

GLÁUCIA GUIMARÃES AMARAL

**USO ISOLADO OU COMBINADO DE ETIDRONATO, RISEDRONATO,
PRAVASTATINA E IPRIFLAVONA NO TRATAMENTO DA
OSTEOPOROSE INDUZIDA POR OVARECTOMIA EM RATAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

GLÁUCIA GUIMARÃES AMARAL

**USO ISOLADO OU COMBINADO DE ETIDRONATO, RISEDRONATO,
PRAVASTATINA E IPRIFLAVONA NO TRATAMENTO DA
OSTEOPOROSE INDUZIDA POR OVARIECTOMIA EM RATAS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 25 de novembro de 2010.

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Co-orientador)

Prof. Rilene Ferreira D. Valadares

Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada

Prof. Tânia Toledo de Oliveira

Prof. Aloísio da Silva Pinto
(Orientador)

**À minha mãe, Fátima,
por TUDO.
Aos meus irmãos, Willer
e Helder, pela amizade e
companheirismo.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, presença constante em minha vida, pela oportunidade de trilhar sonhos.

À minha mãe e irmãos por suavizarem com apoio e abnegação esta trajetória.

Ao professor Aloísio, por ter sido mais que meu orientador, um verdadeiro pai.

À Joselita, Marcelo, Marla e Mayara pelo acolhimento carinhoso em seu lar.

À Rose, pela incrível disposição em ajudar, se tornando minha grande amiga.

À Joelma, Waléria e José Elias, grandes companheiros e também verdadeiros amigos da pós-graduação.

À Mariella, pelo auxílio na execução desta pesquisa.

Ao professor Mário Jefferson, por ter aceito meu convite e principalmente por me receber em Araçatuba de maneira calorosa e divertida.

Aos professores Ricardo e Tânia, que estiveram sempre dispostos a colaborar na construção deste trabalho.

À professora Rilene, por ser sempre solícita e estar predisposta a percorrer comigo um novo caminho.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista.

Obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. OBJETIVO.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Animais.....	13
4.2. Grupos Experimentais.....	14
4.3. Coleta de Material.....	14
4.4. Avaliação dos Marcadores Bioquímicos.....	15
4.5. Exame Histomorfométrico.....	15
4.6. Análise Densitométrica.....	16
4.7. Análise Estatística.....	16
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO.....	23
7. CONCLUSÕES.....	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP	Proteína Morfogenética Óssea
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
DMO	Densidade Mineral Óssea
DVT	Departamento de Veterinária
DXA	Absorção de raios X de dupla energia
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
FPPS	Farnesil Pirofosfato Sintase
HE	Hematoxilina-Eosina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
PP	Pirofosfato
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor ativador nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador nuclear Kappa B
TNF α	Fator α de Necrose Tumoral
UFV	Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ação RANKL/RANK/OPG no mecanismo de ativação e inibição dos osteoclastos.....	5
Figura 2 – Mecanismo de ação das estatinas e bisfosfonatos na cascata da prenilação de proteínas.....	10
Figura 3 – Microfotografias do osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de tibia das ratas dos grupos controle (G1), osteoporótico (G2) e isolados (G3 a G6)	21
Figura 4 – Microfotografias do osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de tibia das ratas dos grupos controle (G1), osteoporótico (G2) e combinados (G7 a G11).....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Valores médios de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, e fosfatase alcalina óssea séricos de ratas submetidas ou não a diferentes tratamentos..... 17

Tabela II – Valores médios de densidade mineral óssea das tíbias e variações percentuais em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos..... 18

Tabela III – Valores médios de densidade trabecular óssea em pontos percentuais e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos..... 19

RESUMO

AMARAL, Gláucia Guimarães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2010. **Uso isolado ou combinado de etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona no tratamento da osteoporose induzida por ovariectomia em ratas.** Orientador: Aloísio da Silva Pinto. Co-orientadores: Ricardo Junqueira Del Carlo e Cláudio César Fonseca.

Este trabalho constituiu em um ensaio biológico com o objetivo de estudar o possível tratamento da osteoporose induzida por ovariectomia, por meio do uso isolado e combinado, utilizando, neste caso, metade das doses dos compostos isolados etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona, que são agentes que demonstraram efeitos positivos sobre o metabolismo ósseo. Ratas Wistar, adultas, pesando em média 250g foram utilizadas. O processo da indução da osteoporose foi feito por intervenção cirúrgica quando os animais completaram 5 meses de idade, por incisão retroumbilical, dando acesso a cavidade abdominal, sob anestesia geral, utilizando da associação de quetamina e xilazina nas doses de 50 e 5 mg/Kg, respectivamente, à exceção dos animais que constituiu o grupo controle (G1). Após 12 semanas, deu-se início ao tratamento farmacológico. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 11 grupos experimentais, sendo os grupos constituídos de 6 animais. O grupo 1 (G1), controle, foi constituído de animais que não foram submetidos a cirurgia ou ao tratamento. No grupo 2 (G2) houve somente a cirurgia. Os demais grupos, além do processo cirúrgico, foram tratados com os medicamentos; o grupo 3 (G3) recebeu etidronato (6 mg/kg), o grupo 4 (G4) risedronato (0,07 mg/kg), o grupo 5 (G5) pravastatina (0,6 mg/kg), o grupo 6 (G6) ipriflavona (100 mg/kg), o grupo 7 (G7) etidronato e pravastatina (3 mg/kg e 0,3 mg/kg), o grupo 8 (G8) etidronato e ipriflavona (3 mg/kg e 50 mg/kg), o grupo 9 (G9) risedronato e pravastatina (0,035 mg/kg e 0,3 mg/kg), o grupo 10

(G10) risedronato e ipriflavona (0,035 mg/kg e 50 mg/kg) e o grupo 11 (G11) pravastatina e ipriflavona (0,3 mg/kg e 50 mg/kg). Todas as substâncias foram administradas por via oral, diariamente, durante 30 dias. Imediatamente antes dos animais serem eutanasiados, aos 35 dias, após o tratamento, foram coletados sangue para dosagens de cálcio, fósforo, albumina e proteínas totais, analisados no equipamento multiparamétrico de bioquímica Alizé e fosfatase alcalina óssea analisado no equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter. A seguir, através de dissecação do tecido muscular, as tíbias direitas foram coletadas e congeladas para estudo densitométrico, utilizando densitômetro ósseo de Raio-X com Smart Scan modelo DPX-ALPHA, com software especial para pequenos animais e as tíbias esquerdas foram coletadas, depois de fixadas, foram descalcificadas e processadas rotineiramente para estudo histomorfométrico, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e para avaliação da densidade trabecular óssea foi aplicado o método de cálculo planimétrico por contagem de pontos. O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com 11 tratamentos em 6 repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. Os grupos controles (G1 e G2) foram comparados entre si por meio do teste F ($p < 0,05$). Os grupos tratados (G3 a G11) foram comparados entre si, através do teste de comparação múltipla Tukey, à 5% de probabilidade. As comparações também foram realizadas entre os grupos tratados e os controles G1 e G2, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnett à 5% de probabilidade. Os resultados não mostraram significativos entre o grupo controle (G1) e o grupo osteoporótico (G2), bem como, entre os grupos tratados (G3 a G11) quanto aos valores séricos de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea. Através da densitometria e histomorfometria foi possível constatar a indução da osteoporose por meio da ovariectomia. Quando comparado grupos tratados ao grupo osteoporótico G2, todos os tratamentos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, tanto para densitometria quanto para histomorfometria. Assim, os fármacos etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona, usados isoladamente ou combinados, apresentaram efeitos positivos sobre o metabolismo ósseo, sendo eficazes em restaurar o tecido ósseo nas condições experimentais. Considerando que a associação dos medicamentos constituiu-se da metade

das doses usadas isoladamente, a possibilidade de redução de efeitos colaterais com a associação torna-se uma alternativa promissora na terapêutica da osteoporose.

ABSTRACT

AMARAL, Gláucia Guimarães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2010. **Isolated or combined use of etidronate, risedronate, pravastatin and ipriflavone in osteoporosis induced by ovariectomy in rats.** Adviser: Aloísio da Silva Pinto. Co-Advisers: Ricardo Junqueira Del Carlo e Cláudio César Fonseca.

This work was in an assay to study the possible treatment of osteoporosis induced by ovariectomy through the use of isolated and combined, using, in this case, half the doses of the compounds isolated etidronate, risedronate, pravastatin, and ipriflavone, which are agents that have shown positive effects on bone metabolism. Wistar rats, adult, weighing on average 250g were used. The process of induction of osteoporosis was made by surgery when the animals were 5 months old, for retroumbilical incision, giving access to the abdominal cavity under general anesthesia using the combination of ketamine and xylazine at doses of 50 and 5 mg / Kg , respectively, except for animals that constituted the control group (G1). After 12 weeks, was started to drug treatment. The animals were randomly divided into 11 experimental groups, with groups consisting of 6 animals. Group 1 (G1), control, consisted of animals that did not undergo surgery or treatment. In group 2 (G2) there was only surgery. The other groups, besides the surgical process, were treated with medication, group 3 (G3) received etidronate (6 mg / kg), group 4 (G4) risedronate (0.07 mg / kg), group 5 (G5) pravastatin (0.6 mg / kg), group 6 (G6) ipriflavone (100 mg / kg), group 7 (G7) etidronate and pravastatin (3 mg / kg and 0.3 mg / kg), Group 8 (G8) etidronate and ipriflavone (3 mg / kg and 50 mg / kg), Group 9 (G9) risedronate and pravastatin (0.035 mg / kg and 0.3 mg / kg), group 10 (G10) risedronate and ipriflavone (0.035 mg / kg and 50 mg / kg) and Group 11 (G11) pravastatin and ipriflavone (0.3 mg / kg and 50 mg / kg). All substances were administered orally daily for 30 days. Immediately before the animals were euthanized at 35 days

after treatment, blood was collected for serum calcium, phosphorus, albumin and total protein analyzed in the equipment Alizé multiparametric biochemistry and bone alkaline phosphatase analysis equipment Access Immunoassay System chemiluminescence of Beckman Coulter. Then, by the dissection of muscle tissue, the right tibias were collected and frozen for densitometric study using bone densitometry X-ray with Smart Scan DPX-ALPHA, with special software for small animals and the left tibias were collected after of fixed, decalcified and were routinely processed for histomorphometric study, the sections were stained with hematoxylin and eosin for evaluation of trabecular bone density was applied to the calculation method for planimetric point count. The assay was performed according to a randomized design with 11 treatments in six replicates. The results were subjected to analysis of variance. The control groups (G1 and G2) were compared using the F test ($p < 0.05$). Treated groups (G3 to G11) were compared by the Tukey multiple comparison test, the 5% probability. Comparisons were also performed between treated groups and controls G1 and G2, applying Dunnett test at 5% probability. The results showed no significant between the control group (G1) and the osteoporotic group (G2), as well as between the treated groups (G3 to G11) for values of serum calcium, phosphorus, albumin, total protein and bone alkaline phosphatase. By densitometry, and histomorphometry was possible to observe the induction of osteoporosis by ovariectomy. Treated groups compared to the osteoporotic group G2, all treatments showed statistically significant differences, for density and histomorphometry. Thus, the drug etidronate, risedronate, pravastatin, and ipriflavone, used isolated or in combination, showed positive effects on bone metabolism and effective in restoring bone tissue in experimental conditions. Whereas the association of drugs constituted half of the doses used in isolation, the possibility of reduced side effects with the combination becomes a promising alternative for the treatment of osteoporosis.

1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conectivo que contém duas distintas linhagens de células, osteoblastos e osteoclastos, que mantêm o balanço mineral do corpo em equilíbrio. Algumas interações anormais entre os osteoblastos e os osteoclastos podem causar um balanço negativo entre a formação e a reabsorção óssea, induzindo assim, a várias doenças relativas ao osso, incluindo a osteoporose (Pagani et al., 2005).

