

2.04.04 - Comportamento Animal

EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ALENDRONATO DE SÓDIO EM RATAS SPRAGUE – DAWLEY OOFORRECTOMIZADAS SUBMETIDAS A DEFEITO ÓSSEO NÃO CRÍTICO

Catharina Nucci-Martins^{1*}, Bruna Bighetto-Cain², Júlia C. Camilli², Eduardo A. R. Socca³, Wagner J. Fávaro³, José Angelo Camilli⁴

1. Doutoranda do IB-UNICAMP

2. Estudante de IC do Instituto de Biologia da UNICAMP

3. Pesquisador do IB-UNICAMP

4. IB – UNICAMP – Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Orientador

Resumo:

O alendronato de sódio (ALE), um bisfosfonato e, portanto, uma droga antirreabsortiva, é reconhecido por ser um fármaco referência “padrão ouro” para o tratamento da osteoporose no Brasil e é amplamente distribuído na rede do Sistema Único de Saúde (SUS). Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos do tratamento crônico com alendronato de sódio em ratas sprague – dawley ooforectomizadas submetidas a defeito ósseo não crítico, por meio de um desenho experimental pré-clínico que investigou aspectos comportamentais, morfológicos e toxicológicos. Nossos resultados destacam o ALE como uma alternativa terapêutica eficaz na regeneração de fraturas em ossos osteoporóticos, por induzir rápida neoformação óssea e não causar efeitos tóxicos. Porém, a avaliação diária de *von Frey* relata um possível efeito colateral da droga, com um potencial para causar sonolência e/ou sedação e/ou calmante, que merece ser melhor investigado, a fim de garantir a segurança do paciente.

Autorização legal: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP: protocolo nº 3591-1.

Palavras-chave: Bifosfonatos; Osteoporose; Fratura.

Apoio financeiro: FAPESP; CAPES; CNPq; FAEPEX.

Introdução:

A prevalência da osteoporose está aumentando com o envelhecimento da população, principalmente em mulheres pós-menopausa, a qual está associada um enorme fardo psicológico, social e econômico (REGINSTER; BURLET, 2006). A Organização Mundial da Saúde estima que o risco médio de fraturas osteoporóticas aumentam cerca de quatro vezes em mulheres com osteoporose (50% de risco aos 50 anos) em comparação a mulheres com densidade mineral óssea normal (13% de risco aos 50 anos) e está entre as causas mais comuns de intensas e prolongadas dores que atingem milhares de pessoas em todo o mundo (OMS, 2003). O tratamento da osteoporose ainda é um importante desafio enfrentado pela medicina moderna, pois muitos fármacos disponíveis no mercado possuem eficácia insatisfatória ou têm potencial para causar efeitos secundários graves no manejo clínico da osteoporose pós-menopausa (MILLER; DERMAN, 2010). Existem quatro principais drogas anti-reabsortivas no mercado (agentes capazes de inibir a formação e/ou função dos osteoclastos): o estrogênio (STEFANICK, 2005), moduladores de receptores de estrógeno (PRINCE; MUCHMORE; SIRIS, 2008), os bisfosfonatos (MILLER, PAUL D., 2008) e a calcitonina (GRUBER et al., 1984). Porém, são os bifosfonatos, especialmente o alendronato de sódio, que foi instituído no Brasil como “padrão ouro” e é amplamente utilizado para tratamento da osteoporose no Sistema Único de Saúde (SUS). Portanto, este estudo tem como objetivo analisar os efeitos do tratamento crônico com alendronato de sódio em ratas sprague – dawley ooforectomizadas submetidas a defeito ósseo não crítico, por meio de um desenho experimental pré-clínico que investiga aspectos comportamentais, morfológicos e toxicológicos. Para isto, propomos ineditamente estudar a arquitetura do osso osteoporótico por meio de histologia específica para o tecido ósseo (*Schmorl*) e para marcação de cálcio (*von Kossa*), bem como investigar parâmetros comportamentais para avaliação da dor (*von Frey* eletrônico) causada por fratura do osso osteoporótico, e para avaliação da deambulação dos animais por meio dos testes de *Open-field* (locomoção espontânea) e *Rotarod* (locomoção forçada). Além disso, será realizada a análise toxicológica por meio de avaliação de cor, textura e peso relativo do coração, pulmões, fígado, baço e rins, análise histopatológica dos órgãos e dosagem de marcadores bioquímicos de função hepática e renal, para melhor caracterização da segurança do uso crônico do alendronato de sódio.

