

**PRISCILA LIMA SEQUETTO**

**EFEITOS DE ALENDRONATO DE SÓDIO, SINVASTATINA,  
CRISINA E TINTURA DE *Camellia sinensis* NA OSTEOPOROSE  
INDUZIDA POR DEXAMETASONA EM RATAS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

**PRISCILA LIMA SEQUETTO**

**EFEITOS DE ALENDRONATO DE SÓDIO, SINVASTATINA,  
CRISINA E TINTURA DE *Camellia sinensis* NA OSTEOPOROSE  
INDUZIDA POR DEXAMETASONA EM RATAS**

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

APROVADA:25 de março de 2008.

---

Prof. Tanus Jorge Nagem  
(co-orientador)

---

Maria Goreti de Almeida Oliveira

---

Prof. Sérgio Pacheco

---

Prof. Aloísio da Silva Pinto

---

Prof<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela proteção e por iluminar meus passos.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por acreditarem e confiarem sempre em mim.

Aos meus avós, meu irmão, tias, tios, primas e primos pelo incentivo, apoio e carinho, que me ajudam a seguir em frente.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade.

Agradeço com carinho especial, a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira, pela confiança e amizade e por seu empenho em ajudar a “abrir as portas para um futuro brilhante”.

Ao Prof. Dr. Tanus Jorge Nagem, Prof<sup>a</sup>. Vera Maria Peters, Prof. Sérgio Pacheco e Prof. Aloísio da Silva Pinto por participarem na concretização de mais uma etapa da minha formação profissional.

Aos amigos do Laboratório de Biofármacos, em especial aqueles que me acompanharam durante os experimentos, pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

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

As amigadas do trabalho, da república e as amigas mais que especiais Lú, Kátia, Raquel, Marina, Paula, Carla, Paty, Helaine e Larissa pelo apoio e cumplicidade.

As amizades de Viçosa, São João e Juiz de Fora, sempre presentes, mesmo quando a falta de tempo ou a distância insistia em nos separar.

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

***Obrigada!***

## CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Tecido ósseo	2
2.1.1 Remodelação óssea	6
2.1.1.1 Marcadores da formação óssea	8
2.1.1.2 Marcadores da reabsorção óssea	9
2.1.1.3 Avaliação laboratorial da remodelação óssea	11
2.2. Osteoporose	13
2.2.1 Aspectos genéticos da osteoporose	19
2.2.1.1 Gene do IGF-1	20
2.2.1.2 Gene do Receptor da Vitamina D (VDR)	21
2.2.1.3 Gene do Colágeno Tipo I $\alpha 1$ (Col I $\alpha 1$ )	21
2.2.1.4 Gene do Receptor Estrogênico	21
2.2.1.5 Outros Genes	22
2.2.1.6 Eixo GH/IGF1	22
2.2.2 Indução de osteoporose por glicocorticóides	23
2.2.2.1 Efeitos sobre osteoblastos	25
2.2.2.2 Efeitos sobre osteoclastos	26
2.2.3 Epidemiologia da Osteoporose	29
2.2.4 Diagnóstico da Osteoporose:	31
2.2.4.2 Diagnóstico Laboratorial	32

2.2.4.3 Diagnóstico por Histomorfometria Óssea	32
2.2.5. Fatores de risco	32
2.2.6. Prevenção e tratamento da osteoporose	35
2.2.6.1 Prevenção	35
2.2.6.2 Tratamento	36
2.2.6.2.1 As estatinas e o metabolismo ósseo	38
2.2.6.2.2 Cálcio e vitamina D	43
2.2.6.2.3 Drogas que inibem a reabsorção óssea	46
2.2.6.2.3.1 Bifosfonatos	46
2.2.6.2.3.2 Calcitonina	54
2.2.6.2.3.3 Estrógenos e SERMS	56
2.2.6.2.3.4 Fitoestrogênios	60
2.2.6.2.4 Drogas que estimulam a formação óssea	62
2.2.6.2.4.1 Fluoreto	62
2.2.6.2.4.2 Paratohormônio	63
2.2.6.2.4.3 Agentes anabolizantes	64
2.2.6.2.5 Flavonóides	65
2.2.6.2.5.1 Efeito de flavonóides no metabolismo ósseo	72
2.2.6.2.5.2 Crisina	76
2.2.6.2.5.3 <i>Camellia sinensis</i> (Chá-verde)	77
3. OBJETIVOS GERAIS	92
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	93
4. MATERIAL E MÉTODOS	94
4.1. Experimento para avaliar o efeito de Bifosfonato e associação de Bifosfonato+Sinvastatina, Flavonóide e Fitoterápico, na osteoporose induzida por dexametasona	95
4.2. Coleta de material para análises	95
4.3. Análise dos constituintes sanguíneos	96
4.4. Microscopia eletrônica de varredura	96
4.5. Análise estatística	97
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	98
5.1. Análise dos parâmetros hematológicos	98
5.2. Análise dos parâmetros bioquímicos	114

5.3. Microfotografias eletrônicas de varredura de ossos de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos.	138
5.4. Histopatologia óssea de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos.	146
6. CONCLUSÕES	155
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
8. APÊNDICE A	201

## LISTA DE ABREVIATURAS

DMO	Densidade Mineral Óssea
FDA	Food and Drug Administration
PTH	Paratormônio
UFC-GM	Linhagem linfócito-monócito-macrófago-osteoclasto
TNF- $\alpha$	Fator- $\alpha$ de necrose tumoral
IL	Interleucina
PGE2	Prostaglandina E2
WHO	Organização Mundial da Saúde
MC3T3-E1	Células osteoblásticas
JNK	c-Jun N-terminal quinase
IGF	Fator de crescimento ligado à insulina
TGF- $\beta$	Fator- $\beta$ transformador de crescimento
B-AP	Fosfatase alcalina sérica ósseo específica
T-AP	Fosfatase alcalina sérica total
BGP	Proteína Gla óssea
P coll I-N	Derivado aminoterminal do peptídeo procolágeno I
RANK	Receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RANKL	Receptor do ativador do fator nuclear ligante Kappa B
NTX	N-telopeptídeo com ligação cruzada Fragmento carboxiterminal piridinolina do telopeptídeo do
ICTP	colágeno tipo I
VDR	Receptor da vitamina D
Col I $\alpha$ 1	Colágeno tipo I $\alpha$ 1
TRH	Terapia de reposição hormonal
SERM	Moduladores seletivos de receptores estrogênicos
OPG	Osteoprotegerina
SOST	Gene da esclerosteose
GH	Hormônio de crescimento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
RX	Raios - X
OMS	Organização Mundial de Saúde

HMG-CoA	3-hidroxi-3 metil-glutaril-coenzima A
BMP-2	Proteína morfogênica óssea-2
HMGCoA-r	Hidroximetil-glutaril-coenzima A redutase
AR	Artrite reumatóide
BF	Bifosfonatos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
OB-OCSF	Fatores estimuladores de osteoclastos derivados de osteoblastos
OB-OCIF	Fatores inibidores de osteoclastos derivados de osteoblastos
TGF- $\beta$	Transforming growth factor
PTK	Tirosina quinase
EGF-R	Fator de crescimento epidérmico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
ABC	Grupo de transportadores ATP-binding cassette
MRP	Proteína associada à resistência de multidrogas
BCRP	Proteína de resistência ao câncer de mama
MDR	Desenvolvimento da resistência à multidrogas
ATP	Trifosfato de adenosina
GSH	Tripetídeo glutationa
Dpd	Deoxipiridinolina
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
CYP1A1	Enzima que participa do metabolismo de drogas
BZD	Receptores centrais do tipo benzodiazepínico
USP	Farmacopéia Americana
C	Catequina
GC	Galocatequina
EC	Epicatequina
EGC	Epigalocatequina
ECG	Epicatequina galato
EGCG	Epigalocatequina galato
ERO	Espécie reativa de oxigênio
UFV	Universidade Federal de Viçosa

EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
MCP-1 CCL2	Monócitos quimioatraentes da proteína1
MRP	Transportador aniônico orgânico
WBC	Leucócitos totais
LIN	Linfócitos
MIE	Mielócitos
GRA	Granulócito
RBC	Contagem de eritrócitos totais
HGB	Concentração total de hemoglobina
HCT	Hematócrito
VCM	Volume corpuscular médio
HCM	Hemoglobina corpuscular média
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
RDW	Amplitude de distribuição do tamanho das hemácias
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente
AP-1	Fator de transcrição dimérico
pH	Potencial de hidrogênio
MFO	Sistema Metabolizador de Drogas Hepático
FAO	Fosfatase alcalina óssea
P	Fósforo
Ca	Cálcio
Cr	Creatinina
LV	Vértebras lombares
SH	Laparotomizadas
OVX	Ovariectomizadas
UV	Raios ultra-violeta
UVB	Raios ultra-violeta B
MAP quinase	Mitógenos ativados por proteínas quinase
NF-kB	Fator nuclear Kappa B

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Proposta do modelo de apoptose mediada pelo TNF- $\alpha$ e sua aceleração pela quercetina nas células MC3T3-E1	5
Figura 2	Genes envolvidos na remodelação óssea (sistema RANKL/OPG)	20
Figura 3	Aspecto multifatorial da fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide	25
Figura 4	Estrutura química das estatinas inibidoras da enzima HMG-COA redutase	39
Figura 5	Biosíntese do Colesterol como substrato para a ação das estatinas e dos bifosfonatos (BP)	41
Figura 6	Estrutura química dos ácidos bifosfônico e pirofosfórico	47
Figura 7	Remodelagem óssea e bifosfonatos	48
Figura 8	Estruturas representativas da classe de compostos bifosfonatos	50
Figura 9	Estrutura química das classes de flavonóides	65
Figura 10	Estrutura química da crisina (5,7-dihidroxi-flavona)	76
Figura 11	a) Aspecto geral da árvore do chá verde. b) (-)-Epicatequina	77
Figura 12	Estrutura das catequinas e teaflavinas	79
Figura 13	Ativação de pró-cancerígeno pelo Sistema Metabolizador de Drogas Hepático (MFO)	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudos prospectivos de efeitos dos glicocorticóides em marcadores bioquímicos de remodelação óssea	26
Tabela 2	Porcentagem de inibição de MRP1 e MRP2	71
Tabela 3	Área do fêmur, conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea e propriedades do ponto médio do fêmur	75
Tabela 4	Concentração sérica de algumas citocinas pró-inflamatórias	76
Tabela 5	Tempos de retenção e identidade dos picos observados no cromatograma	80
Tabela 6	Efeito do extrato aquoso do chá preto ( <i>Camellia sinensis</i> ) nas mudanças induzidas pela ovariectomia em diferentes grupos de ratas (n = 7)	85
Tabela 7	Valores dos parâmetros normais de referência das séries branca e vermelha, de ratas da raça Wistar	98
Tabela 8	Valores médios de leucócitos totais (WBC) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	99
Tabela 9	Valores médios de linfócitos (LIN) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	100
Tabela 10	Valores médios de mielócitos (MIE) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	102
Tabela 11	Valores médios de granulócitos (GRA) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	103
Tabela 12	Valores médios da contagem de eritrócitos totais (RBC) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	105
Tabela 13	Valores médios da concentração total de hemoglobina (HGB) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	106
Tabela 14	Valores médios do hematócrito (HCT) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	107
Tabela 15	Valores médios do volume corpuscular médio (VCM) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	109

Tabela 16	Valores médios da Hemoglobina corpuscular média (HCM) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	110
Tabela 17	Valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	111
Tabela 18	Valores médios da amplitude de distribuição do tamanho das hemácias (RDW) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	113
Tabela 19	Valores médios das dosagens de glicose em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	114
Tabela 20	Valores médios das dosagens de colesterol em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	116
Tabela 21	Valores médios das dosagens de triglicérides em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	117
Tabela 22	Valores médios das dosagens de proteínas em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	119
Tabela 23	Valores médios das dosagens de albumina em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	120
Tabela 24	Valores médios das dosagens de uréia em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	122
Tabela 25	Valores médios das dosagens de creatinina em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	123
Tabela 26	Valores médios das dosagens de fósforo em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	125
Tabela 27	Valores médios de fósforo sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos	126
Tabela 28	Efeito do extrato de <i>Erythrina variegata</i> em marcadores bioquímicos de ratas ovariectomizadas	127
Tabela 29	Valores médios das dosagens de cálcio em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	128
Tabela 30	Valores médios de cálcio sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de	129

ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos

Tabela 31	Efeito do extrato de <i>Erythrina variegata</i> em marcadores bioquímicos de ratas ovariectomizadas	130
Tabela 32	Valores médios das dosagens de fosfatase alcalina total em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	132
Tabela 33	Valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO) em pg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos	133
Tabela 34	Valores médios das dosagens de gama GT em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos	136

## RESUMO

SEQUETTO, Priscila Lima, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Março de 2008. **Efeitos de alendronato de sódio, sinvastatina, crisina e tintura de *Camellia sinensis* na osteoporose induzida por dexametasona em ratas.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira, Co-orientadores: Tanus Jorge Nagem e Ricardo Junqueira Del Carlo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do alendronato de sódio, sinvastatina, flavonóide crisina e tintura da planta *Camellia sinensis* usado 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 foram: alendronato de sódio dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); crisina dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg), administradas diariamente por via oral. Após o período de indução da osteoporose, iniciaram-se os tratamentos. Os animais foram distribuídos em quatorze grupos: G1 = Ração (Controle); G2 = Ração + Dexametasona (Controle com osteoporose); G3 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio dose 1; G4 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio dose 2; G5 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio dose 3; G6 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio dose 1 + Sinvastatina dose 1; G7 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio dose 2 + Sinvastatina dose 2; G8 = Ração + Dexametasona + Alendronato de sódio dose 3 + Sinvastatina dose 3; G9 = Ração + Dexametasona + Crisina dose 1; G10 = Ração + Dexametasona + Crisina dose 2; G11 = Ração + Dexametasona + Crisina dose 3; G12 = Ração + Dexametasona + Extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* dose 1; G13 = Ração + Dexametasona + Extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* dose 2; G14 = Ração + Dexametasona + Extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* dose 3. Após completar 30 dias, a partir da data de início do tratamento, os sete animais de cada grupo foram eutanasiados por sobredosagem anestésica,

utilizando 180 mg/Kg de ketamina e 10 mg/Kg de xilasina, administrados por via intraperitoneal. Foram coletados, então, de cada animal, 5,0 mL de sangue por punção cardíaca, para realização das análises hematológicas e quantificação bioquímica dos níveis séricos de cálcio, fósforo, glicose, fosfatase alcalina total, uréia, creatinina, proteínas, colesterol total, triacilgliceróis, gama GT e albumina. Os resultados das análises bioquímicas quanto aos valores de cálcio, fósforo, glicose, fosfatase alcalina total, uréia, creatinina, proteínas, colesterol total, triacilgliceróis, gama GT e albumina mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e os animais doentes (controle com osteoporose). Também houve diferenças significativas nas dosagens dos parâmetros hematológicos, entretanto, para alguns parâmetros avaliados como: mielócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e amplitude de distribuição do tamanho das hemácias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle com osteoporose e os outros grupos tratados. As microfotografias eletrônicas de varredura mostraram que houve um aumento da porosidade nos ossos dos animais doentes (controle com osteoporose) e uma diminuição destes poros nos animais tratados. Isto também pôde ser observado através da avaliação da histopatologia óssea, que mostrou uma recuperação no tamanho das trabéculas ósseas nos animais tratados quando comparados ao controle osteopórotico.

## ABSTRACT

SEQUETTO, Priscila Lima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2008. **THE EFFECTS OF SODIUM ALENDRONATE, SIMVASTATIN, CHRYSIN, AND THE *Camellia sinensis* TICTURE IN OSTEOPOROSIS INDUCED FOR DEXAMETASONA IN RATS.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-Advisers: Tanus Jorge Nagem and Ricardo Junqueira Del Carlo.

The present work had the objective to evaluate the influence of the sodium alendronate, simvastatin, flavonoid chrysin and the *Camellia sinensis* ticture used separately and in associated, in osteoporose induced for the administration of dexametasone (dose of 7mg/kg of weight), in rats of the Wistar ancestry (*Rattus norvegicus albinus*). The used dosages were: sodium alendronate dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) and dose 3 (0,60 mg); simvastatin dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) and dose 3 (1,0 mg); flavonoid dose 1 (35 mg), dose 2 (60 mg) and dose 3 (90 mg) and phytoterapic dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) and dose 3 (0,03 mg), treated once a day orally. After the osteoporosis induction period, the treatments were initiated. The animals were distributed in fourteen groups: G1 = Comercial ration (Control); G2 = Comercial ration + Dexametasone (Control with osteoporose); G3 = Comercial ration + Dexametasone + Biphosphonate dose 1; G4 = Comercial ration + Dexametasone + Biphosphonate dose 2; G5 = Comercial ration + Dexametasone + Biphosphonate dose 3; G6 = Comercial ration + Dexametasone + Biphosphonate dose 1 + simvastatin dose 1; G7 = Comercial ration + Dexametasone + Biphosphonate dose 2 + simvastatin dose 2; G8 = Comercial ration + Dexametasone + Biphosphonate dose 3 + simvastatin dose 3; G9 = Comercial ration + Dexametasone + Flavonoid dose 1; G10 = Comercial ration + Dexametasone + Flavonoid dose 2; G11 = Comercial ration + Dexametasone + Flavonoid dose 3; G12 = Comercial ration + Dexametasone + Phytoterapic dose 1; G13 = Comercial ration + Dexametasone + Phytoterapic

dose 2; G14 = Comercial ration + Dexametasone + Phytoterapic dose 3. After 30 days from the start of the treatment, seven animals of each group had been euthanasiated by anesthetical overdosage of 180 mg/Kg de ketamin e 10 mg/Kg de xilasin, route to intraperitoneal. It has been collected of each animal, 5,0 mL of blood by cardiac puncture, for the hematological analyses and biochemist quantification of the serum levels of calcium, phosphorus, glucose, fosfatase alkaline total, urea, creatinina, proteins, total cholesterol, tryacylglycerols, gamma GT and albumen. The results of the biochemists analyses of calcium, phosphorus, glucose, fosfatase alkaline total, urea, creatinina, proteins, total cholesterol, tryacylglycerols, gamma GT and albumen had not shown significant differences among the treated groups, being significant only in relation to the control animals (with osteoporosis). Also, it had not have significant differences in the dosages of the hematological parameters between the control group and the control group with osteoporosis, as well as, among them and the treated groups. The electronic microphotographs shows that there was an increase of the porosity in the bones of the control animals (with osteoporosis) and a reduction of these pores in the treated animals. This could also be observed through the evaluation of the bone histopatology, that it showed a recovery in the trabecular area on the treated animals when compared to the control with osteoporosis.

## 1) INTRODUÇÃO

A Osteoporose é um distúrbio osteometabólico onde ocorre redução da densidade mineral óssea (DMO). Esta redução da massa óssea ocorre quando o organismo não consegue fazer o remodelamento ósseo na mesma proporção que ocorre a reabsorção, tornando o osso mais frágil e menos resistente, aumentando a incidência de fraturas.

A doença deve ser considerada como um problema de saúde pública devido ao seu impacto social, físico e econômico. A maioria de casos de osteoporose ocorre em pessoas idosas e principalmente em mulheres devido à perda óssea que é mais pronunciada na pós-menopausa devido a um decréscimo nos níveis séricos de estrogênio.

As principais manifestações clínicas da osteoporose são as fraturas que têm grande importância na sociedade brasileira, considerando o seu envelhecimento progressivo com graves consequências físicas, financeiras e psicossociais, afetando o indivíduo, a família e a comunidade.

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998) estima que 80% da população deste planeta, de algum modo, utiliza plantas medicinais como medicamentos. O emprego de plantas medicinais para tratamento de doenças, é uma prática comum pelas populações carentes, sendo que aproximadamente 82% da população brasileira faz uso de produtos à base de ervas.

Os fitoestrogênios são substâncias derivadas do metabolismo secundário de plantas que possuem uma estrutura fenólica similar aos estrogênios, e por isso têm sido utilizados como alternativa natural à terapia de reposição hormonal da menopausa.

É segundo as considerações expostas que o presente trabalho foi realizado com a intenção de se pesquisar alternativas terapêuticas para o tratamento da osteoporose baseadas em medicamentos obtidos de fontes naturais observando principalmente seu menor custo e também menor incidência de efeitos adversos, quando comparados aos medicamentos sintéticos.

## 2) REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1) Tecido ósseo

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, serve como suporte para as partes moles e protege órgãos vitais. Protege a medula óssea que se encontra na estrutura interna do osso e é formadora das células do sangue. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis.

Além dessas funções, os ossos funcionam como depósitos de cálcio, fósforo e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais.

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células são: (1) os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; (2) os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz; e (3) os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos (Junqueira & Carneiro, 1999).

O tecido ósseo tem como principal função a sustentação do esqueleto e é sujeito a fraturas quando sua resistência sofre colapso frente a uma força maior. As fraturas são passíveis de acontecer em qualquer pessoa, em especial frente a grandes traumas. Entretanto existem situações patológicas em que esta fragilidade está aumentada, como ocorre na osteoporose, na osteomalácia, no hiperparatireoidismo, na osteogênese imperfeita, entre outras. Dentre estas, é a osteoporose a de maior prevalência na população mundial e, portanto, a que recebe maior atenção na literatura científica (Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002).

A medida de massa óssea tem sido o método mais utilizado para diagnóstico da osteoporose, pois trabalhos populacionais demonstraram elevada correlação entre resistência óssea e quantidade de matriz mineralizada, característica medida por este exame (Kanis *et al.*, 1994). Entretanto sabemos que a densidade mineral óssea (DMO) é uma medida

pontual estática e, portanto, não reflete as alterações dinâmicas que este tecido ósseo está sofrendo na ocasião do exame. Para suprir esta limitação e, desta forma, melhorar a sensibilidade e especificidade na avaliação do risco de fratura, marcadores bioquímicos de remodelação óssea vêm sendo desenvolvidos.

Aparentemente existe um nível de densidade óssea, acima do qual as fraturas osteoporóticas não ocorrem. Abaixo desse nível o risco aumenta progressivamente, de forma contínua. A variedade pós-menopáusica dessa desordem é de longe a mais comum, relacionada à perda óssea, que acompanha o estado hipoestrogênico característico do período. O esqueleto adulto não é uma estrutura inativa como à primeira vista pode parecer. Ele sofre um contínuo processo de remodelagem no qual a reabsorção está acoplada à formação óssea. Em cada unidade de remodelação óssea parece ocorrer uma seqüência determinada de eventos. Compreende etapas sucessivas de repouso, ativação, reabsorção, fase reversa, formação (síntese de matriz e sua mineralização), com retorno à fase de repouso para iniciar novo ciclo após determinado estímulo (Parfitt, 1984).

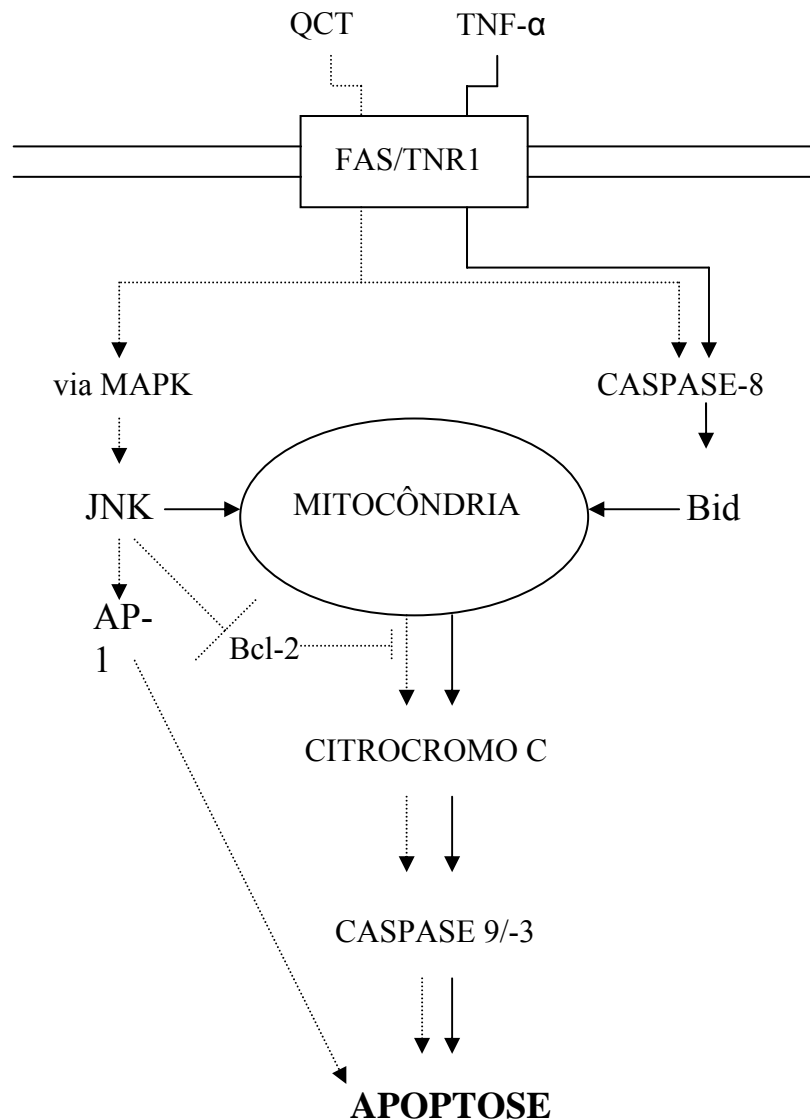
As células que participam da remodelação óssea têm origem diversa. Os osteoblastos – sistema de células fixas – derivam da linhagem das células de revestimento (células da matriz mesenquimal – fibroblastos e osteoblastos), enquanto os osteoclastos – sistema de células móveis – provêm de unidades formadoras comuns de granulócitos e macrófagos da medula óssea denominadas de UFC-GM (linhagem linfócito-monócito-macrófago-osteoclasto). De outra forma, pode ser dito que parte da reabsorção óssea é formada por células que não são próprias do tecido ósseo. São células de linhagem sangüínea que são atraídas à superfície óssea para dar início ao processo reabsortivo. A outra parte – de formação óssea – é formada por células próprias do tecido ósseo, que preenchem a lacuna de reabsorção com a síntese da matriz de colágeno. Normalmente, a reabsorção e a formação são acopladas e, quando a homeostasia é ideal, pode-se esperar que a quantidade de osso no início e no fim do ciclo de remodelagem seja equilibrada (Fernandes *et al.*, 1996).

As células ósseas são sensíveis aos fatores de crescimento, aos hormônios, e às citocinas (Katagiri e Takahashi, 2002). Especificamente, o

fator-  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que é produzido principalmente por macrófagos, por células da medula óssea e monócitos, tem um importante papel no regulamento do metabolismo ósseo. Para o exemplo, TNF  $\alpha$  - estimula osteoblastos a secretar outras citocinas inflamatórias tais como as interleucinas (IL)-1 e IL-6, assim como as prostaglandinas E2 (PGE2) e o próprio TNF -  $\alpha$ , que age diretamente em osteoclastos para causar a reabsorção do osso (Glantschnig *et al.*, 2003). TNF -  $\alpha$  induz também a apoptose dos osteoblastos (Chua *et al.*, 2002). Conseqüentemente, acredita-se que um aumento do nível de TNF- $\alpha$  e uma diminuição no número dos osteoblastos pode ser responsável pela perda do osso *in vivo*.

Recentemente, houve uma tendência global para o uso de compostos bioativos naturais que regulam o metabolismo ósseo (Gallagher *et al.*, 2004). O flavonóide presente na alimentação, quercetina, foi destacado por causa das suas atividades biológica, farmacológica e medicinal.

Evidências sugerem que a quercetina inibe a perda óssea afetando a osteoclastogênese e regulando uma variedade de fatores sistêmicos e locais tais como hormônios e citocinas inflamatórias (Wattel *et al.*, 2003). Entretanto, os mecanismos precisos através dos quais a quercetina regula a ativação dos osteoblastos não são compreendidos completamente, particularmente na presença de citocinas inflamatórias. Além disso, resultados de estudos recentes sugerem que a quercetina não inibe o TNF- $\alpha$  - que induz a citotoxicidade e apoptose das células MC3T3-E1 osteoblásticas - mas acelera estes processos (Son *et al.*, 2006a). Isto conduziu a postular que os efeitos da quercetina em células ósseas podem diferir de acordo com os tipos de células estudadas e as condições dos modelos experimentais, isto é, *in vivo* e *in vitro* (Horcajada-Molteni *et al.*, 2000).



**Fig.1- Proposta do modelo de apoptose mediada pelo TNF- $\alpha$  e sua aceleração pela quercetina nas células MC3T3-E1. TNF- $\alpha$  induz a apoptose nas células através do mecanismo caspase-dependente, visto que a quercetina acelera esta apoptose através de dois mecanismos, um é através da promoção da ativação de caspase, e o outro é através da ativação de sinalizadores de JNK (c-Jun N-terminal quinase). (Son, *et al.*, 2007).**

Quando a mulher atinge os 40 anos de idade, a reabsorção começa a exceder a formação óssea em cerca de 0,5% ao ano. Quando se atinge a menopausa, a quantidade de osso reabsorvida aumenta agudamente, enquanto a quantidade de osso formado aumenta moderadamente (Mazess,

1982). Dessa forma a cada ano perde-se de 1% a 3% de osso cortical e acima de 5% de osso trabecular. Essa erosão óssea mantém-se durante cerca de 10 a 15 anos, após este período a perda óssea é consideravelmente diminuída.

A perda óssea relacionada à menopausa resulta em 15% a 30% de decréscimo de osso trabecular e de 10% a 15% de redução do osso cortical (Ettinger, 1988). Assim, a deficiência estrogênica é responsável por um terço até a metade da perda óssea observada durante a vida da mulher. Em 20 anos perde-se 50% do osso trabecular e 30% do osso cortical, proporcionando condição para elevado risco de fratura. A perda óssea é mais rápida durante os primeiros três a quatro anos após a menopausa. Nos anos seguintes ocorre uma atenuação na velocidade de redução da massa óssea (Fernandes *et al.*, 1996).

### **2.1.1) Remodelação óssea**

A massa óssea resulta tanto da quantidade de osso adquirida durante o crescimento, ou seja, o pico de massa óssea, e a razão de perda óssea relacionada com a idade. Essas mudanças ocorrem durante o processo de remodelação no osso, como resultado do desequilíbrio entre as células de reabsorção (osteoclastos) e as células formadoras (osteoblastos) que removem e recolocam pequenos pacotes de osso em certos pontos do esqueleto. Desse modo, percebe-se que o osso nunca está metabolicamente inativo, sua matriz e suplementos minerais estão sendo remodelados constantemente, ao longo das linhas de estresse mecânico (Marchigiano, 1997).

A remodelação é um fenômeno que nos acompanha ao longo da vida, sendo fundamental para renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade. Nele a reabsorção é seguida da formação óssea em ciclos constantes orquestrados pelas células do tecido ósseo, que incluem os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. 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 (Hanley, 2000). É esta capacidade de avaliação dinâmica que se deseja em um marcador de remodelação óssea.

Os marcadores são considerados indispensáveis hoje em dia nas avaliações de efetividade de uma nova droga para tratamento da osteoporose, além de terem trazido grandes contribuições científicas sobre fisiologia e fisiopatologia do tecido ósseo (Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002).

Um estímulo inicial ativa o ciclo de remodelação. Os osteoclastos promovem um desgaste ósseo formando uma cavidade, ao longo de duas ou três semanas, conhecidas no osso trabecular como uma lacuna de Howship, reabsorvendo um volume de osso aparentemente predeterminado. Tendo completado a tarefa, essas células multinucleadas desaparecem, sendo o seu destino incerto. São substituídos pelos osteoblastos que depositam células osteóides, reabastecendo a cavidade formada. A mineralização do osteóide, que se inicia cinco a dez dias mais tarde, completa o processo de reparo (Fernandes *et al.*, 1996).

Muitos dos fatores que controlam a reabsorção óssea não são bem compreendidos. A ativação é um processo que parece ser controlado por fatores locais (bioquímicos e físicos) e sistêmicos, como hormônio paratireóideo, 1,25-diidroxivitamina D, calcitonina e hormônios sexuais. Admite-se haver um sistema de comunicação entre as linhagens celulares de osteoclastos e osteoblastos para o adequado acoplamento da remodelação óssea. A reabsorção de osso velho pelos osteoclastos e a subsequente formação de osso novo pelos osteoblastos são processos estreitamente relacionados. O termo acoplamento é usado para definir essa forte associação. Existe na realidade um verdadeiro ecossistema ósseo, intercomunicando o sistema de células móveis e fixas (Fernandes *et al.*, 1996).

É muito importante observar que os osteoclastos têm origem comum com a linhagem de células sangüíneas, e em princípio a hematopoiese e a osteoclastogênese podem estar sobre as mesmas influências, sofrendo interferência em princípio de substâncias localmente produzidas. Esse ecossistema possibilita a comunicação entre os dois tipos de linhagens celulares envolvidos na remodelação óssea (osteoblastos e osteoclastos) por meio desses mensageiros localmente produzidos, denominados de "citocinas", que possibilitam o recrutamento das células progenitoras e a ativação ou depressão do processo de remodelação, tanto em relação à formação quanto à reabsorção óssea. Existe uma lista de substâncias referidas como citocinas.

Entre essas, relacionam-se as interleucinas IL-1, IL-3, IL-6, as prostaglandinas, os IGF (fator de crescimento ligado à insulina), TNF- $\alpha$  (fator- $\alpha$  de necrose tumoral), o TGF- $\beta$  (fator- $\beta$  transformador de crescimento), entre outras. (Fernandes *et al.*, 1996).

#### **2.1.1.1) Marcadores da formação óssea**

Existem vários potenciais marcadores da formação óssea. Durante muitos anos houve um único marcador que dava informação sobre o processo de remodelação, que era a fosfatase alcalina sérica (Fernandes *et al.*, 1996).

No osso, a fosfatase alcalina sérica óssea específica (B-AP) é produzida pelos osteoblastos e liberada na circulação sanguínea. Faz parte do *pool* da fosfatase alcalina sérica (T-AP), representando habitualmente cerca de 11% a 16% do total plasmático. A fosfatase alcalina sérica total, por sua vez, é relativamente estável, fácil e barata de medir, mas não é específica para o osso, pois um único gene produz a mesma enzima no fígado, rim e intestino, além do osso. Novas técnicas de radioimunoensaio e quimioluminescência têm permitido a dosagem isolada da fração óssea, cujo papel ainda não é inteiramente conhecido (McComb, 1979 & Posen, 1977). Embora na exclusão de doenças hepáticas a dosagem da T-AP apresente boa correlação com a B-AP, a dosagem desta última tem a vantagem de ser relativamente independente de interferência de outras doenças que intervêm com outras fontes de fosfatase alcalina. Apresenta boa correlação com a dosagem de osteocalcina, parecendo no entanto que essas duas substâncias possam expressar aspectos diferentes da remodelação óssea.

