

INFLUÊNCIA DO IMUNOSSUPRESSOR TACROLIMUS (FK-506) NA RESISTÊNCIA À FLEXÃO DE FÊMURES: ESTUDO EM RATOS

INFLUENCE OF THE IMMUNOSUPPRESSANT TACROLIMUS (FK-506) ON THE FLEXURAL STRENGTH OF FEMUR: A STUDY IN RATS

Matheus Melo Pithon¹, Ana Carolina Dias Viana de Andrade², Vinícius de Brito Rodrigues³, Rogério Lacerda dos Santos⁴

RESUMO

Objetivo: Avaliar a resistência à fratura de fêmures de ratos tratados com o imunossupressor tacrolimus FK-506 e compará-los a ratos tratados com placebo e não tratados. **Métodos:** Foram utilizados 90 ratos da linhagem Wistar machos. Os animais tinham nove semanas de idade e peso entre 220 e 280g. O medicamento utilizado neste estudo foi o agente imunossupressor tacrolimus administrado por via oral, 2mg/kg/dia. A suspensão foi administrada com auxílio de seringa de insulina, sendo a dose terapêutica de manutenção suficiente para manter a atividade imunossupressora. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n = 30): grupo 1, nenhuma substância administrada; grupo 2, administração do imunossupressor tacrolimus FK-506; e grupo 3, administrado apenas veículo. O tratamento com FK-506 foi realizado por 28 dias. Foram avaliadas as contagens totais de leucócitos e diferencial (linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos), com objetivo de monitoramento do efeito imunossupressor. Uma outra análise realizada foi a da densitometria óssea por absorção de raios-X de dupla energia (DXA) antes e após administração do fármaco. Para avaliar a resistência à flexão, desenvolveu-se dispositivo que serviu de apoio para realização dos ensaios mecânicos em máquina universal de ensaios mecânicos EMIC. **Resultados:** Os resultados da resistência à flexão demonstraram diferenças estatísticas entre os grupo 1 e 2 (p = 0,001) e 2 e 3 (p = 0,001). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos 1 e 3 (p = 0,995). **Conclusões:** Os fêmures de ratos tratados com o imunossupressor apresentam menor resistência mecânica que os de ratos normais e os que utilizaram placebo.

Descritores – Fraturas do fêmur; Densitometria; Tacrolimo

ABSTRACT

Objective: To evaluate the resistance to femur fractures in rats treated with the immunosuppressant tacrolimus FK-506 and compare them to untreated rats and rats treated with placebo. **Methods:** We used 90 male Wistar rats. The animals were 9 weeks old and weighing between 220 g and 280 g. The immunosuppressive agent tacrolimus, 2 mg / kg / day, orally administered was used in this study. The suspension was administered using an insulin syringe, and the maintenance dose was sufficient to maintain the immunosuppressive activity. The animals were randomly divided into 3 groups (n=30): Group 1, no substance administered; Group 2 was administered the immunosuppressant tacrolimus FK-506; and Group 3 was administered only the vehicle. Treatment with FK-506 was performed for 28 days. Total and differential (lymphocytes, monocytes, eosinophils and neutrophils) leukocyte counts were done to monitor the immunosuppressive effect. Bone densitometry analysis by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) was also done before and after administration of the drug. To evaluate the flexural strength, a support device was developed to aid in mechanical tests using an EMIC universal testing machine. **Results:** The results of the flexural strength tests showed statistical differences between group 1 and 2 (p = 0.001) and 2 and 3 (p = 0.001). No statistical difference was found between groups 1 and 3 (p = 0.995). **Conclusions:** The femurs of rats treated with immunosuppressive agent have lower mechanical strength than those of normal rats and those using placebo.

Keywords – Femoral fractures; Densitometry; tacrolimus

1 – Especialista em Ortodontia pela Universidade Federal de Alfenas – Unifal; Mestre em Ortodontia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; Doutorando em Ortodontia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; Professor auxiliar na área de Ortodontia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

2 – Médica graduada pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – EBMSP.

3 – Acadêmico do curso de Medicina Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

4 – Especialista em Ortodontia pela Universidade Federal de Alfenas – Unifal; Mestre em Ortodontia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; Doutorando em Ortodontia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

Trabalho realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro e Fundação Oswaldo Cruz Fiocruz-RJ.

