

ROSIMAR REGINA DA SILVA

ALENDRONATO DE SÓDIO, ATORVASTATINA CÁLCICA E FLAVONÓIDES  
NA OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586a  
2006

Silva, Rosimar Regina da, 1973-

Alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e flavonóides na osteoporose induzida por glicocorticóide / Rosimar Regina da Silva. – Viçosa : UFV, 2006.

xxii, 115f. : il. algumas col. ; 29cm.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 90-115.

1. Bifosfonatos - Efeito fisiológico. 2. Estatinas - Efeito fisiológico. 3. Flavonóides - Efeito fisiológico. 4. Osteoporose - Tratamento. 5. Glicocorticóides. 6. Ossos - Metabolismo. 7. Rato como animal de laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.553

ROSIMAR REGINA DA SILVA

ALENDRONATO DE SÓDIO, ATORVASTATINA CÁLCICA E FLAVONÓIDES  
NA OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDE

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2006

---

Prof. Tanus Jorge Nagem  
(Conselheiro)

---

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo  
(Conselheiro)

---

Profa. Martha de Oliveira Guerra

---

Prof. George Henrique Kling de Moraes

---

Profa. Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,  
nunca tem medo e nunca se arrepende”.

(Leonardo da Vinci)

Ao meu querido filho João Lucas, meu bem mais valioso.

Ao meu esposo Héilton César, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua presença e proteção durante a minha vida e pela graça concedida para cumprir mais esta etapa.

Aos meus pais, pelo amor, pela dedicação e pelo exemplo de perseverança e honestidade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

Agradeço de forma especial, a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira, pelo incentivo, confiança e amizade, por sua competência e orientação na realização deste trabalho e pelo valioso exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Tanus Jorge Nagem, por participar na concretização de mais uma etapa da minha formação profissional, pelo apoio e inestimável colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Junqueira Del Carlo, pelo apoio e valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. George Henrique Kling de Moraes, pela participação e pelas sugestões na finalização deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos durante a realização do curso.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Martha de Oliveira Guerra, pela participação na concretização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio César Fonseca, pela contribuição nas análises histomorfométricas.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, pela paciência e pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

À Maria Aparecida Leão, pela amizade e pela grande ajuda na realização dos experimentos.

Ao Humberto Doriguêto Gravina, pela valiosa contribuição na realização dos experimentos.

Ao José Geraldo Pinto, pela ajuda na realização das análises bioquímicas.

À Silvana Ribeiro Garcia, pela orientação nas análises estatísticas.

Aos estagiários do laboratório de Biofármacos pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT .....	xx
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Tecido ósseo.....	3
2.1.1. Remodelação óssea.....	7
2.2. Osteoporose.....	8
2.2.1. Fatores de risco.....	11
2.2.2. Prevenção e tratamento da osteoporose.....	11
2.2.2.1. Cálcio e vitamina D.....	12
2.2.2.2. Drogas que inibem a reabsorção óssea.....	15

2.2.2.2.1. Bifosfonato.....	15
2.2.2.2.2. Calcitonina.....	17
2.2.2.2.3. Estrógenos.....	18
2.2.2.3. Drogas que estimulam a formação óssea.....	19
2.2.2.3.1. Fluoreto.....	19
2.2.2.3.2. Paratormônio.....	20
2.3. As estatinas e o metabolismo ósseo.....	22
2.4. Indução de osteoporose por glicocorticóides.....	26
2.5. Flavonóides.....	29
2.5.1. Efeito de flavonóides no metabolismo ósseo.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
3.1. Experimento para avaliar o efeito de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida por dexametasona.....	41
3.2. Experimento para avaliar o efeito de alendronato de sódio isoladamente e em associação com atorvastatina cálcica, ipriflavona e rutina na osteoporose induzida por dexametasona.....	41
3.3. Experimento para avaliar o efeito de ipriflavona associada à atorvastatina cálcica e de rutina isoladamente e em associação com ipriflavona e alendronato de sódio na osteoporose induzida por dexametasona.....	42
3.4. Coleta de material para análises.....	42
3.4.1. Análise dos constituintes sanguíneos.....	42
3.4.2. Análise de proteína no osso.....	43
3.4.3. Histomorfometria.....	43
3.5. Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45

4.1. Efeito de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona isoladamente na osteoporose induzida por dexametasona.....	45
4.2. Efeito de alendronato de sódio isoladamente e em associação com atorvastatina cálcica, ipriflavona e rutina na osteoporose induzida por dexametasona.....	58
4.3. Efeito de ipriflavona associada à atorvastatina cálcica e de rutina isoladamente e em associação com ipriflavona e alendronato de sódio na osteoporose induzida por dexametasona.....	73
5. CONCLUSÕES .....	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
BRU	Unidades de remodelamento ósseo
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
FIT	The Fracture Intervention Trial
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio de crescimento
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A
IGF I	Fator de crescimento semelhante à insulina I
IL	Interleucina
IL-6 (+IL6-sR)	Receptor solúvel para interleucina-6
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
LIF	Fator inibidor de leucócitos
OPG	Osteoprotegerina

PP	Pirofosfato
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RANKL	Receptor do ativador do fator nuclear ligante Kappa B
RNA	Ácido ribonucléico
UFV	Universidade Federal de Viçosa
VDR	Receptor nuclear para a vitamina D

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microfotografias do osso trabecular normal (a) e osteoporótico (b)....	9
Figura 2 – Fatores que interferem na osteoporose.....	10
Figura 3 – Mecanismo de ação das estatinas e bifosfonatos na cascata da prenilação de proteínas.....	24
Figura 4 – Aspecto multifatorial da fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide.....	28
Figura 5 – Estrutura química da genisteína.....	29
Figura 6 – Estrutura química da daidzeína.....	30
Figura 7 – Estrutura química da ipriflavona.....	30
Figura 8 – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G1 (controle) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	50
Figura 9 – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G2 (controle com osteoporose) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	51
Figura 10– Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G3 (dexametasona + alendronato) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	52
Figura 11– Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G4 (dexametasona + atorvastatina) aos 10	

	(A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	53
Figura 12–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G5 (dexametasona + ipriflavona) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	54
Figura 13–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G1 (controle) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	63
Figura 14–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G2 (controle com osteoporose) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	64
Figura 15–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G3 (dexametasona + alendronato) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	65
Figura 16–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G4 (dexametasona + alendronato + atorvastatina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	66
Figura 17–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G5 (dexametasona + alendronato + ipriflavona) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	67
Figura 18–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G6 (dexametasona + rutina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	68
Figura 19–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G1 (controle) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	80
Figura 20–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G2 (controle com osteoporose) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	81
Figura 21–	Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G3 (dexametasona + alendronato + ipriflavona + rutina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento....	82

Figura 22– Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G4 (dexametasona + ipriflavona + rutina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	83
Figura 23– Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G5 (dexametasona + rutina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	84
Figura 24– Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G6 (dexametasona + atorvastatina + ipriflavona) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores médios de cálcio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	46
Tabela 2 –	Valores médios de fósforo sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta....	47
Tabela 3 –	Valores médios de magnésio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	48
Tabela 4 –	Valores médios de proteínas não colagenosas em mg/100 mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	49
Tabela 5 –	Valores médios de proteínas colagenosas em mg/100 mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	49
Tabela 6 –	Valores médios do número de trabéculas ósseas em pontos percentuais do fêmur de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	55
Tabela 7 –	Valores médios de espessura do osso cortical em $\mu\text{m}$ , de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	56

Tabela 8 –	Valores médios de cálcio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	58
Tabela 9 –	Valores médios de fósforo sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta....	59
Tabela 10–	Valores médios de magnésio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	60
Tabela 11–	Valores médios de glicose sérica em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	61
Tabela 12–	Valores médios de proteínas não colagenosas em mg/100 mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	61
Tabela 13–	Valores médios de proteínas colagenosas em mg/100 mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	62
Tabela 14–	Valores médios do número de trabéculas ósseas em pontos percentuais do fêmur de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	69
Tabela 15–	Valores médios de espessura do osso cortical em $\mu\text{m}$ , de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	71
Tabela 16–	Valores médios de cálcio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	73
Tabela 17–	Valores médios de fósforo sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta....	74
Tabela 18–	Valores médios de magnésio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	75

Tabela 19–	Valores médios de glicose sérica em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	76
Tabela 20–	Valores médios de proteínas não colagenosas em mg/100 mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	78
Tabela 21–	Valores médios de proteínas colagenosas em mg/100 mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	79
Tabela 22–	Valores médios do número de trabéculas ósseas em pontos percentuais do fêmur de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	86
Tabela 23–	Valores médios de espessura do osso cortical em $\mu\text{m}$ , de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta.....	88

## RESUMO

SILVA, Rosimar Regina da, D.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2006.  
**Alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e flavonóides na osteoporose induzida por glicocorticóide.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Ricardo Junqueira Del Carlo e Tanus Jorge Nagem.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona e rutina isoladamente e em associação, na osteoporose induzida pela administração de dexametasona (dose de 7mg/kg de peso), em ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). As dosagens de alendronato, atorvastatina, ipriflavona e rutina foram de 0,02 mg, 0,3 mg, 50 mg e 25 mg, respectivamente, administradas diariamente por via oral. Após o período de indução da osteoporose, iniciou-se os tratamentos. No primeiro experimento os animais foram distribuídos em cinco grupos: G1: controle, G2: controle com osteoporose (animais receberam apenas dexametasona), G3: Dexametasona + Alendronato, G4: Dexametasona + Atorvastatina e G5: Dexametasona + Ipriflavona. No segundo experimento os animais foram distribuídos em seis grupos: G1: controle, G2: controle com osteoporose, G3: Dexametasona + Alendronato, G4: Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina, G5: Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona e G6: Dexametasona + Alendronato + Rutina. No terceiro experimento os animais foram distribuídos em seis grupos: G1: controle, G2: controle com osteoporose, G3: Dexametasona + Alendronato

+ Ipriflavona + Rutina, G4: Dexametasona + Ipriflavona + Rutina, G5: Dexametasona + Rutina e G6: Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona. Aos 10, 20 e 30 dias, após o início dos tratamentos, foram coletadas amostras de sangue para dosagens de cálcio, fósforo, magnésio e glicose; a tíbia esquerda para análise de proteínas colagenosas e de proteínas não colagenosas e o fêmur esquerdo para análise histomorfométrica. No primeiro experimento os resultados não mostraram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo controle com osteoporose, bem como, entre eles e os grupos tratados, quanto aos valores séricos de cálcio e magnésio; proteínas colagenosas ósseas e espessura do osso cortical. Ao final do período experimental observou-se uma redução significativa nos níveis séricos de fósforo, de proteínas não colagenosas ósseas e no número de trabéculas ósseas no grupo controle com osteoporose quando comparado com o grupo controle. Observou-se também que todos os grupos tratados apresentaram aumentos significativos nos níveis de proteínas não colagenosas e que apenas o grupo tratado com ipriflavona apresentou aumento significativo no número de trabéculas ósseas, quando comparados com o grupo controle com osteoporose. No segundo experimento os resultados não mostraram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo controle com osteoporose, bem como, entre eles e os grupos tratados no que se refere aos níveis séricos de cálcio, fósforo e magnésio. Para os níveis de glicose sanguínea observou-se que a dexametasona induziu hiperglicemia e apenas o grupo que recebeu alendronato em associação à ipriflavona reduziu a glicemia. Para as proteínas não colagenosas apenas o grupo que recebeu alendronato em associação à atorvastatina apresentou aumento significativo em relação aos grupos controle. Os resultados mostraram uma redução significativa nos níveis de proteínas colagenosas no grupo controle com osteoporose, mas nenhuma alteração foi observada entre ele e os grupos tratados. Observou-se também uma redução significativa no número de trabéculas ósseas e na espessura cortical no grupo controle com osteoporose, sendo que todos os grupos tratados mostraram aumentos significativos no número de trabéculas ao final do período experimental e que apenas o grupo que recebeu alendronato associado à ipriflavona, não apresentou diferença significativa na espessura cortical. No terceiro experimento os resultados não mostraram diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo controle com osteoporose no que se refere aos níveis séricos de cálcio, fósforo e magnésio; níveis ósseos de proteínas colagenosas e não colagenosas; sendo que todos os tratamentos reduziram os níveis séricos de cálcio ao final do período

experimental. Para os níveis de glicose sanguínea, observou-se que a dexametasona induziu a hiperglicemia e os grupos tratados com alendronato em associação à ipriflavona e rutina e rutina isoladamente reduziram os valores de glicemia quando comparados com o grupo controle com osteoporose. Através da análise histomorfométrica observou-se que a dexametasona reduziu o número de trabéculas ósseas e que todas as substâncias testadas foram eficazes em aumentar a mesma, exceto o grupo que recebeu ipriflavona em associação com a rutina. Além disso, a dexametasona reduziu a espessura cortical e os grupos que receberam alendronato associado à ipriflavona e rutina e a rutina isoladamente apresentaram aumentos significativos nesse parâmetro. Diante dos resultados conclui-se que a rutina e a ipriflavona isoladamente e a ipriflavona utilizada em associação ao alendronato e rutina foram eficientes em reduzir a glicemia induzida pela dexametasona. Além disso, a rutina, o alendronato e a ipriflavona isoladamente e em associações foram eficazes em aumentar o número de trabéculas ósseas e que o alendronato, a atorvastatina e a ipriflavona, quando administrados isoladamente, e a associação de alendronato com atorvastatina aumentaram os níveis de proteínas não colagenosas. Deste modo, essas substâncias usadas isoladamente ou as suas associações, podem ser promissoras no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticóide.

## ABSTRACT

SILVA, Rosimar Regina da, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2006.  
**Sodium alendronate, atorvastatin calcic and flavonoids in osteoporosis induced by glucocorticoids.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee members: Ricardo Junqueira Del Carlo and Tanus Jorge Nagem.

The objective of this paper is to evaluate the influence of sodium alendronate, atorvastatin calcic, ipriflavone and rutin in isolation and in combination, in osteoporosis induced for the administration of dexamethasone (dose of 7mg/kg of weight), in female Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*). The dosages of sodium alendronate, atorvastatin calcic, ipriflavone and rutin, were of 0,02 mg, 0,3 mg, 50 mg e 25 mg, respectively; and all the substances were administered orally, daily. After the induction period of osteoporosis, the treatments began. In the first experiment, the animals were distributed in five groups: G1: control, G2: control with osteoporosis (animal had received only dexamethasone), G3: dexamethasone + alendronate, G4: dexamethasone + atorvastatin and G5: dexamethasone + ipriflavone. In the second experiment, the animals were distributed in six groups: G1: control, G2: control with osteoporosis, G3: dexamethasone + alendronate, G4: dexamethasone + alendronate + atorvastatin, G5: dexamethasone + alendronate + ipriflavone and G6: dexamethasone + alendronate + rutin. In the third experiment, the animals were distributed in six groups: G1: control, G2: control with osteoporosis, G3: dexamethasone + alendronate + ipriflavone + rutin,

G4: dexamethasone + ipriflavone + rutin, G5: dexamethasone + rutin and G6: dexamethasone + atorvastatin + ipriflavone. By the 10th, 20th and 30th days, after the beginning of the treatments, samples were collected of blood for dosages of calcium, phosphorus, magnesium and glucose; of left tibia for collagenous protein and non collagenous protein analysis and of left femur for histomorphometric analysis. In the first experiment, the results did not show significant differences between the control group and the control group with osteoporosis, or even between them and the treated groups in relation to the levels of calcium and magnesium; collagenous bone protein and cortical thickness. At the end of the experimental period a significant reduction was observed in the serum levels of phosphorus, of non collagenous bone protein and in the number of bone trabeculae in the control group with osteoporosis when compared with the control group. It was also observed that all the groups treated presented significant increases in the levels of non collagenous protein and that only the group treated with ipriflavone presented a significant increase in the number of bone trabeculae, when compared with the control group with osteoporosis. In the second experiment the results did not show any significant differences between the control group and the control group with osteoporosis, or even between them and the groups treated relating to the serum levels of calcium, phosphorus and magnesium. For the levels of blood glucose it was observed that dexamethasone induced hyperglycemia and only the group which received alendronate together with ipriflavone reduced the glycemia. For the non collagenous proteins only the group which received alendronate together with atorvastatin presented any significant increase in relation to the control groups. The results showed a significant reduction in the levels of collagenous protein in the control group with osteoporosis, but no alteration was observed between it and the treated groups. A significant reduction was also observed in the number of bone trabeculae and in the cortical thickness in the control group with osteoporosis, considering that all the groups treated showed significant increases in the number of trabeculae at the end of the experimental period and only the group which received alendronate together with ipriflavone, did not present significant differences in cortical thickness. In the third experiment the results did not show significant differences between the control group and the control group with osteoporosis in relation to the serum levels of calcium, phosphorus and magnesium; bone levels of collagenous protein and non collagenous protein; considering that all of the treatments reduced the serum levels of calcium by the

end of the experimental period. For the levels of blood glucose, it was observed that dexamethasone induced hyperglycemia and the groups treated with alendronate together with ipriflavone and rutin and rutin in isolation reduced the levels of glycemia when compared with the control group with osteoporosis. Through histomorphometric analysis it was observed that dexamethasone reduced the number of bone trabeculae and that all the substances tested were effective in increasing them, except the group which received ipriflavone together with rutin. Besides this, dexamethasone reduced cortical thickness and the groups which received alendronate together with ipriflavone and rutin and rutin in isolation presented significant increases in this parameter. In the face of these results it is concluded that rutin and ipriflavone separately and ipriflavone used together with alendronate and rutin were effective in reducing the glycemia induced by the dexamethasone. Besides this, rutin, alendronate and ipriflavone separately and together were effective in increasing the number of bone trabeculae and that alendronate, atorvastatin and ipriflavone, when administered separately, and the association of alendronate with atorvastatin increase the levels of non collagenous proteins. In this way, these substances, whether used in isolation or in combination, could be promising in the treatment of osteoporosis induced by glucocorticoids.

## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional está se dando de forma extremamente rápida. Segundo estimativas, a proporção de idosos em 2050 deverá alcançar 15% da população (CHAIMOWICZ, 1997). Com isso a incidência de múltiplas doenças associadas com a idade, como a osteoporose, tenderá a aumentar (CARNEIRO, 2000).

A osteoporose é definida como uma desordem no tecido ósseo caracterizada pelo comprometimento da força do osso que predispõe a um aumento no risco de fraturas. A força do osso reflete a integração da densidade mineral e a qualidade do osso e é determinada pela interação dos fatores genéticos, hormonais, nutricionais, ambientais e estilo de vida (MEZQUITA-RAYA et al., 2004). É uma doença esquelética progressiva, com conseqüências físicas, psicossociais e financeiras. Resulta de perda óssea assintomática com conseqüente redução da força do osso até que ocorra uma fratura espontânea ou após um trauma mínimo (GOLD e DREZNER, 1995; SINAKI, 1998; BENNEL et al., 2000; HACZYNSKI e JAKIMIUK, 2001; SINAKI et al., 2002).

Nos Estados Unidos observou-se que uma em cada quatro mulheres e um em cada dez homens acima de cinquenta anos de idade apresentam osteoporose e 1,5 milhão de pessoas por ano apresentam fraturas (WHO, 1994). Atualmente já são 10 milhões de americanos com osteoporose e outros 18 milhões apresentam perda de massa óssea (NIH, 2001).

A prevalência de osteoporose e a incidência de fraturas variam segundo gênero e raça/etnia. Mulheres brancas, com deficiência estrogênica principalmente decorrente

da pós-menopausa, de baixo peso e índice de massa corpórea, história familiar de osteoporose, além de história de fratura pregressa são mais predispostas à perda de massa óssea (BIRDWOOD, 1996; NIH, 2001).

Na América Latina pouco se conhece sobre a prevalência da doença. No México, durante o ano de 1998, mais de 24,5 milhões de pessoas foram diagnosticadas com osteopenia ou osteoporose (MORALES-TORRES e GUTIÉRREZ-UREÑA, 2004).

No Brasil esta patologia atinge 25 a 30% das mulheres brancas durante a pós-menopausa e 40 a 60% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade (CARNEIRO, 2001).

Portanto, devido aos altos índices de morbidade e mortalidade associados, principalmente com fraturas de quadril, tratamentos para prevenir, estabilizar ou melhorar o quadro de osteoporose tornam-se muito importantes.

Os flavonóides, substâncias que vem sendo pesquisadas nessa patologia, são compostos naturais encontrados nos alimentos, principalmente nas verduras, leguminosas, frutas, grãos, sementes, ervas e chá. São produzidos pela rota do metabolismo secundário em plantas. Várias propriedades farmacológicas têm sido atribuídas aos flavonóides tais como atividade anticancerígena e na prevenção de patologias relacionadas com a idade. Recentemente pesquisas têm demonstrado que esses compostos aumentam a massa óssea, prevenindo a osteoporose (WATTEL et al., 2004).

Pesquisadores têm demonstrado que o flavonóide rutina e/ou seus metabólitos inibem a perda óssea trabecular induzida pela ovariectomia nos ratos, reduzindo a reabsorção óssea e aumentando a atividade osteoblástica (HORCAJADA-MOLTENI et al., 2000). Além disso, estudos *in vitro* também demonstraram que os flavonóis quercetina e rutina reduziram significativamente a reabsorção óssea (RASSI et al., 2005).

ARJMANDI et al. (2000) observaram em seus experimentos que o tratamento com a ipriflavona, um flavonóide sintético, mostrou-se efetivo na prevenção da perda óssea associada a ovariectomia.

Diante desses estudos, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do alendronato de sódio, da atorvastatina cálcica e dos flavonóides ipriflavona e rutina isoladamente e em associação na osteoporose induzida pela utilização de glicocorticóide.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 – Tecido ósseo**

O osso é um tipo de tecido conjuntivo, sendo um dos poucos tecidos que normalmente se mineralizam (COTRAN et al., 2000).

Anatomicamente, os ossos podem ser classificados em dois tipos: longos (fêmur, tíbia, úmero) e chatos (ossos do crânio, escápula, mandíbula e bacia). Os ossos longos caracterizam-se por apresentar duas extremidades mais largas, as epífises, e uma porção longa entre as duas, a diáfise. A junção entre as epífises e a diáfise constitui as metáfises, onde ocorre o crescimento. A parte externa dos ossos é constituída por um tecido calcificado denso, chamado de córtex ou osso compacto, que, na diáfise, confina a área ocupada pela medula óssea hematopoiética. À medida que nos aproximamos das metáfises, o córtex torna-se progressivamente mais fino e o espaço interno vai sendo preenchido por uma rede de trabéculas ósseas finas, constituindo o osso trabecular (ou esponjoso). O osso trabecular é encontrado na porção interna dos ossos longos, corpos vertebrais e pelve, sendo mais importante do ponto de vista metabólico que o osso cortical (CORONHO et al., 2001). Internamente, revestindo o canal medular, há uma membrana chamada endóstio. O endóstio apresenta uma pronunciada atividade celular provavelmente devido às forças de flexão e de tração que existem no local e é a membrana responsável pelo processo de modelamento e remodelamento ósseo.

Externamente, o osso cortical é revestido por uma membrana chamada de perióstio, composta por duas camadas. A camada externa, que é fibrosa e está em

contato direto com os músculos e outros tecidos moles, possui células diferenciadas. A camada interna possui células osteoprogenitoras indiferenciadas de condrócitos e osteoblastos (EINHORN, 1995).

Os ossos compactos e trabeculares são constituídos pelo mesmo tipo de matriz extracelular e pelo mesmo tipo de células, mas diferem quanto à superfície calcificada, que é da ordem de 90% no osso compacto e de 25% no trabecular. Isso faz com que a superfície de contato do osso trabecular com o meio externo seja muito maior, definindo para esse tipo de tecido um papel basicamente metabólico, enquanto o osso compacto apresenta papel de proteção e sustentação (CORONHO et al., 2001).

Bioquimicamente, o tecido ósseo é definido por uma mistura especial de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%) (COTRAN et al., 2000).

Cerca de 90% da matriz orgânica do osso é constituída por colágeno tipo I, principal produto de secreção dos osteoblastos, e os 10% restantes compreendem proteoglicanas de baixo peso molecular e proteínas não colagenosas. Entre as proteínas não colagenosas estão a osteocalcina, específica do tecido ósseo e sintetizadas pelos osteoblastos, onde sua concentração reflete a formação óssea; a osteopontina, uma sialoproteína envolvida na mediação da aderência celular e a osteonectina (VARGAS et al., 1997, EINHORN, 1995), dentre outras. Estudos sugerem que a osteonectina pode ser um potente inibidor da deposição de hidroxapatita (ROMBERG et al., 1986).

No tecido ósseo, as moléculas de colágeno estão unidas por três resíduos do aminoácido hidroxilisina, lisina ou seus derivados, de maneira que cada duas moléculas de colágeno estão unidas entre si por uma estrutura cíclica fluorescente chamada piridinolina. Os telopeptídeos (extremidades da cadeia protéica) carboxiterminal e aminoterminal do colágeno tipo I, cujas cadeias protéicas estão unidas entre si através da estrutura piridinolínica, são liberados durante a degradação do colágeno tipo I, dando origem aos telopeptídeos carboxiterminal e aminoterminal do colágeno tipo I. Essas substâncias circulam no sangue e são excretadas na urina. Níveis elevados de telopeptídeos carboxiterminal são observados em condições que apresentem uma reabsorção óssea aumentada como no mieloma múltiplo, nas metástases ósseas, na artrite reumatóide, no hiperparatireoidismo e na imobilização (VARGAS et al., 1997).

A piridinolina difere da deoxipiridinolina apenas pela presença de um grupo hidroxila, sendo que a primeira tem distribuição tecidual ampla, enquanto a segunda é mais específica do tecido ósseo e correlaciona-se melhor com a cinética do cálcio e histomorfometria óssea. Ao contrário das piridinolinas livres, a avaliação dos

telopectídeos do colágeno tipo I parecem mostrar maior correlação com a dinâmica do osso. Na urina podem ser dosadas as formas livres de piridinolina e deoxipiridinolina, e as formas ainda ligadas a telopeptídeos aminoterminais e carboxiterminais do colágeno tipo I (SARAIVA e LAZARETTI-CASTRO, 2002).

A osteocalcina é a proteína não colagenosa mais abundante do osso e dentina. Embora sua função específica não seja conhecida, sabe-se que é sintetizada predominantemente pelos osteoblastos diferenciados, incorporada à matriz óssea extracelular e relacionada à mineralização da matriz osteóide. A vitamina D está diretamente relacionada à osteocalcina, uma vez que, estimula a sua síntese (SARAIVA e LAZARETTI-CASTRO, 2002).

Uma fração (10 a 40%) da osteocalcina intacta recém sintetizada é liberada na circulação, possuindo uma meia-vida curta, pois é rapidamente hidrolisada no fígado e rim por metaloproteases. Os fragmentos carboxiterminais são clareados no sangue, onde permanecem os fragmentos aminoterminais intermediários, sendo esta forma juntamente com a intacta as mais abundantes da circulação. Podem ser mensuradas por imunoenaios comercialmente disponíveis e específicos para a forma intacta e, ou, fragmentos. A osteocalcina é bastante instável *in vitro*, sendo rapidamente degradada em temperatura ambiente (SARAIVA e LAZARETTI-CASTRO, 2002). Pesquisadores têm demonstrado que ocorre uma degradação de 17% em amostras de sangue mantidas a temperatura ambiente por duas horas, e é provável que esta degradação ocorra também durante o ensaio (GARNERO e DELMAS, 1998).

A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada expressa por células transformadas, macrófagos, linfócitos T ativados, células epiteliais especializadas e células ósseas, a qual é encontrada no leite e na matriz mineralizada do osso. A síntese de osteopontina pelas células ósseas é regulada por fatores de crescimento, glicocorticóides, (que promovem a formação óssea) hormônio calcitriol e ácido retinóico (que mediam a reabsorção óssea) (ZHANG et al., 1992).

Com relação à matriz inorgânica do osso, esta tem como principal mineral o cálcio. O cálcio corporal encontra-se nas formas ionizadas (50%), ligados a proteínas (40%) e o restante ligado a fosfato e citrato (10%). Cerca de 99% do cálcio corporal são encontrados no osso, e o 1% restante acha-se circulante no meio extracelular ou no meio intracelular, regulado pela ação hormonal. A homeostase do cálcio é regulada pelo PTH, vitamina D (1, 25-diidroxitamina D ou calcitriol, forma ativa da Vitamina D) e calcitonina (CORONHO et al., 2001). Os sais cristalinos depositados na matriz orgânica

do osso são compostos principalmente por cálcio e fosfato, sendo o principal sal cristalino a hidroxiapatita (GUYTON e HALL, 2002).

O tecido ósseo contém três tipos de células: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos. Os osteoblastos são células de origem mesenquimal com intensa capacidade secretora, são responsáveis pela produção de cadeias protéicas precursoras do colágeno para formação de osteóide, precursor não-calcificado do osso, nos locais superficiais de crescimento ou remodelagem (LIN, 1996). Além disso, secretam fatores de crescimento locais, sob influência do GH e fosfatase alcalina óssea, relacionadas com o processo de mineralização do osso talvez através da neutralização de um inibidor da deposição mineral (pirofosfato). A membrana plasmática dos osteoblastos é rica em fosfatase alcalina, cuja atividade é um índice de formação óssea. Os osteoblastos têm receptores para PTH, vitamina D e estrogênio, mas não para a calcitonina. O estímulo do PTH, vitamina D, GH e estrogênio induzem os osteoblastos a produzir o IGF I, que desempenha papel importante na regulação e remodelagem óssea local (MOTTA, 2003).

À medida que os osteoblastos são circundados pela matriz óssea que secretam, deixam de ser células poligonais e desenvolvem extensões longas e delgadas. Nesse momento, o metabolismo dessas células se altera, cessam a síntese de matriz óssea e passam a ser chamadas osteócitos. Os osteócitos situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz óssea, mas mantêm comunicação entre si através dos longos prolongamentos citoplasmáticos, que se intercalam e estabelecem vias de transporte de nutrientes e metabólitos. Os osteócitos sintetizam pequenas quantidades de matriz para manter a integridade óssea (MOTTA, 2003).

Os osteoclastos são monócitos fusionados que histologicamente aparecem como células gigantes, multinucleadas (seis a doze núcleos) encontradas ao longo da superfície do osso. O papel dos osteoclastos é na reabsorção óssea, com a finalidade de reparação de uma fratura ou mobilização de íons cálcio, realizada continuamente. O processo de reabsorção é complexo e depende de características especiais da interface entre o osteoclasto e a superfície óssea, e um espaço fechado forma-se entre a célula e a matriz. Nesse espaço, o osteoclasto libera enzimas lisossomais e mantém um pH ácido, de maneira a possibilitar a dissolução da matriz óssea. A ativação do osteoclasto é dependente da atividade osteoblástica, sendo sua ação limitada em relação ao tempo. Portanto, os osteoclastos possuem uma ação oposta aos osteoblastos, reabsorvendo a matriz óssea (LIN, 1996; COTRAN et al., 2000; CORONHO, 2001; MOTTA, 2003).

Essas células produzem depressões de reabsorção recortadas conhecidas como lacunas de Howship, local onde está sendo reabsorvido ativamente o osso mineralizado (COTRAN et al., 2000).

È interessante salientar que o osteoblasto, mas não o osteoclasto, apresenta receptores para PTH e vitamina D; receptores para estrógenos são comuns aos dois tipos de células, e apenas o osteoclasto apresenta receptores para calcitonina.