A osteocalcina, inicialmente denominada de BGP (bone Gla protein – proteína Gla óssea), ou proteína do osso dependente de vitamina K, é uma proteína não-colagenosa, presente em maior quantidade na matriz óssea, constituindo cerca de 20% a 25%. Acredita-se que a osteocalcina derive exclusivamente dos osteoblastos com seus níveis séricos refletindo sobretudo a formação óssea. Seu metabolismo não é exatamente conhecido. Uma vez sintetizada é incorporada na matriz óssea e liberada na circulação sanguínea, podendo ser identificada no plasma por técnicas de radioimunoensaio e

quimioluminescência. Costuma estar em alta atividade em situações de elevada remodelação óssea (exemplo: hiperparatireoidismo e doença óssea de Paget) e diminuída em situações de comprometimento da remodelação óssea (hipotireoidismo mixedematoso). De outra parte observa-se seu aumento no período pós-menopáusico e diminuição nas pacientes neste período da vida em terapêutica de reposição hormonal (Fernandes *et al.*, 1996).

Existem novos marcadores da formação óssea de potencial importância, como o peptídeo procolágeno I, em especial o derivado aminoterminal (P coll I-N), que é um produto intermediário do metabolismo extracelular do colágeno tipo I. Esses peptídeos circulam no sangue e como tal podem tornar-se medidas sistêmicas do colágeno ósseo, componente predominante da matriz óssea. Essa possibilidade acrescenta importante medida para avaliar eficácia terapêutica, visto que as técnicas disponíveis refletem apenas o metabolismo mineral ósseo isolado. Duas outras proteínas secretadas pelos osteoblastos, a osteonectina e sialoproteína óssea II, aguardam desenvolvimento de técnicas mais específicas de radioimunoensaio e quimioluminescência para que possam ser empregadas clinicamente. Apresentam o inconveniente de serem também produzidas pelas plaquetas, não sendo portanto, específicas do tecido ósseo (Fernandes *et al.*, 1996).

#### **2.1.1.2) Marcadores da reabsorção óssea**

Entre os marcadores bioquímicos da reabsorção óssea, dispõe-se da dosagem do cálcio urinário de 24 horas, da relação cálcio/creatinina e hidroxiprolina/creatinina na urina de jejum, da dosagem sérica da fosfatase ácida târtaro-resistente, da piridinolina, da deoxipiridinolina e dos fragmentos de ligação cruzada amino e carboxiterminais das moléculas do colágeno.

Admite-se que as pacientes que apresentem baixo cálcio na urina de 24 horas ou baixa relação cálcio/creatinina na urina de jejum, sem o uso de diuréticos tiazídicos, estão em regime de baixa ingestão de cálcio ou apresentam problemas de absorção. Tem sido utilizado, quando elevado, como um dos indicadores clássicos de reabsorção óssea aumentada, ainda que não seja específico da remodelação óssea. São empregados rotineiramente em

protocolos de pesquisa do metabolismo de cálcio e em situações clínicas (Fernandes *et al.*, 1996).

A relação hidroxiprolina/creatinina aumentada na urina de jejum pode estar associada com condições de elevada reabsorção óssea, incluindo hipertireoidismo, hiperparatireoidismo e doença de Paget, não sendo específica do estado pós-menopáusicos. Em estudos prospectivos a hidroxiprolina urinária aumenta por ocasião da menopausa e é reduzida pela terapia estrogênica (Lindsay, 1987). Tem utilização clínica e em pesquisa como marcador bioquímico da reabsorção óssea. Apesar disso, no entanto, não parece ser de forma isolada, quando do estudo individual de casos, inteiramente confiável, uma vez que pode estar normal em pacientes com osteoporose (Lindsay, 1987).

Marcadores mais sensíveis da reabsorção óssea têm sido desenvolvidos. A piridolina e a deoxipiridolina, que fazem a ligação cruzada entre as moléculas do colágeno, parecem ser específicas para o colágeno do osso e da cartilagem. Em consequência do tecido ósseo ser a fonte mais abundante de colágeno e de apresentar maiores taxas de remodelação comparada a outros tecidos conjuntivos tais como a cartilagem, a dosagem da piridinolina e, em especial, da deoxipiridinolina na urina expressam potencialmente a reabsorção óssea. Seus níveis são elevados em doenças que se caracterizam por alta remodelação óssea, estando também aumentados após a menopausa. Correlaciona-se com a reabsorção óssea medida em amostras de biópsia da crista ilíaca e não são influenciadas pela dieta (Fernandes *et al.*, 1996).

A fosfatase ácida é uma enzima lisossômica presente em vários tecidos (próstata, baço, eritrócitos, plaquetas, etc.), incluindo o tecido ósseo. Trata-se em realidade de diferentes isoenzimas, que podem ser separadas pelos métodos eletroforéticos. A fosfatase ácida do osso, por sua vez, é resistente ao L(+)-tártaro, enquanto a isoenzima prostática da fosfatase ácida é inibida (Lindsay *et al.*, 1973). A fosfatase ácida tartaro-resistente corresponde, no plasma normal, à fração identificada eletroforeticamente vinda do osso, refletindo dessa forma a atividade osteoclástica. Apresenta, no entanto, dificuldades metodológicas na sua determinação (instabilidade em amostras congeladas e baixa especificidade), necessitando de ensaios de melhor qualidade para permitir o seu uso na clínica diária (Fernandes *et al.*, 1996).

A maioria dos ligamentos cruzados de piridinolina são excretados ligados a fragmentos de peptídeos das moléculas do colágeno, podendo sua dosagem expressar um índice quantitativo do pool total de piridinolina. O fragmento aminoterminal do final da molécula do colágeno humano contém 60% de deoxipiridinolina, sendo denominado de NTX (N-telo-peptídeo com ligação cruzada). Medidas urinárias de NTX proporcionam uma medida reprodutível da taxa de reabsorção óssea. Seus resultados correlacionam-se com as medidas nas mesmas amostras de piridinolina e deoxipiridinolina (Hanson, 1992). Esse marcador reflete as mudanças de remodelação óssea da transição menopáusicas e responde como se espera aos tratamentos com medicações anti-reabsortivas (Hanson, 1996; Rosen & Garnero, 1994).

Existem novas proposições de marcadores da remodelação óssea. Entre elas, a dosagem do fragmento carboxiterminal piridinolina do telopeptídeo do colágeno tipo I (ICTP). O ICTP é um fragmento de ligação cruzada que é liberado no fluido extracelular quando da quebra do colágeno por ocasião da reabsorção óssea. Com a melhora de sensibilidade dos ensaios poderá ser usado no futuro para identificar variações no processo reabsortivo ósseo.

A interpretação dos resultados dos marcadores de remodelação óssea ainda é difícil para os especialistas, havendo por parte deles uma predileção em acompanhar a evolução da massa óssea pelos exames densitométricos seriados. É possível, no entanto, que a análise dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea possa ganhar a aceitação desses especialistas à medida que forem melhorando o erro de precisão, tornando-se menos onerosos, com interpretação mais fácil de seus resultados e possibilitando uma monitoração mais rápida dos resultados terapêuticos (Fernandes *et al.*, 1996).

### **2.1.1.3) Avaliação laboratorial da remodelação óssea**

Os exames laboratoriais visando comprovar alterações da remodelação óssea, denunciativas do aumento da reabsorção que caracteriza a osteoporose involutiva do tipo I, apresentam resultados de interpretação difícil, além de problemas metodológicos, tornando seu emprego na atualidade ainda pouco usual entre os ginecologistas.

Registre-se, no entanto, que novos marcadores mais sensíveis têm sido identificados, tornando bastante promissor o seu emprego no diagnóstico da perda óssea e no monitoramento das pacientes sob tratamento com fármacos que atuam no metabolismo ósseo.

A importância clínica da identificação precoce dos pacientes com risco de osteoporose, visando à introdução do tratamento preventivo, tem contribuído para a pesquisa de novos marcadores de remodelação óssea que possam indicar a taxa de perda do tecido ósseo. As técnicas incluem a identificação plasmática ou urinária de proteínas ou fragmentos protéicos, colagenóticos ou não, de forma isolada ou em grupos de substâncias que se propõem separar indivíduos com perda óssea rápida daqueles com perda lenta.

A medida da massa óssea, pode por si só servir como índice de risco, sendo que as mulheres que apresentam massa óssea baixa na época da menopausa são as mais propensas ao desenvolvimento da osteoporose.

Os marcadores bioquímicos da remodelação têm, em tese, a vantagem de mostrar a realidade momentânea da remodelação óssea, contrariamente à densitometria óssea, que poderia apenas expressá-la retrospectivamente. Outrossim, esses exames, além de identificar as mulheres que perdem massa óssea muito rápido, permitem predizer o prognóstico das pacientes que responderão melhor ao tratamento com as drogas anti-reabsortivas ou estimuladoras da formação óssea. Por último, em curto espaço de tempo, podem atestar a eficácia ou não do fármaco empregado, prestando-se portanto à monitoração do tratamento (Fernandes *et al.*, 1996).

## 2.2) Osteoporose

A osteoporose é conceituada como sendo uma doença caracterizada por deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com redução da massa óssea em níveis insuficientes para a função de sustentação, tendo como consequência elevado risco de fratura. A osteoporose pós-menopáusicas juntamente com a senil são formas primárias de osteoporose e consideradas involucionais (Fernandes *et al.*, 1996).

Constitui-se na mais comum das doenças ósseas metabólicas, afetando muitas mulheres no final de suas vidas. Existem, por outro lado, causas secundárias de osteoporose, geralmente relacionadas a outras doenças ou fatores, que se relacionam a afecções de origem endócrino-metabólicas (hereditárias ou não), reumatológicas, renais, digestivas, neoplásicas e o uso de medicações, que interferem com o equilíbrio do cálcio (corticosteróides, anticonvulsivantes, antiácidos, entre outros). Em 20% dos casos há uma doença secundária determinando a osteoporose, sendo que os casos restantes devem-se à variedade involucional ou primária (Riggs, 1987).

Atinge homens e mulheres com predominância no sexo feminino com deficiência estrogênica e indivíduos idosos. Nos homens, a presença de uma causa secundária de osteoporose é mais freqüente (30% a 60%), sendo o uso de glicocorticóide, hipogonadismo e o alcoolismo, as mais prevalentes. Nas mulheres na pós-menopausa a presença de causas secundárias é menos freqüente, embora deva ser sempre considerada (CBO, 2002).

Na menopausa aumenta a renovação e diminui a formação óssea em cada unidade de remodelação, o que conduz a uma perda de massa óssea. O risco de osteoporose depende tanto da massa óssea máxima alcançada nos anos da idade adulta jovem quanto do índice de perda da massa nas épocas posteriores. O pico de massa óssea geralmente não é alcançado antes de 30 anos e o estilo de vida é um importante determinante da probabilidade de desenvolver mais tarde osteoporose.

O pico de massa óssea é definido como a máxima densidade mineral óssea atingida durante o crescimento e desenvolvimento, em conjunto com uma consolidação subsequente que continua durante a fase de adulto jovem (Matkovic *et al.*, 1994). É aceito que a densidade mineral óssea máxima esteja

presente durante a terceira ou quarta década de vida. Estima-se que mais de 60% da massa óssea adulta esteja relacionada ao pico adquirido. O componente hereditário do pico de massa óssea tem sido estimado em torno de 50% a 70%.

A densidade óssea exibe um padrão familiar em indivíduos normais. Parece existir maior concordância na densidade mineral óssea de gêmeos monozigóticos que dizigóticos (Slemenda *et al.*, 1991). O caráter familiar da densidade óssea é adquirido bem precocemente, e a densidade óssea de meninas pré-púberes está correlacionada com a de suas mães (Ferrari *et al.*, 1998). Acredita-se que o pico de massa óssea seja fortemente influenciado pela hereditariedade, apesar de efeitos cumulativos do estilo de vida interferirem. Recentemente, foi descrita a relação do pico de massa óssea com o cromossomo 11q 12-13, numa população de irmãs gêmeas saudáveis (Koller *et al.*, 2000).

A osteoporose é geralmente considerada doença poligênica desencadeada pela interação de alelos polimórficos comuns com fatores ambientais múltiplos (Peacock *et al.*, 2002). Vários genes tem sido relacionados, como o gene do IGF-1, o gene do receptor da vitamina D (VDR), o gene do colágeno tipo I  $\alpha 1$  (Col I  $\alpha 1$ ), o gene do receptor estrogênico, o gene da esclerosteose e o promotor do gene da osteoprotegerina.

Dentre os fatores de risco está a ausência de atividade física regular e de terapia de reposição hormonal, bem como fatores genéticos e os relativos à dieta (Hallberg *et al.*, 1992). Não se sabe com certeza em que idade começa a perda óssea, mas acredita-se que, entre 40 anos e a menopausa, as mulheres perdem aproximadamente 0,3% a 0,5% de sua massa de osso cortical por ano; após a menopausa, este ritmo acelera para 2% a 3% ao ano (Lucasin Junior & Lima, 1994).

O custo social e familiar devido às fraturas osteoporóticas é muito grande. Também é elevado o custo econômico que acompanha essas fraturas. É grande o número de pessoas afetadas, sendo caro e longo o tratamento a que são submetidas (Fernandes *et al.*, 1996).

A osteoporose é uma doença metabólica do osso, que se caracteriza por baixa massa e deterioração do tecido ósseo, conduzindo à fragilidade do osso com conseqüente aumento do risco de fraturas. Estudos familiares sugerem a

osteoporose como uma doença genética, de caráter poligênico, sendo que mais de 85% da variação de massa óssea está sob controle genético (Wood, *et al.*, 1998).

A fragilidade esquelética é amplamente determinada pela massa e a micro-estrutura do osso. O pico de massa óssea é o maior fator na quantificação de risco à fratura (Rosen, *et al.*, 1998) e variações alélicas no gene receptor da vitamina D (VDR) têm sido relatadas como responsáveis pela alteração da homeostase de cálcio, com efeitos subsequentes sobre o tamanho e a densidade óssea (Sosa, *et al.*, 1998). Em dezembro de 1997 foram listados no Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) 67 genes associados com a osteoporose, incluindo o gene do receptor da Vitamina D (VDR). Assim, a Vitamina D regula a homeostase do cálcio e a mineralização óssea e sua ação é mediada através do gene VDR localizado no cromossoma 12q, o qual tem variantes alélicas conhecidas. O VDR pertence à família de receptores de hormônios tireóides e esteróides e medeia os efeitos da 1,25 dihidroxi-vitamina D [1,25(OH)<sub>2</sub>D] na expressão gênica.

Os efeitos genômicos da 1,25-dihidroxi-vitamina D em uma ampla variedade de tecidos, são mediados pelo receptor da vitamina D (VDR) que é um fator de transcrição ativado por ligante. O gene que codifica o VDR fica situado no cromossoma 12q e contém 14 exons (Crofts *et al.*, 1998), e mede aproximadamente 75 kilobases de DNA genômico (Miyamoto *et al.*, 1997). Exons IA através de IF codificam a região 5' não-traduzida, exons II e III codificam o domínio DNA-ligante, e os exons IV-IX codificam a região ligante-ligante (Crofts *et al.*, 1998 & Pike). A expressão do VDR humano está sob o controle do complexo transcricional por múltiplos promotores tecido-específicos (Crofts *et al.*, 1998). Os alelos variantes individuais e seus haplotipos foram estudados extensamente como marcadores da susceptibilidade à osteoporose. Uma visão mais recente foi focada no papel da possível variação do gene de VDR no desenvolvimento de outras doenças, incluindo o câncer de mama e de próstata, a osteodistrofia, a doença aterosclerótica da artéria coronária, o diabetes, o hiperparatireoidismo, a susceptibilidade à infecção, e a psoríase (Zmuda *et al.*, 2000).

No mínimo 22 mutações originais de perda da função no gene de VDR foram relatados (Malloy *et al.*, 1997 & Malloy *et al.*, 1999). Os tipos

predominantes de mutações encontradas foram as mudanças na posição de alguns poucos nucleotídeos produzindo substituições de aminoácidos no DNA dos domínios-ligante (Malloy *et al.*, 1997).

Estudos procurando identificar uma associação entre alelos do VDR e massa óssea, sugeriram que o principal efeito do genótipo do VDR deve estar mais relacionado ao pico de massa óssea que a perda óssea relacionada à idade ou à menopausa (Zmuda *et al.*, 2000).

Zmuda *et al.* (2000) revelou que há indícios de associação entre a perda óssea em mulheres na pós-menopausa e o gene VDR. O componente hereditário é um fator difícil de ser analisado, mas a história familiar de osteoporose pode ser considerada um indicador adequado para sua avaliação. Indivíduos portadores de genótipos desfavoráveis, ou seja, com a presença de mutações em sítios específicos para o gene VDR, apresentam maior prevalência e incidência de fraturas e perda de massa óssea (Gennari *et al.*, 1999; Gomez *et al.* 1999). No entanto, não há concordância completa entre os dados de literatura (Zmuda *et al.*, 1999). Uma explicação plausível para isso é a necessidade de se considerar as interações entre gene e idade, gene e ambiente e principalmente, a interação entre diferentes genes na densidade mineral óssea (Ferrari *et al.*, 1999).

Em conseqüência de ser uma patologia silenciosa, que pode progredir sem detecção por décadas, a osteoporose afeta milhões de pessoas e está se tornando um dos maiores problemas de saúde. Assim, a osteoporose atinge tanto homens como mulheres e tem um impacto comparável, se não maior, aos mais importantes problemas de saúde, como as doenças cardiovasculares e o câncer (Froes, 2002).

Com o aumento significativo da expectativa de vida das mulheres e, conseqüentemente, das doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares e a osteoporose, muitos profissionais de saúde têm solicitado a realização do perfil lipídico e da avaliação da massa óssea, quase que rotineiramente, para atendimento de pacientes em climatério. Entretanto, estes exames complementares, em geral, são financeiramente onerosos para a mulher e mesmo para os serviços públicos de saúde, visto que são realizados, de uma maneira geral, anualmente em todas as mulheres em acompanhamento pelo climatério (Zabaglia *et al.*, 1998).

Múltiplas são as causas da osteoporose, dentre as quais as hormonais, mecânicas, genéticas e nutricionais. Nas mulheres, a osteoporose está particularmente associada com a menopausa, uma vez que a diminuição de estrógenos acelera a perda óssea (Bedani & Rossi, 2005).

Terapias tradicionais para a osteoporose têm enfatizado agentes que inibem a reabsorção óssea (tais como: estrógenos, calcitonina e bifosfonatos). Entre os agentes anti-reabsorção disponíveis, a terapia de reposição hormonal (TRH) é talvez o tratamento mais efetivo. No entanto, a TRH vem acompanhada por vários efeitos adversos, como o aumento de risco de câncer de mama e de endométrio (Zumoff, 1998). O grupo de compostos conhecidos como moduladores seletivos de receptores estrogênicos (SERM) (Bryant & Dere, 1998) vêm sendo usados para o tratamento da osteoporose. Tais compostos ligam-se e interagem com os receptores estrogênicos. Ultimamente, as isoflavonas têm sido caracterizadas como SERM naturais com benefícios similares para os ossos (Brezinski & Debi, 1999).

Os resultados do tratamento da osteoporose estabelecida costumam ser precários. Por essa razão, nos últimos anos, maior ênfase tem sido dada às medidas profiláticas, procurando-se evitar que as pacientes atinjam o estado de osteoporose, com as fraturas subseqüentes.

Uma das mais significativas conseqüências da menopausa, agora largamente reconhecida em todo o mundo, não é o temporário desconforto ocasionado pelas ondas de calor, mas sim o fato de que cerca de uma em cada quatro mulheres, na faixa etária dos 65 anos ou mais (cerca de 15 anos após a ocorrência da menopausa), pode tornar-se física e psicologicamente inválidas em decorrência dos transtornos (fraturas e invalidez) ocasionados pela osteoporose.

Os ginecologistas são tidos, em geral, por suas pacientes como o seu primeiro médico, sendo aquele que lhe dará cuidados primários de saúde além dos cuidados próprios da especialidade. Apresenta assim o perfil ideal para o acompanhamento da mulher no período da pós-menopausa, monitorando a evolução da massa óssea e a eficácia do tratamento preventivo (Fernandes *et al.*, 1996).

Em comparação com a hipertensão arterial, que é tida como "assassino" silencioso, a osteoporose é considerada como um "ladrão" silencioso.

Insidiosamente, durante anos, subtrai do esqueleto suas reservas, tornando-o tão frágil que, não raro, se quebra espontaneamente (Fernandes *et al.*, 1996).

As fraturas, em geral decorrentes de mínimos traumatismos, constituem-se na conseqüência principal da osteoporose. A fratura por esmagamento da vértebra e a fratura de Colles são muito comuns na osteoporose pós-menopáusia, ao passo que o colo do fêmur afeta mulheres em grupo etário mais idoso. O colapso vertebral assintomático não é raro, parecendo que a maioria das fraturas por esmagamento não apresenta sintomas agudos. Fraturas cuneiformes anteriores da coluna dorsal podem ser relativamente assintomáticas. Levam, no entanto, progressivamente à perda da altura e à cifose dorsal (Fernandes *et al.*, 1996).

Por outro lado, um episódio de dor aguda nas zonas compreendidas entre a coluna dorsal média e a coluna dorsal inferior ou lombar superior, em repouso ou durante a atividade diária de rotina, pode ser o primeiro sintoma de osteoporose. O início da dor em geral é brusco e os pacientes, na maioria das vezes, lembram-se do momento exato em que teve início.

Habitualmente, conseguem identificar a vértebra em que a dor começou. A dor aumenta na posição em pé ou sentada, com melhora em repouso no leito na posição de decúbito. Tosse, espirro e esforço para defecar podem ser acompanhados de exacerbação da dor. A dor aguda desaparece em várias semanas, com ou sem terapêutica analgésica. Pode ocorrer hemorragia retroperitoneal no sítio da fratura, levando à distensão abdominal e ilíaca.

O exame físico pode revelar contração dos músculos paravertebrais, que é palpável e freqüentemente visível. A coluna é sensível à pressão e à percussão ao redor da fratura, mas habitualmente não se identifica um ponto doloroso preciso, pois a fratura encontra-se mais na parte anterior do corpo vertebral que na altura dos elementos palpáveis do arco posterior.

A ocorrência da fratura do quadril depende de numerosos fatores, principalmente do grau do trauma e da capacidade de resistência do osso. O aumento da probabilidade de quedas em idosos, associado a distúrbios neurológicos e cardíacos, é um fator de risco independente para todo tipo de fraturas.

Existem complicações a longo prazo em decorrência das fraturas de compressão das vértebras. As mais incômodas devem-se à restrição das

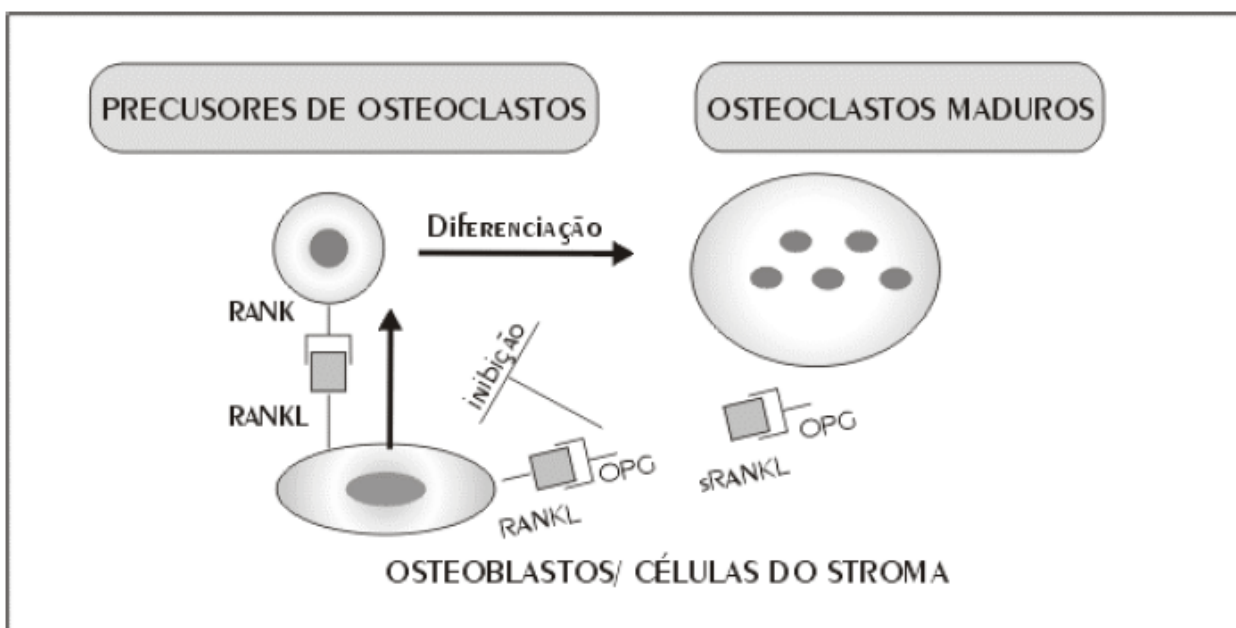
cavidades torácica e abdominal. As pacientes, como resultados das alterações posturais, referem cansaço fácil e intolerância ao esforço. Apresentam alterações dispépticas, com sensação precoce de saciedade e intumescimento pós-prandial, mesmo em pequenas refeições (Fernandes *et al.*, 1996).

### **2.2.1) Aspectos genéticos da osteoporose**

O controle genético da remodelação óssea tem sido alvo de extensa investigação nos últimos anos, e isto é possível através de estudos em doenças genéticas raras, assim como em modelos de camundongos transgênicos. Um grande número de fatores regula a atividade dos osteoblastos e osteoclastos de uma forma complexa, e envolve os hormônios reguladores do metabolismo do cálcio como o PTH, a vitamina D, a calcitonina, os hormônios tiroideanos, os produtos da resposta imune etc (Farias, 2003).

O sistema OPG/RANKL tem sido identificado como um componente importante desta regulação (figura 2). A osteoprotegerina (OPG), um membro da superfamília do receptor do TNF (fator de necrose tumoral), foi identificada no final dos anos noventa. O RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B), que atua como um fator de diferenciação dos osteoclastos, foi descoberto na procura por um ligante natural para a OPG. O RANK (receptor do ativador do fator nuclear Kappa B) é produzido pelas células da linhagem osteoclástica e pelos linfócitos T, e é estimulado por todos os agentes que estimulam a reabsorção óssea, como PTH, 1,25-dihidroxitamina-D, e prostaglandina E. Estas substâncias induzem a expressão do fator de diferenciação dos osteoclastos na superfície das células do estroma da medula óssea, como uma proteína transmembrana, o qual se liga ao RANK na superfície dos precursores dos osteoclastos. Portanto, RANKL ativa seu receptor específico RANK nas células dendríticas e nos osteoclastos, tendo importância fundamental na formação, diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos (Farias, 2003). A OPG foi identificada inicialmente em células intestinais de ratos, sendo necessário a criação de modelos de camundongos transgênicos para que se observasse o seu efeito na remodelação óssea. Os camundongos que expressavam o DNA que codificava a OPG do rato

demonstravam uma densidade óssea muito aumentada, em radiografias, sendo compatível com osteopetrose. Subseqüentemente foi demonstrado que o uso de osteoprotegerina, obtida por tecnologia do DNA recombinante, levava a um bloqueio na osteoclastogênese (*in vivo* e *in vitro*), e conseguia proteger o camundongo da perda óssea pós-ooforectomia (Simonet *et al.*, 1997). Portanto a OPG é produzida por vários tecidos, incluindo os osteoblastos, e funciona como um antagonista do RANKL, regulando a remodelação óssea, ou seja previne a interação do RANKL com seu receptor específico.



**Fig 2 - Genes envolvidos na remodelação óssea (sistema RANKL/ OPG)  
(Farias, 2003)**

#### **2.2.1.1) Gene do IGF-1**

Um dos melhores estudos de genes candidatos continua a ser o de Rotterdam, que apresentou evidências convincentes da associação alélica entre polimorfismos na região promotora do gene IGF-1 e potencial risco de fratura (Rivadeneira *et al.*, 2002). O gene do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) exerce efeitos anabólicos no osso. Pacientes com osteoporose idiopática têm um alto grau de polimorfismo no gene do IGF1, sendo evidenciada a associação de baixos níveis séricos de IGF1 e homozigose para

um alelo específico do microsátelite do gene de IGF1 - 192/192 (Rosen *et al.*, 1998).

#### **2.2.1.2) Gene do Receptor da Vitamina D (VDR)**

Polimorfismos no gene que codifica o receptor de vitamina D (VDR) podem em parte justificar variações genéticas na massa óssea (Cooper *et al.*, 1996 & Sainz *et al.*, 1997). Sainz *et al.*, 1997 estudaram uma população geneticamente homogênea de crianças apontando que polimorfismos no receptor da vitamina D estão relacionados a diferenças significativas (>1 desvio padrão) na densidade óssea vertebral e femural entre genótipos de homozigotos recessivos (aa, bb) e dominantes (AA, BB). Esse estudo sugere que o genótipo pode ser de grande importância na previsão da densidade óssea antes que fatores etários e hormonais afetem a massa óssea (Sainz *et al.*, 1997). Estudos em adultos e crianças sugerem que o efeito da ingestão de cálcio na densidade óssea depende do genótipo do receptor de vitamina D. Assim, a genotipagem do receptor vitamina D pode ser útil na previsão dos reais benefícios da suplementação de cálcio (Dawson-Hughes *et al.*, 1995).

#### **2.2.1.3) Gene do Colágeno Tipo I $\alpha$ 1 (Col I $\alpha$ 1)**

Polimorfismos no gene do colágeno tipo I  $\alpha$ 1 (col I  $\alpha$ 1) estão associados à diminuição da densidade óssea da coluna em crianças pré-puberais com genótipos recessivos homozigóticos e heterozigóticos comparados com o genótipo dominante, dados também encontrados em adultos (Sainz *et al.*, 1999).

#### **2.2.1.4) Gene do Receptor Estrogênico**

A importância do estrogênio para a maturação e a densidade óssea em ambos os sexos sugere que polimorfismos no gene do receptor do hormônio podem influenciar a densidade óssea, e não só os níveis séricos de estradiol. Uma área de restrição (XbaI) do gene do receptor de estrogênio tem sido encontrada em casos de diminuição da densidade óssea em adolescentes do

sexo masculino e mulheres jovens pré-menopausa (Lorentzon *et al.*, 1999 & Mizunuma *et al.*, 1997).

#### **2.2.1.5) Outros Genes**

Mais recentemente, potenciais reguladores da densidade mineral óssea surgiram, como o gene da esclerosteose (SOST) (Uitterlinden *et al.*, 2004) e o promotor do gene da osteoprotegerina (OPG), esta última considerada fundamental para o controle do processo de remodelação óssea (Langdahl *et al.*, 2002).

#### **2.2.1.6) Eixo GH/IGF1**

O hormônio de crescimento (GH) é o principal regulador fisiológico da produção hepática de IGF1. Indivíduos deficientes de GH possuem baixos níveis de IGF1 sérico e menor massa óssea que os normais (Holmes *et al.*, 1994), e o declínio de IGF1 sérico parece estar associado à redução de massa óssea no envelhecimento (Rosen & Pollak, 1999). Esses trabalhos apontam para um importante papel do IGF1 circulante na aquisição do pico de massa óssea e na homeostase esquelética do indivíduo adulto.

Existe relação entre IGF1 sérico e o conteúdo esquelético de IGF1, ou seja, a quantidade de IGF1 no microambiente ósseo depende da produção local de IGF1 pelos osteoblastos corticais e trabeculares e também do IGF1 circulante. De fato, o maior reservatório de IGFs no organismo não é o fígado, mas sim o osso (especialmente IGF1 e IGF2) (Lopes & Farias, 2006).

Anormalidades na formação óssea em várias formas de osteopenia resultam do menor recrutamento ou de apoptose precoce das células osteoblásticas. Estas anormalidades estão associadas com alterações na expressão ou produção de vários fatores de crescimento, inclusive IGFs, que modulam a proliferação e a atividade das células de formação óssea (Canalis, 1996). Estudos *in vitro* demonstram a rápida apoptose dos osteoblastos na ausência de insulina e fatores de crescimento, inclusive os IGFs, além do envolvimento do receptor de IGF tipo1 nesta resposta. Sugerem ainda que a sobrevivência dos osteoblastos é promovida por fatores de crescimento

seqüestrados na matriz óssea, tendo o IGF1 liberado na matriz óssea papel de recrutar novos osteoblastos para a superfície de remodelação (Hill & Meikle, 1997).

O perfeito acoplamento dos processos de formação - reabsorção é necessário para a manutenção de um esqueleto saudável. O IGF1 também parece interferir indiretamente nesse processo mediante seus efeitos, comprovados *in vitro* e *in vivo*, regulando a osteoprotegerina (Rubin *et al.*, 2002). A osteoprotegerina é um peptídeo solúvel secretado pelas células pré-osteoblásticas, cuja função é ligar-se a um peptídeo de superfície no osteoblasto (RANKL), assim inibindo o contato do RANKL com o seu verdadeiro receptor no osteoclasto (RANK), inibindo o processo de ativação do osteoclasto e a subsequente reabsorção óssea. Assim, o sistema RANKL/OPG/RANK está envolvido na dinâmica da remodelação óssea e constitui uma via crítica no esquema de interação osteoblasto - osteoclasto, com significativa relevância em terapêuticas futuras (Lopes & Farias, 2006).