Correspondências: Av. Otávio Santos, 395, sala 705, Centro Odontomédico Dr. Altamirando da Costa Lima, Bairro Recreio – 45020-750 – Vitória da Conquista – Bahia. – E-mail: matheuspithon@bol.com.br

Declaramos inexistência de conflito de interesses neste artigo

INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea por unidade de volume, sem redução significativa do quociente entre a fase mineral e orgânica, nem alterações qualitativas da matriz⁽¹⁾. Associa-se a alterações da microarquitetura óssea e resulta em uma fragilidade aumentada do esqueleto, com risco acrescido de ocorrência de fraturas por traumatismo mínimo⁽¹⁻³⁾. O osso na osteoporose tem comportamento biológico normal na mineralização do osteoide. O que ocorre é o desequilíbrio entre a reabsorção (atividade osteoclástica) e a formação (atividade osteoblástica)⁽¹⁾.

Embora a ideia mais comum seja a de que a osteoporose acometa primariamente as mulheres pós-menopausa, outras populações também são de alto risco. Um desses grupos é formado pelos receptores de transplante de órgãos. Quanto maior a sobrevida desses pacientes, maior será o tempo de exposição aos riscos de fraturas⁽⁴⁾. Nas últimas décadas, os transplantes vêm se tornando uma terapia efetiva para doenças renais, hepáticas, cardíacas e pulmonares em estágios finais. O Brasil acompanha essa progressão no número de transplantes⁽⁵⁾.

A sobrevida após o transplante varia de 50% dos casos em cinco anos para receptores de pulmão a 74% em 10 anos para receptores de rim de doadores vivos HLA idênticos⁽⁵⁾.

Os inibidores da calcineurina-fosfatase (ciclosporina e tacrolimus) são responsáveis, em parte, pela maior sobrevida dos pacientes transplantados e pela redução na dose de glicocorticoides. Porém, como os glicocorticoides, os inibidores da calcineurina-fosfatase também provocam diminuição da massa óssea, sendo que a maior perda óssea ocorre nos primeiros seis meses após o transplante, quando a terapêutica imunossupressora é mais agressiva⁽⁶⁾. Apesar de atualmente a tendência ser a de se utilizar a menor dose total de imunossupressores, muitos pacientes transplantados ainda desenvolvem fraturas como complicação^(5,6).

A incidência de fraturas é menor após transplantes renais (7% a 11% em receptores de rim não diabéticos) e maior em receptores de outros órgãos: 17,2% a 42% após transplantes hepáticos, 18% a 50% após transplantes cardíacos e 25% a 29% após transplantes pulmonares⁽⁴⁾.

Entretanto, as estimativas sobre a prevalência ou incidência de fraturas após transplantes variam muito. Isto talvez reflita alguns fatores como diferenças na seleção dos pacientes, nos regimes imunossupressores e nos critérios utilizados para o diagnóstico de fratura de vértebra⁽⁵⁾.

O objetivo do presente trabalho é avaliar a resistência à fratura de fêmures de ratos tratados com o imunossupressor tacrolimus FK-506 em comparação com ratos não tratados e tratados com placebo.

MÉTODOS

Animais utilizados

Foram utilizados 90 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com nove semanas de idade e peso entre 220 e 280g. Os ratos foram cedidos pelo Cecal (Fiocruz-RJ) mantidos em gaiolas (três animais por gaiola), em ambiente com ar-condicionado à temperatura entre 19-22°C e umidade de 40% para 50%, mantidos por um fotoperíodo de 12/12 horas. Os animais foram alimentados com ração granulada (Nuvilab-CR1, Nuvital, Curitiba, Paraná, Brasil) e água não gasosa de acordo com as orientações para pesquisa animal da Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz-RJ.

MEDICAMENTO

O medicamento utilizado neste estudo foi o imunossupressor tacrolimus (PROGRAF[®], Astellas, Irlanda) administrado por via oral (intragástrica), 2,0mg/kg/dia (dose de manutenção) em um volume de 2ml/kg/dia, a partir de suspensão em água e dextrose 5% de cápsulas (PROGRAF[®] 5mg cápsulas, Astellas, Irlanda) durante 28 dias de experimentação. A suspensão foi administrada com auxílio de seringa de insulina (Plastipak 1ml, Becton Indústria Cirúrgica Ltda., Brasil[®]). O peso dos animais foi aferido a cada aplicação e a dose ajustada conforme a necessidade. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos:

Grupo 1: nenhuma substância administrada;

Grupo 2: administração do imunossupressor FK-506 tacrolimus (PROGRAF[®] 5mg, Astellas, Irlanda); e

Grupo 3: administrado apenas veículo.