Temos que a osteoporose pós-menopausa é a causa mais comum de perda óssea. Sabe-se que a deficiência de hormônios ovarianos é o maior fator de risco para a osteoporose (Chen et al., 2006; Prynne et al., 2006).

A osteoporose é uma desordem multifatorial que envolve uma complexa interação entre genética, estilo de vida e fatores nutricionais (Ralston, 2007).

A ovariectomia em ratas desencadeia uma acentuada redução das concentrações de estrógeno endógeno e induz a anormalidades de remodelação óssea que aumentam a perda óssea e o risco de desenvolver osteopenia. Assim, a ovariectomia em ratas tem sido validada como um modelo para a perda de massa óssea nas mulheres pós-menopausa (Wronski et al., 1985; Wronski et al., 1989; Kalu, 1991; Wimalawansa, 1993; Wronski et al., 1993; Richard e Wasnich, 2001).

Para o tratamento da osteoporose, agentes biomedicinais tem sido utilizados e podem ser divididos, de acordo com suas propriedades farmacológicas, em agentes antirreabsortivos e formadores de osso (Kim et al., 2003).

Como agentes antirreabsortivos destacam-se os bisfosfonatos como o etidronato e o risedronato, em relação aos formadores de ossos apresentam-se as estatinas como a pravastatina e os que teriam a atuação antirreabsortiva e também na formação óssea seriam os flavonóides como a ipriflavona (Pinto et al., 2005).

Os bisfosfonatos aprovados no tratamento da osteoporose se ligam aos cristais de hidroxiapatita, reduzindo risco de fraturas em locais, tais como, o colo do fêmur e vértebra lombar (Foligeman et al., 1981; Cauley et al., 2003). Quimicamente, os bisfosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato, nos

quais o átomo de fósforo se liga ao carbono, formando ligações P-C-P e são mais resistentes à hidrólise química e enzimática (Hamdy, 1993).

As estatinas, tais como a cerivastatina e pravastatina (Mundy et al., 1999), sinvastatina (Maeda et al., 2001), lovastatina (Li et al., 2003), atorvastatina (Pinto, 2004), que atuam como agentes formadores de osso, têm demonstrados efeitos benéficos na prevenção e tratamento da osteoporose por causa dos efeitos potenciais no aumento da diferenciação de células progenitoras ósseas.

Em relação aos flavonóides, efeitos favoráveis à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos foram demonstrados por Katai et al., (1992) e Cheng et al., (1994) e inibição da reabsorção óssea também foi observada (Azria et al., 1993; Notoya et al., 1993; Albanese et al., 1994, Passeri et al., 1995).

As terapias farmacológicas de reposição hormonal, uso de substâncias estabilizadoras do processo reabsortivo ou de substâncias formadoras de osso representam importantes estratégias no campo da saúde pública, pois têm objetivo de impedir a perda adicional de osso e diminuir a probabilidade de futuras fraturas, além de prevenir o aparecimento de distúrbios cardiovasculares e, até mesmo, psíquicos, decorrentes da deficiência hormonal na pós-menopausa (Jaime et al., 2005).

A combinação terapêutica possui considerável aceitação como meio de aumentar os benefícios do tratamento em pacientes com doenças crônicas. Assim, combinações de drogas são frequentemente usadas para tratar hipertensão arterial, diabetes mellitus não dependente de insulina ou artrite reumatóide (Cortet, 2004). Em osteoporose, poucos dados estão disponíveis para regimes de combinações e avaliações seguras têm sido confiadas em densidade mineral óssea (DMO) usada como um marcador, ao contrário do que em resultados clínicos (Cosman et al., 2001).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A osteoporose é uma doença progressiva que envolve deterioração estrutural do tecido ósseo assintomaticamente, levando a fragilidade e aumento da suscetibilidade a fraturas, devido redução da massa óssea e ao aumento do *turnover* ósseo (NOF, 2002). É uma doença com consequências físicas, psicossociais e financeiras (Sinaki et al., 2002). Estima-se que, uma em cada duas mulheres e um em cada quatro homens com mais de 50 anos de idade, terá alguma experiência de fratura relacionada à osteoporose (Gammage et al., 2009).

O envelhecimento populacional está se dando de forma extremamente rápida. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente, um terço das mulheres de raça branca, com idade superior aos 65 anos, são portadoras de osteoporose (WHO, 1994). Existem projeções indicando que, em 2050, a proporção de idosos deverá alcançar 15% da população mundial (Chaimowicz, 1997).

Estudos realizados nos Estados Unidos mostram que a prevalência da osteoporose em mulheres pós-menopausa é de aproximadamente 38%. Estima-se que 10 milhões de americanos acima de 50 anos de idade tem osteoporose e que mais 34 milhões correm o risco de ter a doença. Tem-se também citações de que 1,5 milhão de fraturas estejam associadas a osteoporose. Tendo em vista o aumento da expectativa de vida da população, acredita-se que no ano de 2040 o número de fraturas eleve cerca de três vezes (Cooper, 1999; Tosteson et al., 2008).

No Brasil, poucos dados estatísticos são encontrados. Utilizando-se da densitometria óssea, tem-se o estudo feito por Carneiro (2001), no qual a osteoporose atinge de 25 a 30% das mulheres brancas durante a pós-menopausa e 40 a 60% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade e o de Camargo et al. (2005), realizado em São Paulo, demonstrando que 33% das mulheres e 16% dos homens com mais de 65 anos apresentam osteoporose.

Fraturas podem ser decorrentes de mínimos traumas, como queda de altura do próprio corpo. As mais comuns relacionadas com a osteoporose são as vertebrais. Quando não são vertebrais, as fraturas ocorrem no quadril, punho, pelve, sacro, costelas, esterno, clavícula, fêmur e úmero. Todas elas

são importantes, visto acarretarem dor e incapacidade, o que resulta em significativa morbidade e mortalidade, tendo elevado encargo para a sociedade e grande impacto econômico (Cauley et al., 2000). Dados fornecidos por Cooper (1999) mostram que os custos, nos Estados Unidos, relacionados somente a fraturas decorrentes da osteoporose giravam em torno de 17,9 bilhões de dólares por ano, enquanto que no Reino Unido foram gastos 1,7 bilhão de libras. Dados recentes mostram que o custo anual de fraturas relacionadas com a osteoporose foi de 20 bilhões de dólares nos Estados Unidos e 30 bilhões de dólares na União Européia (Holroyd et al., 2008).

No Brasil, 70 mil indivíduos apresentam, anualmente, fratura do colo do fêmur, sendo que pelo menos 20% morrem de complicações nos primeiros seis meses e metade perdem independência em suas atividades diárias. Além disso, aproximadamente 30% destes pacientes necessitarão de cuidados institucionais ou de enfermagem domiciliar (Compston, 2001; Amadei et al., 2006; Anbinder et al., 2006).

O processo de remodelação do tecido ósseo é contínuo ao longo da vida em resposta a forças mecânicas e a fatores do meio interno, sendo fundamental para a renovação do esqueleto e preservação da sua qualidade. Esse processo envolve o acoplamento da atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos, que é determinado por uma constante troca de sinais entre essas células, com o intuito de remover partes do osso danificado ou mais velho, substituindo com osso recém formado (Mundy e Oyajobi, 2003; Hernandez, 2008; Pivonka et al., 2008).

Como mencionado, a remodelação do tecido ósseo é feita por ação do osteoblasto e osteoclasto, o primeiro apresenta receptores para o hormônio da paratireóide (PTH) e vitamina D, sendo estes responsáveis por estimular a formação de tecido ósseo e, o último, apresenta receptores para calcitonina, responsável por inibir a ação do mesmo. Ambos apresentam receptores para o estrogênio, no entanto as respostas são diferentes, favorecendo a ação do osteoblasto e inibindo a do osteoclasto (Levinson e Altkorn, 1999; Wooldft e Dixon, 1999).

O processo de remodelação óssea pode ser desencadeado por estímulos sistêmicos, como o realizado pelo PTH, ou locais, como microfraturas e tensão mecânica. Assim, a liberação de PTH, 1,25-

diidroxivitamina D, interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6, e TNF α são responsáveis por estimular os osteoblastos a produzir RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B), que se ligam ao receptor RANK presente na membrana de células hematopoiéticas precursoras dos osteoclastos, induzindo-as a se fundirem umas com as outras para formação de osteoclastos multinucleados, ativando-os e aumentando a reabsorção óssea. Em contrapartida, há substâncias inibidoras da reabsorção óssea que estimulam a produção de osteoprotegerina (OPG), que é responsável por inibir a interação entre o RANKL e seu receptor, impedindo o recrutamento, a proliferação e a ativação dos osteoclastos, tendo, portanto, efeito inibitório sobre as células precursoras dos osteoclastos (Figura 1). Assim sendo, a relação entre RANKL/OPG é responsável por controlar a remodelação óssea. Com isso, as alterações na concentração dessas substâncias, induzidas por variações nos níveis de citocinas, administração de glicocorticóide ou deficiência de estrógeno, podem levar o aumento do número e da atividade dos osteoclastos, determinando perda na massa óssea (González, 2000; Hofbauer et al., 2000; Kierszbaum, 2008).

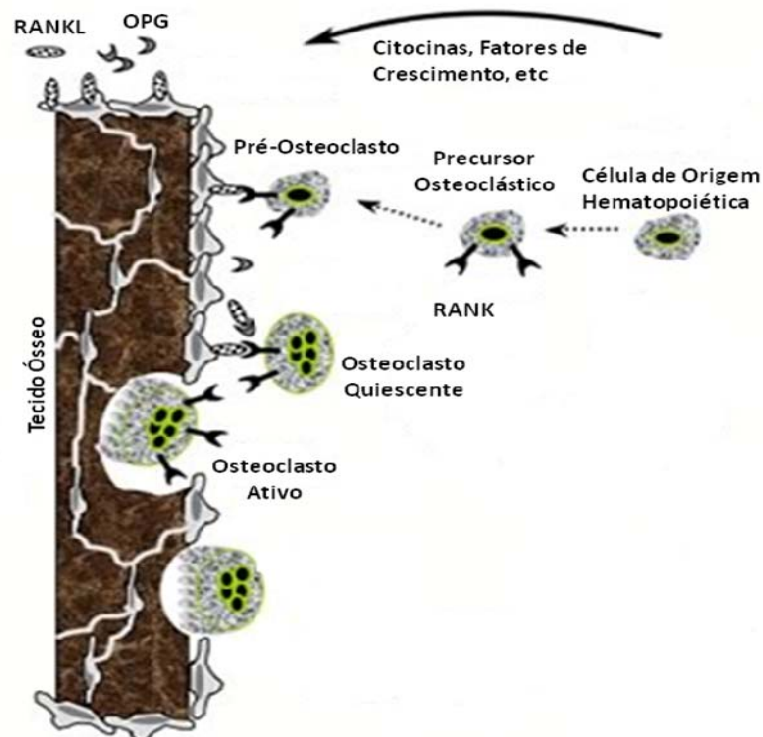


Figura 1- Ação RANKL/RANK/OPG no mecanismo de ativação e inibição dos osteoclastos (Wittrant et al., 2004 – Modificado).

Em situações fisiológicas, a remodelação, que se constitui em reabsorção e formação, é um fenômeno acoplado e dependente, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea (Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002)

A homeostase óssea se mantém até aproximadamente 30 anos. Depois deste período, pode-se constatar um discreto predomínio da reabsorção sobre a formação óssea, caracterizando um estado de osteopenia fisiológica. Em mulheres, esta condição tende a ser mais acentuada devido a redução dos níveis de estrógeno pós-menopausa, o que acaba por desencadear a osteoporose (Aires, 2008).

