



# REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



## Artigo original

# Efeitos da terapia combinada com ácido zoledrônico e propranolol na resistência mecânica em um modelo de rato com osteoporose por desuso



Deepak Kumar Khajuria<sup>a,b,\*</sup>, Rema Razdan<sup>a</sup> e Debiprosad Roy Mahapatra<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacologia, Al-Ameen College of Pharmacy, Bangalore, Índia

<sup>b</sup> Laboratório de Integrativas Multiscale Materiais e Engenharia de Sistemas, Departamento de Engenharia Aeroespacial, Indian Institute of Science, Bangalore, Índia

### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

#### Histórico do artigo:

Recebido em 13 de maio de 2014

Aceito em 28 de julho de 2014

On-line em 23 de outubro de 2014

#### Palavras-chave:

Osteoporose por desuso

Estudo com ratos

Ácido zoledrônico

Propranolol

### R E S U M O

**Objetivos:** Investigar os efeitos aditivos do agente antirreabsorção ácido zoledrônico (ZOL), isolado e em combinação ao propranolol (PRO), em um modelo de rato com osteoporose por desuso.

**Métodos:** Usou-se um modelo de pata traseira direita de rato privada de descarga de peso para estudar as consequências da falta de descarga de peso sobre o esqueleto durante várias condições, como missões espaciais e repouso prolongado no leito em idosos. Ratos Wistar machos de três meses de idade foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD) por 10 semanas para induzir à osteopenia; em seguida, foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: 1 – IPTD para controle positivo; 2 – IPTD mais ZOL (50 µg/kg, dose única intravenosa); 3 – IPTD mais PRO (0,1 mg/kg, via subcutânea, cinco dias na semana); 4 – IPTD mais PRO (0,1 mg/kg, via subcutânea, cinco dias na semana) 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:** No que diz respeito à melhoria da resistência mecânica da diáfise femoral média, a terapia combinada com ZOL mais PRO foi mais eficaz do que a monoterapia com ZOL ou PRO. Além disso, a terapia combinada com ZOL mais PRO foi mais eficaz na melhoria do peso seco do osso e preservou melhor a porosidade do osso cortical do que a monoterapia com ZOL ou PRO em ratos submetidos à imobilização da pata traseira direita.

**Conclusões:** Esses dados sugerem que a terapia combinada com ZOL mais PRO deve ser recomendada 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](mailto:deepak_kumarkhajuria@yahoo.co.in) (D.K. Khajuria).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.07.007>

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

## Effect of combined treatment with zoledronic acid and propranolol on mechanical strength in an rat model of disuse osteoporosis

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Disuse osteoporosis  
Rat model  
Zoledronic acid  
Propranolol

**Objectives:** A model that uses right hind-limb unloading of rats is used to study the consequences of skeletal unloading during various conditions like space flights and prolonged bed rest in elderly. This study was aimed to investigate the additive effects of antiresorptive agent zoledronic acid (ZOL), alone and in combination with propranolol (PRO) 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 randomized into four groups: 1–RHLI positive control, 2–RHLI plus ZOL (50 µg/kg, i.v. single dose), 3–RHLI plus PRO (0.1 mg/kg, s.c. 5 days per week), 4–RHLI plus PRO (0.1 mg/kg, s.c. 5 days per week) 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 treatment, the femurs were removed and tested for bone porosity, bone mechanical properties, and bone dry and ash weight.

**Results:** With respect to improvement in the mechanical strength of the femoral mid-shaft, the combination treatment with ZOL plus PRO was more effective than ZOL or PRO monotherapy. Moreover, combination therapy using ZOL plus PRO was more effective in improving dry bone weight and preserved the cortical bone porosity better than monotherapy using ZOL or PRO in right hind-limb immobilized rats.

**Conclusions:** These data suggest that this combined treatment with ZOL plus PRO should be recommended for the treatment of disuse osteoporosis.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

## Introdução

A osteoporose é uma doença óssea debilitante que causa quase nove milhões de fraturas ósseas a cada ano.<sup>1</sup> O desuso (ausência de descarga de peso) é uma das principais causas da osteoporose.<sup>2</sup> A carga mecânica é essencial para o funcionamento normal do tecido ósseo. A imobilização resulta em desequilíbrio no metabolismo do osso, seguida por uma rápida perda de massa óssea e deterioração de sua função mecânica.<sup>3</sup> Essa perda óssea induzida pela imobilização é causada pelo aumento da reabsorção e redução da formação óssea. A osteoporose por desuso (ausência de descarga de peso) ocorre em pacientes com lesões medulares, em indivíduos restritos ao repouso no leito prolongado e em astronautas expostos à microgravidade durante missões espaciais.<sup>2</sup> A osteoporose induzida pela microgravidade representa uma grave ameaça à saúde do astronauta. A microgravidade leva à falta de descarga de peso sobre o esqueleto, especialmente sobre os ossos que sustentam peso.<sup>3</sup> A osteoporose por desuso não só aumenta a suscetibilidade à fratura em pacientes com lesões medulares e idosos que necessitam repouso no leito, mas também ameaça a segurança e a saúde dos astronautas durante missões espaciais. Portanto, é muito importante encontrar contramedidas relevantes para a osteoporose por desuso, a fim de reduzir ou prevenir essa perda de massa óssea.