Metodologia:

O estudo foi realizado com ratas Sprague-Dawley com 8 semanas de idade e aproximadamente 200 g. Todos os experimentos foram conduzidos somente após aprovação do protocolo nº 3591-1, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP. Os animais foram homogeneamente divididos em três grupos (Sham, OFX+OST, OFX+OST+ALE) de 5 animais cada, que passaram por duas cirurgias, a ooforectomia bilateral (OFX) para retirada dos ovários e indução do quadro osteoporótico e a osteotomia femoral (OST) para criação de um defeito ósseo não crítico (2,3 mm de diâmetro) no fêmur direito das ratas osteoporóticas, 90 dias após OFX, para induzir uma fratura no osso osteoporótico. Os animais do grupo Sham (controle saudável)

apenas passaram por um falso procedimento cirúrgico (sem retirada dos ovários e sem realização do defeito ósseo no fêmur). O tratamento com o fármaco de referência Osteoform® - alendronato de sódio (ALE), foi realizado conforme Chen e colaboradores (2014), utilizando a dose de 1mg/kg, por via intragástrica (i.g.), uma vez por semana (assim como é realizado na clínica, em humanos) e duraram 93 dias no total, iniciando no 15º dia após OFX e finalizando no 18º após OST. Os animais dos grupos Sham e OFX+OST foram tratados com veículo (salina + 5% Tween 80) nos mesmos períodos. Foram realizados testes comportamentais antes da OFX, antes da OST e por 18 dias pós-OST, para avaliação da dor dos animais pelo teste de *von Frey* eletrônico, e para avaliação das atividades locomotoras espontânea e forçada pelos testes *Open-field* e *Rotarod*, respectivamente.

Após a eutanásia dos animais, realizada por aprofundamento anestésico (xilazina e cetamina) seguida de punção cardíaca, os fêmures foram devidamente dissecados para realização de histologia específica para o tecido ósseo (*Schmorl*) e para marcação de cálcio (*von Kossa*). Para análise toxicológica, foi realizada uma avaliação macroscópica de cor, textura e peso relativo. Para a extração do peso relativo, foi calculado o arco-seno da razão peso corporal / peso órgão e extraída a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) desses dados (KYSLOVA et al., 2003). Além disso, foram realizadas histopatologia de alguns órgãos vitais (coração, pulmões, fígado, baço e rins), utilizando coloração de HE. Ademais, foi realizada análise bioquímica com alguns marcadores séricos de lesão hepática e renal, tais como atividade das enzimas transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP) e gama glutamil transferase (GGT), e as concentrações séricas de creatinina, ureia e creatina kinase (CK) através da utilização de kits comerciais específicos. Em todas as análises, os valores de *P* foram considerados estatisticamente significantes apenas quando inferiores a 0,05 ($P < 0,05$). Para todos os cálculos estatísticos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Resultados e Discussão:

Nossos resultados demonstraram que o ALE causa uma “falsa analgesia”, que inibe 100% da hiperalgesia mecânica dos animais, observada no teste de *von Frey*, 1 hora após tratamento. Este efeito durou até 8 horas após tratamento com ALE (1 mg/kg, i.g.). Porém, as avaliações diárias confirmaram que o efeito antihiperálgico observado no dia do tratamento não se repetia nos dias seguintes que o animal ficou sem tratamento, até que realizado um novo tratamento, ou seja, um “falso positivo”, que pode ser devido a um efeito sedativo e/ou calmante e/ou de sonolência nos animais. Nossos resultados corroboram com achados descritos nos efeitos adversos da bula do Osteoform®, que relata um efeito sedativo/calmante da droga (EMS, 2013), mas este dado é controverso com achados da literatura (NAITO et al., 2017; WANG et al., 2016). Os resultados dos testes de locomoção espontânea (*Open-field Test*) e de locomoção forçada em cilindro giratório (*Rotarod Test*) mostraram que o tratamento crônico com o ALE (1 mg/kg, i.g.) não interfere na atividade locomoção dos animais, quando comparado com o controle OVX. Porém ressaltamos que estes testes foram realizados sempre 24 horas após uma avaliação de *von Frey*, ou seja, quando não era mais observado efeito sedativo e/ou calmante e/ou de sonolência nos animais. Então, sugerimos que sejam realizadas novas avaliações para confirmação do real efeito do ALE sobre a hiperalgesia mecânica e locomoção dos animais.

O tratamento crônico com o ALE (1 mg/kg, i.g.) foi capaz de reparar em 100% a extensão do defeito ósseo no fêmur dos animais 18 dias após OST, observada na histologia específica para o tecido ósseo (*Schmorl*), porém, não foi observada diferenças na marcação de cálcio (*von Kossa*).

Nossos resultados revelam que o alendronato de sódio não apresenta efeitos colaterais aparentes sobre a relação peso/órgãos dos animais, sugerindo que o tratamento crônico (93 dias) com ALE (1 mg/kg, i.g.) não causa hipertrofia ou hipotrofia em órgãos vitais. Estes dados corroboraram com os resultados da análise histopatológica do coração, pulmão, fígado, baço e rins, evidenciando que o alendronato não altera a organização estrutural dos tecidos avaliados, pois não foi observada presença de massa tumoral, focos inflamatórios e/ou fibrose. A investigação bioquímica demonstrou que o tratamento crônico com ALE (1 mg/kg, i.g.) não altera a atividade das enzimas TGO, TGP e GGT, bem como concentrações séricas de creatinina e CK em relação aos grupos controle doente (OVX) e controle saudável (Sham). Porém, curiosamente o tratamento crônico com ALE (1 mg/kg, i.g.) aumentou em $26 \pm 7\%$ e $58 \pm 9\%$ as concentrações séricas de ureia em relação aos animais dos grupos controle doente (OFX+OST) e controle saudável (Sham), respectivamente. De acordo com Thrall, Allison e Campbell (2012) as concentrações séricas de ureia em roedores são influenciadas por diversos fatores, tais como dieta proteica, funcionamento do fígado, absorção gastrointestinal e hidratação. Os mesmos autores ressaltam também que roedores adultos podem demonstrar normalmente altas concentrações séricas de ureia e que um comprometimento de 75% da função renal não causaria aumento somente nas concentrações séricas de ureia, mas também nas de creatinina. Neste sentido, Guyton e Hall (1997) destacam o papel da creatinina como indicador mais fiel da função renal, pois esta é constantemente produzida pelo metabolismo muscular da creatina e é exclusivamente filtrada e excretada pelos rins. Portanto, é provável que a alteração de ureia verificada no grupo tratado com alendronato se deva a outros fatores e possivelmente não indica lesão renal, visto que os níveis de creatinina deste grupo permaneceram normais, bem como não foram observadas alterações morfológicas na análise histopatológica dos rins.