### **2.2.2) Indução de osteoporose por glicocorticóides**

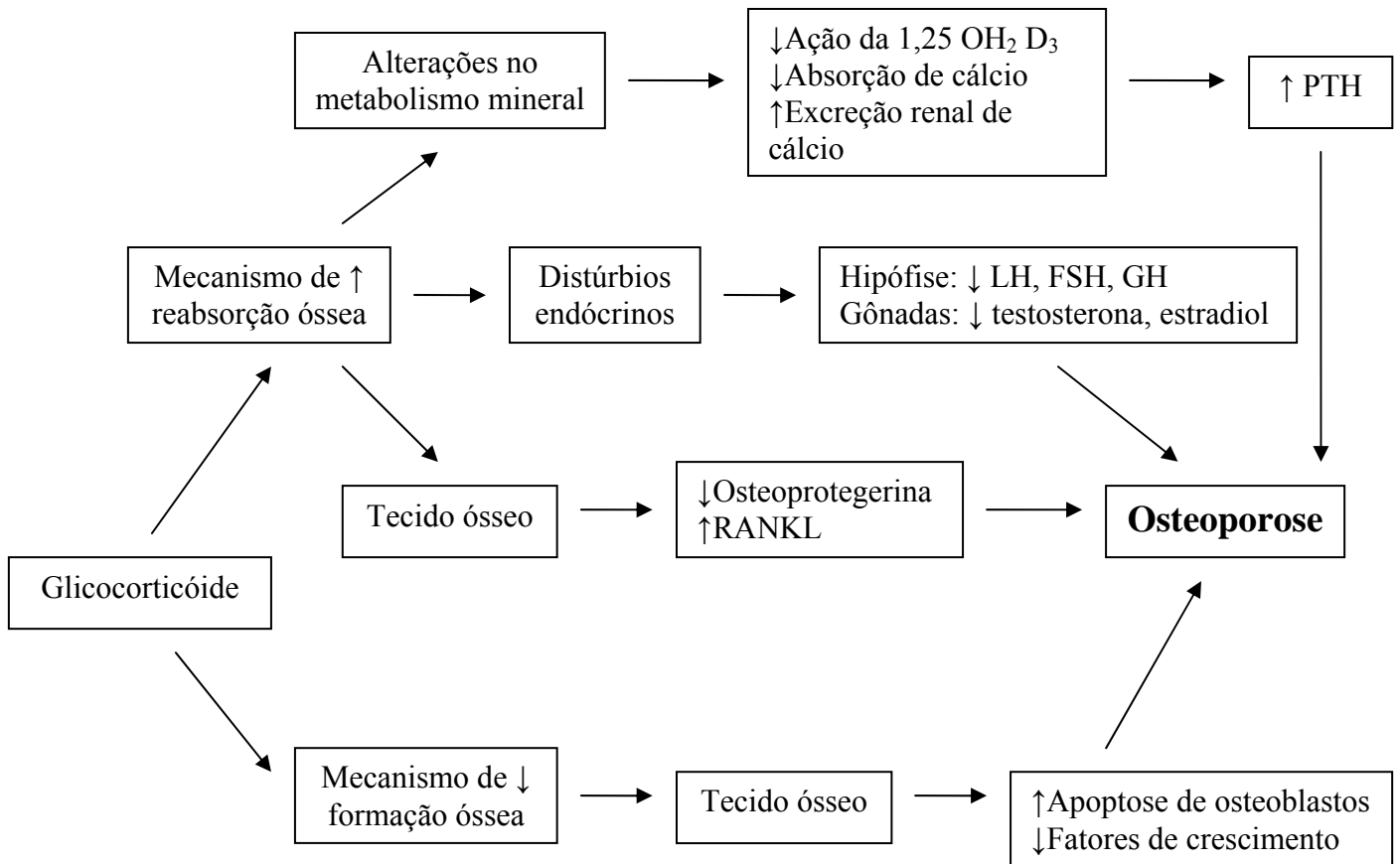
Segundo Brandli *et al.* (1991), a indução da osteoporose pelos glicocorticóides resulta da supressão da atividade de formação óssea dos osteoblastos, combinado com o aumento da atividade de reabsorção óssea pelos osteoclastos. Enquanto o efeito sobre a atividade osteoblástica parece ser direto (Dietrich *et al.*, 1979), seus efeitos sobre a atividade osteoclástica são resultantes da diminuição da absorção de cálcio intestinal, concomitantes com aumento da excreção urinária de cálcio, ambos como causas secundárias do hiperparatireoidismo (Suzuki *et al.*, 1983).

Os glicocorticóides interagem com o metabolismo ósseo em muitos níveis, mas sua ação principal deve ser reduzir o número de osteoblastos e a síntese da matriz óssea. Virtualmente todos os pacientes que recebem glicocorticóides nas doses acima de 5 mg por dia perdem osso, sendo a quantidade perdida dependente da dose cumulativa de esteróide. O risco da fratura é relacionado também à densidade inicial do osso do indivíduo, que por sua vez está relacionada com raça, sexo, idade, estado menopausal, peso corpóreo, fumo e

a presença de alguma doença de base. A medida da densidade óssea e o histórico pessoal de fraturas são os melhores preditores do risco futuro de osteoporose (Reid, 2000). A perda óssea induzida por glicocorticóides é reversível, assim que a droga for retirada ou a dose minimizada, não importando por quanto tempo tenha sido feito o tratamento do indivíduo. Aumentar a entrada do cálcio a 1,5g por o dia, incentivando os pacientes a parar de fumar e fazer mais exercício, e tratar toda deficiência de vitamina D são medidas aplicadas a todos os pacientes. Naqueles com risco elevado, os bifosfonatos são o tipo de intervenção mais recomendado, embora a reposição hormonal seja também efetiva e possa ser usada sozinha ou concomitante aos bifosfonatos.

Desde a introdução dos glicocorticóides na prática clínica seu uso difundido atesta sua invariável eficácia em um grande número de doenças principais, incluindo a doença respiratória obstrutiva e condições inflamatórias tais como artrite reumatóide e artrite temporal. Continuam também a ter um papel principal no transplante de órgãos. Sua eficácia terapêutica é contrabalançada por um grande número de efeitos adversos que esta droga produz, sendo um destes o desenvolvimento da osteoporose (Reid, 2000).

O estudo do tratamento da osteoporose ocasionada por terapia com glicocorticóides tem sido especialmente motivado, pois os mesmos, não raramente, são insubstituíveis para o tratamento médico de muitas e variadas enfermidades devido a seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores (Polo, 2003). Por causa da distribuição difundida dos receptores de glicocorticóide, estes agentes podem impactar no metabolismo ósseo e do cálcio em muitos níveis (Reid, 1997).



**Fig 3 - Aspecto multifatorial da fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide (Lanna *et al.*, 2003).**

### 2.2.2.1) Efeitos sobre osteoblastos

Os glicocorticóides modulam a expressão de genes nas células dos precursores de osteoblastos para produzir mais um fenótipo de osteoblasto diferenciado (Milne & Baran, 1998). Em osteoblastos maduros, entretanto, inibem a proliferação celular e a síntese da matriz, e este é o efeito predominante observado “in vivo” desde que é favorecido por concentrações elevadas de hormônio e por longos períodos de exposição. Este efeito é provavelmente também o resultado do regulamento direto de genes pelos glicocorticóides incluindo aqueles para colágeno tipo I, osteocalcina e fatores de crescimento ligados à insulina e sua ligação com proteínas (Canalis, 1998). Parece também que os glicocorticóides apressam a apoptose de ambos os osteoblastos e osteócitos, contribuindo assim, para a redução da formação

óssea (Gohel *et al.*, 1999). Estes efeitos são observados em animais e em estudos histomorfométricos humanos, em que a taxa da produção óssea dentro de cada unidade osso-modeladora e a duração da atividade de cada unidade são reduzidas. As avaliações de marcadores bioquímicos da formação óssea mostram consistentemente a evidência da formação reduzida do osso (Tabela 1).

**Tabela 1 - Estudos prospectivos de efeitos dos glicocorticóides em marcadores bioquímicos de remodelação óssea (Reid, 2000).**

<b>Estudos de referência</b>						
	Prummel <i>et al</i>	Morrison <i>et al</i>	Cosman <i>et al</i>	Lems <i>et al</i>	Lane <i>et al</i>	Wolthers <i>et al</i>
Doença subjacente	EGO	COAD	MS	RA	Asma	S/ doença
Duração do tratamento	12 semanas	4 semanas	5 semanas	8 dias	5 dias	3 dias
Droga	Pred	Pred	Pred	Dexa	Pred	Pred
Dose diária	40 mg	20mg	1g-5 mg	75 mg	40 mg	40 mg
<b>Marcadores de formação</b>						
Osteocalcina	↓	→	↓↓	↓	↓	
ALP total	↓	↓		→	↓	
ALP óssea	↓ NS				→	
<b>Marcadores de reabsorção</b>						
Pirrolidona			→	↓		→
Deoxipirrolidona				↓	→	→
Hidroxirolina	→	↑	→	→		
TRAP			↑		→	
Cálcio urinário	↑		↑	→		

EGO- oftalmopatia; COAD-doença obstrutiva crônica; MS- esclerose múltipla; RA- artrite reumatóide; Pred- metilprednisolona; Dexa- dexametosona; NS- não significativa; ALP- fosfatase alcalina, TRAP- fosfatase ácida tartarato resistente.

### 2.2.2.2) Efeitos sobre osteoclastos

Os dados dos efeitos dos glicocorticóides em osteoclastos são contraditórios. Há uma evidência de que os glicocorticóides aumentam a formação dos osteoclastos através da formação de precursores na medula óssea, possivelmente em consequência da produção reduzida de osteoprotegerina pelos osteoblastos e da produção aumentada de RANKL (Hofbauer, 1999). Entretanto, os glicocorticóides também aumentam a

apoptose de osteoclastos maduros. Estes efeitos contrários podem esclarecer os achados em cultura de órgãos que os glicocorticóides podem aumentar ou diminuir a reabsorção óssea, dependendo da condição da cultura (Lowe, 1992). Na cultura de órgãos, os efeitos dos glicocorticóides podem ser contribuídos pela inibição da produção de citocinas osteolíticas locais tais como interleucinas-1 e 6, do fator de necrose tumoral e na estimulação da produção do fator de colônias de macrófagos induzido por osteoblastos.

Estudos com animais e humanos são também difíceis de interpretar, mostrando um aumento na superfície desgastada do osso, mas uma diminuição no número dos osteoclastos. Estes achados poderiam ser explicados por uma taxa reduzida do recrutamento dos osteoblastos aos locais em que o osso foi reabsorvido, deixando superfícies corroídas por tempo maior do que o normal. Assim, não há provavelmente uma taxa aumentada de reabsorção óssea, e a maioria dos estudos humanos de marcadores bioquímicos de reabsorção óssea seriam consistentes com esta conclusão (Tabela 1) (Reid, 2000).

Uma inibição da absorção do cálcio associada ao tratamento com glicocorticóides, vem sendo mostrada em vários estudos. Isto não é mediado por mudanças em metabólitos da vitamina D e deve provavelmente representar um efeito direto no sistema de transporte do cálcio no intestino. Dentro das semanas de tratamento com glicocorticóides, há uma ascensão substancial na excreção do cálcio urinário, que parece ser causado por uma inibição direta da reabsorção tubular do cálcio. Há também uma evidência da má absorção do fosfato no intestino e no túbulo renal associada com o uso de glicocorticóide (Reid, 2000).

Efeitos na densidade mineral do osso - algumas horas após a administração de glicocorticóides, há uma queda no nível circulante de osteocalcina, uma proteína da matriz óssea produzida por osteoblastos. Esta mudança na atividade do osteoblasto é seguida por uma perda da massa óssea que é máxima nos primeiros meses da terapia. A perda óssea induzida por glicocorticóides é substancialmente reversível seguindo a retirada destas drogas. Dois estudos em perspectiva demonstraram uma reacumulação do excesso da densidade mineral óssea aproximadamente ao mesmo tempo em que ocorreram as perdas (Rizzato & Montemurro, 1993).

Os efeitos deletérios dos glicocorticóides sobre o tecido ósseo foram descritos há mais de meio século atrás por Harvey Cushing. Atualmente, o problema atinge uma dimensão maior pelo diagnóstico de osteoporose ser mais freqüente e pelo uso amplo, muitas vezes indiscriminado, dos análogos dos glicocorticóides para o controle de diversas doenças. Isso levou ao aparecimento marcante das fraturas, principalmente no esqueleto axial (Eastell *et al.*, 1998). Todas as pessoas são susceptíveis à perda óssea induzida por glicocorticóides; no entanto, crianças e mulheres na pós-menopausa são particularmente sensíveis. A causa das fraturas induzidas por glicocorticóides, assim como em outras formas de osteoporose, é a diminuição da massa óssea. Com o uso dos glicocorticóides esta perda óssea é bifásica, existindo uma fase de perda rápida nos primeiros meses de até 12% seguida de uma perda posterior mais lenta de 2 a 5% ao ano (Lukert *et al.*, 1996; Canalis *et al.* 1996).

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, principalmente devido à formação óssea reduzida, já que o aumento na reabsorção óssea parece estar menos envolvido (Patschan, Loddenkemper, Buttgereit, 2001). Também exercem múltiplos efeitos sistêmicos e locais, que podem levar a uma rápida perda óssea. Os efeitos diretos estão relacionados à ação desta drogas sobre as células ósseas e suas funções. Os indiretos se devem à ação dos glicocorticóides sobre o metabolismo do cálcio e vitamina D, secreção dos hormônios sexuais e efeito sobre a produção de prostaglandinas, citocinas e fatores de crescimento (Hahn *et al.*, 1995; Rackoff *et al.* 1998).

É fundamental ter uma atitude positiva e agressiva em relação à prevenção e tratamento da osteoporose induzida por glicocorticóides. Devido à perda óssea ser assintomática, o diagnóstico só é feito após uma fratura atamática. Pacientes usando glicocorticóides por dois meses ou mais são considerados em risco. Existem algumas drogas disponíveis comercialmente que podem ser usadas para o tratamento da osteoporose induzida por glicocorticóides como os agentes inibidores da reabsorção óssea (calcitonina,

bifosfonatos, fluoreto de sódio) e outras que se encontram em fase experimental (Borba & Lazaretti-Castro, 1999).

### **2.2.3) Epidemiologia da Osteoporose**

A osteoporose constitui-se nos dias atuais em importante problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, por exemplo, afeta mais de 25 milhões de pessoas, predispõe a mais de 1,3 milhão de fraturas ao ano, incluindo mais de 500.000 fraturas vertebrais, 250.000 fraturas de quadril e 240.000 fraturas de punho com custo estimado de 10 bilhões de dólares (CDC, 1993). As fraturas de vértebras, antebraço distal e fêmur proximal dos indivíduos idosos, especialmente se relacionadas a traumatismos leves, têm sido atribuídas tradicionalmente à osteoporose. Sem dúvida, estudos recentes têm revelado que mesmo fraturas do úmero proximal e a maioria das fraturas pélvicas devem definitivamente ser incluídas nessa categoria (Riggs, 1987).

As fraturas osteoporóticas mais comuns são as fraturas vertebrais. Estudos levando em conta as deformidades compressivas da coluna vertebral, independente da severidade, estimam que um terço das mulheres acima de 65 anos de idade tem uma ou mais fraturas vertebrais (Gallagher, 1980). Dado que a maioria delas é assintomática quando ocorre, torna-se difícil precisar sua real incidência. Os dados de prevalência de tais fraturas são também imprecisos, mas alguns comentários de ordem geral podem ser feitos. A relação mulher/homem é cerca de 7/1 para as fraturas vertebrais em contraste com a relação 2/1 encontrada entre as fraturas do quadril (Poggrund, 1977 & Heyse, 1990). Ocorre aumento dramático e contínuo dessas fraturas após os 65 anos de idade.

Cerca de 85% das fraturas de quadril ocorrem entre as mulheres. A incidência aumenta exponencialmente com a idade, indo de 9/100.000 entre as idades de 35 e 44 anos para 3.317/100.000 mulheres/ano em pacientes com 85 anos ou mais (Melton, 1983).

No Brasil a incidência da osteoporose não é clara. Algumas tentativas são feitas visando estimá-la, tendo como base a extrapolação da incidência suposta de osteoporose sobre dados dos censos populacionais fornecidos pelo IBGE.

Tendo em vista que essa enfermidade tem sua epidemiologia ligada à evolução da pirâmide populacional, essas estimativas para o futuro em nosso país oferecem perspectivas muito preocupantes. Os dados do IBGE de 1994 revelam uma população brasileira de 150 milhões de pessoas, dos quais aproximadamente 10% a 12% são de idosos (acima dos 60 anos de idade). Com base nesses dados estima-se uma população de osteoporóticos ao redor de 2,5 milhões de indivíduos. As fraturas do quadril (5% da população acima dos 65-70 anos) estariam próximas de 105 mil casos anuais, com um custo estimado ao ano de 630 milhões de reais. A falta de programas definidos de prevenção de osteoporose projeta o número de indivíduos osteoporóticos para o ano 2000 em 4,3 milhões, com prováveis 215 mil fraturas de colo de fêmur ao ano (Osteoporosis 1995).

Fica clara a importância do adequado conhecimento da incidência, fisiopatologia, diagnóstico e fundamentalmente da prevenção da osteoporose, que já nos dias atuais constitui-se em importante problema de saúde pública também em nosso país (Fernandes *et al.*, 1996).

As repercussões sobre a saúde pública das fraturas relacionadas à osteoporose podem ser dimensionadas em termos de morbidade e mortalidade. As fraturas do fêmur proximal são de longe as mais graves. Associam-se a uma diminuição da expectativa de vida de 12% ou mais (Melton, 1989). O aumento de mortalidade produz-se principalmente nos primeiros três ou quatro meses que seguem a fratura do fêmur proximal. São responsáveis nos Estados Unidos por grande parte das mortes acidentais em mulheres e homens com mais de 75 anos (Melton, 1989).

Outras fraturas raramente são causa de morte, a menos que o paciente tenha outras lesões associadas. As pacientes que sobrevivem a uma fratura do fêmur proximal em geral não conseguem bons resultados nos programas de reabilitação, convivendo, não raro, com seqüelas importantes. Metade das pacientes que antes da fratura andavam normalmente não conseguem fazê-lo posteriormente, a despeito dos esquemas de fisioterapia reabilitadora empregados, comprometendo seriamente a qualidade de vida que se segue. Passam, a partir de então, a necessitar de auxílio para os cuidados pessoais e mesmo para a higiene íntima. A mortalidade em decorrência das fraturas vertebrais é bastante baixa se comparada com a observada após as fraturas do

quadril. Por outro lado, a morbidade crônica, que se arrasta por muitos anos em grande número de mulheres acometidas, compromete seriamente sua qualidade de vida, tornando sua prevenção de extrema importância (Fernandes *et al.*, 1996).

#### **2.2.4) Diagnóstico da Osteoporose:**

##### **2.2.4.1) Diagnóstico por imagem**

Radiografias simples têm baixa sensibilidade diagnóstica só detectando alterações quando a perda óssea excede 30% também não são úteis para acompanhar a evolução e os efeitos do tratamento. Podem levar à suspeita de hiperparatiroidismo e outras doenças que comprometam o osso e acarretam a osteoporose, mas sua maior utilidade é a detecção de fraturas. Especialmente a radiografia simples da coluna tóraco-lombar permite observar osteófitos, calcificações da aorta abdominal, colapsos vertebrais (que falsamente elevam o valor da densidade mineral óssea à densitometria óssea), ainda estabelecendo o grau de deformidade dos corpos vertebrais e de toda a coluna, que leva ao desequilíbrio postural e à dor.

A densitometria óssea utilizando dupla fonte de RX é o método mais usado para quantificar a massa óssea. Mede-se a quantidade de mineral ósseo (gramas de cálcio por  $\text{cm}^2$ ) em áreas mais propensas a fraturas osteoporóticas: coluna lombar e fêmur proximal (colo, trocânter e fêmur total). O diagnóstico de osteopenia/osteoporose à densitometria é baseado em critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), mediante a comparação da densidade óssea do paciente com os valores do pico de massa óssea para o mesmo sexo (T-escore). Assim, considera-se haver osteopenia quando o T-escore fica entre  $< -1$  até  $-2,5$  desvios e osteoporose quando o T-escore é  $\leq -2,5$  desvios abaixo dos valores médios obtidos em jovens. Estes valores são válidos para homens e mulheres. Para cada desvio negativo, considera-se que o risco de fraturas dobre. Além disso, considera-se osteoporose grave uma densidade menor que  $-2,5$  DP associada à fratura (Kanis, 2003). A densidade óssea também é

comparada com os valores esperados para população do mesmo sexo, idade, índice de massa corpórea ou etnia (Z-escore).

#### **2.2.4.2) Diagnóstico Laboratorial**

Muitos pacientes com osteoporose idiopática não apresentam aumento nos marcadores bioquímicos de reabsorção, mas apenas menor capacidade de formação óssea, por vezes associada à hipercalcúria (Zerwekh *et al.*, 1992).

#### **2.2.4.3) Diagnóstico por Histomorfometria Óssea**

Histomorfometrias ósseas de pacientes com osteoporose idiopática apresentam alteração da formação óssea (Zerwekh *et al.*, 1992 & Reed *et al.*, 1995). Foi observado correlação significativa entre o IGF1 sérico e superfície osteoblástica, superfície de mineralização e taxa de formação óssea. Outros autores confirmaram a associação positiva entre o IGF1 medido na matriz óssea e parâmetros histomorfométricos de formação e reabsorção óssea, assim como o volume ósseo (Ljunghal *et al.*, 1992).

O IGF1 liberado pela matriz óssea durante a reabsorção parece participar do acoplamento na formação óssea, e uma diminuição dos níveis de IGF1 intra-ósseo pode resultar num desequilíbrio da remodelação e contribuir para a perda óssea gradual que ocorre principalmente com o envelhecimento (Khosla, 1997).

#### **2.2.5) Fatores de risco**

Existem grandes lacunas nos dados epidemiológicos internacionais sobre a prevalência de osteoporose e identificação prospectiva sobre os riscos de fratura. No entanto, mesmo sem um sistema de vigilância efetivo, pode-se inferir que a modificação da pirâmide etária conferirá importância ainda maior à osteoporose em um futuro próximo. Indiscutivelmente, no desfecho da osteoporose, a idade é de longe o mais importante determinante de massa óssea. A diminuição da densidade óssea com a idade reflete o efeito somatório

de vários processos, os quais ocorrem universalmente, porém, em proporções diferentes de acordo com variações individuais (Marques Neto & Lederman, 1995).

Os fatores tradicionais de risco para a osteoporose incluem mulheres em geral de raça branca, com história familiar, de baixa estatura e magras (estrutura óssea frágil e delicada). O risco aumenta bastante se elas têm menopausa prematura ou cirúrgica e não são submetidas à terapêutica de reposição hormonal. Esses fatores podem ser referidos como iniciadores e inevitáveis. Existem outros, no entanto, que podem acelerar a perda óssea, sendo passíveis de controle para cada indivíduo que os apresente. Entre esses estão os fatores nutricionais, a inatividade física, os hábitos de vida e vícios. Algumas afecções médicas e o uso de determinadas medicações podem estar associados à perda de massa óssea (Fernandes *et al.*, 1996).

Os fitatos representam compostos formados durante o processo de maturação de sementes e grãos de cereais integrais e feijões, podendo se complexar com minerais como o cálcio, o ferro, o zinco e com as proteínas. Em virtude da presença de fitato, o balanço de cálcio tem sido alterado por dietas ricas em fibras (Haack *et al.*, 1998).

Quanto à cafeína, encontrada nas bebidas como café, chás, chocolate e bebidas gasosas cafeinadas, são contraditórios os dados epidemiológicos sobre a relação entre seu consumo e a formação de massa óssea. Segundo Harris & Dawson-Hughes (1994), uma ingestão ótima de cálcio por mulheres na pós-menopausa poderia proteger contra os efeitos danosos da cafeína no osso. Por outro lado, de acordo com Weaver *et al.* (1999), um copo de 240mL de café reduz, em média, a retenção de cálcio em 2-3 mg, o que não conduziria ao comprometimento da massa óssea.

Conlisk *et al.*, 2000 relata pesquisas que defendem a hipótese de que o consumo da cafeína pode afetar resultados de DMO através do aumento da excreção de cálcio (Massey, 1989). Alguns, mas não todos os estudos epidemiológicos com mulheres na pós-menopausa, sugerem que o alto consumo de cafeína está associado com uma saúde óssea deficiente. Alguns autores sugerem que este efeito negativo seria limitado às mulheres na pós-menopausa que consomem baixos níveis de cálcio (Harris, 1994). Porém estudos com mulheres na pré-menopausa também encontraram associação

entre o consumo de cafeína e diminuição na densidade mineral óssea (Rubin, 1999). Entretanto, entre os estudos de mulheres na pré-menopausa, não foram esclarecidos potenciais covariantes tais como o consumo de cálcio na dieta e o peso corporal (Packard & Recker, 1996), e somente um examinou o efeito da cafeína em DMO nas mulheres que consumiram níveis baixos do cálcio.

Além destes, vários outros fatores de risco para osteoporose e fraturas osteoporóticas, vêm sendo relatados, incluindo idade avançada, sexo feminino, etnias caucasianas e asiáticas, história familiar de fraturas, baixa ingestão de cálcio ou vitamina D, ingestão excessiva de álcool, baixo índice de massa corpórea, fumo, alta ingestão de cafeína, sedentarismo ou imobilização, amenorréia primária ou secundária, hiperparatireoidismo, hipercortisolismo, hipogonadismo (em homens), uso de corticosteróides, anticonvulsivantes, tiroxina ou heparina, síndromes de mal-absorção e anorexia nervosa (Lenchik & Sartoris, 1997).

Outras influências endócrinas podem incluir insulina, glicocorticóides, hormônio tireóideo e diuréticos. As influências genéticas também podem explicar as diferenças raciais encontradas, como a maior incidência entre caucasianos e orientais comparados à raça negra, que parece ter alguma proteção em relação à osteoporose (Cohn, 1977).

O tabagismo é um hábito ainda relativamente freqüente entre as mulheres. A nicotina, além de prejudicar a vitalidade de outros órgãos, atua também nocivamente no metabolismo ósseo: transforma o estradiol em 2-metoxiestrona, metabólito inativo, que bloqueia os receptores de estrogênio; atua sobre os ovários promovendo atresia folicular; age também de forma deletéria sobre as células ósseas.

O uso de corticosteróides por sua vez compromete de forma relevante a massa óssea. Esta ocorre habitualmente com o uso prolongado, podendo-se observar perda de 4% a 10% no fim do primeiro ano de uso (Parfitt, 1984), em especial no osso trabecular da coluna e colo do fêmur.

Alguns mecanismos são descritos: inibição da formação óssea, por redução da osteocalcina; redução da absorção intestinal do cálcio por bloqueio da vitamina D; aumento da atividade osteoclástica.

No hiperparatireoidismo observa-se intensa atividade osteoclástica com presença de hipercalcemia e perda óssea. Igualmente no hipertireoidismo

ocorre perda acelerada da massa óssea, devido também ao estímulo acentuado da reabsorção. Tomados em conjunto os fatores genético e hormonal, pode-se dizer que a massa óssea é geneticamente determinada e após a menopausa controlada por meio de hormônios. Doenças intercorrentes que causem incapacidade temporária ou definitiva (por exemplo, artrite reumatóide) e o uso prolongado de certas medicações, em especial os glicocorticóides, podem acarretar considerável prejuízo à massa óssea. Igualmente, a ingestão de álcool e o tabagismo também diminuem a massa óssea (Stevenson *et al.*, 1989).

A obesidade em contrapartida oferece um efeito protetor à osteoporose. Especula-se aqui, além de níveis estrogênicos mais elevados entre as obesas, a influência genética e a ação do próprio peso em fortalecer o esqueleto (Siiteri, 1975).

## **2.2.6) Prevenção e tratamento da osteoporose**

### **2.2.6.1) Prevenção**

Como medida de prevenção e tratamento da osteoporose, uma alimentação balanceada (Carvalho *et al.*, 2002), práticas regulares de exercícios físicos (Tenório *et al.*, 2005) aliados à terapia de reposição hormonal (Notelovitz *et al.*, 1991; Henderson & Harris, 1991) vêm sendo preconizado.

Neste contexto, a utilização de exercícios resistidos tem demonstrado importante relevância na manutenção da massa óssea, por promover estímulo mecânico que leva à osteogênese, reduzindo a incidência de osteoporose (Santarem, 2001).

Estudos avaliando a densidade óssea em mulheres com idade entre 20 e 50 anos indicaram que se atinge o pico de massa óssea adulta ao final ou logo após se atingir o crescimento linear do esqueleto (Stevenson *et al.*, 1989).

Infelizmente, o pico de massa óssea adulta não pode ser influenciado de maneira significativa por dieta ou exercícios em virtude de ser, em larga escala, geneticamente determinado (Fernandes *et al.*, 1996).

Algumas medidas profiláticas podem ser tomadas a partir do início da vida adulta. É importante estar atento aos fatores de risco. Destes os mais importantes são o fumo, o álcool e o café. A estratégia racional para a conservação da massa óssea durante os anos climatéricos volta-se naturalmente para a fisiopatologia da perda óssea observada nesse período. Existe suporte para o emprego da terapêutica de reposição com estrogênios que com esta indicação tem sido largamente empregada em todo o mundo. Quando mulheres sob carência estrogênica recebem a reposição desse hormônio, observa-se reversão de muitos dos efeitos da perda da função ovariana. As alterações bioquímicas na homeostase mineral, principalmente aumento do cálcio, fósforo e fosfatase alcalina sérica, além de cálcio e hidroxiprolina urinários, são revertidas (Lindsay *et al.*, 1976). Não é surpresa, portanto, que estudos bem controlados demonstrem que os estrogênios previnem a perda óssea da mulher na pós-menopausa (Lindsay *et al.*, 1976 & Lindsay *et al.*, 1980).

Estudos demonstram que mulheres ooforectomizadas não-tratadas perdem massa óssea quando comparadas a grupo sob reposição estrogênica e que a reposição desses hormônios por longo tempo (> 10 anos) reduz significativamente essa taxa de perda óssea (Lindsay *et al.*, 1976). A prevenção foi evidente quando os hormônios foram introduzidos nos dois primeiros anos após a ooforectomia e mesmo quando tardiamente introduzida (após 6 anos), conservando a massa óssea nos patamares então existentes. O mesmo estudo (Lindsay *et al.*, 1976) demonstra que os benefícios são tão maiores quanto mais cedo é instituído o tratamento. Recomenda-se portanto a instituição da TRH assim que se confirme o declínio da função ovariana. Tem-se comprovado a redução na incidência das fraturas de punho e do quadril da ordem de 50%, enquanto a redução das deformidades vertebrais alcança 90% (CDC, 1991).

#### **2.2.6.2) Tratamento**

O tratamento médico da osteoporose estabelecida permanece controverso e insatisfatório. Procura-se em primeira instância proteger o patrimônio ósseo

residual e se possível aumentar a sua massa óssea, visando melhorar a qualidade e resistência óssea e minimizar dessa forma o risco de novas fraturas, que é elevado nessas circunstâncias. Ao lado da preservação da massa óssea, deve-se ter em mente os programas de fisioterapia reabilitadora, visando à melhoria da qualidade de vida no período pós-fratura.

Os fármacos que atuam no osso são tradicionalmente classificados como agentes anti-reabsortivos ou agentes estimulantes da formação óssea. Os agentes anti-reabsortivos compreendem o cálcio, estrogênios/progestogênios, calcitonina, bifosfonatos e vitamina D (secundário à absorção de cálcio).

Os agentes estimulantes da formação óssea compreendem o fluoreto de sódio, esteróides anabólicos, PTH, possivelmente 1-25 colecalciferol (hormônio da vitamina D) e exercícios físicos (Fernandes *et al.*, 1996).

Os estrogênios e progestogênios, à semelhança do observado na prevenção, também parecem constituir-se em boa alternativa terapêutica na osteoporose estabelecida, apresentando resultados positivos na coluna lombar e mesmo no fêmur (Civitelli *et al.*, 1998).

Os antiinflamatórios não-esteroidais podem ser empregados, visto que, além do efeito analgésico, atuam reduzindo as prostaglandinas com redução da reabsorção óssea e diminuindo a excreção renal de cálcio.

Com o desenvolvimento das técnicas de medição da massa óssea, pode-se observar que os agentes que atuam na remodelação óssea não agem de maneira uniforme em todos os sítios ósseos. Está agora bem-estabelecido, que um determinado agente pode promover ganho em um sítio ósseo a expensas de perda em outro.

A restauração de um esqueleto osteoporótico é difícil. Devem ser eliminados os fatores que podem agravar a perda óssea e aumentar o risco de fraturas.

A decisão sobre o tratamento deve levar em conta o arsenal medicamentoso existente e as condições de cada paciente, sendo que a decisão deve ser tomada em conjunto pelo médico e paciente.

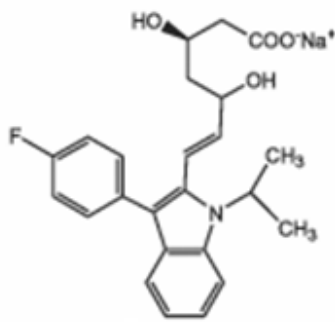
Assim, é recomendável que se tenha um bom conhecimento sobre o mecanismo e o sítio ósseo de ação preferencial de cada um desses agentes, para que se possa indicá-los com razoável segurança e adequado monitoramento.

A terapêutica de reposição hormonal tem lugar na prevenção e no tratamento da osteoporose estabelecida. Além de conservar a massa óssea residual, melhora a capacidade cognitiva e a coordenação motora, contribuindo adicionalmente para reduzir a possibilidade de quedas, que é dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento das fraturas osteoporóticas (Fernandes *et al.*, 1996).

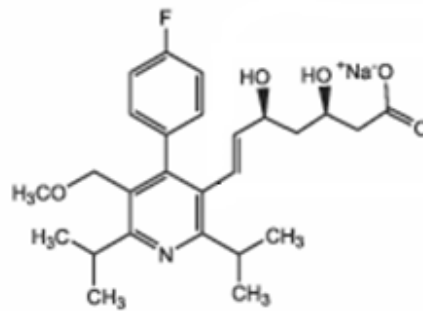
#### **2.2.6.2.1) As estatinas e o metabolismo ósseo**

As estatinas, inibidoras da enzima 3 - hidróxi – 3 metil – glutaril –coenzima A (HMG-CoA) redutase, são utilizadas na redução dos níveis de colesterol no sangue e na prevenção de doenças cardiovasculares. As estatinas mais usadas na prática clínica, como a mevastatina, pravastatina e sinvastatina, resultam do metabolismo de cepas de fungos, *Aspergillus terreus*, e agem como drogas inibidoras específicas, reversíveis e competitivas da HMG-CoA redutase (Vogel G, 1999).