CONTROLE SANGUÍNEO

Foram avaliados a contagem total de leucócitos e diferencial (linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos) no dia 0 e no momento da eutanásia dos animais (28 dias), com objetivo de monitoramento do efeito imunossupressor do medicamento. A coleta de sangue foi realizada a partir de corte na ponta da calda do rato. A contagem de leucócitos foi realizada utilizando um microscópio de luz (Olympus BX40, Tóquio, Japão).

ENSAIO MECÂNICO

O ensaio mecânico foi realizado em máquina universal (Emic DL 10.00, São José dos Pinhais, Brasil). Para tal, confeccionou-se dois dispositivos: um em forma de garra, que se acoplava na parte superior da máquina, o qual serviu para tração do fêmur e um outro inferior, que serviu de base para fixar o osso (Figura 1). A velocidade utilizada foi de 0,5mm/s. O valor da carga e do deslocamento foram registrados e a força máxima para fratura (F_{max}), anotada.

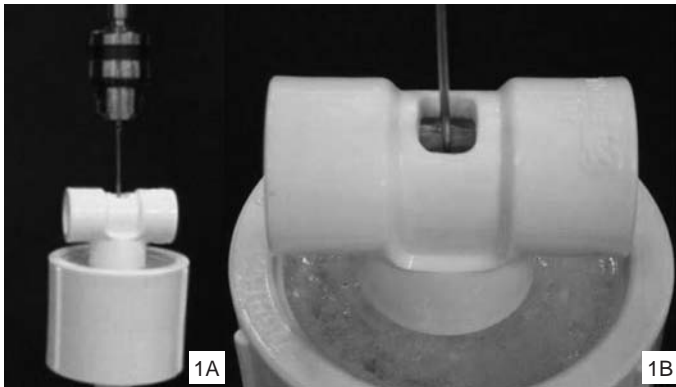


Figura 1 – A) Dispositivo utilizado para a realização do ensaio mecânico; B) Vista aproximada do fêmur sendo traçado durante ensaio mecânico

ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

O conteúdo ósseo mineral (COM) foi mensurado e dividido pela área para obtenção da densidade óssea mineral (DOM) dos fêmures de cada animal. Utilizou-se aparelho de densitometria por absorção de raios-X de dupla energia (DXA) (Prodigy, GE/Lunar, EUA). O fêmur foi colocado imerso em recipiente contendo arroz, simulando os tecidos moles. O escaneamento ósseo e a análise dos dados foram realizados utilizando *software* Prodigy versão 1.3 (Prodigy, GE/Lunar, EUA) para pequenos animais. A resolução (tamanho em pixels) foi de 0,3 x 0,6mm, com um colimador de 0,84mm de diâmetro. A largura da área escaneada foi de 9,9mm e o comprimento de 11,8mm. O tempo de escaneamento por fêmur foi de 0,5min. O fêmur foi escaneado e sua área total selecionada (Figura 2) para a avaliação da densidade óssea.

MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os dados obtidos dos testes de resistência à fratura, densitometria e contagem de linfócitos e leucócitos totais foram analisados estatisticamente com auxílio do programa SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Os valores foram submetidos à análise de variância (Anova), para determinar se havia diferenças estatísticas entre os grupos e, em seguida, ao teste de Tukey. Os resultados foram considerados com significância estatisticamente quando $P < 0,05$.

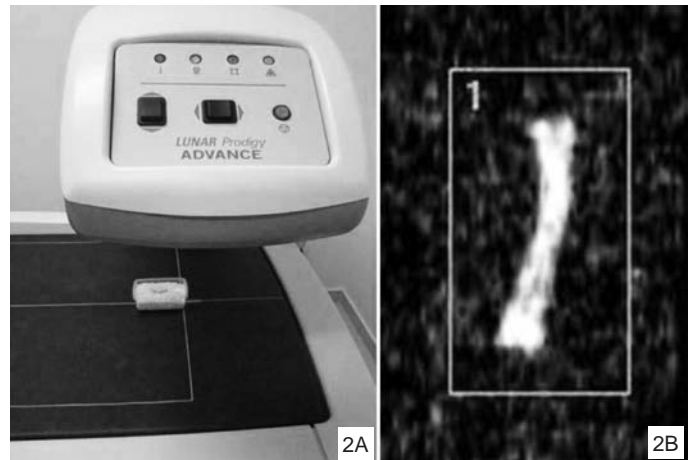


Figura 2 – A) Aparelho utilizado para análise da densitometria (Prodigy, GE/Lunar, EUA); B) Imagem de fêmur escaneado com densitômetro de raios-X (DXA) envolvido pela área selecionada para avaliação da densidade óssea