Vários modelos animais têm sido sugeridos para o estudo da perda óssea induzida pela imobilização, incluindo a neurectomia, a suspensão da cauda, o aparelho gessado e bandagens elásticas. Neste estudo, a imobilização da pata traseira direita (IPTD) foi feita com um procedimento novo, desenvolvido para

evitar os problemas causados pela maior parte dos métodos usados para a imobilização (por exemplo, aparelho gessado, bandagem ou suspensão da cauda) em ratos. O menor peso da estrutura em comparação com um aparelho gessado reduziu ao mínimo a dificuldade de movimentação e locomoção, com uma consequente perda mínima no peso corporal ao longo do período de imobilização. Além disso, não foi encontrada ulceração na pele ou inchaço no pé do animal depois de removida a imobilização. O procedimento de imobilização proposto foi eficaz em produzir o desuso em longo prazo na pata traseira de ratos e é uma boa opção aos métodos tradicionais de imobilização.<sup>2</sup>

O ácido zoledrônico (ZOL) é um difosfonato de terceira geração que contém nitrogênio. O ZOL se liga à hidroxiapatita com a mais elevada afinidade e inibe os osteoclastos com a maior potência dentre todos os difosfonatos regulamentados.<sup>4,5</sup> Portanto, o ZOL precisa ser administrado ao paciente somente uma vez ao ano. É ainda eficaz em inibir a atividade osteoclástica e, assim, reduzir o risco de fratura.<sup>6</sup> Embora os agentes antirreabsorptivos, como os difosfonatos, sejam eficazes em reduzir a perda óssea, não são capazes de induzir a formação de osso novo.<sup>5</sup>

O propranolol (PRO), um antagonista β-adrenérgico não seletivo, é agora considerado um potencial fármaco sob investigação para uso na cicatrização óssea e, mais especificamente, no tratamento da osteoporose. O tratamento da osteoporose pós-menopáusia com PRO melhora as propriedades ósseas, aumenta a formação de osso e diminui a reabsorção óssea no modelo com rato.<sup>7-10</sup> Além disso, vários estudos pré-clínicos demonstraram que o tratamento com PRO atenua a perda óssea induzida pela falta de descarga de

peso.<sup>2,11,12</sup> Adicionalmente, os resultados de alguns estudos epidemiológicos prévios confirmam a hipótese de que o uso de  $\beta$ -bloqueadores está associado a uma diminuição no risco de fraturas.<sup>13-15</sup>

A terapia combinada é agora objeto de ampla pesquisa porque, em alguns casos, ela pode aumentar a eficácia do tratamento. A teriparatida é um análogo do hormônio paratireóide (HPT) humano. É um agente anabólico que reduz o risco de fratura em pacientes com osteoporose. O tratamento combinado com HPT e difosfonatos resultou em melhorias mais acentuadas na arquitetura óssea do que o tratamento isolado com HPT ou difosfonatos.<sup>16-18</sup> Rodrigues et al. demonstraram que baixas doses de PRO suprimem a reabsorção óssea ao inibir a osteoclastogênese mediada pelo receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL), bem como marcadores inflamatórios, sem afetar os parâmetros hemodinâmicos.<sup>19</sup> Esse resultado é apoiado por uma descoberta anterior que mostrou que o propranolol estimula a osteoprotegerina (OPG) por conta própria nos osteoblastos.<sup>20</sup> A capacidade de estimular os osteoblastos, enquanto também inibe os osteoclastos, torna o PRO uma opção atraente e exclusiva à terapia antirreabsortiva 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, depois do HPT.<sup>7,8,10,19,20</sup>

Como a perda óssea induzida pela imobilização envolve tanto o aumento da reabsorção óssea quanto a redução da formação óssea, parece óbvio investir contra a perda óssea induzida pela imobilização com um regime de tratamento antirreabsortivo e anabólico ósseo combinado, como com ZOL e PRO. Os efeitos do tratamento combinado com PRO e ZOL foi previamente estudado em ratas ovariectomizadas,<sup>7</sup> embora esse regime de tratamento nunca tenha sido pesquisado na osteopenia induzida pela imobilização. Por conseguinte, o objetivo deste estudo foi investigar a eficácia do agente anabolizante do tecido ósseo PRO, do agente antirreabsortivo ósseo ZOL e da combinação desses dois fármacos no tratamento da osteopenia induzida pela imobilização em ratos. Em razão dos diferentes mecanismos de ação do ZOL e do PRO, a hipótese do estudo é que a combinação de ZOL e PRO facilitará maiores melhorias nas propriedades ósseas do que uma das intervenções isoladamente. 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 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), 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, criados no laboratório da instituição. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada a  $25 \pm 2$  C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com comida e água à vontade. Os experimentos foram feitos de acordo com as diretrizes do CPC-SEA (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, 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 previamente.<sup>2</sup>