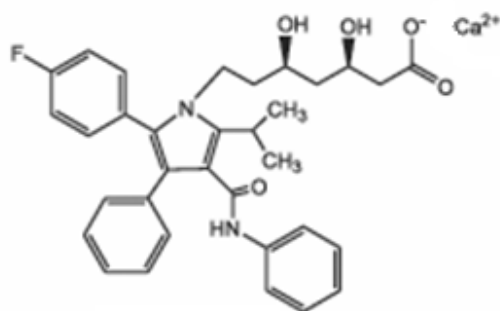
## Sintéticos



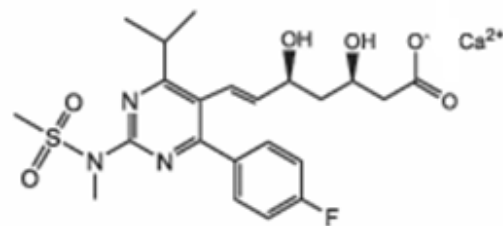
Fluvastatina



Cerivastatina (retirada do mercado em 2001)

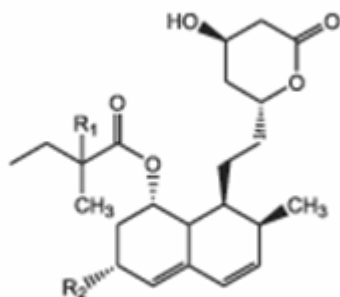


Atorvastatina

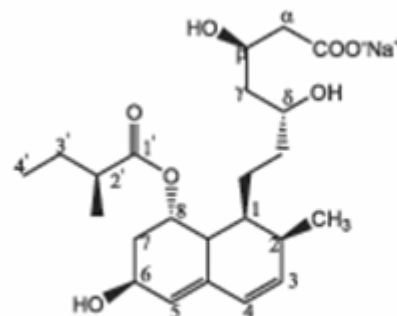


Rosuvastatina

## Naturais



Mevastatina R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H  
Lovastatina R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>  
Simvastatina R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>



Pravastatina

**Fig 4 - Estrutura química das estatinas inibidoras da enzima HMG-COA redutase (Campo & Carvalho, 2007)**

As estatinas exercem muitos efeitos independentes da diminuição do colesterol sérico, conhecidos como pleiotrópicos (Liao, 2005). Estes efeitos incluem ação reguladora na função endotelial, aumento da estabilidade de

placas ateroscleróticas, diminuição do estresse oxidativo e inflamação, e diminuição da resposta trombogênica. Além destes, as estatinas possuem efeitos extra-hepáticos benéficos no sistema imune, sistema nervoso central e ósseo. Muitos destes efeitos pleiotrópicos são mediados pela inibição de isoprenóides, os quais servem como ligantes lipídicos para moléculas envolvidas em processos de sinalização celular.

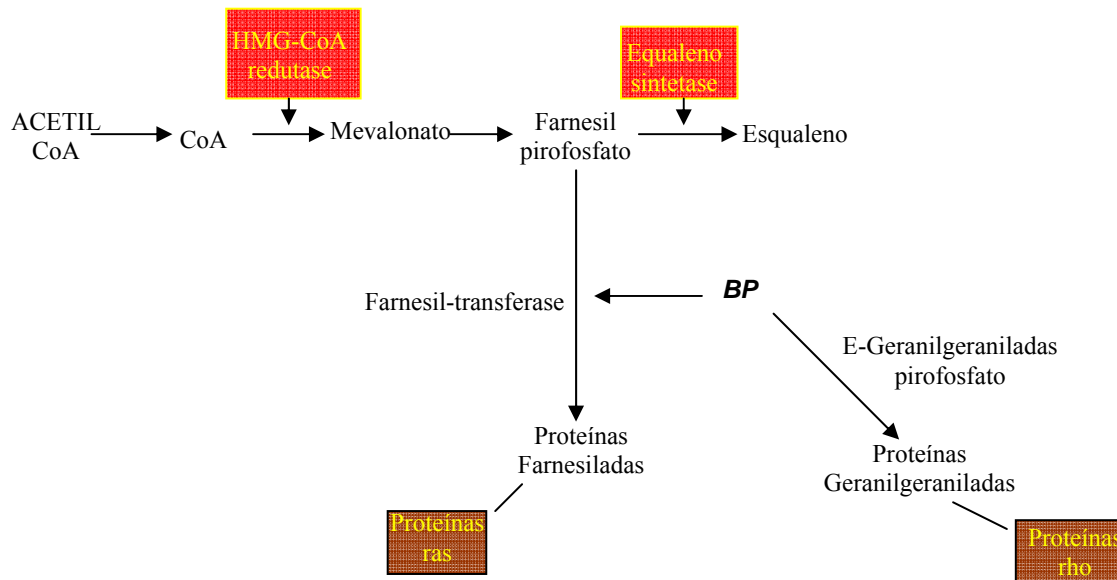
Alguns autores mostraram que as estatinas também podem ter uma ação sobre o tecido ósseo: nos osteoclastos, reduzindo a reabsorção e nos osteoblastos, aumentando a formação óssea (Wada *et al.*, 2000).

Em relação com a formação óssea, Mundy *et al.*, 2000 descreveram que as estatinas aumentariam a produção de BMP-2 (proteína morfogênica óssea – 2), capaz de estimular a diferenciação de células mesenquimais em condrócitos ou em osteoblastos.

A ação sobre 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 bifosfonatos sobre o metabolismo do colesterol. Os bifosfonatos inibem diretamente a síntese de farnesil pirofosfato, impedindo a prenilação das proteínas e, conseqüentemente, reduzindo a reabsorção óssea (Cummings, 2000)

Os efeitos dos inibidores da hidroximetil-glutaril-coenzima A redutase (estatinas), começaram a serem observados à medida que se identificaram os mecanismos de ação dos bifosfonatos na prenilação de proteínas G (Ras e Rho) envolvidas na síntese do colesterol (Luckman *et al.*, 1998). Tal prenilação ocorre em uma etapa posterior ao bloqueio da HMGCoA-r pelas estatinas, sendo, portanto passível de bloqueio com estas drogas (figura 6). Por outro lado, a administração de estatinas em ratos induz a um aumento significativo da formação óssea (Whang *et al.*, 2000).

Esses dados reforçam a idéia que as estatinas inibem a reabsorção e aumentam a formação óssea, contudo os estudos relacionando-as a redução do risco de fraturas são conflitantes (Van Staa *et al.*, 2001).



**Fig 5 - Biosíntese do Colesterol como substrato para a ação das estatinas e dos bisfotonatos (BP) (Luckman *et al.*, 1998)**

Estudos realizados por Cui *et al.*, (1997) relataram que a lovastatina foi capaz de provocar um aumento de volume do osso trabecular da tíbia, do fêmur e de vértebras lombares, que variou de 39% a 94% em um grupo de ratas ooforectomizadas. Concomitantemente, detectaram diminuição no número de osteoclastos. Mostraram que a lovastatina também foi capaz de inibir a adipogênese na medula óssea, a incidência de osteonecrose e também a expressão *in vitro* do RNA mensageiro do gene 422, induzida pela metilprednisolona. Este gene está relacionado com a diferenciação de células pluripotentes em adipócitos. Além disso, a lovastatina se opôs ao efeito inibidor do corticosteróide na expressão do RNA mensageiro de genes da osteocalcina e do colágeno do tipo I. *In vivo*, a lovastatina preveniu o aumento da adipogênese na medula óssea e a osteonecrose da cabeça do fêmur de frangos, induzidas pela metilprednisolona.

Alguns autores também acreditam que as estatinas possam, também, ter uma ação sobre o tecido ósseo: nos osteoclastos, reduzindo a reabsorção e

nos osteoblastos, aumentando a formação óssea (Wada *et al.*, 2000). Bauer *et al.*, em 1999, demonstraram que em usuários de estatinas houve uma tendência a um aumento da densidade mineral óssea do quadril, entre 0,2% e 1,1% e ainda uma menor incidência de fraturas nesta população. Entretanto, estes achados não foram estatisticamente significativos.

Chung *et al.*, em 2000, num estudo retrospectivo comparando pacientes diabéticos e com hiperlipidemia e usando estatinas com pacientes diabéticos sem hiperlipidemia, observaram que os indivíduos do grupo que utilizou estatinas apresentaram maior densidade mineral óssea do que aqueles que não necessitaram usar esta medicação. O efeito das estatinas na densidade mineral óssea foi mais importante nos homens do que nas mulheres diabéticas, provavelmente devido a mecanismos distintos que levariam à perda óssea. No homem, com o aumento da idade, ocorre diminuição da função osteoblástica e na mulher, a deficiência de estrógeno durante a menopausa desencadeia um aumento na reabsorção óssea. Os autores sugeriram que o aumento mais expressivo da densidade mineral óssea em homens ocorreu devido à ação da estatinas nos osteoblastos aumentando a formação óssea. Embora as estatinas possam também atuar na reabsorção óssea, seu efeito nas mulheres diabéticas que participaram deste estudo, na dose utilizada, não foi satisfatório, sugerindo que as estatinas não são capazes de atenuar a fase rápida de perda óssea que ocorre em consequência da menor produção de estrogênio. Este estudo, no entanto, apresentou algumas limitações metodológicas, pois foi observacional, retrospectivo e um pequeno número de pacientes foi avaliado (33 no grupo tratado e 36 no grupo controle). Além disso, seus participantes apresentavam diabetes mellitus, doença sabidamente associada a alterações do metabolismo ósseo.

#### **2.2.6.2.2) Cálcio e Vitamina D**

A proteína matriz do osso consiste primariamente de colágeno embebido em uma substância suporte de mucopolissacarídeos. Representa 35% do volume de material intercelular. A parte mineral óssea ocupa o restante. Os cristais de hidroxiapatita do osso mineralizado contêm significativas quantidades de sódio, magnésio, carbonato e íons citrato, mas cálcio e fósforo são os principais constituintes. Fatores que regulam sua suplementação, absorção, deposição e retirada do tecido ósseo contribuem para a saúde, a estrutura e a resistência óssea.

O cálcio deve fazer parte de qualquer esquema preventivo ou terapêutico que se faça para a osteoporose. Não se tem no entanto, dados conclusivos sobre as necessidades reais de cálcio e sua eficácia na prevenção da perda óssea peri e pós-menopáusicas, visto que esta pode ser influenciada por vários fatores nesse período da vida, em particular do hipoestrogenismo, seu principal determinante.

Os estudos têm demonstrado que após a menopausa há um grande aumento da perda de cálcio que, embora apresente grandes variações individuais, situa-se em média próximo a 40 mg/dia (Heaney, 1978).

Tem-se que a piora da absorção intestinal de cálcio exerce importante papel na patogênese da osteoporose. Para que o organismo tenha os seus requerimentos de cálcio atendidos, é necessário que se encontre suficiente quantidade de cálcio na luz intestinal e que a absorção se faça eficientemente. Inadequada ingestão ou absorção de cálcio leva à mobilização de cálcio ósseo, implicando em balanço negativo de cálcio.

Na osteoporose do tipo senil, ocorre redução da vitamina D e da absorção de cálcio, possivelmente devido à diminuição da capacidade da pele e do rim para sintetizar e hidroxilar a forma ativa da vitamina D. Ocorre também um decréscimo de absorção intestinal da vitamina D de fontes alimentares em indivíduos idosos.

Atualmente, reconhece-se a necessidade de adicionar-se vitamina D à suplementação de cálcio em indivíduos acima dos 70 anos de idade, havendo experiências comprovadas de aumento de densidade óssea e redução de fraturas com essa associação nessa faixa etária (Heaney, 1989 & Gallager,

1980). As doses de 600-800 UI/dia têm mostrado melhora no balanço de cálcio e redução nas taxas de fratura em indivíduos idosos (NIH, 1994).

As necessidades de cálcio sofrem profundas variações individuais e com a idade das pacientes. De igual modo, o estado hormonal, os constituintes da dieta e fármacos, além dos fatores genéticos, influenciam nos requerimentos de cálcio, fazendo com que algumas pessoas necessitem de especial atenção com relação à ingestão de cálcio.

Admite-se, entretanto, que menos de 25% da população adulta apresente consumo adequado de cálcio. A maioria das mulheres recebe 500 mg ou menos de cálcio através de suas dietas, quantidade esta, abaixo das necessidades nutricionais diárias recomendados para mulheres na peri e pós-menopausa (NIH, 1994). Não dispomos de dados bem-elaborados do consumo de cálcio em mulheres pós-menopáusicas em nosso país. O Instituto Nacional de Saúde Norte-americano, em uma reunião de especialistas – National Institutes of Health Consensus Development Conference on Optimal Calcium Intake (NIH, 1994) –, estabeleceu, com base nas informações disponíveis, os requerimentos de cálcio para as pessoas em diferentes situações e faixas de idade. A mesma reunião de consenso estabelece que a vitamina D (600-800 UI/dia) é essencial para uma adequada absorção de cálcio e que uma dieta de 2.000 mg/dia de cálcio é segura para a maioria das pessoas (NIH, 1994).

Recomenda-se que na medida das possibilidades esses requerimentos venham de fontes alimentares ou de alimentos enriquecidos com cálcio, fracionando-se a ingestão total ao longo do dia, com a ingestão dando-se de preferência às refeições. A última ingestão deve ser feita no período noturno, próximo ao deitar. Devem-se evitar em uma mesma refeição os alimentos ricos em cálcio e os ricos em fibras, pois estes diminuem a absorção intestinal de cálcio. Quando por outros motivos deseja-se a ingestão de fibras, deve-se recomendá-las em refeições distantes daquelas em que se objetiva a absorção de cálcio. A principal fonte alimentar de cálcio é o leite e seus derivados. As tabelas de conteúdo de cálcio nos alimentos (excetuando-se o leite e os derivados), não refletem verdadeiramente a quantidade de cálcio real absorvida.

Apesar de inicialmente ser proposto uma ingestão de cálcio por meio de fontes alimentares, muitas mulheres não conseguem seguir essa orientação,

dando-se nestes casos preferência aos suplementos de cálcio. Nessas situações, emprega-se geralmente o carbonato de cálcio, visto que esse preparado fornece uma proporção maior de cálcio (40%). Recomenda-se que seja ingerido com alimentos, para intensificar a sua biodisponibilidade em meio ácido.

Outros preparados farmacêuticos usados como suplementos de cálcio são o lactato, o gluconato e o complexo osseína-hidroxiapatita.

A ingestão de cálcio é segura em mulheres com cálcio sérico normal e sem antecedentes de nefrolitíase ou hipercalcúria. Os cálculos renais em geral ocorrem em indivíduos com deficiência de enzimas que solubilizam o cálcio urinário, não devendo ter excesso de ingestão de cálcio (Fernandes *et al.*, 1996).

Há grande variação individual na absorção de cálcio, a qual está condicionada à presença de Vitamina D e ao aporte de cálcio na alimentação. As taxas de absorção de cálcio pelo intestino oscilam entre 30% e 50% (Amaya-Farfan, 1994).

É necessário haver um suprimento constante de cálcio dietético biodisponível para garantir a massa óssea máxima do programa genético individual. A importância da exposição ao sol está relacionada à Vitamina D, que é obtida com a alimentação através da síntese cutânea na presença da radiação ultravioleta da luz solar. A Vitamina D se converte em 25-hidroxivitamina D (25-OH-D, calcidiol) no fígado; os níveis de calcidiol no sangue constituem uma avaliação razoavelmente exata do nível de vitamina D. A forma biologicamente ativa da Vitamina D, a 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, calcitriol), se forma no rim a partir do calcidiol, o qual estimula a reabsorção óssea e a absorção intestinal do cálcio, conduzindo a um incremento da concentração do cálcio sérico. No entanto, o aumento da concentração de cálcio sérico bloqueia a produção do hormônio paratireóide e a síntese de calcitriol, produzindo uma maior excreção urinária de cálcio e a redução tanto da reabsorção óssea quanto da absorção intestinal de cálcio (Comisión Europea, 1998).

A deficiência de vitamina D nas pessoas de idade avançada pode não ser puramente decorrente de uma ingestão insuficiente, mas da diminuição da síntese renal de 1,25-dihidroxivitamina D, apontada como causadora da

diminuição da proteína ligante de cálcio na estrutura óssea, provocando excessiva perda urinária de cálcio (Kung *et al.*, 1998).

O calcidiol, o calcitriol e o alfacalcidiol são metabólitos polares da vitamina D, que em princípio podem ser indicados em pacientes com deficiência dessa vitamina. O calcidiol, ou 25-hidroxivitamina D, é a forma de estoque, que pode beneficiar indivíduos com deficiência secundária em geral a problemas de absorção intestinal. O calcitriol ou 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-diidroxivitamina D3) é o metabólito ativo mais potente da vitamina D. O papel do calcitriol como o mais importante regulador da absorção intestinal de cálcio suporta a racionalidade para o seu uso no tratamento das osteoporoses.

Os pacientes em uso de calcidiol e calcitriol devem necessariamente controlar a calcemia, visto que hipercalcemia e hipercalcúria podem ocorrer sem sintomas e apresentar conseqüências clínicas sérias.

Análogos de calcitriol, que podem ter efeitos mais seletivos no osso e na homeostasia do cálcio com menor risco de hipercalcemia, têm sido empregados. Entre estes, o alfacalcidiol ou a 1-(OH)D3 (1-hidroxivitamina D3) em estudos preliminares em usuárias de longa duração (6 a 7 anos) mostrou eficácia na redução de fraturas (Orimo *et al.*, 1994).

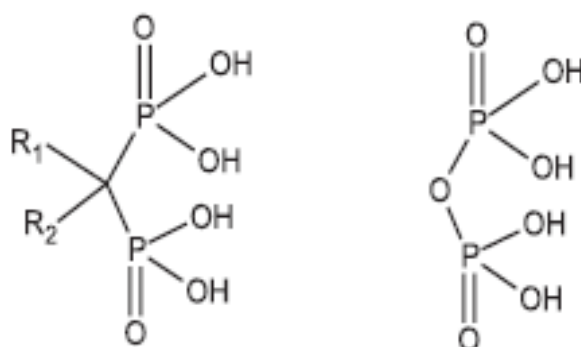
### **2.2.6.2.3) Drogas que inibem a reabsorção óssea**

#### **2.2.6.2.3.1) Bifosfonatos**

O tecido ósseo adulto é distinguido de outros tecidos pela presença de fosfato e cálcio mineral, como a hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , que incorpora em sua estrutura outros íons e sais, sendo o principal componente mineral constituinte do osso e o elemento essencial responsável pela função de apoio mecânico (Uludag, 2002). Devido à dinâmica do tecido ósseo, este é continuamente desgastado pela atividade osteoclástica e substituído pela atividade osteoblástica, ambas reguladas por fatores sistêmicos e locais (Ducy & Karsenty, 2000). Como qualquer outro tecido, os ossos são suscetíveis a doenças que influenciam a atividade osteoclástica, como o hiperparatiroidismo e câncer, sendo a hipercalcemia resultado de destruição direta e localizada do

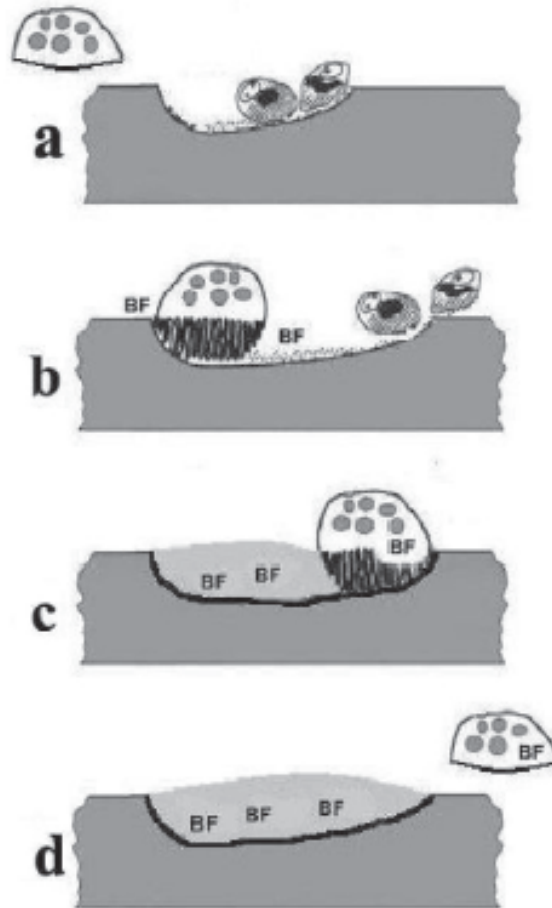
tecido ósseo por células neoplásicas (Coleman, 2001). Exemplos primários são a artrite reumatóide (AR) e a lesão espinhal, nas quais se observa a perda gradual e rápida de massa óssea (Bauman & Spungen, 2000).

Os bifosfonatos são conhecidos por sua alta afinidade pela hidroxiapatita. Esta propriedade trópica óssea dos bifosfonatos possibilitou sua utilização no planejamento de formas latentes de liberação de fármacos nas estruturas ósseas ou na medula óssea (Hirabayashi, 2001). Os pirofosfatos (P-O-P) são reguladores fisiológicos da calcificação e reabsorção óssea, naturalmente presentes no soro e na urina. A ação dos bifosfonatos deve-se à sua semelhança estrutural com este grupo de compostos (Ezra & Golomb, 2000) (Figura 7).



**Fig 6- Estrutura química dos ácidos bifosfônico e pirofosfórico**

A descoberta de que os bifosfonatos podiam inibir a reabsorção óssea foi realizada em 1960, após tentativas para identificar agentes que fossem semelhantes ao pirofosfato e que pudessem também regular a calcificação óssea, sendo, assim, potencialmente úteis para a prevenção de calcificação heterotópica (Rogers *et al.*, 1999). Os bifosfonatos parecem prevenir a calcificação por um mecanismo físico-químico, agindo como cristais após adsorção na superfície óssea. Atuam, também, inibindo a reabsorção do osso por efeito nas células dos osteoclastos, conforme mostra a Figura 8.



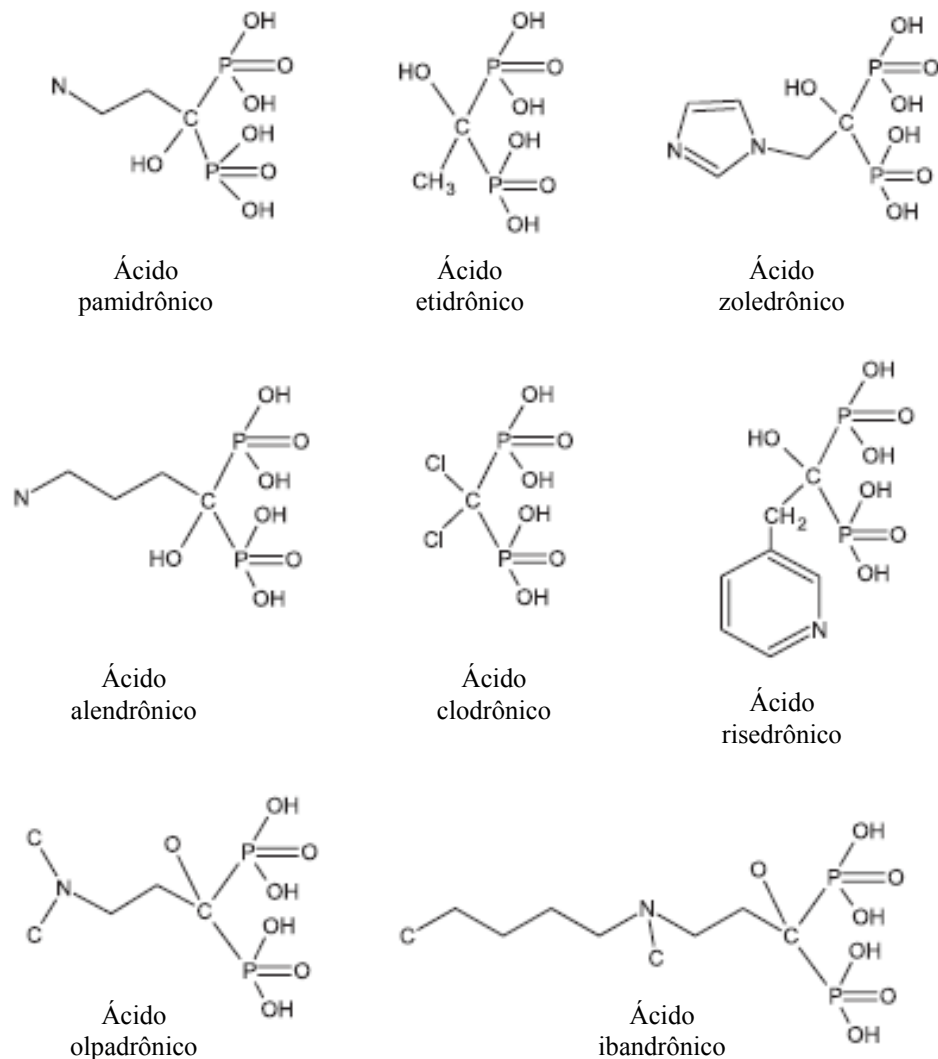
**Fig 7 - Remodelagem óssea e bifosfonatos (BF): a) ação dos osteoclastos na reabsorção óssea, b) e c) atividade dos osteoblastos na formação óssea utilizando os bifosfonatos e d) final da remodelagem (Castro *et al.*, 2004).**

O pirofosfato e os polifosfatos são incapazes de inibir a calcificação ectópica *in vivo*, quando administrados oralmente, devido à hidrólise do pirofosfato no trato gastrintestinal. Os bifosfonatos são análogos não-hidrolisáveis de pirofosfato, porque contêm ligações estáveis P-C-P no lugar de ligações lábeis P-O-P. Constituem-se, portanto, em compostos com as propriedades antidesmineralizantes do pirofosfato, mas resistentes à hidrólise (Rogers *et al.*, 1999).

A capacidade dos bifosfonatos em se ligar ao osso, prevenindo o crescimento e a dissolução de cristais, é maior quando R1 = OH (etidronato) ao invés de Cl (clodronato) (Russell & Rogers, 1999) (figura 7). Embora a estrutura da cadeia lateral de R2 seja a maior determinante de potência anti-reabsorção,

ambos os grupos fosfonatos também são necessários para a atividade dos fármacos. Alterações em um ou outro grupo fosfonato reduzem a afinidade para os ossos. Por exemplo, a substituição de um grupo hidroxila de um dos fosfonatos por um grupo metila formando fosfonofosfinato, notadamente reduz a afinidade e potencia a anti-reabsorção óssea (van Beek *et al.*, 1875). Alterações nos dois grupos fosfonatos, resultando em bifosfonato, conduzem à perda da afinidade óssea e da atividade anti-reabsorção *in vivo* (Ebranhimpour *et al.*, 1995). Os dois grupos fosfonatos, em conjunto com o grupo hidroxila da cadeia lateral R1, conferem alta afinidade para o osso e atuam como um ‘gancho nos ossos’, permitindo direcionamento eficiente e rápido dos bifosfonatos para a superfície do osso. Uma vez localizado dentro do osso, a estrutura e conformação tridimensional da cadeia lateral R2, bem como os grupos fosfonatos, determinam a atividade biológica da molécula e influenciam na capacidade dos fármacos de interagir com alvos específicos (Rogers *et al.*, 1999).

Diversos fármacos da classe dos bifosfonatos foram sintetizados, nos quais os grupos substituintes R1 e R2 variaram, sistematicamente (Figura 9), com propósitos definidos: aumentar a afinidade óssea; melhorar o perfil terapêutico: potência, seletividade e toxicidade; adquirir nova atividade farmacológica e alterar a biodisponibilidade da molécula.



**Fig 8 - Estruturas representativas da classe de compostos bifosfonatos (BFs) (Castro *et al.*, 2004).**

Os bifosfonatos que contêm um átomo de nitrogênio primário em uma cadeia alquílica (pamidronato e alendronato) podem ser de 10 a 100 vezes mais potentes que o etidronato e o clodronato, enquanto os derivados destes compostos que contêm um nitrogênio terciário (ibandronato e olpadronato) são, geralmente, mais potentes em inibir a reabsorção óssea (Geedes *et al.*, 1994).

Entre os bifosfonatos mais potentes que inibem a reabsorção óssea estão aqueles contendo o átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico (risedronato e zoledronato) (Geedes *et al.*, 1994). Os primeiros bifosfonatos aprovados para uso terapêutico foram clodronato dissódico (doença de Paget), pamidronato dissódico (doença de Paget), alendronato de sódio (osteoporose) e risedronato

de sódio (osteoporose). Zoledronato encontra-se em fase experimental para tratamento de câncer de próstata (Uludag, 2002). Além do emprego nessas disfunções, tais compostos podem ser utilizados em hipercalemia maligna e metástase óssea (Hirabayashi, 2001).

Os bifosfonatos são compostos que se caracterizam por duas ligações carbono-fósforo. São análogos do ácido pirofosfônico, em que o átomo de oxigênio foi substituído por um átomo de carbono. Essa estrutura dos bifosfonatos permite um grande número de variações em sua molécula estrutural possibilitando a síntese de diferentes compostos, com características físico-químicas e biológicas próprias. Não é possível, portanto, falar genericamente do efeito dos bifosfonatos sem que se possa considerá-los na sua individualidade.

São agentes anti-reabsortivos. Decrescem rapidamente a taxa de reabsorção abaixo do nível de formação óssea, resultando em ganho líquido de massa óssea. O mecanismo de ação dos bifosfonatos não é inteiramente compreendido. Parece atuar tanto nos osteoclastos quanto nos osteoblastos (Fleish, 1997).

Os bifosfonatos são inibidores potentes da atividade osteoclástica, que reduzem o turnover ósseo e restabelecem o balanço entre a reabsorção e a formação óssea. Em estudos clínicos, vários bifosfonatos previnem a perda óssea, preservam sua estrutura, melhoram sua força e substancialmente reduzem o risco de fraturas em pacientes com osteoporose. Eles são efetivos em várias situações clínicas, incluindo a osteoporose pós-menopáusicas, a reduzida massa óssea em homens e perda óssea induzida por drogas. Doses orais intermitentes e administração intravenosa são mais convenientes do que o esquema original de doses diárias. Essas drogas são geralmente bem toleradas e têm um excelente perfil de segurança, no qual efeitos colaterais sérios são incomuns. Os bifosfonatos potentes são geralmente a opção terapêutica preferida para a maioria dos pacientes com ou em risco de osteoporose (McClung, 2006).

Bifosfonatos são as drogas que inibem a reabsorção óssea e que foram usadas com sucesso no tratamento da osteoporose sistêmica, agindo seletivamente no tecido do osso e interferindo com a ação dos osteoclastos (Russel *et al.*, 1999). Como inibidores dos osteoclastos, os bifosfonatos foram

usados com sucesso nos estudos relacionados à inibição da doença periodontal induzida nos animais sem osteoporose ou outras doenças sistêmicas (Reddy *et al.*, 1995).

Os bifosfonatos são os mais potentes inibidores da reabsorção óssea. Entre eles, etidronato vem sendo gradualmente substituído por risedronato e alendronato, todas estas três drogas são usadas oralmente. Bifosfonatos injetáveis vêm sendo desenvolvidos (Benhamou, 2006).

Mais especificamente, raloxifeno proporciona um limitado ganho de BMD (densidade mineral óssea) e ainda decresce o risco de fraturas de 30-50%, de acordo com estudo populacional (Sarkar *et al.*, 2002). Modelos matemáticos indicam que a proporção do efeito anti-fratura é atribuível ao ganho de BMD que está em torno de 4% para o raloxifeno, 16% para o alendronato e de 7-28% para o risedronato (Watts *et al.* 2004; Li *et al.* 2001). Desse modo, a maioria dos efeitos de prevenção de fraturas através da inibição da reabsorção óssea, é independente da variação na DMO. Na prática, o ganho de DMO, em qualquer magnitude, indica um efeito protetor de fraturas, o que é mais notável para o alendronato (Hochberg *et al.*, 2002).

Esses agentes têm alta afinidade pelos cristais de hidroxiapatita sendo atraídos para a superfície de reabsorção óssea, interferindo com a atividade osteoclástica e reduzindo a reabsorção óssea. Tem alta especificidade pelo tecido ósseo não se acumulando em outros tecidos.

São pobremente absorvidos no trato gastrointestinal (menos de 1% da dose administrada por via oral), sendo recomendada a sua ingestão com água pela manhã em jejum, visando a sua melhor absorção. Não devem ser ingeridos com quaisquer alimentos, sob pena de importantes prejuízos na sua já baixa taxa de absorção intestinal.

Existe um grande número de bifosfonatos disponíveis na prática clínica e muitos outros ainda em estudo. Não se pode falar genericamente dos bifosfonatos. Os compostos que constituem essa extensa família de substâncias têm potências diferentes e apresentam diversos efeitos na remodelação óssea. Existem vários bifosfonatos com efeitos positivos sobre a massa óssea em pacientes com osteoporose estabelecida, entre os quais o etidronato, o clodronato, o pamidronato, o alendronato, o tiludronato e o ibandronato.

O alendronato de sódio, um aminobisfosfonato, é o que apresenta melhores resultados em estudos prospectivos. Tem a propriedade de inibir a reabsorção óssea sem impedir a mineralização da matriz formada, fenômeno que pode ocorrer com outras categorias de bifosfonatos.

Em um estudo multicêntrico, pacientes portadoras de osteoporose pós-menopáusia foram randomicamente tratadas com alendronato (um aminobisfosfonato) ou placebo. Todas as pacientes eram suplementadas com 500 mg diários de cálcio. Ao final de três anos de observação constatou-se densidade óssea na coluna vertebral, no colo do fêmur e no trocânter significativamente maior no grupo medicado em comparação ao grupo placebo (Lieberman *et al.*, 1995). De igual modo, observou-se no grupo tratado com alendronato redução significativa na proporção de mulheres com novas fraturas, deformidades vertebrais, perda de altura e fraturas do colo do fêmur em comparação ao grupo placebo. Ao final do período de observação, a dose de 10 mg diários de alendronato é recomendada como sendo eficaz no tratamento da osteoporose estabelecida (Black *et al.*, 1996).

O impacto do uso dos bifosfonatos em longo prazo precisa ainda ser demonstrado. Não se sabe ainda por quanto tempo devem ser utilizados e qual seu efeito no metabolismo ósseo e na qualidade do osso das usuárias por longo período. Representam os bifosfonatos, em particular o alendronato de sódio, no presente momento, opção eficaz no tratamento da osteoporose estabelecida.

O núcleo dos bifosfonatos consiste em dois grupos fosfatos ligados através de um átomo de carbono central, os membros individuais do grupo diferem somente nos grupos laterais ligados a esse átomo de carbono. As diferenças clínicas relevantes entre os bifosfonatos individuais são sua via de administração, seus efeitos adversos e seu potencial anti-reabsortivo, embora a maioria dos agentes mais novos pareçam conseguir uma inibição máxima comparável à reabsorção óssea. Os bifosfonatos foram usados originalmente na osteoporose induzida por glicocorticóide porque sua inibição da reabsorção óssea oferece o potencial para reparar diretamente o desequilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção. Tem-se demonstrado recentemente *in vitro* que interferem no aumento da apoptose do osteócito e do osteoblasto causado

pelos glicocorticóides, assim podem ter papel mais específico nesta condição (Homik *et al.*, 1999).

