

# **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS HISTOPATOLÓGICOS DO ALENDRONATO NA MUCOSA GÁSTRICA DE RATOS**

*Lucas Antonio Duarte Nicolau (bolsista, PIBIC-UFPI), Renan Oliveira Silva (colaborador, UFPI – CMRV), André Luiz Reis Barbosa (colaborador, UFPI – CMRV), Jand-Venes Rolim Medeiros (Orientador, Depto de Biologia – UFPI – CMRV)*

## **INTRODUÇÃO**

O alendronato é um bifosfonato primário usado para tratamento da osteoporose e na doença de Paget (SIRIS et al., 1996, MEUNIER et al., 1999). Dentre os diversos bifosfonatos no mercado, estudos em animais e humanos sugerem que essa classe de drogas com cadeias amino-laterais, tais como alendronato e pamidronato, pode ter uma incidência maior de lesões gástricas (MACONI et al., 1995), possuindo como efeito colateral mais comum o aparecimento de desconforto e dor abdominal, que em determinadas situações podem ser determinante desde a redução do esquema terapêutico como a sua total interrupção, trazendo grande prejuízo na eficácia do tratamento. Esses sintomas acontecem por causa da injúria na mucosa e ulceração causadas por essa droga (ELLIOTT et al., 1998, KANATSU et al., 2004).

Os mecanismos pelos quais o alendronato e outros bifosfonados promovem injúria na mucosa ainda não estão completamente esclarecidos. Estudos *in vitro* usando um sistema de câmaras contendo tecidos de estômago de ratos demonstraram que a lesão na mucosa foi induzida quando a droga foi aplicada na superfície da mucosa, mas não apresentou lesão quando aplicada na camada serosa. Estes achados sugerem que o alendronato apresenta efeito irritante tópico no epitélio gástrico, ou seja, uma possível ação tóxica da droga. Histologicamente, o alendronato causa necrose epitelial, com edema subepitelial e infiltração de neutrófilos (WALLACE et al., 1999).

Assim, um alvo terapêutico eficaz para a lesão gástrica induzida por alendronato poderia ser conseguido investigando os possíveis mecanismos que contribuem para as alterações da mucosa ou buscando moléculas sinalizadoras que poderiam amplificar os mecanismos de defesa da mucosa gástrica.

Dentre as moléculas importantes para manutenção da integridade da mucosa gástrica se destaca os mediadores gasosos, como o monóxido de carbono (CO), óxido nítrico (NO) e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Esses gases de baixo peso molecular são importantes mediadores biológicos no corpo humano, participando de inúmeros processos fisiológicos e patológicos, como, por exemplo, gastroproteção em baixas concentrações. Contudo, a participação desses mediadores gasosos nas alterações gástricas ocasionadas pelo alendronato é pouco conhecida ainda.

Por conta disso, o presente trabalho propende estudar o efeito gastroprotetor do Monóxido de Carbono (CO), óxido nítrico (NO) e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), mediadores gasosos na lesão gástrica induzida por alendronato, além investigar ainda os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito.

## **METODOLOGIA**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso variando entre 150 a 200g, procedentes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC,

os quais foram mantidos em gaiolas metabólicas. Os animais foram acondicionados em salas com temperatura controlada, foram privados de alimentação até 18-24h antes dos experimentos, porém tiveram acesso livre a água. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o guia de cuidado em uso de animais de laboratório do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA) e esse projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa animal da UFPI.

Os animais foram inicialmente tratados, por gavagem, com uma droga doadora de CO (Hemina: 10 mg/kg), uma droga doadora de NO (Nitroprussiato de sódio: 10 mg/kg) ou uma droga doadora de H<sub>2</sub>S (Reagente de Lawesson: 81 µmol/kg) uma vez por dia durante quatro dias. Após 30 minutos, os animais também receberam alendronato (20 mg/kg, pH 7.0, v.o) sozinho ou após o tratamento com o doador CO (AIHARA et al., 2007). No quarto dia de tratamento, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos e abertos ao longo da grande curvatura (KO & CHO, 1998).

Amostras da mucosa do estômago foram retiradas e fixadas numa solução de formol a 10%, onde permaneceram por 24 horas. Após este procedimento, as amostras foram transferidas para uma solução de álcool a 70%. Em seguida, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina. Os cortes de 5 micrômetros foram então corados com hematoxilina e eosina para estudo ao microscópio ótico com ocular milimetrada ou sistema de aquisição de imagens. O critério para avaliação histológica será o de (LAINE & WEINSTEIN, 1988), que atribui escores aos seguintes parâmetros: edema (0-4), hemorragia (0-4), perda de células epiteliais (0-3) e infiltrado inflamatório (0-3), totalizando um máximo de 14 escores.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os animais tratados com alendronato apresentaram lesões microscópicas na mucosa gástrica e sinais que estão relacionados com a inflamação. Entretanto quando os animais foram tratados com droga doadora de CO (Hemina) estes parâmetros de inflamação foram revertidos significativamente como mostram os números na tabela que representam as médias dos escores.

Em relação à perda de células epiteliais e ao infiltrado inflamatório, observa-se que houve um resultado significativo ( $p < 0,05$ ) quando os animais foram pré-tratados com hemina comparados com o grupo tratado apenas com alendronato.

O alendronato é uma droga potencialmente efetiva para desordens do osso, e conhecido por causar sérias reações adversas no trato gastrointestinal, incluindo úlceras, diarreia e dor abdominal (GRAHAM et. al., 2002; MARSHALL et. al., 2000). Nossos dados confirmam que a administração de alendronato induz uma grave lesão na mucosa gástrica. Adicionalmente, o presente estudo sugere que o mediador gasoso monóxido de carbono (CO) foi capaz de proteger a mucosa gástrica dos animais frente às lesões induzidas por alendronato, demonstrando uma ação citoprotetora eficiente.