SUDA et al. (1995) propuseram um modelo hipotético para explicar o papel das células do estroma/osteoblastos, estimuladas por fatores sistêmicos ou locais, que induziriam a formação dos osteoclastos. As células do estroma/osteoblastos apresentam os seguintes receptores: (a) VDR; (b) sistema proteína quinase A; e (c) via glicoproteína 130. Esses receptores são ativados por diferentes estímulos, ou seja, o VDR pela vitamina D, o sistema quinase A pelo PTH, PTH – proteína relacionada, IL-1, fator  $\alpha$  de necrose tumoral e prostaglandina E<sub>2</sub>, enquanto a via da glicoproteína 130 é ativada pela IL-6 (+IL6-sR), IL-11, oncostatina M e LIF. Quando esses receptores são estimulados, produzem um fator de diferenciação dos osteoclastos, chamado RANKL, molécula chave para a formação dos osteoclastos, que se liga à membrana do osteoblasto. O RANKL reconhece receptores RANK nas células progenitoras dos osteoclastos, estimulando-as na presença de fator estimulante de colônia de macrófago, determinando diferenciação em osteoclastos e também incrementando a atividade dos osteoclastos maduros. A interação entre a RANKL e seu receptor nos osteoclastos é controlada pela OPG. A OPG é um receptor solúvel da família do fator  $\alpha$  de necrose tumoral, que age inibindo a ligação do RANK ao RANKL, assim impedindo o recrutamento, a proliferação e a ativação dos osteoclastos tendo efeito inibitório sobre células precursoras dos osteoclastos. O balanço do sistema OPG/RANKL controla a remodelação óssea. Alterações na concentração dessas substâncias induzidas por variações dos níveis de outras citocinas, administração de glicocorticóides ou deficiência de estrogênio podem induzir um aumento do número e da atividade dos osteoclastos determinando perda de massa óssea (GONZALEZ, 2000; HOFBAUER et al., 2000).

### **2.1.1 – Remodelação óssea**

Ao longo da vida, o tecido ósseo é continuamente remodelado em um processo finamente regulado, chamado de remodelamento ósseo. Esse processo envolve o

acoplamento da atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos. Esse acoplamento é determinado por uma constante troca de sinais entre os osteoblastos e osteoclastos (MUNDY e OYAJOBİ, 2003).

O remodelamento ósseo ocorre em pequenas unidades de células chamadas de BRU, que são observadas em vários sítios das superfícies ósseas. A seqüência de eventos em um sítio de remodelamento, ou seja, em uma BRU, é a ativação-reabsorção-formação (MUNDY e OYAJOBİ, 2003; PEREIRA e TAVEIRA, 2000).

As superfícies ósseas quiescentes são recobertas por células de superfície ou de revestimento. Em resposta a um estímulo de reabsorção, as células de superfície se retraem e expõem a superfície celular; ao mesmo tempo, ocorre a diferenciação, ativação e migração dos osteoclastos aos sítios de reabsorção (superfície exposta). Os osteoclastos reabsorvem o osso velho e formam uma lacuna, chamada de lacuna de Howship. Finalmente, os osteoblastos ocupam o sítio de reabsorção e sintetizam a matriz extracelular (osteóide) que, após um período de amadurecimento (aproximadamente 10 dias), será mineralizada.

Ao final de cada ciclo de remodelamento, a quiescência é restaurada. O produto final do remodelamento ósseo é a manutenção da integridade óssea (MUNDY e OYAJOBİ, 2003).

O remodelamento ósseo ocorre tanto no osso cortical quanto no trabecular. Em situações fisiológicas, a reabsorção e a formação são fenômenos acoplados e dependentes, e o predomínio de um sobre o outro pode resultar em ganho ou perda de massa óssea (SARAIVA E LAZARETTI-CASTRO, 2002).

## **2.2 – Osteoporose**

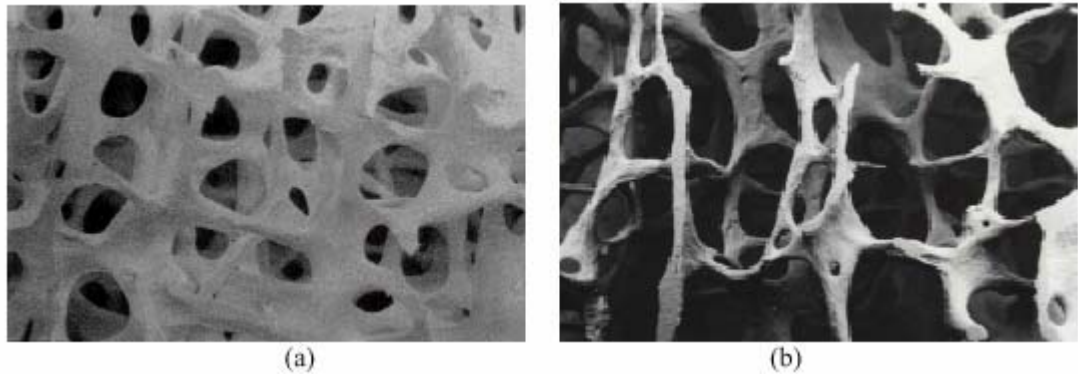
A osteoporose é a doença óssea metabólica mais freqüente, sendo caracterizada por uma diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com aumento da fragilidade óssea e suscetibilidade a fraturas (CORONHO et al., 2001).

Durante a infância e nos primeiros anos da vida adulta, a massa óssea aumenta, atingindo um pico por volta dos 25 a 30 anos. Perto de 10% do esqueleto está continuamente ativo, no processo de remodelação. Após a menopausa, devido à redução dos estrógenos, algumas mulheres passam a perder massa óssea (GARNERO et al., 1999). Normalmente a reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos ocorre primeiro, seguida por uma atividade acoplada, apesar de bem mais lenta, da linhagem que forma

osso novo, osteoblástica (RUSSO, 2001). Se os osteoblastos “falham” nesta fase, uma perda progressiva do ciclo de renovação se estabelece.

Mulheres na pós-menopausa perdem, nos primeiros cinco anos após a menopausa, entre 10% a 15% de osso. Depois deste período a porcentagem diminui, resultando ao final, perda total de 30% a 40% do pico de massa óssea (RECKER, 1993). Entre 30 e 40 anos após a menopausa, as mulheres podem ter perdido 35% de seu osso cortical e 50% de osso trabecular (COTRAN et al., 2000).

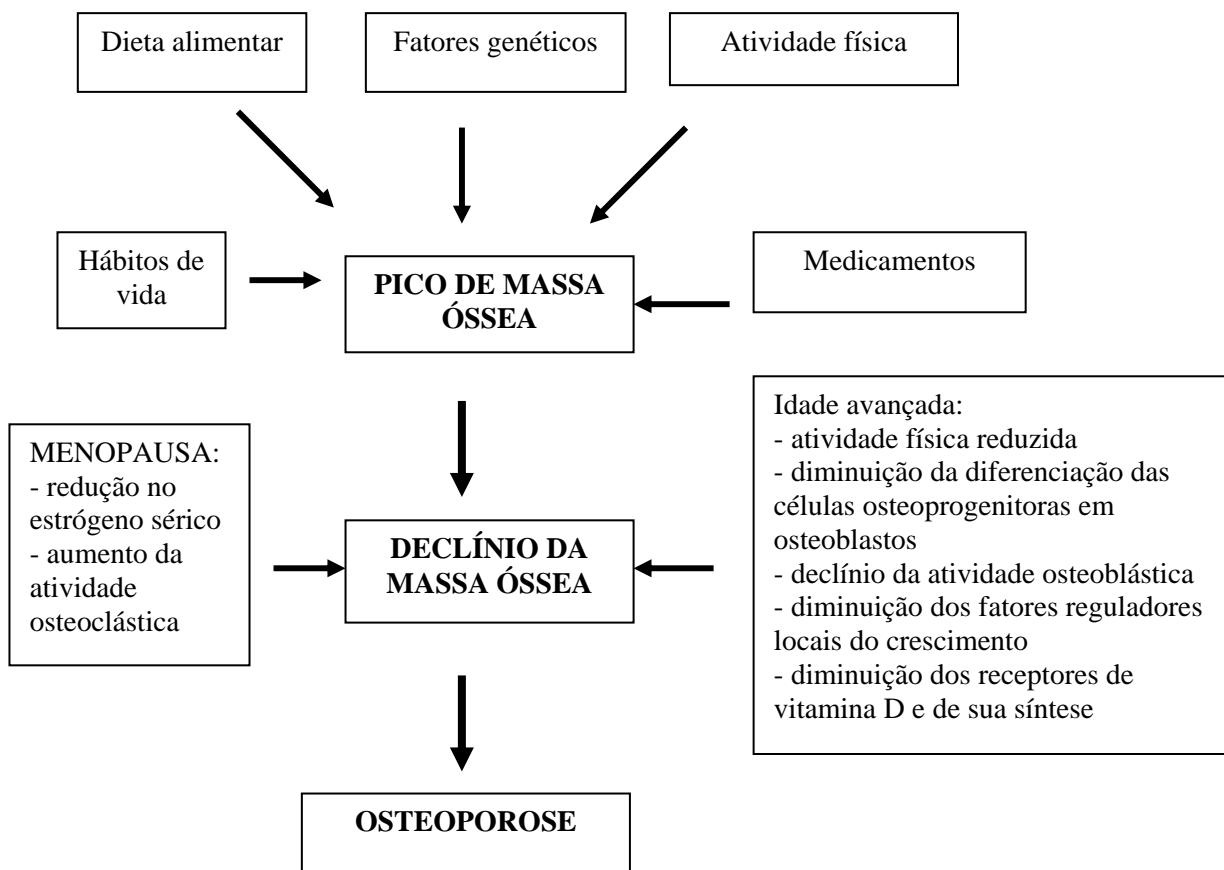
No entanto, muitas mulheres não apresentam significativa perda de massa óssea durante os anos após a menopausa e talvez 25% a 30% das mulheres não experimentem qualquer fratura ao longo de sua vida. Estas mulheres, provavelmente atingiram alto pico de massa óssea antes da menopausa, e, ou sofrem menos perda óssea após a menopausa (WASNICH, 1999).



**Figura 1** – Microfotografias do osso trabecular normal (a) e osteoporótico (b) (MARQUES NETO et al., 1995).

A osteoporose está principalmente relacionada com a deficiência do hormônio ovariano nas mulheres pós-menopausa (JOHNELL, 1996). O estrógeno tem efeito direto supressivo sobre a atividade osteoclástica. Normalmente, os receptores de estrógeno estão presentes nos osteoblastos. Quando o estrógeno se liga aos seus receptores, mediadores químicos são secretados, inibindo a atividade dos osteoclastos (IQBAL, 2000). O estrógeno protege o osso contra a ação do PTH e interfere no aumento da síntese e secreção de diversos agentes que influenciam a formação óssea (LINDSAY, 1995).

A figura 2 mostra um esquema sobre os diversos fatores que interferem no desenvolvimento da osteoporose.



**Figura 2** – Fatores que interferem na osteoporose (NETO e FERNANDES, 2001).

Os roedores estão entre os modelos animais mais utilizados na pesquisa de osteoporose, sendo o rato, certamente, o mais utilizado. Entretanto outros animais como primatas, cães, aves e coelhos também têm sido amplamente utilizados. Além destes, o camundongo aponta como uma perspectiva promissora neste cenário da pesquisa. O rato tem sido usado há décadas na pesquisa experimental da osteoporose e importantes contribuições têm sido alcançadas com seu uso como modelo desde o final da década de 1950, quando estudos com este animal demonstraram a habilidade do osteoclasto em digerir tecido ósseo (SZEJNFELD, 2000).

Estudos experimentais demonstraram que o osso do rato assim como o do homem, não cresce continuamente durante a sua vida. Em ratas, ocorre um rápido crescimento até seis meses de idade. Observa-se também um aumento rápido do comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio no fêmur de um a três meses de idade; depois deste período, a razão de crescimento torna-se mais gradual. De seis a doze meses o crescimento é insignificante e cessa aos dezoito meses (KALU, 1991).

### **2.2.1 – Fatores de risco**

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da osteoporose. A idade, o sexo e a raça estão entre os principais determinantes da massa óssea e do risco de fraturas. Além disso, quanto maior a sobrevivência do indivíduo, maior é o risco de desenvolver osteoporose (SZEJNFELD, 2001).

Mulheres são mais suscetíveis à osteoporose do que homens, pois além de apresentarem perda óssea importante durante a menopausa, possuem menor densidade mineral óssea (RIGGS e MELTON, 1986) e terem ossos mais finos e mais leves, têm maior expectativa de vida, portanto estão mais tempo sob risco (SZEJNFELD, 2001). Vale ressaltar que as fraturas vertebrais são sete vezes mais comuns em mulheres que em homens, tendendo a ocorrer duas décadas após a menopausa (MEINÃO et al., 1998).

Fatores genéticos também são responsáveis pelas variações na massa óssea em diferentes grupos étnicos e raciais. As mulheres brancas possuem baixos índices de pico de massa óssea na idade adulta e apresentam maior prevalência de osteoporose. Estima-se que 30% de todas as mulheres brancas na pós-menopausa terão pelo menos uma fratura osteoporótica durante a vida, incidência que aumenta com a idade avançada. A incidência de fraturas de fêmur em mulheres brancas é duas vezes maior do que em mulheres negras (SZEJNFELD, 2001).

Além disso, o histórico de fraturas na família, baixo nível de cálcio ou vitamina D, uso excessivo de álcool, baixo índice de massa óssea no corpo, tabagismo, alta ingestão de cafeína, estilo de vida sedentário ou imobilização e uso contínuo de corticosteróide, anticonvulsivante, tiroxina ou heparina (LENCHIK e SARTORIS, 1997, MARQUES NETO et al., 1995) também contribuem para o desenvolvimento da osteoporose.

### **2.2.2 – Prevenção e tratamento da osteoporose**

A prevenção da osteoporose é a ação mais importante, uma vez que não existe uma medida efetiva para restaurar a qualidade do osso osteoporótico. A abordagem para a prevenção inclui maximizar o pico de massa óssea e reduzir a perda óssea associada à pós-menopausa e à idade. As medidas de prevenção consistem em: ingestão adequada de cálcio, exercício físico, evitar tabagismo e excesso de álcool, terapia de reposição

hormonal na pós-menopausa, ou quando houver contra-indicações à terapia de reposição hormonal, usar outras opções terapêuticas, como bifosfonatos; suplementação de vitamina D nos idosos, estratégias para redução de queda nos idosos entre outras (CORONHO et al., 2001).

A intervenção terapêutica tem como objetivo específico a prevenção de fraturas, estabilizar ou alcançar um aumento moderado na massa óssea e maximizar a função física.

### **2.2.2.1 – Cálcio e vitamina D**

Muitos estudos têm demonstrado que com o avançar da idade ocorre declínio na absorção de cálcio por deficiência de vitamina D e ou redução renal da atividade da 1- $\alpha$  hidroxilase. Sabe-se que o consumo de quantidades adequadas de cálcio é importante para manutenção da massa óssea. Os ossos são considerados reservas de cálcio, contendo 99% de todo cálcio do organismo. O cálcio é essencial para toda célula do corpo, incluindo coração, nervos e músculos (CARVALHO et al., 2002).

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel, formada por um grupo de compostos que possuem atividade anti-raquitismo, cujos principais compostos são o ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) e o colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>). O ergocalciferol, um esteróide encontrado em vegetais, é derivado do ergosterol, por ação de raios ultravioleta. O colecalciferol é sintetizado pela ação da luz solar sobre a pró-vitamina D<sub>3</sub>, o 7-deidrocolesterol, encontrado na pele de animais (HOLICK, 1994). As vitaminas D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> possuem o mesmo potencial biológico em humanos (HOLICK, 1996) e são comumente denominadas vitamina D.

As principais funções da vitamina D são a manutenção da homeostase do cálcio e do fósforo no organismo e a mineralização dos ossos. Essa vitamina também atua em outros tecidos-alvo, não relacionados com a homeostase do cálcio (PENTEADO, 2003).

A vitamina D também é importante para o osso, por facilitar a absorção de cálcio e de fósforo, essenciais ao metabolismo ósseo. A deficiência de vitamina D acarreta redução da absorção de cálcio e conseqüente aumento dos níveis de PTH, o que promove aumento da reabsorção óssea (CARVALHO et al., 2002). Nos ossos, a maior função biológica da vitamina D ativa é aumentar a mobilização de estoques de cálcio, quando a ingestão desse mineral é inadequada, atuando na manutenção dos níveis

normais de cálcio no sangue e na reabsorção óssea (LAL et al., 1999; SUDA et al. 1992; COLLINS e NORMAN, 1991).

Tem sido demonstrado que uma adequada ingestão de cálcio é benéfica para a massa óssea em qualquer idade. O aumento da ingestão de cálcio maximiza o pico da massa óssea e reduz a perda óssea na pré-menopausa. A perda óssea nos primeiros três anos da pós-menopausa é dependente das alterações hormonais e é difícil prevenir sem a terapêutica de substituição hormonal. No entanto, um estudo demonstrou que a perda óssea de 2% por ano, verificada no início da pós-menopausa, pode ser reduzida para 0,8% por ano apenas com a suplementação de cálcio, o equivalente a uma redução de 40% (CUMMING, 1990).

De acordo com NIEVES et al. (1998), a suplementação de cálcio na pós-menopausa reduz a perda óssea vertebral em cerca de 40%, e minimiza a perda óssea no antebraço e no colo do fêmur. Outros estudos na pré-menopausa também demonstraram que a suplementação diária com sais de cálcio nas doses de 1 grama (PRINCE et al., 1991) e 1,7 gramas (ALOIA et al., 1994) reduzem a perda óssea.

Um estudo realizado em mulheres com mais de 60 anos de idade com fraturas vertebrais e que apresentavam ingestão inferior a 1.000 mg de cálcio por dia, demonstrou que a suplementação diária com 1.200 mg de cálcio durante quatro anos evitou a perda óssea do antebraço, e reduziu em 59% as novas fraturas vertebrais (RECKER et al., 1996).

Foi realizado um estudo comparando os resultados da administração de estrogênios orais na presença e na ausência de suplementação de cálcio. Nos ensaios clínicos em que houve modificação da dieta ou suplementação de cálcio a quantidade total diária de cálcio ingerida foi de 1.183 mg, enquanto que naqueles em que não houve intervenção foi de 563 mg por dia. O aumento anual médio da massa óssea nas pacientes submetidas à terapia de reposição hormonal, sem suplementação de cálcio, foi a nível vertebral de 1,3%, do colo do fêmur de 0,9%, e do antebraço de 0,4%. Quando a terapia hormonal foi acompanhada por ingestão de cálcio observou-se um aumento da massa óssea superior à soma das partes: 3,3%, 2,4% e 2,1%, respectivamente. Estes resultados demonstram que a suplementação de cálcio potencializa os benefícios da terapia estrogênica sobre a massa óssea ao nível da coluna lombar, do colo do fêmur e do antebraço (NIEVES et al., 1998).

Juntamente com o PTH, a vitamina D exerce papel fundamental na regulação da concentração extracelular de cálcio. Sua ação primordial é no trato digestivo

aumentando a absorção intestinal de cálcio e fósforo. Através de receptores nucleares encontrados no intestino delgado, a vitamina D aumenta a síntese de proteínas envolvidas no transporte de cálcio através da mucosa intestinal. No osso, fisiologicamente atua de forma permissiva na mineralização da matriz protéica óssea. Frente a níveis reduzidos de cálcio na dieta, sua ação no osso passa a ser indutora da reabsorção óssea, atuando na manutenção dos níveis normais de cálcio no sangue (MILLER e PORTALE, 1999, LAL et al., 1999; SUDA et al., 1992).

Nos indivíduos deficientes dessa vitamina, a suplementação aumenta a massa óssea e diminui o risco de fraturas. Conseqüentemente, nesses casos recomenda-se suplementação de 400 a 800 UI/dia (LANE e NYDICK, 1999).

Diversas situações podem estar associadas à hipovitaminose D, tais como a ingestão reduzida da vitamina D, a reduzida exposição ao sol por razões culturais ou por doença cutânea, a doença crônica hepática ou renal, ou a ingestão de fármacos que reduzam a ativação ou acelerem a depuração da vitamina D, tais como a fenitoína, a carbamazepina, o fenobarbital e a rifampicina (HARRIS et al., 1999).

Um grande estudo epidemiológico mostrou que o tratamento com a vitamina D foi associado com uma redução em 55% das fraturas de quadril nas mulheres idosas com um reduzido índice de massa corporal ( $< 20 \text{ kg/m}^2$ ), sugerindo a necessidade de todas as mulheres idosas serem tratadas com esta vitamina (RANSTAM e KANIS, 1995). Os resultados deste estudo evidenciam a importância de todas as mulheres pós-menopausa receberem doses adequadas de vitamina D. Atualmente parece haver consenso em considerar a dose diária de 200 UI de vitamina D como insuficiente na pós-menopausa. DAWSON-HUGHES et al. (1995) demonstraram que nesta dosagem a vitamina D limita a perda óssea da coluna e do total do esqueleto, mas é inadequada para minimizar a perda óssea do colo do fêmur.

Um outro estudo realizado em 389 mulheres e homens, com pelo menos 65 anos de idade, demonstrou que a suplementação diária com 500 mg de cálcio e 700 UI de vitamina D<sub>3</sub> durante três anos reduziu a perda óssea no fêmur, na coluna e na totalidade do esqueleto, assim como a incidência de fraturas não-vertebrais (DAWSON-HUGHES et al., 1997). Os resultados deste estudo sugerem que o benefício da suplementação com cálcio e vitamina D é clinicamente importante na prevenção da fratura, por isso é recomendada a sua utilização na redução da perda óssea em indivíduos idosos em ambulatório (LEVINSON e ALTKORN, 1998; STRAUS, 2001).

## 2.2.2.2 – Drogas que inibem a reabsorção óssea

### 2.2.2.2.1 – Bifosfonato

Os bifosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato, potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Estes compostos são extensivamente utilizados no tratamento de várias doenças ósseas, destacando-se a doença de Paget, a hipercalcemia maligna, a osteoporose e a doença metastática e osteolítica (RUSSO, 2001; FERNANDES et al., 2005).

Entre os vários compostos denominados bifosfonatos destacam-se o alendronato, etidronato, pamidronato, clodronato, ibandronato, tiludronato, zoledronato e risedronato. Todos os bifosfonatos reduzem a excreção urinária dos marcadores bioquímicos da remodelação óssea (CORONHO et al., 2001).

O mecanismo de ação dos bifosfonatos pode estar relacionado à capacidade de se fixarem na matriz óssea, pois apresentam uma alta afinidade na ligação aos cristais de hidroxiapatita; com isso são assimilados pelos osteoclastos e, em seguida, inibindo sua ação (RIBEIRO e VOLPATO, 2005). A ligação de bifosfonatos aos minerais do tecido ósseo leva à supressão da reabsorção óssea induzida por osteoclastos tendo uma ação direta mediada por osteoblastos com atividade anti absorptiva (SAHNI et al., 1993; VITTE et al., 1996).

O alendronato, bifosfonato de terceira geração, foi amplamente estudado e, devido aos resultados obtidos, é um dos componentes mais utilizados para o tratamento da osteoporose (CORONHO et al., 2001). Esta droga reduz significativamente a incidência de todas as fraturas clínicas em pacientes com história de fraturas vertebrais (DELMAS, 2001). Um estudo recente demonstrou que o tratamento com alendronato por três anos consecutivos aumentou a densidade mineral óssea vertebral e reduziu o risco de fraturas vertebrais em mulheres orientais na pós-menopausa com osteoporose (KUSHIDA et al., 2004).

A apoptose, ou morte celular programada, foi descrita em osteoclastos há muitos anos e talvez seja a via normal de morte dessas células (RODAN, 1998). O tempo de vida dos osteoclastos, estimado a partir de estudos histológicos, é de duas a quatro semanas *in vivo* e de no máximo duas semanas *in vitro*. Já foi descrito que os bifosfonatos aumentam a apoptose de osteoclastos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HUGHES et al., 1995).

Os bifosfonatos contendo nitrogênio como o risedronato, alendronato, pamidronato e ácido zoledrônico e os não nitrogenados como clodronato e etidronato causam apoptose de osteoclastos em coelhos. A apoptose dos osteoclastos estaria envolvida em trocas morfológicas, perda da membrana mitocondrial e ativação de proteases caspase-3, capazes de clivar substratos peptídicos (BENFORD et al., 2001).

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

LIBERMAN et al. (1995) estudaram o efeito do uso de alendronato de sódio em diferentes doses em 994 mulheres na pós-menopausa com idade de 45 a 80 anos, com baixa densidade mineral óssea (-2,5 T-score), demonstrando a redução de 21% das fraturas não vertebrais. Um extenso estudo denominado FIT foi realizado visando especificamente examinar o efeito da droga em pacientes com alto risco clínico de desenvolver fraturas e em pacientes com fraturas comprovadas radiologicamente. O estudo conhecido como FIT 1, com duração de três anos, demonstrou um aumento médio da densidade mineral óssea de coluna lombar de 8,8% e do fêmur na ordem de 5,9%. Observou-se uma redução de fraturas vertebrais na ordem de 50% e, naqueles pacientes com uma ou mais fraturas pré-existentes, a redução foi de 90%. No FIT 2 (realizado em 30 centros internacionais), envolvendo 4.432 mulheres na pós-menopausa com a idade entre 54 e 81 anos com T-score < -1,6 no colo do fêmur, sem fraturas prévias vertebrais, observou-se que os pacientes que obtiveram melhor resultado em termos de ganho de massa óssea (aumento da densidade mineral óssea) foram aqueles que se encontravam no quartil inferior de densidade mineral óssea. A redução de fraturas de colo do fêmur foi na ordem de 43% no grupo que utilizou a dose diária de 10mg. Efeitos colaterais foram observados em baixos índices (3% de casos de esofagite).

Além disso, um estudo mostrou que o uso de etidronato em mulheres com osteoporose na pós-menopausa, na dose de 400 mg/dia durante duas semanas, seguido por suplementação de cálcio (500 mg/dia por três meses), com repetição do ciclo a cada três meses durante três anos, proporcionou um ganho de massa óssea vertebral de 5% e redução de risco de fraturas vertebrais (CORONHO et al., 2001).

Estudos realizados com o risedronato, na dose de 5mg diários, revelou excelentes resultados em termos de ganho de densidade mineral óssea, redução de

fraturas e capacidade de prevenir a perda de massa óssea em homens em uso de corticosteróides (REGINSTER et al., 2000).

DA PAZ et al. (2001) avaliaram o efeito do 17  $\beta$ -estradiol e do alendronato na prevenção da perda óssea em ratos ovariectomizados. Os animais receberam por via subcutânea 17  $\beta$ -estradiol na dose de 30  $\mu$ g/kg de peso corporal ou alendronato na dose de 0,1 mg/kg de peso corporal. Após 6 semanas de tratamento houve uma redução significativa na densidade mineral óssea no osso trabecular (fêmur distal) nos ratos ovariectomizados. Tanto o alendronato quanto o 17  $\beta$ -estradiol aumentaram a densidade mineral óssea, sendo que esse efeito foi mais pronunciado nos animais que receberam alendronato. A histomorfometria do fêmur distal mostrou uma redução no volume trabecular no grupo ovariectomizado, e um aumento nos dois grupos tratados, principalmente no grupo que recebeu alendronato. Entretanto, aumento na espessura trabecular só foi observado no grupo que recebeu 17  $\beta$ -estradiol. Além disso, houve uma redução nos níveis séricos de osteocalcina e de deoxipiridinolina nos dois grupos tratados. Embora ambas as drogas fossem eficazes em inibir perda óssea, o alendronato, na dose utilizada, apresentou melhores resultados no que se refere ao aumento da massa óssea.

#### **2.2.2.2.2 – Calcitonina**

A calcitonina é um polipeptídeo hormonal com 32 aminoácidos, secretado principalmente pelas células G da tireóide e está relacionado à manutenção dos níveis normais de cálcio plasmático e à proteção do osso contra a desmineralização. Elevações agudas dos níveis de cálcio plasmático estimulam a secreção de calcitonina, que, por sua vez, exerce seu efeito hipocalcemiante inibindo a ação dos osteoclastos na reabsorção óssea e retardando a absorção intestinal de cálcio (COIFMAN et al., 1997).

Devido às suas propriedades antiosteoclásticas, antiinflamatória e analgésica, tem sido amplamente empregada no tratamento de distúrbios clínicos e biológicos caracterizados por excessiva remodelação óssea, como osteoporose pós-menopausa, doença de Paget e hipercalcemia maligna (CARSTENS JR e FEINBLATT, 1991; RICO et al., 1995).

Sabe-se que a calcitonina é usada como inibidor da reabsorção óssea osteoclástica, proporcionando um aumento discreto na densidade mineral óssea. O

mecanismo de ação da calcitonina é a redução da atividade do osteoclasto; portanto, não altera o seu número. A sua ação se faz através de um receptor específico do osteoclasto (STOCK et al., 1997; CORONHO et al., 2001).

Um estudo com calcitonina intranasal, na dose de 200 UI/dia, de cinco anos de duração, duplo-cego, randomizado, controlado com placebo em mulheres na pós-menopausa com uma ou mais fraturas vertebrais, mostrou uma redução no risco de novas fraturas vertebrais de 36%. Não houve redução no risco de fraturas extravertebrais (STOCK et al., 1997).

Estudo realizado em pacientes utilizando 100 UI de calcitonina sintética de salmão associada a 500 mg de cálcio elementar quando comparado com um grupo utilizando apenas cálcio mostrou que os pacientes que utilizaram calcitonina sofreram apenas um sexto de fraturas vertebrais (RICO et al., 1992).

#### **2.2.2.2.3 – Estrógenos**

Os estrógenos são hormônios que promovem as características femininas, controle reprodutivo e gravidez, influenciam a pele, os ossos, sistema cardiovascular e imunidade (TAPIERO et al., 2002). Esses hormônios desempenham um papel importante na regulação do metabolismo ósseo. Os estrógenos, bem como os andrógenos têm mostrado inibir os osteoblastos de liberar fatores de estimulação local da osteoclastogênese. Todavia, redução na concentração desses hormônios na circulação aumenta a formação de precursores de osteoclastos no osso e assim o número de osteoclasto maduro (JILKA et al., 1992; WEINSTEIN et al., 2000). O estrógeno também induz a expressão do gene que codifica a síntese dos receptores para progesterona nos osteoblastos e, mediado por esse mecanismo, postula-se que ele estimularia indiretamente a síntese de matriz óssea (RICKARD et al., 2002).

Recentemente foi comprovado que a OPG, um membro da família de receptores para o fator  $\alpha$  de necrose tumoral presente nos osteoblastos, inibe a reabsorção óssea por impedir a diferenciação e a atividade dos osteoclastos (NAKAMURA et al., 2002; HAYNES et al., 2001). O estrógeno estimula a síntese de OPG e postula-se que essa seja uma das explicações pela qual a ação principal do estrógeno sobre o osso seja a de inibir a reabsorção óssea (LIAO et al., 2002).

O estrógeno estimula a produção de calcitonina, que previne a remoção de cálcio do osso (RICHART e LINDSAY, 1984). O osso trabecular tende a ser mais

sensível do que osso cortical a variações nos níveis de estrógeno. A redução dos níveis de estrógeno tem sido relacionada à alta incidência de fraturas vertebrais. Vale lembrar que as vértebras são constituídas primariamente de osso trabecular (RIGGS e MELTON, 1983).

### **2.2.2.3 – Drogas que estimulam a formação óssea**

#### **2.2.2.3.1 – Fluoreto**

O flúor (fluoreto de sódio e monofluorofosfato) é um potente estimulador da formação de osso trabecular. No entanto, a dose efetiva é muito próxima da dose tóxica e há controvérsias a respeito da qualidade do osso formado, pois pode haver formação de osso fluorado, o que limita sua utilização. Também existem relatos de osteomalácia associada ao seu uso. Para minimizar os efeitos citados acima, o flúor deve ser administrado associado ao cálcio e à vitamina D. Outros efeitos colaterais incluem náuseas, vômitos, epigastralgia, diarreia, melena e artralgia. A dose recomendada é de 0,5 a 1 mg/kg/dia, porém são necessários maiores estudos clínicos que comprovem sua eficácia no tratamento da osteoporose. No Brasil, sua forma isolada não está disponível comercialmente, podendo ser utilizado na forma de polivitamínicos (SZEJNFELD, 1995; PINTO NETO et al., 2002).