Benefit observou homens, mulheres pré-menopausadas, e mulheres pós-menopausadas recebendo ou não a terapia de reposição hormonal. Um ganho na massa óssea ocorreu independente da duração do uso de glicocorticoide precedente, e nenhum efeito adverso na histomorfometria óssea era demonstrado (Chavassieux *et al.*, 2000). A taxa de fratura vertebral foi reduzida aproximadamente à metade por aquelas em uso do alendronato, embora esta fosse somente estatisticamente significativa entre as mulheres na pós-menopausa.

Todos os bifosfonatos são muito insolúveis e têm conseqüentemente uma biodisponibilidade oral baixa. Para conseguir benefício através da administração oral, devem ser ingeridos com água ao menos 30 minutos antes da alimentação e ser separados por certas horas da ingestão de suplementos minerais (tais como o cálcio ou o ferro) ou de anti-ácidos. Raramente, causam irritação gastrointestinal, o alendronato vem sendo associado com erosões esofágicas (naqueles com refluxo gastro-esofágico) e etidronato com diarreia. Dos vários agentes investigados os bifosfonatos produziram os resultados mais positivos na densidade mineral óssea e na única evidência de uma taxa reduzida da fratura. Podem ser usados em todos os pacientes tratados com glicocorticóides, incluindo os jovens e pacientes em reposição hormonal (Reid, 2000).

#### **2.2.6.2.3.2) Calcitonina**

A calcitonina é o principal hormônio produzido pelas células parafoliculares da tireóide (células C) e é um inibidor potente da reabsorção óssea, sua secreção é estimulada pelo cálcio. No hipotireoidismo tem-se uma baixa reserva de calcitonina e isto é responsável pelo estímulo à hipercalcemia significativamente reduzido, provavelmente devido à destruição das células C pelo processo de tireoidite crônica. Pacientes com hipotireoidismo, quando começam a terapia de reposição hormonal, podem apresentar um

remodelamento ósseo com alto turnover devido à ação dos hormônios tireóides (Furlanetto, *et al.* 1991).

Os efeitos hipocalcêmicos e hipofosfatêmicos da calcitonina são causados, predominantemente, pela inibição direta da reabsorção osteoclástica do osso e por influência na função renal (Eto *et al.*, 1993). Por suas propriedades anti-osteoclásticas, anti-inflamatórias e analgésica a calcitonina é utilizada no tratamento de doenças caracterizadas por excessiva remodelação óssea como a osteoporose.

A calcitonina derivada do salmão é mais potente que a humana, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em parte porque é excretada mais lentamente da circulação (Harrison, 1995).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que a calcitonina favorece a osteogênese por inibir a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, além de possuir um leve efeito analgésico, relativa segurança e efeitos colaterais mínimos (Siminoski, 1996).

A calcitonina é um hormônio polipeptídico de cadeia longa produzido pelas células parafoliculares da glândula tireóide. Embora seu papel na espécie humana seja ainda desconhecido, observa-se que seu emprego, na dose de 50 a 200 UI/dia, diminui a perda óssea adicional em coluna vertebral e fêmur em pacientes com osteoporose estabelecida, admitindo-se também uma recuperação parcial do osso anteriormente perdido. Tem importante efeito analgésico, podendo, com essa indicação, ser empregada em episódios de dor aguda decorrentes das fraturas vertebrais. Devido à natureza protéica da calcitonina, ocorre degradação pelos sucos gástricos quando de sua administração por via oral. Por essa razão, a calcitonina tem sido administrada por via subcutânea, o que dificulta o seu emprego por longos períodos. Ultimamente tem-se administrado a calcitonina pela mucosa nasal com a utilização de spray nasal. Os efeitos colaterais são mínimos com essa preparação, entre os quais, leve quadro de rinite e obstrução nasal (Flicker *et al.*, 1997).

A calcitonina apresenta também propriedades analgésicas, presumivelmente decorrentes da sua mediação na liberação de endorfinas. Alguns estudos de pacientes com fraturas vertebrais têm demonstrado que a calcitonina sintética de salmão (injetável e spray nasal) reduz a dor em auto-

avaliação das pacientes e o consumo de analgésicos (Lyritis *et al.*, 1991 & Pun *et al.*, 1989).

Não se tem definido o melhor esquema de administração de calcitonina e qual deve ser a duração do tratamento. O uso intermitente de calcitonina de salmão também parece ser eficaz. O efeito mais significativo sobre a massa óssea observa-se após o segundo ou terceiro ano de uso da medicação. Nessa época é interessante a reavaliação dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea, sendo recomendável a interrupção do tratamento quando tais marcadores estiverem em faixa de normalidade. Deve-se no entanto, monitorá-los a cada 3 ou 6 meses após a interrupção do tratamento. Quando houver nessa situação aumento dos marcadores bioquímicos denunciando perda óssea, deve-se reinstaurar o tratamento (Kleerekoper *et al.*, 1998).

#### **2.2.6.2.3.3) Estrógenos e SERMS**

A ação dos estrógenos sobre a massa óssea é primordialmente anti-reabsortiva, de forma indireta sob a linhagem osteoclástica, pois ao estarem presentes estes hormônios inibem citocinas (interleucinas 1, 6 e TNF) e fatores locais produzidos pelo osteoblasto, que estimulam a chegada do osteoclasto nas unidades de remodelação óssea e promovem maior atividade desta linhagem celular. Atualmente discute-se ainda a ação do estradiol na linhagem dos osteoclastos, ao diminuir células osteoclasto-like na medula óssea e promover apoptose precoce destas células (Ramalho *et al.*, 2000).

Os estrogênios atuam sobre a remodelação óssea inibindo a reabsorção, não parecendo estimular a formação de osso (Rogers, 1969); no entanto, foram descritos receptores de estrogênios em culturas de células ósseas, tanto em osteoblastos quanto em osteoclastos (Eriksen, 1988).

Outros mecanismos indiretos podem atuar por meio da inibição da síntese de prostaglandinas. Entre essas, particularmente aquelas da série E podem atuar como reguladores locais das células ósseas, influenciando tanto a formação como a reabsorção. Estudos *in vitro* têm demonstrado um aumento de cerca de duas vezes de prostaglandina E2, liberada de culturas de ossos

parietais obtidos de ratas ooforectomizadas, que são inibidas por prévio tratamento *in vivo* com baixas doses de estradiol (Feyen, 1987).

Obviamente que o uso deste hormônio esteróide ainda teria vantagem sobre as demais drogas anti-reabsortivas por fazer desaparecer a sintomatologia da menopausa e proteger do envelhecimento cutâneo-mucoso, além de favorecer a redução dos níveis de lipídeos e proteção cerebral da demência senil (Garnero *et al.*, 1999).

Dispõe-se no presente momento de substâncias denominadas "Moduladores seletivos de receptores de estrogênios" genericamente SERM, que apresentam, à semelhança dos estrogênios, efeitos favoráveis sobre a massa óssea.

O primeiro SERM com largo emprego clínico foi o tamoxifeno, como tratamento adjuvante em pacientes com câncer de mama. Nessas pacientes observa-se bom efeito sobre a massa óssea, perfil lipídico e efeito antiestrogênico na mama (Love *et al.*, 1992 & Love *et al.*, 1994). Apresenta-se, no entanto, à semelhança do emprego de estrogênios isolados aumento do risco de hiperplasia e câncer de endométrio (Seoud *et al.*, 1993 & Lahti *et al.*, 1993).

Em função desses efeitos, outros SERM têm sido desenvolvidos visando ao tratamento da osteoporose sem os inconvenientes endometriais do tamoxifeno. O raloxifeno, um benzotiofeno não-esteróide, tem-se mostrado seguro, não aumentando as taxas de hiperplasia e câncer endometrial (Seoud *et al.*, 1993). Por outro lado, tem efeitos benéficos sobre a massa óssea e o perfil lipídico (Black *et al.*, 1994 & Delmas *et al.*, 1997). Pelos efeitos favoráveis sobre a massa óssea, o raloxifeno pode ser empregado com essa indicação, em substituição à TRH, nas pacientes de risco para osteoporose ou com doença estabelecida, particularmente em mulheres com risco de câncer de mama ou que não fazem a reposição hormonal com essa preocupação.

O mecanismo de ação molecular do raloxifeno envolve alta afinidade de ligação com o receptor de estrógeno, provocando alteração conformacional na estrutura do receptor, sua dimerização e associação com elementos de resposta do DNA, sendo inclusive descritos sítios de ligação do DNA e elementos resposta específicos para o raloxifeno, distintos dos estrógenos. Este produto tem uma propriedade agonista sobre a massa óssea e

antagonista do útero e mamas por adquirir uma conformação espacial específica em receptores alfa (Russo, 2001).

O hormônio paratireóideo (PTH), estimulador da reabsorção óssea, parece ter seu efeito antagonizado pelos estrogênios. Um decréscimo da atividade estrogênica leva a uma ligeira elevação dos níveis de cálcio no sangue com hipercalcúria, resultando em balanço negativo do cálcio. Concentrações plasmáticas e urinárias de cálcio, fósforo e hidroxiprolina (degradação do colágeno) aumentadas, refletindo reabsorção óssea, têm sido relatadas em mulheres após a menopausa, particularmente naquelas em que esta foi induzida artificialmente. Essas alterações têm sido prevenidas em pacientes sob reposição estrogênica.

Por outro lado, a deficiência estrogênica pode propiciar um aumento na sensibilidade esquelética às ações do PTH, com um aumento posterior na reabsorção óssea, ao passo que níveis mais altos de estrogênios podem reduzir a atividade do PTH circulante (Heaney, 1989).

Entre as teorias para explicar o papel dos estrogênios na supressão da perda óssea encontra-se a da calcitonina. Essa é uma teoria segundo a qual os estrogênios atuam de maneira indireta sobre o osso, ao estimular a secreção de calcitonina pelas células medulares da tireóide e, desse modo dirigir a inibição da atividade osteoclástica, diminuindo a reabsorção óssea (Stevenson *et al.*, 1981).

Até o presente momento, não está claro quais funções osteoblásticas são moduladas pelos estrogênios. Tem sido difícil demonstrar efeitos proliferativos ou de diferenciação dos estrogênios sobre os osteoclastos. Parece mais consistente, com base nos estudos *in vivo*, que os estrogênios exerçam os seus efeitos diminuindo a atividade osteoclástica. Admite-se assim que estrogênios atuam nos osteoblastos estimulando ou inibindo a produção de substâncias que controlariam a função osteoclástica. Por esse mecanismo os estrogênios controlam, de maneira indireta, a função osteoclástica via atuação direta no osteoblasto, pela elaboração de um ou mais fatores. Esses fatores derivados dos osteoblastos podem ser fatores estimuladores ou inibidores da atividade osteoclástica, denominados respectivamente de OB-OCSF (*osteoblast-derived osteoclast-stimulating factors* – fatores estimuladores de osteoclastos derivados de osteoblastos) e OB-OCIF (*osteoblast-derived*

*osteoclast-inhibitory factors* – fatores inibidores de osteoclastos derivados de osteoblastos). Os OB-OCSF poderiam ser inibidos pela ação estrogênica, enquanto os OB-OCIF seriam estimulados na presença desse hormônio.

No mecanismo local de remodelação óssea, o papel das citocinas tem grande importância, que podem ser moduladas pela ação estrogênica. As interleucinas IL-1 e IL-6 podem ser as substâncias que atuam como OB-OCSF, visto a sua potente ação como estimuladora da atividade osteoclástica. Essas interleucinas poderiam ser derivadas dos osteoblastos ou seus precursores na medula óssea ou em células adjacentes. Observa-se diminuição dessas interleucinas *in vitro* na presença de  $17\beta$ -estradiol (Girasole *et al.*, 1992).

O OB-OCIF pode ser, entre outros, o TGF- $\beta$ , que é liberado pelos osteoblastos em resposta à estimulação estrogênica. Essa citocina exerce potente ação mitogênica *in vitro* sobre células precursoras dos osteoblastos. Por outro lado, também diminui diretamente a reabsorção osteoclástica e inibe o recrutamento de células precursoras dos osteoclastos da medula óssea. Dessa forma, os estrogênios poderiam atuar aumentando a produção de TGF- $\beta$ , inibindo assim a atividade osteoclástica. Tem-se demonstrado também ação direta *in vitro* dos estrogênios reduzindo a atividade dos osteoclastos, inclusive a produção de enzimas lisossômicas (Girasole *et al.*, 1992; Pottratz *et al.*, 1994; Eriken *et al.*, 1990 & Canalis *et al.*, 1991).

O uso de doses adequadas de estrogênios em terapêutica de reposição hormonal (TRH) claramente confirma o efeito protetor desses esteróides na conservação da massa óssea. Os efeitos dos estrogênios parecem ocorrer universalmente no esqueleto, incluindo os principais sítios de fratura osteoporótica. Estudos têm demonstrado que pelo menos 40 a 60 pg/ml de estradiol plasmático são necessários para adequada proteção óssea. Quando o tratamento de reposição hormonal é interrompido, observa-se acelerada perda de massa óssea, que se assemelha à observada com a menopausa natural (Lindsay *et al.*, 1978). A reposição hormonal com propósito de conservação da massa óssea para ser eficaz precisa ser mantida por alguns anos. Não está estabelecido, em definitivo, o período do tempo de tratamento visando a esse objetivo. Admite-se que um período de cinco a dez anos possa ser necessário para redução das fraturas osteoporóticas, quando a reposição hormonal teve início imediato no período pós-menopáusic.

#### 2.2.6.2.3.4) Fitoestrogênios

A ação estrogênica e antiestrogênica de algumas substâncias derivadas de plantas é conhecida há algumas décadas e, por esta razão, são denominadas de fitoestrogênios. Os três maiores grupos de fitoestrogênios encontrados são: flavonas, isoflavonas e coumestranos. O poder estrogênico destas substâncias é variável. O grupo de isoflavona (malonilgenistina, malonildaidzina, genistina, daidzina, genisteína, daidzeína, acetildaidzina, gliciteína, acetilgenistina e equol) tem maior atividade estrogênica e maior afinidade pelos receptores. Um dos metoxi-derivados da isoflavona, chamado de biochanina A, não se liga aos receptores de estrogênios mas tem efeito estrogênico *in vivo*. A daidzeína e a formononetina têm maior afinidade pelos receptores estrínicos do que os metoxi-derivados, mas ambos possuem efeito estrogênico fraco *in vivo* (Knight, 1996 e Kim, 1996). A metilação poderia ser o mecanismo pelo qual o efeito estrogênico da isoflavona é reduzido. A diferença existente entre a genisteína e a daidzeína se deve à presença do grupo 5-hidroxila de genisteína (Kwon, 1998 e Clarkson, 1995).

A terapia de reposição estrogênica diminui o risco de enfermidade cardiovascular por vários fatores, como melhora no perfil lipídico (reduzir os níveis circulantes de c-LDL e aumentar a concentração plasmática de c-HDL) modulação do funcionamento endotelial, síntese de prostaciclina e óxido nítrico e diminuição da agregação plaquetária e do fibrinogênio. Outras opções alternativas aos estrógenos tem sido as isoflavonas genericamente conhecidas como fitoestrógenos. Sua molécula tem uma estrutura semelhante ao 17-beta-estradiol e é capaz de atuar sobre os receptores estrogênicos simulando algumas das propriedades dos hormônios femininos, incluindo a prevenção da osteoporose e efeitos protetores cardiovasculares sobre o perfil lipídico. Estudos sustentam que o consumo de soja permite a redução do colesterol total, do c-LDL e dos triglicerídeos. Todavia os mecanismos responsáveis por esses eventos ainda não foram elucidados, existindo, portanto varias hipóteses. Uma dessas, propõe que os fitoestrógenos estimulam a secreção de sais biliares e em conseqüência aumentam a taxa de excreção do colesterol. Outra afirma que tais moléculas elevam as concentrações de tiroxina livre, gerando um leve hipertireoidismo. Já outros autores propõem que os análogos vegetais

favorecem o metabolismo de LDL e VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) nos hepatócitos.

Com relação aos efeitos benéficos sobre a aterogênese, acredita-se que uma dieta rica em isoflavonas torna as c-LDL(s) resistentes à peroxidação, tornando o consumo de soja um fator protetor contra a aterosclerose, por esses fatores acima na matriz subendotelial. Sobre os efeitos vasculares, estudos têm demonstrado que esses análogos estrogênicos atuam como bloqueadores dos canais lentos de cálcio produzindo uma vasodilatação arterial (Marques *et al.*, Curso de Ciências Farmacêuticas – UNIFOR).

As propriedades estrogênicas e antiestrogênicas dos fitoestrogênios decorrem da sua interação com os receptores de estrogênios. Os lignanos e as isoflavonas têm atividade estrogênica fraca e, às vezes, antiestrogênica (como o tamoxifeno) (Kondo, 1990 e Martin, 1978).

Estudos recentes têm assinalado efeitos benéficos dos fitoestrogênios na prevenção de várias doenças crônicas como os cânceres de cólon, mama e próstata, e as doenças cardiovasculares. Nas pacientes na pós-menopausa, observou-se que são capazes de reduzir os sintomas e que poderiam prevenir algumas doenças crônicas que ocorrem no climatério, como a osteoporose (Gennari, 1997 e Arjmandi, 1996).

Acredita-se que os fitoestrogênios produzem alguns dos efeitos do estrogênio, porém, não seriam carcinogênicos. A genisteína funcionaria como potente inibidor da oncogênese, pois inibe a tirosina quinase (PTK), o fator de crescimento epidérmico (EGF-R), as DNA topoisomerasas I e II, a quinase ribossômica S6, assim como a angiogênese e a diferenciação celular *in vivo*. Além disso, inibiria a produção de radicais livres, modularia o ciclo celular e, eventualmente, poderia precipitar a apoptose (Barnes, 1995). O efeito estrogênico dos fitoestrogênios é mais facilmente observado nas mulheres do sudeste asiático, onde o consumo de isoflavona, presente na soja, é 20 vezes maior do que na população dos EUA, que consome mais produtos industrializados à base de carne vermelha (Peterson, 1995).

Os benefícios que os fitoestrogênios proporcionam ao sistema cardiovascular já foram referidos por diversos autores que observaram que os fitoestrogênios reduzem os níveis de LDL e a taxa total de colesterol sanguíneo tanto em animais quanto em humanos (Han *et al.*, 2002). Em relação a esses

achados, destaca-se que a incidência de coronariopatias na população asiática, comparada com a população dos EUA, é dez vezes menor (Clarkson, 1998).

Com o aumento da expectativa de vida das mulheres e, ao mesmo tempo, com o crescimento dos fatores que agravam as doenças crônicas, como fumo, estresse, vida sedentária e hábito alimentar rico em gordura, entre outros, a terapia de reposição hormonal nas mulheres na pós-menopausa tem sido cada vez mais indicada. A isoflavona poderia ser alternativa terapêutica neste período da vida da mulher. O consumo diário de 45 a 100 mg de isoflavona, que equivale a 60-100 g de soja, seria suficiente para se obter benefícios (Fukutake, 1996), em especial para abolir os sintomas vasomotores.

#### **2.2.6.2.4) Drogas que estimulam a formação óssea**

##### **2.2.6.2.4.1) 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 modo regular (três a quatro vezes por semana), no tratamento da osteoporose. No Brasil, sua forma isolada não está disponível comercialmente, podendo ser utilizado na forma de polivitamínicos (Szejnfeld, 1995; Pinto *et al.*, 2002).

O fluoreto de sódio é o único composto com propriedade de estimular osteoblastos, tanto em número quanto em capacidade de formação de matriz óssea. Os trabalhos experimentais e clínicos têm demonstrado que ocorre aumento na densidade mineral óssea (DMO) em até 10% ao ano, e aos níveis

pré-menopausa em 4 anos. Contudo, estudos publicados por Riggs *et al.* 1990, e Kleerekoper *et al.* 1991, mostraram que esse aumento de DMO não reflete necessariamente aumento na força do tecido ósseo. Além disso, os índices de fratura entre pacientes tratados com fluoreto não são diferentes dos pacientes do grupo controle. Todavia, esses trabalhos têm sido criticados devido às altas doses de fluoreto administradas aos pacientes (em torno de 80mg/dia). Desde 1994, Pak *et al.*, vêm realizando ensaios clínicos utilizando monofluorofosfato de sódio e citrato de cálcio, com diminuição nos índices de fratura e aumento da DMO.

O fluoreto de sódio tem emprego tradicional no tratamento das cáries dentárias. A observação do aumento da densidade óssea em pacientes tratados com fluoreto despertou o interesse do seu emprego no tratamento da osteoporose.

O exato mecanismo de ação do fluoreto de sódio não é bem compreendido, sendo observado no entanto aumento do número e da atividade dos osteoblastos. Experiências "in vitro" sugerem uma ação direta do fluoreto estimulando a proliferação dos precursores dos osteoblastos, sendo portanto considerado um fármaco que estimula a formação óssea (Baylink *et al.*, 1983).

#### **2.2.6.2.4.2) 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. O hormônio intacto, biologicamente ativo, representa 5 a 30% da concentração plasmática total do PTH (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 & Hock, 1984) e com a manutenção e/ou aumento da massa óssea trabecular em humanos (Rosen & 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-1a-hidroxilase renal e conseqüente síntese de 1,25(OH)<sub>2</sub>D. 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 (Brown *et al.*, 1993).

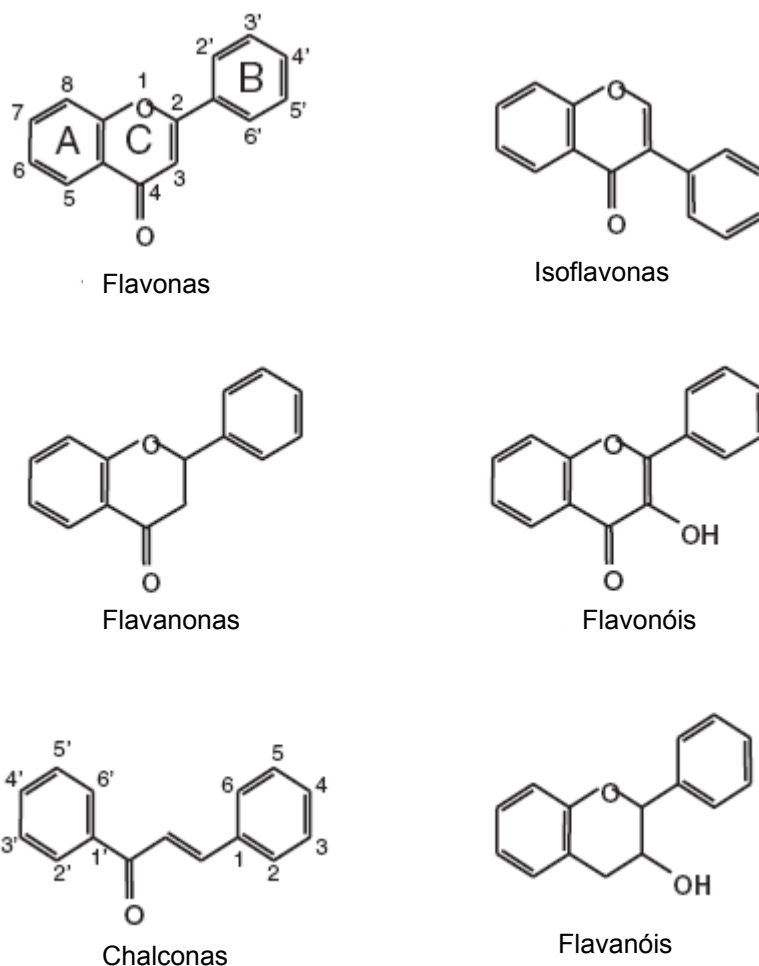
O paratormônio exerce potente efeito anabólico no osso. Seu uso é reservado para pacientes com severa osteoporose pós-menopausa com no mínimo duas fraturas vertebrais (Benhamou, 2006).

#### **2.2.6.2.4.3) Agentes anabolizantes**

Os agentes anabolizantes são compostos quimicamente relacionados aos androgênios, diferenciando-se destes pelo poderoso efeito anabólico protéico em doses que têm pouco efeito androgênico, não sendo no entanto possível a erradicação desses efeitos androgênicos. Dentre os agentes anabolizantes, o decanoato de nandrolona tem sido usado para o tratamento da osteoporose, nas doses de 25 a 50 mg, por via intramuscular, a intervalos de 3 ou 4 semanas. Estudos prospectivos recentes têm demonstrado que pacientes com osteoporose estabelecida têm obtido ganho de massa óssea. De outra parte, observa-se aumento da massa muscular e redução de massa gordurosa (Johansen, 1989).

### 2.2.6.2.5) Flavonóides

Os flavonóides são uma grande classe de compostos naturais extensamente presentes no mundo vegetal, com mais de 6500 compostos diferentes descritos (Harborne e Williams, 2000). No geral, estes compostos possuem o esqueleto formado por um anel carbônico e um anel aromático adicional unido na posição 2, 3 ou 4. Baseado na substituição em diferentes posições e no status da oxidação do anel C, os flavonóides podem ser classificados em diversas subclasses incluindo as flavonas, os flavonóis, as flavononas, os flavanóis, as isoflavonas e os chalconas (Fig 10).



**Fig 9 - Estrutura química das classes de flavonóides**

Os flavonóides são também um componente integral de nossa dieta comum e são particularmente abundantes nos vegetais, nas frutas e em

bebidas derivadas de planta tais como o vinho e o chá. Os alimentos de soja são fontes ricas de genisteína, isoflavonas e daidzeína e cada grama do feijão seco contém aproximadamente 1 mg destes compostos (Reinli e Block, 1996).

O chá verde e o vinho vermelho são ricos em catequinas incluindo a epicatequina, o epigallocatequina, o epicatequina-3-galato e o epigallocatequina-3-galato, e o índice destes compostos no chá verde podem ser tão elevados quanto 1000 mg/L (Lee *et al.*, 1995). O consumo diário de flavonóides totais na dieta nos E.U.A. foi estimado em torno de 1 grama (Kuhnau, 1976), mas é provável que este valor seja uma superestimação e o consumo real deve ser substancialmente mais baixo.

Na natureza, a maioria dos flavonóides existem como glicosídeos, mas as agliconas também são geralmente absorvidas pelo trato gastrointestinal após sua ingestão devido à sua hidrofobicidade mais elevada. Os glicosídeos submetem-se à hidrólise pelas glicosidases presentes nas células da mucosa gastrointestinal ou secretadas pela microflora colônica.

A informação total, definitiva a respeito da absorção dos flavonóides e sua biodisponibilidade requer uma investigação adicional. Os flavonóides submetem-se à extensiva glicuronidação e à sulfatação intestinal e hepática (Chen *et al.*, 2003; Liu e Hu, 2002) e as espécies químicas predominantes circulando *in vivo* após uma dose oral são estes metabólitos conjugados. As concentrações do composto primário na circulação sistêmica estão geralmente abaixo da escala micromolar, mas sua presença é persistente, provavelmente devido à reciclagem entero-hepática dos metabólitos conjugados (Setchell *et al.*, 2001; Walle *et al.*, 2001). Entretanto, quando uma dose alta é dada via intravenosa, driblando o metabolismo de primeira passagem, as concentrações no plasma dos compostos primários poderiam alcançar mais de 100  $\mu$ M (Ferry *et al.*, 1996). O metabolismo dos flavonóides pelo citocromo P450 foi observado em estudos de biotransformação *in vitro* usando microsomas do fígado de rato e do ser humano (Hu *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 1998), mas seu significado *in vivo* ainda é, em geral, desconhecido.

Nos últimos anos tem ressurgido o interesse científico nos flavonóides com mais de 2000 publicações por o ano que contém "flavonóides" como uma palavra chave. Isto é devido à associação destes compostos com uma larga escala de efeitos de promoção da saúde. Numerosos estudos indicaram que os

flavonóides têm atividades anti-oxidante, anti-carcinogênica, anti-viral, anti-inflamatória e anti-estrogênica ou estrogênica (Havsteen, 2002; Middleton *et al.*, 2000). A elevada ingestão dos flavonóides foi ligada ao risco reduzido de câncer, de doenças cardiovasculares, de osteoporose e de outras doenças degenerativas relacionadas com a idade (Havsteen, 2002; Hertog *et al.*, 1993; Huxley e Neil, 2003; Keli *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1991; Middleton *et al.*, 2000; Potter *et al.*, 1998). Por exemplo, muito do interesse nos flavonóides tem sido focalizado recentemente em suas propriedades anti-cancerígenas.

Os estudos epidemiológicos sugeriram uma associação entre a ingestão de flavonóides e um reduzido risco de determinados tipos de câncer. A baixa taxa de incidência e de mortalidade de câncer de mama observados em mulheres japonesas e em mulheres da origem japonesa que vivem no Havaí foi atribuída ao elevado consumo de soja na dieta; os produtos de soja contêm isoflavonóides (Messina *et al.*, 1994). Adicionalmente, um risco reduzido da incidência do câncer de mama foi associado também com uma ingestão elevada de daidzeína e de genisteína em um estudo alemão de casos-controle (Linseisen *et al.*, 2004). Nos estudos com animais, a administração dos flavonóides vem mostrando a prevenção do desenvolvimento e o crescimento dos vários tipos de carcinomas induzidos por produtos químicos e de tumores transplantados (Buchler *et al.*, 2003; Kohno *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2002). Os mecanismos propostos para estes efeitos da prevenção do câncer são multifatoriais, incluindo suas atividades anti-oxidante, seus efeitos nos caminhos de transdução dos sinais envolvidos na proliferação e na angiogênese da célula, assim como a modulação da sua atividade aromatase, a enzima-chave envolvida na biossíntese do estrogênio e as enzimas requeridas para a ativação metabólica dos pró-carcinogenes e a detoxificação de carcinogenes (Kellis e Vickery, 1984; Middleton *et al.*, 2000).

Flavonóides sintéticos derivados, flavona ácido acético e flavopiridol, foram avaliados em experimentações clínicas da fase II para suas atividades anti-cancerígenas (Aklilu *et al.*, 2003; Siegenthaler *et al.*, 1992). Além da sua variedade de atividades promotoras da saúde, os flavonóides têm pouca toxicidade e uma longa história na alimentação humana (Middleton *et al.*, 2000). As doses muito grandes destes compostos (até 500 mg/kg) foram administradas aos animais, com quase nenhuma toxicidade relatada, devido a

sua larga escala de atividades benéficas à saúde e de seus registros notáveis de segurança. Além disso, devido a um aumentado interesse público na medicina alternativa e prevenção de doença, o uso de preparações naturais para a manutenção da saúde tornou-se mais popular, e estimou-se que os produtos naturais são ingeridos por aproximadamente 10% ou mais da população geral e por 30-70% dos indivíduos com estados específicos da doença (Duggan *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2002). Assim, o consumo de grandes doses dos flavonóides é freqüente, aumentando o risco de interações farmacocinéticas mediadas por flavonóides com a medicação convencional. Este problema é relevante, porque há crescentes evidências indicando que interações entre produtos contendo flavonóides e drogas convencionais podem ocorrer. Por o exemplo, a co-administração do suco de uva, que contém uma grande quantidade do flavonóide nariginina, aumentou significativamente a biodisponibilidade oral da felodipina (Bailey *et al.*, 1993), da nimodipina (Fuhr *et al.*, 1998), da ciclosporina (Ducharme *et al.*, 1995) e do saquinavir (Kupferschmidt *et al.*, 1998), e diminuiu a biodisponibilidade oral do fexofenadine (Dresser *et al.*, 2002) em avaliação com humanos. Considerando esta evidência de interações flavonóide-droga nos estudos clínicos e animais, a presença da quantidade de flavonóide frequentemente elevada em suplementos dietéticos, e a popularidade crescente de muitos produtos naturais contendo flavonóides, que não requerem a aprovação do FDA nos Estados Unidos para o marketing, uma avaliação cuidadosa da interação de flavonóides geralmente ingeridos com os mecanismos moleculares que determinam a disposição da droga incluindo a absorção, a distribuição, o metabolismo e a eliminação tornam-se importantes. Conseqüentemente, compreender a interação dos flavonóides com os transportadores da droga ajudar-nos-á compreender e prever potenciais interações flavonóides-droga (Morris & Zhang, 2006).

Para exercer suas funções biológicas, agentes xenobióticos e endobióticos devem passar através dos vários sistemas biológicos de membrana para serem absorvidos, distribuídos, metabolizados e eliminados, assim como para ligar a seus receptores intracelular e a enzimas. O sistema biológico de membrana é um sistema de bicamada lipídica que contém numerosas proteínas, incluindo muitos transportadores. Assim, as atividades

destes transportadores são importantes para a farmacocinética e farmacodinâmica de muitas drogas importantes, especialmente aqueles compostos hidrofílicos. Conseqüentemente, compreender a interação dos flavonóides com estes transportadores ajudar-nos-á compreender e prever interações potenciais de flavonóides-drogas (Morris & Zhang, 2006).

Um grupo de transportadores chamados de ABC (ATP-binding cassette) incluindo a glicoproteína-P, proteínas associadas à resistência de multidrogas (MRPs) e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP), atraiu atenção especial por causa de sua participação no desenvolvimento da resistência à multidrogas (MDR) (Litman *et al.*, 2001) e sua importância demonstrada na farmacocinética e farmacodinâmica. A glicoproteína-P, MRPs e BCRP são todos transportadores de efluxo de membrana, bombeando seus substratos para fora das células usando a energia derivada da hidrólise do ATP (Litman *et al.*, 2001).

MRP1 é um transportador aniônico orgânico e transporta conjugados aniônicos e de compostos lipofílicos incluindo a glutatona, glicuronídeos e conjugados sulfatados (Konig *et al.*, 1999) para fora das células, usando a energia derivada da hidrólise do ATP. Alguns cátions, compostos anfifílicos ou neutros, tais como os agentes anti-câncer, antraciclinas, etoposídeos e alcalóides da Vinca rósea têm sido transportados por MPR1 (Cole *et al.*, 1994). MPR1 tem ampla distribuição nos tecidos o que indica que MPR1 pode limitar a distribuição de seus substratos em vários tecidos e desta maneira, serve como uma função protetora nos tecidos (Leslie *et al.*, 2001a). Certamente, animais experimentais sem MPR1 funcionais podem apresentar citotoxicidade aumentada do tecido ósseo e outros tecidos (Johnson *et al.*, 2001).

Muitos flavonóides agliconas incluindo morina, silimarina, crisina, kaempferol, narigenina, miricetina, galangina, baicaleína, luteolina, robinetina, diosmetina, crisoeriol, tamarixetina e isoramnetina podem inibir o transporte mediado MRP1 em vários graus (Leslie *et al.*, 2001b). Os flavonóides glicosilados genistina e naringina exercem baixo efeito inibitório sobre MRP1 (Leslie *et al.*, 2001b).

Alguns flavonóides, tais como quercetina, miricetina, apigenina e naringenina, tem sido pesquisados por estimular o transporte de GSH por MRP1 (Leslie *et al.*, 2003, 2001b); conseqüentemente, a depleção de GSH

celular (um cofator para o transporte de agentes quimioterapêuticos mediados por MRP1), pode também representar um mecanismo potencial para a inibição MRP1 por estes compostos.