RESULTADOS

Contagem de linfócitos e leucócitos total

A contagem de linfócitos no tempo 0 foi de $7,71 \pm 0,7$ células/mm³. Com 28 dias esses valores diminuíram ($4,54 \pm 0,3$ células/mm³), apresentando diferenças estatísticas entre o tempo 0 e 28. Ocorreu redução também dos leucócitos, passando de $10,24 \pm 0,8$ para $6,75 \pm 0,6$ células/mm³ ($p < 0,05$).

Resistência à flexão

Os resultados da resistência à flexão e fratura mostraram diferenças estatísticas entre o grupo tratado com o imunossupressor com os grupos não tratados e tratado com placebo (Tabela 1).

Tabela 1 – Média, desvio padrão e análise estatística dos grupos avaliados

Grupos	Média (DP)	Estatística*
1	171,18 ($\pm 26,07$)	A
2	117,46 ($\pm 23,19$)	B
3	169,98 ($\pm 27,11$)	A

DP = desvio padrão

* = análise estatística, em que letras iguais representa ausência de diferenças estatísticas ($p > 0,05$)

Densitometria óssea

A densitometria óssea mostrou valores diferentes entre o grupo que recebeu medicamento ($140,9 \pm 12,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) com os que não receberam ($152,2 \pm 3,4$ e $153,5 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), respectivamente para os grupos 1 e 3. Tal diferença foi avaliada estatisticamente com $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

O tacrolimus é um antibiótico macrolídeo descoberto em 1984 por um laboratório japonês, mostrando-se com

eficiente efeito imunossupressor. Essa droga é produzida pela fermentação da bactéria *Streptomyces tsukubaensis* e é capaz de suprimir as respostas imunológicas humorais e celulares, representando uma alternativa à ciclosporina-A⁽⁷⁾.

O uso clínico do tacrolimus é crescente, sendo considerada atualmente a droga base em mais de 80% dos transplantes hepáticos e 30% dos transplantes renais⁽⁸⁾. Seu modo de ação é na ativação das células T, bloqueando a calcineurina⁽⁸⁾. Um dos efeitos adversos de seu uso é agindo negativamente sobre o esqueleto, aumentando a reabsorção óssea, levando a significativa perda óssea.

Uma redução na massa mineral leva a pensar no aumento do número de fraturas ósseas nesses indivíduos. Baseado nessa premissa, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência à flexão e fratura de fêmures de ratos tratados com esse medicamento.

Para tal utilizou-se a dose de 2,0mg/kg/dia, a mesma utilizada por Sabry *et al*⁽⁹⁾, que avaliaram três doses distintas de tacrolimus em ratos transplantados (3,2mg/kg/dia, 2,0mg/kg/dia e 1,0mg/kg/dia em suspensão oral) e observaram que a dose de 2,0mg/kg/dia mostrou ser a dose suficiente para manter os níveis séricos terapêuticos sem causar perda de peso e mínimos efeitos colaterais, o que suporta os achados de Hayakawa *et al*⁽¹⁰⁾. Neste estudo não observamos perda de peso e efeitos colaterais de significância clínica nos ratos tratados com tacrolimus, como prurido⁽¹¹⁾, risco de infecções⁽¹²⁾ e diarreia⁽¹²⁾ que ocorre com frequência em humanos.

Para monitoramento do efeito imunossupressor do medicamento foram realizadas contagens de leucócitos total e diferencial durante o experimento, com 28 dias houve diminuição de leucócitos totais, apresentando inclusive diferenças estatísticas entre os tempos 0 e 28.