Diversos fatores influenciam o risco de osteoporose, entre eles o gênero feminino, as etnias amarela e branca, a idade mais avançada, a precocidade do início da menopausa, a hereditariedade (presença de osteoporose ou de fratura osteoporótica entre os ancestrais e os colaterais), erros nutricionais (baixa ingestão de cálcio, baixa ingestão de vitamina D₃ ou baixa insolação para produção da mesma, situações de má absorção de alimentos, etc.), maus hábitos (ingestão exagerada de café, álcool, tabaco), sedentarismo, certas medicações (glicocorticóides, anticonvulsivantes), doenças como a artrite reumatóide e quase todas as doenças inflamatórias sistêmicas e disfunções tireoidianas (Maddalozzo et al., 2009; Souza, 2010).

O fator genético pode ser um agente importante na predisposição à osteoporose. Em estudo feito por Khoury (1998), foram encontradas fortes evidências sugerindo que a interação entre genes e ambiente desempenha um papel na densidade mineral óssea. Em 1997, foram listados, no Online Mendelian Inheritance in Men, 67 genes associados com a osteoporose, incluindo o gene da vitamina D (Khoury, 1998). Zmuda et al. (2000) apontam haver relação entre o fator genético e a osteoporose. Apesar das evidências, o fator hereditariedade é de difícil análise, mas o histórico familiar pode auxiliar quando se deseja diagnosticar a doença.

A osteoporose está principalmente relacionada com a deficiência do hormônio ovariano nas mulheres pós-menopausa (Johnell, 1996). As células osteoclásticas possuem receptores estrogênicos, cuja interação com este hormônio libera mediadores químicos que são responsáveis por inibir a sua atividade reabsortiva (Iqbal, 2000).

Os fármacos utilizados no tratamento da osteoporose são classificados como agentes que impedem a reabsorção óssea ou estimulam a formação de tecido ósseo. Dos agentes antirreabsortivos, temos como exemplos o cálcio, estrógenos/progesteronas, calcitonina, bisfosfonatos e vitamina D. Dos agentes formadores de osso compreendem o fluoreto de sódio, esteróides anabólicos, PTH e estatinas (Fernandes et al., 1996; Pinto et al., 2005).

A descoberta de que os bisfosfonatos poderiam inibir a reabsorção óssea ocorreu após experiências, na década de 60, para a identificação de agentes semelhantes ao pirofosfato que pudessem também regular a calcificação óssea, sendo potencialmente úteis para a prevenção de calcificações ectópicas (Rogers et al., 1999). Os bisfosfonatos são análogos ao pirofosfato, no qual a ponte de oxigênio é substituída por um átomo de carbono e modificada por cadeias laterais de comprimentos e configurações variáveis (Russel et al., 1999). A presença de um átomo de carbono ligando os dois grupos fosfato proporciona aos bisfosfonatos resistência à hidrólise enzimática (Rogers et al., 1999). Como o pirofosfato, os bisfosfonatos têm afinidade pelos cristais de hidroxiapatita, ligando-se fortemente a eles, especialmente nos pontos de remodelamento ativo (Bandeira et al., 2000). Esta adsorção é importante porque o osteoclasto, ao reabsorver o tecido ósseo, absorve também o bisfosfonato. Dentro do citoplasma do fagócito, os bisfosfonatos atuam na cadeia do mevalonato, inibindo a enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS). Esta enzima promove a transformação do geranilpirofosfato em geranilgeranilpirofosfato e farnesilpirofosfato (Figura 2). Estes metabólitos promovem a prenilação das pequenas proteínas essenciais para a função da borda em escova e para a sobrevivência do osteoclasto. Assim, interrompendo a cadeia do mevalonato, inibe-se a função osteorreabsortiva do osteoclasto (Fogelman et al., 1981; Souza, 2010).

Estima-se que o tempo de vida dos osteoclastos seja de duas a quatro semanas *in vivo* e de no máximo duas semanas *in vitro*. Estudos feitos por Hughes et al. (1995), descrevem que os bisfosfonatos aumentam a apoptose de osteoclastos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Segundo Benford et al. (2001), os bisfosfonatos contendo nitrogênio como o risedronato, alendronato, pamidronato e ácido zolendronico e os não nitrogenados clodronato e etidronato causam apoptose de osteoclastos em coelhos. Esta apoptose

estaria relacionada a trocas metabólicas, perda da membrana mitocondrial e ativação de proteases caspases-3, capazes de clivar substratos peptídios.

As caspases estão presentes no citosol sob forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica à altura de resíduos do ácido aspártico, ocupando uma função de destaque na execução do programa de morte celular (Thompson, 1999).

Estudos realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm demonstrado que os bisfosfonatos, além de sua conhecida propriedade antirreabsortiva, atuam promovendo atividade osteoblástica e, conseqüentemente, formação de tecido ósseo. Estudos de Knoch et al. (2005), em cultura de células de medula óssea humana tratadas com os bisfosfonatos alendronato, risedronato e zoledronato, evidenciaram a proliferação celular e diferenciação osteogênica determinada por, além da contagem de células, aumento dos níveis de fosfatase alcalina.

Os bisfosfonatos tem seu uso no tratamento de diversas doenças ósseas, com destaque na doença de Paget, hipercalcemia maligna, osteoporose, doença metastática e osteolítica (Russo, 2001; Fernandes et al., 2005).

Coronho et al. (2001) mostraram que o uso de etidronato em mulheres com osteoporose, na dose de 400 mg/dia durante duas semanas e suplementação de 500 mg/dia de cálcio durante três meses, com repetição do ciclo a cada três meses durante três anos, desencadeou ganho de massa óssea vertebral de 5% e redução de fraturas vertebrais.

O risedronato na dose de 5 mg diários, também foi utilizado em estudos feitos por Reginster et al. (2000), resultando em aumento de densidade mineral óssea, redução de fraturas e capacidade de prevenir a perda de massa óssea em homens submetidos a tratamento com corticóides.

As estatinas são os agentes mais efetivos e bem tolerados na terapia das dislipidemias. Dentre os vários compostos denominados estatinas temos a atorvastatina, a fluvastatina, a pravastatina, a mevastatina e a sinvastatina. Estas drogas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-Coa) redutase, a qual catalisa a etapa taxa limitante na via da biossíntese de colesterol, bloqueando a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico, responsável por comprometer a formação de geranyl pirofosfato e farnesil pirofosfato (Figura 2), metabólitos importantes na prenilação de

proteínas fundamentais na regulação do metabolismo dos osteoclastos, o que resulta em aumento da apoptose destas células (Cumming e Bauer, 2000; Mahley e Bersot, 2001).

Segundo Mundy et al. (1999), as estatinas podem ter efeitos benéficos sobre o tratamento da osteoporose e fraturas. Este fato está relacionado a sua capacidade de causar ganhos substanciais de tecido ósseo devido a seus efeitos promotores sobre o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), o qual conduz a diferenciação osteoblástica e a formação óssea. O provável mecanismo responsável por estes efeitos é o aumento da transcrição do gene do BMP-2 (Mundy, 2001).

O tratamento com atorvastatina em osteoblastos humanos aumentou a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica, osteocalcina e fosfatase alcalina, indicando que houve ganho de tecido ósseo (Viereck et al., 2005).

Segundo Uyar et al. (2009), houve diminuição da densidade mineral óssea da região mediana e da metáfise distal do fêmur em ratas ovariectomizadas, bem como uma melhora na região mediana do fêmur com o uso de risedronato e atorvastatina. Estes resultados foram observados através da análise de densidade mineral óssea, ensaio biomecânico e histomorfometria.

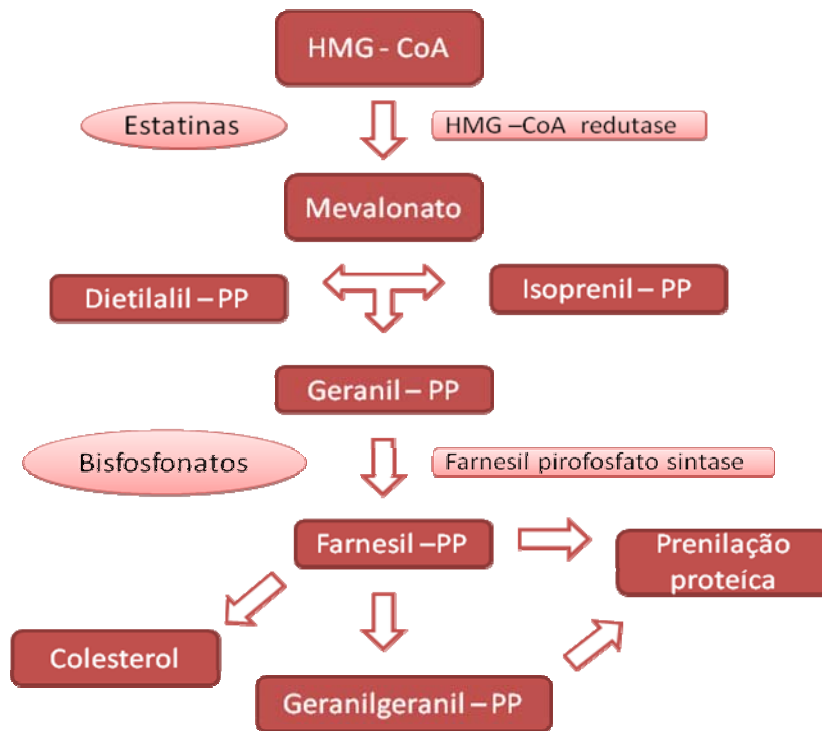


Figura 2 – Mecanismo de ação das estatinas e bisfosfonatos na cascata da prenilação de proteínas (Braga Jr. et al., 2002).

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural. São compostos polifenólicos, cuja síntese não ocorre na espécie humana, sendo encontrados nos alimentos, principalmente nas verduras e frutos. Entretanto, possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os sistemas biológicos (Peterson e Dwyer, 1998; Nijveldt et al., 2001). Efeitos favoráveis à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos foram demonstrados por Katai et al. (1992) e Cheng et al. (1994) e inibição da reabsorção óssea também foi observada (Azria et al., 1993; Notoya et al., 1993; Albanese et al., 1994; Passeri et al., 1995).

Foi verificado por Gambacciany et al. (1994), que o flavonóide ipriflavona previne a perda de massa óssea em pacientes osteoporóticos e provoca decréscimo no *turnover* ósseo provocado por hipogonadismo. Cecchetti et al. (1995) mostraram que a ipriflavona foi capaz de induzir aumento de massa óssea após tratamento de 12 meses em mulheres osteoporóticas e também foi efetivo em prevenir perda óssea. Segundo Arjmandi et al. (2000), com a utilização de flavonóide, em ratas ovariectomizadas, foi capaz de prevenir

completamente a perda da densidade óssea do fêmur e, através da histomorfometria, observou taxas de formações ósseas elevadas.

Estudos têm demonstrado que ratas ovariectomizadas tratadas com flavonóides genisteína ou daidzeína apresentaram aumento na densidade mineral óssea, taxa de formação óssea e redução na taxa de reabsorção óssea, quando comparadas às ratas ovariectomizadas não tratadas com estes compostos (Blair et al., 1996; Anderson et al., 1998; Fanti et al., 1998; Ishida et al., 1998).

Evidências indicam que os flavonóides se ligam aos receptores beta do estrogênio, estimulam *in vitro* a síntese protéica de células da linhagem osteoblástica e, seu uso por mulheres na pós-menopausa, aumenta a concentração de osteocalcina, o que reflete também aumento da atividade osteoblástica (Moreira, 2004).

