* 2005;280:30192-200.
 11. Bonnet N, Gadois C, McCloskey E, Lemineur G, Lespessailles E, Courteix D, et al. Protective effect of b-blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. *Bone.* 2007;40:1209-16.
 12. De Vries F, Souverein PC, Cooper C, Leufkens HG, van Staa TP. Use of b-blockers and the risk of hip/femur fracture in the United Kingdom and The Netherlands. *Calcif Tissue Int.* 2007;80:69-75.
 13. Meisinger C, Heier M, Lang O, Döring A. Beta-blocker use and risk of fractures in men and women from the general population: the Monica/Kora Augsburg cohort study. *Osteoporos Int.* 2007;18:1189-95.
 14. Rodrigues WF, Madeira MF, Da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-da-Silva VJ, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol.* 2012;165:2140-51.
 15. Huang HH, Brennan TC, Muir MM, Mason RS. Functional alpha1- and beta2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *J Cell Physiol.* 2009;220:267-75.
 16. Cosman F. Combination therapy for osteoporosis: a reappraisal. *Bone Key Reports.* 2014;3:518.
 17. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52:466-70.
 18. Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem.* 2001;47:74-80.
 19. Bitto A, Burnett BP, Polito F, Marini H, Levy RM, Armbruster MA, et al. Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol. *Br J Pharmacol.* 2008;155:896-905.
 20. 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;19:646-56.
 21. Qureshi HG, Hussain G, Jafary ZA, Bashir MU, Latif N, Riaz Z. Calcium status in premenopausal and postmenopausal women. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2010;22:143-5.
 22. Yogesh HS, Chandrashekhhar VM, Katti HR, Ganapaty S, Raghavendra HL, Gowda GK, et al. Anti-osteoporotic activity of aqueous-methanol extract of *Berberis aristata* in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol.* 2011;134:334-8.
 23. Das AS, Mukherjee M, Mitra C. Evidence for a prospective anti-osteoporosis effect of black tea (*Camellia Sinensis*) extract in a bilaterally ovariectomized rat model. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004;13:210-6.