Flavonóides glicuronados e sulfatados podem ser bons substratos para MRP1, podem também inibir MRP1, e ainda alterar a distribuição de substratos para MRP1, seguido da ingestão de altas doses de flavonóides (Morris e Zhang, 2006).

Existem também as MRP2 que podem interagir com flavonóides e se localizam na membrana apical de células polarizadas tais como hepatócitos, células epiteliais intestinais e células tubulares proximais renais (Buchler *et al.*). A perda de MRP2 nos seres humanos é associada com a síndrome de Dubin-Johnson, caracterizada por excreção biliar imperfeita de glicuronídeos da bilirrubina e de outros conjugados aniônicos (Kajihara *et al.*). MRP2 também contribui para a função da barreira hemato-encefálica (Potschka *et al.*, 2003). Somente dois flavonóides (miricetina e robinetina) inibiram MRP2 (Tabela 2). Os mecanismos para a interação flavonóide-MRP2 não foram estudados extensivamente, mas podem ser similares àqueles para a interação flavonóide-MRP1 (van Zanden *et al.*, 2005).

**Tabela 2 - Porcentagem de inibição de MRP1 e MRP2, mediadores do transporte de cálcio pelos flavonóides (25  $\mu$ M), e determinação dos valores de IC<sub>50</sub> para inibição de MRP1 e MRP2. (Morris e Zhang, 2006).**

	MRP1		MRP2	
	Inibição a 25 $\mu$ M (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Inibição a 25 $\mu$ M (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Flavona	36	>50	5	>50
3-Hidroxi-flavona	3	>50	2	>50
3'-Hidroxi-flavona	13	>50	0	>50
4'-Hidroxi-flavona	15	>50	1	>50
Crisina	10	>50	2	>50
3,3'-Dihidroxi-flavona	4	>50	1	>50
3,4'-Dihidroxi-flavona	57	24,4 $\pm$ 4,1	16	>50
Galangina	43	35,3 $\pm$ 7,3	0	>50
Baicaleína	48	30,9 $\pm$ 4,4	28	>50
Apigenina	47	35,1 $\pm$ 9,6	2	>50
Naringenina	2	>50	0	>50
3,3',4'-Trihidroxi-flavona	26	>50	17	>50
Kaempferol	72	19,4 $\pm$ 3,6	2	>50
Fisetina	2	>50	1	>50
Luteolina	53	22,4 $\pm$ 4,8	17	>50
Eriodictiol	31	>50	13	>50
Morina	30	49,0 $\pm$ 7,6	8	>50
Quercetina	63	21,8 $\pm$ 3,5	5	>50
Taxifolina	8	>50	3	>50
Catequina	15	>50	0	>50
Robinetina	75	13,6 $\pm$ 3,9	76	15,0 $\pm$ 3,5
Miricetina	63	20,2 $\pm$ 4,3	68	22,2 $\pm$ 3,9
Acacetina	18	>50	1	>50
Kaempferida	40	>50	2	>50
5,7,3',4'-Tetrametoxi-flavona	76	7,9 $\pm$ 1,5	20	>50
Diosmetina	84	2,7 $\pm$ 0,6	17	>50
Crisoeriol	85	4,0 $\pm$ 0,7	31	>50
Tamarixetina	68	7,4 $\pm$ 3,4	8	>50
Isoramnetina	60	14,3 $\pm$ 2,8	10	>50

Flavonóides também podem se ligar a BCRP que é um transportador de efluxo de membrana recentemente clonado (Miyake *et al.*, 1999). Têm como substratos agentes anti-câncer tais como etoposídeos e teniposídeos, canfotecinas, topotecano, zidovudina entre outros (Wang *et al.*, 2003).

A inibição de BCRP por flavonóides é mediada provavelmente muito mais pelos compostos originais em vez de seus metabólitos tais como glicuronídeos e conjugados sulfatados (Imai *et al.*, 2004). A importância desta família de

transportadores é limitar a biodisponibilidade oral e a distribuição e também facilitar a excreção renal destas substâncias (flavonóides). Plantas medicinais contendo vários flavonóides podem potencializar este efeito. Muitas pesquisas serão necessárias com estes transportadores para avaliar o potencial clínico de interações flavonóides-drogas.

Entre os flavonóides, a ipriflavona parece ter indicação no tratamento da osteoporose. Seu exato mecanismo ainda não é conhecido. Apresenta atividade estrogênica, podendo dessa forma, atuar no metabolismo ósseo ou propiciar aumento da ação dos próprios estrogênios. Não se tem ao certo o seu principal foco de atuação, sendo identificadas ações tanto em osteoblastos quanto em osteoclastos. São necessárias novas investigações para um melhor conhecimento do seu mecanismo de ação e estudos prospectivos para comprovação de sua eficácia (Fernandes *et al.*, 1996).

#### **2.2.6.2.5.1) Efeitos de flavonóides no metabolismo ósseo**

Os flavonóides compõem ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os sistemas biológicos (Peterson, Dwyer, 1998).

As isoflavonas (genisteína e daidzeína), encontradas na soja, têm significantes efeitos na saúde óssea entre mulheres pós-menopausa, juntamente com alguns efeitos hormonais (Giada, 2006).

Verificou-se que flavonóides previnem a perda de massa óssea em pacientes osteoporóticos e provoca “decréscimo do turnover” ósseo provocado por hipogonadismo (Gambacciany, 1994). Efeitos favoráveis à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos foi demonstrado por Katai *et al.* (1992) e Cheng *et al.* (1994), e inibição da reabsorção óssea também foi observado (Notoya *et al.*, 1993). O mecanismo envolvido na ação modulatória em células do tecido ósseo parece ter atividade antirreabsortiva (Azria *et al.*, 1993).

Os efeitos hormonais das isoflavonas, aliados à baixa incidência de osteoporose em mulheres asiáticas, propiciaram a investigação da ação dessas substâncias sobre o tecido ósseo (Cooper, Campion e Melton, 1992).

Estudos usando roedores ovariectomizados têm mostrado que as isoflavonas, isoladas ou associadas à proteína de soja, reduzem a perda e massa óssea que ocorre após a ovariectomia (Arjmandi *et al.*, 1998b; Picherit *et al.*, 2001a). Similarmente, ensaios em humanos têm registrado que as isoflavonas, isoladas ou associadas à proteína, atenuam a perda óssea que ocorre durante e depois da menopausa (Alekel *et al.*, 2000; Morabito *et al.*, 2002).

Em geral, tanto evidências epidemiológicas como clínicas apontam para uma relação positiva entre o consumo de isoflavonas e a densidade mineral óssea. Estudos realizados em ratas ovariectomizadas mostraram que as isoflavonas diminuíram a excreção urinária de deoxipiridinolina (Dpd), marcador específico para reabsorção óssea (Picherit *et al.*, 2001a; Picherit *et al.*, 2001b). Similarmente, Horiuchi *et al.* (2000) mostraram que o consumo de proteína de soja por mulheres japonesas na pós-menopausa foi associado com a diminuição da excreção de Dpd.

Estudos *in vitro* revelaram que a genisteína inibe a reabsorção óssea mediante inibição da formação e diferenciação de células osteoclastos *like*, provenientes da medula óssea, e pela indução da apoptose de osteoclastos maduros (Yamaguchi e Gao, 1997; Gao e Yamaguchi, 1999). O efeito supressor da genisteína sobre os osteoclastos deve-se parcialmente à inibição da proteína tirosina quinase e ativação da proteína tirosina fosfatase (Gao e Yamaguchi, 2000).

Em relação à formação óssea, vários estudos *in vitro* têm evidenciado o efeito estimulatório da genisteína sobre a formação e mineralização em sistema de cultura de células (Yamaguchi e Gao, 1997; Yamaguchi e Gao, 1998). Esses estudos mostraram que os efeitos são parcialmente mediados pela ligação da genisteína aos receptores estrogênicos e pela síntese de componentes protéicos nos osteoblastos. Além disso, a soja e suas isoflavonas promovem a produção do fator de crescimento (insulin like growth factor I – fator de crescimento ligado à insulina) IGF-I (Arjmandi *et al.*, 1998a), que aumenta a atividade osteoblástica em humanos e correlaciona-se

positivamente com a massa óssea em mulheres na pré (Romagnoli *et al.*, 1993) e pós-menopausa (Boonen *et al.*, 1996). No entanto, essas observações indiretas devem ser confirmadas mediante modelos *in vivo* e *in vitro* incluindo estudos de longo prazo. Usando o modelo de osteopenia, a proteína de soja aumentou a expressão do gene para IGF-I indicado pelos altos níveis de RNAm femoral. Nesse estudo, a incorporação da proteína de soja ao conteúdo normal de isoflavonas (2,3 mg/g de proteína) exerceu maior efeito sobre o RNAm femoral de IGF-I. Esses resultados indicam que as isoflavonas devem influenciar o aumento da síntese de IGF-I. Similarmente, foi observado que a suplementação com proteína de soja aumentou os níveis séricos de IGF-I, confirmando os resultados em animais (Arjmandi *et al.*, 2000).

Daidzeína é uma das isoflavonas mais abundantes na soja e é a única que pode ser metabolizada ao equol, um composto com maior atividade estrogênica que as outras isoflavonas. Fonseca & Ward 2004, determinaram os efeitos da daidzeína purificada em combinação com o cálcio elevado (Ca) em preservar o fêmur e as vértebras lombares (LV1-LV4), a densidade mineral óssea (DMO) e a força biomecânica do osso em três locais diferentes (ponto médio do fêmur, trocânter do fêmur e LV3) em ratas ovariectomizadas. As ratas (SH) laparotomizadas bilateralmente (n = 12) receberam a dieta do controle (AIN93G) que contém 2g Ca/kg, a dieta das ratas ovariectomizadas (OVX) foram randomizadas em grupos de 1 a 6 (n = 12): OVX (2g Ca/kg), HCa (25g Ca/kg), HD (2g Ca + 200mg daidzeína/kg), HDCa (25g Ca + 200mg daidzeína/kg), LD (2g Ca + 100mg daidzeína/kg) ou LDCa (25g Ca +100mg daidzeína/kg) por 12 semanas. HDCa preservou o fêmur e as vértebras, a densidade mineral óssea e a força biomecânica do osso (em todos os três locais) comparada ao grupo de OVX, entretanto, somente no ponto médio a força foi preservada a um nível que fosse maior que o tratamento com Hca. Os grupos tratados com HD tiveram um maior aumento da densidade mineral óssea quando comparados ao grupo ovariectomizados, entretanto, a daidzeína sozinha (HD) não pareceu preservar o osso trabecular (Tabela 3).

**Tabela 3 – Área do fêmur, conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea e propriedades do ponto médio do fêmur (Fonseca & Ward 2004).**

	SH	OVX	Hca	HD	HDCa	LD	LDCa
Área (cm <sup>2</sup> )	0.43±0.01	0.44± 0.0	0.48±0.01	0.45±0.0	0.46±0.01	0.44±0.0	0.46±0.01
Conteúdo mineral ósseo (mg)	27.4±0.4	23.6±0.6	28.8±0.5	25.6±0.4	28.3±0.5	24.6±0.6	28.3±0.6
Densidade mineral óssea (mg/ cm <sup>2</sup> )	64.2±1.3	53.8±0.5	60.6±0.8	57.2±0.5	61.5±0.8	55.8±0.8	61.0±0.7
<b>Ponto médio do fêmur</b>							
	SH	OVX	Hca	HD	HDCa	LD	LDCa
Carga de rendimento (N)	14.4±0.3	12.4±0.7	13.9±0.4	12.6±0.4	14.4±0.3	12.5±0.4	14.2±0.6
Capacidade de recuperação (Jx10 <sup>-4</sup> )	5.99±0.28	5.17±0.55	5.68±0.20	5.25±0.23	6.02±0.23	5.85±0.66	6.15±0.41
Pico de carga (N)	21.8±0.8	18.1±0.6	21.8±0.8	19.8±0.7	22.1±0.5	17.9±0.7	22.3±0.9
Força (Jx10 <sup>-3</sup> )	3.63±0.46	3.23±0.89	3.79±0.42	2.95±0.37	4.56±0.86	2.03±0.23	4.04±0.57
Rigidez (N/mm)	190±5	162±5	184±7	164±5	184±5	160±5	182±6

*Grupos: SH-laparotomizadas bilateralmente; OVX-ovariectomizadas (2g Ca/kg), HCa (25g Ca/kg), HD (2g Ca + 200mg daidzeína/kg), HDCa (25g Ca + 200mg daidzeína/kg), LD (2g Ca + 100mg daidzeína/kg) ou LDCa (25g Ca +100mg daidzeína/kg).*

Tanto a daidzeína quanto o Ca atenuaram o aumento sérico de IL-1 $\beta$  observado no grupo de OVX (Tabela 4). Os resultados deste estudo sugerem que a combinação da daidzeína e do Ca elevado afetam favoravelmente o osso cortical e trabecular como indicado pela densidade mineral óssea do fêmur, das vértebras lombares e da força biomecânica óssea, mas muito deste efeito pode estar mediado pela dieta elevada do Ca (Fonseca & Ward 2004).

**Tabela 4 – Concentração sérica de algumas citocinas pró-inflamatórias (Fonseca & Ward 2004).**

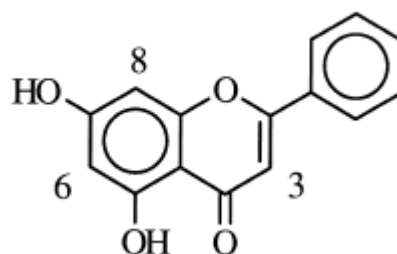
	SH	OVX	HCa	HD	HDCa	LD	LDCa
IL-6 (pg/ml)	18.71 ± 1.30	23.29 ± 1.69	20.77 ± 2.24	19.46 ± 2.95	23.62 ± 2.79	26.41 ± 2.57	30.22 ± 3.14
TNF-α (pg/ml)	5.12 ± 1.35	13.74 ± 4.57	23.95 ± 7.36	13.22 ± 2.93	11.24 ± 1.86	13.67 ± 5.31	13.04 ± 3.48
IL-1β (pg/ml)	1.60 ± 0.42 <sup>b</sup>	7.12 ± 2.25 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.67 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.44 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.57 <sup>b</sup>	2.49 ± 0.99 <sup>b</sup>	3.31 ± 1.08 <sup>b</sup>

Valores indicados por letras diferentes são estatisticamente diferentes ( $P < 0,005$ ).

Grupos: SH-laparotomizadas bilateralmente; OVX-ovariectomizadas (2g Ca/kg), HCa (25g Ca/kg), HD (2g Ca + 200mg daidzeína/kg), HDCa (25g Ca + 200mg daidzeína/kg), LD (2g Ca + 100mg daidzeína/kg) ou LDCa (25g Ca + 100mg daidzeína/kg).

### 2.2.6.2.5.2) Crisina

O flavonóide crisina (Fig.11), presente em níveis elevados no mel e na própolis (Siess et al., 1996), tem sido mostrado recentemente como um potente inibidor da ativação do vírus da imunodeficiência humana nos modelos de infecção latente (Critchfield *et al.*, 1996). O alvo deste efeito parece ser a caseína quinase II (Critchfield *et al.*, 1997).



**Fig 10 - Estrutura química da crisina (5,7-dihidroxiavona)**

Crisina tem sido apontada também como um potente inibidor de enzimas que participam do metabolismo de drogas, incluindo CYP1A1 (Tsyrllov *et al.*, 1994) e a fenolsulfotransferase (Walle *et al.*, 1995), ambas envolvidas na bioativação da carcinogênese. No entanto, se os efeitos *in vitro* podem ser extrapolados *in vivo* é desconhecido, assim como a disponibilidade sistêmica da crisina após sua ingestão oral também não foi investigada. Crisina, entretanto, pode submeter-se à transformação metabólica e ser metabolizada extensivamente pelos microssomas do fígado de ratos (Nielsen *et al.*, 1998). Os produtos resultantes foram compostos mono e dihidroxilados de crisina.

Embora a crisina pareça ter propriedades favoráveis ao transporte através da membrana, sua absorção pode ainda ser seriamente limitada pelo eficiente metabolismo de conjugação que ocorre nas células epiteliais intestinais.

Os efeitos dos flavonóides no sistema nervoso central foram considerados somente nestes últimos 10 anos. Estudos realizados por Medina *et al.*, 1989 demonstraram a capacidade de alguns flavonóides ligar a receptores centrais do tipo benzodiazepínico (BZD). Substâncias tais como o equol (Luk *et al.*, 1983) e amentoflavona (Nielsen *et al.*, 1988) foram consideradas como ligantes seletivos para os receptores de BZD em experimentos *in vitro*, mas mostraram ser inativos *in vivo*. Outros compostos naturais tais como a crisina e apigenina exibiram efeitos excitatórios afetando o relaxamento muscular, a sedação e a locomoção quando injetados nos ratos (Viola, 1995).

#### 2.2.6.2.5.3) *Camellia sinensis* (Chá-verde)

*Camelia sinensis* (L) O. Kuntze é uma planta da família Theaceae, conhecida popularmente por chá verde, chá da Índia ou “green tea”. Suas folhas possuem cerca de 30% compostos polifenólicos, principalmente (-)-epicatequinas, cuja principal propriedade terapêutica é a de antioxidante (SImões *et al*, 2004). Esta planta têm sido muito usada em formulações magistrais e em produtos fitoterápicos importados.

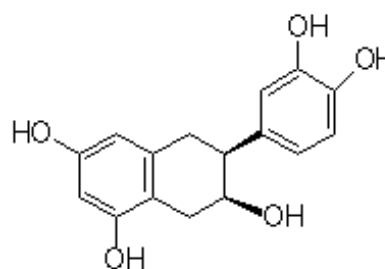


Fig 11 - a) Aspecto geral da árvore do chá verde.

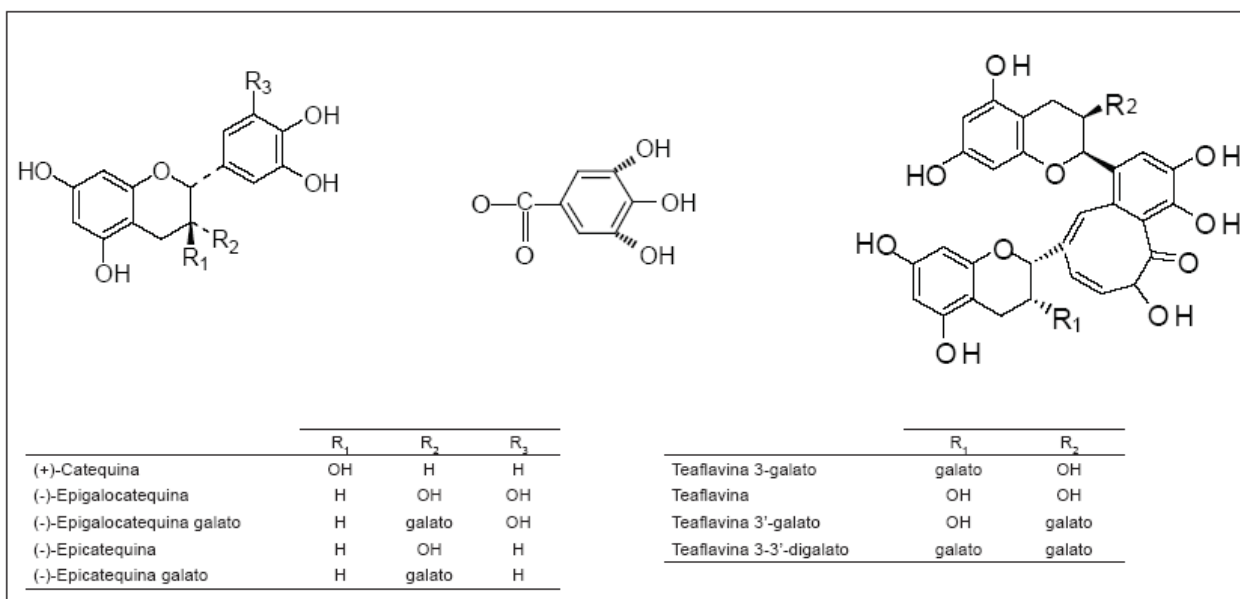
b) (-)-Epicatequina

Embora seja uma planta muito utilizada atualmente, a Farmacopéia Brasileira (2000), Farmacopéia Americana - USP 28 (2005), British Pharmacopoea (2000) e European Pharmacopoea (2001) não contêm monografia sobre esta planta.

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo todo. Anteriormente, seu consumo concentrava-se em países da Ásia e Europa, panorama que vem mudando ao longo dos últimos anos. O chá verde consiste em uma bebida de sabor agradável, preparada a partir da infusão de folhas de *Camellia sinensis*, pertencente à família Theaceae (Linnaeus). O processo de manufatura do chá verde envolve o aquecimento de folhas colhidas frescas, a fim de promover a inativação de enzimas catalíticas. Desta forma, previne-se a fermentação (oxidação) do chá, obtendo-se um produto seco e estável (Balentine, 1992; Frei & Higdon, 2003). A fermentação parcial ou total das folhas de *Camellia sinensis* resulta em dois outros tipos de chá, o *oolong* e o chá preto, respectivamente (Balentine, 1992).

O crescente interesse pela bebida deve-se grandemente a estudos que a mostram como fonte de flavonóides e a relação inversa entre seu consumo e o risco de doenças degenerativas como câncer e doenças do coração. Diversos artigos, mostram o grande número de trabalhos abordando o assunto, embora as evidências sejam consideradas ainda inconclusivas (Matsubara *et al.*, 2006). O impacto que a ingestão excessiva de flavonóides gera sobre a saúde foi também revisado (Skibola *et al.*, 2000), abordando principalmente a ação dos suplementos alimentares.

A composição química do chá verde inclui diversas classes de compostos fenólicos, tais como flavanóis, flavonóis e ácidos fenólicos, além de cafeína, pigmentos, carboidratos, aminoácidos e outras substâncias (Lunder, 1992; Hong *et al.*, 2001). Os principais flavanóis presentes no chá verde são os monômeros de catequinas. As catequinas pertencem a um grupo de polifenóis encontrados nas folhas de *Camellia sinensis*, matéria-prima para a produção de chás verde e preto. O chá verde propriamente dito é feito de folhas mais novas e tenras. As catequinas do chá verde incluem, por exemplo, a catequina (C), a galocatequina (GC), a epicatequina (EC), a epigalocatequina (EGC), a epicatequina galato (ECG) e a epigalocatequina galato (EGCG) (Lunder, 1992; Balentine, 1992) (Figura 13).



**Fig 12 - Estrutura das catequinas e teaflavinas (Lunder, 1992; Balentine, 1992).**

A EGCG corresponde a mais abundante catequina do chá verde (50-60%) (Lunder, 1992). O teor de catequina no vegetal depende de alguns fatores externos tais como a forma do processamento das folhas antes da secagem, a localização geográfica do plantio e as condições de cultivo (Mckay *et al.*, 2002). A diferença da matéria-prima reflete-se no sabor, cor e, possivelmente, nos teores de catequinas. O chá verde é uma infusão de folhas apenas secas, enquanto que o chá preto provém de folhas processadas. No processamento, as catequinas das folhas sofrem oxidação, o que é muito importante para o desenvolvimento de cor e sabor da bebida. A oxidação é enzimática por ação da polifenoloxidase presente nos vacúolos das células. Para a enzima ser liberada destes vacúolos, as folhas secas são trituradas e deixadas expostas ao oxigênio do ar (Takeo, 1992).

Yao *et al.* 2004, analisaram por HPLC os flavonóis e os ácidos fenólicos em folhas frescas de *Camellia sinensis* crescida na Austrália. A tabela 5 mostra os tempos de retenção, os dados espectrais e as identidades para os picos observados no cromatograma.

**Tabela 5 - Tempos de retenção e identidade dos picos observados no cromatograma (Yao *et al.*, 2004).**

Pico	Tempo (min)	Pico máximo (nm)	Identidade	Pico máximo (nm) na literatura
1	2.43	236, 271	Teogalino	276 <sup>b</sup> , 226.5 <sup>c</sup> , 274.5 <sup>c</sup> , 275 <sup>f</sup>
2	3.09	232, 273	Ácido gálico	272 <sup>a</sup> , 273 <sup>b</sup> , 226.5 <sup>c</sup> , 270.5 <sup>c</sup>
3	4.53	233, 272	Teobromina	226.5 <sup>c</sup> , 272.5 <sup>c</sup>
4	4.97	235, 289sh, 323	Ácido isoclorogênico	296.5 <sup>c</sup> , 324.5 <sup>c</sup>
5	5.60	234, 275	Galocatequina (GC)	271 <sup>a</sup>
6	6.30	235.5, 269	Epigalocatequina (EGC)	271 <sup>a</sup> , 272 <sup>b</sup>
7	7.58	233, 263	Catequina (C)	280 <sup>a</sup>
8	8.28	234, 283, 325	Ácido <i>p</i> -coumarilquinínico	313 <sup>b</sup> , 228.5 <sup>c</sup> , 310.5 <sup>c</sup> , 314 <sup>c</sup>
9	9.14	235, 301sh, 325	Ácido clorogênico	292.5 <sup>c</sup> , 320.5 <sup>c</sup>
10	10.48	234, 270	Cafeína	226.5 <sup>c</sup> , 272.5 <sup>c</sup>
11	11.78	236, 272	Epigalocatequina galato (EGCG)	275 <sup>a</sup> , 279.5 <sup>a</sup> , 277 <sup>b</sup> , 226.5 <sup>c</sup> , 274.5 <sup>c</sup>
12	12.50	234, 277	Epicatequina (EC)	280 <sup>a</sup>
13	13.42	234, 310	Ácido <i>p</i> -coumárico	
14	15.71	232.5, 276	Ácido 3-( <i>p</i> -hidroxifenilpropiónico) (3PA)	
15	16.00	235, 273	Galocatequina galato (GCG)	
16	18.06	257, 306sh, 354	Quercetina 3-ramnosilglicosídeo (Q3RG)	256.5 <sup>c</sup> , 264 <sup>sh,c</sup> , 352.5 <sup>c</sup> , 259 <sup>e</sup> , 266 <sup>sh,e</sup> , 359 <sup>e</sup>
17	18.77	237, 275	Epigalocatequina 3,5-digalato (EGCDG)	283 <sup>d</sup>
18	20.67	234, 275.5	Epicatequina galato (ECG)	280 <sup>a</sup> , 226.5 <sup>c</sup> , 276.5 <sup>c</sup> , 279 <sup>d</sup>
19	21.75	233, 277	Catequina galato (CG)	
20	22.75	255, 265sh, 353	Quercetina 3-glicosídeo (Q3G)	256.5 <sup>c</sup> , 264 <sup>sh,c</sup> , 354.5 <sup>c</sup> , 257 <sup>e</sup> , 269 <sup>x,e</sup> , 362 <sup>e</sup>
21	23.76	254, 262sh, 352.5	Quercetina glicosídeo (QG)	256.5 <sup>c</sup> , 264 <sup>sh,c</sup> , 352.5
22	27.44	266, 346	Kaempferol 3-ramnosilglicosídeo (K3RG)	264.5 <sup>c</sup> , 344.5 <sup>c</sup>
23	28.57	264, 346	Kaempferol glicosídeo (KG)	264.5 <sup>c</sup> , 344.5 <sup>c</sup>
24	29.31	233, 278	Epicatequina 3,5-digalato (ECDG)	282 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Bradfield and Penny (1948)

<sup>b</sup> Roberts and Williams (1958)

<sup>c</sup> Bailey et al. (1990)

<sup>d</sup> Coxon et al. (1972)

<sup>e</sup> Mabry et al. (1970)

<sup>f</sup> Cartwright and Roberts (1954a, 1954b)

As catequinas são compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e a adstringência do chá verde (Balentine *et al.*, 1997). As teaflavinas são compostos responsáveis por parte da cor (alaranjada) e sabor (adstringência) da infusão (Collier *et al.*, 1973) de chá preto. Como esperado, os chás verdes não apresentaram teaflavinas. Em compensação, os chás pretos contêm menos catequinas, indicando a transformação destas em teaflavinas por condensação. As estruturas destes dois grupos de compostos estão representadas na Figura 13 (Matsubara *et al.*, 2006).

A atividade antioxidante das catequinas pode prevenir a citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo em diferentes tecidos (Skrzydowska *et al.*, 2002; Asfar *et al.*, 2003; Rah *et al.*, 2005). As propriedades antioxidantes do chá verde têm sido apontadas como o principal fator contribuinte na prevenção e/ou no tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e outras (Miura *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002).

Estudos em animais e em seres humanos revelaram que o consumo de chá verde pode elevar a capacidade antioxidante no plasma (Leenen *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2000; Skrzydowska *et al.*, 2002). As catequinas do chá verde têm sido descritas como eficazes neutralizadores de diferentes espécies reativas tais como o superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, óxido nítrico e peroxinitrito (Guo *et al.*, 1999; Nanjo *et al.*, 1999; Valentão *et al.*, 2003; Rah *et al.*, 2005; Bixby *et al.*, 2005). Além disso, estes flavanóis também são capazes de interromper a peroxidação de lipídeos e atenuar o consumo de vitamina E (Salah *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1999; Miura *et al.*, 2001).

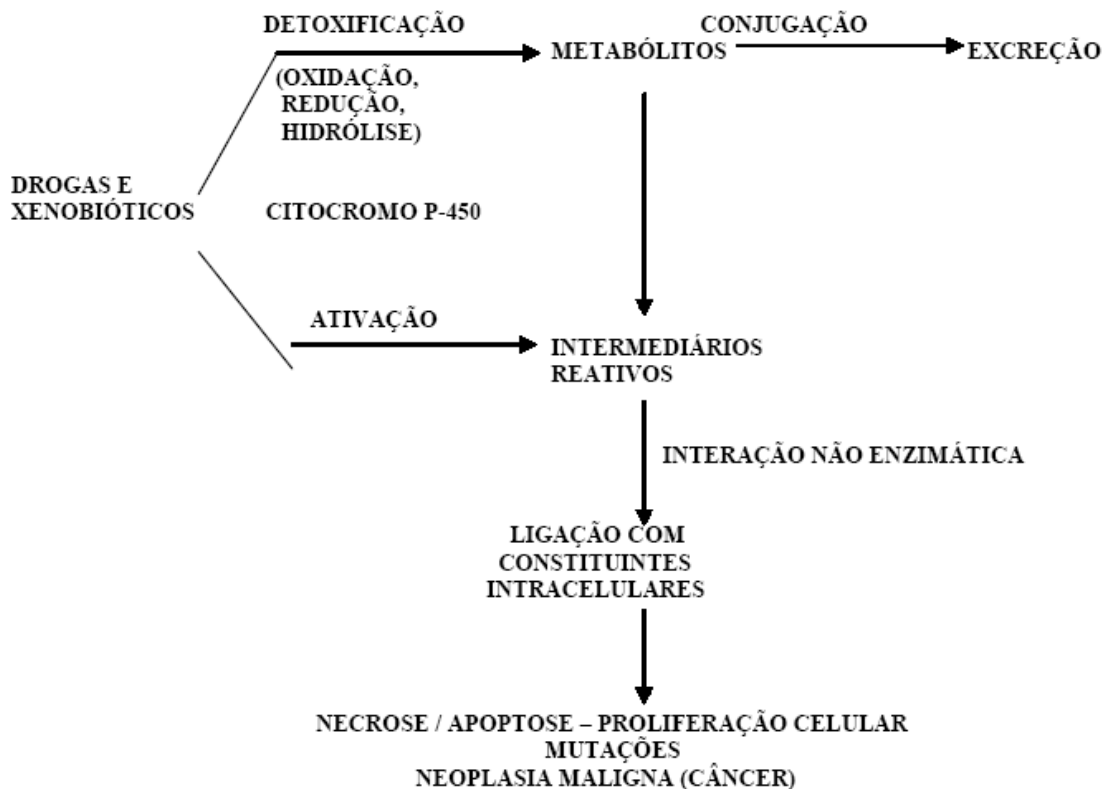
Estudos *in vitro* encontram-se bem avançados, mostrando possíveis mecanismos de ação contra o câncer, em todas as etapas do desenvolvimento da doença: iniciação, promoção e propagação (Dreosti, 1996). Vários destes trabalhos utilizaram extratos de chás, mas atribuíram o efeito protetor às catequinas e teaflavinas. Em ratos, os estudos com epigalocatequina galato são predominantes, possivelmente pelo seu teor maior dentre as catequinas em chá verde. Este composto impediu o crescimento de tumores de fígado (Nishida *et al.*, 1994) e intestino (Fujita *et al.*, 1989).

Há evidências de que as catequinas do chá verde podem exercer efeitos modulatórios na atividade das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase, o que pode estar associado ao aumento da expressão de enzimas detoxificadoras induzido por flavonóides (Canivenclavier *et al.*, 1996). Estes resultados sugerem, portanto, que a atividade antioxidante dos flavonóides do chá verde, além de ocorrer diretamente, por meio da neutralização de espécies reativas, pode se processar através de mecanismos indiretos, como, por exemplo, a preservação e modulação de enzimas antioxidantes (Skrzydowska *et al.*, 2002). Além disso, existem relatos de que os polifenóis do chá verde podem inibir a atividade de enzimas envolvidas com a produção de EROs, como, por exemplo, a ciclooxigenase-2, a lipooxigenase e a xantina oxidase (Aucamp *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2001). A EGCG apresentou-se como o mais potente inibidor da xantina oxidase, em comparação com outras catequinas (ECG, EGC, EC e C) (Aucamp *et al.*, 1997).

Estudos em animais ou em seres humanos revelaram que, após o consumo de chá verde, as principais catequinas detectadas no plasma incluem a EGC, a EC, a EGCG, a ECG, além de seus metabólitos. O tempo necessário para que as formas livres de catequinas atinjam a concentração máxima no plasma varia de 1,3 – 2 h (Chen, 1997; Lee *et al.*, 2002b). Embora a EGCG seja o flavanol mais abundante no chá verde, a sua taxa de absorção e a concentração máxima no plasma, após a ingestão da bebida, são inferiores às da EGC e da EC. Por outro lado, a meia-vida de eliminação da EGCG é maior do que a da EGC e da EC (3,4 h, 1,7 h e 2,0 h, respectivamente) (Chen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002b). Além disso, diferente das demais catequinas, a EGCG circula principalmente na forma livre (Lee *et al.*, 2002b). Após a sua absorção e metabolização, as catequinas circulam no plasma, principalmente, na forma de metabólitos glicuronados e/ou metilados (Piskula & Terao, 1998; Donovan *et al.*, 2001). Entretanto, investigações da farmacocinética das catequinas sugeriram que a absorção, distribuição e eliminação desses compostos diferem entre si (Chen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002b; Lu *et al.*, 2003). Além disso, diferenças em parâmetros farmacocinéticos também são observadas quando os polifenóis do chá verde são administrados na forma de substância isolada ou *in natura* (Chen *et al.*, 1997). O principal metabólito detectado no plasma e

urina de seres humanos, após o consumo de chá verde, foi o 4'-O-metil-EGC (Meng *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002b).