O tratamento com ipriflavona já vem sendo utilizado como uma terapia alternativa de reposição hormonal, tendo em vista que possui efeito estrogênico. Foi demonstrado que é eficaz na prevenção de perda óssea associada com o uso crônico de esteróides, imobilização e ovariectomia (Head, 1999).

Recomendam-se modelos animais específicos para avaliação de novos agentes com potencial para terapêutica da osteoporose clínica, como também para validar estratégias terapêuticas (Thompson et al., 1995), sendo a ovariectomia, o mais utilizado para estudar a diminuição óssea e a consequente perda de resistência (Bagi et al., 1997). Nos animais ovariectomizados, ocorre um aumento do *turnover* ósseo, com taxa de reabsorção dos osteoclastos excedendo a formação dos osteoblastos. Estes estudos são realizados por meio de marcadores bioquímicos, estudos histomorfométricos, densitometria óssea, entre outros (Thorndike e Turner, 1998; Santos, 2004; Pinto et al., 2005; Ferreira Junior et al., 2008).

Várias espécies de animais têm sido utilizadas para estudos da perda de massa óssea, dentre elas, os primatas não humanos, cães, ovinos, suínos, coelhos, ratos e camundongos (Priemel et al., 2002). No entanto, os ratos, devido às semelhanças na arquitetura óssea em relação aos humanos, tem

sido utilizados na caracterização das alterações do tecido ósseo associadas à idade, fatores hormonais e efeitos terapêuticos (Li et al., 2003).

A terapia de combinação possui considerável aceitação como um meio de aumentar os benefícios do tratamento em pacientes com doenças crônicas (Cortet, 2004). Mulheres pós-menopausa possuem um alto risco de desenvolverem distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes tipo II e a osteoporose (Burguera et al., 2001; Saengsirisuwan et al., 2009).

Dados relacionados a regimes de combinações no tratamento da osteoporose são pouco frequentes. Avaliações seguras têm sido confiadas à densidade mineral óssea (DMO) usada como um marcador (Cosman et al., 2001). A mensuração da DMO é feita utilizando a absorção de raios-X de dupla energia (DXA®). A DXA é reconhecida como o método mais valioso não-invasivo para medição mineral óssea (Fogelman e Ryan, 1992) e sua ampla utilização se deve a características tais como a velocidade, precisão e baixa exposição à radiação. Na pesquisa clínica, medidas de DMO mensuradas pela DXA são de crucial importância para o acompanhamento de pacientes detentores de doenças ósseas, em particular para avaliação da eficácia de tratamentos para a osteoporose (Svendsen et al., 1995).

Segundo Borelli (1998), a osteoporose pode ser classificada pela histomorfometria óssea. A histomorfometria óssea permite análise estática e dinâmica, bem como detecção de alterações tissulares na unidade metabólica óssea, particularmente, no osso trabecular, tornando possível a avaliação patogênica da mesma com a definição do elemento funcional predominante (Pinto, 2004).

Segundo Thompson et al. (1995), avaliações de densitometria óssea, marcadores bioquímicos, testes biomecânicos e histomorfometria são realizados no modelo animal da mesma maneira que nos humanos.

3. OBJETIVO

Diante da premissa que a osteoporose é a doença osteometabólica mais frequente na atualidade, tendo altos índices de morbidade e mortalidade, devido ao aumento na expectativa de vida da população mundial, torna-se necessário pesquisas que possam prevenir ou amenizar os altos custos com a saúde, cada vez mais onerantes, principalmente em países em desenvolvimento.

Assim, na busca de alternativas mais eficazes e menos dispendiosas no controle e principalmente no tratamento da osteoporose estabelecida, o presente experimento foi idealizado na tentativa de tratar a osteoporose induzida por ovariectomia através do uso isolado e combinado, utilizando, neste caso, metade das doses dos compostos isolados etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona, que são agentes que demonstraram efeitos positivos sobre o metabolismo ósseo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram supervisionados por um Médico Veterinário e estão em concordância com as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV, tendo sido o projeto aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, processo nº 27/2009.

Foram utilizadas 66 ratas da raça Wistar, adultas, pesando em média 250g, procedentes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e alimentadas com ração padronizada comercial para alimentação de ratos de laboratório e água *ad libitum* durante todo experimento. Eles permaneceram em gaiolas de polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável em forma de grade, no Biotério de Experimentação do Departamento de Educação Física da UFV contendo, em cada uma, seis animais. Os animais foram mantidos em um ambiente climatizado à temperatura

média de 22° C, com período de luz de 12 horas e as gaiolas higienizadas três vezes por semana.

4.2. Grupos Experimentais

A osteoporose foi induzida por ovariectomia. A intervenção cirúrgica, em 60 animais, foi feita quando os animais completaram 5 meses de idade, por incisão retroumbilical, dando acesso a cavidade abdominal, sob anestesia geral, utilizando a associação de quetamina e xilazina nas doses de 50 e 5 mg/Kg, respectivamente.

Após 12 semanas da cirurgia, deu-se início ao tratamento farmacológico. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 11 grupos experimentais, sendo os grupos constituídos de 6 animais. O grupo 1 (G1), controle, foi constituído de animais que não foram submetidos a cirurgia ou ao tratamento. No grupo 2 (G2) houve somente a cirurgia. Os demais grupos, além do processo cirúrgico, foram tratados com os medicamentos: o grupo 3 (G3) recebeu etidronato (6 mg/kg) (dose de 400mg preconizada para humanos), o grupo 4 (G4) risedronato (0,07 mg/kg) (dose de 5mg preconizada para humanos), o grupo 5 (G5) pravastatina (0,6 mg/kg) (dose de 40mg preconizada para humanos), o grupo 6 (G6) ipriflavona (100 mg/kg), dose esta utilizada em ratas intactas ou ovariectomizadas (Yamazaki, 1986; Arjmandi et al., 2000), o grupo 7 (G7) etidronato e pravastatina (3 mg/kg e 0,3 mg/kg), o grupo 8 (G8) etidronato e ipriflavona (3 mg/kg e 50 mg/kg), o grupo 9 (G9) risedronato e pravastatina (0,035 mg/kg e 0,3 mg/kg), o grupo 10 (G10) risedronato e ipriflavona (0,035 mg/kg e 50 mg/kg) e o grupo 11 (G11) pravastatina e ipriflavona (0,3 mg/kg e 50 mg/kg). Todas as substâncias foram administradas por via oral, diariamente, durante 30 dias.

4.3. Coleta de Material

Imediatamente antes dos animais serem eutanasiados com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 50mg/kg), aos 35 dias, foram coletados, através de punção da veia cava caudal, 5mL de sangue para a dosagem dos níveis séricos de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea (FAO). A seguir, com os animais já eutanasiados, foi efetuada a dissecação do tecido

muscular, as tíbias direitas foram coletadas e congeladas para estudo densitométrico e as tíbias esquerdas foram coletadas para estudo histomorfométrico.

4.4. Avaliação dos Marcadores Bioquímicos

As dosagens sorológicas de cálcio, fósforo, albumina e proteínas totais foram realizadas utilizando o Aparelho Multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), bem como “kits” específicos da marca Biolab.

Para as dosagens sorológicas de fosfatase alcalina óssea foi utilizado o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter, assim como “kits” Ostase, específico para dosagem da FAO, também da mesma indústria.

4.5. Exame Histomorfométrico

As tíbias esquerdas foram colocadas em formol 10% neutro tamponado, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, foram descalcificadas e processadas rotineiramente para estudo histológico.

O exame histológico constou de coloração de hematoxilina e eosina (HE) e para avaliação da densidade trabecular óssea foi aplicado o método de cálculo planimétrico por contagem de pontos.

Para cálculo da densidade ocupada por osso trabecular, foi obtida uma imagem amostral de osso trabecular, contido na região subcondral, de cada corte histológico da tíbia, em microscópio óptico equipado com câmara digital (Olympus Biological CX31). Estas imagens foram analisadas através do sistema para análises de imagem Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 em monitor de microcomputador de 15 polegadas, com aumento final de 200X. Uma grátícula composta por 494 interseções, distando 1cm cada uma, foi aplicada sobre a imagem, sendo uma área de 100 interseções isolada para a mensuração. Estas interseções foram computadas como pontos coincidentes à trabecula óssea ou ao espaço intertrabecular. Realizou-se 6 repetições, sendo, assim, para cada animal, computados um total de 600 pontos, perfazendo, portanto, 3600 pontos por grupo de 6 animais de cada tratamento. Desta forma, obteve-se o percentual da densidade trabecular óssea dos animais experimentais (Pinto et al., 2006).

4.6. Análise Densitométrica

Para análise densitométrica, as tíbias direitas foram identificadas e envolvidas em gaze umedecida com solução fisiológica e conservadas em *freezer* a 20°C negativos. Para o procedimento da densitometria, os ossos foram posteriormente transferidos para refrigerador comum, sendo mantidos por 24 horas. Em seguida, permaneceram em temperatura ambiente, até atingir equilíbrio térmico, quando foram analisadas.

A densidade mineral óssea (DMO), em g/cm², dada pelo conteúdo mineral ósseo (CMO), em g, pela área, em cm², ($DMO = CMO / \text{ÁREA}$) foi mensurada nas tíbias dos animais, utilizando densitômetro ósseo de Raio-X com Smart Scan modelo DPX-ALPHA, com software especial para pequenos animais.

4.7. Análise Estatística

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com 11 tratamentos em 6 repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância. Os grupos controle e osteoporótico (G1 e G2) foram comparados entre si por meio do teste F ($p < 0,05$). Os grupos tratados (G3 a G11) foram comparados entre si, através do teste de comparação múltipla Tukey, à 5% de probabilidade. As comparações também foram realizadas entre os grupos tratados e os controles G1 e G2, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnett à 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas pelo Software SAEG/UFV.

5. RESULTADOS

Os resultados dos marcadores bioquímicos séricos cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea de ratas submetidas aos tratamentos com etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona isolados ou combinados são apresentados na Tabela I.

TABELA I- Valores médios de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, e fosfatase alcalina óssea séricos de ratas submetidas ou não a diferentes tratamentos.

Grupos	Cálcio mg/dL	Fósforo mg/dL	Albumina g/dL	Proteínas Totais g/dL	Fosfatase Alcalina Óssea pg/dL
G1 Controle	12,72± 0,26 A	7,70± 0,46A	4,52± 0,17 A	82,54± 4,36 A	0,067± 0,030 A
G2 Osteoporótico	12,64± 0,29 A	7,74± 0,30A	4,35± 0,26 A	80,21± 2,87 A	0,060± 0,032 A
G3 Etidronato	12,36± 0,48 a	7,53± 0,40 a	4,24± 0,19 a	76,27± 2,45 a	0,063± 0,025 a
G4 Risedronato	12,73± 0,64 a	7,55± 0,65 a	4,32± 0,26 a	81,69± 3,46 a	0,064± 0,031 a
G5 Pravastatina	12,82± 0,50 a	7,80± 0,33 a	4,26± 0,15 a	81,24± 3,44 a	0,061± 0,026 a
G6 Ipriflavona	12,75± 0,57 a	7,90± 0,29 a	4,27± 0,08 a	75,92± 4,41 a	0,060± 0,034 a
G7 Etidronato+Pravastatina	12,45± 0,55 a	7,62± 0,54 a	4,61± 0,18 a	84,35± 1,99 a	0,064± 0,031 a
G8 Etidronato+Ipriflavona	12,54± 0,48 a	7,68± 0,61 a	4,41± 0,13 a	82,75± 3,21 a	0,060± 0,036 a
G9 Risedronato+Pravastatina	12,47± 0,61 a	7,57± 0,57 a	4,69± 0,09 a	84,68± 4,10 a	0,061± 0,024 a
G10 Risedronato+Ipriflavona	12,56± 0,53 a	7,66± 0,42 a	4,57± 0,10 a	82,31± 3,30 a	0,062± 0,028 a
G11 Pravastatina+Ipriflavona	12,53± 0,56 a	7,67± 0,35 a	4,53± 0,21 a	83,57± 3,54 a	0,063± 0,027 a

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

Médias seguidas de pelo menos um letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na tabela I, verificamos que não houve diferença significativa para os valores de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais e fosfatase alcalina óssea séricos entre os grupos tratados, bem como entre os grupos controle (G1) e osteoporótico (G2). Desta forma, estes parâmetros bioquímicos, neste estudo, não possibilitam direcionar no sentido do diagnóstico da osteoporose.