Os ratos foram divididos em cinco grupos (seis em cada). 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  $\mu$ g/kg, em dose única intravenosa) por mais 10 semanas; 4 – IPTD por 10 semanas e, em seguida, IPTD mais cinco dias por semana de injeção subcutânea com 0,1 mg/kg de PRO (0,1 mg/kg, via subcutânea, cinco dias por semana) por mais 10 semanas; 5 – IPTD durante 10 semanas, em seguida, IPTD mais PRO (0,1 mg/kg, via subcutânea, cinco dias por semana) mais ZOL (50  $\mu$ g/kg, dose única intravenosa) por mais 10 semanas. As injeções subcutâneas cinco dias por semana no caso dos grupos PRO e ZOL mais PRO 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 ZOL receberam administração subcutânea de veículo (soro fisiológico comum, cinco dias/semana) durante 10 semanas. As doses de medicação usadas neste experimento foram selecionadas a partir de estudos anteriores sobre a osteoporose em modelo de ratos.<sup>7</sup> 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  $-20^\circ$  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.<sup>8,21</sup> 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.<sup>8</sup> Resumidamente, os fêmures foram removidos do congelador a  $-20^{\circ}$  C e reidratados 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, com abaixamento da 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 por Khajuria et al.<sup>8</sup>

### Medição do peso seco e das cinzas do fêmur

Depois de 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 do osso foi mensurado com uma balança digital. Em seguida, os fêmures secos foram queimados e reduzidos a cinzas a  $900^{\circ}$  C, durante cinco horas, e o peso das 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 ensaio assinado-rank. 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).

O comprimento dos fêmures imobilizados não foi significativamente diferente do dos fêmures não imobilizados nos mesmos ratos no grupo IPTD (controle positivo) e nos grupos de tratamento submetidos à IPTD (tabela 2).

### Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porosidade do osso

A intensidade da transmissão de raios-X no grupo IPTD (controle positivo) nas regiões R1, R2, R3 e R4 do osso femoral de

**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 <sup>a</sup>	320,1 $\pm$ 13,39 <sup>a</sup>
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 + PRO	222,4 $\pm$ 11,07	217,0 $\pm$ 10,21
IPTD + ZOL + PRO	227,4 $\pm$ 19,88	219,6 $\pm$ 14,14

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.

<sup>a</sup> 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).

**Tabela 2 – Comprimento femoral médio dos ratos nos grupos controle e experimental**

Grupo	Comprimento do fêmur (mm)	
	Esquerdo (não imobilizado)	Direito (imobilizado)
Controle normal	40,80 $\pm$ 2,1	41,09 $\pm$ 2,2
IPTD (controle positivo)	39,99 $\pm$ 3,4	39,89 $\pm$ 1,3
IPTD + ZOL	40,31 $\pm$ 4,7	40,23 $\pm$ 4,7
IPTD + PRO	40,23 $\pm$ 3,3	40,14 $\pm$ 8,7
IPTD + ZOL + PRO	40,51 $\pm$ 7,6	40,48 $\pm$ 2,9

Os dados são expressos como a média  $\pm$  DP (n=6). Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).



ratos foi significativamente mais elevada do que no grupo controle 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 (monoterapia ou terapia combinada) foram capazes de diminuir a porosidade óssea em ratos submetidos à IPTD. Os valores da intensidade da transmissão de raios-X dos grupos ZOL, PRO e ZOL mais PRO foram significativamente menores em comparação ao grupo IPTD (controle positivo) nas regiões R1, R2, R3 e R4 do osso femoral de ratos. A intensidade da transmissão de raios-X no grupo ZOL mais PRO foi significativamente menor do que nos grupos ZOL e PRO nas regiões R1, R2, R3 e R4. Esses resultados indicam que, em comparação com a monoterapia com ZOL ou PRO, a terapia combinada com ZOL mais PRO é mais benéfica para a massa dos ossos trabecular e cortical que foi diminuída pela imobilização (fig. 1).

#### **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 o grupo IPTD (controle positivo) sofreu 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.

Nos grupos ZOL, PRO e ZOL mais PRO, o pico de carga, a rigidez máxima, a dureza, a resistência máxima e o módulo de elasticidade do fêmur foram significativamente maiores do que no grupo IPTD (controle positivo). Nos grupos ZOL e PRO, a resistência máxima e o módulo de Young foram significativamente menores do que no grupo ZOL mais PRO.

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

A IPTD induziu a uma diminuição estatisticamente significativa no peso seco e das cinzas dos fêmures imobilizados dos ratos do grupo IPTD (controle positivo) em comparação com os ratos controle normais não imobilizados (tabela 3). Nos ratos submetidos à IPTD tratados com algum dos tratamentos ativos (monoterapia e terapia combinada), o peso seco e das cinzas dos fêmures foi significativamente maior do que no grupo IPTD (controle positivo). No fêmur submetido à IPTD dos ratos tratados com ZOL mais PRO, o peso seco e das cinzas foi significativamente maior do que no fêmur dos grupos tratados com ZOL ou PRO. Nos fêmures esquerdos não imobilizados não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo IPTD (controle positivo), o grupo normal não imobilizado e todos os grupos submetidos a tratamentos ativos (monoterapia e terapia combinada).

