

FABRÍCIO LUCIANI VALENTE

**HISTOMORFOMETRIA E EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA
DE RANKL EM FÊMUR E VÉRTEBRA DE RATOS
COM OSTEOPOROSE SECUNDÁRIA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

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

T

V154h
2007

Valente, Fabrício Luciani, 1980-

Histomorfometria e expressão imunoistoquímica de RANKL em fêmur e vértebra de ratos com osteoporose secundária / Fabrício Luciani Valente – Viçosa, MG, 2007.

xi, 51f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio.
Dissertação (mestrado) – Universidade federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 45-51.

1. Patologia experimental. 2. Rato como animal de laboratório. 3. Osteoporose. 4. Histopatologia. 5. Imunohistoquímica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.089602733

FABRÍCIO LUCIANI VALENTE

**HISTOMORFOMETRIA E EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE RANKL EM
FÊMUR E VÉRTEBRA DE RATOS COM OSTEOPOROSE SECUDÁRIA**

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

APROVADA: 20 de março de 2007.

Prof^a. Laércio dos Anjos Benjamin
(Co-orientador)

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Co-orientador)

Prof^a Rogéria serakides

Prof^a Andréa P. Batista Borges

Prof^a Marlene Isabel Vargas Vilorio
(Orientadora)

Aos meus pais: Luiz Antônio e Maria Aparecida
Aos meus irmãos: Aline, Luiz Gustavo e Geisiane
À minha pequena sobrinha Yasmim
Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade constante de aprendizado em minha vida, no COLUNI, na Graduação e no Mestrado;

À Professora Marlene, pela orientação já há tanto tempo desde Iniciação Científica, Estágio Voluntário e Curricular e agora no Mestrado; por estimular independência de trabalho e de pensamento; e por me receber com cuidado, amizade e carinho;

Ao Professor Patarroyo, por incentivar uma visão crítica frente às diversas formas de conhecimento;

À Priscilla, com quem vim a trabalhar num extenso projeto, do qual faz parte a presente dissertação, e à grande equipe de colaboradores e amigos que ajudaram na execução do trabalho: Policarpo, Irma, Ferdinan, Denise, Paloma, João Paulo e ao Professor Rubens do Departamento de Engenharia Florestal;

Ao Professor Ricardo Junqueira Del Carlo, por todas as oportunidades e portas abertas desde o início da Graduação;

Ao Professor Laércio, pelo bom humor e apoio nos momentos mais complicados;

À Professora Rogéria Serakides, pela disponibilidade e interesse no meu trabalho;

À Professora Andréa, a quem também já muito recorri em momentos críticos;

À Professora Tânia Toledo e sua equipe, por despertarem meu interesse pela pesquisa;

Ao Professor Gumercindo, por ensinar a perceber visões diferentes e estabelecer de uma vez por todas a importância das abordagens interdisciplinares;

A Anna Paula Ferreira, por quem desenvolvo uma crescente admiração, obrigado pelas lições de força e determinação e por todo apoio na

execução deste trabalho; agradeço a toda sua família, por me receber com tanto carinho;

À amiga Ana Paula Peconick, pelo apoio crucial e pelas palavras sempre amigas;

Ao Gabriel, pela amizade e ajuda fundamental;

A todos os amigos e companheiros de pós-graduação, Carlos, Paulo Ricardo, Javier, Sandra, Carla, Yasmine – desejo-lhes sempre a melhor sorte em seus caminhos;

A Rosi, a quem devo boa parte do meu mestrado, por toda a ajuda, cuidado e simpatia;

Ao Rogerinho, por toda a ajuda quanto ao material de estudo;

Aos amigos Rafael, Ferdinan, Hellen e Taciana;

Aos amigos estagiários Juliana, Hugo e Flávia;

Aos funcionários dos laboratórios Márcio, Cláudio e Adão;

Aos amigos Thiago, Felipe, Higor, Flávio, Ivan, Lauro, Daniel e Aloísio, por eu estar sempre aprendendo;

Ao Luís e à Angélica, meus amigos-irmãos, por tornarem tudo mais fácil;

Agradeço enfim a Deus; por já ter deixado tudo pronto, antes mesmo de chegarmos; por eu saber que a solução existe antes mesmo de o problema surgir; por tudo e por todos que Ele pôs no meu caminho; e à minha família, meus pais, Luiz Antônio e Maria Aparecida, por me ensinarem a ser forte; meus irmãos, Aline, Gustavo, Carlinhos e Geisiane, por estarem presentes na minha vida, um incentivo indispensável; e minha sobrinha Yasmim, para quem o mundo está apenas começando;

Muito obrigado a todos!

BIOGRAFIA

FABRÍCIO LUCIANI VALENTE, filho de Luiz Antônio Valente e Maria Aparecida Valente, nasceu em 15 de fevereiro de 1980, na cidade de Ubá, Minas Gerais, Brasil.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, em fevereiro de 2000, concluindo a graduação em janeiro de 2005.

Iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, em fevereiro de 2005.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. Tecido Ósseo	4
1.1. Metabolismo Ósseo	5
1.1.1. Osteoblastos	6
1.1.2. Osteócitos	8
1.1.3. Osteoclastos	9
1.1.4. Unidade Básica Multicelular	12
2. Sistema RANKL/RANK/OPG	13
2.1. Conceitos	13
2.2. Funções	14
2.3. Doenças Inflamatórias X Expressão de RANKL	17
3. Osteoporose	18
3.1. Osteoporose Primária	21
3.1.1. Osteoporose por Deficiência de Hormônios Sexuais	21
3.1.2. Osteoporose Senil	24
3.2. Osteoporose Secundária	24
3.2.1. Osteoporose Induzida por Glicocorticóide	25
4. Perspectivas	29
MATERIAL E MÉTODOS	30
1.1. Animais	30
1.2. Aclimação	31
1.3. Procedimento Cirúrgico	31
1.4. Administração do Glicocorticóide	32

1.5. Histopatologia	32
1.6. Imunoistoquímica	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
1. Histomorfometria	36
2. Imunoistoquímica	42
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

1,25(OH)D3	Vitamina D3
BMD	Densidade Mineral Óssea
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BMU	Unidade Básica Multicelular
CSF	Fator Estimulador de Colônia
DEXA	Radioabsorciometria de Feixes Duplos
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HSP 70	Proteína de Choque Térmico 70
HSP 90	Proteína de Choque Térmico 90
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina - 1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IFN-γ	Interferon- γ
JNK	c-Jun N-terminal kinase
M-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Monócitos/Macrófagos
mRNA	RNA mensageiro
NF-κB	Fator Nuclear κ B
NO	Óxido Nitroso
ODF	Fator de Diferenciação Osteoclástica
OPG	Osteoprotegerina
OPGL	Ligante de OPG
PPARγ2	Fator Transcricional para Diferenciação de Adipócitos
PTH	Paratormônio
RANKL	Ligante do Receptor Ativador de NF- κ B
RANK	Receptor Ativador de NF- κ B
RNA	Ácido Ribonucleico
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador - β

TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFSR11	Membro da Superfamília TNF 11
TRAF	Fator Associado a Receptor TNF
TRAIL	Ligante de Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF
TRANCE	Citocina Induzida por Ativação Relacionada a TNF
VTO	Volume Trabecular Ósseo

RESUMO

VALENTE, Fabrício Luciani, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Histomorfometria e expressão imunoistoquímica de RANKL em fêmur e vértebra de ratos com osteoporose secundária.** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-Orientadores: Laércio dos Anjos Benjamin e Ricardo Junqueira Del Carlo.

A osteoporose é uma doença comum em humanos, acometendo tanto mulheres quanto homens. A doença pode ter origem primária, relacionada à deficiência de hormônios sexuais ou a senilidade, ou secundária, cujo exemplo mais comum é o uso crônico de glicocorticóides. Independente da causa, a consequência da osteoporose é a diminuição da massa óssea, aumentando o risco de fraturas. Apesar de ser considerada uma doença sistêmica, a redução de massa óssea na osteoporose não é uniforme no esqueleto. RANKL é uma citocina capaz de ativar a função osteoclástica e sua expressão é indutível em osteoblastos e linfócitos T. A função desta citocina tem sido considerada um possível alvo terapêutico no tratamento da osteoporose. Para avaliar a relação da perda óssea trabecular e a expressão de RANKL, foram realizados testes imunoistoquímicos e histomorfométricos em fêmur e vértebras de ratos castrados e/ou tratados com glicocorticóides, 56 dias após a indução. A expressão imunoistoquímica de RANKL pôde ser verificada nos animais castrados, tanto machos quanto fêmeas, mas não no grupo castrado que também recebeu glicocorticóide. Entretanto, a diminuição da massa óssea em ambos os grupos foi similar na avaliação histomorfométrica. Isso pode ocorrer por causa do efeito inibitório que os glicocorticóides têm sobre o metabolismo. As análises histomorfométricas revelaram ainda, que a massa óssea trabecular avaliada por este método é similar em machos e fêmeas, e que a perda óssea não é uniforme entre o colo femoral, o côndilo femoral e o corpo vertebral. Aos 56 dias de indução, o quadro de perda óssea instalado tanto em machos quanto em fêmeas, para todos os fragmentos ósseos analisados, é compatível com o quadro de osteoporose.

ABSTRACT

VALENTE, Fabrício Luciani, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March of 2007. **Histomorphometry and Immunohistochemical Expression of RANKL in Femur and Vertebra of Rats with Secondary Osteoporosis.** Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-Advisers: Laércio dos Anjos Benjamin and Ricardo Junqueira Del Carlo.

Osteoporosis is a common human disease affecting both men and women, and it can be classified as (1) primary, related to sexual hormones deficiency or senility, or (2) secondary, for what the most common example is the chronic therapies with glucocorticoids. Whatever is its cause, the osteoporosis outcomes are bone loss and increased fracture risk. Although osteoporosis is considered a systemic condition, bone loss seen in osteoporosis is not homogeneous throughout the skeleton. RANKL is a cytokine able to activate the osteoclasts function and its expression is inducible in osteoblasts and T cells by a range of stimuli. Function of RANKL has been considered a possible therapeutic target for the treatment of osteoporosis. To evaluate the trabecular bone loss related to the RANKL expression, immunochemistry and histomorphometric assays were used in femur and vertebra of castrated and/or glucocorticoid-treated male and female rats, at the day 56 after induction. RANKL expression was evident only in the castrated group, both male and female, but not in the group of castrated rats that also received glucocorticoid therapy. But histomorphometric data showed that bone loss was similar in both groups. That could happen because glucocorticoid can inhibit osteoblast metabolism. Histomorphometry also reveals that trabecular bone mass in male is similar to female, and bone loss is not homogeneous between distal and proximal femur and vertebra body. At the day 56 after induction, bone loss, in femur and vertebra, both male and female, was compatible to osteoporosis.

INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença comum em humanos, caracterizada pelo desequilíbrio na formação e na reabsorção óssea, que resulta em perda de massa óssea. O osso, mais frágil, torna-se mais susceptível a fraturas, a principal consequência da doença. A osteoporose é responsável por alta morbidade e mortalidade entre idosos (WHO, 2003).

Os homens representam cerca de 20% dos casos de osteoporose e 25% das fraturas de quadril. Para eles, no entanto, as consequências da doença são mais severas: comparados com as mulheres, os homens com fraturas de quadril têm maiores taxas de morbidade e mortalidade (30 a 50% morrem dentro de um ano). Em homens, 50 a 70% dos casos de osteoporose são secundários a outra condição, como a osteoporose induzida pelo uso crônico de glicocorticóide (LICATA, 2003). Nas mulheres, a osteoporose está relacionada, em parte, à deficiência de hormônios sexuais a partir da menopausa. Com o aumento da expectativa de vida em muitas regiões do mundo, as mulheres vivem mais de um terço de suas vidas após a menopausa, o que explica a crescente incidência da doença. Em 1990, o número de fraturas de colo de fêmur no mundo foi estimado entre 1,3 e 1,7 milhões; para 2025, espera-se que esta cifra seja de quase três milhões, podendo chegar a 6 milhões em 2050. O número de leitos em hospitais ocupados por mulheres que sofreram fratura no colo femoral é similar àquele para doença coronariana, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer de mama (WHO, 2003).

A compreensão do processo fisiopatológico por meio do qual a osteoporose instala-se, é fundamental para o estabelecimento de terapias eficazes, e que apresentem o mínimo efeito colateral. O estudo desse processo logo apontou para o envolvimento de células do sistema imunológico e citocinas na estimulação da perda óssea. Dentre as citocinas, destaca-se o sistema RANKL/RANK/OPG, cuja descoberta estimulou o estudo da interação entre os dois sistemas, ósseo e imune, criando-se o termo osteoimunologia (ARRON e CHOI, 2000).

A formulação de um modelo de indução para o estudo da osteoporose por SANTOS (2004) deu início a esta linha de pesquisa na Universidade Federal de Viçosa. O envolvimento das citocinas do sistema RANKL/RANK/OPG na patogênese das doenças que envolvem perda óssea e, principalmente, a expectativa de sua utilidade na terapêutica e prevenção destas doenças, torna evidente a avaliação do padrão de expressão destas moléculas no modelo proposto.

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é avaliar a perda de osso trabecular nas epífises proximal e distal do fêmur e no corpo vertebral da quarta vértebra lombar de ratos machos e fêmeas e verificar a expressão imunoistoquímica de RANKL nestes mesmos locais, a partir de modelos experimentais de indução de perda óssea.

Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão imunoistoquímica de RANKL, pelo método da imunoperoxidase indireta no osso trabecular de colo femoral, cômulo femoral e corpo vertebral;
- Avaliar o volume trabecular ósseo por histomorfometria e comparar os valores entre tratamentos, entre sexo e entre ossos; e
- Relacionar a expressão de RANKL com a perda de volume trabecular ósseo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Tecido ósseo

Os ossos são constituídos por um tipo especial de tecido conjuntivo e formam o esqueleto, que tem como funções suportar as partes moles do corpo, proteger os órgãos vitais do organismo nas caixas torácica e craniana e no canal raquidiano, alojar e proteger a medula óssea, compor um sistema de alavancas associado aos músculos, e reservar cálcio e fósforo para o organismo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

A composição dos ossos varia com a idade, com a localização anatômica, a saúde geral do indivíduo e o status nutricional. No entanto, 50 a 70% de um osso adulto são compostos de minerais, 20-40% de matriz orgânica, 5-10% de água e 1-5% lipídeos. Cerca de 90% da matriz orgânica do tecido ósseo são compostos por colágeno do tipo I - uma molécula tripla hélice, formada por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ - sintetizado pelos osteoblastos. As outras proteínas componentes da matriz incluem glicoproteínas e proteoglicanos, que formam a substância cimentante. Também estão presentes fatores de crescimento e proteínas exógenas. Estas têm origem sanguínea, como a albumina e as $\alpha 2$ -HS-glicoproteínas. A maior parte do mineral ósseo é a hidroxiapatita, que, no osso, consiste de cristais muito pequenos e contém muitas impurezas, incluindo carbonato e magnésio (SHEA e MILLER, 2005).

O osso é um órgão leve, rígido, de alta força tênsil e não quebradiço por causa de sua combinação de tecido ósseo compacto ou cortical e osso esponjoso ou trabecular (NG *et al*, 1997).

No osso cortical maduro, as lamelas de matriz calcificada são concêntricas a um canal vascular formando o sistema haversiano ou ósteon. O osso esponjoso é uma rede de trabéculas preenchidas por medula óssea. As trabéculas não apresentam vascularização dentro da matriz, de forma que a

irrigação é feita a partir da medula óssea subjacente. Neste tipo de osso, as lamelas seguem a curvatura geral da superfície óssea (SHEA e MILLER, 2005).

As células que compõem o tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteócitos são derivados dos osteoblastos. Eles ocupam lacunas no interior da matriz e sua nutrição é feita por meio de canalículos que permitem a troca de substâncias com os capilares. Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, móveis, muito ramificadas e que reabsorvem o tecido ósseo. A superfície interna e externa dos ossos são revestidas respectivamente pelo endóstio e o perióstio, que são membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

1.1. Metabolismo ósseo

Os ossos têm a capacidade de mudar seu formato organizando sua estrutura interna de forma que a quantidade de tecido requerido para que o osso cumpra sua função seja minimizada. Esta adaptação é um processo dinâmico e envolve tanto a modelação quanto a remodelação. Modelação óssea é um processo pelo qual o osso muda seu comprimento e diâmetro durante as fases de desenvolvimento do esqueleto. Remodelação óssea envolve uma interação complexa de células que segue uma seqüência de ativação, reabsorção e formação óssea (HAZENBERG *et al.*, 2006).

Remodelação

A remodelação óssea é um processo normal e altamente regulado. Ela envolve a ação coordenada de osteoblastos e osteoclastos, e assegura a integridade do esqueleto ao longo da vida. No processo de remodelação óssea, a reabsorção precede a formação, e os osteoblastos ou seus precursores regulam a formação e a atividade dos osteoclastos (CARDA *et al.*, 2005). Mediadores endócrinos (hormônios) e imunológicos (citocinas) estão envolvidos na regulação da remodelação (SHEA e MILLER, 2005).

A taxa de remodelação varia entre ossos diferentes e entre locais diferentes dentro do mesmo osso. O *turnover* ósseo é mais alto em regiões de osso trabecular envolvido por medula óssea vermelha, altamente vascularizada, em comparação com o osso adjacente à medula amarela (SHEA e MILLER, 2005). Vários agentes e fatores são considerados iniciadores ou supressores da remodelação óssea, como mostrado no quadro 1.

Ativadores	Inibidores
PTH	Calcitonina
Prostaglandinas	Bisfosfonatos
Tiroxina	Estrógenos
Vitamina A	Andrógenos
1,25(OH)D3	INF γ
IL-1, IL-6	IL-18
TNF	OPG
Carga mecânica	
RANKL	

Quadro 1: Agentes e fatores de influência sobre a atividade de remodelação óssea (SHEA e MILLER, 2005).

1.1.1. Osteoblastos

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese da matriz orgânica (osteóide) e participam da mineralização (SHEA e MILLER, 2005). Quando inativas, estas células formam uma camada sobre a superfície do osso compacto e do osso trabecular (*Lining Cells*) (LERNER, 2000). Estas células têm grande capacidade de proliferação e, por separarem o compartimento fluido ósseo dos fluidos intersticiais, podem exercer um importante papel na regulação dos níveis plasmáticos de cálcio, na nutrição e suporte metabólico aos osteócitos, e na iniciação da reabsorção pelos osteoclastos (SHEA e MILLER, 2005).

Os osteoblastos originam-se de células mesenquimais pluripotentes, que também originam condrócitos, miócitos, fibroblastos, adipócitos e células do estroma da medula óssea (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000). Diante disto, os precursores dos osteoblastos atingem o osso por migração a partir dos tecidos

conjuntivos vizinhos e da medula óssea. Os progenitores dos osteoblastos também podem originar-se de pericitos (MANOLAGAS, 2000).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMP – Bone Morphogenetic Proteins), que pertencem à superfamília TGF (Fator de Crescimento Transformador), possuem atividade potente para induzir a formação de osso e cartilagem (KARSENTY, 2000; CAO e CHEN, 2005) e são responsáveis pelo comprometimento dos precursores para a linhagem de osteoblastos (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000).

As BMPs estimulam a transcrição de *cbfa 1* (*core binding factor a1*) (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000), um ativador transcricional da diferenciação osteoblástica, cuja função é dominante e não-redundante com a função de nenhum outro gene (KARSENTY, 2000).

Cbfa1 tem todas as características de um ativador transcricional de diferenciação celular, pois (1) é expresso em células destinadas a tornarem-se osteoblastos, mas não em células já diferenciadas; (2) não é expresso em outro tipo celular em níveis significantes; (3) regula a expressão da maior parte dos genes expressos nos osteoblastos, em particular os genes que codificam as proteínas da matriz extracelular; e (4) a transfecção do gene *cbfa1* para células não-osteoblásticas induz a expressão de genes osteoblásticos (KARSENTY, 2000).

Os osteoblastos apresentam receptores para PTH, prostaglandinas, estrógenos, 1,25(OH)₂D₃ e algumas citocinas. Além disso, eles expressam fatores estimuladores de colônia (CSF), RANKL e OPG (SHEA e MILLER, 2005).

Após completarem a síntese da matriz, cerca de 5 % dos osteoblastos ativados retornam à forma inativa revestindo a matriz calcificada (*Lining Cells*); 30% tornam-se osteócitos, células ósseas maduras, que ocupam lacunas no interior da matriz calcificada; e 65% sofrem apoptose (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000).

1.1.2. Osteócitos

O osteoblasto deposita a matriz que produz ao redor de seu corpo e de seus prolongamentos, dando origem a uma lacuna e aos canalículos, respectivamente. Uma vez aprisionado, ele passa a ser chamado de osteócito. Cada lacuna contém uma única célula, cuja nutrição é feita pelos prolongamentos celulares ao longo dos canalículos que estabelecem contato com outras células, já que não há difusão de substâncias pela matriz calcificada (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Os osteócitos participam ativamente da manutenção da matriz e são as células mais abundantes do osso (TATE, 2003); mais de 90% das células ósseas são osteócitos (SHEA e MILLER, 2005; WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000).

O osteócito contém entre 40 a 60 processos celulares, com uma distância de 20 a 30 μm entre elas. Assim, formam uma rede interconectada por seus processos dendríticos, permitindo uma comunicação individual entre osteócitos e os osteoblastos inativos da superfície óssea (HAZENBERG *et al*, 2006). Este sistema lacuno-canalicular age possivelmente como um transdutor que detecta carga mecânica, microdanos e cristais de hidroxiapatita frágeis, para então transmitir o estímulo para a ativação da remodelação óssea (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000). Considera-se a hipótese de que a transmissão de sinais mecânicos para os osteócitos via superfície celular pode ocorrer diretamente pela matriz do tecido devido ao fluxo de fluido induzido pela carga mecânica bem como indiretamente via estresse de pressão pelo sistema lacuno-canalicular. O aumento dos níveis de pressão pode causar a apoptose dos osteócitos devido ao surgimento de microfraturas que afetam a homeostase destas células. Estudos recentes indicam que a apoptose de osteócitos aumenta a atividade osteoclástica (HAZENBERG *et al*, 2006).

1.1.3. Osteoclastos

A reabsorção óssea é uma atividade celular elementar na modelação do esqueleto durante o crescimento e desenvolvimento. Os osteoclastos, as únicas células capazes de reabsorver o tecido ósseo (VÄÄNÄNEN, 2005), são células gigantes, multinucleadas e que se originam da fusão de precursores da linhagem monocítica (LERNER, 2000; FENG, 2005; SHEA e MILLER, 2005; VÄÄNÄNEN, 2005).

Existe uma grande variação no número de núcleos do osteoclasto entre as espécies. Os osteoclastos das aves contêm muito mais núcleos que os osteoclastos de mamíferos, o que pode ser explicado por uma maior capacidade de reabsorção óssea necessária para disponibilizar cálcio para a formação da casca dos ovos (VÄÄNÄNEN, 2005).

A reabsorção óssea envolve dois processos: o recrutamento e a ativação dos osteoclastos (TAKAHASHI *et al*, 1999).

Os osteoclastos diferenciam-se de células hematopoiéticas da linhagem mononuclear, que também podem ser encontradas circulando pelo sangue periférico (VÄÄNÄNEN, 2005). Consequentemente, enquanto os precursores de osteoblastos atingem o osso pela migração a partir dos tecidos vizinhos, os precursores dos osteoclastos chegam a partir da circulação (MANOLAGAS, 2000). No entanto, a formação dos osteoclastos limita-se ao tecido mineralizado, de forma que nunca aparecem na circulação (LERNER, 2000).

Ainda não está claro o que determina o sítio de reabsorção no osso, mas existe a hipótese de que microfraturas, que precisam ser reparadas, poderiam sinalizar o tecido-alvo. Na realidade, os osteócitos poderiam estar constantemente enviando sinais de “não-reabsorção”. Em uma microfratura, os osteócitos locais morrem, interrompendo o sinal e marcando assim o sítio de reabsorção (VÄÄNÄNEN, 2005).

Ao chegar ao local de reabsorção, os osteoclastos iniciam um processo com várias etapas. Primeiro, precisam ligar-se à matriz mineralizada, reorganizando seu citoesqueleto e formando a zona selada. Em seguida, ocorre

uma polarização da membrana celular, formando dois domínios específicos: a borda em escova, voltada para a lacuna de reabsorção; e o domínio secretório, para o lado oposto da célula, por onde os produtos da reabsorção são secretados na circulação após um processo de transcitose (Figura 1). Após exercer sua atividade, o osteoclasto despolariza-se, desprende-se do sítio de reabsorção, reorganiza seu citoesqueleto e reloca-se para outro sítio ou sofre apoptose (SHEA e MILLER, 2005; VÄÄNÄNEN, 2005).

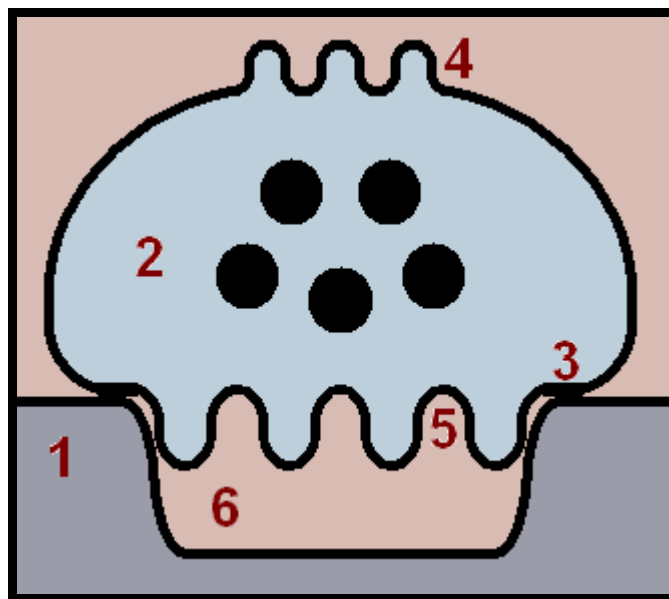


Figura 1: Esquema de um osteoclasto e sua conformação para a reabsorção óssea. Osso (1); Osteoclasto (2); Região da zona selada (3); Domínio secretório (4); Borda em escova, formada pela fusão de diversas vesículas endossomais à membrana celular (5); Lacuna de reabsorção (6). Adaptado de VÄÄNÄNEN, 2005.

A atividade do osteoclasto envolve a dissolução da hidroxiapatita e a degradação do colágeno da matriz óssea (LERNER, 2000; VÄÄNÄNEN, 2005).

Para a desmineralização da matriz, o ambiente da lacuna é acidificado pelo osteoclasto, que possui bombas vacuolares de prótons e canais de cloreto. Os prótons lançados provavelmente têm sua produção mediada por anidrase carbônica II (LERNER, 2000). A catepsina K é a principal enzima que degrada a matriz (VÄÄNÄNEN, 2005).

As células do estroma da medula óssea e os osteoblastos têm um papel fundamental na osteoclastogênese, pois expressam citocinas e fatores de

crescimento para iniciar e dar suporte à diferenciação osteoclástica, estimulando os osteoclastos por contato direto célula-célula, por meio de proteínas expressas na superfície de suas membranas. Além disso, os receptores para os principais hormônios osteotrópicos com capacidade de promover a reabsorção óssea encontram-se nos osteoblastos, que, quando estimulados, exercem uma atividade parácrina (LERNER, 2000).

Dentre as diversas citocinas capazes de influenciar a diferenciação, ativação e atividade dos osteoclastos em estudos *in vitro*, RANKL e M-CSF, juntos, mostram-se suficientes para a osteoclastogênese (FENG, 2005). RANKL, uma citocina da família TNF, é expresso principalmente em osteoblastos e células T ativadas. Seu receptor ativo é o RANK, expresso em osteoclastos, seus precursores e células dendríticas. Uma vez ativado nos osteoclastos, RANK permite a maturação e desenvolvimento das funções de reabsorção óssea (ARRON e CHOI, 2000). Vários hormônios e drogas estimulam ou inibem a diferenciação dos osteoclastos regulando a expressão de RANKL e seus receptores (VÄÄNÄNEN, 2005).