Na Tabela II, são apresentados os resultados da densidade mineral óssea (DMO) das tíbias de ratas ovariectomizadas submetidas aos tratamentos com etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona isolados ou combinados.

TABELA II - Valores médios de densidade mineral óssea das tíbias e variações percentuais em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos.

Grupos	DMO (g/cm ²)	Variação % em relação a G1	Variação % em relação a G2
G1 Controle	0,181±0,0341 A	-----	-----
G2 Osteoporótico	0,146±0,0151 B	-----	-----
G3 Etidronato	0,175±0,0093 a	- 3,31	+19,86**
G4 Risedronato	0,192±0,0075 a	+ 6,07	+31,50**
G5 Pravastatina	0,179±0,0166 a	- 1,10	+22,6**
G6 Ipriflavona	0,184±0,0162 a	+ 1,66	+26,0**
G7 Etidronato+Pravastatina	0,182±0,0063 a	+ 0,55	+24,6**
G8 Etidronato+Ipriflavona	0,182±0,0099 a	+ 0,55	+24,6**
G9Risedronato+Pravastatina	0,184±0,0113 a	+ 1,66	+26,0**
G10Risedronato+Ipriflavona	0,180±0,0024 a	- 0,55	+24,6**
G11Pravastatina+Ipriflavona	0,170±0,0167 a	- 6,07	+16,43**

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05)

Médias seguidas de pelo menos um letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P< 0,05)

**Estatisticamente diferente do grupo G2 pelo teste de Dunnett (P< 0,05).

Na tabela II, a indução da osteoporose por meio da ovariectomia pôde ser constatada, o que valida este método para ser usado no estudo desta patologia. Foi verificado que os tratamentos com etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona e suas combinações aumentaram os valores de densidade mineral óssea a níveis semelhantes aqueles encontrados nos animais do grupo controle, não ocorrendo diferença significativa entre eles. Quando comparado ao grupo osteoporótico G2, todos os tratamentos apresentaram diferenças estatisticamente significativas, o que demonstra a capacidade destes tratamentos de restaurar o tecido ósseo.

Os valores médios da densidade trabecular óssea de ratas submetidas aos tratamentos com etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona isolados ou combinados são apresentados na Tabela III.

TABELA III - Valores médios de densidade trabecular óssea em pontos percentuais e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos.

Grupos	Densidade Trabecular Óssea %	Variação % em relação a G1	Variação % em relação a G2
G1 Controle	51,5 ± 8,32 A	-----	-----
G2 Osteoporótico	33,00 ± 8,32 B	-----	-----
G3 Etidronato	45,00 ± 9,52 b	-12,62	+36,36**
G4 Risedronato	53,00 ± 6,56 ab	+2,91	+60,60**
G5 Pravastatina	60,50 ± 6,17 a	+17,47*	+83,30**
G6 Ipriflavona	59,50 ± 7,45 a	+15,53*	+80,30**
G7 Etidronato + Pravastatina	55,95 ± 11,86 ab	+8,64	+69,54**
G8 Etidronato + Ipriflavona	52,50 ± 10,26 ab	+1,94	+59,09**
G9 Risedronato + Pravastatina	52,10 ± 8,46 ab	+1,17	+57,87**
G10 Risedronato + Ipriflavona	52,60 ± 11,08 ab	+2,13	+59,39**
G11 Pravastatina + Ipriflavona	43,50 ± 7,38 b	-15,53*	+31,81**

Médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05)

Médias seguidas de pelo menos um letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P< 0,05)

*Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnett (P< 0,05).

**Estatisticamente diferente do grupo G2 pelo teste de Dunnett (P< 0,05).

Na tabela III, também pode-se constatar a eficácia da ovariectomia, pois o valor médio da densidade trabecular óssea do grupo osteoporótico (G2) apresentou-se significativamente diminuído quando comparado ao do grupo controle (G1).

Quando comparamos os tratamentos ao grupo controle (G1), pode-se observar valores significativos para os grupos G5, G6 e G11, pravastatina, ipriflavona e a associação destes, respectivamente. Nos dois primeiros, os valores foram positivamente significativos e no último negativo. Isto demonstrou que, quando utilizados isoladamente pravastatina e ipriflavona, tem-se resultados superiores inclusive ao grupo controle, porém a associação dos mesmos causou resultado inferior a este grupo, podendo se inferir que ocorreu um antagonismo competitivo parcial. Em relação ao grupo osteoporótico (G2), todos os tratamentos foram significativamente positivos, indicando o sucesso na restauração do tecido ósseo.

Nas figuras 3 e 4, temos microfotografias de cortes histológicos da região do terço proximal da tíbia esquerda dos animais, onde pode ser observado uma diminuição trabecular óssea, identificada principalmente pela menor espessura das trabéculas ósseas no grupo osteoporótico (G2), havendo, portanto, uma maior área de medula óssea, neste grupo, quando comparado ao grupo controle (G1). Em relação aos grupos tratados, pode ser observado um aumento na espessura das trabéculas ósseas e uma redução dos espaços intertrabeculares ocupados por medula óssea, ratificando a restauração do tecido ósseo pelo uso isolado ou associado dos medicamentos, corroborando com os resultados da tabela III.

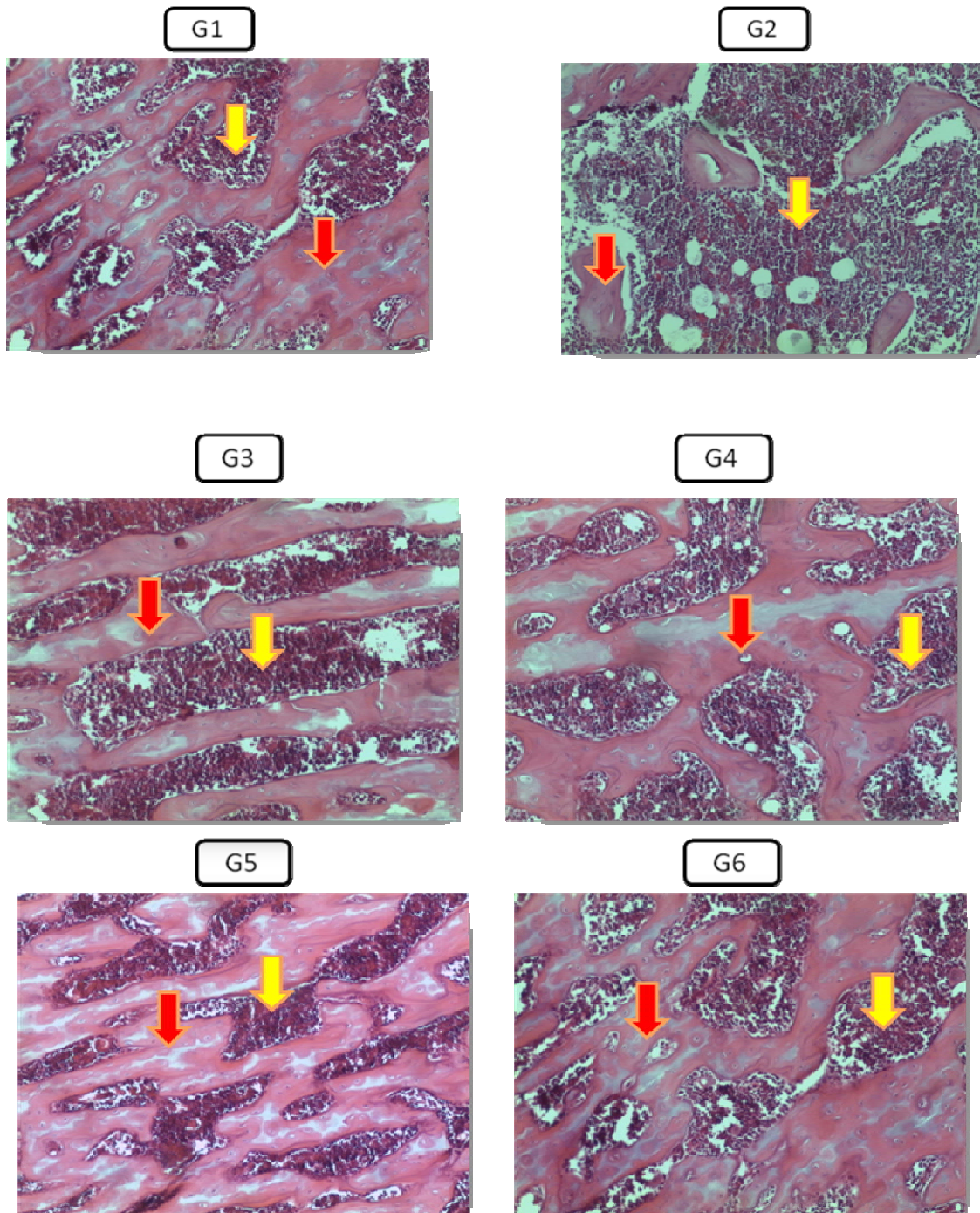


Figura 3 – Microfotografias do osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de tíbia das ratas dos grupos controle (G1), osteoporótico (G2) e isolados (G3 a G6). HE – 200X.