A porosidade do osso e as propriedades mecânicas das patas esquerda e direita estão representadas como diagramas de barras na figura 3 e na figura 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 do osso femoral de ratos, a intensidade de transmissão de raios-X no lado imobilizado

(direito) foi significativamente mais elevada do que no lado não imobilizado (esquerdo) no grupo controle imobilizado.

Do mesmo modo, 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) nos grupos imobilizados tratados com ZOL ou PRO. Em contraste, o grupo imobilizado tratado com ZOL mais PRO 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 no grupo controle imobilizado; ou seja, o lado imobilizado (direito) apresentou valores significativamente menores nos parâmetros de resistência, incluindo o pico de carga, a rigidez máxima, a resistência à fratura, a resistência máxima e o módulo de elasticidade, do que o lado não imobilizado (esquerdo). Do mesmo modo, nos grupos imobilizados tratados com ZOL ou PRO, o lado imobilizado (direito) apresentou valores de parâmetros de resistência significativamente menores, incluindo um menor pico de carga, rigidez máxima, resistência à fratura, resistência máxima e módulo de elasticidade do que o lado não imobilizado (esquerdo). Em contraste, o grupo imobilizado tratado com ZOL mais PRO mostrou proteção completa contra a imobilização (fig. 4).

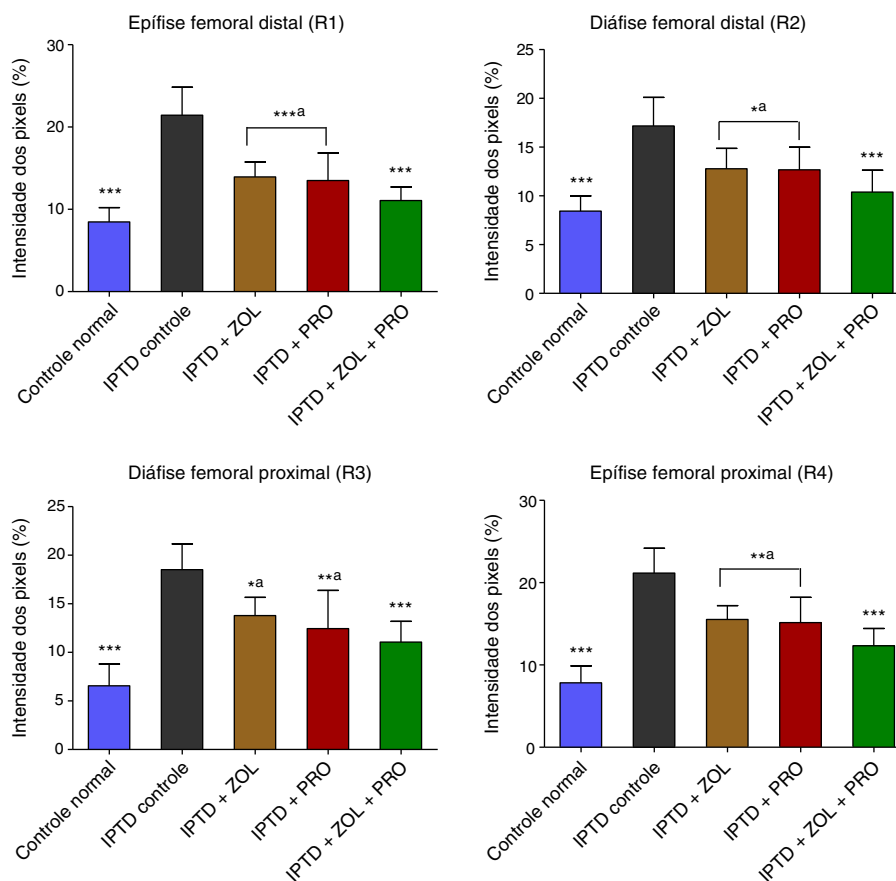
---

## **Discussão**

Este estudo teve como objetivo promover a aplicação clínica da terapia combinada com ZOL mais PRO como um tratamento curativo para a osteoporose por desuso já estabelecida. Em razão da dificuldade e do alto custo da feitura de experimentos em astronautas durante uma missão espacial, os pesquisadores estabeleceram uma série de modelos experimentais terrestres *in vivo* para simular as condições experimentadas durante uma missão espacial. O presente estudo mostrou que a monoterapia com PRO e ZOL foi capaz de neutralizar a perda óssea em um modelo de rato com osteoporose por desuso. Além disso, mostrou que a terapia combinada com ZOL mais PRO apresenta uma vantagem terapêutica em relação à monoterapia com ZOL ou PRO no tratamento da osteoporose por desuso.