Estudos realizados por FARLEY et al. (1983) demonstraram que os fluoretos podem influenciar diretamente a atividade das células osteoblásticas. Estes autores observaram que concentrações micromolares de fluoretos aumentam a proliferação e a atividade de fosfatase alcalina em células ósseas derivadas de embrião de galinha. Além disso, observou-se que fluoreto aumenta o crescimento e a mineralização da cultura óssea. Observações similares foram encontradas em células ósseas humanas derivadas do osso trabecular de cabeça de fêmur (WERDEGAL et al., 1988). A fosfatase alcalina é um marcador de formação óssea.

Entretanto, outros estudos utilizando fluoretos têm demonstrado resultados negativos sobre a proliferação de osteoblastos humanos. Os autores sugerem que esses resultados ocorrem porque os osteoblastos derivados de ossos de animais experimentais ou pacientes osteoporóticos tratados com fluoreto exibem uma maior capacidade para proliferar *in vitro*, com isso conclui-se que, *in vivo*, o fluoreto pode atuar indiretamente sobre a síntese local de alguns fatores de crescimento ou exercer uma ação preferencial

sobre a subpopulação de células osteoblásticas. Com relação a esta hipótese, foi sugerido que precursores de osteoblastos são mais sensíveis à ação de fluoreto que osteoblastos maduros (CAVERZASIO et al., 1998).

Em adição ao seu efeito mitogênico sobre células como osteoblastos, o fluoreto tem mostrado influenciar o processo de diferenciação e formação das células ósseas. Muitos estudos têm mostrado um aumento na atividade da fosfatase alcalina em células osteoblásticas em resposta ao fluoreto (CAVERZASIO et al., 1998). Além disso, efeito estimulatório sobre a produção de osteocalcina foi observado em células estromais derivadas de medula humana (KASSEM et al., 1994). Estas observações estão de acordo com estudos *in vivo* indicando um aumento na formação óssea em indivíduos tratados com fluoreto com um correspondente aumento desses dois marcadores da diferenciação de células osteoblásticas. Estudos também têm demonstrado que fluoreto aumenta seletivamente o transporte de fosfato inorgânico dependente de sódio em células osteoblásticas. Não obstante, estudos *in vitro* demonstraram que a presença de fosfato inorgânico aumenta a resposta mitogênica induzida por fluoreto em cultura de células de galinha (CAVERZASIO et al., 1998).

#### **2.2.2.3.2 – Paratormônio**

O PTH é um hormônio polipeptídico com 84 aminoácidos sintetizado nas glândulas paratireóides a partir de um precursor, o pré-pró-paratormônio, sendo um dos responsáveis pelo controle da calcemia e o mais importante na regulação das alterações agudas das concentrações extracelulares de cálcio. A seqüência dos primeiros 34 aminoácidos na extremidade amino-terminal é responsável pela sua atividade biológica. Além da molécula intacta do PTH, são secretados fragmentos amino-terminais, carboxi-terminais e a sua porção média (POTTS, 2001, BRACCO et al., 2003).

Após a sua síntese, o PTH permanece armazenado em vesículas de secreção e pode ser metabolizado no meio intracelular, sendo que os fragmentos amino-terminais são degradados e os fragmentos carboxi-terminais de tamanhos variados são liberados para a circulação, juntamente com a forma ativa (MARX, 2000). O PTH tem uma meia vida de aproximadamente 2 minutos, sendo que a sua metabolização ocorre na maior parte no fígado (70%), rins (20%) e em menor quantidade em outros tecidos, como o tecido ósseo (POTTS, 2001). Os fragmentos carboxi-terminais, entretanto, são

excretados pelo rim e possuem meia-vida mais prolongada, com efeito biológico ainda não esclarecido (GRACITELLI et al., 2002).

Uma elevação dos níveis plasmáticos de PTH está envolvida na fisiopatologia da perda óssea na osteoporose senil, como consequência da deficiência de vitamina D (RIGGS et al., 1998).

A ação do PTH se dá diretamente no rim e no osso e indiretamente no trato digestivo, sempre resultando em incremento dos níveis séricos de cálcio. No rim, através de receptores específicos nos túbulos contorcidos distais, o PTH determina a reabsorção de cálcio e magnésio e a excreção de fosfato e bicarbonato. Este órgão é particularmente responsável pelos ajustes mais rápidos da calcemia (POTTS, 2001).

No osso, age sobre a reabsorção, regulando a liberação de cálcio e fosfato para o líquido extracelular. Embora os osteoclastos sejam os responsáveis por essa última ação, diferentemente dos osteoblastos, essas células não possuem receptores específicos para o PTH. Portanto, a reabsorção óssea osteoclástica estimulada pelo PTH decorre da liberação de fatores parácrinos pelos osteoblastos, ou ainda pelo estímulo de expressão de proteínas de membrana nos osteoblastos, que estimulam o amadurecimento e atividade dos osteoclastos (POTTS, 2001). As ações do PTH no osso variam de acordo com as suas concentrações plasmáticas. Em níveis fisiológicos, esse hormônio tem um efeito ósseo anabólico. A secreção intermitente do PTH associa-se com aumento do osso trabecular e cortical em ratas (GUINNESS-HEY e HOCK, 1984) e com a manutenção e/ou aumento da massa óssea trabecular em humanos (ROSEN e DONAHUE, 1996). Já a sua secreção contínua e/ou aumentada apresenta efeito catabólico, ocorrendo perda de massa óssea como, por exemplo, pode ser observado no hiperparatireoidismo primário sintomático.

No trato digestivo, o PTH controla indiretamente a absorção intestinal de cálcio e fósforo, através da regulação da atividade da enzima 25(OH)D-1 $\alpha$ -hidroxilase renal e consequente síntese de vitamina D (BROWN et al., 1993).

As concentrações de cálcio ionizado no líquido extracelular são os principais determinantes da secreção do PTH. Modificações dos níveis séricos de cálcio resultam em respostas rápidas da secreção desse hormônio. A detecção de variações na calcemia ocorre através de sensores de cálcio presentes nas paratireóides, que consistem em receptores protéicos localizados na superfície da membrana das células principais (BROWN et al., 1993).

As ações diferenciadas do PTH sobre a formação e reabsorção óssea têm sido intensamente estudadas e novos aspectos sobre sua ligação com o receptor e as vias de sinalização intracelular nos osteoblastos têm sido descritas. Os receptores de PTH foram identificados no tecido ósseo, nos osteoblastos e nos seus precursores, as células progenitoras pluripotentes de linhagem mesenquimal (SWARTHOUT et al., 2002). Nos osteoclastos ou em seus precursores não se identificou até o momento nenhum receptor de PTH, o que nos leva a concluir que todos os efeitos desse hormônio sobre a reabsorção óssea são intermediados pelos osteoblastos (STREWLER, 2001).

Ao mesmo tempo que o PTH estimula a reabsorção óssea para manter as concentrações plasmáticas de cálcio, já mantém garantida a recuperação deste tecido ósseo pelos osteoblastos, mantendo o equilíbrio entre formação e reabsorção (CALVI et al., 2001).

A ativação dos osteoblastos pelo PTH resulta na expressão de genes importantes para a degradação da matriz, a produção de fatores de crescimento e a estimulação e recrutamento dos osteoclastos. Seus efeitos biológicos conhecidos se fazem através de um receptor de membrana acoplado à proteína G. A maioria dos efeitos sobre os osteoblastos é mediada pelo receptor acoplado à proteína Gs, que estimula a adenil-ciclase elevando as concentrações de AMPc e o sistema da proteína-quinase A, enquanto que o receptor acoplado à proteína Gq ativa a fosfolipase C, a proteína-quinase C e o metabolismo dos inositóis-fosfatos. O equilíbrio entre esses dois sistemas permite o efeito biológico global do PTH (GOLTZMAN, 1999).

### **2.3 – As estatinas e o metabolismo ósseo**

As estatinas são inibidoras por competição da HMG-CoA redutase, enzima implicada na conversão de acetato em ácido mevalônico na cadeia de reações químicas, que ocorrem para a síntese de colesterol. Com a redução da quantidade de colesterol formado no hepatócito ocorre maior síntese de receptores de membrana que captam lipoproteínas ricas em colesterol, as quais se reduzem na circulação (WITZTUM, 1995; MAEDA et al., 2003). Portanto essas drogas são utilizadas na redução dos níveis de colesterol no sangue e na prevenção de doenças cardiovasculares. Dentre os vários compostos denominados estatinas incluem a atorvastatina, a fluvastatina, a pravastatina, a mevastatina e a simvastatina.

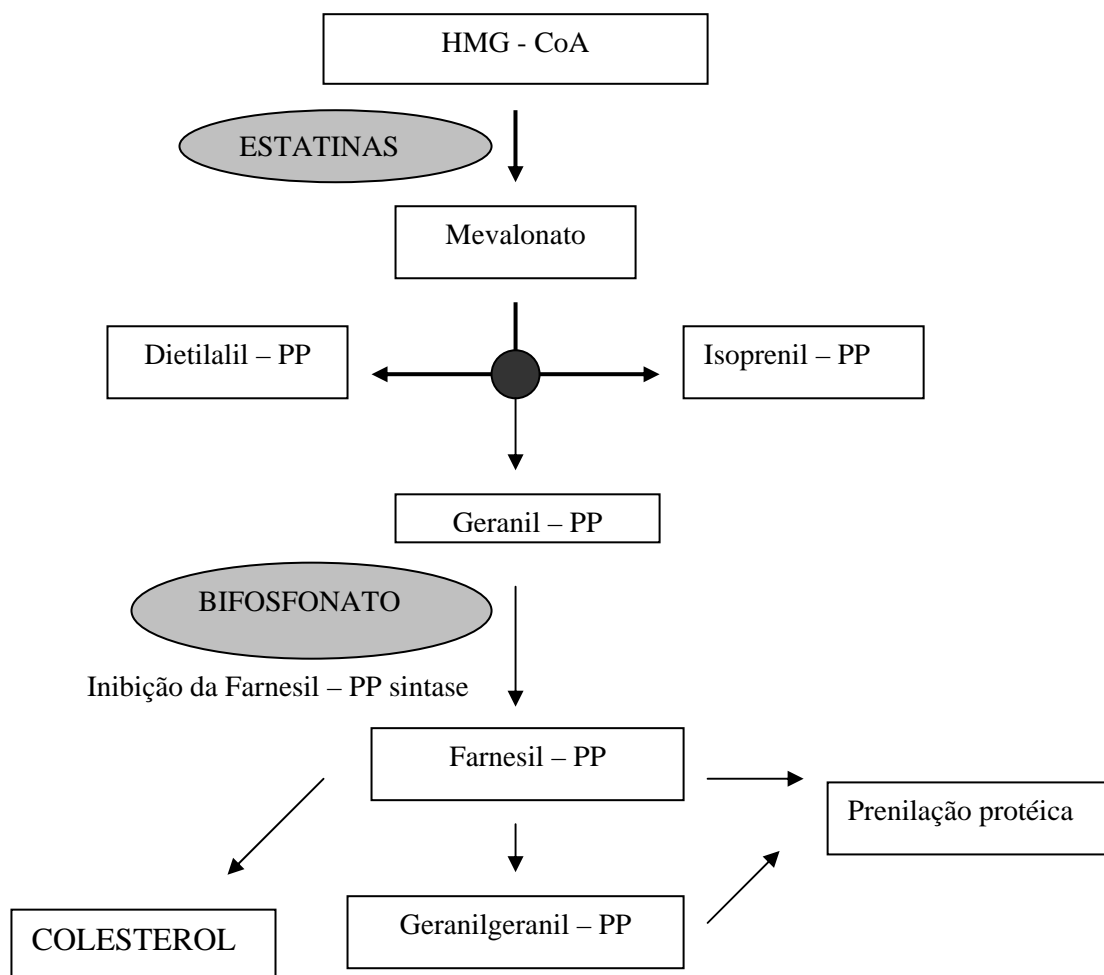
Alguns pesquisadores acreditam que as estatinas possam, também, ter uma ação sobre o tecido ósseo, agindo nos osteoclastos, reduzindo a reabsorção e nos osteoblastos, aumentando a formação óssea (WADA et al., 2000).

Recentemente as estatinas estão sendo relacionadas aos efeitos protetores na perda óssea. Entretanto, os mecanismos pelos quais as estatinas podem afetar o metabolismo ósseo são pouco esclarecidos. VIREECK et al. (2005) avaliaram o efeito da atorvastatina na produção RANKL e da OPG, os quais são essenciais para a biologia celular dos osteoclastos. Enquanto RANKL aumenta a formação e a ativação do osteoclasto, desse modo, promovendo a perda óssea, a OPG age como um receptor solúvel e antagoniza os efeitos do RANKL. Em osteoblastos humanos, a atorvastatina aumentou os níveis de RNA mensageiro de OPG e a secreção dessa proteína, sendo que o máximo de efeito ocorreu na dose de 10(-6) M. Os experimentos indicaram que o efeito estimulatório dose-dependente da atorvastatina sobre os níveis de RNA mensageiro de OPG ocorre após 24 horas e sobre a secreção de OPG, após 48 a 72 horas. Além disso, a atorvastatina anulou o efeito inibitório dos glicocorticóides sobre a produção de OPG. O tratamento com atorvastatina em osteoblastos humanos aumentou a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica, osteocalcina e fosfatase alcalina. Os dados sugerem que a atorvastatina aumenta a diferenciação osteoblástica e a produção de OPG, o que pode contribuir para a redução da perda óssea.

A ação das estatinas sobre os osteoclastos não está ainda bem estabelecida. Sabe-se que as estatinas atuam numa etapa da síntese de colesterol, bloqueando a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico. A partir disto, acredita-se que a formação de geranyl pirofosfato e farnesil pirofosfato, metabólitos posteriores nesta cascata, ficaria deficiente, inibindo a prenilação de proteínas (inclusão de um grupo prenil lipídico na proteína). A prenilação é fundamental na regulação do metabolismo dos osteoclastos e sua inibição resulta em maior apoptose dessas células. Esta hipótese foi levantada baseando-se na ação dos bisfosfonatos sobre o metabolismo do colesterol. Os bisfosfonatos inibem diretamente a síntese de farnesil pirofosfato, impedindo a prenilação das proteínas e, conseqüentemente, reduzindo a reabsorção óssea (Figura 3) (CUMMINGS e BAUER, 2000; ROGERS, 2004).

TANRIVERDI et al. (2005) avaliaram o efeito de risedronato isoladamente (5 mg/dia) e risedronato (5 mg/dia) em associação com a atorvastatina (20 mg/dia) em 120 mulheres hipercolesterolêmicas na pós menopausa, com osteoporose ou osteopenia. Após seis meses de terapia, os pesquisadores observaram que o grupo que recebeu o

risedronato em associação com a atorvastatina apresentou aumento significativamente maior na densidade mineral óssea da coluna lombar (1,58% contra 0,75%,  $p < 0,05$ ), mas não encontraram nenhuma diferença na densidade mineral óssea do quadril. Além disso, a terapia com o risedronato em associação com a atorvastatina melhorou o perfil lipídico no soro (LDL e colesterol total). Os autores concluíram que as estatinas apresentam efeitos aditivos modestos em relação aos bifosfonatos em melhorar a densidade mineral óssea da coluna lombar em mulheres hipercolesterolêmicas na pós-menopausa com osteoporose ou osteopenia, mas relatam a necessidade de se realizar novos estudos em longo prazo com tamanho de amostra adequado para avaliar os efeitos da estatina isoladamente ou em associação, no metabolismo ósseo, com objetivo de prevenir o desenvolvimento de fraturas.



**Figura 3** – Mecanismo de ação das estatinas e bifosfonatos na cascata da prenilação de proteínas (BRAGA JR et al., 2002).

Pesquisadores avaliaram o efeito da atorvastatina sobre a densidade mineral óssea de ratos ovariectomizados com oito semanas de idade. Seis semanas após a realização da cirurgia os animais receberam veículo, atorvastatina, 17  $\beta$ -estradiol e o PTH humano. O tratamento com o 17  $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ g/kg) por 12 semanas aumentou significativamente a densidade mineral óssea lombar, enquanto a atorvastatina (2 mg/kg) não apresentou nenhum efeito. A combinação da atorvastatina com o 17  $\beta$ -estradiol aumentou significativamente a densidade mineral óssea da vértebra lombar e da área de metáfise femural quando comparada com os grupos que receberam 17  $\beta$ -estradiol ou da atorvastatina isoladamente. Baixas dosagens de PTH humano (1  $\mu$ g/kg) não alteraram a densidade mineral óssea lombar ou femural, enquanto doses mais elevadas (17,5  $\mu$ g/kg) aumentaram significativamente a densidade mineral óssea. A administração de atorvastatina em associação com PTH humano (1-34) (1  $\mu$ g/kg) durante oito semanas aumentou significativamente a densidade mineral óssea da vértebra lombar e da área de metáfise do fêmur. Estes resultados demonstraram que a administração crônica de atorvastatina parece aumentar a densidade mineral óssea da vértebra lombar e da área de metáfise do fêmur dos ratos ovariectomizados tratados com doses submáxima de 17  $\beta$ -estradiol e de PTH humano (1-34) (KAWANE et al., 2004).

REID et al. (2001) avaliando dados de fraturas de um ensaio clínico controlado e randomizado sobre o efeito das estatinas na mortalidade por doença coronariana, não encontraram evidências de redução de fraturas. Os autores sugerem que um pequeno efeito das estatinas na redução de fraturas não pode ser totalmente excluído, mas é improvável que elas tenham eficácia clínica significativa na redução do risco de fraturas.

BJARNASON et al. (2001) num estudo que avaliou o efeito metabólico da fluvastatina e vitamina C nos parâmetros de marcadores da remodelação óssea, randomizaram 68 mulheres pós-menopausa com osteoporose e hipercolesterolemia para o tratamento por 12 semanas com fluvastatina (dose de 40 mg) + vitamina C (dose de 500 mg) ou apenas vitamina C. Foram avaliados os marcadores bioquímicos de formação óssea (osteocalcina e fosfatase alcalina total) e da reabsorção óssea (telopeptídeos carboxiterminais do colágeno tipo I sérico e urinário). Os autores observaram que a fluvastatina associada à vitamina C não aumentou os marcadores de formação óssea. Quanto aos marcadores de reabsorção, houve uma redução significativa quando comparados com os parâmetros iniciais, porém, não houve diferenças nesses

marcadores no grupo tratado e não-tratado. Diante desses dados, os autores concluíram que a fluvastatina não teve influência nos parâmetros de remodelação óssea.

VIERECK et al. (2005) ao avaliarem o efeito da atorvastatina em osteoblastos humanos observaram que esse medicamento aumentou a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica, osteocalcina e fosfatase alcalina.

MÉIER et al. (2000) estudaram a associação entre fraturas e o uso de estatinas. Eles avaliaram 91.611 pacientes com idade entre 50 e 89 anos que foram divididos em três grupos: grupo 1, constituído de indivíduos que receberam pelo menos uma prescrição de estatina, fibrato ou qualquer outra droga lipídio redutora; grupo 2, de pacientes com diagnóstico de hiperlipidemia que não receberam nenhuma prescrição de droga lipídio redutora; e o grupo 3 que compreendeu 50.000 indivíduos sem diagnóstico de hiperlipidemia e sem prescrição de droga lipídio redutora em nenhum momento. Eles seguiram cada paciente desde a primeira prescrição, até o indivíduo desenvolver fratura, abandonar o estudo ou morrer. Os autores observaram uma redução significativa no risco de fratura, que chegou a 45% para todos os tipos de fratura e atingiu 88% no caso de fratura de quadril, naqueles pacientes que receberam alguma prescrição de estatina durante sua vida.

## **2.4 – Indução de osteoporose por glicocorticóides**

Os glicocorticóides são hormônios de natureza esteróidica que atuam em uma variedade de órgãos e sistemas. O produto natural, cortisol ou hidrocortisona, é considerado o principal hormônio do córtex supra renal, e, a partir de modificações introduzidas em sua molécula, foram sintetizados inúmeros derivados com atividade glicocorticóide maior e mais prolongada, cujas indicações terapêuticas são amplas e variadas (CORONHO et al., 2001).

Os glicocorticóides apresentam vários efeitos sobre a resposta imune em vários locais e possuem propriedade antiinflamatória e imunossupressiva quando administrados terapeuticamente (PATTSCHAN et al., 2001). Além disso, os glicocorticóides estão associados com perda óssea e um subsequente aumento de fraturas em humanos. Estes efeitos sobre o tecido ósseo podem ser devido a inúmeros fatores, incluindo aumento da eliminação de cálcio renal e diminuição da absorção de cálcio intestinal. Um balanço negativo de cálcio devido a mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal é responsável pelo hiperparatireoidismo secundário em

pacientes tratados com glicocorticóide (BIKLE e PILLAI, 1993; KLEIN et al., 1977; LUKERT e RAISZ, 1990; REID, 1997). Embora os mecanismos precisos permaneçam obscuros, a eliminação urinária aumentada de cálcio que ocorre em resposta ao glicocorticóide, provavelmente é uma consequência da reabsorção tubular diminuída (REID, 1997; REID e IBBERTSON, 1987). Isto pode ser um efeito a longo prazo, uma vez que, uma única dose de prednisolona aumenta os níveis de cálcio do soro mas não altera significativamente o nível de cálcio urinário (YONEMURA et al., 1999).

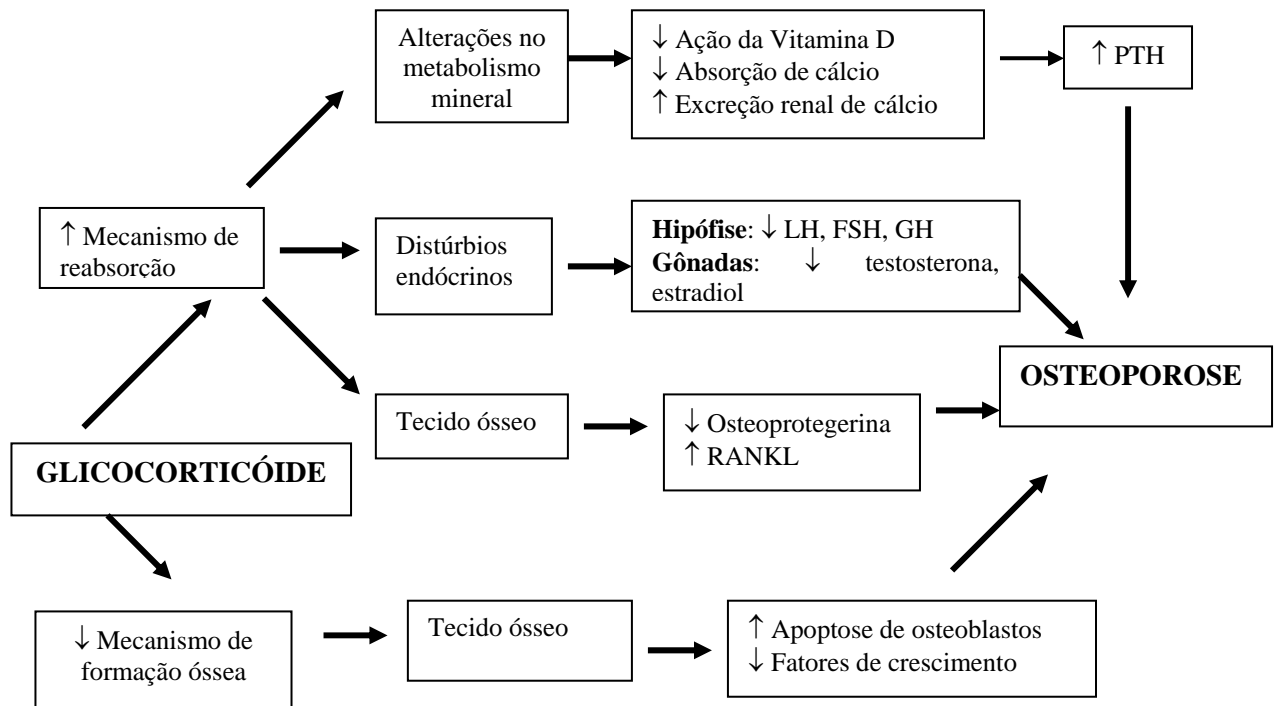
Os glicocorticóides interferem no metabolismo do cálcio em diferentes locais, como intestino, rins e unidades de remodelação óssea, produzindo um balanço negativo constante desse íon. No trato gastrointestinal, a influência mais evidente é a diminuição de sua absorção, através da inibição do transporte ativo transcelular secundário ao antagonismo sobre a vitamina D. Entretanto, parece existir uma associação entre os níveis de glicocorticóides e a absorção de cálcio pelo duodeno, de tal forma que doses baixas aumentam enquanto doses elevadas reduzem sua absorção. A corticoterapia também influencia negativamente o metabolismo renal de cálcio, aumentando a sua excreção urinária, devido à redução da reabsorção tubular renal (SEGAL e LANE, 1997).

Como previamente relatado sempre se acreditou que o hiperparatireoidismo secundário acelera o desenvolvimento de osteoporose induzida por glicocorticóide. O efeito estimulatório direto de glicocorticóides sobre a síntese e secreção de PTH tem sido observado *in vitro*: administração de dexametasona aumenta a secreção de PTH de células da paratireóide de cultura bovina e a secreção de PTH estimulada por cortisol de culturas de glândulas de paratireóide de rato (AU, 1976; SUGIMOTO et al., 1989).

Concentrações baixas de esteróides sexuais na circulação em mulheres após a menopausa ou ovariectomizadas levam ao aumento da perda óssea. Entretanto, reposição hormonal pode prevenir essas mudanças. Na ausência de reposição hormonal, a osteoporose pode se desenvolver como um resultado de uma redução na formação óssea e estimulação na reabsorção óssea (DUCY et al., 2000; SCHOT e SCHUURS, 1990; WEINSTEIN et al., 2000). O efeito inibitório dos glicocorticóides sobre a síntese e secreção de hormônios sexuais contribui para a osteoporose induzida por glicocorticóides.

Os glicocorticóides modificam a atividade metabólica e proliferativa das células ósseas. Eles inibem a osteoblastogênese e osteoclastogênese e reduzem a meia vida dos osteoclastos. Eles também são potentes repressores da função osteoblástica e

provavelmente estimuladores da maturação dos osteoclastos. Em conjunto, estas mudanças conduzem à osteoporose induzida por glicocorticóide, principalmente devido à formação óssea reduzida. Um aumento na reabsorção óssea parece estar menos envolvido (PATTSCHAN et al., 2001).



**Figura 4** – Aspecto multifatorial da fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide (LANNA et al., 2003).

Além disso, a corticoterapia prolongada produz, habitualmente, uma tendência à diminuição da tolerância aos carboidratos, podendo, em alguns casos, resultar em hiperglicemia de jejum e glicosúria. Contribui para a redução da tolerância aos carboidratos a presença de resistência periférica à ação da insulina, documentada pela elevação dos níveis basais de insulina, resultando em longo prazo, em hiperplasia das células  $\beta$  pancreáticas. Dessa maneira, como os glicocorticóides estimulam a produção de glicose mas diminuem sua utilização periférica, pacientes em uso crônico de doses farmacológicas de glicocorticóides habitualmente apresentam-se intolerantes aos carboidratos (com teste oral de tolerância à glicose ou curva glicêmica alterada) e, até mesmo, com diabetes mellitus clinicamente manifesto, com hiperglicemia de jejum e glicosúria, naqueles geneticamente predispostos (CORONHO, 2001).

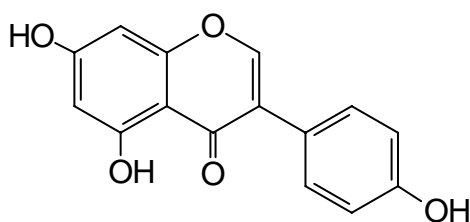
## 2.5 – Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos encontrados nos alimentos, principalmente nas verduras e frutas (NIJVELDT et al., 2001). São derivados do grupo benzo- $\gamma$ -pirano e possuem um esqueleto de 15 átomos de carbono. Por possuírem largo espectro de atividades biológica e farmacológica, têm recebido ampla atenção dos pesquisadores desde a década de 90 (METODIEWA et al., 1997). São denominados fitoquímicos, devido à origem vegetal, sendo considerados princípios ativos em muitas plantas (REPETTO e LLESUY, 2002).

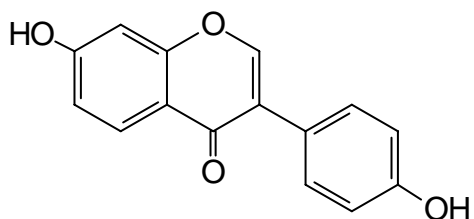
Mais de seis mil diferentes flavonóides foram identificados dentro da maior classe de flavonóides que incluem flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas. Esses compostos são absorvidos no trato gastrointestinal de homens e animais e são excretados intactos ou como metabólitos na urina e fezes (NIJVELDT et al., 2001; COOK e SAMMAN, 1996; PETERSON e DWYER, 1998).

Os flavonóis mais comuns são o kaempferol, a quercetina e a miricetina, e entre eles o mais importante é sem dúvida a rutina (3-rutinosil-quercetina) composto com atividade biológica (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

As isoflavonas estão presentes principalmente em produtos à base de soja, mas também em outros grãos como na ervilha, feijão e seus derivados e em legumes (LIGGINS et al., 2000). Entre elas destacam-se a genisteína (Figura 5), a daidzeína (Figura 6) e a gliciteína.

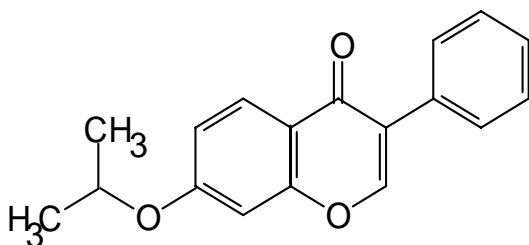


**Figura 5** – Estrutura química da genisteína



**Figura 6** – Estrutura química da daidzeína

A ipriflavona (7-isopropoxiisoflavona) é um derivado sintético não hormonal produzido comercialmente da daidzeína (Figura 7).



**Figura 7** – Estrutura química da ipriflavona.

Os nutricionistas estimam que a ingestão média de flavonóides em uma dieta normal é de 1–2 g por dia (HAVSTEEN, 2002) e por serem consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta humana regular, esses compostos desempenham um importante papel na saúde humana.

### **2.5.1 – Efeito dos flavonóides no metabolismo ósseo**

Nos últimos anos tem-se declarado que os fitoestrógenos seriam alternativas naturais à terapia de reposição hormonal na menopausa. Os fitoestrógenos encontrados em várias plantas comestíveis podem ter efeitos estrogênicos e antiestrogênicos. Estudos epidemiológicos, comparando a população asiática versus ocidental, têm sugerido que uma dieta rica em fitoestrógenos melhoraria os sintomas da menopausa e protegeria contra câncer de mama, perda óssea e doenças cardiovasculares. Conseqüentemente existe um movimento global incentivando o consumo de alimentos

ricos em fitoestrógenos, dentre eles os flavonóides, e de comprimidos de extratos concentrados de isoflavonas (CLAPAUCH et al., 2002).

As primeiras evidências do efeito benéfico dos fitoestrógenos nos ossos vêm da observação de que populações que ingeriam altos teores de soja em sua dieta natural apresentavam menores índices de fratura do colo do fêmur que outras populações que não tinham esse hábito (SOMEKAWA et al., 2001; MEI et al., 2001).

Os fitoestrógenos são compostos de estruturas não esteroidais, porém semelhantes ao estrógeno; presente em frutas, vegetais e grãos, e apresentam baixa atividade estrogênica (SILVA et al., 2003; LIGGINS et al., 2000). Os tipos mais comuns são as cumestranas, lignanas e isoflavonas. Em humanos, os fitoestrógenos apresentam tanto os efeitos estrogênicos, como os efeitos antiestrogênicos, dependendo da concentração de estrógeno endógeno circulante e dos seus receptores estrogênicos. A soja é rica em isoflavonas, principalmente a genisteína e a daidzeína, que são os compostos fitoestrógenos com maior evidência de atividade estrogênica, e estão sendo pesquisados para o tratamento dos sintomas da menopausa (SILVA et al., 2003).