REFERÊNCIAS

1. Wang Y, Tao Y, Hyman ME, Li J, Chen Y. Osteoporosis in china. *Osteoporos Int*. 2009;20(10):1651-62.
2. Fenton TR, Lyon AW, Eliasziw M, Tough SC, Hanley DA. Meta-analysis of the effect of the acid-ash hypothesis of osteoporosis on calcium balance. *J Bone Miner Res*. 2009;24(11):1835-40.
3. Solomon DH, Rekedal L, Cadarette SM. Osteoporosis treatments and adverse events. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(4):363-8.
4. Negri AL, Plantalech LC, Russo Picasso MF, Otero A, Sarli M. [Post-transplantation osteoporosis]. *Medicina (B Aires)*. 1999;59(6):777-86.
5. Cipriani R, Farias ML. [Osteoporosis after solid organs transplantation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(3):369-77.
6. Cohen A, Shane E. Osteoporosis after solid organ and bone marrow transplantation. *Osteoporos Int*. 2003;14(8):617-30.
7. Goto S, Stepkowski SM, Kahan BD. Effect of FK 506 and cyclosporine on heart allograft survival in rats. *Transplant Proc*. 1991;23(1 Pt 1):529-30.
8. Garcia SC. Cyclosporine A and tacrolimus: a review. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(6):393-401.
9. Sabry A, El-Agroudy A, Sheashaa H, Hawas S, El-Shahat FB, Barakat N. Co-administration of ketoconazole and tacrolimus therapy: a transplanted rat model. *Int Urol Nephrol*. 2006;38(3-4):713-8.
10. Hayakawa K, Hata M, Nishiyama T, Ohashi M, Ishikawa M. Maintenance of unresponsiveness by short-term pulse therapy with FK 506 in rat transplantation. *Transplant Proc*. 1996;28(3):1830-1.
11. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs*. 2003;63(12):1247-97.
12. Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs*. 2000;59(2):323-89.
13. Cvetkovic M, Mann GN, Romero DF, Liang XG, Ma Y, Jee WS, et al. The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G, and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. *Transplantation*. 1994;57(8):1231-7.
14. Kirino S, Fukunaga J, Ikegami S, Tsuboi H, Kimata M, Nakata N, et al. Regulation of bone metabolism in immunosuppressant (FK506)-treated rats. *J Bone Miner Metab*. 2004;22(6):554-60.
15. Rodino MA, Shane E. Osteoporosis after organ transplantation. *Am J Med*. 1998;104(5):459-69.
16. Katz IA, Takizawa M, Jaffe II, Stein B, Fallon MD, Epstein S. Comparison of the effects of FK506 and cyclosporine on bone mineral metabolism in the rat. A pilot study. *Transplantation*. 1991;52(3):571-4.
17. Abdelhadi M, Ericzon BG, Hultenby K, Sjöden G, Reinholdt FP, Nordenström J. Structural skeletal impairment induced by immunosuppressive therapy in rats: cyclosporine A vs tacrolimus. *Transpl Int*. 2002;15(4):180-7.

De acordo com Cvetkovic *et al*⁽¹³⁾, a partir do 14º dia de uso do tacrolimus, ocorre um desequilíbrio na atividade osteoblástica/osteoclástica; segundo eles, tal episódio pode estar associado a um aumento significativo de níveis do hormônio PTH (suspensão oral de FK-506 à 3,2mg/kg/dia). O mesmo foi confirmado por Kirino *et al*⁽¹⁴⁾, que relatou um aumento significativo na segunda semana com pico máximo na terceira semana (injeção intraperitoneal de FK-506 à 1,0mg/kg/dia), e que a partir de uma administração contínua de FK-506, o aumento do PTH leva ao início de perda de tecido ósseo. Tentando avaliar perda da massa mineral realizou-se análise densitométrica. Os resultados mostraram diferenças estatísticas entre os grupos onde utilizou-se o tacrolimus com os demais. Resultado esse que corroboram com Cvetkovic *et al*⁽¹³⁾ e Kirino *et al*⁽¹⁴⁾.

Relatos na literatura com resultados contraditórios e intensas discussões sobre o tacrolimus demonstram que este pode induzir a perda óssea em humanos^(6,15) e em modelos de animal experimental^(13,16,17).

Os resultados quanto à diminuição da densidade mineral apresentados entre os animais do grupo 1 e 3 com o grupo 2, no qual utilizou-se o tacrolimus, vêm a ser confirmados com ensaio mecânico de resistência à fratura dos fêmures desses animais. Ocorreu diminuição significativa na resistência à fratura dos fêmures dos ratos tratados ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

Pode-se concluir, com a realização desse trabalho, que os fêmures de ratos tratados com o imunossupressor tacrolimus FK-506 apresentaram menor densidade óssea mineral e resistência menor à flexão e fratura do que os tratados com placebo e os não tratados.