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.<sup>2,22,23</sup> 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.

O aumento da porosidade óssea nas regiões R1, R2, R3, R4 do fêmur do rato em razão da falta de descarga de peso na



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

pata traseira direita foi inibido por todos os tratamentos ativos (monoterapia e terapia combinada). Além disso, a porosidade óssea no grupo ZOL mais PRO nas regiões R1, R2, R3 e R4 do osso femoral de ratos foi significativamente mais baixa do que

na monoterapia com ZOL ou PRO. Isso indica que a terapia combinada com ZOL mais PRO engrossa e fortalece o osso cortical. É interessante notar que nos animais tratados com monoterapia e terapia combinada, o peso seco e das cinzas

**Tabela 3 – 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) <sup>a</sup>	Peso das cinzas do osso (mg/osso) <sup>a</sup>
Controle normal	630,7 $\pm$ 8,1	381,4 $\pm$ 7,7	639,8 $\pm$ 12,2 <sup>b</sup>	385,7 $\pm$ 9,4 <sup>b</sup>
IPTD (controle positivo)	620,5 $\pm$ 10,9	368,9 $\pm$ 4,3	543,9 $\pm$ 15,5	321,5 $\pm$ 11,5
IPTD + ZOL	622,1 $\pm$ 18,1	379,1 $\pm$ 7,2	593,7 $\pm$ 13,7 <sup>b,c</sup>	351,7 $\pm$ 9,8 <sup>b,c</sup>
IPTD + PRO	619,3 $\pm$ 12,5	372,9 $\pm$ 8,5	592,4 $\pm$ 12,3 <sup>c,d</sup>	346,1 $\pm$ 12,3 <sup>b,d</sup>
IPTD + ZOL + PRO	638,2 $\pm$ 9,2	388,9 $\pm$ 15,6	617,9 $\pm$ 15,5 <sup>c</sup>	365,6 $\pm$ 6,2 <sup>e</sup>

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

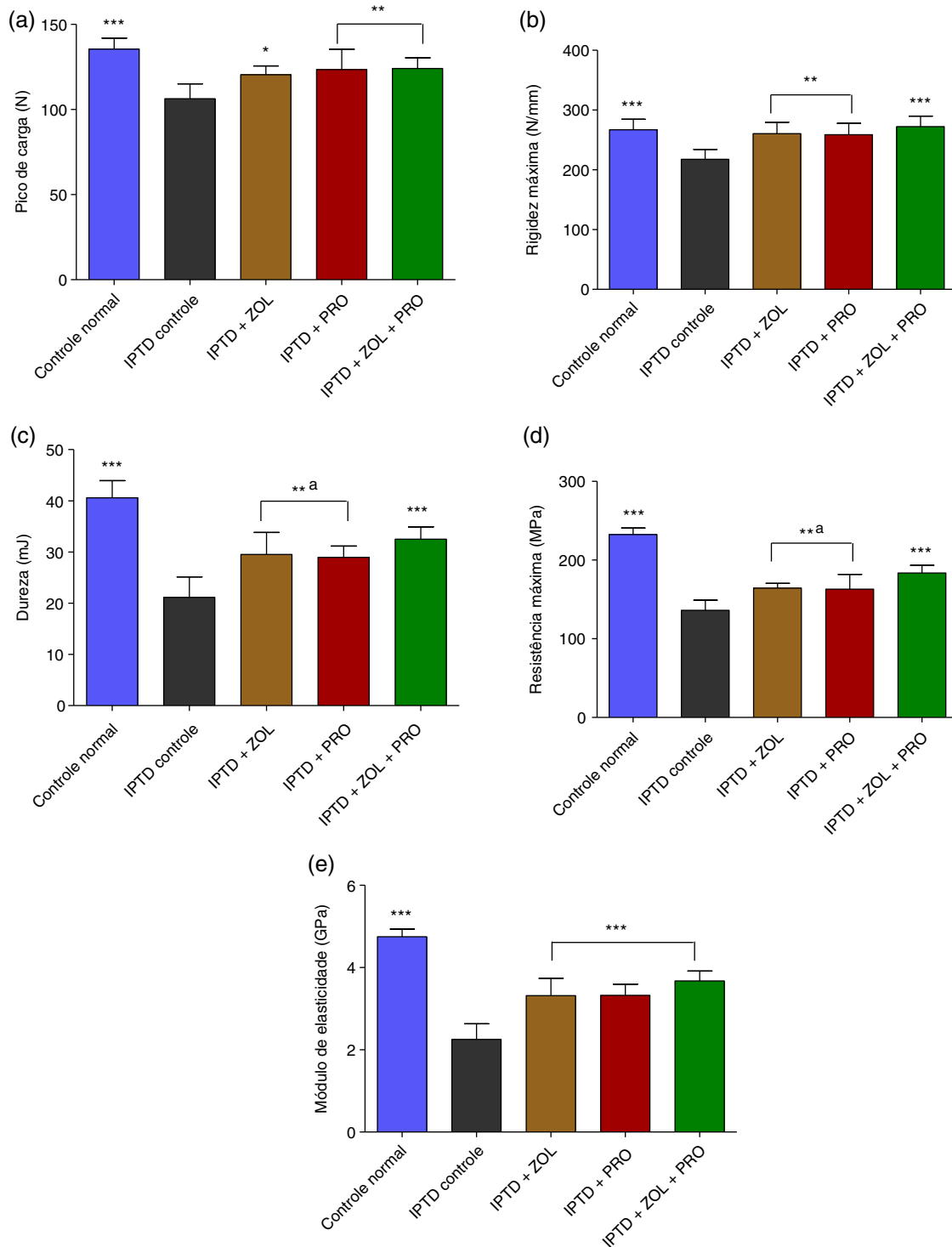
<sup>a</sup> Indica, para o parâmetro, uma diferença significativa dos tratamentos ativos entre as duas patas.