A frequência da osteoporose varia nas populações em diferentes regiões geográficas, com menor incidência em mulheres asiáticas que as dos países ocidentais. Mulheres japonesas têm menor risco de sofrerem fraturas de quadril que mulheres brancas. Postula-se que tal fato se deva a fatores como estatura, exercícios físicos, equilíbrio e o tipo de dieta adotada, incluindo consumo de fitoestrógenos e cálcio. Um estudo que comparou a taxa de fraturas em Hong Kong e nos Estados Unidos, demonstrou que, em Hong Kong, aos 85 anos, observa-se uma taxa de 1/3 das fraturas observadas nos Estados Unidos (CLAPAUCH et al., 2002).

DEYHIM et al. (2003) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito de fitoestrógenos e flavonóides na perda óssea que ocorre no período pós-menopausa. Foram utilizados ratos ovariectomizados, os quais foram divididos em três grupos: ovariectomizado, ovariectomizado + 0,575 mg de isoflavona/g de proteína dietética (0,96 mg/dia) e ovariectomizado + 1,15 mg de isoflavona/g de proteína dietética (1,92 mg/dia). A ovariectomia reduziu a densidade óssea da quarta vértebra lombar, tíbia e fêmur e aumentou a excreção urinária de cálcio. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a suplementação de isoflavona na dieta nas duas dosagens não afetou a densidade mineral óssea e nem os outros parâmetros relacionados ao metabolismo ósseo, como por exemplo, cálcio total no soro, cálcio ionizado no soro, magnésio no soro e excreção de cálcio e magnésio na urina. Os autores sugerem que a

dosagem de isoflavona usada não foi suficiente para alterar os parâmetros analisados e que os níveis de suplementação de isoflavona que previne perda óssea, observada por outros pesquisadores, foram em dosagens superiores aos administrados neste estudo (50 mg por kg de peso corporal).

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 (marcador de formação óssea oriunda dos osteoblastos), o que reflete também num aumento da atividade osteoblástica (MOREIRA, 2004).

Estudos realizados por FANTI et al. (1998) demonstraram um incremento dos níveis séricos de osteocalcina em ratas ooforectomizadas, com o uso de genisteína, sendo que os níveis de D-piridinolina (marcador da atividade osteoclástica) permaneceram inalterados. Tal fato sugere uma ação essencial da genisteína na formação óssea e não anti-reabsortiva, como a ação dos estrogênios. Entretanto, estes estudos não apresentam o mecanismo de ação destas substâncias.

HEAD (1999) relataram sobre os efeitos do flavonóide ipriflavona no metabolismo ósseo. A ipriflavona é um flavonóide sintético obtido a partir da daidzeína e vem sendo pesquisado como um grande promissor na prevenção e no tratamento da osteoporose e de outras desordens do metabolismo ósseo. O tratamento com ipriflavona já vem sendo utilizado como uma terapia alternativa de reposição hormonal, uma vez que possui efeito estrogênico. Estudos têm demonstrado ainda que ela é eficaz na prevenção de perda de massa óssea associada com o uso crônico de esteróides, imobilização, ovariectomia, osteodistrofia renal. Também vem sendo pesquisado na doença de Paget, hiperparatireoidismo e otosclerose.

Pesquisas sobre a farmacocinética da ipriflavona mostram que ela é metabolizada no fígado e excretada na urina. Alimentos parecem favorecer a sua absorção. Quando fornecidos a voluntários (homens) na dose de 200 mg/kg de peso corporal, 80% da dose administrada foi absorvida após o almoço. Em cães e gatos sete metabólitos foram identificados no plasma. O seu tempo de meia vida em humanos foi de 9,8 horas para a ipriflavona e de 2,7 a 16,1 horas para os seus metabólitos (HEAD, 1999; REGINSTER, 1993).

O mecanismo de ação da ipriflavona parece ser superior à de outros medicamentos disponíveis para a prevenção e tratamento da osteoporose, prevenindo a perda de massa óssea. Substâncias que tem efeitos benéficos na prevenção da

reabsorção óssea podem prevenir a atividade osteoclástica quando fornecida em longo prazo. Tratamentos com fármacos anti-reabsortivos incluem estrógenos, cálcio, bifosfonatos e calcitonina. Já o fluoreto de sódio, fragmentos anabólicos do PTH, fator de crescimento ligado à insulina demonstraram atividade de formação óssea (HEAD, 1999).

Pesquisas também têm demonstrado que os metabólitos da ipriflavona inibem a reabsorção óssea (GIOSSI et al., 1996). Além disso, pesquisas *in vitro* mostraram que todos os metabólitos da ipriflavona foram capazes de inibir a reabsorção óssea estimulada por PTH. BONUCCI et al. (1992) relataram que a atividade osteoclástica estimulada pelo PTH resultou em hipercalcemia e que esta foi inibida por suplementação dose-dependente de ipriflavona em ratos.

NOTOYA et al. (1993) pesquisaram os efeitos da ipriflavona sobre a inibição da reabsorção óssea em camundongos. O mecanismo envolvido incluiu tanto a inibição da ativação de osteoclastos maduros quanto a formação de novos osteoclastos. Quando a ipriflavona foi combinada com vitamina K em meio celular, uma inibição mais acentuada da reabsorção óssea foi observada, sendo que tanto a ipriflavona quanto a vitamina K parecem possuir mecanismos de ação semelhantes. Além disso, a ipriflavona parece estimular a atividade da fosfatase alcalina, um indicador de formação óssea. Os autores concluíram que o efeito inibitório da ipriflavona sobre a reabsorção óssea é similar ao da vitamina K, mas os mecanismos para a atividade osteoblástica são diferentes.

Os efeitos da ipriflavona sobre a estrutura cristalina também vêm sendo pesquisados. Observou-se que certos medicamentos, como o fluoreto de sódio, aumentam a densidade óssea, mas modificam a estrutura cristalina tornando o osso mais frágil (RIGGS et al., 1990). Estudo realizado em ratos, onde se utilizou doses de 200-400 mg/kg/dia de ipriflavona durante 12 semanas mostraram que não houve alterações na estrutura cristalina do osso. Os pesquisadores concluíram que há um efeito positivo da ipriflavona na densidade mineral óssea e isto parece estar associado com um aumento na formação de cristais de apatita (GHEZZO et al., 1996). Além disso, um estudo realizado em ratos tratados com ipriflavona mostrou um aumento de 50% na resistência à fratura sem nenhuma alteração na composição mineral ou cristalinidade do tecido ósseo (CIVITELLI et al., 1995).

A ipriflavona parece não agir diretamente através dos receptores de estrogênio. Aproximadamente 10% da ipriflavona absorvida é convertida em daidzeína (produto

ativo) no organismo. A falta de ação estrogênica foi observada através de um estudo com 15 mulheres na pós-menopausa utilizando 600 a 1000 mg de ipriflavona por dia durante 21 dias, avaliando-se os níveis de hormônio luteinizante, hormônio folículo estimulante e prolactina além da citologia vaginal. Os resultados encontrados apontaram para a ausência de qualquer ação estrogênica (PETILLI et al., 1995; MELIS et al., 1992).

Estudos também demonstraram que a ipriflavona inibiu a atividade osteoclástica e a secreção de PTH. Foi também observado aumento nos níveis de fosfatase alcalina e na formação de colágeno com a utilização de cinco metabólitos da ipriflavona *in vitro* (NOTOYA et al., 1993). Sabe-se que o PTH estimula a reabsorção óssea para manter as concentrações plasmáticas de cálcio (CALVI et al., 2001). A fosfatase alcalina, por sua vez, é um marcador da formação óssea.

Vários possíveis mecanismos têm sido sugeridos para explicar os efeitos benéficos das isoflavonas da soja no tecido ósseo, os quais podem ajudar a prevenir o desenvolvimento da osteoporose. Tem sido sugerido que os osteoblastos e os osteoclastos são células alvo para a ação da genisteína e da daidzeína. Estudos em cultura de células semelhantes a osteoblastos sugerem que genisteína combina com receptores de estrógenos e exerce seus efeitos pelo mesmo mecanismo que este hormônio. Por outro lado, ela pode também exercer efeitos por outros mecanismos, independentes de receptores para estrógenos (WILLIAMS et al, 1998).

Alguns pesquisadores têm relatado que a genisteína inibe a topoisomerase II, interferindo assim, com a progressão do ciclo celular, enquanto que outros sugerem que a genisteína ativa receptores peptídicos ligados à membrana, iniciando outros efeitos independentes de estrógenos. Por exemplo, os osteoclastos são dependentes da atividade de receptores de proteína tirosina kinase, então os inibidores de proteína tirosina kinase são candidatos à prevenção da osteoporose. A genisteína e a daidzeína, isoflavonas naturais, são inibidoras de proteína tirosina kinase e poderiam agir por este mecanismo (WILLIAMS et al., 1998).

Outros estudos foram realizados com o objetivo de investigar os efeitos das isoflavonas daidzina e genistina, precursoras da genisteína e daidzeína, na perda óssea em ratas ovariectomizadas alimentadas com dietas deficientes em cálcio. As isoflavonas foram administradas oralmente nos animais por quatro semanas. Os ossos do fêmur destes animais apresentaram redução significativa na densidade, força de quebra, cinzas, peso e conteúdo de cálcio e fósforo quando comparados com os animais não

ovariectomizados. Estas mudanças foram prevenidas nos animais que receberam daidzina e genistina na dose de 50mg/kg/dia durante quatro semanas e nos animais que receberam uma estrona subcutânea (7,5 µg/kg/dia) como controle positivo. A ovariectomia causou atrofia do útero e aumentou a taxa de excreção urinária de pirinolina e desoxipirinolina. Isto foi prevenido pela administração de daidzina e estrona, não ocorrendo com a genistina. O efeito preventivo do tratamento com daidzina na perda óssea em ratas ovariectomizadas parece ser devido à supressão do *turnover* do osso, sendo que a genistina possui um mecanismo diferente da daidzina (ISHIDA et al., 1998).

Foi realizado um estudo controlado com placebo, em 98 mulheres com diagnóstico de osteoporose, onde se utilizou 200 mg de ipriflavona três vezes ao dia. Após dois anos de tratamento o grupo placebo perdeu em média 3,5% da massa óssea, enquanto no grupo que recebeu ipriflavona não apenas houve estabilização da perda como também um discreto incremento na massa óssea (ADAMI et al, 1997). Além disso, um grupo de 28 mulheres italianas com idade superior a 65 anos, com osteoporose e evidência radiológica de pelo menos uma fratura vertebral, foi tratado com 600 mg de ipriflavona e 1000 mg de cálcio. Após 12 meses houve um aumento de 6% na densidade mineral óssea do rádio distal no grupo que recebeu ipriflavona e nenhuma alteração no grupo placebo (PASSERI et al, 1992).

ARJMANDI et al. (2000) realizaram uma pesquisa com objetivo de comparar e contrastar alguns dos mecanismos protetores do osso realizados pela ipriflavona com àqueles do 17 β-estradiol na deficiência de hormônio ovariano. Quarenta e oito ratos Sprague-Dawley com 95 dias foram distribuídos em quatro grupos: controle, ovariectomizados, ovariectomizados + ipriflavona (100 mg/kg peso/dia) e ovariectomizados + 17 β-estradiol (10 µg/kg peso/dia). De acordo com os resultados obtidos, os pesquisadores concluíram que tanto o tratamento com ipriflavona quanto com 17 β-estradiol preveniram completamente a perda da densidade óssea do fêmur induzida pela ovariectomia. Entretanto, ao contrário do 17 β-estradiol, a ipriflavona não reduziu o aumento da atividade da fosfatase alcalina no soro ou as concentrações de fator de crescimento ligado à insulina e proteína de ligação de fator de crescimento ligado à insulina. Com relação à análise histomorfométrica, observou-se que a taxa de formação óssea mais elevada ocorreu nos animais tratados com ipriflavona. Isto indica que a ipriflavona é mais efetiva na prevenção da perda óssea associada à ovariectomia.

Os mecanismos pelos quais a ipriflavona protege o osso, na deficiência de hormônio ovariano, podem ser diferentes daqueles exercidos pelo 17  $\beta$ -estradiol e podem envolver aumento na taxa de formação óssea.

YAMAGUCHI e GAO (1998) estudaram, *in vitro*, os efeitos da genisteína e da genistina sobre os componentes ósseos em tecidos femurais obtidos de ratas fêmeas em idade avançada. Estes tecidos foram cultivados por 24 horas em um meio contendo ou veículo ou genisteína ( $10^{-8}$  –  $10^{-5}$  M) ou genistina ( $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  M). A presença de genisteína e genistina causou um aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina, no conteúdo de DNA e cálcio nos tecidos. O efeito da genisteína foi maior que o da genistina. A presença de sulfato de zinco ( $10^{-5}$  M) causou um aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina elevada pela genisteína e nos conteúdos de DNA e cálcio, o que não ocorreu com a genistina. Então estes resultados sugerem que a genisteína e a genistina possuem efeito anabólico no metabolismo ósseo em tecidos femorais de ratas em idade avançada e que o efeito da genisteína é aumentado pela presença do zinco, um elemento traço essencial.

ANDERSON et al. (1998) ao avaliarem o efeito da genisteína no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas encontraram resultados consistentes com os de outras pesquisas descritas na literatura em células isoladas e tecidos reprodutivos. Doses mais baixas de genisteína agem similarmente a estrógenos com um efeito benéfico ao tecido ósseo, mas em doses elevadas, podem exercer efeitos potencialmente adversos às funções celulares das células e tecidos ósseos.

Estudos têm demonstrado que ratos ovariectomizados tratados com genisteína ou daidzeína apresentaram aumento no peso seco do fêmur, na densidade mineral óssea na taxa de formação óssea e redução na taxa de reabsorção óssea quando comparadas com ratos ovariectomizados não tratados com estes isoflavonóides (ANDERSON et al., 1998; BLAIR et al., 1996; ISHIDA et al., 1998; FANTI et al., 1998).

HORCAJADA-MOLTENI et al. (2000) avaliaram o efeito de rutina sobre o metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas. Trinta ratos Wistar com três meses de idade foram divididos em três grupos: grupo controle (animais não ovariectomizados alimentados com dieta padrão), grupo ovariectomizado (dieta padrão) e grupo ovariectomizados + rutina (dieta padrão + 0,25% de rutina). Após 90 dias, tanto a excreção urinária de deoxipiridinolina (marcador da reabsorção óssea) quanto a calciúria estavam mais elevadas nos animais do grupo ovariectomizado do que nos animais dos grupos ovariectomizados + rutina e controle. Além disso, a concentração de

osteocalcina no plasma (um marcador da atividade osteoblástica) foi mais elevada nos ratos do grupo ovariectomizado + rutina do que nos ratos do grupo controle. Estes resultados indicam que a rutina (e/ou seus metabólitos), inibem a perda óssea trabecular induzida pela ovariectomia nos ratos, reduzindo a reabsorção óssea e aumentando a atividade osteoblástica.

Pesquisadores avaliaram os efeitos de concentrações nanomolares de quercetina e rutina sobre o desenvolvimento e atividade de osteoclastos *in vitro* comparando com os efeitos do 17  $\beta$ -estradiol. Células não aderentes da medula óssea suína foram cultivadas durante 11 dias em fatias de dentina na presença de 10nM de vitamina D, com ou sem 10nM de quercetina, 10 nM de rutina ou 10 nM de 17  $\beta$ -estradiol. Os osteoclastos desenvolveram-se na presença de vitamina D, mas seu número foi significativamente reduzido pela quercetina, rutina e 17  $\beta$ -estradiol. Assim como o 17  $\beta$ -estradiol, ambos os flavonóis reduziram significativamente a reabsorção óssea. Os osteoclastos e as células progenitoras de osteoclastos contêm receptor de estrógeno alfa (ERalfa), ERbeta e proteínas RANK. Tanto a rutina quanto a quercetina aumentaram a proteína nuclear ERbeta e diminuíram a proteína ERalfa das células progenitoras de osteoclastos. Além disso, rutina reduziu a proteína RANK, enquanto o 17  $\beta$ -estradiol e a quercetina promoveram apoptose por clivagem da caspase-8 e caspase-3. Todos os efeitos dos flavonóis foram revertidos quando se utilizou um antagonista do estrógeno na concentração de 1nM. Assim, as propriedades anti-reabsortiva dos flavonóis em estudo são mediadas principalmente pelos receptores de estrógeno, através da inibição da proteína RANK ou ativação de caspases (RASSI et al., 2005). As caspases ocupam função de destaque na execução do programa de morte celular. Elas estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica à altura de resíduos do ácido aspártico (THOMPSON, 1999).

PINTO (2004) estudou o efeito do bifosfonato alendronato de sódio (na dose de 0,2 mg/kg), da estatina atorvastatina cálcica (na dose de 1,2 mg/kg) e do flavonóide ipriflavona (na dose de 100 mg/kg) na osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas da linhagem Wistar. A influência desses fármacos foi avaliada pelos marcadores bioquímicos de remodelação óssea, tais como, teores de cálcio e fósforo sérico e de fosfatase alcalina óssea e análise histomorfométrica, visualizando-se a densidade trabecular óssea. De acordo com os resultados obtidos observou-se que

todas as substâncias avaliadas apresentaram resultados significativos no aumento da densidade trabecular óssea, destacando-se que o bifosfonato apresentou o melhor resultado, sendo alcançados níveis de densidade trabecular óssea semelhantes aos dos animais normais.

CHIBA et al. (2003) realizaram um ensaio biológico para avaliar o efeito de hesperidina,  $\alpha$ -glicosilhesperidina e 17  $\beta$ -estradiol sobre a perda óssea em ratos ovariectomizados, um modelo animal de osteoporose pós-menopausa. Quarenta ratos, fêmeas, com oito semanas de idade foram distribuídos em cinco grupos: grupo 1: animais controle operado (não ovariectomizados) que se alimentaram de dieta padrão (AIN-93G), grupo 2: animais ovariectomizados alimentados com dieta padrão, grupo 3: animais ovariectomizados alimentados com dieta padrão + hesperidina (dose de 0,5g/100g de ração); grupo 4: animais ovariectomizados alimentados com dieta padrão +  $\alpha$ -glicosilhesperidina (dose de 0,7g/100g de ração) e grupo 5: animais ovariectomizados alimentados com dieta padrão + 17  $\beta$ -estradiol (dose de 0,03  $\mu$ g/dia). Após quatro semanas os ratos foram sacrificados e foram coletados o fêmur, útero, fígado e amostras de sangue. Nos ratos ovariectomizados, a densidade mineral óssea do fêmur foi menor que o do grupo controle não ovariectomizado. Nos grupos que receberam hesperidina ou  $\alpha$ -glicosilhesperidina, essa perda foi significativamente reduzida. As concentrações de cálcio, fósforo e zinco do fêmur foram significativamente maiores nos grupos que receberam hesperidina e 17  $\beta$ -estradiol quando comparados com o grupo ovariectomizado. As análises histomorfométricas mostraram que o volume e a espessura do osso trabecular na metáfise distal do fêmur estavam reduzidas nos ratos ovariectomizados, sendo que  $\alpha$ -glicosilhesperidina preveniu significativamente a perda óssea. Além disso, a hesperidina e 17  $\beta$ -estradiol reduziram o número de osteoclastos da metáfise femural nos ratos ovariectomizados. A hesperidina também reduziu os níveis de lipídios no soro e fígado quando comparados com o grupo ovariectomizado alimentado com dieta controle. Esses resultados sugerem um possível papel dos flavonóides na prevenção de patologias como osteoporose e doenças cardiovasculares.

AGNUSDEI et al. (1992) avaliaram o efeito de ipriflavona (600 mg/dia) associada ao cálcio (1000 mg/dia) em pacientes com osteoporose pós-menopausa. Após um ano de estudo, observou-se que o grupo que recebeu ipriflavona apresentou um aumento na densidade mineral do rádio distal e nos níveis séricos de osteocalcina

quando comparados com o grupo controle (que recebeu apenas o cálcio). Os resultados desse trabalho indicam que a ipriflavona é capaz de aumentar a densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e flavonóides ipriflavona e rutina isoladamente e em associação sobre o metabolismo ósseo de ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 50 dias de idade, pesando em média 150 gramas e com osteoporose induzida pela utilização do glicocorticóide dexametasona.

Os animais foram provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, Viçosa, Minas Gerais. Os experimentos, as dosagens bioquímicas do plasma e as dosagens de proteínas colagenosas e proteínas não colagenosas dos ossos foram realizadas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV.

Em todos os experimentos os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas contendo em cada uma seis animais, em ambiente climatizado, com ciclo claro/escuro de 12 horas, onde permaneceram por um período de adaptação de cinco dias, recebendo ração comercial (Labina - Purina<sup>®</sup>) e água “*ad libitum*”. Após o período de adaptação, teve início o processo de indução da osteoporose, que consistiu na administração de dexametasona (DECADRON<sup>®</sup>, fosfato dissódico de dexametasona - 4mg/ml, conteúdo 2,5 ml), por via intramuscular, na dose de 7mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas em todos os animais à exceção do grupo controle (ração), que continuou recebendo água e ração “*ad libitum*”, durante todo o período experimental.

As dosagens de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona e rutina utilizadas nos experimentos foram de 0,02 mg, 0,3 mg, 50 mg e 25 mg, respectivamente, sendo que todas essas substâncias foram administradas diariamente por via oral.

### **3.1 Experimento para avaliar o efeito de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida por dexametasona**

Para a realização desse experimento foram utilizadas 90 ratas. Após o período de indução da osteoporose, os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, contendo cada um dezoito animais:

G1 = Ração (Controle)

G2 = Ração + Dexametasona (Controle com osteoporose)

G3 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio

G4 = Ração + Dexametasona + Atorvastatina cálcica

G5 = Ração + Dexametasona + Ipriflavona

### **3.2 Experimento para avaliar o efeito de alendronato de sódio isoladamente e em associação com atorvastatina cálcica, ipriflavona e rutina na osteoporose induzida por dexametasona**

Para a realização desse experimento foram utilizadas 108 ratas. Após o período de indução da osteoporose, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos, contendo cada um dezoito animais:

G1 = Ração (Controle)

G2 = Ração + Dexametasona (Controle com osteoporose)

G3 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio

G4 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio + Atorvastatina cálcica

G5 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio + Ipriflavona

G6 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio + Rutina

### **3.3 Experimento para avaliar o efeito ipriflavona associada à atorvastatina cálcica e de rutina isoladamente e em associação com ipriflavona e alendronato de sódio na osteoporose induzida por dexametasona**

Para a realização desse experimento foram utilizadas 108 ratas. Após o período de indução da osteoporose, os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos, contendo cada um dezoito animais:

G1 = Ração (Controle)

G2 = Ração + Dexametasona (Controle com osteoporose)

G3 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio + Ipriflavona + Rutina

G4 = Ração + Dexametasona + Ipriflavona + Rutina

G5 = Ração + Dexametasona + Rutina

G6 = Ração + Dexametasona + Atorvastatina cálcica + Ipriflavona

### **3.4 Coleta de material para análises**

A partir da data de início do tratamento, aos 10, 20 e 30 dias, seis animais de cada grupo foram eutanasiados por sobredosagem anestésica de Zoletil 50<sup>®</sup>, via intramuscular, na dose de 20 mg/kg de peso corporal.

Foram coletados, então, de cada animal, 5 ml de sangue por punção cardíaca, para quantificação bioquímica dos níveis séricos de cálcio, magnésio, fósforo e glicose, sendo que a última foi dosada apenas no segundo e terceiro experimento.

Após a eutanásia foram coletados o fêmur esquerdo para análise histopatológica e a tíbia esquerda para análise de proteínas colagenosas e proteínas não colagenosas.

#### **3.4.1 Análise dos constituintes sanguíneos**

Após a coleta, o sangue foi acondicionado em tubos de ensaio e logo a seguir as amostras foram centrifugadas a 7100 xg por 15 minutos à temperatura ambiente, para obtenção do soro.

Para determinar as concentrações plasmáticas de cálcio, magnésio, fósforo e glicose, foi utilizado o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé) e “kits” da marca BioMérieux.

### **3.4.2 Análise de proteínas no osso**

Para a análise das proteínas colagenosas e proteínas não colagenosas, os ossos foram desengordurados com éter etílico por 10 horas, em aparelho de Soxhlet. Em seguida, foram pesados e colocados em sacos plásticos, etiquetados e acondicionados em congelador até o momento das análises.

Para extração das proteínas não colagenosas, os ossos foram desmineralizados com volumes constantes de 5,0 mL de EDTA, sal dissódico, 0,5 moles/L, pH 8,2, de acordo com HAUSCHKA e GALLOP (1977). Esse procedimento foi repetido a cada 8 horas durante 3 dias. Os extratos de EDTA obtidos foram utilizados na determinação dos teores de proteínas não colagenosas, utilizando a albumina sérica bovina como padrão (BRADFORD, 1976).

Após desmineralizados, os ossos foram lavados com água destilada para eliminar o EDTA, secos em estufa (80°C), pesados e utilizados na determinação dos teores de proteínas colagenosas. Este método foi proposto por Berthelot para estimar o teor de nitrogênio, sendo modificado por Pezemek e Nielsen (GUIMARÃES, 1993). O teor de proteínas colagenosas foi obtido multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

### **3.4.3 Histomorfometria**

Logo após a eutanásia, procedeu-se a dissecação do fêmur esquerdo, tomando-se o cuidado de se manter a região epifisária. Os ossos foram colocados em formol tamponado à 10%, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, descalcificado em solução de ácido fórmico/citrato de sódio, incluído em parafina e processado rotineiramente para estudo histológico em microscopia de luz. Obteve-se um corte longitudinal de cada fêmur, de quatro micrômetros (4  $\mu\text{m}$ ) de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Logo após, os cortes foram montados sobre lâmina de vidro e corados com hematoxilina e eosina.

Para cálculo do número de trabéculas, foi obtida uma imagem amostral de osso trabecular, contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico equipado com câmara digital (TCL-984 P). Estas imagens foram analisadas em monitor de microcomputador de 14 polegadas, com aumento final de 200 vezes. Uma gradícula composta por 100 interseções foi aplicada sobre a imagem para a mensuração. Estas interseções foram computadas como pontos coincidentes à trabecula óssea ou ao espaço intertrabecular (cavidade medular). Realizou-se três repetições, sendo, assim, para cada animal, computados um total de 300 pontos, perfazendo, portanto, 1800 pontos por grupo de seis animais de cada tratamento. Desta forma, obteve-se o percentual do número de trabéculas ósseas dos animais experimentais.

Para avaliar a espessura do osso cortical, o mesmo foi medido desde a superfície periosteal até a superfície endosteal, com auxílio de uma régua acoplada a ocular microscópica com aumento de 10x associado a objetiva de 4x. Foram realizadas 20 medições e o valor final para cada animal foi determinado através da média dos valores obtidos, expressa em micrômetros.

### **3.5 Análise estatística**

Os experimentos foram instalados no delineamento inteiramente casualizado, com cinco (primeiro experimento) ou seis (segundo e terceiro experimento) tratamentos em seis repetições.

Procedeu-se à análise de variância dos dados e nos casos em que a interação tratamentos x tempos foi significativa, efetuou-se o desdobramento da mesma. As médias dos grupos tratados foram comparadas entre si por meio do teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Cada grupo tratado foi comparado com os grupos controle (G1 e G2) pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância. O efeito do tempo foi analisado por meio do teste F.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

##### **Efeito de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona isoladamente na osteoporose induzida por dexametasona**

Os resultados obtidos para cálcio, fósforo e magnésio no soro sanguíneo de ratas encontram-se nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. Durante todo o período experimental não houve diferença significativa nos níveis séricos de cálcio entre os grupos controle, bem como, entre eles e os grupos tratados (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por DEYHIM et al. (2003). Ao avaliarem o efeito de isoflavonas no metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas, esses pesquisadores não observaram alterações nos níveis sanguíneos de cálcio total, cálcio ionizado, magnésio e excreção de cálcio e magnésio na urina.

PINTO (2004) também não encontrou alterações significativas nos níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina quando avaliou o efeito de alendronato de sódio (dose de 0,2 mg/kg), atorvastatina cálcica (dose de 1,2 mg/kg) e ipriflavona (dose de 100 mg/kg) em ratas com osteoporose induzida pela utilização de dexametasona.

A concentração sanguínea de cálcio permanece notavelmente constante. Quando a concentração de cálcio no sangue é muito baixa, o PTH e/ou a vitamina D normalizam a concentração pela mobilização de cálcio do osso, aumentam a absorção intestinal e estimulam sua reabsorção nos rins. Por outro lado, quando a concentração de cálcio no sangue é muito alta, a calcitonina assegura que o cálcio seja deslocado de volta para o osso ou excretado pela urina. Dessa forma, níveis sanguíneos geralmente

não refletem o estado nutricional em relação ao cálcio (COZZOLINO, 2005; OLIVEIRA et al., 2003).

**Tabela 1** – Valores médios de cálcio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	11,22	10,39	9,90	10,50	-	-
Controle com osteoporose (G2)	11,81	10,36	9,82	10,66	+1,52	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	12,46	10,38	9,32	10,78 a	+2,67	+1,13
Dexametasona + Atorvastatina (G4)	11,14	10,32	9,56	10,34 a	-1,52	-3,00
Dexametasona + Ipriflavona (G5)	10,85	11,32	9,60	10,59 a	+0,86	-0,66

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Aos 20 e 30 dias de experimento observou-se uma redução significativa nos níveis séricos de fósforo no grupo controle com osteoporose quando comparado com o grupo controle (Tabela 2). Quando comparado com o grupo controle com osteoporose, observa-se que aos 20 dias de experimento, houve um aumento significativo apenas no grupo tratado com ipriflavona (+31,23%). Ao final do período experimental todos os grupos tratados aumentaram significativamente a fosfatemia.

Os glicocorticóides têm uma ação multifatorial no tecido ósseo. Diminuem a formação óssea, reduzem a absorção do cálcio intestinal e aumentam a excreção do cálcio renal, levando a um hiperparatireoidismo secundário (CORONHO, 2001). O teor de fosfato inorgânico no plasma circulante é influenciado pelo PTH, absorção intestinal, funcionamento renal e metabolismo ósseo. O PTH exerce sobre a fosfatemia uma influência oposta à exercida sobre a calcemia, isto é, tende a reduzir a fosfatemia, por aumentar a excreção renal de fosfato, a despeito de causar mobilização do mesmo a partir dos ossos (OLIVEIRA et al., 2003). Isto poderia explicar a redução nos níveis séricos de fósforo observado no grupo controle com osteoporose (-22,04%) quando comparados com o grupo controle, ao final do período experimental.

**Tabela 2** – Valores médios de fósforo sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	3,80	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	5,47	+43,95 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	5,38 a	+41,58 *	-1,65
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	5,37 a	+41,32 *	-1,83
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	4,36 b	+14,74 *	-20,29 *
20	Controle (G1)	4,67 ab	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	3,97 bc	-14,99 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	3,82 bc	-18,20 *	-3,78
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	3,10 c	-33,63 *	-21,91 *
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	5,21 a	+11,56 *	+31,23 *
30	Controle (G1)	4,99 a	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	3,89 b	-22,04 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	4,65 ab	-6,81 *	+19,54 *
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	4,46 ab	-10,62 *	+14,65 *
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	4,83 ab	-3,21	+24,16 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

A Tabela 3 mostra os valores médios de magnésio sérico. Durante todo o período experimental houve um aumento significativo na magneemia no grupo controle com osteoporose quando comparado com o grupo controle. Aos 20 dias, apenas o grupo tratado com atorvastatina apresentou uma redução significativa (-13,61%) quando comparado com o grupo controle com osteoporose, sendo que ao final do período experimental nenhuma alteração significativa foi observada nos grupos tratados.