Outros membros da família TNF têm efeito na modulação da diferenciação, função, sobrevivência e/ou apoptose dos osteoclastos; dentre eles, destacam-se TNF α , FasL, TRAIL e RANKL. A descoberta do sistema de citocinas RANKL/RANK/OPG ajudou a estabelecer o suporte das células osteoblásticas e do estroma da medula – células capazes de expressar RANKL – para a osteoclastogênese (FENG, 2005).

Os osteoclastos apresentam receptores para a calcitonina (LERNER, 2000), que inibe a atividade de reabsorção do osteoclasto (VÄÄNÄNEN, 2005).

O óxido nítrico (NO) tem efeito inibitório sobre os osteoclastos e, na maior parte das situações, os osteoblastos e as células endoteliais são a principal fonte de NO no osso. No entanto, os próprios osteoclastos também podem produzir NO. De forma contrária, é provável que alguma fonte de NO seja necessária para a função osteoclástica normal e pode ocorrer apoptose dessas células se seu mecanismo for completamente eliminado. O NO é um importante segundo mensageiro para a ação do estrogênio no osso e um mecanismo-chave

pelo qual o efeito anabólico do estrógeno no osteoclasto pode reduzir a atividade osteoclástica (BLAIR *et al*, 2005).

TGF- β , da mesma superfamília das BMPs, foi reportado como um substituto do RANKL na formação osteoclástica em meio contendo soro, presumivelmente porque seu mecanismo de ação utiliza vias em comum com RANK (BLAIR *et al*, 2005).

Os receptores para andrógenos estão presentes no osso e têm efeito na massa óssea, suprimindo a atividade de CSF-1 ou RANKL, o que parece ser similar aos efeitos do estrógeno (BLAIR *et al*, 2005).

O receptor para interleucina 1 (IL-1) é um membro da família de receptores Toll-like, constituinte da imunidade inata, capaz de responder a glicoproteínas e produtos bacterianos, bem como à IL-1 produzida em uma resposta inflamatória. Este receptor está particularmente bem representado e ativo na família dos macrófagos, como os osteoclastos e seus precursores. Sua sinalização é feita por proteínas adaptadoras (TRAF) e atua estimulando NF- κ B. Assim, seria esperado que incrementasse a resposta TNF, como RANKL (BLAIR *et al*, 2005).

1.1.4. Unidade básica multicelular (BMU)

Um sítio de remodelação é iniciado pelo aparecimento de osteoclastos (e precursores) seguindo vários estímulos locais ou humorais para a reabsorção. A remodelação óssea é controlada por vários hormônios circulantes e fatores produzidos localmente e a comunicação intercelular entre as diferentes células ósseas é uma parte integrante desses mecanismos (NG *et al*, 1997).

Em um osso adulto e saudável, todos os osteoclastos e osteoblastos ativados pertencem a uma estrutura temporária conhecida como Unidade Básica Multicelular (BMU – *Basic Multicellular Unit*), que compreende uma equipe de osteoclastos à frente, outro de osteoblastos em seguida, um capilar central, um suprimento nervoso e tecido conjuntivo associado. No osso cortical, uma BMU escava e repõe um túnel; no osso esponjoso, escava e repõe uma vala. A meia-vida de uma BMU é de cerca de 6 a 9 meses, mais longa que a meia-vida dos

osteoblastos e osteoclastos. Conseqüentemente, um suprimento contínuo de progenitores das células ósseas é necessário para a formação e progressão da BMU no osso (MANOLAGAS, 2000).

2. Sistema RANKL/RANK/OPG

Com a descoberta do sistema de citocinas RANKL/RANK/OPG, presente tanto no sistema imune quanto no sistema ósseo, a relação entre esses dois sistemas mostrou-se mais íntima do que se pensava. Além disso, várias citocinas, fatores estimuladores de colônia e moléculas sinalizadoras apresentam funções cruciais no tecido ósseo (GRCEVIC *et al.*, 2001; BARON, 2004). Para encorajar o estudo interdisciplinar entre a biologia óssea e a imunologia, foi criado o termo osteoimunologia (RHO *et al.*, 2004).

2.1. Conceitos

RANKL significa “Ligante do Receptor para a Ativação do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B)”. RANKL é uma citocina da superfamília do TNF. Possui dois receptores, um funcional (RANK) e outro, que se liga ao RANKL para prevenir sua atividade, OPG (Osteoprotegerina) (GRCEVIC *et al.*, 2001; WALSH e CHOI, 2003; FENG, 2005).

RANKL também é conhecido por outras denominações, por ter sido descoberto de forma independente entre grupos de pesquisa do sistema ósseo e do sistema imunológico; dentre elas: OPGL, ODF, TRANCE e TNFSF-11 (GRCEVIC *et al.*, 2001; WALSH e CHOI, 2003; FENG, 2005).

Os membros da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) e de seus receptores (TNFR) têm como funções gerais a regulação da diferenciação, proliferação e sobrevivência celulares. Os receptores dessa família não apresentam atividade enzimática em seu domínio intracelular, sendo, sua sinalização, mediada por proteínas adaptadoras chamadas Fatores Associados ao Receptor de Fator de Necrose Tumoral (TRAF) (WALSH e CHOI, 2003; FENG, 2005).

2.2. Funções

As citocinas do sistema RANKL/RANK/OPG regulam funções tanto das células ósseas quanto das células imunológicas. Este sistema é essencial para função e desenvolvimento normais de osteoclastos, células dendríticas e linfócitos T e B (GRCEVIC *et al.*, 2001).

RANK é o membro 11A da superfamília de receptores de TNF, interage diretamente com a proteína adaptadora, e essa interação é responsável pela ativação do complexo NF- κ B e JNK (FENG, 2005). São conhecidos 6 TRAFs, dentre os quais, apenas TRAF4 não participa da sinalização via RANK. TRAF1, 2, 3 e 5 ligam-se a uma região distal (em relação à membrana) da cauda citoplasmática do RANK e TRAF6 liga-se à uma porção mais proximal. TRAF6 parece ser o adaptador crucial para a sinalização via RANKL/RANK (TAKAHASHI *et al.*, 1999; WALSH e CHOI, 2003). O IFN- γ também pode inibir a função do RANK porque degrada o TRAF6 (ARRON e CHOI, 2000; TAKAYANAGI *et al.*, 2000; WALSH e CHOI, 2003). Estes mecanismos estão representados na figura 2.

RANKL está relacionado ao desenvolvimento e processos homeostáticos no tecido ósseo, no tecido linfóide, na produção de leite e na regulação da interação célula dendrítica/linfócito T (WALSH e CHOI, 2003). A expressão de RANKL dentro do sistema imune é restrita aos linfócitos T ativados por ligação antígeno-receptor (GRCEVIC *et al.*, 2001).

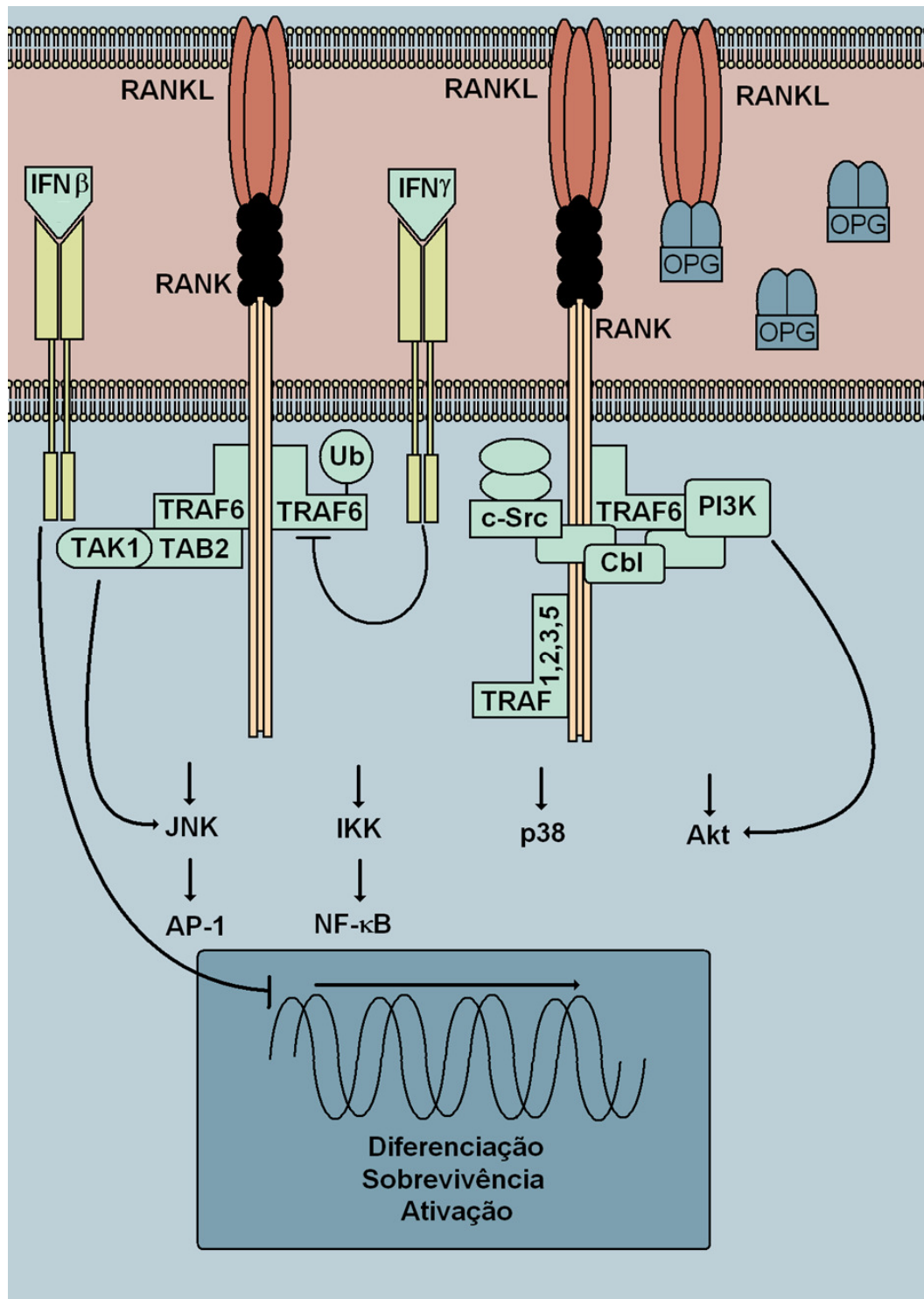


Figura 2 : Esquema representando a interação RANK/RANKL, citocinas de membrana, e o papel regulatório do receptor solúvel OPG. IFN- γ é um regulador negativo porque seu mecanismo de sinalização utiliza e degrada TRAF6, importante proteína adaptadora na cauda intracitoplasmática de RANK para sua função, que envolve ativação de JNK e NF- κ B. Adaptado de WALSH e CHOI, 2003.

Várias substâncias têm potencial para regular negativa ou positivamente a expressão de OPG, RANKL e RANK. Algumas delas estão relacionadas no quadro 2. A expressão de RANKL é altamente indutível e parece ser regulada pelos mesmos fatores osteotrópicos que regulam a expressão de OPG (WALSH e CHOI, 2003; BEZERRA *et al.*, 2005).

	OPG	RANKL	RANK
Vitamina D3	↑	↑	
PTH	↓	↑	
Estrógeno	↑	∅	
IL-1	↑	↑	
IL-6	↑	↑	↓
IL-11	↑	↑	
IL-17		↑	
CD40L	↑		↑
TNF	↑	↑	
TGFβ	↑	↓	
Glicocorticóides	↓	↑	
Prostaglandina			
E2	↓	↑	
Cálcio	↑	↑	
LPS	↑		

Quadro 2: Alguns reguladores da expressão de OPG, RANKL e RANK: (↑) expressão aumentada; (↓) expressão diminuída; (∅) não mudou; (em branco) não testado ou desconhecido (Adaptado de WALSH e CHOI, 2003).

RANKL é um regulador da formação e ativação de osteoclastos, através do qual muitos hormônios e citocinas produzem seu efeito de osteoabsorção. Dentro do sistema ósseo, RANKL é expresso na linhagem osteoblástica e em condrócitos que estão hipertrofiando, e exerce seu efeito ligando-se a seu receptor, RANK, expresso na linhagem osteoclástica. Esta ligação determina uma rápida diferenciação de precursores de osteoclastos e a uma ativação e resistência à apoptose dos osteoclastos maduros (GRCEVIC *et al.*, 2001), efeito similar na interação RANKL/RANK em células T e células dendríticas (KARTSOGIANNIS *et al.*, 1999). RANKL não é fator de crescimento e sim fator de diferenciação, importante para desenvolvimento e função de células T, células dendríticas e osteoclastos (TAKAHASHI *et al.*, 1999).

OPG é um receptor também produzido pelas células osteoblásticas e do estroma e que compete com RANK pela ligação ao RANKL (Figura 2). A ligação com OPG não tem efeito, portanto, sua ação é reguladora da atividade do RANKL, inibindo a maturação de osteoclastos e a ativação de osteoclastos maduros, além de evitar a resistência à apoptose (GRCEVIC *et al.*, 2001; FENG, 2005). A produção de OPG também pode ser induzida em linfócitos B e células dendríticas (WALSH e CHOI, 2003).

A remodelação óssea é controlada por um balanço entre a ligação RANK/RANKL e a produção de OPG (GRCEVIC *et al.*, 2001, BEZERRA *et al.*, 2005). Vários hormônios, citocinas, fatores de crescimento ou drogas, de efeito local ou sistêmico, que têm propriedades osteotrópicas, têm a capacidade de alterar esse equilíbrio, como mostrado no Quadro 1 (GRCEVIC *et al.*, 2001; FENG, 2005).