Seta amarela: região medular

Seta vermelha: trabécula óssea

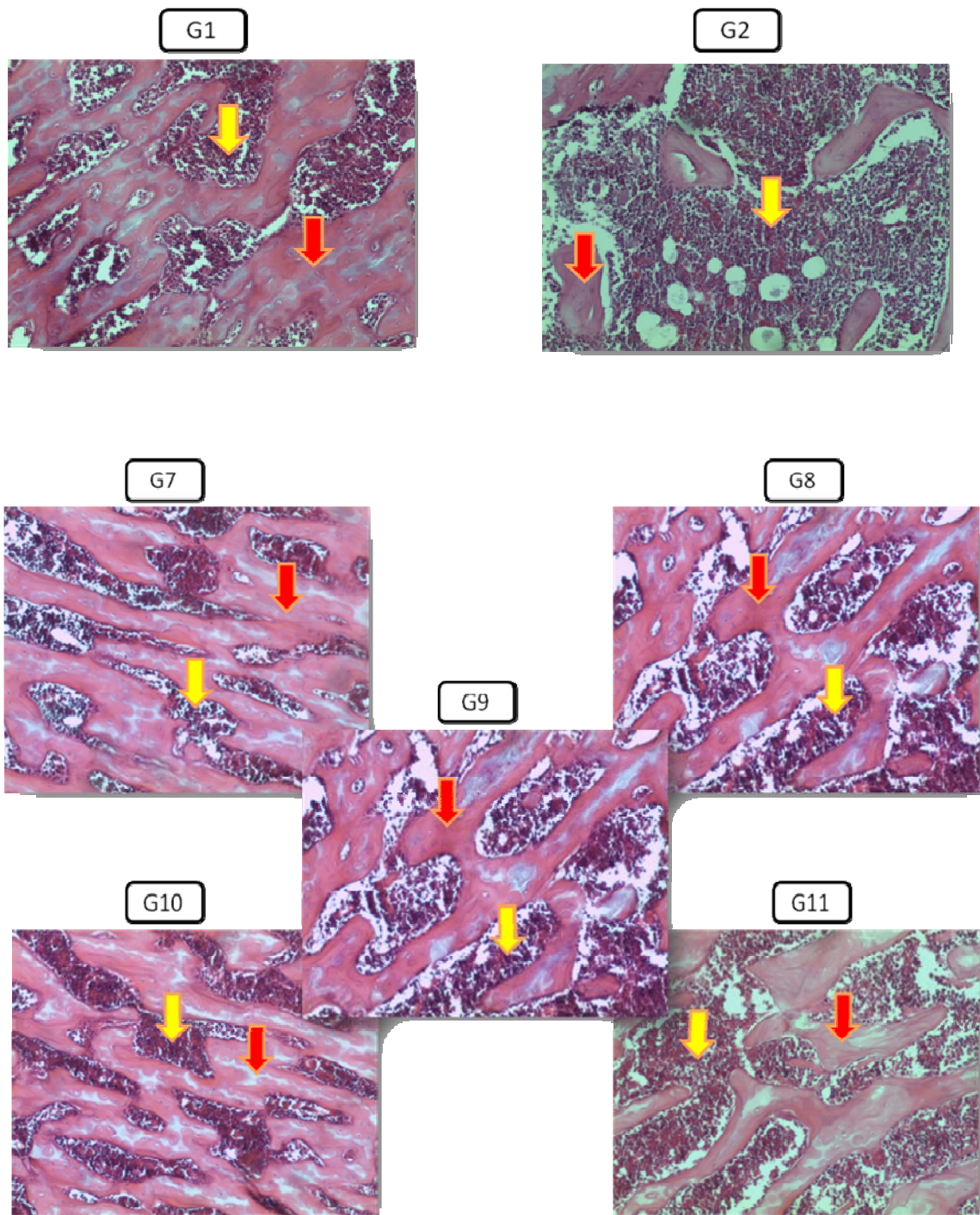


Figura 4 – Microfotografias do osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de tibia das ratas dos grupos controle (G1), osteoporótico (G2) e combinados (G7 a G11). HE – 200X.

Seta amarela: região medular

Seta vermelha: trabécula óssea

6. DISCUSSÃO

Segundo estudo realizado por Dempster et al. (1995), as ratas apresentam um aumento no *turnover* ósseo após a ovariectomia que é evidenciado pelo aumento de osteoclastos na superfície óssea. Thompson et al. (1995), em ratas castradas, observou que a tíbia proximal e a vértebra lombar, por exemplo, respondem similarmente à deficiência de estrógeno como mensurado pela perda de osso trabecular e resposta positiva ao tratamento com estrógeno. O nosso estudo, utilizando-se desta metodologia, evidenciou as mesmas respostas em tíbias de ratas por meio da densitometria óssea e histomorfometria.

A densitometria óssea vem sendo utilizada para avaliar a densidade óssea e é referida como recurso útil no diagnóstico e orientação terapêutica com vistas ao tratamento de doenças osteometabólicas, estudos de reparações ósseas de fraturas e procedimentos cirúrgicos (Louzada, 2001). A DMO explica de 60 a 80% da variabilidade na resistência mecânica do osso e, uma diminuição na DMO, tem uma próxima correlação com a ocorrência das fraturas na osteoporose (Bell et al., 1967; Mcbroom et al., 1985; Mosekilde et al., 1987; Cortet et al., 1995). Os agentes farmacológicos responsáveis por suprimir o *turnover* ósseo, aumentando a densidade mineral óssea, estão sendo desenvolvidos e avaliados por esse método (Jerome e Peterson, 2001).

O uso associativo de medicamentos tem sido visto como uma forma de otimizar o tratamento de doenças crônicas. Em relação à osteoporose, as associações ainda são reduzidas e avaliações seguras tem sido confiadas à densidade mineral óssea (DMO), usada como um marcador, ao contrário dos resultados clínicos (Harris et al., 2001).

Em relação aos marcadores bioquímicos, resultados significativos não foram encontrados entre os grupos controle, osteoporótico e tratados. O que pode ser explicado no caso de cálcio e fósforo pela homeostase presente no organismo. Estes dois íons devem ser avaliados conjuntamente, visto que a concentração sanguínea de um é dependente do outro. Qualquer alteração sanguínea de cálcio inferior a 2,4 mmol/L é rapidamente corrigida principalmente pelo hormônio da paratireóide (PTH). Assim, quando a concentração de cálcio no sangue é baixa, o PTH normaliza-a pela mobilização

de cálcio dos ossos, aumento da absorção intestinal e estimulação da sua reabsorção nos rins. Em contrapartida quando a concentração é alta, a calcitonina assegura que o cálcio seja deslocado de volta para os ossos ou excretado pela urina (Guyton e Hall, 2002). Resultados concordantes com estes também foram encontrados por Cecchetti et al. (1995), Deyhim et al. (2003), Motta (2003), Santos (2004), Pinto et al. (2005) e Silva (2006) em estudos sobre a osteoporose em ratas.

Proteínas totais são envolvidas em múltiplas funções, tais como a manutenção da pressão osmótica e da viscosidade do sangue, o transporte de nutrientes, metabólitos, hormônios e produtos de excreção, regulação do pH sanguíneo e a participação na coagulação sanguínea (González e Scheffer, 2002). No estudo da restauração da osteoporose induzida por dexametasona, utilizando alendronato de sódio, sinvastatina, crisina e tintura de *Camellia sinensis*, Sequetto (2008), observou que as alterações entre os grupos tratados e o osteoporótico foram estatisticamente significativas, o que não foi observado neste estudo. Já no estudo feito por Pinto et al. (2005) e Silva (2006), onde foi utilizado alendronato, atorvastatina e ipriflavona na restauração do tecido ósseo que estava osteoporótico por indução de glicocorticóide, alterações estatísticas também não foram observadas em relação às proteínas totais, corroborando com o encontrado neste estudo. Estes resultados podem ser explicados devido a mensuração ser realizada nas proteínas solúveis, não sendo contabilizado pequenos peptídios e/ou aminoácidos que são obtidos pela desnaturação decorrente da acidificação do meio pelos osteoclastos.

Com relação às albuminas, Sequetto (2008) também encontrou diferença significativa entre os tratamentos e o grupo osteoporótico. Tendo em vista que albumina é a principal proteína responsável pelo transporte de medicamentos e nutrientes, um aumento na sua concentração acaba sendo refletido nos valores de proteínas totais, o que também foi constatado pela pesquisadora. No entanto, neste estudo, as albuminas, assim como as proteínas totais, não foram significativas, sendo possivelmente reflexo da diferente metodologia de indução.

A fosfatase alcalina óssea (FAO) é o marcador de formação óssea mais frequentemente utilizado (Bikle, 1997; Vieira, 1999). A FAO é uma isoforma da fosfatase alcalina total, que apesar de semelhança estrutural com essa, pode

ser detectada através de imunoenaios específicos, apresentando baixa reação cruzada. A medida da isoforma ósseo-específica tem vantagens sobre a fosfatase alcalina total, uma vez que além de não sofrer influências hepáticas, é mais sensível a pequenas variações no *pool* circulante (Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002). Alterações estatisticamente significativas nos valores de fosfatase alcalina óssea não foram observadas no presente estudo, corroborando resultados obtidos por Pinto et al. (2006), Ferreira Junior et al. (2008) e Sequetto (2008), em estudos sobre a osteoporose. No entanto, os resultados encontrados por Kim et al. (2003) divergem dos anteriores, visto que esta enzima é um marcador utilizado para formação óssea, pois o mesmo encontra-se presente na membrana plasmática de osteoblastos (Bikle, 1997; Vieira, 1999). A falta de resultados significativos pode ser decorrente de sua atividade ser inibida por alguns aminoácidos livres como L-fenilalanina, L-triptofano, L-leucina e L-homoarginina, que podem ter sido obtidos pela desnaturação das proteínas ósseas, decorrente da acidificação do meio (Lehninger et al., 2007).

O estudo histomorfométrico é um método de extrema valia utilizado para a verificação da remodelação óssea, precisando a extensão da perda óssea e das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo, sendo capaz de identificar alterações osteometabólicas como a osteoporose (Junqueira e Carneiro, 2008). Estudos feitos por Pinto et al. (2005), no qual foi utilizado alendronato, atorvastatina e ipriflavona, isolados e associados, Silva (2006), que utilizou alendronato, ipriflavona e rutina isoladamente e associados, Ferreira Junior et al. (2008) utilizando alendronato, risedronato, atorvastatina e lovastatina e Uyar et al. (2009), que utilizaram risedronato e atorvastatina com o intuito de verificar a restauração do tecido ósseo de ratas osteoporóticas, foram capazes de viabilizar a utilização da histomorfometria em pesquisas sobre osteoporose e tratamento da mesma. Estes resultados foram condizentes com os encontrados neste trabalho.

Tendo em vista que há agentes formadores de osso, como as estatinas e agentes antirreabsortivos, como os bisfosfonatos, existe uma forte razão teórica para a associação dos mesmos, no intuito de obter resultados mais satisfatórios. No entanto, os primeiros estudos não se mostraram tão promissores, segundo Black et al. (2003).

A maioria dos estudos sobre combinações de fármacos tem associado os inibidores de reabsorção óssea e os formadores de osso, como por exemplo, bisfosfonato e hormônio da paratireóide (PTH). No entanto, o sincronismo deles não tem mostrado resultados satisfatórios, sendo até denominado por Audran (2006) como desapontadores.

Lindsay et al. (1999) constataram um ganho ósseo significativo ao associar alendronato ao estrogênio, em mulheres, por um período de um ano. Bone et al. (2000) verificaram que o tratamento simultâneo de alendronato com estrogênio foi mais efetivo do que as substâncias isoladas, sendo o ganho em densidade mineral óssea de 8,3% versus 6% e 6%, respectivamente, em dois anos de terapia.

Outros estudos tem associado bisfosfonatos, moduladores seletivos do receptor estrogênico, hormônio da paratireóide, estrogênio, estrogênio e progesterona e calcitonina (Pinkerton e Dalkin, 2007). As primeiras pesquisas associando estatinas, flavonóides e bisfosfonatos foram feito por Pinto et al. (2006), que obteve excelentes resultados com as associações, mostrando-as bem mais efetivas que o uso isolado dos medicamentos.

Neste estudo, também pôde se observar resultados positivos com as associações, apesar delas não terem se mostrado melhores do que os compostos isolados como foi constatado por Pinto (2004), o que não inviabiliza sua utilização, pois nos tratamentos associados etidronato + pravastatina, etidronato + ipriflavona, risedronato + pravastatina, risedronato + ipriflavona e pravastatina + ipriflavona foi utilizada a metade da dose dos isolados, tornando-os assim, uma forma menos danosa ao organismo. Sabe-se que os medicamentos apresentam efeitos adversos, podendo-se destacar para os bisfosfonatos: náusea, dispepsia, dor abdominal, constipação, diarreia, dor músculo-esquelética, cefaléia, esofagite, úlcera esofágica, gastrite, duodenite, disfagia, estenose esofágica, disfunção renal (albuminúria) e flebite quando administrada intravenosamente. As estatinas podem acarretar diarreia, insônia, mialgia, rabdomiólise, opacidade do cristalino e parestesias. Quanto aos flavonóides, sua toxicidade seria baixa, sendo pouco expressivo os efeitos indesejáveis. Considerando os níveis de doses utilizadas na posologia de combinação, espera-se minimizar os possíveis efeitos colaterais destes

medicamentos. Assim, sugere-se que as associações realizadas neste experimento poderiam ser utilizadas como alternativas na terapêutica da osteoporose.

7. CONCLUSÕES

Os fármacos etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona, usados isoladamente, apresentaram efeitos positivos sobre o metabolismo ósseo, sendo eficazes em restaurar o tecido ósseo nas condições experimentais.