Os rins de indivíduos normais são capazes de excretar rapidamente grandes quantidades de magnésio absorvido da dieta ou mesmo daquele injetado. Mesmo depois de ingestão considerada alta, os níveis no sangue em geral ficam constantes (COZZOLINO, 2005), o que justificaria os resultados encontrados nos diferentes tratamentos ao final do período experimental.

**Tabela 3** – Valores médios de magnésio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	2,68	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	3,59	+33,96 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	3,27 b	+22,01 *	-8,91 *
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	3,79 a	+41,42 *	+5,57 *
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	3,52 ab	+31,34 *	-1,95
20	Controle (G1)	0,6	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	3,16	+371,64 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	3,07 ab	+358,21 *	-2,85
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	2,73 b	+307,46 *	-13,61 *
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	3,28 a	+389,55 *	+3,80
30	Controle (G1)	0,95	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	2,88	+203,16 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	3,13 a	+229,47 *	+8,68
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	2,91 a	+206,32 *	+1,04
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	2,93 a	+208,42 *	+1,74

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Aos 10, 20 e 30 dias de experimento observa-se uma redução significativa nos níveis de proteínas não colagenosas no grupo que recebeu dexametasona (-40,41%) quando comparado com o grupo controle (Tabela 4). Ao final do período experimental, houve aumentos significativos nos níveis dessa proteína óssea nos grupos tratados com alendronato (+43,15%), atorvastatina (+43,15%) e ipriflavona (+41,10%) quando comparados com o grupo controle com osteoporose.

Esse resultado é bastante satisfatório uma vez que na osteoporose ocorre um aumento da perda de massa óssea e conseqüentemente redução das proteínas que estão presentes na matriz orgânica do osso. Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram nitidamente menor perda de proteínas ósseas não colagenosas em todos os tratamentos.

Uma vez que o alendronato, a atorvastatina e a ipriflavona se mostraram eficientes em aumentar os níveis ósseos de proteínas não colagenosas, isso pode indicar que essas substâncias foram efetivas em estimular a síntese de tecido ósseo.

**Tabela 4** – Valores médios de proteínas não colagenosas em mg/100mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	2,61	2,46	2,29	2,45	-	-
Controle com osteoporose (G2)	1,59	1,27	1,53	1,46	-40,41*	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	2,08	2,05	2,13	2,09 b	-14,69*	+43,15*
Dexametasona + Atorvastatina (G4)	2,09	2,06	2,13	2,09 b	-14,69*	+43,15*
Dexametasona + Ipriflavona (G5)	2,13	2,35	1,71	2,06 b	-15,92*	+41,10*

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

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 aumentam a concentração de osteocalcina, o que reflete também um aumento da atividade osteoblástica (MOREIRA, 2004).

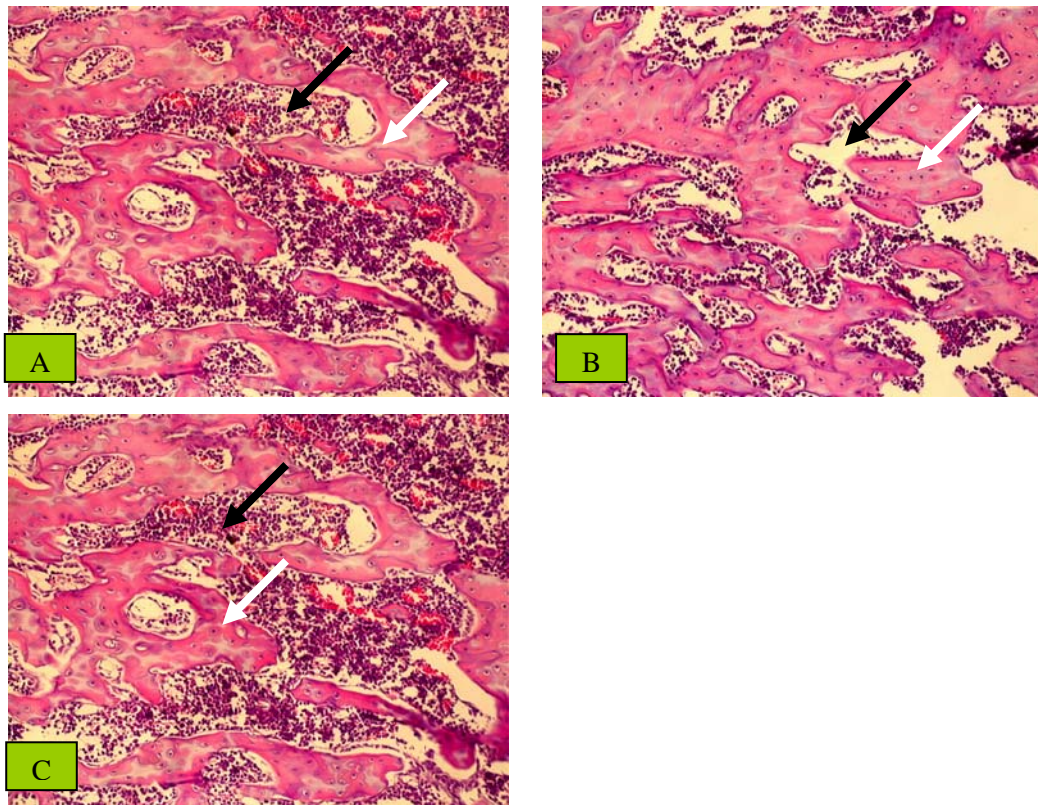
Para os níveis médios de proteínas colagenosas ósseas observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos controle, bem como, entre eles e os grupos tratados (Tabela 5).

**Tabela 5** – Valores médios de proteínas colagenosas em mg/100g de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	34,44	35,89	28,75	33,03	-	-
Controle com osteoporose (G2)	37,65	38,65	32,06	36,12	+9,36	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	32,26	37,01	35,98	35,08 a	+6,21	-2,88
Dexametasona + Atorvastatina (G4)	30,81	39,65	35,84	35,43 a	+7,27	-1,91
Dexametasona + Ipriflavona (G5)	33,85	37,97	34,98	35,60 a	+7,78	-1,44

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

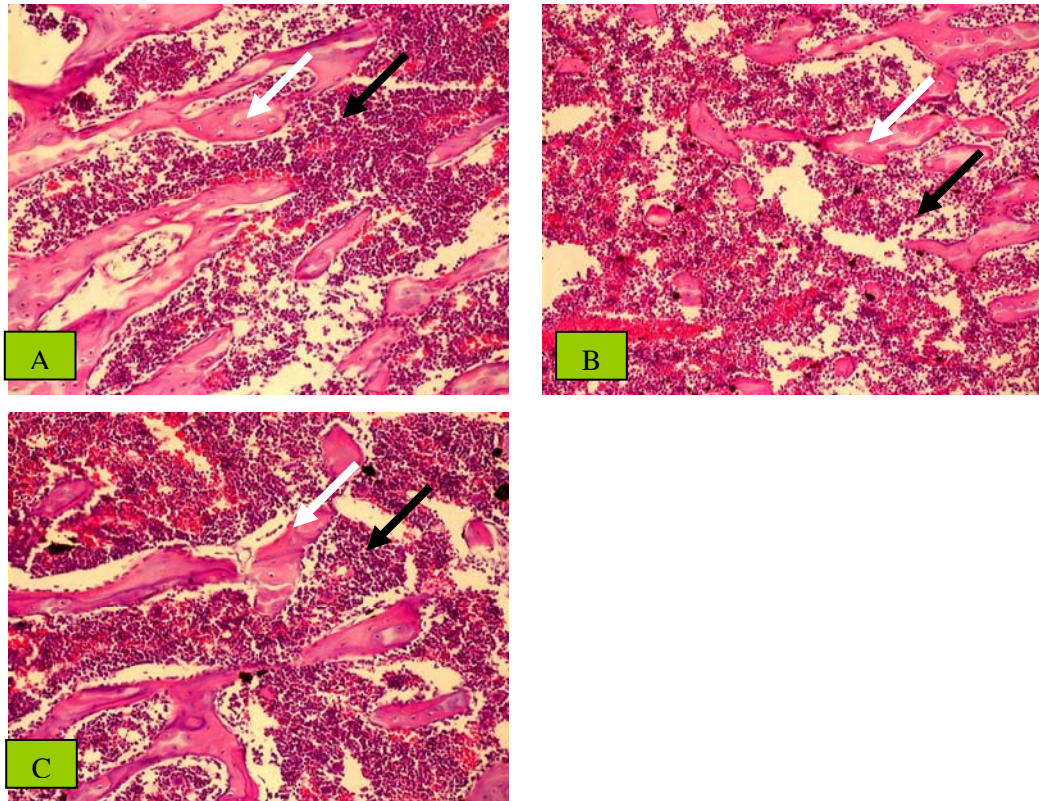
As Figuras 8, 9, 10, 11 e 12 mostram os cortes histológicos da região do terço proximal do fêmur esquerdo dos animais aos 10, 20 e 30 dias de experimento, respectivamente. As setas brancas mostram a região trabecular e as setas pretas a cavidade medular. A Figura 9 mostra uma redução trabecular óssea, identificada principalmente pelo menor número de trabéculas ósseas nos animais que receberam dexametasona, o que evidencia o efeito desse glicocorticoide na indução da osteoporose. Além disso, observa-se que todos os tratamentos foram eficazes em aumentar o número de trabéculas ósseas, ao longo do período experimental (Figuras 10, 11 e 12).



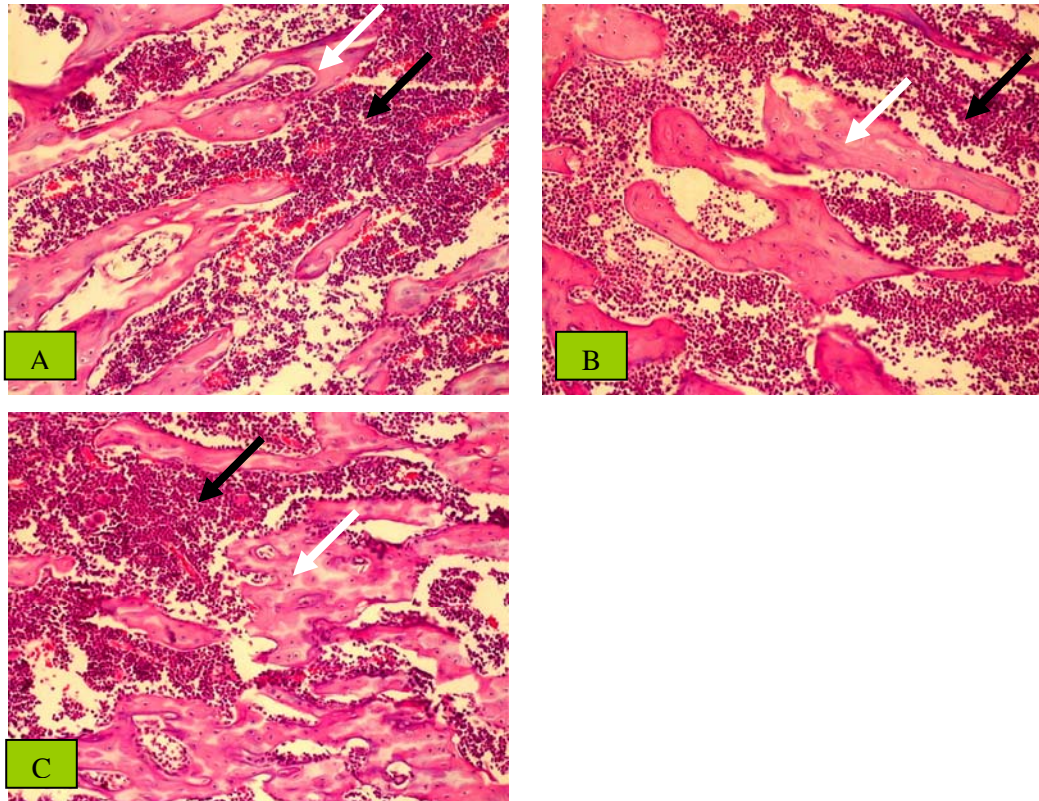
**Figura 8** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G1 (controle) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.

Seta branca – trabécula óssea.

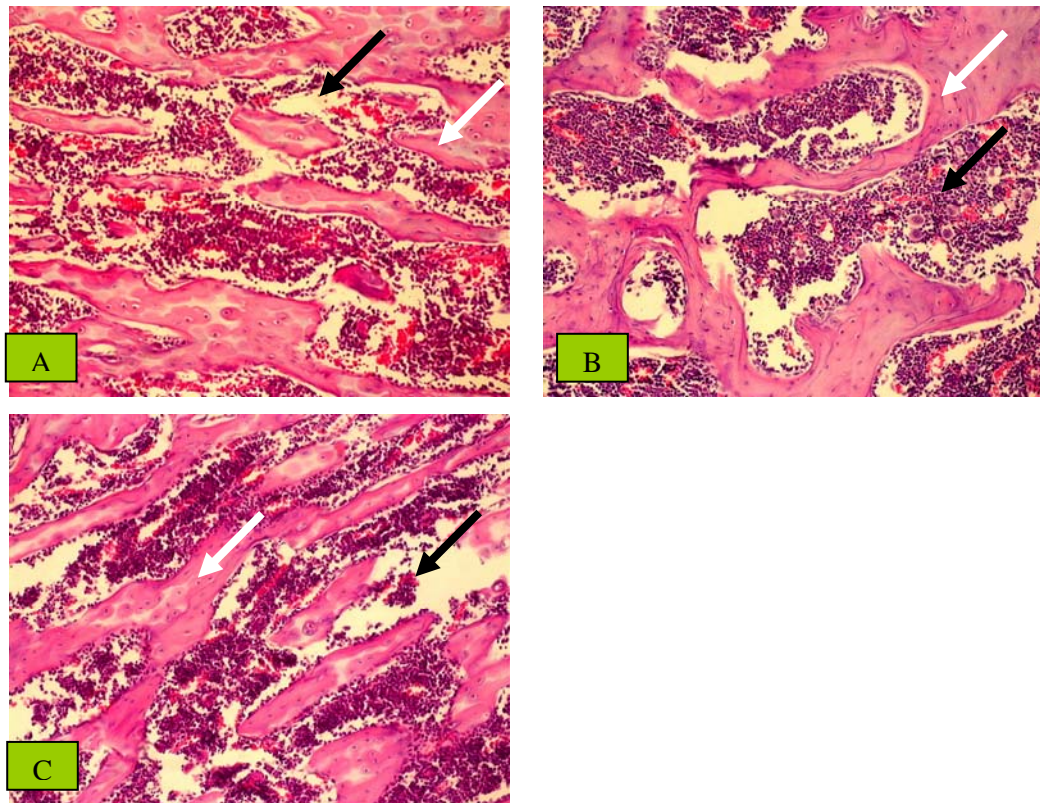
Seta preta – cavidade medular.



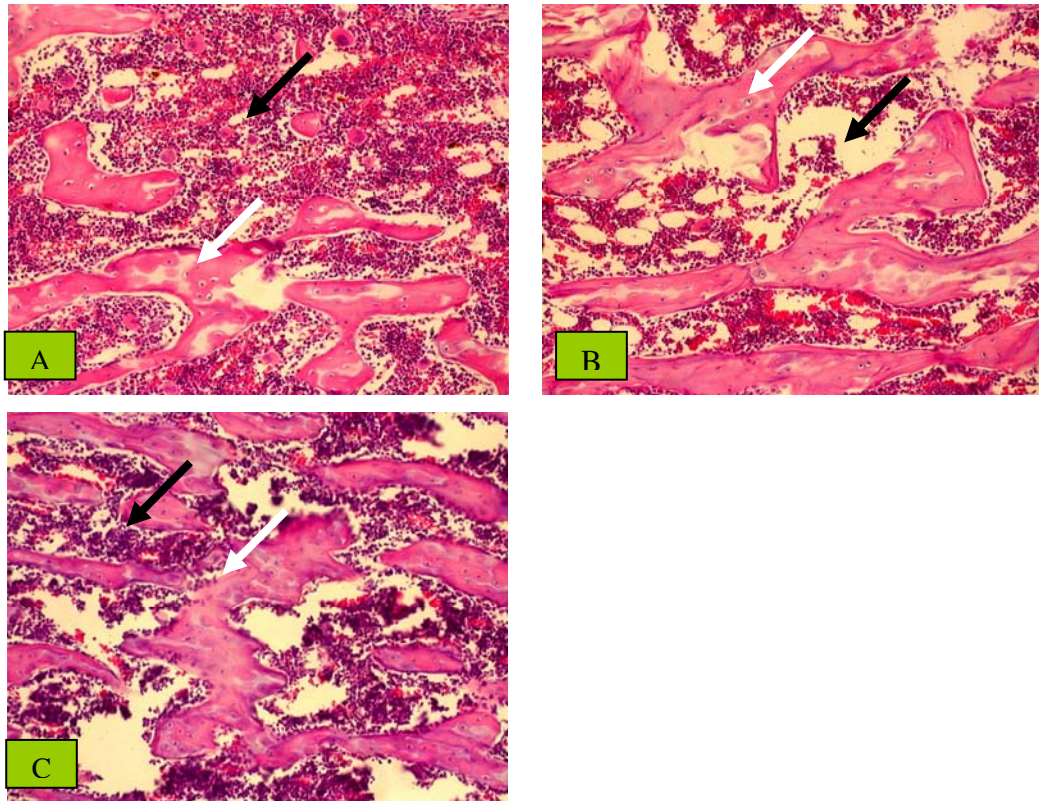
**Figura 9** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G2 (controle com osteoporose) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 10** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G3 (dexametasona + alendronato) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 11** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G4 (dexametasona + atorvastatina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 12** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G5 (dexametasona + ipriflavona) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.

A redução no número de trabéculas ósseas pode ser comprovada pelos resultados apresentados na Tabela 6, onde observa-se uma redução significativa no número de trabéculas ósseas nos animais do grupo controle com osteoporose durante todo o período experimental. Esse resultado comprova a eficácia da dexametasona na indução da osteoporose.

**Tabela 6** – Valores médios do número de trabéculas ósseas em pontos percentuais do fêmur de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	59,00	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	28,50	-51,69 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	20,83 b	-64,69 *	-26,91 *
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	31,50 a	-46,61 *	+10,53 *
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	29,50 ab	-50,00 *	+3,51
20	Controle (G1)	57,50	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	19,67	-65,79 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	28,17 b	-51,01 *	+43,21 *
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	50,67 a	-11,88	+157,60 *
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	36,50 b	-36,52 *	+85,56 *
30	Controle (G1)	59,50	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	31,33	-47,34 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	34,50 b	-42,02 *	+10,12
	Dexametasona + Atorvastatina (G4)	36,50 b	-38,66 *	+16,50
	Dexametasona + Ipriflavona (G5)	43,33 a	-27,18 *	+38,30 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Estudos histomorfométricos com osteoporose induzida por glicocorticóides têm demonstrado uma redução na formação óssea a nível tecidual e celular, resultando numa redução do volume ósseo e na espessura trabecular. Em adição, um aumento no *turnover* e, ou reabsorção óssea tem sido observado em muitos estudos, particularmente em associação com a utilização de altas doses de glicocorticóides (CARBONARE et al., 2001; LOCASCIO et al., 1998).

Quando comparados com o grupo controle com osteoporose, observa-se um aumento significativo no número de trabéculas nos animais tratados com atorvastatina (+10,53%) aos 10 dias de experimento. Já aos 20 dias de tratamento, todos os grupos

tratados apresentaram aumentos significativos e aos 30 dias de tratamento, apenas a ipriflavona (+38,30%) foi eficaz em aumentar o número de trabéculas ósseas.

Vários trabalhos têm demonstrado que a ipriflavona aumenta a densidade mineral óssea em humanos e animais com osteoporose. CIVITELLI et al. (1995) avaliaram o efeito da ipriflavona, durante um mês, (dose 200 ou 400 mg/kg) sobre as propriedades biomecânicas e composição mineral óssea. Na dose mais elevada a ipriflavona melhorou as propriedades biomecânicas dos ossos quando comparadas com o grupo controle, sugerindo uma maior capacidade de suportar stress mecânico. Esses dados foram confirmados pelos estudos de força de impacto que demonstraram um gasto maior de energia para fraturar o osso dos animais tratados com ipriflavona na dose de 400 mg/kg. Com relação aos níveis de cálcio, fósforo e magnésio nos ossos, nenhuma alteração foi observada entre os animais tratados com ipriflavona e os do grupo controle. Além disso, nessa dosagem houve um aumento na densidade mineral óssea, o que demonstra que o tratamento com ipriflavona aumentou a densidade óssea e melhorou as propriedades biomecânicas dos ossos sem alterar a composição mineral.

Com relação à espessura do osso cortical, nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos controle, bem como, entre eles e os grupos tratados (Tabela 7).

**Tabela 7** – Valores médios de espessura do osso cortical em  $\mu\text{m}$ , de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	133,38	144,92	145,11	141,14	-	-
Controle com osteoporose (G2)	128,72	118,44	126,97	124,71	-11,64	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	93,51	184,59	137,35	138,48 a	-1,88	+11,04
Dexametasona + Atorvastatina (G4)	121,44	146,57	135,51	134,51 a	-4,70	+7,86
Dexametasona + Ipriflavona (G5)	123,29	153,65	129,98	135,64 a	-3,90	+8,76

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Embora vários trabalhos demonstrem uma correlação positiva entre a utilização de alendronato e ipriflavona no metabolismo ósseo, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram observados por AKAHOSHI et al. (2005). Esses pesquisadores avaliaram o efeito do alendronato (na dose de 1 mg/kg de peso/dia)

isoladamente ou associado à vitamina D ativa em mini porcos com osteoporose induzida por glicocorticóides. Para estudar o efeito dessas substâncias no metabolismo ósseo eles avaliaram a espessura trabecular e cortical, sendo que nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo tratado com glicocorticóide (grupo controle) e os grupos que receberam alendronato e/ou vitamina D.

## Efeito de alendronato de sódio isoladamente e em associação com atorvastatina cálcica, ipriflavona e rutina na osteoporose induzida por dexametasona

Aos 20 dias de tratamento, observou-se uma redução significativa na calcemia no grupo tratado com alendronato associado à atorvastatina (+23,44%) em relação ao grupo controle com osteoporose. Ao final do período experimental, nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos controle, bem como, entre eles e os grupos tratados (Tabela 8).

**Tabela 8** – Valores médios de cálcio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	13,57	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	13,70	+0,96	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	12,55 a	-7,52	-8,39
	Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	12,58 a	-7,30	-8,18
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	12,13 a	-10,61	-11,46
	Dexametasona + Rutina (G6)	11,72 a	-13,63	-14,45
20	Controle (G1)	11,88	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	9,00	-24,24 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	9,75 b	-17,93 *	+8,33
	Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	11,11 a	-6,48	+23,44*
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	10,22 ab	-13,97	+13,56
	Dexametasona + Rutina (G6)	9,67 b	-18,60 *	+7,44
30	Controle (G1)	12,57	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	12,17	-3,18	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	12,12 a	-3,58	-0,41
	Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	12,38 a	-1,51	+1,73
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	12,53 a	-0,32	+2,96
	Dexametasona + Rutina (G6)	12,40 a	-1,35	+1,89

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

OLIVEIRA et al. (2003) encontraram resultados similares quando avaliaram o efeito do flavonóide rutina nas dosagens de 20, 40 e 60 mg sobre os níveis sanguíneos de cálcio, fósforo e cloreto em coelhos da raça Nova Zelândia. Os resultados desse trabalho demonstraram que independente das dosagens utilizadas, a rutina não alterou a

calcemia nesses animais. Com relação ao fósforo apenas os coelhos fêmeas que ingeriram 20 mg de rutina apresentaram redução significativa na fosfatemia.

Para os níveis séricos de fósforo, nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos controle, bem como, entre eles e os grupos tratados, aos 30 dias de experimento (Tabela 9).

**Tabela 9** – Valores médios de fósforo sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	3,82	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	5,09	+33,25 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	4,33 a	+13,35 *	-14,93 *
	Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	3,50 b	-8,38	-31,24 *
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	3,45 b	-9,69	-32,22 *
	Dexametasona + Rutina (G6)	4,05 ab	+6,02	-20,43 *
20	Controle (G1)	4,68	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	4,88	+4,27	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	5,83 a	+24,57 *	+19,47 *
	Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	5,42 ab	+15,81 *	+11,07 *
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	5,11 ab	+9,19 *	+9,19 *
	Dexametasona + Rutina (G6)	4,72 b	+0,85	-3,28
30	Controle (G1)	4,98	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	4,99	+0,20	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	4,77 a	-4,22	-4,41
	Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	4,72 a	+4,78	-5,41
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	4,92 a	-1,20	-1,40
	Dexametasona + Rutina (G6)	4,68 a	-6,02	-6,02

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Com relação aos níveis séricos de cálcio e fósforo, resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram relatados por VALENTE et al. (1994) quando avaliaram o efeito de ipriflavona (600 mg/dia) em mulheres na pós-menopausa com baixa densidade mineral óssea. Todas as pacientes receberam suplementação de cálcio (1g/dia). Após 12 meses de tratamento nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis séricos de cálcio, fósforo, osteocalcina e fosfatase alcalina e nos níveis de cálcio, fosfato e hidroxiprolina urinária. Entretanto, houve um aumento na densidade

mineral óssea nas mulheres que receberam ipriflavona, enquanto as mulheres do grupo placebo apresentaram uma redução na mesma.

Durante todo o período experimental não houve diferença significativa nos níveis séricos de magnésio entre os grupos controle, sendo que apenas o grupo tratado com alendronato associado à ipriflavona apresentou redução significativa na magnesemia (-11.61%), quando comparado com o grupo controle com osteoporose (Tabela 10).

**Tabela 10** – Valores médios de magnésio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	2,72	0,67	0,95	1,45	-	-
Controle com osteoporose (G2)	2,82	0,80	1,02	1,55	+6,90	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	3,02	0,93	0,94	1,63 a	+12,41 *	+5,16
Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	2,69	0,97	0,93	1,53 ab	+5,52	-1,29
Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	2,52	0,70	0,90	1,37 b	-5,52	-11,61*
Dexametasona + Rutina (G6)	2,78	0,68	0,80	1,42 ab	-2,07	-8,39

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Para os níveis séricos de glicose, observou-se um aumento significativo no grupo controle com osteoporose (+37,57%) em relação ao controle. Os resultados também demonstram que a associação de alendronato e ipriflavona (-31,85%) foi eficaz em reduzir os níveis de glicemia em ratas com osteoporose induzida pela utilização de dexametasona (Tabela 11).

Sabe-se que a corticoterapia prolongada pode levar a uma hiperglicemia. Além disso, há uma relação entre o diabetes mellitus e a osteoporose. A redução da massa óssea foi descrita tanto em portadores de diabetes mellitus tipo 1 quanto em portadores de diabetes mellitus tipo 2. Os mecanismos fisiopatológicos relacionados à perda óssea no diabetes mellitus parecem incluir redução da atividade osteoblástica, alteração do metabolismo de fósforo e cálcio, redução da síntese colágena ou produção reduzida de IGF-I e insulina. Alguns estudos sugerem que pacientes com mau controle metabólico e longo tempo de evolução do diabetes mellitus tipo 1 apresentam maior risco de osteopenia (VARGAS et al., 2003).

**Tabela 11** – Valores médios de glicose sérica em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	151,22	121,93	193,32	155,49	-	-
Controle com osteoporose (G2)	202,93	181,07	257,73	213,91	+37,57*	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	206,80	115,30	194,93	172,34 ab	+10,84	-19,43
Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	204,62	131,72	221,70	186,01 ab	+19,63	-13,04
Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	129,88	138,60	168,84	145,77b	-6,25	-31,85*
Dexametasona + Rutina (G6)	213,63	157,63	206,10	192,45a	+23,77*	-10,03

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Aos 10, 20 e 30 dias de experimento, nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis ósseos de proteínas não colagenosas entre os grupos controle (Tabela 12). Quando comparado com o grupo controle com osteoporose, observa-se que o grupo tratado com alendronato associado à atorvastatina apresentou aumento significativo nesse parâmetro (+29,37%).

**Tabela 12** – Valores médios de proteínas não colagenosas em mg/100mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	1,59	1,27	1,53	1,46	-	-
Controle com osteoporose (G2)	1,77	1,16	1,36	1,43	-2,05	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	1,43	1,15	1,32	1,30 c	-10,96	-9,09
Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	1,86	1,74	1,96	1,85 a	+26,71 *	+29,37 *
Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	1,64	1,57	1,61	1,61 ab	+10,27	+12,59
Dexametasona + Rutina (G6)	1,93	1,27	1,47	1,56 bc	+6,85	+9,09

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Com relação aos níveis ósseos de proteínas colagenosas, observa-se uma redução significativa no grupo controle com osteoporose em relação ao grupo controle (-26,98%); sendo que um aumento significativo foi observado no grupo tratado com

alendronato (+16,87%) quando comparado com o grupo controle com osteoporose (Tabela 13).

**Tabela 13** – Valores médios de proteínas colagenosas em mg/100mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	34,44	35,89	28,75	33,03	-	-
Controle com osteoporose (G2)	23,17	22,22	26,97	24,12	-26,98 *	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	29,35	27,05	28,18	28,19 a	-14,65	+16,87 *
Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	26,64	24,11	26,73	25,83 b	-21,80 *	+7,09
Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	25,32	25,50	28,74	26,52 b	-19,71 *	+9,95
Dexametasona + Rutina (G6)	27,27	28,25	22,76	26,08 b	-21,04 *	+8,13

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

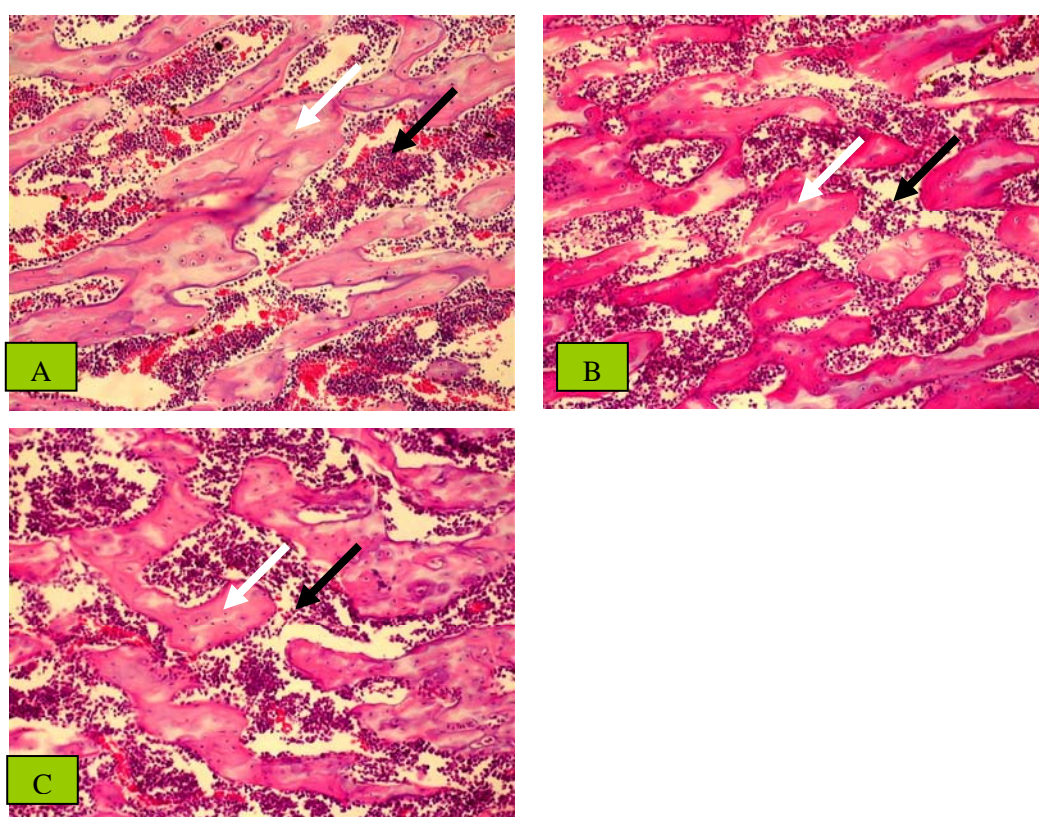
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Estudos demonstraram que os glicocorticóides suprimem a função osteoblástica, inibindo a replicação celular, a síntese de colágeno e de proteínas não colagenosas (LANNA et al., 2003). Esses resultados explicam a redução nos níveis ósseos de proteínas colagenosas no grupo que recebeu dexametasona. Entretanto, o tratamento com alendronato aumentou os níveis dessa proteína, demonstrando a eficácia desse medicamento em estimular a síntese de tecido ósseo.