CARDA e colaboradores (2005) verificaram a expressão de RANKL e OPG em osso e cartilagem da articulação craniomandibular de fetos humanos e detectaram co-expressão nas mesmas células ósseas e no mesmo nível de diferenciação tanto de proteínas quanto de mRNA das duas citocinas, o que sugere que sua indução é acoplada.

Animais transgênicos, *knockout* para o gene *rankl*, desenvolvem severa osteopetrose (BEZERRA *et al.*, 2005; FENG, 2005). O mesmo ocorre em camundongos transgênicos com altos níveis sistêmicos de OPG. Como esperado, animais deficientes em OPG apresentaram osteoporose (BEZERRA *et al.*, 2005), mostrando o papel regulatório da osteoprotegerina no equilíbrio ósseo.

2.3. Doenças inflamatórias X expressão de RANKL

Erosão focal e osteoporose periarticular nos locais de inflamação ativa e perda óssea generalizada com massa óssea reduzida são as principais complicações da artrite reumatóide (BEZERRA *et al.*, 2005). Tais complicações podem ser atribuídas a uma cascata de citocinas osteoclastogênicas secretadas por linfócitos T ativados, macrófagos, fibroblastos e osteoblastos, incluindo IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α e M-CSF, que se acumulam nos compartimentos sinoviais das

articulações inflamadas (GRCEVIC, 2001; BEZERRA *et al*, 2005). Estes compartimentos podem contribuir ainda como fonte de precursores de osteoclastos, uma vez que seus macrófagos podem diferenciar-se em osteoclastos na presença de M-CSF e RANKL. A administração de OPG não tem efeito na severidade da inflamação, mas bloqueia a perda da densidade mineral óssea, de forma dose-dependente. RANKL parece não ser o responsável pela destruição da cartilagem na artrite reumatóide; no entanto, apresenta um papel claramente modulador, mas ainda indefinido (BEZERRA *et al*, 2005).

Um mecanismo similar ocorre em osteomielite e doença periodontal. Nesta, componentes microbianos induzem o infiltrado inflamatório e a secreção de várias citocinas. Em trabalhos com camundongos, a doença periodontal apresentou perda óssea significativamente mais fraca em animais *knockout* para linfócitos T (GRCEVIC *et al*, 2001).

3. Osteoporose

A osteoporose é conceituada como uma doença caracterizada por perda de massa óssea, determinando fragilidade do esqueleto. O número de fraturas decorrentes da osteoporose vem aumentando continuamente (WHO, 2003), porém, as informações sobre o impacto econômico e social da doença em países em desenvolvimento ainda são escassas (ROCHA e RIBEIRO, 2003; MORALES-TORRES e GUTIÉRREZ-UREÑA, 2004).

A osteoporose é comum, assintomática e freqüentemente não detectada até que ocorra uma fratura (REGINSTER e BURLET, 2006). Na maioria dos casos, é considerada uma doença poligênica multifatorial, na qual determinantes genéticos são modulados por fatores hormonais, ambientais e nutricionais (GENNARI *et al*, 2002). A tecnologia para mensuração da BMD (Densidade Mineral Óssea; *BMD – Bone Mineral Density*) trouxe características quantitativas ao conceito de osteoporose: BMD < -1,0 indica osteopenia; e abaixo de -2,5, osteoporose (FERRETTI *et al*, 2003). Histomorfometricamente, a doença é definida quando a perda óssea é maior que 11% (ALEXANDRE, 2005). A BMD

é uma medida de diagnóstico mais sensível que histomorfometria, pois mensura todo o osso em questão (WEINSTEIN *et al*, 2004).

A osteoporose é classificada, segundo a causa, em primária (tipos I e II) e secundária. A osteoporose primária do tipo I, ou osteoporose idiopática pós-menopausa, está associada à deficiência de estrogênio. O tipo II, ou idiopática senil, está associado ao envelhecimento, fase em que ocorre deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do PTH e diminuição de formação óssea. A osteoporose secundária é a perda óssea associada a processos inflamatórios, alterações endócrinas e uso de drogas (heparina, glicocorticóides) (GALI, 2001).

Conseqüências

A osteoporose é uma doença sistêmica, mas as fraturas debilitantes ocorrem frequentemente no punho, vértebras e colo femoral (SHEA e MILLER, 2005).

Mulheres com fraturas vertebrais podem ter função física diminuída, dor nas costas, perda de altura e vida social prejudicada. Alguns estudos mostram que fraturas de quadris dentro de um grupo relativamente saudável de mulheres aumentam quase seis vezes o risco de morte e aproximadamente metade das mortes ocorre dentro de um ano. Além disso, os custos com fraturas osteoporóticas são altos e estão aumentando cada vez mais (REGINSTER e BURLET, 2006).

Epidemiologia

Embora a prevalência da doença seja alta, o diagnóstico nem sempre ocorre, particularmente em casos em que o paciente não apresenta evento traumático (CAPPER e FLANAGAN, 2005).

A incidência da osteoporose em mulheres na pós-menopausa continua a aumentar com o envelhecimento progressivo das populações (REGINSTER e BURLET, 2006). Porém SHUSTER (2005) afirma que a prevalência da osteoporose aumenta mais que o nosso entendimento sobre sua causa e

tratamento. Em 2005, nos Estados Unidos, mais de 10 milhões de indivíduos apresentavam osteoporose (SHEA e MILLER, 2005). Estima-se que em 2020, no Brasil, 11% da população terá mais de 60 anos (SIQUEIRA *et al*, 2005), mas as informações sobre o impacto econômico e social da osteoporose em países em desenvolvimento ainda é escasso (ROCHA e RIBEIRO, 2003).

SIQUEIRA e colaboradores (2005) realizaram um estudo na cidade de Pelotas (RS) com o objetivo de estimar a prevalência de fraturas. Nesse estudo, foi verificado diagnóstico médico para osteoporose em 2,5% de todos os homens entrevistados e 12,2% das mulheres. Este diagnóstico apresentava correlação positiva com casos de fraturas nos 12 meses anteriores à entrevista.

ROCHA e RIBEIRO (2003) investigaram a incidência de fraturas de quadris em uma população residente em Sobral (CE), que representa uma área equatorial. Segundo estes autores, este tipo de estudo é importante para identificar fatores de risco ambientais e genéticos para melhor abordagem da prevenção e tratamento da osteoporose. Este estudo mostra menor incidência de fraturas de quadris quando comparada àquela apresentada por outros estudos em outras áreas do país. Os autores assumem que a população de Sobral é constituída principalmente de descendentes de europeus e indígenas, salientando que africanos não participam consideravelmente da formação desta população e especulam que a luz solar constante nesta região pode estar relacionada a melhores níveis de vitamina D3.

MORALES-TORRES e GUTIÉRREZ-UREÑA (2004) conduziram uma revisão de literatura e entrevistas com profissionais especializados por toda a América Latina para avaliar o impacto da doença. Foi verificado que há várias publicações a respeito da distribuição dos valores de BMD avaliados por DEXA e que o pico de massa óssea é atingido em idades similares e declina após a menopausa também de maneira similar. No entanto, as prevalências de osteopenia e osteoporose não são bem conhecidas.

Outro dado interessante verificado por estes autores é o fato de que a maior parte dos estudos mostra incidências de fratura de quadris mais baixas nas populações latino-americanas se comparado com aquelas encontradas na

população dos Estados Unidos, Canadá e Europa, mas que estes resultados podem ser devido a diferenças metodológicas, e frisam que outros estudos conduzidos nos Estados Unidos mostram menor incidência de fraturas de quadris entre mulheres mexicanas quando comparadas com caucasianas. MORALES-TORRES e GUTIÉRREZ-UREÑA concluíram que a América Latina apresenta grande diversidade geográfica e étnica, mas há uma falta de informação epidemiológica a respeito da osteoporose.

Os homens têm menor prevalência de osteoporose que as mulheres por várias razões, dentre elas: os homens acumulam maior massa óssea; não são afetados por um evento similar à menopausa, ou seja, os níveis de testosterona declinam lentamente; a expectativa de vida para os homens é menor; e o número de homens submetidos à avaliação da densidade óssea é menor, podendo haver então uma conclusão incorreta sobre a prevalência da osteoporose em homens (LICATA, 2003).

3.1. Osteoporose primária

3.1.1. Osteoporose por deficiência de hormônios sexuais

Mulheres

Com a menopausa, surgem alterações na remodelação óssea, com aumento do *turnover* e um balanço ósseo negativo. A perda óssea é mais acentuada nos primeiros anos pós-menopausa (HERNANDEZ *et al*, 2003) e a perda de estrógeno na menopausa é o principal contribuinte para a patogênese da osteoporose (FAN *et al*, 2005). A estimulação da formação de osteoclastos é reconhecida como mecanismo fundamental pelo qual a deficiência de estrógeno induz perda óssea (CENCI *et al*, 2000), pois este hormônio é o principal regulador negativo da atividade osteoclástica. A ausência de estrógeno estimula a expressão de IL-1, IL-6 e TNF, que têm ação estimulante da reabsorção óssea e regula negativamente a expressão de IGF1, que tem ação estimuladora da formação óssea (FAN *et al*, 2005). O estrógeno modula a rede de citocinas e sua ausência

acaba por estimular inclusive a expressão de RANKL (RIGGS *et al*, 2002). A figura 3 detalha um pouco mais esta modulação.

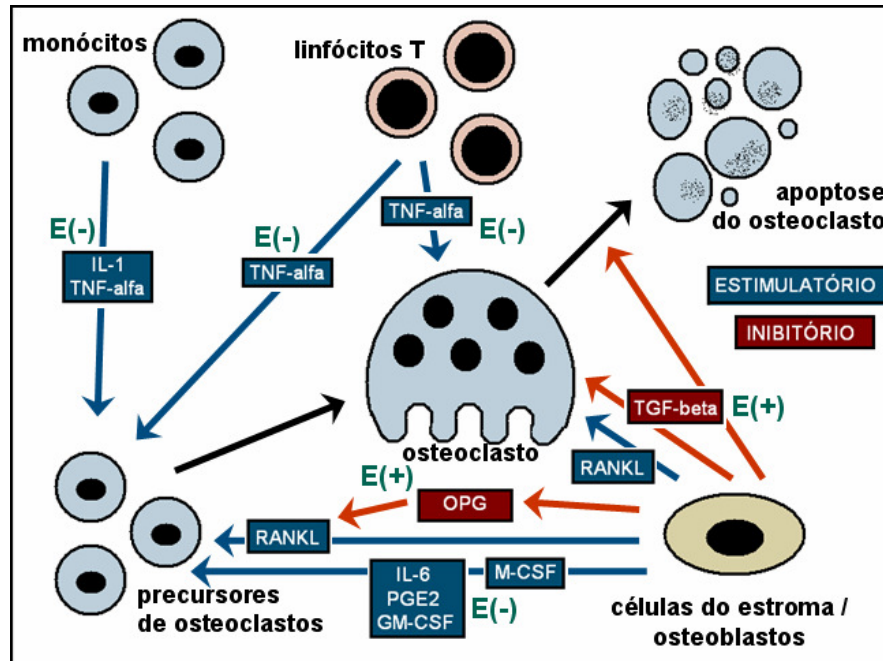


Figura 3: Efeito do estrógeno sobre o tecido ósseo. Setas e caixas azuis mostram citocinas e vias com efeitos estimulatórios; vermelhas, efeitos inibitórios. Estrógeno (E) é mostrado de acordo com seu efeito positivo (+) ou negativo (-). Adaptado de RIGGS *et al.*, 2002.

FAN e colaboradores (2005) utilizaram metodologias proteômicas para caracterizar a expressão diferencial de proteínas nos ossos de ratos com osteoporose induzida por ovariectomia e detectaram três proteínas com expressões distintas. A primeira, ausente no grupo normal, foi identificada como uma enzima antioxidante que limita a atividade de espécies reativas de oxigênio. Essa expressão pode ser uma retro-alimentação do acúmulo de oxigênio que resulta da perda de estrógeno em ratas castradas. As outras duas proteínas foram expressas com mais abundância no grupo com osteoporose. Uma foi identificada como proteína do citoesqueleto presente em todas as células eucarióticas; e a outra, uma enzima relacionada à ubiquitinação de proteínas.

Os radicais livres estão envolvidos na osteoclastogênese e na absorção óssea. Além da deficiência de estrógeno, vários outros fatores de risco para osteoporose, como o fumo, hipertensão e diabetes, estão associados com o

aumento do estresse oxidativo. O aumento do peróxido de hidrogênio pode aumentar a expressão de TNF- α , que tem capacidade de induzir perda óssea. O próprio peróxido poderia aumentar a função e diferenciação dos osteoclastos, que expressam NADPH oxidase e produzem alta quantidade de espécies reativas de oxigênio durante a reabsorção óssea (MUTHUSAMI *et al*, 2005).

Homens

Nos homens, ocorre um declínio lento da produção de andrógenos. Há uma diminuição gradual da massa óssea, que é linearmente relacionada à idade. Por isso, a osteoporose é mais comum em mulheres. Mas a osteoporose masculina não deixa de ser importante por causa disso. O impacto clínico da osteoporose é mais severo em homens que em mulheres. Hipogonadismo em homens é um forte fator de risco para osteoporose que contribui para a perda óssea em 20-30% dos homens idosos. Os andrógenos apenas não são suficientes para manter um estatus ósseo normal em homens saudáveis. O estradiol desempenha papel predominante na regulação da massa óssea via receptores α e β específicos localizados dentro dos osteoblastos. Em ratos com hipogonadismo, o estrógeno é mais efetivo em restaurar a massa óssea que os andrógenos. Assim, se esteróides sexuais fossem utilizados no tratamento para a osteoporose masculina, os melhores efeitos seriam alcançados com o uso de estrógeno, mas os efeitos feminilizantes da terapia seriam inaceitáveis em pacientes com função testicular normal (ALEXANDRE, 2005).