<sup>b</sup> p < 0,05.

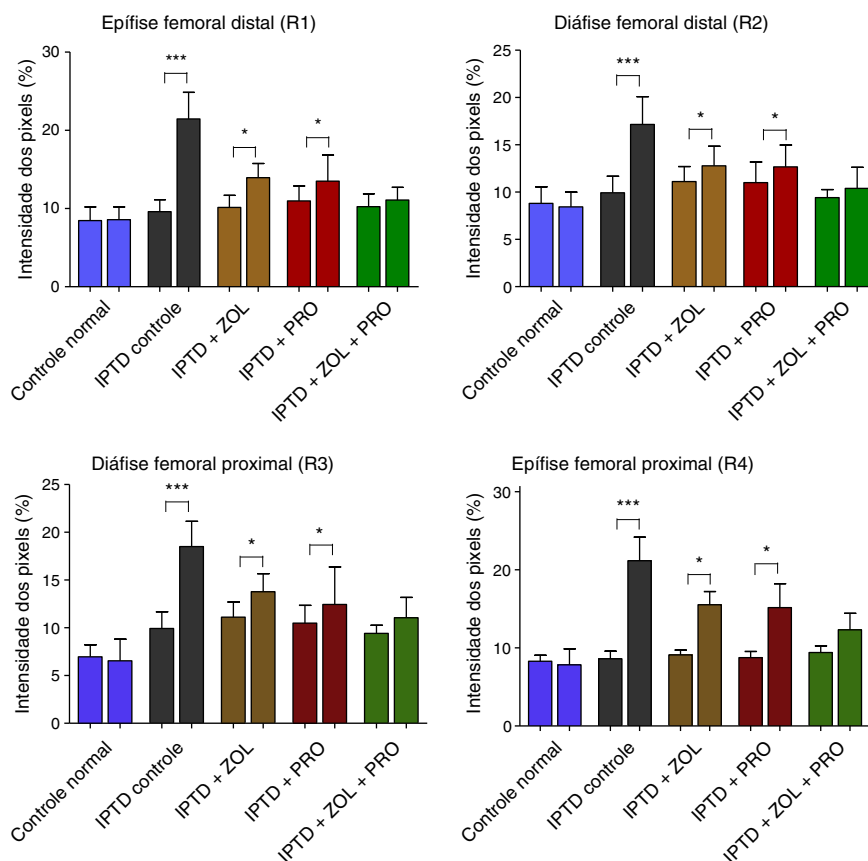
<sup>c</sup> p < 0,001, comparado com o grupo IPTD (controle positivo).

<sup>d</sup> p < 0,05, comparado com o grupo ZOL mais PRO. Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).

<sup>e</sup> p < 0,01.



**Figura 2 – Efeitos do ácido zoledrônico, propranolol ou ácido zoledrônico mais propranolol sobre a resistência mecânica da diáfise femoral. A diáfise foi submetida ao teste de flexão de três pontos até a falha, que forneceu dados sobre o pico de carga (a), a rigidez máxima (b), a dureza (c), a resistência máxima (d) e o módulo de elasticidade (e). 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); <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , comparado com o grupo ZOL + PRO. Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).**



**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  $\pm$  DP). Todos os grupos, com exceção do grupo controle normal, foram submetidos à imobilização da pata traseira direita (IPTD).**

do fêmur direito imobilizado foi significativamente maior do que do que no grupo IPTD (controle positivo). Além disso, nos animais tratados com terapia combinada (ZOL mais PRO), o peso seco e das cinzas do fêmur direito imobilizado foi significativamente maior do que nos grupos ZOL ou PRO. Esses resultados mostram que a terapia combinada com ZOL mais PRO é benéfica em aumentar a massa óssea do fêmur do rato, que estava diminuída em decorrência da IPTD.