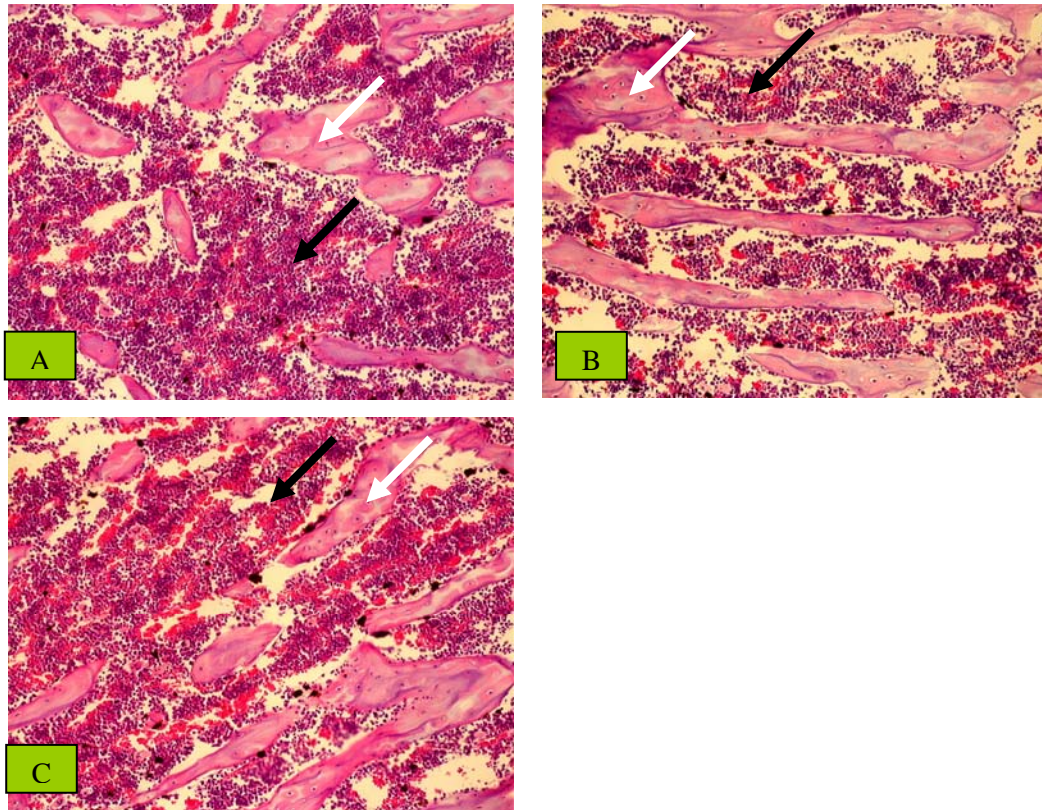
PEDRAZZONI et al. (1995) avaliaram o efeito do alendronato (5 mg/dia durante 2 dias) e do clodronato (600 mg/dia durante 2 dias) em pacientes com osteoporose e doença de Paget. Após a administração do bifosfonato os pacientes foram monitorados durante 28 dias. Os pesquisadores observaram uma redução acentuada nos níveis urinários de hidroxiprolina, piridinolina livre e telopeptídeos aminoterminal do colágeno tipo I em todos os pacientes, sendo que a redução mais acentuada ocorreu aos 7 e 14 dias após a administração dos medicamentos.

Esses resultados demonstraram que o alendronato e o clodronato reduzem a degradação de colágeno, uma vez que os telopeptídeos aminoterminal do colágeno tipo I são liberados durante a degradação do colágeno tipo I, circulam no sangue e são excretados na urina. Portanto, esses dados justificariam os maiores níveis de proteínas colagenosas encontradas nos ossos dos animais que receberam alendronato.

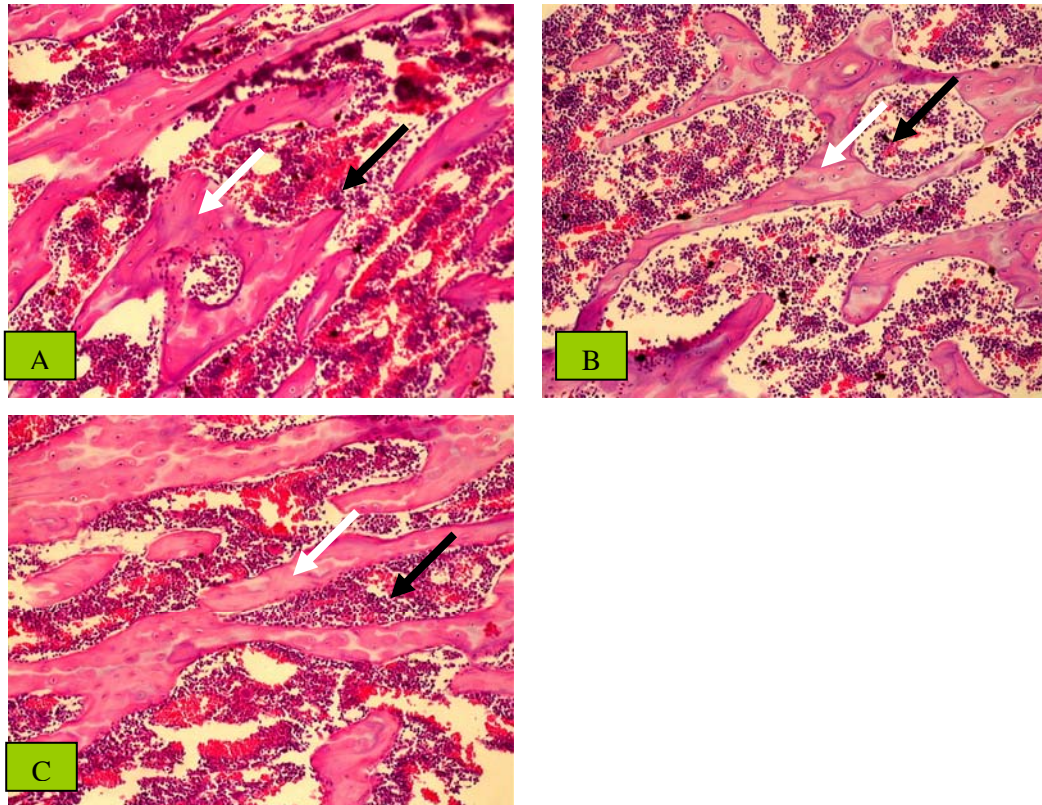
As Figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18 mostram os cortes histológicos da região do terço proximal do fêmur esquerdo dos animais aos 10, 20 e 30 dias de experimento, respectivamente. As setas brancas mostram a região trabecular e as setas pretas a cavidade medular. Ao avaliar os cortes histológicos do grupo que recebeu dexametasona observou-se uma redução no número de trabéculas ósseas acompanhada por um aumento na cavidade medular (Figura 14). Além disso, os cortes histológicos dos animais tratados com as diferentes substâncias e associações, apresentados nas Figuras 15, 16, 17 e 18, evidenciaram um aumento no número de trabéculas. Esses resultados podem ser comprovados mediante os dados apresentados na Tabela 14.



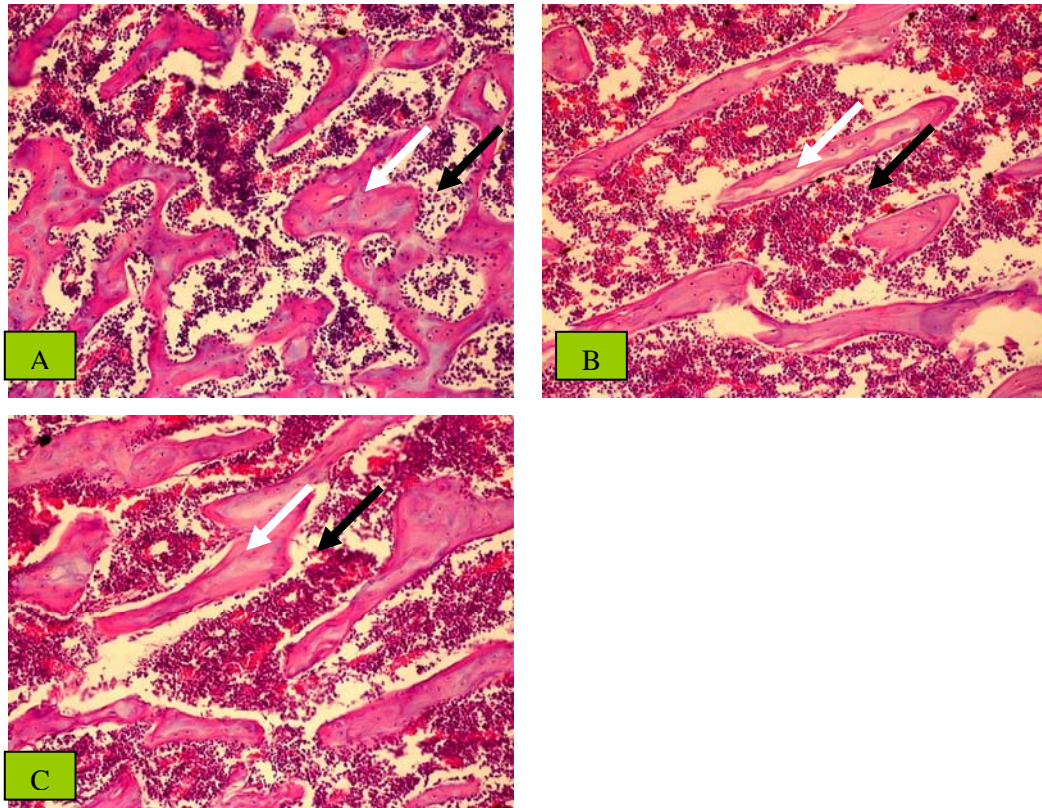
**Figura 13** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G1 (controle) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



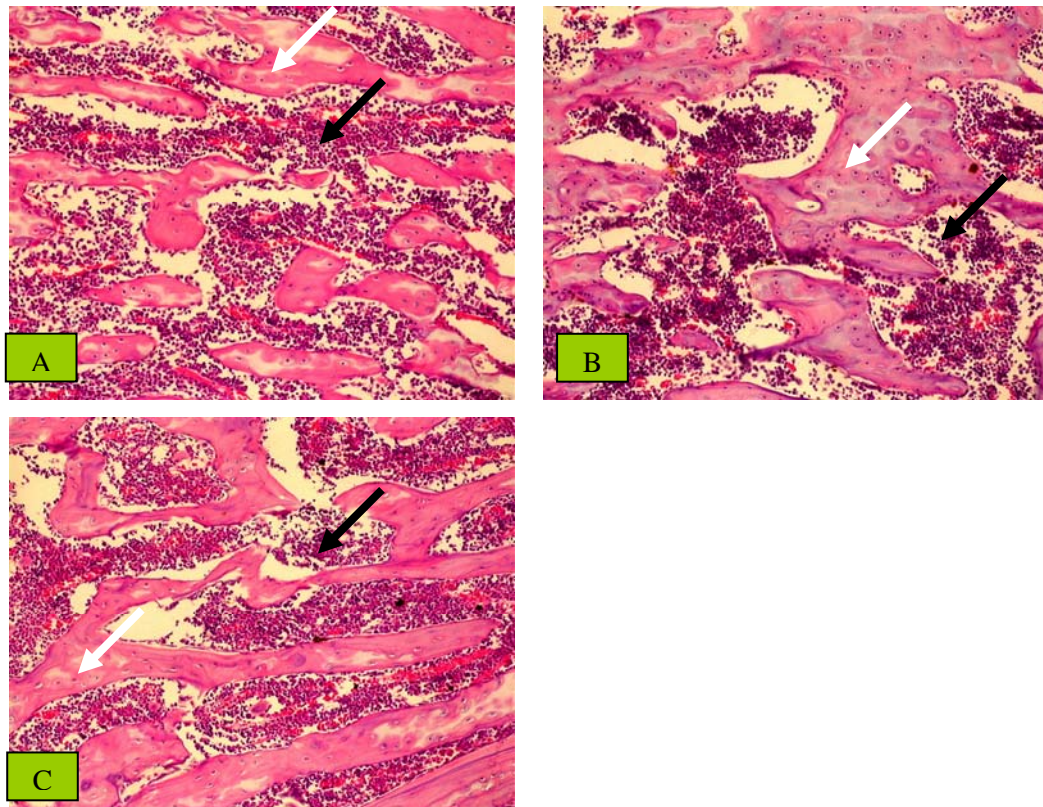
**Figura 14** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G2 (controle com osteoporose) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



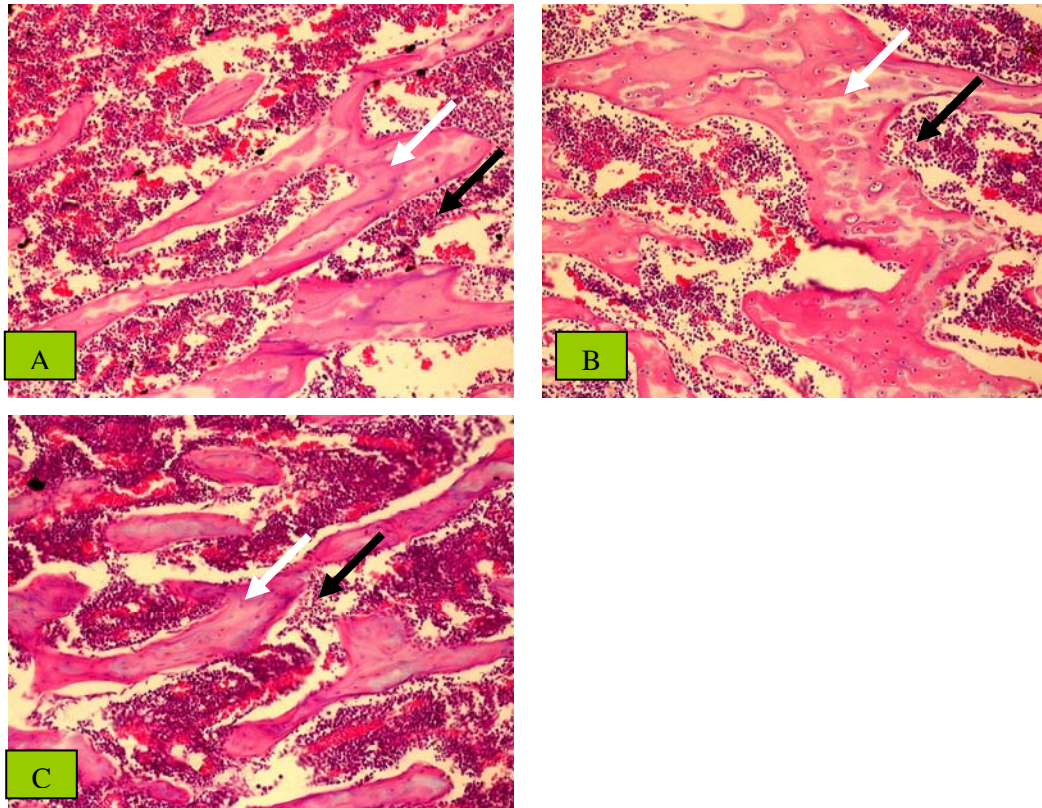
**Figura 15** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G3 (dexametasona + alendronato) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 16** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G4 (dexametasona + alendronato + atorvastatina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 17** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G5 (dexametasona + alendronato + ipriflavona) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 18** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G6 (dexametasona + rutina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.

Durante todo o período experimental houve uma redução significativa no número de trabéculas ósseas no grupo que recebeu dexametasona, quando comparado com o grupo controle (Tabela 14). Várias pesquisas têm demonstrado que os glicocorticóides reduzem a massa óssea. Um estudo com duração de 3 semanas, realizado com o objetivo de avaliar o efeito da dexametasona no metabolismo ósseo, demonstrou que essa droga reduz a espessura e o número de trabéculas no fêmur distal. Além disso, houve uma redução nos níveis séricos de osteocalcina, marcador de formação óssea, em todos os ratos tratados com dexametasona (McLAUGHLIN et al., 2002).

**Tabela 14** – Valores médios do número de trabéculas ósseas em pontos percentuais do fêmur de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	58,83	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	22,50	-61,75 *	-
	Dexametasona + Alendronato (G3)	35,67 a	-39,37 *	+58,53 *
	Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	36,67 a	-37,67 *	+62,98 *
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	35,67 a	-39,37 *	+58,53 *
	Dexametasona + Rutina (G6)	31,17 bc	-47,02 *	+38,53 *
	20	Controle (G1)	57,83	.
Controle com osteoporose (G2)		22,17	-61,66 *	.
Dexametasona + Alendronato (G3)		39,00 b	-32,56 *	+75,91 *
Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)		27,50 c	-52,45 *	+24,04
Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)		34,17 bc	-40,91 *	+54,13 *
Dexametasona + Rutina (G6)		50,50 a	-12,68	+127,79 *
30		Controle (G1)	59,50	.
	Controle com osteoporose (G2)	27,33	-54,07 *	.
	Dexametasona + Alendronato (G3)	53,67 a	-9,80	+96,38 *
	Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	42,83 b	-28,02 *	+56,71 *
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	37,50 b	-36,97 *	+37,21 *
	Dexametasona + Rutina (G6)	45,83 abc	-22,97 *	+67,69 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Aos 10 dias de tratamento, observou-se que houve aumento significativo no número de trabéculas em todos os grupos tratados. Aos 20 dias de tratamento apenas os grupos que receberam alendronato, alendronato associado à ipriflavona e rutina isoladamente foram eficazes em aumentar a mesma. Ao final do período experimental todos os grupos tratados aumentaram o número de trabéculas, sendo que o resultado mais pronunciado foi observado no grupo tratado com alendronato (+96,38%).

Resultados semelhantes foram encontrados por DA PAZ et al. (2001). Estes pesquisadores avaliaram o efeito do 17  $\beta$ -estradiol (30  $\mu$ g/kg) e do alendronato (0,1 mg/kg), via subcutânea, na prevenção da perda óssea em ratas ovariectomizadas. Ao final do período experimental observou-se uma redução significativa na densidade mineral óssea e no volume trabecular nas ratas ovariectomizadas. Tanto o alendronato quanto o 17  $\beta$ -estradiol aumentaram a densidade mineral óssea e o volume trabecular, sendo que esse efeito foi mais pronunciado nos animais que receberam alendronato. Os pesquisadores concluíram que nas doses utilizadas, o alendronato foi mais eficaz na prevenção da perda óssea.

Pesquisadores avaliaram o efeito da atorvastatina na produção do RANKL e de OPG em osteoblastos humanos. Enquanto o RANKL aumenta a formação e a ativação do osteoclasto, desse modo, promovendo a perda óssea, a OPG age como um receptor solúvel e antagoniza os efeitos do RANKL. A atorvastatina aumentou os níveis de RNA mensageiro de OPG e a secreção dessa proteína, sendo que o máximo de efeito ocorreu na dose de  $10^{-6}$  M. Além disso, a atorvastatina anulou o efeito inibitório dos glicocorticóides sobre a produção de OPG. O tratamento com atorvastatina em osteoblastos humanos aumentou a expressão de marcadores de diferenciação osteoblástica, osteocalcina e fosfatase alcalina. Os dados sugerem que a atorvastatina aumenta a diferenciação osteoblástica e a produção de OPG (VIERECK et al., 2005), o que pode contribuir para a redução da perda óssea

Com relação à espessura do osso cortical (Tabela 15), observou-se que o grupo controle com osteoporose apresentou uma redução significativa em relação ao grupo controle (-18,24%), sendo que os grupos tratados com alendronato, alendronato associado à atorvastatina e rutina isoladamente foram eficazes em aumentar a mesma. De acordo com esses resultados, podemos observar que o tratamento com a dexametasona alterou o metabolismo ósseo, reduzindo a espessura do osso cortical do fêmur das ratas ao passo que a rutina, alendronato e o alendronato associado à atorvastatina reverteram esse efeito.

**Tabela 15** – Valores médios de espessura do osso cortical em  $\mu\text{m}$ , de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Tratamentos	Época de coleta (dias)			Média	% de variação em relação à:	
	10	20	30		G1	G2
Controle (G1)	133,38	144,91	145,11	141,13	-	-
Controle com osteoporose (G2)	115,04	118,34	112,79	115,39	-18,24*	-
Dexametasona + Alendronato (G3)	137,93	127,65	137,53	134,37 a	-4,79	+16,45*
Dexametasona + Alendronato + Atorvastatina (G4)	135,32	163,93	140,62	146,62 a	+3,89	+27,06*
Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona (G5)	123,48	130,17	141,98	131,88 b	-6,55	+14,29
Dexametasona + Rutina (G6)	132,99	139,49	134,53	135,67 a	-3,87	+17,58*

Em cada coluna, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Várias pesquisas demonstram que o *turnover* e a reabsorção óssea estão aumentados nos estágios avançados de terapia com glicocorticóide, visto que a redução na formação óssea é predominante nesse período. Entretanto estudos prospectivos têm demonstrado uma rápida perda óssea e um aumento no risco de fraturas durante os primeiros meses de terapia com glicocorticóide, que pode ser explicado com base no baixo *turnover* e formação óssea (VAN STAA et al., 2000).

VEDI et al. (2005) avaliaram, através da análise histomorfométrica, o osso cortical de 14 pacientes (nove mulheres e cinco homens) com idade entre 18 e 48 anos, tratados com glicocorticóides. Os resultados demonstraram que a porosidade do osso cortical aumentou nos pacientes que fizeram essa terapia em longo prazo. Os autores relatam que esses resultados são devido a um aumento na reabsorção óssea durante os estágios finais de terapia com glicocorticóide, em combinação com uma redução, a longo prazo, da formação óssea.

O alendronato de sódio é uma droga que inibe o *turnover* e a reabsorção óssea, sendo usada no tratamento da osteoporose pós-menopausa (PYTLIK et al. 2004; BROULIK et al., 2005). PYTLIK et al. (2004) avaliaram o efeito do alendronato de sódio (dose de 3 mg/kg de peso/dia) isoladamente e em associação com o retinol, sobre a remodelação óssea de ratas ovariectomizadas. Foram avaliados o ganho de peso, o conteúdo de mineral na tíbia, fêmur e vértebras, além da espessura do osteóide, crescimento transversal do endóstio e perióstio, área da cavidade da medula óssea e do osso cortical. Os resultados demonstraram que o alendronato de sódio inibiu alterações

no metabolismo ósseo que ocorrem com a ovariectomia. Quando administrado em associação com o retinol, o efeito do alendronato foi atenuado.

FOLDES et al. (1988) estudaram o efeito da ipriflavona (dose de 40 mg/kg de peso durante oito semanas) em ratos. Com relação às análises histológicas e histomorfométricas os pesquisadores observaram que o tratamento com ipriflavona reduziu a reabsorção óssea e aumentou a espessura cortical. Além disso, a redução na densidade trabecular óssea foi menos aparente na metáfise e na diáfise. Os autores concluíram que o tratamento não preveniu a osteoporose, mas reduziu significativamente os efeitos da mesma.

**Efeito de ipriflavona associada à atorvastatina cálcica e de rutina isoladamente e em associação com ipriflavona e alendronato de sódio na osteoporose induzida por dexametasona**

A Tabela 16 mostra os valores médios de cálcio sérico. Aos 10 e 30 dias de tratamento observa-se que não houve diferença significativa na calcemia entre os grupos controle. Com relação aos grupos tratados, estes apresentaram uma redução significativa na calcemia quando comparada com o grupo controle com osteoporose.

Embora vários trabalhos não relatem alterações na calcemia em animais tratados com ipriflavona (CIVITELLI et al., 1995; VALENTE et al., 1994, PINTO, 2004), alendronato e atorvastatina (PINTO, 2004), observamos uma redução na calcemia em todos os grupos tratados ao longo do período experimental.

**Tabela 16** – Valores médios de cálcio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	13,45	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	13,30	-1,12	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	9,22 a	-31,45 *	-30,68 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	8,75 a	-34,94 *	-34,21 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	8,79 a	-34,65 *	-33,91 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	9,07 a	-32,57 *	-31,80 *
20	Controle (G1)	11,88	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	9,15	-22,98 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	9,12 a	-23,23 *	-0,33
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	9,94 a	-16,33 *	+8,63
	Dexametasona + Rutina (G5)	9,50 a	-20,03 *	+3,83
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	10,37 a	-12,71 *	+13,33
30	Controle (G1)	12,57	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	12,17	-3,18	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	10,20 a	-18,85 *	-16,19 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	10,08 a	-19,81 *	-17,17 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	8,54 b	-32,06 *	-29,83 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	10,33 a	-17,82 *	-15,12 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Aos 10 dias de tratamento houve um aumento significativo nos níveis séricos de fósforo no grupo controle com osteoporose (+33,25%). Ao final do período experimental, os grupos tratados com alendronato associado à ipriflavona e rutina (+52,51%) e ipriflavona associada à rutina (+48,50%) apresentaram elevações significativas nos níveis séricos desse mineral (Tabela 17).

**Tabela 17** – Valores médios de fósforo sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	3,82	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	5,09	+33,25 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	6,86 b	+79,58 *	+34,77 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	8,06 ab	+110,99 *	+58,35 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	6,44 b	+68,59 *	+26,52
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	8,72 a	+128,27 *	+71,32 *
20	Controle (G1)	4,68	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	4,88	+4,27	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	7,51 a	+60,47 *	+53,89 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	8,09 a	+72,86 *	+65,78 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	7,57 a	+61,75 *	+55,12 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	8,28 a	+76,92 *	+69,67 *
30	Controle (G1)	4,98	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	4,99	+0,20	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	7,61 a	+52,81 *	+52,51 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	7,41 a	+48,80 *	+48,50 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	4,43 b	-11,04	-11,22
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	5,96 ab	+19,68	+19,44

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Embora a maior parte dos estudos demonstre uma redução nos níveis séricos de fósforo com a administração de ipriflavona ou glicocorticóides (CIVITELLI et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2003) resultados similares aos encontrados nesse trabalho foram observados por ZANCHETTA et al. (1997). Esses pesquisadores avaliaram o efeito da utilização do pamidronato na dose de 200mg/dia em mulheres com osteoporose pós-menopausa e observaram tendência a um discreto aumento nos níveis

séricos de fosfato. Além disso, a calcemia apresentou-se com valores normais sendo que nenhum episódio hipocalcêmico foi relatado.

A Tabela 18 mostra os valores médios dos níveis séricos de magnésio. Nenhuma alteração significativa foi encontrada nos diferentes grupos aos 20 e 30 dias de tratamento.

**Tabela 18** – Valores médios de magnésio sérico em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	2,72	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	1,05	-61,40 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	1,04 b	-61,76 *	-0,95
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	0,86 b	-68,38 *	-18,10
	Dexametasona + Rutina (G5)	0,68 b	-75,00 *	-35,24
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	1,70 a	-37,50 *	+61,90 *
20	Controle (G1)	0,67	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	0,80	+19,40	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	0,82 a	+22,39	+2,50
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	0,65 a	-2,99	-2,99
	Dexametasona + Rutina (G5)	0,77 a	+14,93	-3,75
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	1,08 a	+61,19	+35,00
30	Controle (G1)	0,95	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	1,02	+7,37	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	1,18 a	+24,21	+15,69
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	0,75 a	-21,05	-26,47
	Dexametasona + Rutina (G5)	0,72 a	-24,21	-29,41
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	0,81 a	-14,74	-20,59

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Como já citado, é difícil determinar o estado de magnésio porque os níveis séricos desse mineral permanecem constantes mesmo quando se tem uma grande variação na dieta. Além disso, outros pesquisadores têm demonstrado uma tendência à manutenção de níveis normais de magnesemia, quando avaliaram o efeito da ipriflavona

sobre as propriedades biomecânicas dos ossos de ratos adultos (CIVITELLI et al., 1995).

De acordo com a Tabela 19, observa-se que ao final do período experimental houve um aumento significativo na glicemia no grupo controle com osteoporose (+53,25%) em relação ao grupo controle. Com relação aos grupos tratados, nota-se que os animais que receberam alendronato associado à ipriflavona e rutina e rutina isoladamente apresentaram redução significativa na glicemia aos 10 e 30 dias de tratamento, o que demonstra a eficácia dessas substâncias no tratamento de hiperglicemia induzida pela utilização de glicocorticóide.

**Tabela 19** – Valores médios de glicose sérica em mg/dL de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	151,22	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	280,45	+85,46 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	129,88 a	-14,11	-53,69 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	185,82 ab	+22,88	-33,74 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	206,48 b	+36,54	-26,37 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	236,17 b	+56,18 *	-15,79
	20	Controle (G1)	121,93	.
Controle com osteoporose (G2)		138,60	+13,67	.
Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)		98,00 c	-19,63	-29,29
Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)		180,52 b	+48,05 *	+30,25
Dexametasona + Rutina (G5)		275,48 a	+125,93 *	+98,76 *
Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)		154,62 bc	+26,81	+11,56
30		Controle (G1)	193,32	-
	Controle com osteoporose (G2)	296,27	+53,25 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	168,84 a	-12,66	-43,01 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	250,64 b	+29,65 *	-15,40
	Dexametasona + Rutina (G5)	214,53 ab	+10,97	-27,59 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	226,40 ab	+17,11	-23,58

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

O tratamento com glicocorticóides principalmente em altas doses induz resistência à insulina (RUZZIN et al., 2005) o que levaria ao aumento na glicemia, como observado nos animais que receberam tratamento com essa droga.

REDDY et al. (2001) estudaram a integridade estrutural do fêmur e da tíbia de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Os resultados demonstraram que o estado diabético está associado com deterioração mecânica do osso, resultando em ossos com integridade biomecânica inferior. A integridade biomecânica do osso é um dos mais importantes fatores relacionados com o risco de fratura.

Os produtos finais de glicação avançada estão associados a um número de condições degenerativas crônicas especialmente com o diabetes, e tem sido relacionados com a reabsorção óssea (MIYATA et al., 1997). Estudos realizados por CERVANTES-LAUREAN et al. (2005), demonstraram que a rutina e os seus metabólitos inibem a formação de produtos finais de glicação avançada, induzidas pela glicose, no colágeno I *in vitro*, o que poderia contribuir para os efeitos benéficos à saúde associados com o consumo de rutina.

A Tabela 20 mostra os valores médios de proteínas não colagenosas nos diferentes grupos ao longo do período experimental. Mediante esses resultados observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos controle. No que se refere aos grupos tratados, nenhuma alteração foi observada ao final do período experimental.

**Tabela 20** – Valores médios de proteínas não colagenosas em mg/100mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	1,59	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	1,77	+11,32	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	1,69 ab	+6,29	-4,52
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	1,57 ab	-1,26	-11,30
	Dexametasona + Rutina (G5)	1,37 b	-13,84	-22,60 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	1,82 a	+14,47	+2,82
20	Controle (G1)	1,26	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	1,16	-7,94	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	1,65 a	30,95 *	+42,24 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	1,51 ab	+19,84 *	+30,17 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	1,30 b	+3,17	+12,07
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	1,63 a	+29,37 *	+40,52 *
30	Controle (G1)	1,52	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	1,35	-11,18	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	1,31 a	-13,82	-2,96
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	1,52 a	0	+12,59
	Dexametasona + Rutina (G5)	1,36 a	-10,53	+0,74
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	1,45 a	-4,61	-4,61

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Com relação aos valores médios de proteínas colagenosas, observa-se que aos 10 e 20 dias de experimento houve uma redução significativa nos níveis ósseos dessa proteína no grupo controle com osteoporose (-32,72% e -38,09%, respectivamente). Ao final do período experimental nenhum aumento significativo foi observado nos diferentes grupos tratados, quando comparados com o grupo controle com osteoporose (Tabela 21).