O câncer de próstata é dependente de andrógeno e a terapia de privação de andrógenos é seu tratamento padrão. Isso pode ser alcançado pela castração ou pelo uso de agonistas de GnRH (ALEXANDRE, 2005). Um dos efeitos colaterais desta terapia é a perda óssea com risco de fratura. Há relatos de alta prevalência de osteopenia e osteoporose pré-existentes em pacientes com câncer de próstata. Nesses casos, a terapia de privação de andrógenos incrementaria a perda óssea. Outros efeitos colaterais são a diminuição da massa corpórea e a diminuição do tamanho muscular. Os tratamentos para a osteoporose

em homens são os mesmos utilizados para a osteoporose pós-menopausa (MAGNO *et al*, 2005).

3.1.2. Osteoporose senil

Com a idade, uma variedade de alterações endócrinas e metabólicas combina-se para enfraquecer o esqueleto. A produção de testosterona nos homens diminui assim como a produção de hormônio do crescimento em ambos os sexos e os músculos se deterioram. A absorção de cálcio torna-se ineficiente, o hiperparatireoidismo secundário aumenta e vários níveis de disfunção da vitamina D podem ser vistos, da função ineficiente à deficiência (LICATA, 2003).

Com a perda óssea que ocorre durante o envelhecimento, há aposição periosteal como mecanismo compensatório para prevenir a falência estrutural que se dá com o desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea dentro de cada BMU na remodelação óssea. Este mecanismo compensatório é menor em mulheres (RUSSO *et al*, 2006). Em seus trabalhos, RUSSO e colaboradores (2006) também verificaram o crescimento do diâmetro do osso com maior intensidade em homens, enquanto o diâmetro medular é proporcional em ambos os sexos.

3.2. Osteoporose secundária

Muitas doenças e drogas podem causar osteoporose secundária. Dentre as drogas, os glicocorticóides estão no topo da lista de causadores de osteoporose. No entanto, anticonvulsivantes, antigonadotrópicos, tabaco e álcool podem levar à perda óssea. Doenças como desordens gastrointestinais, disfunções renais, hipogonadismo, hiperparatireoidismo primário e secundário, hipercortisolismo endógeno, hiperprolactinemia, acromegalia, leucemia, entre outras, também têm efeito deletério sobre o esqueleto (LICATA, 2003).

3.2.1. Osteoporose induzida pelo uso de glicocorticóides

A osteoporose induzida por glicocorticóides pode ser ocasionada pela exposição crônica a concentrações excessivas de cortisol endógeno ou mesmo a doses farmacológicas (MANELLI e GIUSTINA, 2000).

Os glicocorticóides são muito utilizados no tratamento de doenças com componente inflamatório como a asma, a artrite reumatóide e a dermatite atópica, e também na manutenção de órgãos transplantados (ZIEGLER e KASPERK, 1998; REID, 2000; MCLAUGHLIN *et al*, 2002; LANNA *et al*, 2003; MCILWAIN, 2003). No entanto, vários são os efeitos colaterais do uso dos glicocorticóides e, entre eles, a osteoporose destaca-se como o mais sério e debilitante (SAMBROOK e LANE, 2001; MCLAUGHLIN *et al*, 2002). Existem opções terapêuticas efetivas contra a osteoporose induzida por glicocorticóides, mas o maior obstáculo é o fato de que a maioria dos pacientes que recebem tratamento com glicocorticóides não são avaliados quanto à perda óssea (MCILWAIN, 2003). Alguns danos causados pela exposição crônica a glicocorticóides são tratáveis e potencialmente reversíveis, dependendo de sua extensão (MANELLI e GIUSTINA, 2000).

O efeito dos glicocorticóides no metabolismo ósseo depende da duração do tratamento, da dose e do tipo de corticoterapia, da idade, do sexo e do índice de massa corpórea, da susceptibilidade individual aos danos ósseos mediados pelos glicocorticóides (MANELLI e GIUSTINA, 2000) e da doença concorrente para a qual o glicocorticóide é utilizado como tratamento (SAMBROOK e LANE, 2001). Tais fatores podem ter um efeito independente e aditivo na perda óssea (MCILWAIN, 2003).

Os receptores para glicocorticóides estão amplamente distribuídos no organismo. Encontram-se no citoplasma, em sua forma inativa, em um complexo protéico que inclui as proteínas de choque térmico HSP90 e HSP70. Quando o glicocorticóide liga-se ao seu receptor, ele transloca-se para o núcleo, onde interage com um promotor do gene-alvo (MCLAUGHLIN *et al*, 2002; LANNA *et al*, 2003).

Os glicocorticóides também atuam de uma forma não-genômica e rápida por interações com moléculas envolvidas em sinalização transducional (PATSCHAND *et al*, 2001; MCLAUGHLIN *et al*, 2002).

A perda óssea induzida por glicocorticóides tem caráter multi-fatorial (ZIEGLER e KASPERK, 1998) e, como seus receptores são amplamente difundidos pelo organismo, eles podem exercer impacto no osso e no metabolismo do cálcio de várias maneiras (REID, 2000). Além disso, envolve prevalentemente o osso trabecular e é mais pronunciado nos 12 primeiros meses de exposição (MANELLI e GIUSTINA, 2000, SAMBROOK e LANE, 2001; LANNA *et al*, 2003; MCILWAIN, 2003). A característica cardinal da osteoporose induzida por glicocorticóides é a diminuição da formação óssea (MCILWAIN, 2003; TAMURA *et al*, 2004).

Alguns pacientes tratados com glicocorticóides apresentam BMD normal, o que indica que alguns indivíduos podem ser resistentes aos efeitos osteopênicos dos glicocorticóides. Teoricamente, isto é possível porque há polimorfismo no receptor de glicocorticóide, o que poderia resultar em diferentes graus de sensibilidade a esses hormônios. Mas há pouca evidência clínica de que isso tenha importância prática (REID, 2000).

A maioria dos indivíduos que recebem uma dose igual ou superior a 5mg por dia de prednisolona está sujeita a perda óssea com risco de fraturas (REID, 2000), mas doses menores que estas não eliminam esse risco (TAMURA *et al*, 2004).

Osteoblastos

Os glicocorticóides afetam os osteoblastos tanto na sua atividade proliferativa quanto metabólica (PATSCHAND *et al*, 2001), podendo exercer efeito inibitório direto de três formas: 1) inibindo a replicação de seus precursores; 2) diminuindo a gênese de novos osteoblastos e; 3) induzindo sua apoptose (ZIEGLER e KASPERK, 1998; MANELLI e GIUSTINA, 2000; LAFAGE-PROUST *et al*, 2003).

Na presença de glicocorticóides, a diferenciação das células mesenquimais que dariam origem aos precursores de osteoblastos, pode ser desviada para a produção de adipócitos (MCLAUGHLIN *et al*, 2002), pois aumentam a expressão de PPAR γ 2 (*peroxisome proliferator-activated receptor γ 2*) – fator transcricional para diferenciação de adipócitos - e diminuem a expressão de Cbfa1 - fator transcricional essencial para a diferenciação osteoblástica. Além disso, diminuem a produção de diversos fatores locais importantes na formação óssea, como IGF-1 e receptores TGF β tipo I (TAMURA *et al*, 2004).

Ao mesmo tempo, os glicocorticóides também diminuem a produção de colágeno do tipo I (ZIEGLER e KASPERK, 1998; MANELLI e GIUSTINA, 2000; REID, 2000; LANNA *et al*, 2003; TAMURA *et al*, 2004) e da osteocalcina, um marcador da formação óssea (ZIEGLER e KASPERK, 1998; REID, 2000; MCLAUGHLIN *et al*, 2002). *In vitro*, os glicocorticóides são capazes de aumentar a expressão de RANKL e diminuir a de OPG (MCLAUGHLIN *et al*, 2002; LANNA *et al*, 2003).

Osteoclastos

Os efeitos da exposição crônica dos osteoclastos aos glicocorticóides são contraditórios. Não foram encontrados receptores para glicocorticóides e osteoclastos (LAFAGE-PROUST *et al*, 2003). Há aumento da formação destas células a partir de seus precursores porque há diminuição da expressão de OPG e aumento de RANKL, mas também há aumento da apoptose de osteoclastos maduros. Em conclusão, a diminuição da formação óssea seria mais importante que o aumento da reabsorção na fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóides (REID, 2000; PATSCHAND *et al*, 2001; LAFAGE-PROUST *et al*, 2003; TAMURA *et al*, 2004).

Intestino

Os glicocorticóides diminuem a absorção de cálcio no intestino (ZIEGLER e KASPERK, 1998; MANELLI e GIUSTINA, 2000) por um mecanismo independente de interferência no metabolismo da vitamina D (REID,

2000). O transporte transcelular do cálcio e a síntese de suas proteínas ligantes ficam diminuídos (PATSCHAND *et al*, 2001).

Rins

Os glicocorticóides induzem hipercalciúria (MANELLI e GIUSTINA, 2000) porque diminuem a reabsorção renal do cálcio filtrado no glomérulo. Este efeito, juntamente com a baixa absorção intestinal de cálcio, leva a uma diminuição do cálcio sérico, o que pode estimular as glândulas paratireóides a secretarem mais paratormônio (ZIEGLER e KASPERK, 1998; REID, 2000).

Hormônios

Os glicocorticóides podem inibir o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (MANELLI e GIUSTINA, 2000; PATSCHAND *et al*, 2001) e mesmo inibir a produção dos hormônios sexuais diretamente pelas gônadas (PATSCHAND *et al*, 2001). Com o comprometimento da função gonadal, as mulheres apresentam amenorréia e os homens, infertilidade e impotência (ZIEGLER e KASPERK, 1998). O hipogonadismo está associado à osteoporose em ambos os sexos (REID, 2000). Segundo WEINSTEIN e colaboradores (2004), em modelos murinos, o hipogonadismo não ocorre ou contribui para a osteoporose induzida por glicocorticóides e os efeitos destas substâncias na perda óssea sobrepõem àqueles do hipogonadismo, ou seja, seus efeitos não são aditivos.

Os glicocorticóides podem aumentar a secreção de PTH (MANELLI e GIUSTINA, 2000). As paratireóides apresentam receptores para os glicocorticóides, que podem promover diretamente uma hiperplasia glandular e um aumento dos níveis do paratormônio (LANNA *et al*, 2003). Além disso, o aumento da secreção do paratormônio pode ser secundário a outras ações dos glicocorticóides que acarretam perda de cálcio do organismo (LANNA *et al*, 2003), e para PATSCHAND e colaboradores (2001), o hiperparatireoidismo secundário não contribui para a patogênese da osteoporose induzida por glicocorticóides.

Os dados relativos ao metabolismo da vitamina D são divergentes (MANELLI e GIUSTINA, 2000). Alguma diferenciação na vitamina D sérica poderia ser devido a mudanças na concentração de PTH (REID, 2000).

Segundo LANNA e colaboradores (2003), a calcitonina não tem envolvimento na fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide.

Músculos

O excesso de glicocorticóide determina uma atrofia e diminuição da força muscular, um estímulo a menos para a formação óssea (ZIEGLER e KASPERK, 1998; SAMBROOK e LANE, 2001).

4. Perspectivas

Segundo BEZERRA e colaboradores (2005), a inibição de RANKL parece ser a estratégia mais racional e aconselhável para prevenir a destruição óssea em diversas doenças e possivelmente erradicar doenças humanas de grande importância como osteoporose, doença periodontal e artrite reumatóide, que afetam milhões de pessoas.

FENG (2005) citam a possibilidade da utilização de p55 solúveis para neutralizar TNF- α , bem como o bloqueio dos mecanismos de sinalização dos receptores como terapia para a perda óssea pós-menopausa e em doenças inflamatórias. No entanto, os mecanismos precisos ainda precisam ser elucidados.

TAKAYANAGI e colaboradores (2000) mostram a possibilidade do uso terapêutico de IFN- γ , seguindo o mesmo princípio.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto, registrado sob o número 50501354079 na Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PPG) da Universidade Federal de Viçosa e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Departamento de Veterinária - UFV utilizou para as análises histomorfométricas e imunoistoquímicas fêmures e vértebras provenientes do projeto intitulado “Desenvolvimento de um Modelo Experimental de indução de Osteoporose” (nº 50503350752 PPG/UFV) (SANTOS, 2004).

1.1. Animais

Foram utilizados três protocolos para a indução da perda óssea: castração, administração de glicocorticóide e castração associada à administração de glicocorticóide.

Para as avaliações histomorfométricas e imunoistoquímicas, foram utilizados ratos e ratas 56 dias após a indução da perda óssea, o que corresponde à última coleta de material. Os animais, adquiridos do Biotério da Universidade Federal de Viçosa com cerca de 90 dias de idade, foram distribuídos em 4 grupos, cada um com 5 machos e 5 fêmeas:

- Grupo 1: Grupo controle;
- Grupo 2: Grupo castrado;
- Grupo 3: Grupo submetido ao tratamento com glicocorticóide; e
- Grupo 4: Grupo submetido à castração e ao tratamento com glicocorticóide.

1.2. Aclimação

Os animais foram mantidos em uma sala especialmente climatizada: um exaustor associado a um timer funcionou durante 30 minutos a cada duas horas; um ar condicionado foi programado para ligar, juntamente com o exaustor, sempre que a temperatura ultrapassasse 24°C e a umidade relativa do ar, 75%. Outro timer, associado aos interruptores de luz, manteve os animais expostos à luz artificial, durante 12 horas por dia. Não houve exposição à luz natural.

Os animais foram submetidos à aclimação por uma semana antes da execução dos protocolos do experimento.

Água e ração comercial¹ foram fornecidas à vontade, sendo a água trocada diariamente. A cama (maravalha) utilizada nas gaiolas foi previamente submetida à autoclavagem e substituída três vezes por semana. As gaiolas foram lavadas com a mesma frequência.

1.3. Procedimento cirúrgico

Após o período de aclimação, os animais dos grupos 2 e 4 foram submetidos à castração realizada por uma equipe de médicos veterinários. Foi conduzida anestesia geral com o uso de tiletamina-zolazepam², na dosagem de 30 mg/kg de peso vivo, administrada pela via intramuscular.