As associações etidronato + pravastatina, etidronato + ipriflavona, risedronato + pravastatina, risedronato + ipriflavona mantiveram a mesma atividade farmacológica obtidas com os compostos isolados.

Considerando que a associação dos medicamentos constituiu-se da metade das doses usadas isoladamente, a redução de efeitos colaterais com a associação torna-se uma alternativa promissora na terapêutica da osteoporose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires, M.M. **Fisiologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan: 1137-1162, 2008.

Albanese, C.B.; Cudd, A.; Argentino, L.; Zambonin-Zallone, A.; Macintyre, I. Ipriflavone directly inhibits osteoclasts activity. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 199:930-936, 1994.

Amadei, S.U.; Silveira, V.A; Pereira, A.C.; Carvalho, Y.R.; Rocha, R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 1(42):7-15, 2006.

Anbinder, A.L.; Prado, M.A.; Spalding, M.; Balducci, I.; Carvalho, Y.R; Rocha, R.F. Estrogen deficiency and periodontal condition in rat- A radiographic and macroscopic study. **Brazilian Dental Journal**, 17(3):201-207, 2006.

Anderson, J.J.B.; Ambrose, W.W.; Garner, S.C. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 217(3):345-350, 1998.

Arjmandi, B.H.; Birnbaum, R.S.; Juma, S.; Barengolts, E.; Kukreja, S.C. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevents bone loss by different mechanisms. **Calcified Tissue International**, 66:61-65, 2000.

Audran, M. Drug combination strategies for osteoporosis. **Joint Bone Spine**, 73:374-378, 2006.

Azria, M.; Behhar, C.; Cooper, S.; Lac, K. Effect of ipriflavone on osteoclasts motility and resorption in vitro in vivo studies. **Calcified Tissue International**, 52:16-20, 1993.

Bagi, C.M.; Wilkie, D.; Georgelos, K.; Williams, D.; Bertolini, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. **Bone**, 3 (21):261-267, 1997.

Bandeira, F.; Macedo, G.; Caldas, G.; Griz, L.; Faria, M. **Osteoporose**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 390p.

Bell, G.H.; Dunbar, O.; Beck, J.S.; Gibb, A. Variations in strength of vertebrae with age and their relation with osteoporosis. **Calcified Tissue International**, 1:75-86, 1967.

Benford, H.L.; MCGowan, N.W.A.; Helfrich, M.H.; Nutall, M.E.; Roger, M.J. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3-activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone**, 28(5):465-473, 2001.

Bikle, D.D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. **American Journal of Medicine**, 103:427-436, 1997.

Black, D.M.; Greenspan, S.L.; Ensrud, K.E.; Palermo, L.; McGowan, J.A. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, 349:1207–1215, 2003.

Blair, H.C.; Jordan, E.; Peterson, J.T.; Barnes, S. Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, 61(4):629-637, 1996.

Bone, H.G.; Greenspan, S.L.; McKeever, C.; Bell, N.; Davidson, M.; Downs, R.W. Alendronate and estrogen effects in postmenopausal women with low bone mineral density. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 85:720–726, 2000.

Borelli, A. **Envelhecimento ósseo: osteoporose**. In: Carvalho Filho, E.T.; Papaléo Netto, M. Geriatria: Fundamentos, Clínica e Terapêutica. 2ª ed. São Paulo, Atheneu : 297-307, 1998.

Braga Júnior, J.W.R.; Souza, A.W.S.; Noronha, L.K.; Furia, J.K.; Szejnfeld, V.L. Estatinas e densidade mineral óssea: mitos e verdades. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 42(2):111-114, 2002.

Burguera, B.; Hofbauer, L.C.; Thomas, T.; Gori, F.; Evans, G.L.; Khosla, S.; Riggs, B.L.; Turner, R.T. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. **Endocrinology**, 142(8):3546-3553, 2001.

Camargo, M.B.; Cendoroglo, M.S.; Ramos, L.R.; De Oliveira Latorre Mdo, R.; Saraiva, G.L.; Lage, A.; Carvalhaes Neto, N.; Araujo, L.M.; Vieira, J.G.; Lazaretti-Castro, M. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly Caucasian elderly population in the city of Sao Paulo, Brazil. **Osteoporosis Internacional**, 16(11):1451-1460, 2005.

Carneiro, R.A. Epidemiological aspects of osteoporosis in Brazil. **Bone**, 29(3):298-299, 2001.

Cauley, J.A.; Thompson, D.E.; Ensrud, K.C et al. Risk of mortality following clinical fractures. **Osteoporosis Internacional**, 11:556–561, 2000.

Cauley, J.A.; Robbins, J.; Chen, Z.; Cummings, S.R.; Jackson, R.D.; Lacroix, A.Z. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the women's health initiative randomized trial. **Journal of the American Medical Association**, 290:1729–1738, 2003.

Cecchetti, M.; Bellometti, S.; Cremonesi, G.; Solimeno, L.P.; Torri, G. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 49:465-468, 1995.

Chaimowicz, F. A saúde dos idosos às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Revista de Saúde Pública**, 31(2):184-200, 1997.

Chen, Y.M.; Ho, S.C.; Woo, J.L. Greater fruit and vegetable intake is associated with increased bone mass among postmenopausal Chinese women. **British Journal of Nutrition**, 96:745-751, 2006.

Cheng, S.L.; Zhang, S.F.; Nelson, T.L.; Warlow, P.M.; Civitelli, R. Stimulatory of human osteoblasts differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. **Calcified Tissue International**, 55:356-362, 1994.

Compston, N.J.E. Sex steroids and bone. **Physiological Reviews**, 81(1):419-447, 2001.

Cooper C. Epidemiology of osteoporosis. **Osteoporosis International**, (Suppl. 2): S2-S8, 1999.

Coronho, V.; Petroianu, A.; Santana, E.M.; Pimenta, L.G. **Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1535p, 2001.

Cortet, B.; Colin, D.; Dubois, P.; Delcambre, B.; Marchandise, X. Methods for quantitative analysis of trabecular bone structure. **Revue du Rhumatisme [English Edition]** 62:781-794, 1995.

Cortet, B. Combination therapy for osteoporosis. **Joint Bone Spine**, 71:363-364, 2004.

Cosman, F.; Nieves, J.; Woelfert, L.; Formica, C.; Gordon, S.; Shen, V. Parathyroid hormone added to established hormone therapy: effects on vertebral fracture and maintenance of bone mass after parathyroid hormone withdrawal. **Journal of Bone and Mineral Research**, 16:925-931, 2001.

Cumming, S.R.; Bauer, D.C. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture? **The Journal of the American Medical Association**, 283(24):3255-3257, 2000.

Dempster, D.W.; Birchman, R.; Xu, R.; Lindsay, R.; Shen, V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. **Bone**, 1(16):157-161, 1995.

Deyhim, F.; Stoecker, B.J.; Borusewitz, G.H.; Arjmandi, B.H. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. **Nutrition Research**, 23 (1):123-130, 2003.

Fanti, P.; Monier-Faugere, M.C.; Geng, Z.; Schmidt, J.; Morris, P.E.; Cohen, D.; Malluche, H.H. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, 8(3):274-281, 1998.

Ferreira Júnior, D.B.; Pinto, A.S.; Del Carlo, R.J.; Fonseca, C.C.; Oliveira, T.T.; Cardoso, C.A.; Amaral, G.G.; Lima, L.R.P. Efeitos de bifosfonatos e estatinas na reparação de fraturas em tíbias de ratas com osteoporose induzida com dexametasona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 29(2):201-207, 2008.

Fernandes, C.; Leite, R.S.; Lanças, F.M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, 28(2):274-280, 2005.

Fernandes, C.E.; Mello, R.; Wehba, S.; Machado, R.B. **Osteoporose pós-menopausa**, 1996. Disponível em www.menopausiaenlinea.com. Acesso em 16/10/2010.

Fogelman, I.; Pearson, D.W.; Bessent, R.G.; Tofe, A.J.; Francis, M.D.A. Comparison of skeletal uptake of three diphosphonates by whole body retention. **Journal of Nuclear Medicine**, 22:880-883, 1981.

Fogelman, I.; Ryan, P. Measurement of bone mass. **Bone**, 13:S23–S28, 1992.

Gambacciany, M.; Spinetti, A.; Piaggese, L.; Cappagli, B.; Taponeco, F.; Manetti, P.; Weiss, C.; Tetei, G.C.; La Commare, P.; Facchini, V. Ipriflavone prevents the bone loss mass reduction in premenopausal women treated with gonadotropin hormone-releasing hormone agonists. **Bone Liner**, 26:19-26, 1994.

Gammage, K.L.; Francoeur, C.; Mack, D. E.; Klentrou, P. Osteoporosis health beliefs and knowledge in college students: the role of dietary restraint. **Eating Behaviors**, 10(1):65-67, 2009.

González, E.A. The role of cytokines in skeletal remodeling: possible consequences for renal osteodystrophy. **Nephrology Dialysis Transplant**, 15(7):945-950, 2000.

González, F.H.D.; Scheffer, J.F.S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análises clínica, metabólica e nutricional. Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluídos corporais; **29º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, 2002.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002. 853p.

Hamdy, N.A.T. Role of bisphosphonates in metabolic bone diseases. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 4:19-25, 1993.

Harris, S.T.; Eriksen, E.F.; Davidson, M.; Ettinger, M.P.; Moffett, A.H.; Baylink, D.J. Effect of combined risedronate and hormone replacement therapies on bone mineral density in postmenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 86:1890-1897, 2001.

Head, K.A. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. **Alternative Medicine Review**, 4 (1):10-22, 1999.

Hernandez, C.J. How can bone turnover modify bone strength independent of bone mass? **Bone**, 42(6):1014-1020, 2008.

Hofbauer, L.C.; Khosla, S.; Dunstan, C.R; Lacey, D.L.; Boyle, W.J.; Riggs, B.L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, 15(1):2-12, 2000.

Holroyd , C.; Cooper, C.; Dennison, E. Epidemiology of osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 22(5):671–685, 2008.

Hughes, D.E.; Wright, K.R.; Uy, H.L.; Sasaki, A.; Yoneda, T.; Roodman, G.D.; Mundy, G.R.; Boyce, B.F. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, 10(10):1478-1487, 1995.

Iqbal, M.M. Osteoporosis: epidemiology, diagnosis and treatment. **Southern Medical Journal**, 93(1):2-17, 2000.

Ishida, H.; Uesugi, T.; Hirai, K.; Toda, T.; Nukaya, H.; Yokotsuka, K.; Tsuji, K. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 21(1):62-66, 1998.

Jaime, A.P.G.; Anbinder, A.L.; Lima, A.P.; Prado, F.A.; Balducci, I.; Rocha, R.F. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. **Ciência Odontológica Brasileira**, 8(2):70-79, 2005.

Jerome, C.P.; Peterson, P.E. Nonhuman primate models in skeletal research. **Bone**, 29:1–6, 2001.

Johnell, O. Advances in osteoporosis: better identification of risk factors can reduce morbidity and mortality. **Journal of Internal Medicine**, 239(4):299-304, 1996.

Junqueira, L.C.U.; Carneiro, J. **Histologia Básica – Texto e Atlas**. Guanabara Koogan, 2008. 542p.

Kalu, D. N. The ovariectomised rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Mineral** 15:175–192; 1991.

Katai, Y.; Kawase, T.; Nakano, T.; Mikuni-Tabagaki, Y.; Saito, S. Effects of iprivaflone and estrogen on the differentiation and proliferation of osteogenic cells. **Calcified Tissue International**, 51:11-15, 1992.

Khoury, M.J. Genetic and epidemiological approaches to the search for gene-environment interaction: the case of osteoporosis. **American Journal of Epidemiology**, 147:1-2, 1998.

Kierszembbaum, A.L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução a patologia**. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008. 696p.