As catequinas são metabolizadas através das enzimas hepáticas. A bioativação dos agentes procarcinogênicos e conseqüente ativação das mesmas, é feita por meio das enzimas metabolizadoras hepáticas (Fase I). Maliakal, Couville e Wanwimolruk (2001) investigaram a hipótese de modulação dessas enzimas da Fase I e da família citocromo P450, após consumo de chá verde em ratos Wistar. Foram avaliadas as isoenzimas P450 (CYP) e a atividade das enzimas da Fase II, (Figura 14) por incubação dos microsossomos hepáticos ou citosólicos com substratos apropriados. O CYP1A2 teve sua atividade enzimática aumentada em todos os grupos e o CYP1A1 na maioria dos grupos. A ação das catequinas como moduladoras das enzimas das fases I e II diminui o risco de câncer quimicamente induzido (Allen *et al.*, 2001). Os mesmos autores realizaram experimentos para definir o efeito do chá verde no aumento da expressão do citocromo P450 (CYP1A1) , utilizando células hepáticas e detectaram aumento de 2 a 3 vezes na atividade enzimática do CYP1A1. Esses resultados, comparados com os de outros extratos vegetais e agentes químicos, demonstram que o chá verde apresentou aumento de duas vezes da sua atividade, enquanto com as outras substâncias o aumento foi de 10 a 35 vezes, sugerindo a ação do chá verde como modulador hepático.



**Figura 13 - Ativação de pró-cancerígeno pelo Sistema Metabolizador de Drogas Hepático (MFO) (Maliakal, Couville e Wanwimolruk, 2001).**

Das *et al.*, 2005, avaliaram o potencial fitoestrogênico do extrato aquoso do chá preto (*Camellia sinensis*) em modelos de ratas ovariectomizadas bilateralmente (2.5%, 1 mL/100g peso corporal por 28 dias). Isto foi acompanhado por um aumento significativo no nível do estradiol sérico. Para testar se este aumento no nível do estradiol do soro sofreria influência dos danos da ovariectomia, os autores avaliaram parâmetros de marcadores de reabsorção óssea e da atividade osteoclástica (fosfatase ácida tartarato-resistente), degradação do colágeno (hidroxiprolina urinária), perda óssea (índice mineral de cinza do osso) e a força do osso quebrando (densidade do osso). Os resultados indicaram que o aumento no nível do estradiol do sérico depois do tratamento com extrato aquoso do chá preto (*Camellia sinensis*) poderia diminuir significativamente a deterioração que a ovariectomia produzia no osso. Este estudo propõe que o extrato aquoso do chá preto (*Camellia sinensis*) pode ser avaliado como um composto fitoestrogênico para a prevenção dos danos da osteoporose provocados pela deficiência de estrógeno.

**Tabela 6 – Efeito do extrato aquoso do chá preto (*Camellia sinensis*) nas mudanças induzidas pela ovariectomia nos níveis de estradiol sérico, fosfatase ácida tartarato-resistente, hidroxiprolina urinária, densidade óssea, cálcio ósseo e fosfato ósseo em diferentes grupos de ratas (n = 7) (Das *et al.*, 2005).**

	<b>Controle (Grupo A)</b>	<b>Ovariectomizadas (Grupo B)</b>	<b>Ovariectomizadas + Chá-preto (Grupo C)</b>
Estradiol sérico (pg/ml)	73.69 ± 2.37	14.50 ± 1.46	38.24 ± 6.66
TRAP sérica (U/L)	0.858 ± 0.067	1.406 ± 0.098	0.866 ± 0.053
Hidroxiprolina urinária (mg/24 h)	0.342 ± 0.035	0.725 ± 0.064	0.378 ± 0.059
<b>Densidade óssea (g/cm<sup>3</sup>)</b>			
Fêmur	1.430 ± 0.384	1.191 ± 0.022	1.314 ± 0.019
Costela torácica	1.628 ± 0.050	1.330 ± 0.023	1.517 ± 0.028
Vértebra Torácica	1.371 ± 0.035	1.188 ± 0.030	1.279 ± 0.007
Vértebra lombar	1.251 ± 0.010	1.145 ± 0.016	1.254 ± 0.023
	<b>Controle (Grupo A)</b>	<b>Ovariectomizadas (Grupo B)</b>	<b>Ovariectomizadas + Chá-preto (Grupo C)</b>
<b>Cálcio ósseo (%)</b>			
Fêmur	23.37 ± 0.49	18.92 ± 0.51	23.00 ± 0.69
Costela torácica	36.45 ± 0.70	24.90 ± 0.25	32.04 ± 1.18
Vértebra Torácica	22.01 ± 0.42	11.84 ± 0.55	21.31 ± 0.15
Vértebra lombar	21.09 ± 0.77	17.64 ± 0.40	21.38 ± 0.67
<b>Fosfato ósseo (%)</b>			
Fêmur	20.24 ± 0.46	18.11 ± 0.52	21.57 ± 0.28
Costela torácica	23.33 ± 0.21	20.80 ± 0.43	22.64 ± 0.24
Vértebra Torácica	20.54 ± 0.22	17.16 ± 0.52	20.98 ± 0.08
Vértebra lombar	20.50 ± 0.45	16.50 ± 0.20	20.29 ± 0.47

Pang *et al.* 2006 testaram a atividade diferencial dos flavonóides kaempferol e quercetina na atenuação da via sinalizadora da família de receptores do fator- $\alpha$  de necrose tumoral em células ósseas. Estes dois flavonóides estão presentes em *Camellia sinensis* e segundo estes pesquisadores o kaempferol exerce um profundo efeito anti-osteoclastogênico

agindo sobre os osteoclastos e osteoblastos. O kaempferol, mas não a quercetina, dose dependente, inibe a produção do fator- $\alpha$  de necrose tumoral que é induzida por citocinas osteoclastogênicas, interleucina 6 e monócitos quimioatraentes proteína 1 (MCP-1 CCL2) em osteoblastos. Também se observou que tanto a quercetina quanto o kaempferol, inibem a expressão de RANKL, um dos marcadores da diferenciação osteoclástica e ainda inibem receptores de RANK e calcitonina. Quercetina e kaempferol também mostraram poder de inibir a reabsorção óssea osteoclástica e apoptose, provavelmente via efeito estrogênico como relatado em modelos de osteoclastos em coelhos.

Estudos realizados por Chiba *et al.* (2003), demonstraram que quercetina e rutina inibem a perda óssea trabecular. Notoya *et al.*, relata efeitos inibitórios da quercetina na formação de células ligadas aos osteoclastos. Estes efeitos são observados através do tratamento com receptor ativador do fator nuclear Kappa B presente em macrófagos. Foi observado também os efeitos destes flavonóides no decréscimo de proliferação, diferenciação e mineralização de células osteoblásticas de calvária de ratos.

O chá verde é produzido a partir das folhas frescas da planta *Camellia sinensis* (Yang & Wang, 1993). As folhas desta planta são fermentadas através de um processo que previne a oxidação e a polimerização dos polifenóis da planta. São estes compostos que são considerados como os principais mediadores quimioprotetores. O chá verde contém quatro polifenóis principais: (-)epicatequina (EC), (-)epicatequina-3-galato (ECG), (-)epigallocatequina (EGC), e (-)epigallocatequina-3-galato (EGCG). Contem também outros agentes que têm atividades quimioprotetoras. Estes incluem a cafeína, os flavonodióis, os flavonóides, ácidos fenólicos assim como os alcalóides teofilina e teobromina (Lu *et al.*, 2002). São os polifenóis, entretanto, que têm o maior efeito com respeito à quimioproteção. Os chás preto e outros tipos de chá, tem também atividades quimioprotetoras, que são atribuídas primeiramente à cafeína, às tearubiginas e teaflavinas (Hebert *et al.*, 2005).

Morazzoni *et al.*, 1995 e Makimura *et al* 1993 relatam pesquisas sobre o efeito inibitório de compostos bioativos do chá verde (*Camellia sinensis*) sobre a atividade da enzima colagenase. Atribui estes efeitos como benéficos para osteoporose e o uso destes produto na cosmética. Demonstraram que os

polifenóis e flavonóides aí presentes têm habilidade de inibir atividade enzimática de diversas metaloproteinases especificamente a colegenase, uma enzima responsável pela degradação de componentes estruturais da matriz extracelular (colágeno) e do endotélio vascular. Suas ações têm sido atribuídas a galatoepicatequina e galatoepigallocatequina. Também relatam que seus extratos podem ser utilizados em produtos anti-envelhecimento (cosmética) para reduzir os efeitos de metaloproteinases da pele. Craig *et al* 2001, relatam também que extratos de *C. sinensis* possuem ações fotoprotetoras reduzindo a formação de eritemas na pele. Seus mecanismos de ação são baseados na atividade antioxidante, efeitos imunorregulatórios e em sua habilidade de inibir a infiltração de macrófagos induzidos por radiação UVB na pele.

O chá verde e seus constituintes polifenólicos reduzem o número de queratinócitos da epiderme que são células que estão sofrendo apoptose (Schwarz *et al.*, 1995). O tratamento com EGCG tópico resultou em uma redução da apoptose de queratinócitos *in vivo*, com irradiação direta na pele de luz UV (Elmets *et al.*, 2001). Uma análise mais adicional mostrou que seu efeito antiapoptótico *in vitro* esteve ligado a um aumento na expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 e por uma diminuição na proteína pro-apoptótica Bax, induzido por EGCG (Chung *et al.*, 2003). Em contraste a seu efeito em queratinócitos normais, EGCG estimula a apoptose em papilomas pre-malígnos e carcinomas ecamosos invasivos induzidos por UV células de ratos (Chen *et al.*, 1998). Propôs-se que este efeito diferencial na apoptose em queratinócitos malignos contra queratinócitos benignos é responsável, ao menos em parte, pelos efeitos quimioprotetores de EGCG na fotocarcinogênese. Um outro problema da exposição de radiação UVB *in vivo* é o desenvolvimento de uma resposta inflamatória profunda que consiste no influxo de neutrófilos e de macrófagos no local da pele irradiada com UV. A resposta inflamatória contribui para a patogênese da fotocarcinogênese e da supressão imune. Aplicação dos polifenóis do chá verde à pele assim como a administração como chá tomado oralmente, reduzem bastante a resposta inflamatória causada pela radiação de UV (Katiyar *et al.*, 2001). Um efeito similar foi observado nos seres humanos (Katiyar *et al.*, 1999). O efeito de EGCG na migração de neutrófilos foi estudado *in vitro* em câmaras de Boyden e *in vivo* em um modelo de inflamação alérgica de ratos (Takano *et al.*, 2004). Em ambos os estudos,

EGCG teve efeitos inibitórios. Um outro tipo de célula que migra na pele seguindo a radiação UV é o macrófago CD11b<sup>+</sup> (Katiyar *et al.*, 2001; Katiyar *et al.*, 1999). O macrófago CD11b<sup>+</sup> serve como célula apresentadora de antígeno que é responsável para a apresentação do antígeno aos linfócitos T em mecanismos de respostas imunes. É também uma fonte potente de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico na pele irradiada por UV (Mittal *et al.*, 2003). Assim, com sua habilidade de deter o movimento dos macrófagos CD11b<sup>+</sup> na pele irradiada por UV, EGCG reverte a imunossupressão induzida pelo UV e reduz a produção de intermediários reativos do oxigênio. As células de Langerhans são células derivadas da medula óssea que residem na epiderme por longos períodos de tempo e servem como contrapartida para a produção dos macrófagos CD11b<sup>+</sup>; estas células ativam as células que servem como efetoras para processos imunológicos celulares. As células de Langerhans são extraordinariamente suscetíveis a ferimento UV, e os danos a este tipo de célula representam um papel chave no desenvolvimento da supressão imune induzida por UV. Além disso, os efeitos deletérios da radiação UV em células de Langerhans são fatores de contribuição importantes à patogênese do câncer de pele induzido por radiação UV e à redução em respostas imunes celulares encontrados pela pele (Elmets *et al.*, 2001). Os estudos mostraram que aplicação do chá verde à pele humana antes da exposição à radiação UV conduz um aumento em densidades das células de Langerhans perto do que é visto na pele normal.

A pesquisa dos efeitos bioquímicos de citocinas nas últimas duas décadas mostrou que a supressão imune induzida pela radiação de UV está mediada, ao menos em parte, por alterações na produção de uma variedade de citocinas diferentes derivadas da pele e que estes efeitos contribuem ao desenvolvimento do câncer da pele induzido por UV (Schade *et al.*, 2005). Foi mostrado que o chá verde e seus constituintes polifenólicos inverteram os efeitos imunossupressores da radiação UV, portanto houve um interesse considerável em definir os efeitos do chá verde em modificações induzidas por UV na produção de citocinas. De interesse particular foram os efeitos das interleucinas (IL)-10 e -12. IL-10 é um citocina de 18 kDa que regula a hipersensibilidade alérgica de contato e outras respostas imunes celulares (Moore *et al.*, 1993). Já a IL-12, facilita a indução e o

desencadeamento das respostas imunes celulares (Moore *et al.*, 1993). *In vitro* a exposição dos queratinócitos à radiação UVB resulta na produção de IL-10 (Enk *et al.*, 1995). Quando injetadas em ratos, as IL-10 causam imunossupressão sistêmica. A administração sistêmica dos anticorpos anti-IL-10 aos ratos provocam a inibição da resposta de hipersensibilidade induzida por UV (Rivas *et al.*, 1992). A IL-12 inverte os efeitos imunossupressores da radiação UVB nas respostas imunes celulares cutânea (Schmitt *et al.*, 1995). Por exemplo, a administração de anticorpos anti-IL-12 *in vivo* antes que a presença do alérgeno impeça a sensibilização e a administração sistêmica de IL-12 recombinante impede a supressão imune induzida por UV e superam a tolerância hapteno-específica produzida (Riemann *et al.*, 1996). A evidência indica que a supressão imune induzida por UV está mediada, ao menos em parte, por um aumento na produção de IL-10 e por uma redução nos níveis IL-12 (Katiyar *et al.*, 1999). O uso de EGCG mostrou mudar a relação entre estas duas citocinas, reduzindo a produção de IL-10 e aumentando IL-12. Como foi mencionado, os macrófagos CD11b<sup>+</sup> migram na epiderme depois da exposição de UVB (Kang *et al.*, 1994), e EGCG inibe a migração destas células na epiderme (Katiyar *et al.*, 1999). Assim, limita a quantidade de IL-10 encontrada na pele. A aplicação tópica de EGCG aumenta extremamente a produção de IL-12 quando comparados com os ratos tratados com o UVB por drenar os linfonodos (Katiyar *et al.*, 1999). EGCG não é eficaz em inibir a resposta e a fotocarcinogênese provocada por queimaduras solares, indicando que a produção destas citocinas é um intermediário necessário nos efeitos de fotoproteção dos polifenóis do chá-verde. Uma análise mais adicional mostrou que além a promover repostas imunes celulares, IL-12 produzidas através da utilização de EGCG aumentam a síntese de enzimas que reparam os danos UV induzidos no DNA (Meeran *et al.*, 2006).

A radiação UV provoca danos ao DNA de células cutâneas sendo os mais freqüentes os dímeros de pirimidina. Os dímeros de pirimidina estão envolvidos na iniciação da imunossupressão induzida por UV (Kripke *et al.*, 1992) assim como várias formas de câncer de pele (Yarosh *et al.*, 2001). Diversos estudos demonstraram os efeitos fotoprotetores de polifenóis do chá-verde do em impedir os danos no DNA induzidos por UV. No estudo *in vitro* usando células humanas cultivadas (fibroblastos de pulmão, fibroblastos da

pele, e queratinócitos da epiderme), EGCG resultou em uma redução dose-dependente dos danos induzidos por UV no DNA de todos os três tipos de células (Morley *et al.*, 2005). Os polifenóis do chá-verde também inibiram significativamente os danos no DNA induzidos por UVB quando aplicados topicamente na epiderme de ratos (Chatterjee *et al.*, 1996). A aplicação de polifenóis do chá-verde à pele provou ser mais eficaz em proteger os danos do DNA induzidos por UV *in vivo*. Quando aplicados topicamente à pele humana 30 minutos antes da exposição UV, os polifenóis do chá-verde reduziram os danos do DNA induzidos por UV (Elmets *et al.*, 2001). Em outro estudo *in vivo*, a pele humana foi tratada com os polifenóis do chá-verde antes da exposição UV. O tratamento com os polifenóis do chá-verde inibiu a indução da formação dos dímeros de pirimidina provocados pela radiação UVB na epiderme e na derme, incluindo a derme mais profunda. Em resposta aos danos do DNA, aumenta os níveis da proteína p53 e induz a síntese de p21, um inibidor de quinases ciclo-dependentes, conduzindo à parada do ciclo celular (Yusuf *et al.*, 2007).

Diversos caminhos diferentes de sinais celulares de transdução são ativados depois da exposição UV, e assim, a radiação UV transmite sinais de membrana do plasma ao núcleo, conduzindo finalmente a uma resposta celular (Bode & Dong, 2000). As mudanças produzidas pela ativação destes caminhos foram relacionadas ao envelhecimento da pele, ao crescimento do câncer e à invasão, à sobrevivência celular, à proliferação celular e a determinados tipos de danos ao DNA. Os polifenóis do chá-verde mostraram afetar múltiplas etapas em vários caminhos da transdução de sinais. Pensa-se que a inibição de diversos destes caminhos contribui em um significativo mecanismo de efeitos fotoprotetores *in vivo* e *in vitro*. Alguns dos principais caminhos de transdução de sinais alterados pelos polifenóis do chá-verde são p53 e moléculas regulatórias dos ciclos celulares como MAP quinase (Mitógenos ativados por proteínas quinase), NF- $\kappa$ B (fator nuclear Kappa B), AP-1 (família de fatores de transcrição, envolvidos na proliferação celular) e fosfatidilinositol 3-quinase/Akt (Proteína quinase B) e p70 S6-K (Yusuf *et al.*, 2007).

Para manter a integridade das células saudáveis após os danos do DNA, diversas respostas celulares são ativadas incluindo a remoção do DNA danificado, atraso na progressão do ciclo celular, e reparo do DNA pela

ativação do transcricional de p53, de p21<sup>waf1/cip1</sup>, de MDM2 e das proteínas da família Bcl-2 (Brugarolas *et al.*, 2005; Levine, 1997). A indução de p53 após danos provocados no DNA está associada também com o aumento da apoptose, presumivelmente naquelas células que são danificadas severamente. Os estudos demonstraram que a administração oral do chá verde aos ratos SKH-1 com danos provocados por UV, realçou aumentos no número de células p53-e de p21<sup>waf1/cip1</sup>-positivas na epiderme após a exposição ao UV (Lu *et al.*, 2000). Isto implica que o efeito fotoprotetor do chá verde na carcinogênese induzida por UV pode ser mediado com estímulo e aumentos nos níveis de p53, p21<sup>waf1/cip1</sup> (Yusuf *et al.*, 2007).

A evidência disponível indica que o chá-verde tem muitos efeitos biológicos que melhoram os efeitos prejudiciais da radiação de UVA e de UVB. Estas atividades biológicas diferem daquelas de fotoprotetores tradicionais. Os polifenóis do chá-verde têm assim o potencial, quando usados conjuntamente com os fotoprotetores tradicionais, para proteger mais a pele de encontro aos efeitos adversos da radiação ultravioleta (Yusuf *et al.*, 2007).

### 3) OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve como finalidade estudar a influência do alendronato de sódio, sinvastatina, flavonóide crisina e do extrato hidroalcoólico da planta *Camellia sinensis* utilizado isoladamente e em associação, em ratas com osteoporose induzida por glicocorticóide.

### **3.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.1.1) Desenvolvimento de novos produtos para o tratamento da osteoporose a partir de formas farmacêuticas de origem vegetal, animal e sintética, buscando um medicamento mais acessível à população.

3.1.2) Realização ensaios biológicos para determinações dos efeitos anti-osteoporóticos.

3.1.3) Avaliação de parâmetros hematológicos sanguíneos e quantificação bioquímica dos níveis séricos de cálcio, fósforo, glicose, fosfatase alcalina total, uréia, creatinina, proteínas, colesterol total, triacilgliceróis, gama GT e albumina.

3.1.4) Realização análises da histopatologia dos ossos.

#### 4) MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de alendronato de sódio e sinvastatina (isoladamente e em associação), do extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* e do flavonóide crisina sobre o metabolismo ósseo de ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 60 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 análises bioquímicas do plasma e análise hematológica do sangue foram realizadas no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. As análises morfológicas através da microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Em todos os experimentos, os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo em cada uma sete 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. Após o período de indução, 3 animais foram eutanasiados, para verificarmos a eficácia da indução.

As dosagens utilizadas nos experimentos foram calculadas fazendo correspondência do peso e metabolismo dos animais à dosagem usual recomendada para humanos. Desta forma as doses utilizadas no experimento foram: alendronato de sódio (0,20 mg; 0,40 mg e 0,60 mg), sinvastatina (0,40 mg; 0,70 mg e 1,0 mg); crisina (35mg; 60 mg e 90 mg) e extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* (0,01 mg; 0,02 mg e 0,03 mg), sendo que todas essas substâncias foram administradas diariamente por via oral, durante 30 dias.

#### **4.1) Experimento para avaliar o efeito de Alendronato de sódio e associação de Alendronato de sódio + Sinvastatina, Crisina e Extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis*, na osteoporose induzida por dexametasona (D)**

Para a realização desse experimento foram utilizadas 98 ratas. Após o período de indução da osteoporose, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatorze grupos, contendo cada um sete animais:

**G1** = Ração + D (Controle com osteoporose)

**G2** = Ração (Controle)

**G3** = Ração + D + Alendronato de sódio dose 1

**G4** = Ração + D + Alendronato de sódio dose 2

**G5** = Ração + D + Alendronato de sódio dose 3

**G6** = Ração + D + Alendronato de sódio dose 1+ sinvastatina dose 1

**G7** = Ração + D + Alendronato de sódio dose 2+ sinvastatina dose 2

**G8** = Ração + D + Alendronato de sódio dose 3+ sinvastatina dose 3

**G9** = Ração + D + Crisina dose 1

**G10** = Ração + D + Crisina dose 2

**G11** = Ração + D + Crisina dose 3

**G12** = Ração + D + Extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* dose 1

**G13** = Ração + D + Extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* dose 2

**G14** = Ração + D + Extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* dose 3

#### **4.2) Coleta de material para análises**

Ao completar 30 dias a partir da data de início do tratamento, os sete animais de cada grupo foram eutanasiados por sobredosagem anestésica, utilizando 180 mg/Kg de Ketamina e 10 mg/Kg de Xilasina, administrados por via intraperitoneal.

Foram coletados, então, de cada animal, 5,0 mL de sangue por punção cardíaca, para quantificação bioquímica dos níveis séricos de cálcio, fósforo, glicose, fosfatase alcalina total, uréia, creatinina, proteínas totais, colesterol

total, triacilgliceróis, gama GT e albumina sérica. Após a eutanásia, foi coletado o fêmur esquerdo de 3 animais de cada grupo para análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura.

#### **4.3) Análise dos constituintes sanguíneos**

Após a coleta, o sangue de cada animal foi acondicionado em 2 tubos de ensaio. O primeiro contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) foi destinado a análise hematológica e o segundo, foi centrifugado a 7100 x g por 15 minutos à temperatura ambiente, para obtenção do soro.

A análise hematológica foi realizada através de método automatizado utilizando o equipamento HUMANCOUNT nº de série 902405, ANVISA/M.S. 10302240177.

Para determinar as concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo, glicose, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, proteínas totais, colesterol total, triacilgliceróis, gama GT e albumina, foi utilizado o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé) e “kits” da marca BioMérieux e Bioclin.

#### **4.4) Microscopia eletrônica de varredura**

Para a análise em microscopia eletrônica de varredura, os ossos foram desengordurados com éter de petróleo 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 a realização desta análise, as amostras foram descongeladas e retirada toda a umidade em estufa a 45°C até peso constante. Posteriormente foram preparadas para a visualização em MEV (microscópio eletrônico de varredura) por montagem de modo adequado no suporte porta-amostras (“stub”) e cobertas com uma fina camada de ouro (20-30 nm de espessura), com o objetivo de prover ou aumentar a condutividade da superfície da amostra. O MEV utilizado para realizar este tipo de análise foi o LEO 1430 VP.

#### **4.5) Análise estatística**

Os experimentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com quatorze tratamentos em sete repetições.

Foi realizada a análise de variância dos dados e nos casos em que a interação tratamentos x tempos foi significativa, efetuou-se o desdobramento da mesma. Cada grupo tratado foi comparado com os grupos controle com osteoporose (G1) pelo teste de Dunnett, considerando 5% de significância.

## 5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1) Análise dos Parâmetros Hematológicos

A tabela 7 mostra os valores dos parâmetros normais de referência, das séries hematológicas (branca e vermelha), plaquetas e proteínas totais, do sangue de ratas da raça Wistar com idade entre 50-77 dias, para eventual comparação com os resultados obtidos neste experimento.

**Tabela 7** – Parâmetros sanguíneos normais de referência de ratas da raça Wistar (Feldman, *et al.* 1986 – Veterinary Hematology).

<i>Valores de referência</i>			
<b>Série vermelha</b>		<b>Série branca</b>	
RBC	7,71 x 0,65 (x10 <sup>6</sup> µL)	Neutrófilos	14,9 ± 6,2 (%)
HB	15,2 ± 1 (g/dL)	Linfócitos	82,5 ± 6,7 (%)
MCV	62 ± 3,4 (fL)	Monócitos	1,7 ± 1,8 (%)
MCHC	31,8 ± 1,4 (%)	Eosinófilos	0,9 ± 0,8 (%)
Reticulócitos	3 ± 1,7 (%)	Basófilos	0,04 ± 0,13 (%)
<i>Valores de referência</i>			
Plaquetas	10 <sup>26</sup> ± 179 (x10 <sup>3</sup> µ)		
Proteínas totais	7,1 ± 0,4 (g/dL)		

A tabela 8 mostra os valores médios de leucócitos totais e suas respectivas percentagens de variação. Os animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) tiveram uma redução significativa no conteúdo médio dos leucócitos em relação aos animais do G2 (normal), o que pode ser devido à utilização da dexametasona em dosagem superior à terapêutica para a indução da osteoporose.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o G6 (Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1) obteve uma maior percentagem de redução de leucócitos totais (25%) em relação ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Já o G10 (Flavonóide dose 2) foi o que mais aumentou este parâmetro (32%) em relação ao G1. Todos os tratamentos apresentaram variações estatisticamente significativas quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

Todos os grupos tratados com flavonóide (G9, G10 e G11) recuperaram o conteúdo de leucócitos, para valores próximos ou acima do normal (G2), o que pode ser indicativo de que estas substâncias não causam depressão do estado imunológico destes animais.

**Tabela 8 – Valores médios de leucócitos totais (WBC) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (10 <sup>3</sup> µ)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	5,23 A	-
G2-Ração	5,98 B	+ 14
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	4,60 B	- 12
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	4,53 B	- 13
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	6,86 B	+ 31
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	3,91 B	- 25
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	6,02 B	+ 15
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	6,46 B	+ 24
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	6,24 B	+ 19
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	6,92 B	+ 32
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	5,84 B	+ 12
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	5,42 B	+ 4
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	5,14 B	- 2
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	5,87 B	+ 12

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Leucograma é a parte do hemograma que inclui a avaliação dos glóbulos brancos. Compreende as contagens global e diferencial dos leucócitos, além da avaliação morfológica do esfregaço sanguíneo ao microscópio. Este exame

é indicado no diagnóstico a acompanhamento dos processos infecciosos, inflamatórios, alérgicos, tóxicos e neoplásicos. Os valores de referência para leucócitos totais e para os diferentes tipos leucocitários variam com a idade. A contagem relativa dos leucócitos é de uso corrente na prática clínica, mas pode não traduzir uma real alteração; esta deve ser comprovada pela contagem absoluta, a qual considera o número global dos leucócitos (Verrastro *et al.*, 2005).

A tabela 9 mostra os valores médios de linfócitos totais e suas respectivas percentagens de variação. Os animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) tiveram um aumento significativo no conteúdo médio dos linfócitos em relação aos animais do G2 (normal). Todas as alterações foram estatisticamente significativas nesta tabela quando comparadas ao G1.

Segundo os resultados desta tabela, o grupo 6 tratado com bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1 foi o grupo que apresentou a maior percentagem de redução de linfócitos (18%) e o flavonóide na dose 2 (G10) aumentou este parâmetro em 30%, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

**Tabela 9 – Valores médios de linfócitos (LIN) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (10 <sup>3</sup> μ)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	3,26 A	-
G2-Ração	2,97 B	- 9
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	3,09 B	- 5
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	2,71 B	- 17
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	3,97 B	+ 22
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	2,67 B	- 18
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	3,47 B	+ 7
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	3,91 B	+ 20
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	3,92 B	+ 18
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	4,24 B	+ 30

G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	3,61 B	+ 11
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	3,37 B	+ 3
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	2,98 B	- 9
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	3,88 B	+ 19

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1 (0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

A linfocitose ocorre em algumas patologias como os linfomas e mononucleose infecciosa. Neste estudo os animais estavam com osteoporose, e o aumento do conteúdo de linfócitos observado na maioria dos tratamentos pode ser devido à utilização da dexametasona em dosagem superior à terapêutica para a indução da osteoporose.

A tabela 10 mostra os valores médios de mielócitos e suas respectivas percentagens de variação. Os animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) tiveram um pequeno aumento no conteúdo médio dos mielócitos em relação aos animais do G2 (normal) não sendo, portanto considerado significativo, mostrando que a administração de dexametasona em altas doses não provocou grandes variações no conteúdo deste parâmetro. Apesar das variações individuais no conteúdo de mielócitos para cada tratamento nenhum deles apresentou significância a 5% quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

De acordo com os resultados observados nesta tabela, observou-se que o G4 (bifosfonato dose 2) reduziu em 67% este parâmetro, quando comparado ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Apesar desta redução não ter sido significativa nas circunstâncias do teste estatístico adotado, destacamos reduções consideravelmente grandes para os tratamentos com Bifosfonato (G3, G4 e G5), o que pode ser entendido como um efeito adverso deste medicamento. O tratamento com Flavonóide na dose 1 (G9) foi o que apresentou menor variação deste parâmetro, reduzindo em 9%, quando comparado ao G1.

**Tabela 10 - Valores médios de mielócitos (MIE) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (10 <sup>3</sup> μ)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	0,43 A	-
G2-Ração	0,41 A	- 6
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	0,20 A	- 53
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	0,14 A	- 67
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	0,26 A	- 40
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	0,22 A	- 48
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	0,20 A	- 53
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	0,34 A	- 20
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	0,39 A	- 9
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	0,21 A	- 51
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	0,23 A	- 48
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	0,31 A	- 28
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	0,27 A	- 38
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	0,30 A	- 31

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

O mielócito é uma célula redonda com núcleo redondo ou oval. Não se visualizam nucléolos, estas células se dividem pouco (apenas uma divisão), são bastante numerosas em esfregaços de medula óssea (Verrastro *et al.*, 2005).

A tabela 11 mostra os valores médios de granulócitos e suas respectivas percentagens de variação. Os animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) tiveram uma redução significativa no conteúdo médio dos linfócitos em relação aos animais do G2 (normal). Observou-se que o G6

(Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1) apresentou a maior percentagem de redução neste parâmetro (18%), já o G10 (Flavonóide dose 2) apresentou a maior percentagem de aumento (61%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos quando comparados ao G1.

**Tabela 11 - Valores médios de granulócitos (GRA) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (10 <sup>3</sup> µ)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	1,76 A	-
G2-Ração	2,04 B	+ 16
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	1,87 B	+ 6
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	1,70 B	- 3
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	2,50 B	+ 42
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	1,45 B	- 18
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	2,38 B	+ 35
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	2,34 B	+ 33
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	1,82 B	+ 3
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	2,84 B	+ 61
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	2,37 B	+ 35
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	2,10 B	+ 19
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	2,02 B	+ 15
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	1,90 B	+ 8

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Bifosfonato dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1 (0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

As células granulocíticas são todas aquelas que possuem granulações ou grânulos no citoplasma. Conforme a natureza e aspecto dessas granulações

tais células são classificadas em neutrófilos, eosinófilos ou basófilos. Além destas, também fazem parte da linhagem granulocítica as células monocitárias e os macrófagos. Estes se originam da mesma célula jovem da medula óssea capaz de se diferenciar em direção aos granulócitos. Os granulócitos eosinófilos e basófilos são células que atuam mais em reações de tipo alérgico ou imunológico, todos os granulócitos são capazes de exercer a fagocitose embora esta seja importante apenas em neutrófilos e macrófagos. (Verrastro *et al.*, 2005).

No microambiente da medula as seguintes células estão presentes: células redondas tipo reticular, histiócitos ou macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos e osteoclastos (células ósseas), raros adipócitos e mastócitos. Com relação à distribuição das células precursoras no interior da medula óssea é importante salientar que há um arranjo preferencial das mesmas. As células pluripotentes têm localização preferencial junto às trabéculas ósseas, tornando-se menos numerosas nas porções distantes destas. Nas regiões mais centrais (região óssea axial), predominam os precursores granulocíticos mais diferenciados e as células maduras que penetram nos vasos venosos sinusoidais centrais e daí entram na circulação (Verrastro *et al.*, 2005). Portanto um indivíduo com uma doença óssea que tivesse sua medula óssea afetada, poderia apresentar uma redução no conteúdo sanguíneo destas células, como foi observado no G1 (grupo com osteoporose não tratado) da tabela 11.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 12 observou-se que o G13 (Fitoterápico dose 2) apresentou uma maior percentagem de redução de eritrócitos totais (13%) e o G11 (Flavonóide dose 3) uma maior percentagem de aumento (12%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

Os animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) tiveram um aumento significativo no conteúdo médio dos eritrócitos totais em relação aos animais do G2 (normal). Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos em relação ao G1.

Como quase todos os tratamentos tiveram aumento deste parâmetro em relação ao conteúdo de eritrócitos totais do G2 (normal) podemos sugerir que a

dexametasona utilizada para induzir a osteoporose, em doses elevadas, causa um aumento da eritropoiese nestes animais.