Nas fêmeas, foi realizada ovariectomia, por acesso ventral, utilizando-se de fio de algodão 10 para a ligadura dos pedículos. Peritônio, musculatura, tecido subcutâneo e pele foram suturados com fio de náilon 0,25. Nos machos, para a orquiectomia, os cordões espermáticos receberam ligadura com o fio de algodão e o tecido subcutâneo e a pele foram suturados com fio de náilon. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam 5mg/kg de antibiótico

¹ LABINA® - Purina

² ZOLETIL® 50 - Virbac

(oxitetraciclina)³ por via intramuscular, tratamento que foi repetido por mais dois dias consecutivos.

1.4. Administração do glicocorticoide

Os animais dos grupos 3 e 4 foram submetidos ao protocolo de administração do glicocorticoide. A dexametasona⁴ foi a droga escolhida, administrada pela via intramuscular, na dose de 7 mg/Kg de peso vivo, uma vez por semana, durante 4 semanas. A última aplicação aconteceu 28 dias antes do término do experimento.

1.5. Histopatologia

Os ossos coletados foram fixados em formol 10% neutro tamponado e, em seguida, foram transferidos para uma solução descalcificadora de citrato de sódio, em que permaneceram por cerca de duas semanas até que estivessem completamente descalcificados. O material foi então lavado em água corrente, e seccionado em cortes longitudinais nas epífises femorais e no eixo sagital das vértebras lombares (L4).

Em seguida, os ossos foram desidratados, clarificados e incluídos em parafina, segundo protocolo de rotina do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Foram realizados cortes com 4µm de espessura em micrótomo rotativo e em seguida, foram corados com Hematoxilina e Eosina.

As lâminas foram fotografadas com aumento de 100X nas regiões de osso trabecular do colo e cômulo femorais do corpo vertebral. As imagens foram analisadas da seguinte forma:

1. Foi montada uma grade a partir da fotomicrografia de uma escala no mesmo aumento em que as lâminas foram fotografadas. A escala utilizada era graduada em 0,01mm. A grade é composta de 100 quadros cujos lados

³ OXITRAT-LA® - Vallée

⁴ AZIUM® - Schering-Plough

correspondem a 0,1mm nas lâminas fotografadas. A grade apresenta, então, 11 linhas que cortam perpendicularmente outras 11 linhas, somando 121 interseções (Figura 4 e 5).

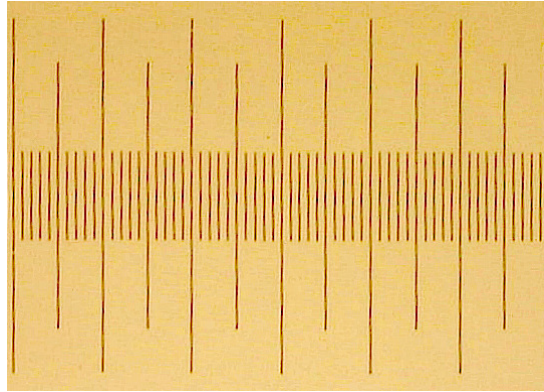


Figura 4: Régua graduada em 0,01mm fotografada em aumento de 100X.

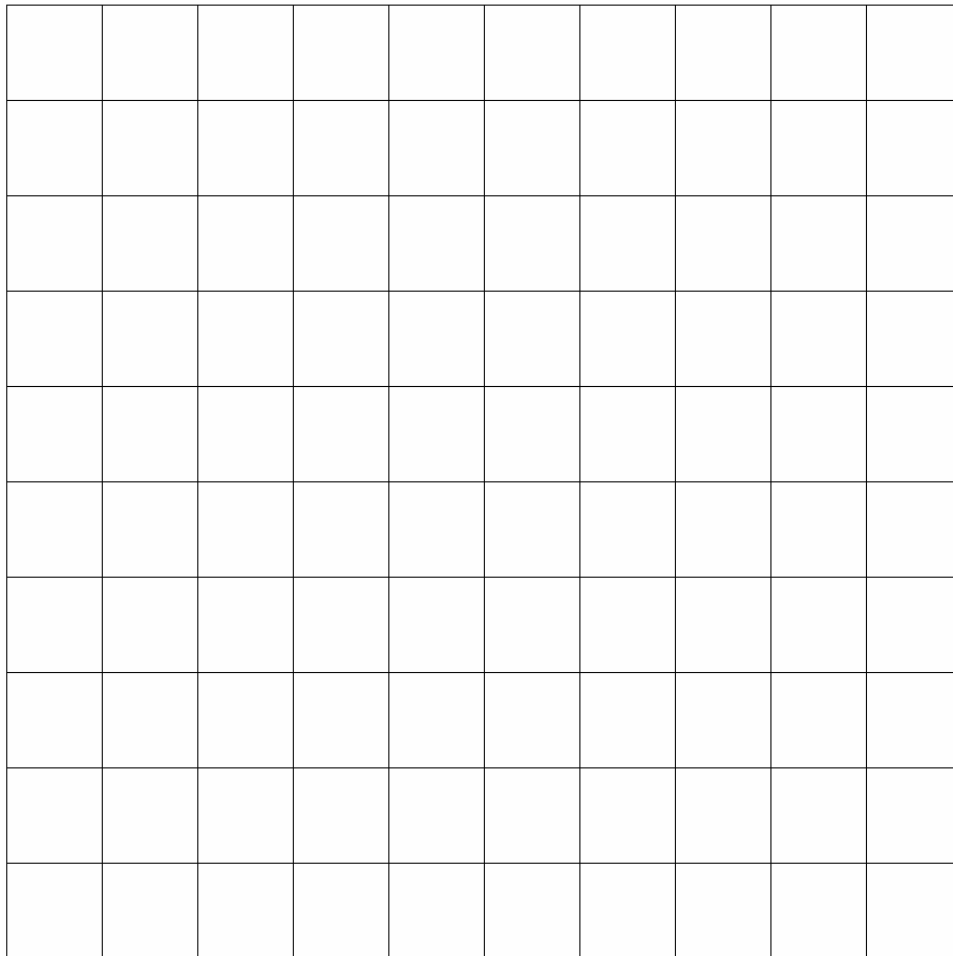


Figura 5: Grade montada a partir da graduação da régua da Figura 4, com 100 quadros de 0,1mm de lado.

2. Esta grade foi sobreposta a uma área de osso trabecular e os pontos de interseção coincidentes com tecido ósseo foram contados (Figura 6).

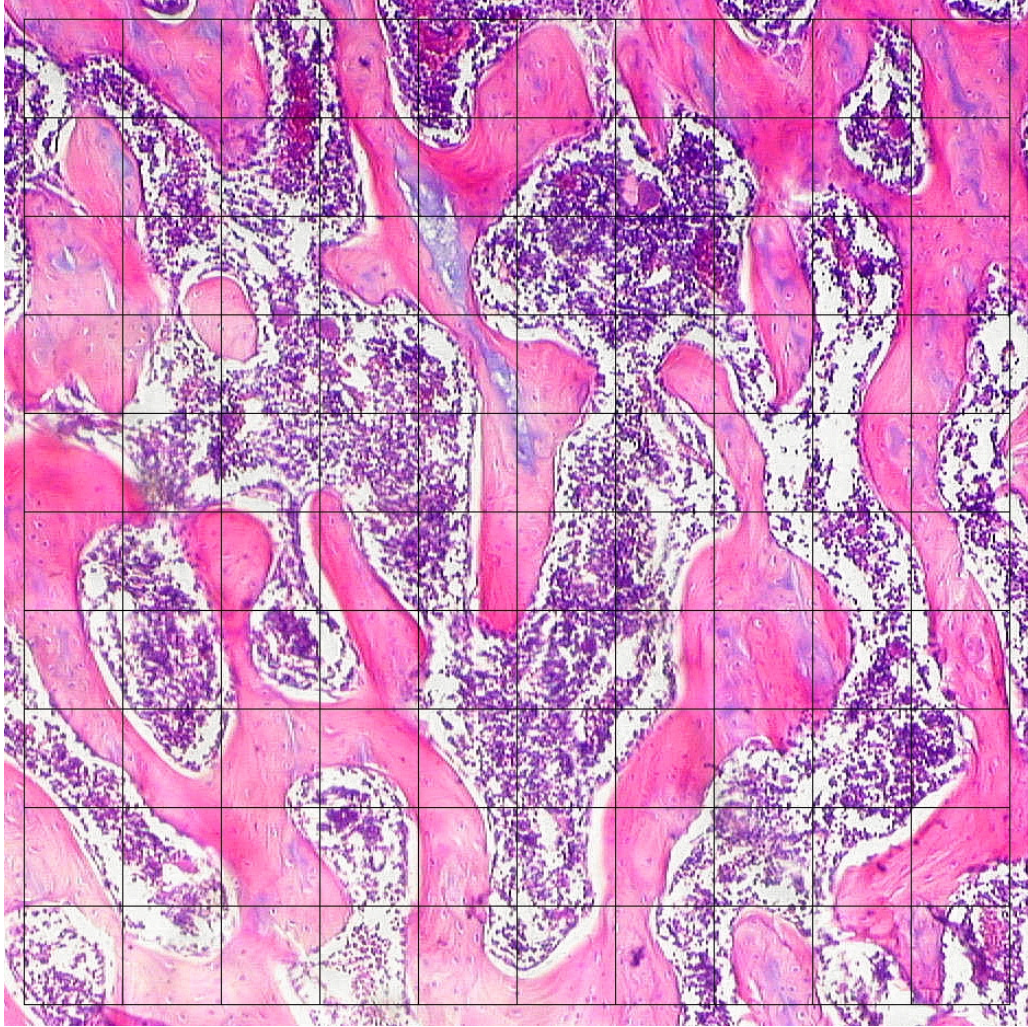


Figura 6: Grade sobreposta à imagem do osso trabecular.

3. O valor absoluto encontrado corresponde ao volume trabecular ósseo e foi submetido aos testes estatísticos por ser representado por um número inteiro.

1.6. Imunoistoquímica

Para a avaliação imunoistoquímica de RANKL, os cortes foram desparafinizados durante 18 horas (56°C) e diafanizados em dois banhos de xilol por 15 minutos cada. A seguir, hidratação em dois banhos com álcool absoluto, álcoois 90, 80, 70% e mais dois banhos em PBS pH 7,4 por 5 minutos cada. Foi feita recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 (90°C – 20 minutos). A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ 3% em metanol por 15 minutos à temperatura ambiente e o sítios inespecíficos bloqueados com soro normal de coelho 1:10 por 45 minutos também à temperatura ambiente. O material foi então incubado com anticorpo policlonal anti-RANKL⁵ (1:50) por 18 horas a 4°C. Após lavagens com PBS pH 7,4, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário marcado com peroxidase (1:500), por 60 minutos a 37°C. . A imunomarcação foi revelada com DAB (diaminobenzidina) e contra-corada com Hematoxilina de Harris.

1.7. Análises Estatísticas

Os dados obtidos pela avaliação histomorfométrica foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors e ao teste t de Student, no programa de estatística ASSISTAT 7.4, desenvolvido na Universidade Federal de Campina Grande e distribuído gratuitamente (<http://assistat.sites.uol.com.br/>).

As médias dos valores absolutos encontrados no teste t para o Volume Trabecular Ósseo (VTO) foram transformadas em porcentagem e a perda óssea calculada em relação ao grupo controle, de acordo com as fórmulas:

$$\text{VTO}(\%) = \frac{\text{Pontos Coincidentes com Tecido Ósseo}}{\text{Pontos Totais (=121)}} \times 100$$

$$\text{Perda Óssea} (\%) = 100 - (\text{Média Tratamento} \times 100 / \text{Média Controle})$$

⁵ Sc-7628 - Santa Cruz Biotechnology

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Histomorfometria

O modelo de indução de perda óssea utilizado nos ratos do presente experimento foi desenvolvido por SANTOS (2004), que verificou a perda óssea avaliando a resistência óssea a ensaios mecânicos de flexão e compressão e as concentrações de cálcio e fósforo no osso. No entanto, os parâmetros utilizados para conceituar a osteoporose (FERRETTI *et al*, 2003, ALEXANDRE, 2005) não foram avaliados. Ou seja, a osteoporose é conceituada sob o ponto de vista diagnóstico, como uma osteopenia avançada. Segundo os autores mencionados, a determinação da osteoporose pode ser feita pela avaliação da densidade mineral óssea ou pela histomorfometria.

As **Figuras 7 e 8** mostram dois exemplos dentre as lâminas utilizadas para a histomorfometria: fotomicrografias dos Grupos Controle – Macho e Glicocorticóide – Macho. Os valores absolutos referentes ao volume trabecular ósseo (número de pontos coincidentes com as 121 interseções da grade) mostraram distribuição normal no teste de normalidade de Lilliefors (nível de significância = 5%). As médias dos grupos foram então avaliadas pelo teste T de Student de três maneiras: comparação entre tratamentos, comparação entre sexos e comparação entre ossos.

Comparação Entre Tratamentos

Os diferentes tratamentos foram comparados entre si para o mesmo osso e o mesmo sexo. As médias obtidas e avaliadas pelo teste t de Student (Quadro 3) mostram que o volume trabecular ósseo no colo femoral, cômulo femoral e vértebra dos machos e no colo e cômulo femorais das fêmeas é similar nos três protocolos utilizados, mas diferentes do grupo controle ao nível de significância de 1%. As vértebras do grupo de fêmeas castradas apresentaram

volume trabecular ósseo similar aos outros tratamentos e ao grupo controle, que por sua vez difere dos dois grupos que receberam o glicocorticóide.

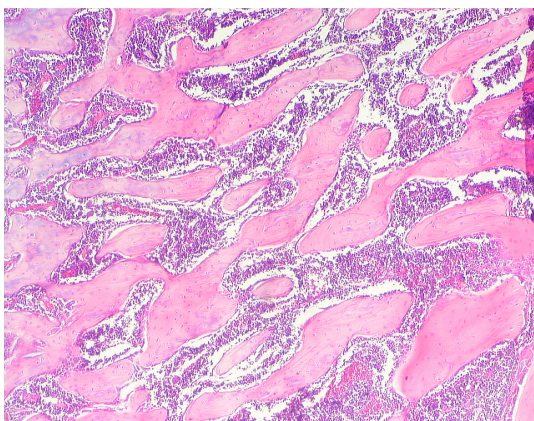


Figura 7: Fotomicrografia de colo femoral de um animal do Grupo controle de machos. Na análise histomorfométrica, o Volume Trabecular Ósseo desta amostra é de 62, o que corresponde a 51,2%. Aumento de 100X.