Kim, S.; Lee, M.; Rhee, M. Studies on the effects of biomedical agents on serum concentration of Ca^{2+} , P and ALP. Activity in osteoporosis-induced rats. **Journal of Veterinary Science**, 4(2):151-154, 2003.

Knoch, F.; Jaquier, C.; Kowalsky, M.; Schaeren, S.; Alabre, C.; Martin, I.; Rubash, H.E.; Shanbhag, S. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, 26:6941–6949, 2005.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. **Princípios da Bioquímica**. 4ª edição Sarvier, 2007. 1232p.

Levinson, W.; Altkorn, D. Prevenção primária da osteoporose pós-menopausa. **Journal of the American Medical Association Brasil**, 3(10):2607-2609, 1999.

Li, C.Y.; Jee, W.S.; Chen, J.L.; Mo, A.; Setterberg, R.B.; Su, M.; Tian, X.Y.; Ling, Y.F.; Yao, W. Estrogen and “exercise” have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebral and femoral neck of the ovariectomized rat. **Calcified Tissue International**, 72(1):42-49, 2003.

Li, X.; Cui, Q.; Kao, C.; Wang, G.J.; Baliana, G. Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPAR γ 2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. **Bone**, 33:652-659, 2003.

Lindsay, R.; Cosman, F.; Lobo, R.A.; Walsh, B.W.; Harris, S.T.; Reagan, J.E. Addition of alendronate to ongoing hormone replacement therapy in the

treatment of osteoporosis: a randomized, controlled clinical trial. **J Clin Endocrinology Metabolism**, 84:3076–3081, 1999.

Louzada, M.Q.J. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbula de coelhos castrados. **Revista da Faculdade de Odontologia**, 13(1):33–38, 2001.

Maddalozzo, G.F.; Turner, R.T.; Edwards, C.H.; Howe, K.S.; Widrick, J.J.; Rosen, C.J.; Iwaniec, U.T. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. **Osteoporosis International**, 29(9):1529-1538, 2009.

Maeda, T.; Matsunuma, A.; Kawane, T.; Horiuchi, N. Simvastatin Promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 280:874–877, 2001.

Mahley, R.W.; Bersot, T.P. Drug therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia. In: Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G. (Eds.) **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill: 971-1002, 2001.

Mcbroom, R.J.; Hayes, W.C.; Edwards, W.T.; Goldberg, R.P.; White, A.A. III. Prediction of vertebral body compressive fracture using quantitative computed tomography. **Journal of Bone and Joint Surgery**, 67A:1206-1214, 1985.

Moreira, C. O uso dos fitoestrogênios em ginecologia: evidências para o emprego clínico dos fitoestrogênios na prevenção e no tratamento da osteoporose da mulher pós-menopausa. **Boletim da Sociedade de Reumatologia do Rio de Janeiro**, 32(112):9-13, 2004.

Mosekilde, L.I.; Mosekilde, L.E.; Danielsen, C.C. Biochemical competence of vertebral trabecular bone in relation to ash density and age in normal individuals. **Bone**, 8:79-85, 1987.

Motta, V.T. **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre, Editora Médica Missau, 2003. 419p.

Mundy, G.D.; Oyajobi, B.O. Bone remodeling. In: FAVUS, M.J. (Org.). **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. 5. ed. Washington, American Society for Bone and Mineral Research :46-58, 2003.

Mundy, G.R. Statins and their potential for osteoporosis. **Bone**, 29(6):495-497, 2001.

Mundy, G. R.; Garrett, R.; Harris, S.; Chan, J.; Chen, D.; Rossini, G.; Boyce B.; Zhao, M.; Gutierrez, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, 286:1946–1949, 1999.

National Osteoporosis Foundation (NOF) America's Bone Health. **The state of osteoporosis and low bone mass**. 2002: Internet Creations.

Nijveldt, R.J.; Nood, E.V.; Hoorn, D.E.C.V.; Boelens, P.G.; Nooren, K.V.; Leeuwen, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, 74(4):418-425, 2001.

Notoya, K.; Yoshida, K.; Taketomi, S.; Yamazaki, I.; Kumegawa, M. Inhibitory effects of ipriflavone on osteoclast-mediated bone resorption and new osteoclast-mediated formation in long-term cultures of mouse unfractionated bone cells. **Calcified Tissue International**, 53:206-209, 1993.

Pagani, F.; Francucci, C.M.; Moro, L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. **Journal Endocrinological Investigation** 28(Suppl. 10):8–13, 2005.

Passeri, M.; Biondi, D.; Dall'Aglio, E.; Pedrazoni, M.; Bufalino, L.; Castiglione, G.N.; Di Peppe, C.; Abate, G. Effects of 2-year therapy with ipriflavone in elderly women with established osteoporosis. **Italian Journal of Mineral & Electrolyte Metabolism**, 9:137-144, 1995

Peterson, J.; Dwyer, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, 18(12):1995-2018, 1998.

Pinkerton, J.V.; Dalkin, A.C. Combination therapy for treatment of osteoporosis: A review. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, 559-565, 2007.

Pinto, A. S. **Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona, isoladamente e em associação, na osteoporose induzida com dexametasona**. 2004. 54f. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

Pinto, A.S.; Oliveira, T.T.; Del Carlo, R.J.; Nagem, T.J.; Fonseca, C.C.; Moraes, G.H.K.; Ferreira Junior, D.B.; Cardoso, C.A. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42(1):99-107, 2006.

Pinto, A.S.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J.; Del Carlo, R.J.; Fonseca, C.C.; Moraes, G.H.K.; Bragine, D.F.J.; Cardoso, C.A. Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona sobre a osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 26 (1):63-70, 2005.

Pivonka, P.; Zimak, J.; Smith, D.W.; Gardiner, B.S.; Dunstan, C.R.; Sims, N.A.; John Martin, T.; Mundy, G.R. Model structure and control of bone remodeling: a theoretical study. **Bone**, 43(2):249-263, 2008.

Priemel, M.; Schilling, A.F.; Haberland, M; Pogoda, P.; Rueger, J.M.; Amling, M. Osteopenic mice: animal models of the aging skeleton. **J. Musculoskelet Neuronal Interact**, 2(3):212-218, 2002.

Prynne, C.J.; Mishra, G.D.; O'Connell, M.A.; Muniz, G.; Laskey, M.A.; Yan, L., et al. Fruit and vegetable intakes and bone mineral status: a cross sectional study in 5 age and sex cohorts. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 83:1420–1428, 2006.

Ralston, S.H. Genetics of osteoporosis. **Proceedings of Nutrition Society**, 66(2):158–165, 2007.

Reginster, J.; Minne, H.W.; Sorensen, O.H.; Hooper, M.; Roux, C.; Brandi, M.L.; Lund, B.; Ethgen, D.; Pack, S.; Roumagnac, I.; Eastell, 108 R. Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. **Osteoporosis International**, 11(1):83-91, 2000.

Richard, D. and Wasnich, M. D. Epidemiology of osteoporosis. Primer on the **Bone**, 28(1) H. Namkung-Matthai et al. 85 January:80–86, 2001.

Rogers, M.J.; Frith, J.C.; Luckman, S.P.; Coxon, F.P.; Benford, H.L.; Monk-konen, J. et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, 24:73S-79S, 1999.

Russel, R.; Rogers, M.J.; Frith, J.C.; Luckman, S.P.; Coxon, F.P.; Benford, H.L. et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. **Journal Bone Mineral Research**, 14:53-65, 1999.

Russo, L.A.T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 45(4):401-406, 2001.

Saengsirisuwan, V.; Pongseeda, S.; Prasannarong, M.; Vichaiwong, K.; Toskulkaeo, C. Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. **Metabolism**, 58(1):38-47, 2009.

Santos, P.S. **Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose**. 2004. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2004.

Saraiva, G.L e Lazaretti-Castro, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 46(1):72-78, 2002.

Sequetto, P.L. **Efeitos de alendronato de sódio, sinvastatina, crisina e tintura de *Camellia sinensis* na osteoporose induzida por dexametasona em ratas**. 2008. 202f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, 2008.

Silva, R.R. **Alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e flavonóides na osteoporose induzida por glicocorticóide**. 2006. 115f. Tese de Doutorado – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

Sinaki, M.; Itoi, E.; Wahner, H.W.; Wollan, P.; Gelzcer, R.; Mullan, B.P.; Collins, D.A.; Hodgson, S.F. Stronger back muscles reduce the incidence of vertebral fractures: a prospective 10 year follow-up of postmenopausal women. **Bone**, 30(6):836-841, 2002.

Souza, M.P.G. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, 45(3):220-9, 2010.

Svendsen, O.L.; Hassager, C.; Skodt, V.; Christiansen, C. Impact of soft tissue on in vivo accuracy of bone mineral measurements in the spine, hip and forearm: a human cadaver study. **Journal Bone Mineral Research**, 10(6):868–873, 1995.

Thompson, C.B. Apoptosis. In: Paul, W.E. (Org.). **Fundamental immunology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 813-829, 1999.

Thompson, D.D.; Simmons, H.A.; Pirie, C.M.; Ke, H.Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, 4(17), 1995.

Thorndike, E.A.; Turner, A. In search of an animal model for postmenopausal diseases. **Frontiers Bioscience**, Tampa, 3:7-26, 1998.

Tosteson, A.N.; Melton, L.J.; Dawson-Hughes, B.; Baim, S.; Favus, M.; Khosla, S.; Lindsay, R.L. Cost-effective osteoporosis treatment thresholds: the United States perspective. **Osteoporosis International**, 19(4):437-447, 2008.

Uyar, Y.; Baytur, Y.; Inceboz, U.; Demir, B.C.; Gumuser, G.; Ozbilgin, K. Comparative effects of risedronate, atorvastatin, estrogen and SERMs on bone mass and strength in ovariectomized rats. **Maturitas**, 63:261-267, 2009.

Vieira, J.G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 43:415-422, 1999.

Viereck, V.; Grundker, C.; Blaschke, S.; Frosch, K.H.; Schoppet, M.; Emons, G.; Hofbauer, L.C. Atorvastatin stimulates the production of osteoprotegerin by human osteoblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, 96(6):1244-1253, 2005.

Wimalawansa, S. J. Therapeutic options in prevention and treatment of osteoporosis. **Experimental Clinical Endocrinology** 12:1–27; 1993.

Wittrant, Y.; Théoleyre, S.; Chipoy, C.; Padrines, M.; Blanchard, F.; Heymann, D.; Rédini, F. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumors and associated osteolysis. **Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer**, 1704:49-57, 2004.

Wooldft, A.D; Dixon, A.S.J. **Osteoporose: um guia clínico**, 1999.

World Health Organization. **Assessment of fracture risk and application to screening for postmenopausal osteoporosis**. Washington, DC: Technical Report Series 843:1-129, 1994.

Wronski, T.J.; Dann, L.M.; Qi, H.; Yen, C.F. Skeletal effects of withdrawal of estrogen and diphosphonate treatment in ovariectomised rats. **Calcified Tissue International** 53:210–216; 1993.

Wronski, T.J.; Dann, L.M.; Scott, K.S.; Crooke, L.R. Endocrine and pharmacological suppressors of bone turnover protect against osteopenia in ovariectomised rats. **Endocrinology** 125:810–816; 1989.

Wronski, T.J.; Lowry, P.L.; Walsh, C.C.; Ignaszewski, L. A. Skeletal alterations in ovariectomised rats. **Calcified Tissue International** 37:324 –328; 1985.

Yamazaki, I. Effect of ipriflavone on the response of uterus and thyroid to estrogen. **Life Sciences**, 38:757-764, 1986.

Zmuda, J.M.; Cauley, J.A.; Ferrell, R.E. Vitamin D gene variants and osteoporosis. **Epidemiologic Reviews**, 22(2):203-217, 2000.