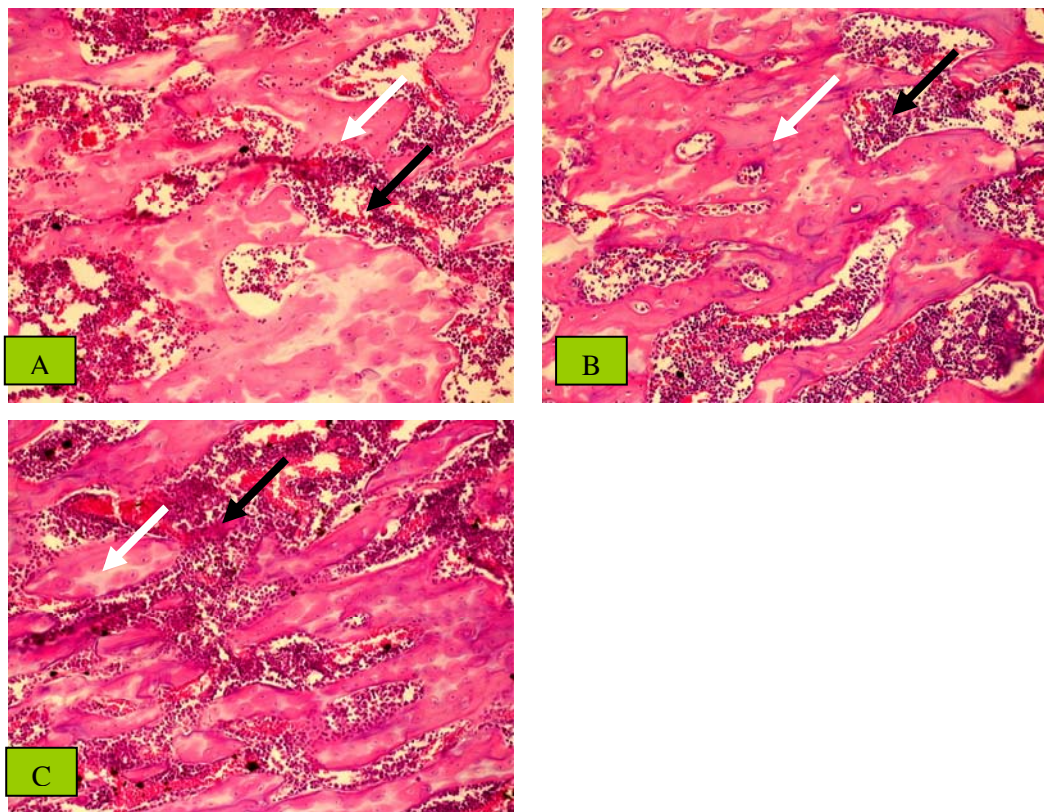
**Tabela 21** – Valores médios de proteínas colagenosas em mg/100mg de osso de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	34,44	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	23,17	-32,72 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	25,19 b	-26,86 *	+8,72
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	24,38 b	-29,21 *	+5,22
	Dexametasona + Rutina (G5)	13,57 c	-60,60 *	-41,43 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	28,73 a	-16,58	+24,00
	20	Controle (G1)	35,89	-
Controle com osteoporose (G2)		22,22	-38,09 *	-
Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)		25,90 a	-27,84 *	+16,56 *
Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)		23,55 ab	-34,38 *	+5,99
Dexametasona + Rutina (G5)		17,18 b	-52,13 *	-22,68 *
Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)		24,22 ab	-32,52 *	+9,00
30		Controle (G1)	28,75	-
	Controle com osteoporose (G2)	26,97	-6,19	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	28,38 ab	-1,29	+5,23
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	28,24 ab	-1,77	+4,71
	Dexametasona + Rutina (G5)	21,50 b	-25,22 *	-20,28 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	30,16 a	+4,90	+11,83

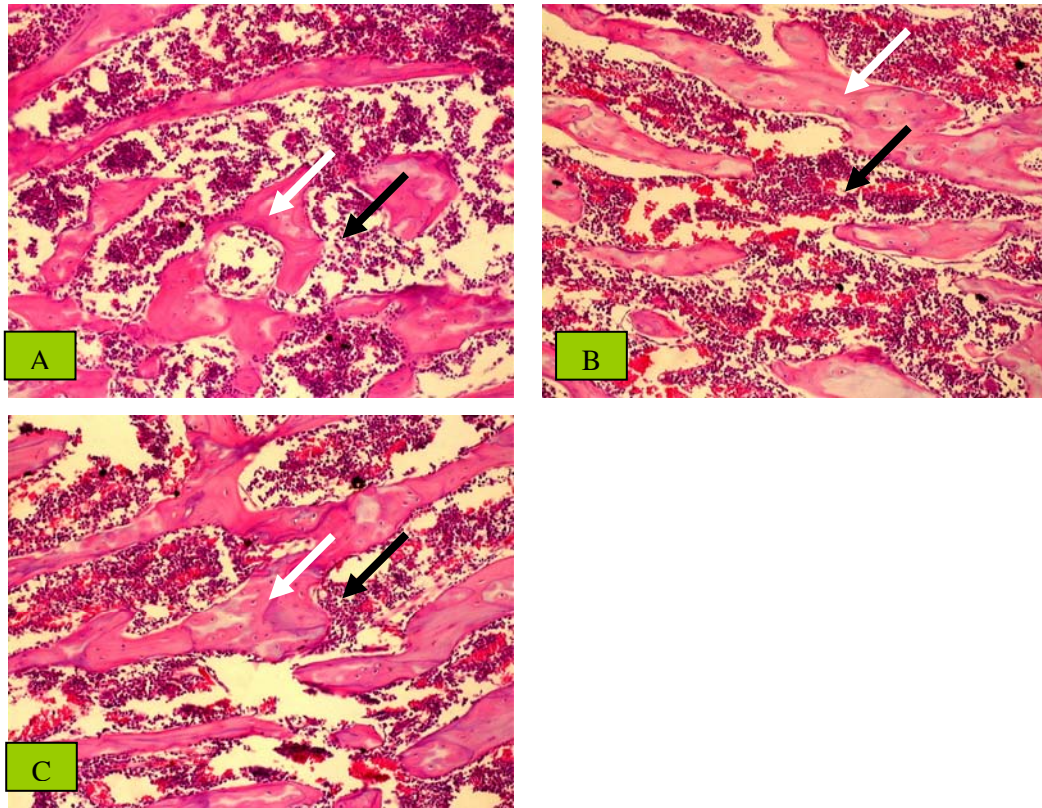
Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

CIVITELLI et al. (1995) relataram que o tratamento com a ipriflavona não alterou significativamente os níveis séricos de fosfatase alcalina ou de telopeptídeos do colágeno tipo I, dois marcadores de reabsorção óssea. Portanto, isso poderia justificar os melhores níveis de proteínas colagenosas encontrada nesse experimento nos grupos que receberam ipriflavona.

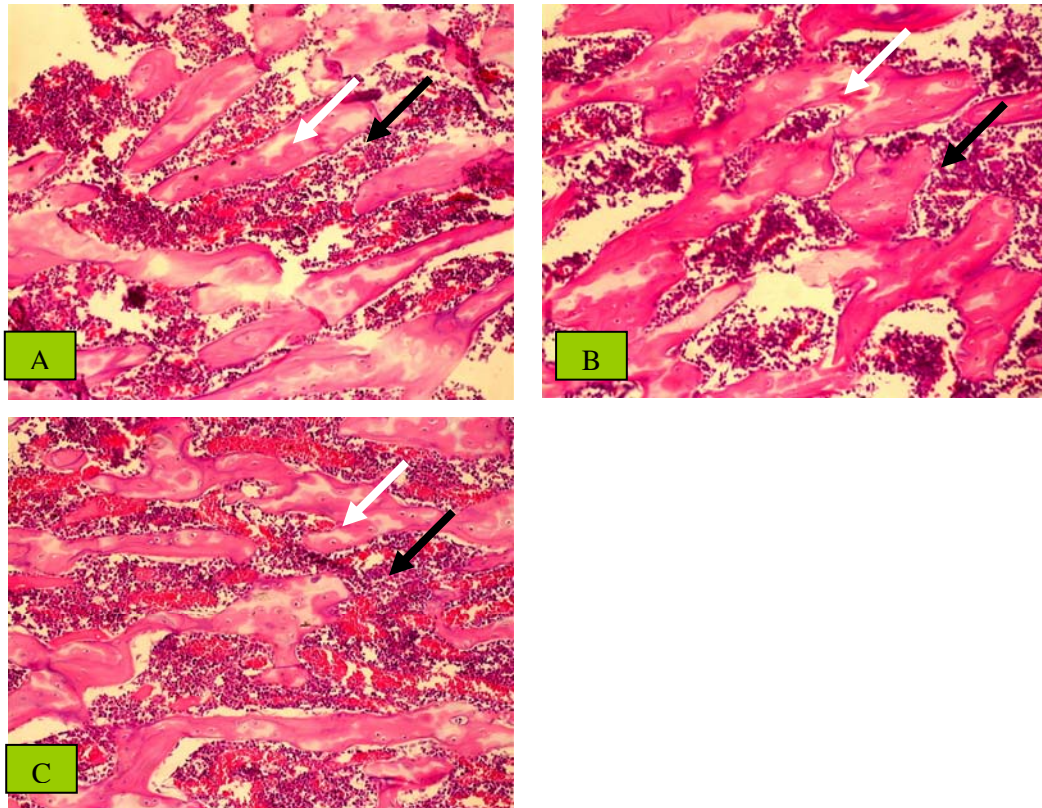
As Figuras 19, 20, 21, 22, 23 e 24 mostram os cortes histológicos da região do terço proximal do fêmur esquerdo dos animais aos 10, 20 e 30 dias de experimento, respectivamente. As setas brancas mostram a região trabecular e as setas pretas a cavidade medular. Ao avaliar os cortes histológicos do grupo que recebeu dexametasona observou-se novamente uma redução no número de trabéculas ósseas acompanhada por um aumento na cavidade medular (Figura 20). Além disso, os cortes histológicos dos animais tratados com as diferentes substâncias e associações, apresentados nas Figuras 21, 22, 23 e 24, evidenciaram um aumento no número de trabéculas ósseas.



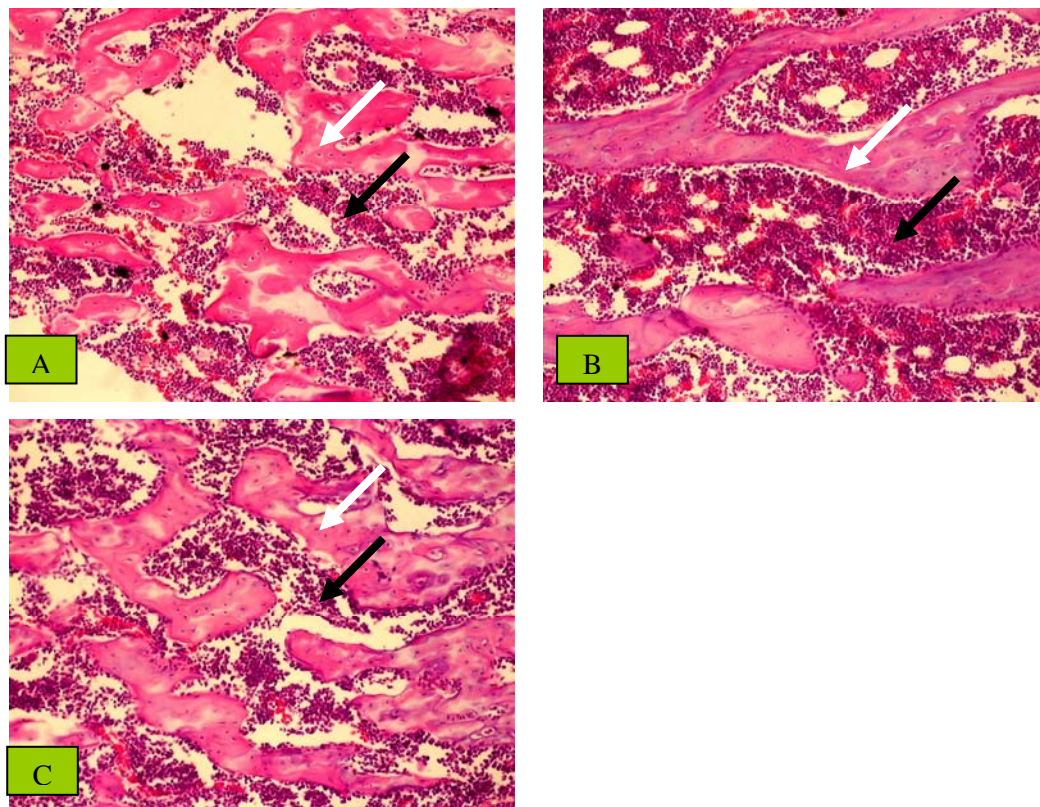
**Figura 19** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G1 (controle) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



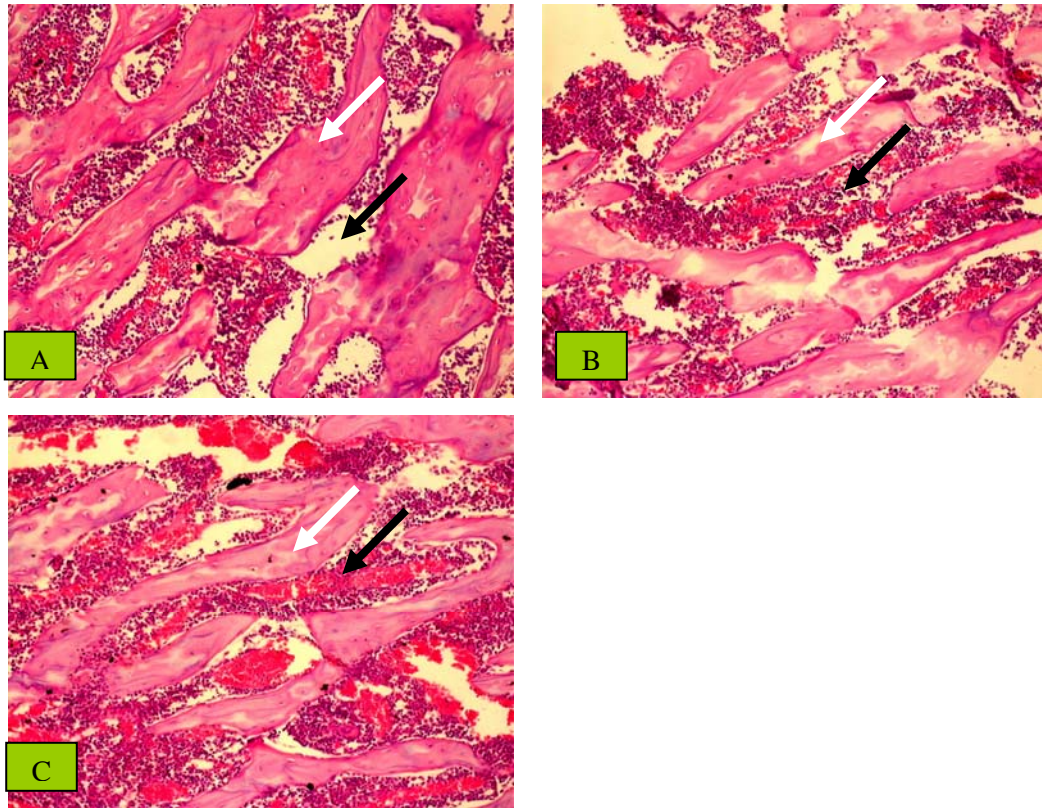
**Figura 20** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G2 (controle com osteoporose) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



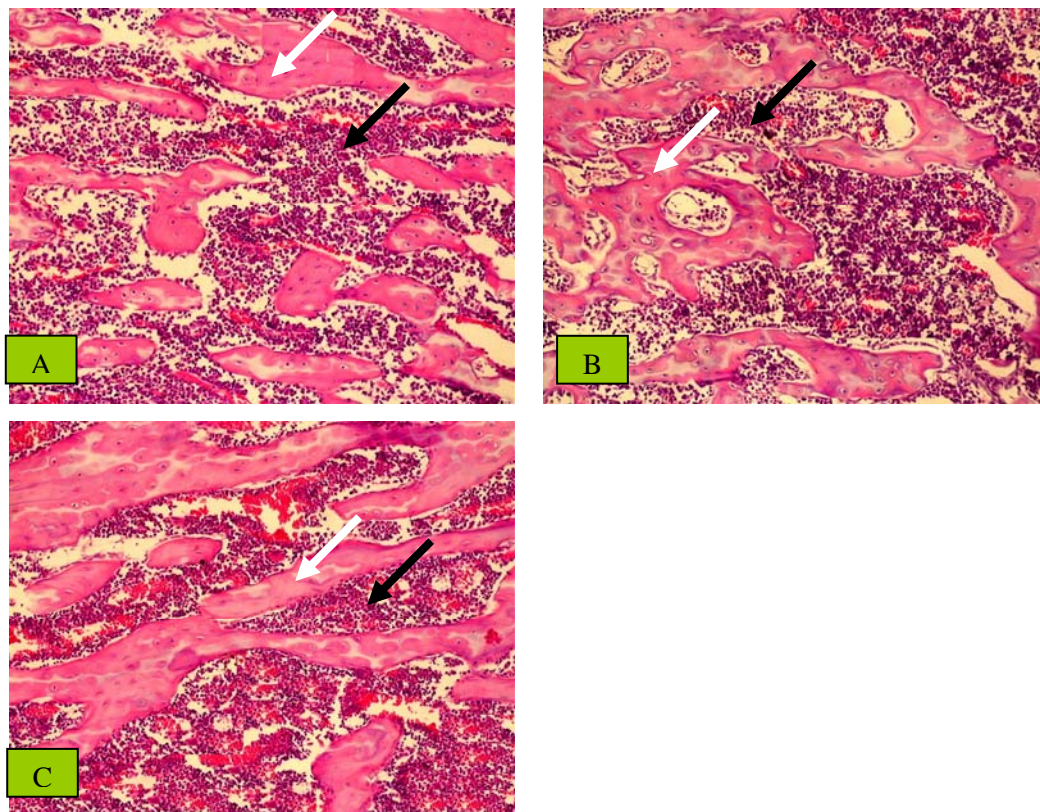
**Figura 21** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G3 (dexametasona + alendronato + ipriflavona + rutina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 22** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G4 (dexametasona + ipriflavona + rutina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 23** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G5 (dexametasona + rutina) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.



**Figura 24** – Microfotografia de osso trabecular (esponjoso) do terço proximal de fêmur de ratas do grupo G6 (dexametasona + atorvastatina + ipriflavona) aos 10 (A), 20 (B) e 30 (C) dias de tratamento. Coloração HE. Corte longitudinal. Aumento de 200x.  
Seta branca – trabécula óssea.  
Seta preta – cavidade medular.

Durante todo o período experimental houve uma redução significativa no número de trabéculas ósseas no grupo que recebeu dexametasona, quando comparado com o grupo controle (Tabela 22). Além disso, todas as substâncias testadas aumentaram significativamente o número de trabéculas ósseas, quando comparadas com o grupo controle com osteoporose.

**Tabela 22** – Valores médios do número de trabéculas ósseas em pontos percentuais do fêmur de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	58,83	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	28,50	-51,56 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	42,67 b	-27,47 *	+49,72 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	38,67 b	-34,27 *	+35,68 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	52,83 a	-10,20	+85,37 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	42,50 b	-27,76 *	+49,12 *
20	Controle (G1)	57,50	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	19,67	-65,79 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	56,17 a	-2,31	+185,56 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	40,00 b	-30,43 *	+103,36 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	38,17 b	-33,62 *	+94,05 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	38,17 b	-33,62 *	+94,05 *
30	Controle (G1)	59,50	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	30,83	-48,18 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	55,17 a	-7,28	+78,95 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	39,83 b	-33,06 *	+29,19 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	43,50 b	-26,89 *	+41,10 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	43,17 b	-27,45 *	+40,03 *

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram encontrados por PINTO (2004) quando avaliou o efeito do alendronato + atorvastatina, alendronato + ipriflavona e atorvastatina + ipriflavona em ratas com osteoporose induzida por dexametasona. As doses de alendronato, atorvastatina e ipriflavona utilizadas foram de 0,1mg/kg, 0,6 mg/kg e

50mg/kg, respectivamente. Através da avaliação da densidade trabecular óssea se observou um aumento da mesma em todos os tratamentos efetuados, sendo que as associações contendo alendronato de sódio apresentaram elevadas taxas de restauração tecidual óssea, alcançando valores superiores aos do grupo dos animais normais.

Pesquisas têm demonstrado que a rutina atua no metabolismo ósseo. HORCAJADA-MOLTENI et al. (2000) avaliaram o efeito de rutina sobre o metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas. No final do período experimental, tanto a excreção urinária de deoxipiridinolina (marcador da reabsorção óssea) quanto a calciúria estavam mais elevadas nos animais do grupo ovariectomizado do que nos grupos ovariectomizados que receberam rutina e no grupo controle. A concentração de osteocalcina do plasma foi mais elevada nas ratas do grupo ovariectomizado que recebeu rutina quando comparado ao grupo controle. Estes resultados indicam que a rutina (e/ou seus metabólitos), inibem a perda óssea trabecular induzida pela ovariectomia nas ratas, reduzindo a reabsorção óssea e aumentando a atividade osteoblástica.

KAWANE et al. (2004) avaliaram o efeito de atorvastatina (dose de 2 mg/kg/dia) isoladamente e em associação com o 17 beta-estradiol e o PTH humano em ratas ovariectomizadas. Os resultados demonstraram que a combinação da atorvastatina com o 17 beta-estradiol aumentou significativamente a densidade mineral óssea da vértebra lombar e da área de metáfise femural quanto comparada com os grupos que receberam 17 beta-estradiol ou atorvastatina isoladamente.

Ao final do período experimental, observa-se uma redução significativa na espessura do osso cortical no grupo controle com osteoporose (-22,27%). Com relação aos grupos tratados, apenas o grupo que recebeu alendronato associado à ipriflavona e rutina (+44,22%) e o grupo que recebeu rutina isoladamente (+40,78%) apresentaram aumentos significativos nesse parâmetro quando comparados com o grupo controle com osteoporose (Tabela 23).

**Tabela 23** – Valores médios de espessura do osso cortical em  $\mu\text{m}$ , de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nas respectivas épocas de coleta

Época de coleta (dias)	Tratamentos	Média	% de variação em relação à:	
			G1	G2
10	Controle (G1)	133,38	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	115,04	-13,75	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	155,98 a	+16,94 *	+35,59 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	135,02 b	+1,23	+17,37 *
	Dexametasona + Rutina (G5)	148,90 a	+11,64	+29,43 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	149,09 a	+11,78	+29,60 *
20	Controle (G1)	144,92	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	118,34	-18,34	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	144,92 a	0	+22,46
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	138,03 a	-4,75	+16,64
	Dexametasona + Rutina (G5)	129,40 a	-10,71	+9,35
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	133,96 a	-7,56	+13,20
30	Controle (G1)	145,11	-	-
	Controle com osteoporose (G2)	112,79	-22,27 *	-
	Dexametasona + Alendronato + Ipriflavona + Rutina (G3)	162,67 a	+12,10	+44,22 *
	Dexametasona + Ipriflavona + Rutina (G4)	125,71 c	-13,37	+11,45
	Dexametasona + Rutina (G5)	158,79 ab	+9,43	+40,78 *
	Dexametasona + Atorvastatina + Ipriflavona (G6)	132,11 bc	-8,96	+17,13

Em cada tempo, médias seguidas de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).  
\* Estatisticamente diferente do controle (G1 ou G2) pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

MAZZUOLI et al. (1992) avaliaram o efeito do tratamento com ipriflavona sobre a remodelação óssea no hiperparatireoidismo primário. Nove pacientes (6 mulheres e 3 homens) receberam por via oral, 1200 mg/dia de ipriflavona dividida em 3 doses diárias. Todos os pacientes foram tratados por 21 dias, sendo que em 5 deles o tratamento foi prolongado para 42 dias. Os resultados demonstraram que a ipriflavona afeta a remodelação óssea inibindo a reabsorção sem afetar a formação do osso. Portanto, a ipriflavona é indicada no tratamento das doenças metabólicas do osso caracterizadas por um aumento no *turnover* ósseo.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste trabalho conclui-se que nenhuma das substâncias avaliadas afetou os níveis séricos de magnésio, fósforo e proteínas colagenosas. Uma redução significativa nos níveis séricos de cálcio foi observada nos grupos que receberam alendronato associado à ipriflavona, ipriflavona associada à rutina e atorvastatina associada à ipriflavona; além disso, observou-se uma redução significativa no grupo tratado com rutina, entretanto a relação cálcio/fósforo se manteve adequada.

O alendronato, a atorvastatina e a ipriflavona, quando administrados isoladamente, e a associação de alendronato com atorvastatina aumentaram os níveis de proteínas não colagenosas. A rutina e a ipriflavona isoladamente e a associação de ipriflavona com alendronato e rutina foram eficazes em reduzir a glicemia induzida pela dexametasona. Através da análise histomorfométrica observou-se que a rutina, o alendronato e a ipriflavona isoladamente e em associações foram eficazes em aumentar o número de trabéculas ósseas.

Deste modo, essas substâncias usadas isoladamente ou as suas associações, podem ser promissoras no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticóide.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, S.; BUFALINO, L.; CERVETTI, R.; DI MARCO, C.; DI MUNNO, O.; FANTASIA, L.; ISAIA, G.C.; SERNI, V.; VECCHIET, I.; PASSERI, M. Ipriflavone prevents radial bone loss in postmenopausal women with low bone mass over 2 years. **Osteoporosis International**, v. 7, n. 2, p. 119-125, 1997.

AGNUSDEI, D.; ADAMI, S.; CERVETTI, R.; CREPALDI, G.; DiMUNNO, O.; FANTASIA, L.; ISAIA, G.C.; LETIZIA, G.; ORTOLANI, S.; PASSERI, M. Effects of ipriflavone on bone mass and calcium metabolism in postmenopausal osteoporosis. **Bone and Mineral**, v. 19, n. 1, p. S43-48, 1992.

AKAHOSHI, S.; SAKAI, A.; ARITA, S.; IKEDA, S.; MORISHITA, Y.; TSUTSUMI, H.; ITO, M.; SHIRAISHI, A.; NAKAMURA, T. Modulation of bone turnover by alfacalcidol and/or alendronate does not prevent glucocorticoid-induced osteoporosis in growing minipigs. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 341-350, 2005.

ALOIA, J.F.; VASWANI, A.; YEH, J.K.; ROSS, P.L.; FLASTER, E.; DILMANIAN, F.A. Calcium supplementation with and without hormone replacement therapy to prevent postmenopausal bone loss. **Annals of Internal Medicine**, v.120, n. 2, p. 97-103, 1994.

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**, v. 217, n. 3, p. 345-350, 1998.

ARJMANDI, B.H.; BIRNBAUM, R.S.; JUMA, S.; BARENGOLTS, E.; KUKREJA, S.C. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevent bone loss by different mechanisms. **Calcified Tissue International**, v. 66, n. 1, p. 61-65, 2000.

AU, W.Y. Cortisol stimulation of parathyroid hormone secretion by rat parathyroid glands in organ culture. **Science**, v. 193, n. 4257, p. 1015-1017, 1976.

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**, v. 28, n. 5, p. 465-473, 2001.

BENNELL, K.; KHAN, K.; MCKAY, H. The role of physiotherapy in the prevention and treatment of osteoporosis. **Manual Therapy**, v. 5, n. 4, p. 198-213, 2000.

BIKLE, D.D.; PILLAI, S. Vitamin D, calcium and epidermal differentiation. **Endocrine Reviews**, v. 14, n. 1, p. 3-19, 1993.

BIRDWOOD, G. **Understanding osteoporosis and its treatment: A guide for physicians and their patients**. London: Parthenon Publishing, 1996. 82 p.

BJARNASON, N.H.; RIIS, B.J, CHRISTIANSEN, C. The effect of fluvastatin on parameters of bone remodeling. **Osteoporosis International**, v. 12, n. 5, p. 380-384, 2001.

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**, v. 61, n. 4, p. 629-637, 1996.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. **Introdução à química dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1992. 223 p.

BOEL, E.; SELMER, J.; JENSEN, T. Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or advanced glycosylation end product formation hold promise? **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 9, n. 2, p. 104-129, 1995.

BONUCCI, E.; BALLANTI, P.; MARTELLI, A.; MERETO, E.; BRAMBILLA, G.; BIANCO, P.; BUFALINO, L. Ipriflavone inhibits osteoclast differentiation in parathyroid transplanted parietal bone of rats. **Calcified Tissue International**, v. 50, n. 4, p. 314-319, 1992.

BOUILLON, R.; BEX, M.; VAN HERCK, E.; LAUREYS, J.; DOOMS, L.; LESAFFRE, E.; RAVUSSIN, E. Influence of age, sex and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 80, n. 4, p. 1194-1202, 1995.

BRACCO, O.L.; KAYATH, M.J.; VIEIRA, J.G.H. Hormônio da paratireóide (1-34) no tratamento da osteoporose. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 3, p. 285-291, 2003.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

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**, v. 42, n. 2, p. 111-114, 2002.

BROULIK, P.D.; ROSENKRANCOVA, J.; RUZICKA, P.; SEDLACEK, R. Effect of alendronate administration on bone mineral density and bone strength in castrated rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, n. 7, p. 414-418, 2005.

BROWN, E.M.; GAMBA, G.; RICCARDI, D.; LOMBARDI, M.; BUTTERS, R.; KIFOR, O.; SUN, A.; HEDIGER, M.A.; LYTTON, J.; HEBERT, S.C. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. **Nature**, v. 366, n. 6455, p. 575-580, 1993.

CALVI, L.M.; SIMS, N.A.; HUNZELMAN, J.L.; KNIGHT, M.C. Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 3, p. 277-286, 2001.

CARBONARE, L.D.; ARLOT, M.E.; CHAVASSIEUX, P.M.; ROUX, J.P.; PORTERO, N.R.; MEUNIER, P.J. Comparison of trabecular bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 1, p. 97-103, 2001.

CARNEIRO, R.A. Epidemiological aspects of osteoporosis in Brazil. **Bone**, v. 29, n. 3, p. 298-299, 2001.

CARNEIRO, R.A. Osteoporose primária. In: COSSERMELLI, W. **Terapêutica em reumatologia**. 1. ed. São Paulo: Lemos editorial, 2000. cap. 116, p. 1035-1045.

CARSTENS JR., J. H.; FEINBLATT, J. D. Future horizons for calcitonin: a U.S. perspective. **Calcified Tissue International**, v. 49, n. 2, p. S2-S6, 1991.

CARVALHO, D.C.L.; ROSIM, G.C.; GAMA, L.R.; TAVARES, M.R.; TRIBIOLI, R.A.; SANTOS, I.R.; CLIQUET JR., A. tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 647-654, 2002.

CAVERZASIO, J.; PALMER, G.; BONJOUR, J.P. Fluoride: mode of action. **Bone**, v. 22, n. 6, p. 585-589, 1998.

CERVANTES-LAUREAN, D.; SCHRAMM, D.D.; JACOBSON, E.L.; HALAWEISH, I.; BRUCKNER, G.G.; BOISSONNEAULT, G.A. Inhibition of advanced glycation end product formation on collagen by rutin and its metabolites. **Journal of Nutrition**

**Biochemistry**, 2005. Disponível em: < [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) >, Acesso em: 21 fev. 2006.