Conclusões:

Os resultados deste estudo destacam o alendronato de sódio como uma terapêutica útil para o reparo ósseo em quadros de osteoporose por apresentar rápida neoformação óssea na extensão do defeito ósseo

produzido no fêmur dos animais, 18 dias após osteotomia. Porém, a avaliação diária de *von Frey* relata um possível efeito colateral da droga, com um potencial para causar sonolência e/ou sedação e/ou efeito calmante, que merecem ser melhor investigados, a fim de garantir a segurança do paciente. Além disso, nossos resultados revelam que o tratamento crônico com o ALE (1 mg/kg, i.g.) não altera a atividade locomotora dos animais, não causa efeitos tóxicos sobre a relação peso X órgão dos animais, não altera a morfologia de órgãos vitais e em marcadores bioquímicos de função hepática, renal e cardíaca. Desta forma, este estudo contribuiu para suportar o uso do alendronato de sódio para consolidação óssea em quadros de osteoporose no SUS e causar um alerta sobre seus possíveis efeitos colaterais.

Referências bibliográficas

CHEN, G.-X. et al., Effect of Low-Magnitude Whole-Body Vibration Combined with Alendronate in Ovariectomized Rats: A Random Controlled Osteoporosis Prevention Study. ***PloS one***, 9, (5), e96181, 2014.

EMS, Sigma Pharma Ltda. **OSTEOFORM®: alendronato de sódio**. ANVISA. Hortolândia/SP. 2013. Disponível: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=6374732015&pldAnexo=2749245. Acesso em: 15 Fev. 2018.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. ISBN: 9780721659442.

GRUBER, H. E.; IVEY, J. L.; BAYLINK, D. J.; MATTHEWS, M.; NELP, W. B.; SISOM, K.; CHESNUT, C. H., 3rd, Long-term calcitonin therapy in postmenopausal osteoporosis. ***Metabolism: clinical and experimental***, 33, (4), 295-303, 1984.

KYSELOVA V., PEKNICOVA J., BUCKIOVA D., BOUBELIK M. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. ***Reproductive Biology and Endocrinology***, v. 1, p. 30, Mar 24 2003.

MILLER, P. D., **Bisphosphonates: pharmacology and use in the treatment of osteoporosis**. In *Osteoporosis*, 3rd. ed. ed.; Feldman, D.; Marcus, R.; Nelson, D.; Rosen, C. J., Eds. Elsevier Academic Press: San Diego, pp 1725-1742, 2008.

MILLER P. D.; DERMAN R. J. What is the best balance of benefits and risks among anti-resorptive therapies for postmenopausal osteoporosis? ***Osteoporosis international***, v. 21, n. 11, p. 1793-802, Nov 2010.

NAITO Y., WAKABAYASHI H., KATO S., NAKAGAWA T., IINO T., SUDO A. Alendronate inhibits hyperalgesia and suppresses neuropeptide markers of pain in a mouse model of osteoporosis. ***Journal of Orthopaedic Science***, v. 22, n. 4, p. 771-777, Jul 2017.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **WHO Technical Report Series – 921: Prevention and management of osteoporosis**. 2003. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42841/1/WHO_TRS_921.pdf >. Acesso em: 14 fev. 2018.

PRINCE, R.; MUCHMORE, D. B.; SIRIS, E. S. **Estrogen analogues: selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens**. In *Osteoporosis*, 3rd. ed. ed.; Feldman, D.; Marcus, R.; Nelson, D.; Rosen, C. J., Eds. Elsevier Academic Press: San Diego, pp 1705-1723, 2008.

REGINSTER, J.-Y.; BURLET, N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. ***Bone***, v. 38, n. 2, Supplement 1, p. 4-9, 2// 2006.

STEFANICK, M. L., Estrogens and progestins: background and history, trends in use, and guidelines and regimens approved by the US Food and Drug Administration. ***The American journal of medicine***, 118 Suppl 12B, 64-73, 2005.

THRALL, M.A. et al. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2. Chichester: John Wiley & Sons; 2012. ISBN: 9780813810270.

WANG L., GUO T. Z., HOU S., WEI T., LI W. W., SHI X., CLARK J. D., Kingery W. S. Bisphosphonates Inhibit Pain, Bone Loss, and Inflammation in a Rat Tibia Fracture Model of Complex Regional Pain Syndrome. ***Anesthesia & Analgesia***, v. 123, n. 4, p. 1033-45, Oct 2016.