Estes resultados sugerem ainda que a inibição do infiltrado de células ao local da inflamação é um mecanismo de extrema importância para a prevenção do dano gástrico induzido pelo alendronato.

Temos que animais pré-tratados com drogas doadoras de NO (NPS) ou drogas doadoras de H<sub>2</sub>S (Reagente de Lawesson) tiveram resultados que revelaram efeito gastroprotetor. No entanto, os parâmetros do grupo pré-tratado com doador de NO (NPS) foram levemente mais acentuados em

relação ao grupo pré-tratado com doador de H<sub>2</sub>S (Reagente de Lawesson) e os que mais se destacaram foram: a perda de células epiteliais e o infiltrado de células inflamatórias do grupo pré-tratado com NPS em resultado significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo controle.

O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é um mediador gasoso sintetizado a partir da L-cisteína, primariamente via cistationa- $\gamma$ -liase (CSE) e cistationa- $\beta$ -sintetase (CBS) (WANG, 2002). Estudos recentes sugerem que o H<sub>2</sub>S contribui com a defesa da mucosa (MEDEIROS, 2009). Apesar de expressar as duas enzimas, a expressão da CSE é a principal em relação à lesão gástrica. Analisando a imunohistoquímica, verificou-se a expressão, então, da enzima CSE através do padrão de coloração quando comparada com o grupo controle, sugerindo dessa forma a participação do mediador gasoso H<sub>2</sub>S no efeito gastroprotetor.

Pelo ensaio imunohistoquímico, verificou-se ainda a participação da enzima hemeoxigenase-1 (HO-1), enzima que interage com grupamentos heme e gera como um dos produtos dessa interação bioquímica o monóxido de carbono (CO) (OTTERBEIN, 2003). Na figura 2 (painel B) foi observada a expressão da HO-1 através do padrão de coloração do tecido gástrico. Pode-se sugerir que este efeito, a expressão das enzimas, pode ser uma resposta de defesa do organismo reagindo contra a lesão causada pelo alendronato.

**APOIO:** CNPq/UFPI

## **CONCLUSÃO**

- ✓ Este estudo sugere que os mediadores gasosos monóxido de carbono (CO), óxido nítrico (NO) e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) exercem efeito gastroprotetor atuando como uma possível via desde efeito na lesão induzida por alendronato em ratos.
- ✓ Nossos achados sugerem que provavelmente o organismo em resposta de defesa reage à lesão causada pelo alendronato expressando as enzimas cistationa- $\gamma$ -liase (CSE) e heme oxigenase-1 (HO-1).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AIHARA, E.; HAYASHI, S.; AMAGASE, K.S.; KATO K.; TAKEUCHI. Prophylactic effect of rebamipide against the irritative and healing impairment actions of alendronate in rat stomachs. **Inflammopharmacology**. v. 15, p. 196–202, 2007.
- ELLIOTT, S.N.; MCKNIGHT, W.; DAVIES. Alendronate induces gastric injury and delays ulcer healing in rodents. **Life Sci**, v. 62, p. 77–91, 1998.
- GRAHAM, D.Y. What the gastroenterologist should know about the gastrointestinal safety profiles of bisphosphonates. **Dig Dis Sci**, 47, 1665–1678, 2002.
- KANATSU, K.; AIHARA, E.; OKAYAMA, M. Mucosal irritative and healing impairment action of risedronate in rat stomachs: Comparison with alendronate. **J Gastroent Hepatology**. v. 19, p. 512–520, 2004.

- KO, J.K-S.; CHO, C.H. Histopatological Study of Mechanisms of Adaptive Cytoprotection on Ethanol-Induced Mucosal Damage in Rat Stomachs. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, p. 1248-1257, 1998.
- LAINE, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, p. 1254-1262, 1988.
- MACONI, G.; BIANCHI, P.G. Multiple ulcerative esophagitis caused by alendronate. **Am J Gastroenterol**. v. 90, p. 1889-90, 1995
- MARSHALL, J. K., RAINSFORD, K. D., JAMES, C. et al. A randomized controlled trial to assess alendronate-associated injury of the upper gastrointestinal tract. **Aliment Pharmacol Ther**, 4, 1451–1457, 2000.
- MEDEIROS, J.V.R.; BEZERRA, V.H.; GOMES, A.S.; BARBOSA, A.L.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; SOARES, P.M.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; SOUZA, M.H.L.P. Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 330(3), p. 764-70. 2009.
- MEUNIER P.J.; DELMAS P.D.; EASTELL R.; MCCLUNG M.R.; PAPAPOULOS S.; RIZZOLI R.; SEEMAN E.; WASNICH R.D. Diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women: clinical guidelines. **Clinical Therapeutics**. 21, 1025–1044, 1999.
- OTTERBEIN, L.; SOARES, M.P.; YAMASHITA, K.; BACH, F.H. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology*, v. 24, p. 449-455, 2003.
- SIRIS, E.; WEINSTEIN, R.S.; ALTMAN, R. et al. Comparative study of alendronate versus etidronate for the treatment of Paget's disease of bone. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 81, p. 961-967, 1996.
- WALLACE, J.L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; BASTAKI, S.; BLANK, M.A. N-bisphosphonates cause gastric epithelial injury independent of effects on the microcirculation. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 13, p. 1675-1682, 1999.
- WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J**, v. 16, p. 1792-1798, 2002.

**PALAVRAS-CHAVE:** *gastroproteção, aminobifosfonatos, alendronato, mediadores gasosos.*