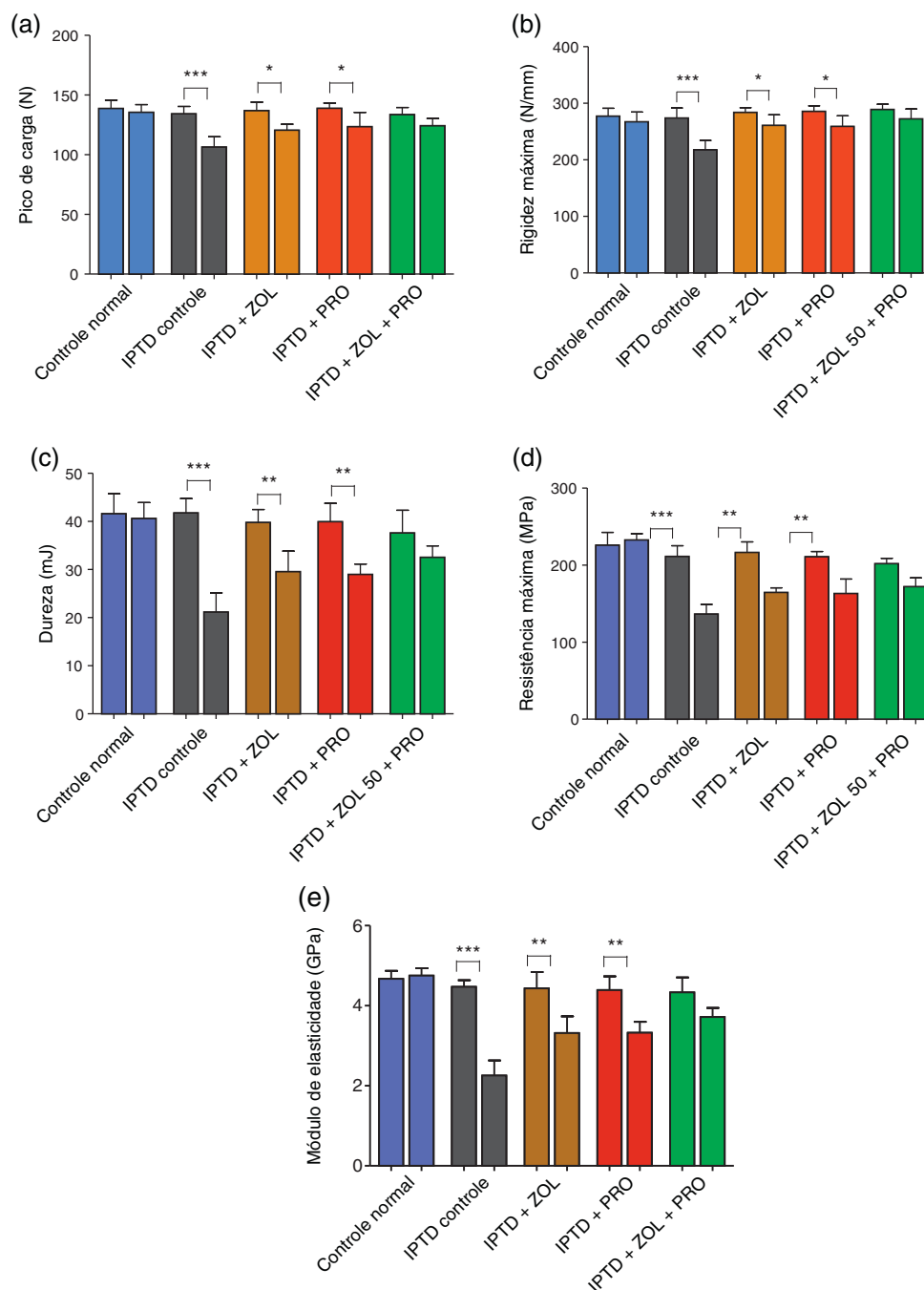
A carga mecânica é essencial para a manutenção da força do osso. A força do osso é determinada pela massa óssea e pelas propriedades intrínsecas do material ósseo. A inatividade física decorrente de lesões medulares, repouso prolongado em idosos e astronautas expostos à microgravidade durante missões espaciais aceleram a deterioração da microarquitetura óssea e desmineralização.<sup>2,7</sup> A terapia combinada com ZOL mais PRO foi estatisticamente superior à monoterapia com ZOL e PRO em aumentar a dureza e resistência máxima da diáfise femoral média. Os dados atuais se correlacionam com os achados em nossos estudos anteriores, que demonstraram os efeitos da terapia combinada com ZOL mais PRO sobre as propriedades mecânicas do osso de ratas ovariectomizadas.<sup>7</sup> Portanto, a possibilidade de que a terapia combinada com ZOL mais PRO seja capaz de tratar/prevenir a perda óssea induzida pela falta de descarga de peso é alta.

Este estudo tem várias limitações. Deve-se considerar que a extrapolação dos dados obtidos em estudos com ratos para seres humanos deve ser feita com precaução, porque (1) os ratos são animais quadrúpedes e, por conseguinte, experimentam um padrão de carga diferente daquele dos seres humanos; e (2) o padrão de remodelação óssea no rato é diferente daquele dos seres humanos. No entanto, a vantagem de usar esse modelo de rato pré-clínico é que ele possibilita a avaliação não só do turnover ósseo e da massa óssea, mas também das propriedades mecânicas do osso.