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

CHENU, C.; COLUCCI, S.; GRANO, M.; ZIGRINO, P.; BARATTOLO, R.; ZAMBONIN, G.; BALDINI, N.; VERGNAD, P.; DELMAS, P.D.; ZALLONE, A.Z. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 4, p. 1149-1158, 1994.

CHIBA, H.; UEHARA, M.; WU, J.; WANG, X.; MASUYAMA, R.; SUZUKI, K.; KANAZAWA, K.; ISHIMI, Y. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. **Journal of Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 1892-1897, 2003.

CIVITELLI, R.; ABBASI-JARHOMI, S.H.; HALSTEAD, L.R.; DIMAROGONAS, A. Ipriflavone improves bone density and biomechanical properties of adult male rat bones. **Calcified Tissue International**, v. 56, n. 3, p. 215-219, 1995.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R.M.R; JULIÃO, M.A.S.G.; LOUREIRO, C.K.C.; GIARODOLI, P.B.; PINHEIRO, S.A; HARRIGAN, A.R.; SPRITZER, P.M.; PARDINI, D.P.; WEISS, R.V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L.A; PÓVOA, L.C. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.

COIFMAN, R.; WEFORT, R.V.B.; KASAMATSU, T.S.; FUKUSIMA, L.; SANTORO, I.; JAMNIK, S.; VIEIRA, J.G.H.; CASTRO, M.L. Calcitonina monomérica plasmática e hipercalcemia em pacientes portadores de neoplasia pulmonar. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 105-108, 1997.

COLLINS, E.D.; NORMAN, A.W. Vitamin D. In: MACHLIN, J.L. **Handbook of vitamins**. New York: Marcel Dekker, 1991. cap. 2, p. 59-98.

COOK, N.C., SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.

CORONHO, V.; PETROIANU, A.; SANTANA, E.M.; PIMENTA, L.G. **Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1535p.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Manole, 2005. 878p.

CUMMING, R.G. Calcium intake and bone mass: a quantitative review of the evidence. **Calcified Tissue International**, v. 47, n. 4, p. 194-201, 1990.

CUMMINGS, S.R.; BAUER, D.C. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture? **The Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 24, p. 3255-3257, 2000.

DA PAZ, L.H.B.C.; FALCO, V.; TENG, N.C.; REIS, L.M.; PEREIRA, R.M.R.; JORGETTI, V. Effect of 17  $\beta$ -estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 8, p. 1015-1022, 2001.

DAWSON-HUGHES, B.; HARRIS, S.S.; KRALL, E.A.; DALLAL, G.E.; FALCONER, G.; GREEN, C.L. Rates of bone loss in postmenopausal women randomly assigned to one of two dosages of vitamin D. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 1140-1145, 1995.

DAWSON-HUGHES, B.; HARRIS, S.S.; KRALL, E.A.; DALLAL, G.E. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age and older. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 10, p. 670-676, 1997.

DELMAS, P.D. Treatment of postmenopausal osteoporosis-state of the art. **Osteoporosis International**, v. 12, n. 1, p. S1-S48, 2001.

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**, v. 23, n. 1, p. 123-130, 2003.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501-1504, 2000.

EINHORN, T.A. Enhancement of fracture-healing. **Journal Bone Joint Surgery**, v. 77, n. 6, p. 940-956, 1995.

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**, v. 8, n. 3, p. 274-281, 1998.

FARLEY, J.R.; WERDEGAL, J.E.; BAYLINK, D.J. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity in bone forming cells. **Science**, v. 222, n. 4621, p. 330-332, 1983.

FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 274-280, 2005.

FIORI, C.E.; GIBILARO, M.; MOTTA, M.; FOTI, R.; DIELI, M. Modification of cortical and trabecular mineral density of the femur, induced by ipriflavone therapy, clinical results after 12 months. **La Clinica Terapeutica**, v. 146, n. 1, p. 13-19, 1995.

FOLDES, I.; RAPCSAK, M.; SZOOR, A.; GYARMATI, J. SZILAGYI, T. The effect of ipriflavone treatment on osteoporosis induced by immobilization. **Acta Morphologica Hungarica**, v. 36, n. 1-2, p. 79-93, 1988.

GARNERO, P.; DELMAS, P.D. Biochemical markers of bone turnover - Applications for Osteoporosis. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 27, n. 2, p. 303-323, 1998.

GARNERO, P.; MARTON, I.; DELMAS, P. Effects of intranasal 17-beta estradiol on bone turnover and serum insulin-like growth factor I in postmenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 84, n. 7, p. 2390-2396, 1999.

GHEZZO, C.; CIVETTELLI, R.; CADEL, S., BORELLI, G.; MAIORINO, M.; BUFALINO, L.; BONGRANI, S. Ipriflavone does not alter bone apatite crystal structure in adult male rats. **Calcified Tissue International**, v. 59, n. 6, p. 496-499, 1996.

GIOSSI, M.; CARUSO, P.; CIVELLI, M.; BONGRANI, S. Inhibition of parathyroid hormone-stimulated resorption in cultured fetal rat long bones by the main metabolites of ipriflavone. **Calcified Tissue International**, v. 58, n. 6, p. 419-422, 1996.

GOLD, D.T.; DREZNER, M.K. Quality of life. In: RIGGS, L.; MELTON, J. **Osteoporosis: etiology, diagnosis and management**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995. p. 475-486.

GOLTZMAN, D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 173-177, 1999.

GONZÁLEZ, E.A. The role of cytokines in skeletal remodeling: possible consequences for renal osteodystrophy. **Nephrology Dialysis Transplant**, v. 15, n. 7, p. 945-950, 2000.

GRACITELLI, M.E.C.; VIDORIS, A.A.C.; LUBA, R., LAZARETTI-CASTRO, M. Parathyroid hormone and osteoporosis: solving the puzzle. Physiologic rationale for the therapeutic use of PTH in osteoporosis. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 3, p. 215-220, 2002.

GUIMARÃES, V.M.; MORAES, G.H.K.; FONSECA, J.B.; ROSTAGNO, H.S. Efeitos do ácido L-glutâmico, L-prolina e L-lisina da dieta no desenvolvimento e incidência de problemas de pernas em pintos de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.22, n. 4, p.584-590, 1993.

GUINNESS-HEY, M.; HOCK, J.M. Increased trabecular bone mass in rats treated with human synthetic parathyroid hormone. **Metabolic Bone Disease and Related Research**, v. 5, n. 4, p. 177-181, 1984.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973p.

HACZYNSKI, J.; JAKIMIUK, A. Vertebral fractures: a hidden problem of osteoporosis. **Medical Science Monitor**, v. 7, n. 5, p. 1108-1117, 2001.

HARRIS, S.S.; DAWSON-HUGHES, B.; PERRONE, G.A. Plasma 25-hydroxyvitamin D responses of younger and older men to three weeks of supplementation with 1800 IU/day of vitamin D. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 470-474, 1999.

HAUSCHKA, P.V.; GALLOP, P.M. Purification and calcium-binding properties of osteocalcin, the gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins of bone. In: WEISSIERMAN, R.H. (Org.) **Calcium binding proteins and calcium function**. Amsterdam: Elsevier, 1977. p. 338-347.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HAYNES, D.R.; CROTTI, T.N.; LORIC, M.; BAIN, G.I.; ATKINS, G.J.; FINDLAY, D.M. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. **Rheumatology**, v. 40, n. 6, p. 623-630, 2001.

HEAD, K.A. Ipriflavone: an important bone-building isoflavone. **Alternative Medicine Review**, v. 4, n. 1, p. 10-22, 1999.

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**, v. 15, n. 1, p. 2-12, 2000.

HOLICK, M.F. Vitamin D. In: SHILS, M.E. (Org.). **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. cap. 17, p. 308-325.

HOLICK, M.F. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: FAVUS, M.J. (Org.). **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. cap. 13, p. 74-81.

HORCAJADA-MOLTENI, M.N.; CRESPIY, V.; COXAM, V.; DAVICCO, M.J.; RÉMÉSY, C.; BARLET, J.P. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 11, p. 2251-2258, 2000.

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**, v. 10, n. 10, p. 1478-1487, 1995.

IQBAL, M.M. Osteoporosis: epidemiology, diagnosis and treatment. **Southern Medical Journal**, v. 93, n. 1, p. 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**, v. 21, n. 1, p. 62-66, 1998.

JILKA, R.L.; HANGOC, G.; GIRASOLE, G.; PASSERI, G.; WILLIAMS, D.C.; ABRAMS, J.S.; BOYCE, B.; BROXMEYER, H.; MANOLAGAS, S.C. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. **Science**, v. 257, n. 5066, p. 88-91, 1992.

JOHNELL, O. Advances in osteoporosis: better identification of risk factors can reduce morbidity and mortality. **Journal of Internal Medicine**, v. 239, n. 4, p. 299-304, 1996.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-191, 1991.

KASSEM, M.; MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E.F. Growth hormone stimulates proliferation of normal human bone marrow stromal osteoblast precursor cells in vitro. **Growth Regulation**, v. 4, n. 3, p. 131-135, 1994.

KAWANE, T.; TERASHIMA, S.; KURAHASHI, I.; YANAGAWA, T.; YOSHIDA, H.; HORIUCHI, N. Atorvastatin enhances bone density in ovariectomized rats given 17beta-estradiol or human parathyroid hormone (1-34). **Endocrine**, v. 24, n. 2, p. 121-129, 2004.

KLEIN, G.R.; ARNAUD, S.B.; GALLAGHER, J.C.; DELUCA, H.; RIGGS, B.L. Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisolism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 60, n. 1, p. 253-259, 1977.

KUSHIDA, K.; SHIRAKI, M.; NAKAMURA, T.; KISHIMOTO, H.; MORII, H.; YAMAMOTO, K.; KANEDA, K.; FUKUNAGA, M.; INOUE, T.; NAKASHIMA, M.; ORIMO, H. Alendronate reduced vertebral fracture risk in postmenopausal Japanese

women with osteoporosis: a 3-year follow-up study. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 462-468, 2004.

LAL, H.; RAJESH-PANDEY, M.B.B.S.; AGARWAL, S.K. Vitamin D: non-skeletal actions and effects on growth. **Nutrition Research**, v. 18, n. 1, p. 1683-1718, 1999.

LANE, J.M.; NYDICK, M. Osteoporosis: current modes of prevention and treatment. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 7, n. 1, p. 19-31, 1999.

LANNA, C.M.M; MONTENEGRO JR, R.M.; PAULA, F.J.A. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 1, p. 9-18, 2003.

LENCHIK, L.; SARTORIS, D. Current concepts in osteoporosis. **American Journal of Roentgenology**, v. 168, n. 4, p. 905-911, 1997.

LEVINSON, W.; ALTKORN, D. Primary prevention of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of the American Medical Association**, v. 280, n. 21, p. 1821-1822, 1998.

LIAO, E.Y.; LUO, X.H.; SU, X. Comparison of the effects of 17-beta-E2 and progesterone on the expression of osteoprotegerin in normal human osteoblast-like cells. **Journal Endocrinology Investigation**, v. 25, n. 9, p. 785-790, 2002.

LIBERMAN, U.A; WEISS, S.R; BROLL, J; MINNE, H.W; QUAN, H; BELL, N.H; RODRIGUEZ-PORTALES, J.; DOWNS, R.W.; DEQUEKER, J.; FAVUS, M. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 22, p. 1437-1443, 1995.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 6, p. 326-331, 2000.

LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 75-85, 1996.

LINDSAY, R. Estrogen deficiency. In: RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. **Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management**. 2 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1995. cap. 6, p. 133-160.

LOCASCIO, V.; BALLANTI, P.; MILANI, S.; BERTOLDO, F.; LOCASCIO, C.; ZANOLIN, E.M.; BONUCCI, E. A histomorphometric long-term longitudinal study of trabecular bone loss in glucocorticoid-treated patients: prednisone versus Deflaz-acort. **Calcified Tissue International**, v. 62, n. 3, p. 199-204, 1998.

LUKERT, B.; RAISZ, L.G. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. **Annals of Internal Medicine**, v. 112, n. 5, p. 352-364, 1990.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 681-692, 2003.

MARQUES NETO, J.F.; COIMBRA, A.V.; BARROS, L.F.O.; CASTRO, M.L. **Atlas de osteoporose**. São Paulo: Rhodia Farma, 1995. 202p.

MARX, S.J. Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 25, p. 1863-1875, 2000.

MAZZUOLI, G.; ROMAGNOLI, E.; CARNEVALE, V.; SCARDA, A.; SCARNECCHIA, L.; PACITTI, M.T.; ROSSO, R.; MINISOLA, S. Effects of ipriflavone on bone remodeling in primary hyperparathyroidism. **Bone and Mineral**, v. 19, n. 1, p. S27-33, 1992.

McLAUGHLIN, F.; MACKINTOSH, J.; HAYES, B.P.; McLAREN, A.; UINGS, I.J.; SALMON, P.; HUMPHREYS, J.; MELDRUM, E.; FARROW, S.N. Glucocorticoid-induced osteopenia in the mouse as assessed by histomorphometry, microcomputed tomography, and biochemical markers. **Bone**, v. 30, n. 6, p. 924-930, 2002.

MEI, J.; YEUNG, S.; KUNG, A.W. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 86, n. 11, p. 5217-5221, 2001.

MEIER, C.R.; SCHLEINGER, R.G.; KRAENZLIN, M.E.; SCHLEGEL, B.; JICK, H. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. **The Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 24, p. 3205-3210, 2000.

MEINÃO, I.M.; PIPPA, M.G.B.; ROMANELLI, P.R.S.; ZERBINI, C.A.F. Doenças osteometabólicas. In: MOREIRA, C.; CARVALHO, M.A.P. **Noções práticas de reumatologia**. Belo Horizonte: Health, 1998. cap. 2, p. 379-404.

MELIS, G.B.; PAOLETTI, A.M.; CAGNACCI, A.; BUFALINO, L.; SPINETTI, A.; GAMBACCIANI, M.; FIORETTI, P. Lack of any estrogenic effect of ipriflavone in postmenopausal women. **Journal Endocrinology Investigation**, v. 15, n. 10, p. 755-761, 1992.

METODIEWA, D.; KOCHMAN, A.; KAROLCZAK, S. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N-Diethylaminoethyl-ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 41, n. 5, p. 1067-1075, 1997.

MEZQUITA-RAYA, P.; MUÑOZ-TORRES, M.; ALONSO, G.; LUNA, J. D.; QUESADA, J.M.; DORADO, G.; LUQUE-RECIO, F.; RUIZ-REQUENA, M.E.; LOPEZ-RODRIGUEZ, F.; ESCOBAR-JIMÉNEZ, F. Susceptibility for postmenopausal osteoporosis: interaction between genetic, hormonal and lifestyle factors. **Calcified Tissue International**, v. 75, n. 5, p. 373-379, 2004.

MILLER, W.L.; PORTALE, A.A. Genetic disorders of vitamin D biosynthesis. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 28, n. 4, p. 825-840, 1999.

MIYATA, T.; NOTOYA, K.; YOSHIDA, K.; HORIE, K.; MAEDA, K; KUROKAVA, K; TAKETOMI, S. Advanced glycation end products enhance osteoclast- induced bone

resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 2, p. 260-270, 1997.

MORALEZ-TORRES, J.; GUTIÉRREZ-UREÑA, S. The burden of osteoporosis in Latin América. **Osteoporosis International**, v. 15, n. 8, p. 625-632, 2004.

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-menopausada. **Boletim da Sociedade de Reumatologia do Rio de Janeiro**, v. 32, n. 112, p. 9-13, 2004.

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

MUNDY, G.D.; OYAJOB, 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, 2003. p.46-58.

NAKAMURA, H.; TSUJIT; HIRATA, A.; YAMAMOTO, T. Localization of osteoprotegerin (OPG) on Bone Surfaces and Cement lines in rat tibia. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 50, n. 7, p. 945-953, 2002.

NETO, J.F.M.; FERNANDES, C.E. Mecanismos de desenvolvimento de osteoporose e suas implicações clínico-terapêuticas em Projeto Osteoporose 2001, presente e futuro da osteoporose: aspectos clínicos e terapêuticos. **Sociedade Brasileira de Osteoporose**, 2001. cap. 2, p. 1-30.

NIEVES, J.W.; KOMAR, L.; COSMAN, F.; LINDSAY, R. Calcium potentiates the effect of estrogen on bone mass: review and analysis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 18-24, 1998.

NIH. National Institutes of Health. Consensus development panel on osteoporosis prevention. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. **The Journal of the American Medical Association**, v. 285, n. 6, p. 785-795, 2001.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.V.; HOORN, D. E. C. V.; BOELENS, P. G.; NOOREN, K. V.; LEEUVEN, P. A. M. V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NOTOYA, K.; YOSHIDA, K.; TAKETOMI, S.; YAMAZAKI, I.; KUMEGAWA, M. Inhibitory effect of ipriflavone on osteoclast-mediated bone resorption and new osteoclast formation in long-term cultures of mouse unfractionated bone cells. **Calcified Tissue International**, v. 53, n. 3, p. 206-209, 1993.

OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; LIMA, R.M.; ARAÚJO, A.L.A.; LIMA, E.Q.; SILVA, R.R.; SILVA, E.; FERREIRA JR., D.B. Efeito de rutina sobre os níveis de cloreto, cálcio e fósforo em soro de coelhos. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 30, n. 3, p. 263-270, 2003.

OWEN, T.A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BARONE, L.M.; WILMING, L.; TASSINARI, M.S.; KENNEDY, M.B.; POCKWINSE, S.; LIAN, J.B.; STEIN, G.S. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **Journal of Cellular Physiology**, v. 143, n. 3, p. 420-430, 1990.

PASSERI, M.; BIONDI, M.; COSTI, D.; BUFALINO, L.; CASTIGLIONE, G.N.; DI PEPPE, C.; ABATE, G. Effect of ipriflavone on bone mass in elderly osteoporotic women. **Bone and Mineral**, v. 19, n. 1, p. S57-S62, 1992.

PATSCHAN, D.; LODDENKEMPER, K.; BUTTGEREIT, F. M. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Bone**, v. 29, n. 6, p. 498-505, 2001.

PEDRAZZONI, M.; ALFANO, F.S.; GATTI, C.; FANTUZZI, M.; GIRASOLE, G.; CAMPANINI, C.; BASINI, G.; PASSERI, M. Acute effects of bisphosphonates on new and traditional markers of bone resorption. **Calcified Tissue International**, v. 57, n. 1, p. 25-29, 1995.

PENTEADO, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2003. 612p.

PEREIRA, A.A.C.; TAVEIRA, L.A.A. Movimentação dentária induzida e ovariectomia: avaliação microscópica. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2000.

PETERSON, J., DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PETILLI, M.; FIORELLI, G.; BENVENUTI, S.; FREDIANI, U.; GORI, F.; BRANDI, M.L. Interactions between ipriflavone and the estrogen receptor. **Calcified Tissue International**, v. 56, n. 2, p. 160-165, 1995.

PINTO, A.S. **Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona, isoladamente e em associação, na osteoporose induzida com dexametasona**. 2004. 54f. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

PINTO NETO, A.M.; SOARES, A.; URBANETZ, A.A.; SOUZA, A.C.A.; FERRARI, A.E.M., AMARAL, B. et al. Consenso brasileiro de osteoporose 2002. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n. 6, p. 343-354, 2002.

POTTS, J.T. Parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide in the regulation of calcium homeostasis and bone development. In: DEGROOT, L.J.; JAMESON, J.L. (Org.). **Endocrinology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 969-998.

PRINCE, R.L.; SMITH, M.; DICK, I.M.; PRICE, R.I.; WEBB, P.G.; HENDERSON, N.K.; HARRIS, M.M. Prevention of postmenopausal osteoporosis: a comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone-replacement therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 17, p. 1189-1195, 1991.

PYTLIK, M.; KACZMARCZYK-SEDLAK, I.; SLIWINSKI, L.; JANIEC, W.; RYMKIEWICZ, I. Effect of concurrent administration of alendronate sodium and retinol on development of changes in histomorphometric parameters of bones induced by ovariectomy in rats. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 571-579, 2004.

RANSTAM, J.; KANIS, J.A. Influence of age and body mass on the effects of vitamin D on hip fracture risk. **Osteoporosis International**, v. 5, n. 6, p.450-454, 1995.

RASSI, C.M.; LIEBERHERR, M.; CHAUMAZ, G.; POINTILLART, A.; COURNOT, G. Modulation of osteoclastogenesis in porcine bone marrow cultures by quercetin and rutin. **Cell and Tissue Research**, v. 319, n. 3, p. 383-393, 2005.

RECKER, R.R. Current therapy for osteoporosis. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 76, n. 1, p. 14-16, 1993.

RECKER, R.R.; HINDERS, S.; DAVIES, K.M.; HEANEY, R.P.; STEGMAN, M.R.; LAPPE, J.M.; KIMMEL, D.B. Correcting calcium nutritional deficiency prevents spine fracture in elderly women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11, n. 12, p. 1961-1966, 1996.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; HAMADE, S.; ENWEMEKA, C.S. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 54, n. 1, p. 1-8, 2001.

REGINSTER, J.Y.L. Ipriflavone pharmacological properties and usefulness in postmenopausal osteoporosis. **Bone and Mineral**, v. 23, n. 3, p. 223-232, 1993.

REGINSTER, J.; MINNE, H.W.; SORENSEN, O.H.; HOOPER, M.; ROUX, C.; BRANDI, M.L.; LUND, B.; ETHGEN, D.; PACK, S.; ROUMAGNAC, I.; EASTELL,

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**, v. 11, n. 1, p. 83-91, 2000.

REID, I.R. Glucocorticoid osteoporosis mechanisms and management. **European Journal of Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 209-217, 1997.

REID, I.R.; HAGUE, W.; EMBERSON, J.; BAKER, J.; TONKIN, A.; HUNT, D.; MACMAHON, S.; SHARPE, N. Effect of pravastatin on frequency of fracture in the LIPID study: secondary analysis of a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 509-512, 2001.

REID, I.R.; IBBERTSON, H.K. Evidence for decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. **Hormone Research**, v. 27, n. 4, p. 200-204, 1987.

REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 523-534, 2002.

RIBEIRO, A.F.; VOLPATO, N.M. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 852-858, 2005.

RICHART, R.M.; LINDSAY, R. Osteoporosis and its relationship to estrogen. **Contemporary Obstetrics and Gynecology**, v. 24, n. 4, p. 201-224, 1984.

RICKARD, D.J.; WATERS, K.M.; RUESINK, T.J.; KHOSLA, S.; KATZENELLENBOGEN, J.A.; KATZENELLENBOGEN, B.S.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Estrogen receptor isoform-specific induction of progesterone receptors in human osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 4, p. 580-592, 2002.

RICO, H.; HERNANDEZ, E.R.; CABRANES, J.A.; GOMEZ-CASTRESAMA, F. Suggestion of a deficient osteoblastic function in diabetes mellitus: the possible cause of osteopenia in diabetics. **Calcified Tissue International**, v. 45, n. 2, p. 71-73, 1989.

RICO, H.; HERNANDEZ, E.R.; REVILLA, M.; GOMEZ-CASTRESANA, F. Salmon calcitonin reduces vertebral fracture rate in postmenopausal crush fracture syndrome. **Bone and Mineral**, v. 16, n. 2, p. 131-138, 1992.

RICO, H.; REVILLA, M.; HERNANDEZ, E. R.; VILLA, L.F.; ALVAREZ DE BUERGO, M. Total and regional bone mineral content and fracture rate in postmenopausal osteoporosis treated with salmon calcitonin: a prospective study. **Calcified Tissue International**, v. 56, n. 3, p. 181-185, 1995.

RIGGS, B.L.; HODGSON, S.F.; O'FALLON, W.M. Effects of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 12, p. 802-809, 1990.

RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON, L.J. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 5, p. 763-768, 1998.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. Involutional osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 26, p. 676-686, 1986.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. **American Journal of Medicine**, v. 75, n. 6, p. 899-901, 1983.

RODAN, G.A. Mechanisms of action of bisphosphonates. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 375-388, 1998.

ROGERS, M.J. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. **Calcified Tissue International**, v. 75, n. 6, p. 451-461, 2004.

ROMBERG, R. W.; WERNESS, P. G.; RIGGS, B. L.; MANN, K. G. Mineral and collagen-binding proteins. **Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 1176-1180, 1986.

ROSEN, C.J.; DONAHUE, L.R. Parathyroid hormone and osteoporosis. **Current Opinion in Endocrinology and Diabetes**, v. 3, n. 2, p. 532-539, 1996.

RUSSO, L.A.T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45, n. 4, p. 401-406, 2001.

RUZZIN, J.; WAGMAN, A.S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, v. 48, n. 10, p. 2119-2130, 2005.

SAHNI, M.; GUENTHER, H.L.; FLEISCH, H.; COLLIN, P.; MARTIN, T.J. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblast. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 5, p. 2004-2011, 1993.

SARAIVA, G.L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p.72-78, 2002.

SCHOT, L.P.C.; SCHUURS, A.H.W.M. Pathophysiology of bone loss in castrated animals. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.73, n.3, p. 461-465, 1990.

SEGAL, L.G.; LANE, N.E. Controlling steroids osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal Medicine**, v. 14, n. 1, p. 43-56, 1997.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. **American Journal Clinical of Nutrition**, v. 134, n. 6, p.1333S-1343S, 1998.

SILVA, E.V.; VIDOTTI, C.C.F.; SILVA, M.T.S. Sintomas da menopausa: uma análise crítica dos tratamentos disponíveis. **Boletim Farmacoterapêutica**, v.3, n. 2, p. 61-65, 2003.

SINAKI, M. Musculoskeletal challenges of osteoporosis. **Aging**, v. 10, n. 3, p. 249-262, 1998.

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**, v. 30, n. 6, p. 836-841, 2002.

SOMEKAWA, Y.; CHIGUCHI, M.; ISHIBASHI, T.; ASO, T. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal japanese women. **Obstetrics and Gynecology**, v. 97, n. 1, p. 109, 2001.

STOCK, J.L.; AVIOLI, L.V.; BAYLINK, D.J. Calcitonin-salmon nasal spray reduces the incidence of new vertebral fractures. PROOF Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n.2, p. S149, 1997.

STRAUS, S.E. Geriatric medicine. **British Medical Journal**, v. 322, n. 7278, p. 86-89, 2001.

STREWLER, G. Local and systemic control of osteoblast. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 3, p. 271-272, 2001.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; ABE, E. Role of vitamin D in bone resorption. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 53-59, 1992.

SUDA, T.; UDAGAWA, N.; NAKAMURA, I.; MIYAURA, C.; TAKAHASHI, N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. **Bone**, v. 17, n.2, p. S87-S91, 1995.

SUGIMOTO, T.; BROWN, A.J.; RITTER, C.; MORRISSEY, J.; SLATOPOLSKY, E.; MARTIN, K.J. Combined effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on parathyroid hormone secretion in cultured bovine parathyroid hormone secretion in cultured bovine parathyroid cells. **Endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 638-641, 1989.

SWARTHOUT, J.T.; D'ALONZO, R.C.; SELVAMURUGAN, N.; PARTRIDGE, N.C. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. **Gene**, v. 282, n. 1-2, p. 1-17, 2002.

SZEJNFELD, V.L. Atualização terapêutica em osteoporose. **Rheumatology**, v. 2, n. 1, p. 4-7, 1995.

SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2000. 406p.

SZEJNFELD, V.L. Reumatologia. In: PRADO, F.C.; RAMOS, J.; VALLE, JR. **Atualização terapêutica**. 20. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. cap. 18, p. 1434-1437.

TANRIVERDI, H.A.; BARUT, A.; SARIKAYA, S. Statins have additive effects to vertebral bone mineral density in combination with risedronate in hypercholesterolemic postmenopausal women. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 120, n. 1, p. 63-68, 2005.

TAPIERO, H.; BA, G.N.; TEW, K.D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, n. 1, p. 36-44, 2002.

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

VALENTE, M.; BUFALINO, L.; CASTIGLIONE, G.N.; D'ANGELO, R.; MANCUSO, A.; GALOPPI, P.; ZICHELLA, L. Effects of 1-year treatment with ipriflavone on bone in postmenopausal women with low bone mass. **Calcified Tissue International**, v. 54, n. 5, p. 377-380, 1994.

VAN STAA, T.P.; LEUFKINS, H.G.M.; COOPER, C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 10, p. 777-787, 2000.

VARGAS, D.M.; AUDI, L.; CARRASCOSA. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 367-370, 1997.

VARGAS, D.M.; RIGOTTI, T.; GÜTZ, C.N.R.M.; LOBE, M.C.S.; FERNADES, J.A. Mineralização óssea em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 3, p. 253-258, 2003.

VEDI, S.; ELKIN, S.L.; COMPSTON, J.E. A histomorphometric study of cortical bone of the iliac crest in patients treated with glucocorticoids. **Calcified Tissue International**, v. 77, n. 2, p. 79-83, 2005.

VIERECK, V.; GRUNDKER, C.; BLASCHKE, S.; FROSCHE, K.H.; SCHOPPET, M.; EMONS, G.; HOFBAUER, L.C. Atorvastatin stimulates the production of osteoprotegerin by human osteoblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, n. 6, p. 1244-1253, 2005.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P.D. The role of collagen in bone strength. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 3, p. 319-336, 2005.

VITTE, C.; FLEICH, H.; GUENTHER, H.L. Biphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated receptor. **Endocrinology**, v. 137, n. 6, p. 2324-2333, 1996.

YAMAGUCHI, M, GAO, Y.H. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: the genistein effect is enhanced by zinc. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.178, n.1-2, p.377-382, 1998.

YONEMURA, K.; HISHIDA, A.; KIMURA, M.; WATANABE, T.; KUMAGAI, H. Prednisolone induces an increase in serum calcium concentration: possible involvement of the kidney, the bone, and the intestine. **Calcified Tissue International**, v. 65, n. 4, p. 267-271, 1999.

WADA, Y.; NAKAMURA, Y.; KOSHIYAMA, H. Lack of positive correlation between statin use and bone mineral density in Japanese subjects with type 2 diabetes. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, n. 18, p. 2865, 2000.

WASNICH, R.D. Epidemiology of osteoporosis. In: AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. 4 ed. Washington: LWEW, 1999. cap. 46, p. 257-259.

WATTEL, A.; KAMEL, S.; PROUILLET, C.; PETIT, J.P.; LORGET, F.; OFFORD, E.; BRAZIER, M. Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF kappa B and AP-1. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 92, n. 2, p. 285-295, 2004.

WEINSTEIN, R.S.; JILKA, R.L.; PARFITT, A.M.; MANOLAGAS, S.C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 2, p. 274-282, 2000.

WERDEGAL, J.F.; LAU, K.H.W.; BAYLINK, D.J. Fluoride and bovine extract influence cell proliferation and phosphatase activities in bovine bone cell cultures. **Clinical Orthopedic**, v. 233, n. 6, p. 274-281, 1988.

WILLIAMS, J.P., JORDAN, S.E., BARNES, S.; BLAIR, H.C. Tyrosine kinase inhibitor effects on osteoclastic acid transport. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 1369S-1374S, 1998.

WITZTUM, J.L. Drugs used in the treatment of hyperlipoproteinemia. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p. 875-897.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO/843. **Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis**. Geneva: WHO, 1994. 130 p.

ZANCHETTA JR; SPIVACOW, R.F.; BOGADO, C.; SARLI, M.; PLOTKIN, H.; ROLDÁN, E.J. Extended use, up to 6 years, of an oral amino-bisphosphonate in patients with established osteoporosis. **Medicina**, v. 57, n. 1, p. 37-44, 1997.

ZHANG, Q.; WRANA, J.L.; SODEK, J. Characterization of the promoter region of the porcine opn (osteopontin, secreted phosphoprotein 1) gene. Identification of positive and negative regulatory elements and a 'silent' second promoter. **European Journal of Biochemistry**, v. 207, n. 2, p. 649-659, 1992.