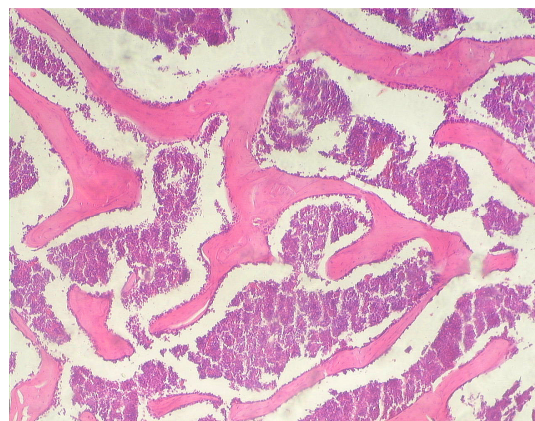


Figura 8: Fotomicrografia de cõndilo femoral de um animal do Grupo glicocorticóide de fêmeas. Na análise histomorfométrica, o VTO desta amostra é de 35, o que corresponde a 28,9%. Aumento de 100X.

	MACHOS		
	COLO**	CÔNDILO**	VÉRTEBRA**
TRATAMENTO	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
Controle	65,25 a	56,00 a	48,50 a
Castrado	45,25 b	37,75 b	25,25 b
Glicocorticóide	43,50 b	32,50 b	31,25 b
Castr+Glic	40,25 b	33,75 b	27,75 b
	FÊMEAS		
	COLO**	CÔNDILO**	VÉRTEBRA*
TRATAMENTO	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
Controle	61,00 a	59,50 a	47,75 a
Castrado	50,50 b	27,75 b	38,25 ab
Glicocorticóide	45,50 b	32,75 b	32,0 b
Castr+Glic	43,25 b	34,50 b	30,25 b

Quadro 3: Comparação das médias obtidas na histomorfometria entre protocolos de indução de osteoporose pelo teste t de Student. ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ns não significativo. As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Com base na comparação estatística e na observação das médias obtidas, pode-se confirmar a eficiência dos modelos de indução da perda óssea, exceto nas vértebras do grupo de fêmeas castradas (Grupo 2), no qual, apesar da média do volume trabecular ósseo ser mais baixa, o teste T mostrou que essa diferença não é significativa, quando comparada ao grupo controle. No entanto, o

fato deste grupo ter apresentado resultados significativos para colo e côndilo femorais mostra que a perda óssea não é uniforme em todo o esqueleto.

Ainda, a histomorfometria não contribuiu para determinar qual tratamento é mais ou menos severo na indução da perda óssea. No entanto, SANTOS (2004) verificou que a fragilidade óssea nos testes de flexão das tíbias destes mesmos animais é maior nos dois grupos tratados com glicocorticóide, mas similares entre si. Esta observação condiz com a afirmação de WEINSTEIN e colaboradores (2004) sobre a dominância e não adição dos efeitos dos glicocorticóides sobre a castração. Para SANTOS (2004), os testes de compressão das vértebras, apesar de indicarem fragilidade, são inconclusivos porque o tamanho e diâmetro da vértebra têm grande influência na resistência à força compressiva. O aumento da atividade osteoclástica é considerado o mecanismo fundamental na fisiopatologia da perda óssea por deficiência de estrógeno (CENCI *et al.*, 2000), enquanto na osteoporose induzida por glicocorticóides, a diminuição da atividade osteoblástica parece ser mais proeminente (MCILWAIN, 2003; TAMURA *et al.*, 2004), mesmo porque o efeito desses medicamentos nos osteoclastos é contraditório (LAFAGE-PROUST *et al.*, 2003).

Comparação Entre Sexos

Na comparação do volume trabecular ósseo entre os sexos (Quadro 4), os testes demonstram diferença entre machos e fêmeas somente para o grupo que foi submetido à castração. Neste grupo, para o osso trabecular do côndilo femoral, pode-se afirmar que as fêmeas perderam mais volume ósseo que os machos ($p < 0,01$) e que o contrário acontece nas vértebras, onde a massa óssea nos machos é menor do que nas fêmeas ($p < 0,05$).

Um dos fatores responsáveis pela perda óssea mais rápida em mulheres é o pico de massa óssea, considerada maior em homens (LICATA, 2003). Em ratos, se ocorre este pico, estes resultados mostram que o Volume Trabecular Ósseo avaliado por histomorfometria não é a medida mais adequada para observar o efeito dessa diferença, pois as médias entre os grupos controle dos três segmentos ósseos analisados foram semelhantes entre machos e fêmeas.

COLO				
TRAT	Controle ^{ns}	Castrado ^{ns}	Glicocorticóide ^{ns}	Castr+Glic ^{ns}
	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
MACHO	65,25 a	45,20 a	43,50 a	40,25 a
FÊMEA	61,00 a	50,50 a	45,50 a	43,25 a
CÔNDILO				
TRAT	Controle ^{ns}	Castrado ^{**}	Glicocorticóide ^{ns}	Castr+Glic ^{ns}
	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
MACHO	56,00 a	37,75 a	32,50 a	33,75 a
FÊMEA	59,50 a	27,75 b	32,75 a	34,50 a
VÉRTEBRA				
TRAT	Controle ^{ns}	Castrado [*]	Glicocorticóide ^{ns}	Castr+Glic ^{ns}
	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
MACHO	48,50 a	25,25 b	31,25 a	27,75 a
FÊMEA	47,75 a	38,25 a	32,00 a	30,25 a

Quadro 4: Comparação das médias obtidas na histomorfometria entre sexo pelo teste t de Student. ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). ns não significativo. As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Comparação Entre Ossos

Os três fragmentos ósseos utilizados na análise histomorfométrica de cada animal foram comparados entre si pelo teste T para avaliar em qual deles a perda óssea foi mais acentuada dentro de cada tratamento.

O grupo controle mostra que, em machos e fêmeas, para o nível de significância 5%, as vértebras têm menor massa óssea trabecular em relação ao colo e o cômulo femorais (Quadro 5). Para o grupo de animais castrado ($p < 0,01$), essa proporção permanece para machos. Já nas fêmeas, a massa óssea trabecular apresenta-se na seguinte ordem decrescente: colo, vértebra e cômulo. Em todos os animais tratados com glicocorticóide (Grupo 3 e 4), o cômulo femoral passa a ter perda similar à das vértebras, tanto para machos quanto para fêmeas ($p < 0,05$).

Apesar de a osteoporose ser considerada uma doença sistêmica (SHEA e MILLER, 2005), estes resultados mostram que a perda óssea não é uniforme dentro do esqueleto. Essa diferença ocorre porque a atividade da BMU depende da irrigação sanguínea local e estimulação mecânica, que também não é uniforme ao longo do esqueleto (WEINSTEIN e MANOLAGAS, 2000). No osso trabecular, a

irrigação ocorre a partir da medula óssea; assim, o *turnover* ósseo é maior no osso envolvido por medula óssea vermelha (SHEA e MILLER, 2005). A transmissão de sinais mecânicos também tem grande influência na ativação da BMU: ossos ou partes de ossos sujeitos a maior tensão mecânica, têm maior *turnover* ósseo (HAZENBERG *et al*, 2006). Por esses motivos, os locais do esqueleto em que as fraturas são mais comuns devem ser priorizados como locais de escolha para os exames diagnósticos.

TRAT	Controle		Castrado	
	MACHO*	FÊMEA*	MACHO**	FÊMEA**
	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
COLO	65,25 a	61,00 a	45,25 a	50,50 a
CÔND	56,00 a	59,50 a	37,75 a	27,75 c
VÉRT	48,50 b	47,75 b	25,25 b	38,25 b
TRAT	Glicocorticóide		Castr+Glic	
	MACHO*	FÊMEA*	MACHO**	FÊMEA**
	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA	MÉDIA
COLO	43,50 a	45,50 a	40,25 a	43,25 a
CÔND	32,30 b	32,75 b	33,75 b	34,50 b
VÉRT	31,25 b	32,00 b	27,75 b	30,25 b

Quadro 5: Comparação das médias obtidas na histomorfometria entre ossos pelo teste t de Student. ** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$). * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). **ns** não significativo. As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Perda Óssea Relativa

A perda óssea, calculada em porcentagem, em relação ao grupo controle é mostrada no quadro 6.

Em humanos, a osteoporose é definida na avaliação histomorfométrica como perda óssea maior que 11% (ALEXANDRE, 2005). Caso seja possível projetar tal medida para ratos, pode-se afirmar que os animais, aos 56 dias de experimento, apresentaram osteoporose. No entanto, apesar da utilização de ensaios experimentais com ratos ser muito comum para o estudo da osteoporose, existem diferenças fundamentais entre o esqueleto humano e o de ratos. BAGI e colaboradores (1997) citam, entre outras diferenças, a forma do colo femoral em secção transversal (circular no rato e triangular em humanos) e a porcentagem de

osso cortical (72,5% em ratos e 12,5% em humanos) e enfatizam a importância de um grupo controle apropriado para fazer uma extrapolação adequada dos dados obtidos com estudos em ratos para humanos.

	COLO					
	MACHOS			FÊMEAS		
	MÉDIA	VTO%	PERDA ÓSSEA %	MÉDIA	VTO%	PERDA ÓSSEA %
1	65,25	53,93	*	61,00	50,41	*
2	45,25	37,40	30,65	50,50	41,74	17,21
3	43,50	35,95	33,33	45,50	37,60	25,41
4	40,25	33,26	38,31	43,25	35,74	29,10
	CÔNDILO					
	MACHOS			FÊMEAS		
	MÉDIA	VTO%	PERDA ÓSSEA %	MÉDIA	VTO%	PERDA ÓSSEA %
1	56,00	46,28	*	59,50	49,17	*
2	37,75	31,20	32,59	27,75	22,93	53,36
3	32,50	26,86	41,96	32,75	27,07	44,96
4	33,75	27,89	39,73	34,50	28,51	42,02
	VÉRTEBRA					
	MACHOS			FÊMEAS		
	MÉDIA	VTO%	PERDA ÓSSEA %	MÉDIA	VTO%	PERDA ÓSSEA %
1	48,50	40,08	*	47,75	39,46	*
2	25,25	20,87	47,94	38,25	31,61	19,90
3	31,25	25,83	35,57	32,00	26,45	32,98
4	27,75	22,93	42,78	30,25	25,00	36,65

Quadro 6: volume trabecular ósseo (%) e Perda Óssea (%), para colo, cômulo e vértebras nos grupos. (1) Grupo Controle; (2) Castrado; (3) Tratados com Dexametasona e; (4) Castrado tratado com o Glicocorticóide.

2. Imunoistoquímica

Apenas o grupo castrado, tanto machos quanto fêmeas, apresentou imunomarcção, ainda que fraca, na camada de osteoblastos que cobre a superfície das trabéculas ósseas, indicando a presença de expressão de RANKL (Figuras 9 e 10). Esta observação está de acordo com o esperado para este grupo, uma vez que a ausência dos hormônios sexuais pode levar a um aumento da indução de RANKL, que estimula a ativação da atividade osteoclástica (RIGGS *et al*, 2002). Os glicocorticóides também podem induzir a expressão de RANKL (MCLAUGHLIN *et al*, 2002; LANNA *et al*, 2003) e a não observação de imunomarcção nos grupos tratados com glicocorticóide pode ser um indício de

que a síntese da citocina pelos osteoblastos está diminuída no momento da análise pela ação de inibição metabólica do medicamento (ZIEGLER e KASPERK, 1998; MANELLI e GIUSTINA, 2000; LAFAGE-PROUST *et al*, 2003). Apesar de alguns efeitos dos glicocorticóides serem revertidos quando retirado o medicamento (MANELLI e GIUSTINA, 2000), os resultados mostram que o tempo decorrido entre a última aplicação de dexametasona (28 dias de experimento) e a coleta (56 dias), ou seja, 28 dias de intervalo, não são suficientes para que os osteoblastos expressem RANKL, pois o grupo 4 recebeu glicocorticóide, mas também foi castrado, isto é, se seus osteoblastos tivessem se recuperado, poderiam tornar a expressar RANKL como no Grupo 2.

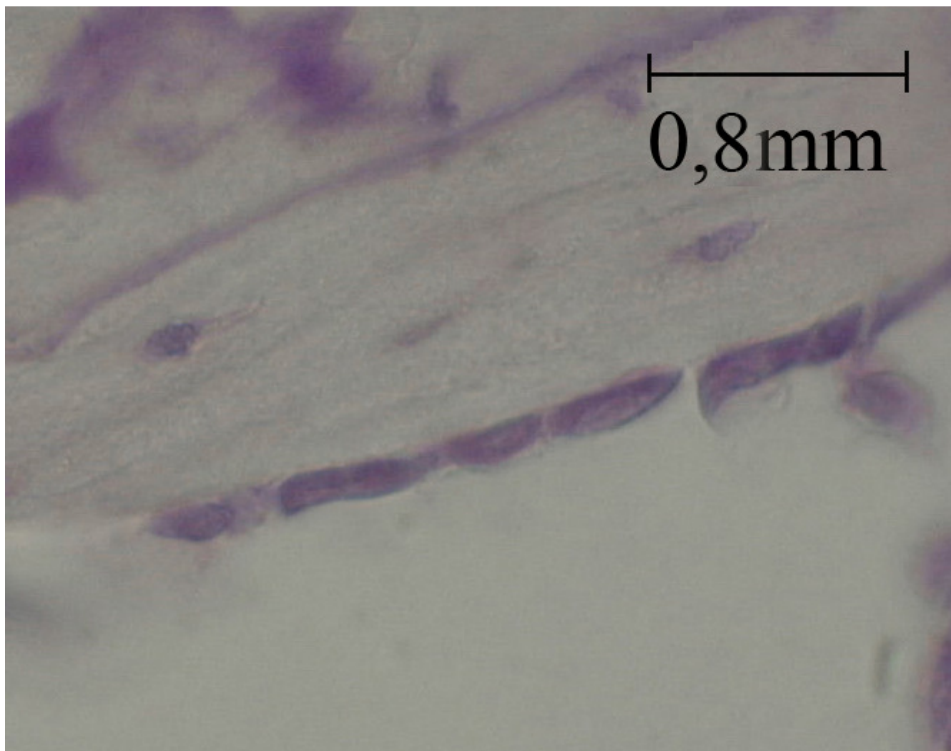


Figura 9: Fotomicrografia da imunohisto-química de uma fêmea do grupo controle. Ausência de imunomarcagem.