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 grave induzida pela IPTD não foi totalmente corrigida com a monoterapia com ZOL ou PRO. Em contraste, a terapia combinada com ZOL mais PRO mostrou proteção completa contra a osteoporose por desuso, o que sugere que essa modalidade de tratamento tem uma vantagem terapêutica sobre a monoterapia no tratamento da osteoporose por desuso.

No que diz respeito à situação clínica, com o conhecimento adquirido com os estudos mencionados anteriormente relativos à imobilização e o presente estudo, parece aconselhável reduzir os períodos de imobilização tanto quanto possível<sup>24,25</sup>





**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), a rigidez máxima (b), a dureza (c), a resistência máxima (d) e o módulo de elasticidade (e). 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).**

e, talvez, considerar o uso da terapia combinada com ZOL mais PRO como proteção contra a perda da densidade e resistência óssea, mesmo durante a imobilização em curto prazo. Além disso, a terapia combinada com ZOL mais PRO pode prevenir ou reduzir o risco de fibrilação atrial, uma das graves reações farmacológicas adversas ao ZOL.<sup>7</sup> Em outras situações clínicas

que envolvem a imobilização a muito longo prazo (paraplegia ou tetraplegia – ambas após lesões medulares – ou hemiplegia após um acidente vascular encefálico e missões espaciais de longa duração), o tratamento preventivo com ZOL mais PRO também pode ser recomendado, com base nos achados deste estudo pré-clínico.

## Conclusão

Este estudo fornece evidências de que o PRO e o ZOL, quando administrados como monoterapia, são capazes de reverter o efeito inibitório da imobilização sobre a formação óssea. Este estudo é o primeiro a demonstrar que a terapia combinada com ZOL mais PRO é altamente eficaz em melhorar as propriedades do osso em um modelo animal de osteoporose por desuso e sugere que a terapia combinada tem uma vantagem terapêutica sobre a monoterapia com ZOL ou PRO na prevenção e no tratamento da osteoporose por desuso induzida pela inatividade mecânica. Os achados são consistentes com os efeitos do ZOL mais PRO sobre a perda óssea por deficiência de estrogênio e ampliam o conhecimento que se tem a respeito dos efeitos desse tratamento sobre a perda óssea induzida pela imobilização. Assim, esse regime combinado pode ser de interesse para avaliação adicional por ensaios clínicos. Além disso, o PRO pode ser um potencial novo agente anabolizante do tecido ósseo para a prevenção/tratamento da osteoporose, que pode ser usado isoladamente ou em associação aos difosfonatos.

## 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 Priydarshi 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

1. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2006;17:1726-33.
2. 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.
3. 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.
4. Russell RGG, 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.
5. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Drugs for the management of osteoporosis: a review. *Rev Bras Reumatol.* 2011;51:365-82.
6. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007;356:1809-22.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Bonnet N, Benhamou CL, Malaval L, Goncalves C, Vico L, Eder V, et al. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *J Cell Physiol.* 2008;217:819-27.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Johnston S, Andrews S, Shen V, Cosman F, Lindsay R, Dempster DW, et al. The effects of combination of alendronate and human parathyroid hormone (1-34) on bone strength are synergistic in the lumbar vertebra and additive in the femur of C57BL/6J mice. *Endocrinology.* 2007;148:4466-74.
17. Yang X, Chan YH, Muthukumaran P, Dasde S, Teoh SH, Lee T. Ibandronate does not reduce the anabolic effects of PTH in ovariectomized rat tibiae: a microarchitectural and mechanical study. *Bone.* 2011;48:1154-63.
18. Campbell GM, Bernhardt R, Scharnweber D, Boyd SK. The bone architecture is enhanced with combined PTH and alendronate treatment compared to monotherapy while maintaining the state of surface mineralization in the OVX rat. *Bone.* 2011;49:225-32.
19. 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.
20. Huang HH, Brennan TC, Muir MM, Mason RS. Functional alpha1- and beta2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *J Cell Physiol.* 2009;220:267-75.
21. Sahana H, Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR, Suresh S, Rao RR, et al. Improvement in bone properties by risedronate adsorbed hydroxyapatite novel nanoparticle formulation in rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Biomed Nanotechnol.* 2012;9:1-9.

- 
22. 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.
  23. Trebacz H. Disuse-induced deterioration of bone strength is not stopped after free remobilization in young adult rats. *J Biomech*. 2001;34:1631-6.
  24. Kannus P, Jarvinen M, Sievanen H, Jarvinen TAH, Oja P, Vuori I. Reduced bone mineral density in men with a previous femur fracture. *J Bone Miner Res*. 1994;9:1729-36.
  25. Kannus P, Jarvinen M, Sievanen H, Oja P, Vuori I. Osteoporosis in men with a history of tibial fracture. *J Bone Miner Res*. 1994;9:423-9.