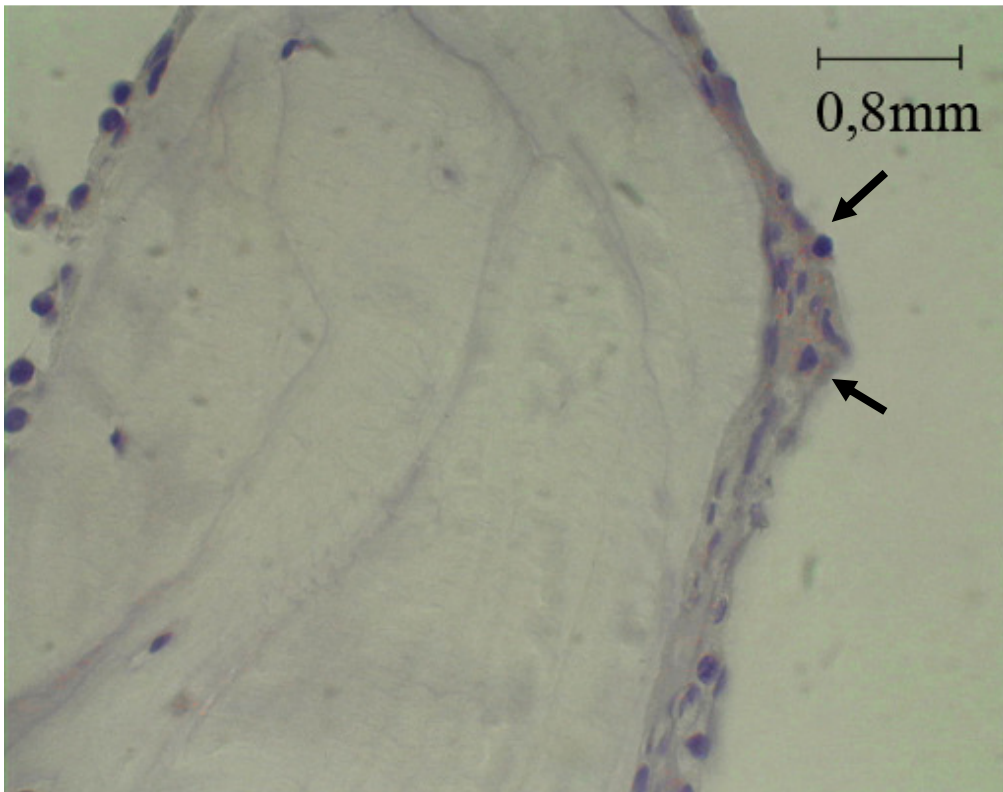


Figura 10: Fotomicrografia da Imunoisto-química de um macho do grupo castrado. Imunomarcção muito fraca (setas) em poucos campos das lâminas.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nas avaliações imunoistoquímica de RANKL e histomorfométrica do volume trabecular ósseo, segundo o protocolo e condições descritas, pode-se concluir:

1. A avaliação histomorfométrica dos grupos castrado, tratado com glicocorticóide e castrado seguido de tratamento com glicocorticóide determina uma diminuição do volume trabecular ósseo em quantidades similares.
2. O volume trabecular ósseo analisado por histomorfometria é semelhante entre machos e fêmeas normais.
3. A perda de massa trabecular óssea não é uniforme entre colo femoral, cômulo femoral e corpo vertebral.
4. A massa trabecular óssea do corpo vertebral de ratos normais é menor que no colo e cômulo femorais.
5. O cômulo femoral mostra maior sensibilidade à perda óssea que o colo e a vértebra.
6. Após 28 dias do final do tratamento com dexametasona, ainda não há expressão de RANKL detectável por imunoperoxidase.
7. Aos 56 dias de experimento, os animais apresentavam osteoporose.
8. Bloqueio de RANKL como possível terapia contra osteoporose pode não ser eficaz na osteoporose induzida por glicocorticóide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, C. Androgens and bone Metabolism. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 202-206. 2005.

ARRON, J. R.; CHOI, Y. Bone versus Immune System. **Nature**, v. 408, p. 535-536. 2000.

BAGI, C. M., WILKIE, D., GEORGELOS, K., WILLIAMS, D., BERTOLINI, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. **Bone**, v. 21, n. 3, p. 261-267. 1997.

BARON, R. Arming the Osteoclast. **Nature Medicine**, v. 10, n. 5, p. 458-460. 2004.

BEZERRA, M. C.; CARVALHO, J. F.; PROKOPOWITSCH, A. S.; PEREIRA, R. M. R. RANK, RANKL and Osteoprotegerin in Arthritic Bone Loss. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.161-170. 2005.

BLAIR, H. C.; ROBINSON, L. J.; ZAIDI, M. Osteoclast Signalling Pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, p. 728-738 . 2005.

CAPPER, C.; FLANAGAN, M. OPTIONS: Osteoporosis Prevention in UK Schools. **Journal of Orthopaedic Nursing**, v. 9, p. 39-42. 2005.

CARDA, C.; SILVESTRINI, G.; DE FERRARIS, M. E. G.; PEYDRÓ, A.; BONUCCI, E. Osteoprotegerin (OPG) and RANKL Expression and Distribution in Developing Human Craniomandibular Joint. **Tissue and Cell**, v. 37, p. 247-255. 2005.

CAO, X.; CHEN, D. The BMP Signaling and in vivo Bone Formation. **Gene**, v. 357, p. 1-8. 2005.

CENCI, S.; WEITZMANN, M. N.; ROGGIA, C.; NAMBA, N.; NOVACK, D.; WOODRING, J.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 1229-1237. 2000.

FAN, Y.; LIU, J.; WANG, S.; WANG, H.; SHI, F.; XIONG, L.; HE, W.; PENG, X. Functional Proteome of Bones in Rats with Osteoporosis Following Ovariectomy. **Life Sciences**, v. 76, p. 2893-2901. 2005.

FENG, X. Regulatory Roles and Molecular Signaling of TNF Family Members in Osteoclasts. **Gene**, v. 350, p. 1-13. 2005.

FERRETTI, J. L.; COINTRY, G. R.; CAPOZZA, R. F.; FROST, H. M. Bone Mass, Bone Strength, Muscle-Bone Interactions, Osteopenias and Osteoporosis. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 269- 279. 2003.

GALI, J. C. Osteoporose. **Revista Acta Ortopedica Brasileira**, v. 9, p. 53-62. 2001.

GENNARI, L.; BECHERINI, L.; FALCHETTI, A.; MASI, L.; MASSART, F.; BRANDI, M. L. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms – review. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 8, p. 1-24. 2002.

GRČEVIĆ, D.; KATAVIĆ, V.; LUKIĆ, I. K.; KOVAČIĆ, N.; LORENZO, J. A.; MARUŠIĆ, A. Cellular and Molecular Interactions between Immune System and Bone. **Croatian Medical Journal**, v. 42, n. 4, p. 384-392. 2001.

HAZENBERG, J. G.; LEE, T. C.; TAYLOR, D. The Role of Osteocytes in Functional Bone adaptation. **BoneKey-Osteovision**, v. 3, p. 10-16. 2006.

HERNANDEZ, C. J.; BEAUPRÉ, G. S.; CARTER, D. R. A Theoretical Analysis of the changes in Basic Multicellular Unit Activity at Menopause. **Bone**, v. 32, p. 357- 363. 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 412p.

KARSENTY, G. Bone Formation and Factors Affecting this Process. **Matrix Biology**, v. 19, p. 85-89. 2000.

KARTSOGIANNIS, V.; ZHOU, H.; HORWOOD, N. J.; THOMAS, R. J.; HARDS, D. K.; QUINN, J. M. W.; NIFORAS, P.; NG, K. W.; MARTIN, T. J.; GILLESPIE, M. T. Localization of RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) mRNA and Protein in Skeleton and Extraskelatal Tissues. **Bone**, n. 25, p. 525-534. 1999.

LAFAGE-PROUST, M. H.; BOUDIGNON, B.; THOMAS, T. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathophysiology Data and Recent Tratments. **Joint Bone Spine**, n. 70, v. 109-118. 2003.

LANNA, C. M. M.; MONTENEGRO Jr; R. M.; PAULA, F. J. A. Fisiopatologia da Osteoporose Induzida por Glicocorticóide. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, p. 9-18. 2003.

LERNER, U. H. Osteoclast Formation and Resorption. **Matrix Biology**, v. 19, p. 107-120. 2000.

LICATA, A. Osteoporosis in Men: Suspect secondary Disease first. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 70, p. 247-254. 2003.

MAGNO, C.; ANASTASI, G.; MORABITO, N.; GAUDIO, A.; MAISANO, D.; FRANCHINA, F.; GALÌ, A.; FRISINA, N.; MELLONI, D. Preventing Bone Loss during Androgen Deprivation Therapy for Prostate Câncer: Early Experience with Neridronate. **European Urology**, v. 47, p. 575-581. 2005.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, p. 79–85. 2000.

MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocrine Reviews**, n. 21, p. 115-137. 2000.

MCILWAIN, H. H. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Managenment. **Preventive Medicine**, v. 36, p. 243-249. 2003.

MCLAUGHLIN, F.; MACKINTOSH, .; 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, p. 924-930. 2002.

MORALES-TORRES, J.; GUTIÉRREZ-UREÑA, S. The Burden of Osteoporosis in Latin America. **Osteoporosis International**, v. 15, p. 625-632. 2004.

MUTHUSAMI, S.; RAMACHANDRAN, I.; MUTHUSAMY, B.; VASUDEVAN, G.; PRABHU, V.; SUBRAMANIAN, V.; JAGADEESAN, A.; NARASIMHAN, S. Ovariectomy Induces Oxidative Stress and Impairs Bone Antioxidant System in Adult Rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 360, p. 81-86. 2005.

NG, K. W.; ROMAS, E.; DONNAN, L.; FINDLAY, D. M. Bone Biology. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 11, p. 1-22. 1997.

PATSCHAND, D; LODDENKEMPER, K; BUTTGEREIT, F. Molecular Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Bone**, v. 29, p. 498-505. 2001.

REGINSTER, J.-Y.; BURLET, N. Osteoporosis: A Still Increasing Prevalence. **Bone**, v. 38, p. S4-S9. 2006.

REID, I. R.; Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 14, p. 279-298. 2000.

RHO, J.; TAKAMI, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems. **Molecular and Cells**, v. 17, p. 1-9. 2004.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Sex Steroids and the Construction and conservation of the Adult Skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 3, p. 279-302. 2002.

ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, A. R. Low Incidence of Hip Fractures in an Equatorial Area. **Osteoporosis International**, v. 14, p. 496-499. 2003.

RUSSO, C. R.; LAURETANI, F.; SEEMAN, E.; BARTALI, B.; BANDINELLI, S.; DI IORIO, A.; GURALNIK, J.; FERRUCCI, L. Structural Adaptations to Bone Loss in Ageing Men and Women. **Bone**, v. 38, p. 112-118. 2006.

SAMBROOK, P.; LANE, N E. Corticosteroid Osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 15, p. 401-413. 2001.

SANTOS, P. S. **Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 85 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.

SHEA, J. E.; MILLER, S. C. Skeletal Function and Structure: Implications for Tissue-Target Therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 945-957. 2005.

SHUSTER, S. Osteoporosis, a Unitary Hypothesis of Collagen Loss in Skin and Bone. **Medical Hypothesis**, v. 65, p. 426- 432. 2005.

SIQUEIRA, F. V.; FACCHINI, L. A.; HALLAL, P. C. The Burden of Fractures in Brazil: A Population-Based Study. **Bone**, v. 37, p. 261-266. 2005.

TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; SUDA, T. A. A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, Regulates Osteoclast Differentiation and Function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, p. 449-455. 1999.

TAKAYANAGI, H.; OGASAWARA, K.; HIDA, S.; CHIBA, T.; MURATA, S.; SATO, K.; TAKAOKA, A.; YOKOCHI, T.; ODA, H.; TANAKA, K.; NAKAMURA, K.; TANIGUCHI, T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . **Nature**, v. 408, p. 600-605. 2000.

TAMURA, Y.; OKINAGA, H.; TAKAMI, H. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 500-504. 2004.

TATE, M. L. K. "Whither flows the fluid in bone?" An Osteocyte's Perspective. **Journal of Biomechanics**, v. 36, p. 1409-1424. 2003.

VÄÄNÄNEN, K. Mechanism of Osteoclast Mediated Bone Resorption - Rationale for the Design of New Therapies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 959-971. 2005.

WALSH, M. C.; CHOI, Y. Biology of the TRANCE Axis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 251-263. 2003.

WEINSTEIN, R. S.; JIA, D.; POWERS, C. C.; STEWART, S. A.; JILKA, R. L.; PARFITT, A. M.; MANOLAGAS, S. C. The Skeletal Effects of Glucocorticoid Excess Override Those of Orchidectomy in Mice. **Endocrinology**, v. 145, p. 1980-1987. 2004.

WEINSTEIN, R. S.; MANOLAGAS, S. C. Apoptosis and Osteoporosis. **American Journal of Medicine**, v. 108, p. 153-164. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and Management of Osteoporosis. **WHO Technical Report Series**, v. 921, 193p. 2003.

ZIEGLER, R; KASPERK, C. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Prevention and Treatment. **Steroids**, v. 63, p. 344-348. 1998.