**Tabela 12 – Valores médios da contagem de eritrócitos totais (RBC) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (10 <sup>6</sup> µ)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	9,73 A	-
G2-Ração	9,02 B	- 7
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	10,24 B	+ 5
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	9,29 B	- 4
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	9,25 B	- 5
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	9,14 B	- 6
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	9,65 B	- 1
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	9,48 B	- 3
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	9,88 B	+ 2
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	10,10 B	+ 4
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	10,88 B	+ 12
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	9,98 B	+ 3
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	8,51 B	- 13
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	10,08 B	+ 4

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Na tabela 13 temos os dados de concentração total de hemoglobina, onde observamos que o G13 (Fitoterápico dose 2) apresentou uma maior percentagem de redução na concentração total de hemoglobina (13%) e o G11 (Flavonóide dose 3) uma maior percentagem de aumento (5%), quando

comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Estes dados coincidem com os grupos que apresentaram as maiores variações na tabela 12 (eritrócitos totais). Isto mostra que o conteúdo de hemoglobina está estreitamente relacionado à contagem de eritrócitos totais presentes no sangue circulante.

Os animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) tiveram um aumento significativo no conteúdo médio dos eritrócitos totais em relação aos animais do G2 (normal). Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos em relação ao G1. Com exceção do G13, todos os outros tratamentos aumentaram os dois parâmetros com pouca percentagem de variação, mostrando que o aumento da eritropoiese foi acompanhado pelo aumento na concentração total de hemoglobina.

A hemoglobina, o principal componente dos eritrócitos, serve como veículo para o transporte de oxigênio e dióxido de carbono. A medida do valor da hemoglobina é o exame mais importante para se avaliar a série vermelha. Quando os valores da hemoglobina estiverem abaixo dos valores normais, respeitadas as variações para sexo e idade pode-se diagnosticar uma anemia (Fischbach, 2005).

**Tabela 13 – Valores médios da concentração total de hemoglobina (HGB) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (g/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	15,73 A	-
G2-Ração	14,03 B	- 11
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	15,86 B	+ 1
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	14,86 B	- 6
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	14,47 B	- 8
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	14,77 B	- 6
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	15,07 B	- 4
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	14,79 B	- 6
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	15,49 B	- 2

G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	15,40 B	- 2
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	16,53 B	+ 5
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	15,70 B	- 0,3
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	13,73 B	- 13
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	15,57 B	- 1

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1 (0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

De acordo com os resultados obtidos na tabela 14 para hematócrito, os animais pertencentes ao grupo 5 (Bifosfonato dose 3) apresentaram a maior percentagem de redução neste parâmetro 15%, já os do grupo 11 (Flavonóide dose 3) apresentaram a maior percentagem de aumento 6%, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Os animais pertencentes ao G1 tiveram um significativo aumento deste parâmetro em relação aos animais do G2 (normal). Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos quando comparados ao G1.

**Tabela 14 - Valores médios do hematócrito (HCT) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (%)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	53,51 A	-
G2-Ração	48,06 B	- 10
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	54,05 B	+ 1
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	48,81 B	- 9
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	45,24 B	- 15
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	53,54 B	+ 0,2
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	49,60 B	- 7
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	50,26 B	- 6

G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	53,14 B	- 1
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	52,63 B	- 2
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	56,93 B	+ 6
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	53,29 B	- 1
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	46,43 B	- 13
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	53,59 B	- 0,5

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

O hematócrito corresponde, em porcentagem, ao volume de hemácias em relação ao volume total de sangue.

Nos aparelhos automatizados, o hematócrito é calculado e não medido diretamente e, por esta razão, não é um índice adequado para se avaliar anemia (Fischbach, 2005).

A análise do número de eritrócitos, valor da hemoglobina, hematócrito e as várias relações entre eles fornecem os chamados índices hematimétricos que permitem interpretar pelos valores encontrados no hemograma, as variações da série vermelha. Observamos em nossos resultados que o G11 (Flavonóide dose 3) foi o grupo que apresentou o maior aumento nestes três parâmetros (tabelas 12, 13 e 14), evidenciando esta correlação entre eles.

Na tabela 15 temos os dados de volume corpuscular médio, onde observamos que o G11 (Flavonóide dose 3) apresentou uma maior porcentagem de redução deste parâmetro (2%) e o G6 (Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1) uma maior porcentagem de aumento (2%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Apesar das variações individuais do volume corpuscular médio para cada tratamento nenhum deles apresentou significância a 5% quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Também não foi observadas variações no volume corpuscular médio entre os grupos G1 (grupo com osteoporose não

tratado) e G2 (normal), mostrando que a administração de dexametasona em altas doses não provocou grandes variações neste parâmetro.

O VCM é a relação que existe entre o volume globular obtido e o número de eritrócitos. O VCM é importante para se definir se ocorre anemia e se ela é predominantemente de eritrócitos de pequeno volume, isto é microcítica ou de grande volume macrocítica (Verrastro *et al.*, 2005).

**Tabela 15 - Valores médios do volume corpuscular médio (VCM) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (fl)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	53,43 A	-
G2-Ração	53,43 A	-
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	52,83 A	- 1
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	53,57 A	-
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	53,86 A	+ 1
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	54,57 A	+ 2
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	53,00 A	- 1
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	53,14 A	- 1
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	53,57 A	-
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	53,40 A	- 1
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	52,29 A	- 2
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	53,29 A	-
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	53,00 A	- 1
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	53,29 A	-

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

De acordo com os resultados obtidos na tabela 16 (hemoglobina corpuscular média) observou-se que o G5 (Bifosfonato dose 3) aumentou em 1% e o G11 (Flavonóide dose 3) reduziu em 3% este parâmetro, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Nenhum tratamento foi estatisticamente significativo em relação ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Também não foram observadas variações significativas entre os grupos G1 (grupo com osteoporose não tratado) e G2 (normal), mostrando que assim como na tabela 15, administração de dexametasona em altas doses não provocou grandes variações neste parâmetro.

A HCM é dada pela relação entre o valor da hemoglobina obtida em gramas por 100dL de sangue e a contagem dos eritrócitos. O resultado é expresso em picogramas (pg) ou micro-microgramas ( $\mu\text{g}$ ) (Verrastro *et al.*, 2005).

**Tabela 16 - Valores médios da hemoglobina corpuscular média (HCM) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (pg)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	15,70 A	-
G2-Ração	15,63 A	-
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	14,48 A	- 1
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	15,70 A	-
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	15,86 A	+ 1
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	15,77 A	-
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	15,61 A	- 1
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	15,63 A	-
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	15,70 A	-
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	15,74 A	-
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	15,17 A	- 3
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	15,69 A	-
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	15,64 A	-

G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3

15,43 A

- 2

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1 (0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Na tabela 17 (concentração de hemoglobina corpuscular média) observou-se que o G6 apresentou a maior percentagem de redução (2%), o G10 e o G13 foram os únicos grupos a apresentar aumento deste parâmetro (1%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

Os animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) tiveram um pequeno aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média em relação aos animais do G2 (normal) não sendo, portanto considerado significativo, mostrando que a administração de dexametasona em altas doses não provocou grandes variações no conteúdo deste parâmetro. Nenhum tratamento foi estatisticamente significativo em relação ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

A concentração da hemoglobina corpuscular média é calculada pela relação entre a hemoglobina obtida em gramas por 100dL e o volume globular, o resultado é dado em percentagem.

**Tabela 17 - Valores médios da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (g/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	29,37 A	-
G2-Ração	28,66 A	- 2
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	29,37 A	-
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	29,30 A	-
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	29,34 A	-

G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	28,84 A	- 2
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	29,44 A	-
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	29,44 A	-
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	29,30 A	-
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	29,60 A	+ 1
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	29,09 A	- 1
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	29,44 A	-
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	29,57 A	+ 1
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	29,06 A	- 1

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Doses utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Segundo os resultados fornecidos pela tabela 18 (amplitude de distribuição do tamanho das hemácias), o G3 (Bifosfonato dose 1) apresentou um aumento de 3%, o G9 (Flavonóide dose 1) uma redução de 4% deste parâmetro, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

Pudemos verificar um pequeno aumento dos valores médios do RDW dos animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) em relação aos animais do G2 (normal), não sendo, portanto, considerado significativo e mostrando que a dexametasona mesmo em altas doses não provoca grandes alterações neste parâmetro.

Red Cell Distribution Widht (RDW) corresponde à amplitude de distribuição do tamanho das hemácias. É mais um índice de anisocitose, indicando o quanto a população de hemácias se desvia do tamanho normal (Verrastro *et al.*, 2005).

**Tabela 18 - Valores médios da amplitude de distribuição do tamanho das hemácias (RDW) em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (%)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	16,00 A	-
G2-Ração	15,33 A	- 4
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	16,48 A	+ 3
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	15,73 A	- 2
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	15,47 A	- 3
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	15,54 A	- 3
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	15,74 A	- 2
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	15,77 A	- 1
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	15,41 A	- 4
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	15,70 A	- 2
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	15,99 A	-
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	15,80 A	- 1
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	16,06 A	-
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	15,99 A	-

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

## 5.2) Análise dos Parâmetros Bioquímicos

Na tabela 19 encontram-se os valores médios de glicose e suas respectivas percentagens de variação. De acordo com os resultados obtidos observou-se que o G5 (Bifosfonato dose 3) apresentou o maior aumento na concentração de glicose (41%) e o G4 (Bifosfonato dose 2) apresentou uma redução de 18% neste parâmetro, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). É importante ressaltar que os animais pertencentes ao G1 tiveram um significativo aumento deste parâmetro em relação aos animais do G2 (normal). Todos os outros tratamentos também mostraram aumento do conteúdo dos níveis séricos de glicose, quando comparados ao G2 (normal). Este considerável aumento pode ser entendido como um efeito adverso da dexametasona quando administrada em altas doses. Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos quando comparados ao G1.

**Tabela 19 - Valores médios das dosagens de glicose em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (mg/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	166,83 A	-
G2-Ração	135,14 B	- 19
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	182,09 B	+ 9
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	136,84 B	-18
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	234,63 B	+ 41
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	172,18 B	+ 3
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	182,50 B	+ 9
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	179,87 B	+ 8
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	179,28 B	+ 7
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	149,30 B	- 11
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	179,93 B	+ 8
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	223,09 B	+ 34
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	194,40 B	+ 17

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

O metabolismo anormal da glicose pode ser causado por: incapacidade das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas de produzirem insulina, números reduzidos de receptores de insulina, deficiência da absorção intestinal de glicose, incapacidade do fígado de metabolizar glicogênio, níveis alterados de hormônios que participam do metabolismo da glicose (Motta, 2000).

A dexametasona, é um potente medicamento antiinflamatório porém, dentre seus efeitos colaterais age como droga imunossupressora, induz diabetes e induz osteoporose. Como os parâmetros de glicose aumentaram bastante em vários dos tratamentos os resultados mostram que realmente a dexametasona pode induzir diabetes.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 20 (valores médios de colesterol), o G14 osteoporótico quando recebeu o fitoterápico na dose 3 teve um aumento de 84% na concentração de colesterol, já o G4 tratado com bifosfonato na dose 2 teve uma diminuição de 18% deste parâmetro, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

Observou-se também que os animais tratados com a associação de bifosfonato + sinvastatina (doses 1, 2 e 3) apresentaram redução do conteúdo de colesterol quando comparados ao G2 (normal), o que pode ser entendido pela ação redutora de colesterol reconhecida para a sinvastatina. Os tratamentos com fitoterápico (doses 1, 2 e 3) provocaram aumento deste conteúdo, quando comparados ao G2 e apesar destes valores não apresentarem significância estatística de acordo com o método adotado, o significado clínico deste aumento deve ser avaliado e estes tratamentos considerados como hipercolesterolemiantes na situação experimental destes animais, ou seja, com osteoporose induzida por dexametasona.

**Tabela 20 - Valores médios das dosagens de colesterol em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (mg/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	101,20 A	-
G2-Ração	125,40 B	+ 24
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	106,34 B	+ 5
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	83,03 B	- 18
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	108,10 B	+ 7
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	117,27 B	+ 16
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	112,39 B	+ 11
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	115,23 B	+ 14
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	120,40 B	+ 19
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	125,97 B	+ 24
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	142,06 B	+ 40
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	164,44 B	+ 62
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	150,31 B	+ 49
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	186,09 B	+ 84

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Ao chá verde tem sido atribuído efeito no metabolismo lipídico devido à presença de metilxantinas e flavonóides. As metilxantinas (cafeína) agem por inibir a enzima fosfodiesterase induzindo um acúmulo de AMP cíclico, dentre os efeitos fisiológicos observados ocorre um aumento na fosforilação de proteínas, um aumento na mobilização de cálcio e um aumento na permeabilidade das membranas celulares (Wang *et al.*, 1992).

Foi verificada a diminuição de peroxidação de lipídeo no fígado, no soro e em tecido nervoso de animais submetidos a uma dieta líquida de chá verde

durante cinco semanas. Os ingredientes bioativos proporcionaram um aumento da atividade da glutathione peroxidase e glutathione reductase, diminuindo a concentração de hidroperóxidos de lipídeo, 4-hidroquinononal e alondialdeído, indicando uma redução da peroxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999).

De acordo com os resultados obtidos na tabela 21 (dosagens de triacilglicerídeos) observou-se que todos os tratamentos provocaram o aumento do conteúdo médio deste parâmetro, em relação aos animais do G2 (normal). É importante ressaltarmos que o G14 (Fitoterápico dose 3) foi o grupo que apresentou maior aumento (182%) e o G3 (Bifosfonato dose 1) o grupo que apresentou o menor aumento (4%) deste parâmetro, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

É importante lembrar que o aumento de glicose no sangue aumenta a liberação de insulina que favorece a entrada de glicose no fígado e no tecido adiposo aumentando a síntese de triacilglicerídeos. De acordo com os resultados mostrados nas tabelas 19 e 21, observamos que todos os tratamentos provocaram aumento do conteúdo médio de glicose e também dos triacilglicerídeos, quando comparados ao conteúdo médio observado para o G2 (normal). Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos em relação ao G1.

**Tabela 21 – Valores médios das dosagens de triacilglicerídeos em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (mg/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	54,52 A	-
G2-Ração	46,43 B	- 15
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	56,64 B	+ 4
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	58,13 B	+ 7
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	66,73 B	+ 22
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	72,70 B	+ 33
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	59,00 B	+ 8
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	59,56 B	+ 9

G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	117,79 B	+ 116
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	126,29 B	+ 132
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	104,63 B	+ 92
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	117,64 B	+ 116
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	118,49 B	+ 117
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	153,53 B	+ 182

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1 (0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Os triacilglicerídeos são responsáveis por aproximadamente 90% do consumo alimentar e constituem 95% da gordura armazenada nos tecidos (Fischbach, 2005).

Podemos observar que o extrato hidroalcoólico de chá verde não reduz colesterol. A literatura relata o uso de chás para a redução do colesterol, porém deve ser considerado que apenas a água quente não extrai os flavonóides livres responsáveis por esta ação. Este fitoterápico na formulação em que usamos (extrato hidroalcoólico) não é recomendado como hipolipidêmico e hipotrigliceridêmico em indivíduos osteoporóticos. Isto nos leva a concluir que um indivíduo com inflamação aguda ingerindo dexametasona e extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* pode ter aumento no nível sérico de glicose, colesterol e triacilglicerol, que é considerado como um grave efeito colateral.

De acordo com os resultados obtidos para proteínas apresentados na tabela 22, ressaltamos que todos os tratamentos provocaram o aumento deste parâmetro, o que pode ser entendido como efeito da dexametasona administrada em altas dosagens a estes animais para a indução da osteoporose. O G14 (Fitoterápico dose 3) apresentou maior aumento (75%) e o G5 (Bifosfonato dose 3) o menor aumento (1%) deste parâmetro, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Todos os tratamentos foram estatisticamente significativos em relação ao G1.

Tanto os grupos tratados com flavonóide quanto os tratados com fitoterápico tiveram aumento considerável no conteúdo de proteínas do soro sanguíneo. Observando inclusive uma relação de dose-dependência para os tratamentos com flavonóide nas doses 1, 2 e 3, que aumentaram este parâmetro em 13, 33 e 44%, respectivamente em relação ao G1.

**Tabela 22 – Valores médios das dosagens de proteínas totais em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (g/L)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	71,84 A	-
G2-Ração	71,50 B	- 1
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	78,36 B	+ 9
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	72,61 B	+ 2
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	72,37 B	+ 1
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	78,84 B	+ 10
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	76,59 B	+ 7
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	77,53 B	+ 8
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	81,19 B	+ 13
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	95,27 B	+ 33
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	103,56 B	+ 44
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	109,17 B	+ 52
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	99,56 B	+ 39
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	126,01 B	+ 75

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

As proteínas plasmáticas totais são elementos celulares essenciais, constituídas de moléculas extremamente volumosas formadas de longas

cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Miller *et al.*, 1999). Elas estão envolvidas em múltiplas funções tais como a manutenção da pressão osmótica e da viscosidade do sangue, o transporte de nutrientes, metabólitos, hormônios e produtos de excreção, a regulação do pH sanguíneo e a participação na coagulação sanguínea. As proteínas sanguíneas são sintetizadas principalmente pelo fígado, sendo que a taxa de síntese está diretamente relacionada com estado nutricional do animal, especialmente com os níveis de proteína e de vitamina A e com a funcionalidade hepática (González *et al.*, 2002).

De acordo com os resultados obtidos para albumina (tabela 23), o grupo 14 tratado com Fitoterápico na dose 3 aumentou em 30% este parâmetro enquanto o G5 tratado com Bifosfonato na dose 3 reduziu em 0,3%, quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Com exceção do grupo G4 (Bifosfonato dose 2) todos os tratamentos nos animais com osteoporose foram estatisticamente significativos em relação ao G1. Não foi observado, portanto, significância estatística a 5% entre os G1 e G2 (normal).

A maior percentagem de aumento deste parâmetro foi verificada nos grupos tratados com o fitoterápico (G12, G13 e G14). Este aumento pode ser devido à albumina como transportadora de compostos bioativos, ser necessária em maiores quantidades para transportar todas as substâncias presentes no extrato que possui uma composição complexa, com muitas substâncias presentes.

**Tabela 23 - Valores médios das dosagens de albumina em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (g/L)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	3,88 A	-
G2-Ração	3,86 A	- 0,2
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	3,96 B	+ 2
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	3,89 A	- 0,2
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	3,87 B	- 0,3

G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	4,16 B	+ 7
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	4,03 B	+ 4
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	3,99 B	+ 3
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	4,19 B	+ 8
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	4,35 B	+ 12
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	4,66 B	+ 20
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	4,92 B	+ 27
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	4,70 B	+ 21
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	5,06 B	+ 30

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1 (0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

A albumina é uma proteína globular hidrossolúvel. Sintetizada no fígado, pelos hepatócitos, e catabolizada nos tecidos periféricos, é responsável pela manutenção da pressão osmótica intravascular. Devido à sua grande capacidade de ligação com outras substâncias, evita a excreção precoce de algumas drogas, auxiliando também no processo de desintoxicação e inativação de compostos que possam ser tóxicos ao organismo animal (Coles *et al.*, 1987). É a principal proteína transportadora de medicamentos, nutrientes e decompostos bioativos presente nos fitoterápicos, um aumento na sua concentração reflete em um aumento nas proteínas totais, como pôde ser observado na tabela 22.

Segundo os valores médios das dosagens de uréia (tabela 24), o grupo que teve a maior percentagem de aumento no parâmetro uréia foi o G14, tratado com o Fitoterápico na dose 3 (78%), já o G4 (Bifosfonato dose 2) foi o que apresentou a maior redução deste parâmetro (3%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). É importante ressaltar que os animais pertencentes ao G1 tiveram um significativo aumento do conteúdo médio deste parâmetro em relação aos animais do G2 (normal). Todos os

outros tratamentos também mostraram aumento do conteúdo dos níveis séricos de uréia, quando comparados ao G2 (normal), que pode ser considerado como um efeito adverso da administração de altas doses de dexametasona para a indução da osteoporose nestes animais. Também foi verificado que todos os tratamentos nos animais com osteoporose foram estatisticamente significativos em relação ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

**Tabela 24 - Valores médios das dosagens de uréia em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (mg/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	35,68 A	-
G2-Ração	28,36 B	- 21
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	35,96 B	+ 1
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	34,69 B	- 3
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	35,21 B	- 1
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	35,21 B	- 1
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	36,73 B	+ 3
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	39,11 B	+ 10
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	37,64 B	+ 6
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	43,67 B	+ 22
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	46,87 B	+ 31
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	43,70 B	+ 22
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	46,29 B	+ 30
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	63,66 B	+ 78

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Em nossos resultados, os valores aumentados de uréia estão de acordo com os aumentos observados para proteínas, já que o catabolismo de proteínas forma uréia que é sua forma de excreção.

A uréia é sintetizada no fígado a partir da amônia proveniente do catabolismo de aminoácidos. Os níveis de uréia são analisados em relação ao nível de proteína na dieta e ao funcionamento renal. A uréia é excretada principalmente pela urina e, em menor grau, pelo intestino. Na maioria dos animais, o nível de uréia é indicador de funcionamento renal (González *et al.*, 2002).

De acordo com os resultados obtidos para creatinina (tabela 25), o grupo que teve a maior percentagem de aumento no parâmetro uréia foi o G14, tratado com o Fitoterápico na dose 3 (49%). O G4 (Bifosfonato dose 2) foi o que apresentou a maior redução deste parâmetro (5%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). É importante ressaltar que os animais pertencentes ao G1 tiveram uma pequena, porém significativa diminuição do conteúdo médio deste parâmetro em relação aos animais do G2 (normal). Também foi verificado que todos os tratamentos nos animais com osteoporose foram estatisticamente significativos em relação ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

**Tabela 25 - Valores médios das dosagens de creatinina em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (mg/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	0,61 A	-
G2-Ração	0,64 B	+ 5
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	0,64 B	+ 5
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	0,58 B	- 5
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	0,62 B	+ 2
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	0,68 B	+ 12
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	0,65 B	+ 7
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	0,62 B	+ 2

G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	0,64 B	+ 5
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	0,73 B	+ 20
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	0,71 B	+ 17
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	0,77 B	+ 26
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	0,82 B	+ 35
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	0,91 B	+ 49

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1 (0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

A creatinina plasmática é derivada, praticamente em sua totalidade, do catabolismo da creatina presente no tecido muscular. A excreção de creatinina só se realiza por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida nem reaproveitada pelo organismo. Por isso, os níveis de creatinina plasmática refletem a taxa de filtração renal, de forma que níveis altos de creatinina indicam uma deficiência da funcionalidade renal (González *et al.*, 2002).

Das *et al* 2004, realizaram um trabalho testando o efeito antiosteoporótico de um extrato aquoso de *Camellia sinensis* (chá verde). Para induzir osteoporose os ratos tiveram seus ovários retirados. Este experimento que durou 28 dias revelou que as ratas ovariectomizadas tiveram um significativo aumento da excreção urinária de creatinina. Os animais que foram tratados com o extrato aquoso do chá verde tiveram menor perda urinária de creatinina.

Na tabela 26 encontram-se os valores médios das dosagens de fósforo, onde observamos que o grupo 14 (Fitoterápico dose 3) apresentou a maior percentagem de aumento (79%) e o grupo 5 (Bifosfonato dose 3) a maior percentagem de redução (7%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Os animais pertencentes ao G1 tiveram um aumento significativo no conteúdo médio deste parâmetro em relação aos animais do G2 (normal). Também foi verificado que todos os tratamentos nos animais com osteoporose tiveram aumento deste parâmetro em relação ao G2 (normal) e

foram estatisticamente significativos em relação ao G1 (grupo com osteoporose não tratado).

**Tabela 26 - Valores médios das dosagens de fósforo em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (mg/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	7,93 A	-
G2-Ração	6,24 B	- 21
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	7,76 B	- 2
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	7,83 B	- 1
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	7,39 B	- 7
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	9,50 B	+ 20
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	8,45 B	+ 7
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	7,43 B	- 6
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	12,01 B	+ 52
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	11,45 B	+ 44
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	12,56 B	+ 58
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	13,36 B	+ 68
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	9,49 B	+ 20
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	14,17 B	+ 79

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1 (0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1 (0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Pinto *et al.*, 2005, em estudo para verificar comparativamente os efeitos de alguns medicamentos sobre a osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas, observou que os tratamentos não modificaram os valores médios de fósforo sérico de maneira significativa em relação aos grupos controles (G1) e (G2) e também entre si (Tabela 27).

**Tabela 27 - Valores médios de fósforo sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos (Pinto *et al.*, 2005).**

Período	Grupo/Tratamento	Fósforo mg/dL	DP	Variação % em relação G1	Variação % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	7,93 A	± 0,748	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	8,12 A	+ 0,461	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	8,30 a	± 0,784	4,64	2,22
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,84 a	+ 0,583	-1,13	-3,43
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,92 a	+ 0,359	-0,13	-2,46
14 Dias	G1 Controle	7,22 A	+ 0,606	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,58 A	+ 0,272	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,31 a	± 0,853	1,25	-3,63
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,20 a	+ 0,738	-0,18	-4,99
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,37 a	± 0,815	2,08	-2,84
21 Dias	G1 Controle	7,49 A	± 0,481	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,69 A	± 0,682	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,57 a	± 0,795	1,07	-1,56
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,78 a	± 1,015	3,87	-1,17
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,57 a	± 0,666	1,06	-1,56
28 Dias	G1 Controle	7,70 A	± 0,582	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,37 A	+ 0,645	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,57 a	± 0,596	-1,69	2,71
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,49 a	+ 0,563	-2,73	1,63
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,41 a	+ 0,54	-3,77	0,54

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Zhang *et al.*, 2007, em estudo para investigar se *Erythrina variegata* L., pertencente à família das leguminosas, exerce efeitos benéficos em ossos de ratas ovariectomizadas, analisaram a dosagem de cálcio e fósforo em soro sanguíneo e na urina. Concluíram que nenhuma mudança nas dosagens de fósforo sérico foi observada entre todos os grupos, enquanto a dosagem urinária de fósforo para o grupo das ratas tratadas com alta dose do extrato *E. variegata* foi bem mais baixa quando comparado ao grupo das ratas ovariectomizadas bilateralmente (Tabela 28).

**Tabela 28 - Efeito do extrato de *Erythrina variegata* em marcadores bioquímicos de ratas ovariectomizadas (Zhang *et al.*, 2007).**

Grupos	Fósforo sérico (mg/dL)	P/Cr urinária (mg/mg)
Ratas intactas	5.80 ± 0.38	1.50 ± 0.13
Laparotomizadas bilateralmente	5.72 ± 0.20	1.62 ± 0.06
Ovariectomizadas bilateralmente	5.42 ± 0.14	1.92 ± 0.16
Tratadas com 17β-estadiol	5.63 ± 0.29	1.78 ± 0.23
Tratadas com baixa dose do extrato <i>E. variegata</i>	5.44 ± 0.14	1.60 ± 0.11
Tratadas com alta dose do extrato <i>E. variegata</i>	5.38 ± 0.25	1.40 ± 0.19#

Dados estatísticos: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs Laparotomizadas bilateralmente; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  vs Ovariectomizadas bilateralmente.

Em estudo realizado por Santos, 2004 para estabelecer a osteoporose seja por meio da castração, ou da administração de glicocorticoide, este pesquisador verificou que todos os grupos experimentais apresentaram concentrações plasmáticas normais de cálcio:fósforo (1:1 a 2:1) e concentrações ósseas de cálcio:fósforo (2:1) inferiores ao normal, com exceção dos grupos controle.

Das *et al* 2004, realizaram um trabalho testando o efeito antiosteoporótico de um extrato aquoso de *Camellia sinensis* (chá verde). Para induzir osteoporose as ratas tiveram seus ovários retirados. O seu experimento que durou 28 dias revelou que as ratas ovariectomizadas tiveram um significativo aumento da excreção urinária de fosfato. Os animais que foram tratados com o extrato aquoso do chá verde tiveram menor perda urinária de fósforo.

De acordo com os valores médios das dosagens de cálcio, apresentados na tabela 29, o G14 (Fitoterápico dose 3) foi o que apresentou maior aumento deste parâmetro (30%) e o G5 (Bifosfonato dose 3) o que apresentou menor redução (3%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não

tratado). Todos os tratamentos nos animais com osteoporose foram estatisticamente significativos em relação ao G1 (animais com osteoporose). Os animais pertencentes ao G1 tiveram um aumento significativo deste parâmetro em relação aos animais do G2 (normal). Também foi verificado que todos os tratamentos nos animais com osteoporose, tiveram aumento deste parâmetro em relação ao G2 (normal), porém devido à homeostasia do cálcio sérico ser muito bem controlada, não podemos afirmar que este aumento tenha sido provocado pela maior liberação de cálcio dos ossos nestes animais com osteoporose.

**Tabela 29 - Valores médios das dosagens de cálcio em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (mg/dL)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	9,58 A	-
G2-Ração	8,72 B	- 9
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	9,63 B	+ 1
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	9,51 B	- 1
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	9,25 B	- 3
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	10,73 B	+ 12
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	10,90 B	+ 14
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	10,53 B	+ 10
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	11,31 B	+ 18
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	11,57 B	+ 21
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	11,61 B	+ 21
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	11,96 B	+ 25
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	11,46 B	+ 20
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	12,44 B	+ 30

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg),*

dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).

Pinto *et al.*, 2005, em estudo para verificar comparativamente os efeitos de alguns medicamentos sobre a osteoporose induzida pelo glicocorticoide dexametasona em ratas, observou que não houve diferença significativa entre os grupos controle (G1) e o grupo osteoporótico (G2), quanto aos valores médios de cálcio sérico, expressos em mg/dL, em todos os períodos avaliados e também entre eles e os grupos tratados (G3, G4 e G5), respectivamente. Em relação aos tratamentos efetuados, observa-se, também, que não ocorreu diferença significativa dos valores nos diversos períodos testados (Tabela 30).

**Tabela 30 – Valores médios de cálcio sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos (Pinto *et al.*, 2005).**

Período	Grupo/Tratamento	Cálcio mg/dL	DP	Variação % em relação G1	Variação % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	13,65 A	± 0,42	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,80 A	± 0,65	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	14,08 a	± 0,44	3,17	2,05
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	13,47 a	+ 1,30	-1,34	-2,42
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	13,45 a	± 0,55	-1,47	-2,54
14 Dias	G1 Controle	13,37 A	± 0,37	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,05 A	± 0,19	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	12,98 a	± 0,57	-2,87	-0,51
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	13,30 a	+ 0,54	-0,50	1,92
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	13,18 a	+ 0,35	-1,37	1,02
21 Dias	G1 Controle	13,00 A	± 0,42	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,22 A	± 0,82	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	12,93 a	± 0,67	-0,51	-2,14
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	13,05 a	+ 0,58	0,38	-1,26
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	13,39 a	+ 0,29	3,00	1,31
28 Dias	G1 Controle	13,65 A	+ 0,44	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,60 A	± 0,43	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	13,27 a	± 0,67	-2,78	-2,45
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	13,70 a	± 0,61	0,36	0,73
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	13,68 a	+ 0,54	0,22	0,58

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Zhang *et al.*, 2007, em estudo para investigar se *Erythrina variegata* L., pertencente à família das leguminosas, exerce efeitos benéficos em ossos de

ratas ovariectomizadas, analisaram a dosagem de cálcio e fósforo em soro sanguíneo e na urina. Concluíram que baixas doses do extrato desta leguminosa, podem prevenir a diminuição do cálcio sérico e o aumento da excreção de cálcio na urina, fazendo-se comparação com os resultados obtidos para as ratas ovariectomizadas; enquanto este extrato em dosagens mais altas reduziu apenas o nível da excreção urinária de cálcio (Tabela 31).

**Tabela 31 - Efeito do extrato de *Erythrina variegata* em marcadores bioquímicos de ratas ovariectomizadas (Zhang *et al.*, 2007).**

Grupos	Cálcio sérico (mg/dL)	Ca/Cr urinária (mg/mg)
Ratas intactas	11.08 ± 0.16	0.026 ± 0.003
Laparotomizadas bilateralmente	10.94 ± 0.23	0.035 ± 0.004
Ovariectomizadas bilateralmente	10.35 ± 0.13*	0.068 ± 0.007**
Tratadas com 17β-estadiol	11.18 ± 0.23##	0.027 ± 0.006###
Tratadas com baixa dose do extrato <i>E. variegata</i>	10.84 ± 0.14#	0.026 ± 0.007###
Tratadas com alta dose do extrato <i>E. variegata</i>	10.48 ± 0.13	0.013 ± 0.003###

Dados estatísticos: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs Laparotomizadas bilateralmente; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$  vs Ovariectomizadas bilateralmente.

O turnover do cálcio é muito bem regulado e a maior excreção de cálcio ocorre na urina e em menor quantidade nas fezes. Cerca de 50% do cálcio sanguíneo encontra-se na forma ionizada; o restante encontra-se ligado a proteínas. Apenas o cálcio ionizado pode ser usado pelo corpo em processos vitais como contração muscular, função cardíaca, transmissão de impulsos nervosos e coagulação sanguínea (Motta, 2000).

Das *et al* 2004, realizaram um trabalho testando o efeito antiosteoporótico de um extrato aquoso de *Camellia sinensis* (chá verde). Para induzir

osteoporose as ratas tiveram seus ovários retirados. O seu experimento que durou 28 dias revelou que as ratas ovariectomizadas tiveram um significativo aumento da excreção urinária de cálcio. Os animais que foram tratados com o extrato aquoso do chá verde tiveram menor perda urinária de cálcio. Segundo este pesquisador os animais com osteoporose tratados com chá-verde teriam menor perda urinária de: cálcio, fosfato, creatinina, cálcio/creatinina e hidroxiprolina. Parecendo atribuir o mecanismo dos compostos bioativos da *Camellia sinensis* a um efeito protetor de perda óssea hipogonadal. Flavonóides e polifenóis (ésteres de polifenóis, teaflavina, galato de teaflavina e digalato de teaflavina, tearubigenina, catequinas, epigallocatequinas, epigallocatequinas galato, epicatequina, epicatequina galato e teaflavinas) presentes no extrato hidroalcoólico testados neste trabalho parecem ter um efeito protetor efetivo na perda de massa óssea. Um decréscimo na excreção urinária de cálcio e fosfato pode ser atribuído a um decréscimo na reabsorção óssea e/ou aumento na formação óssea (Das *et al*, 2004).

De acordo com os resultados obtidos na tabela 32 (valores médios das dosagens de fosfatase alcalina total), o grupo que apresentou a maior percentagem de redução (34%) da atividade da fosfatase alcalina no soro sanguíneo foi o G5 tratado com bifosfonato na dose 3, já o G12 tratado com fitoterápico dose 1 foi o que mais aumentou este parâmetro (53%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). É importante ressaltar que os animais pertencentes ao G1 tiveram um aumento significativo do conteúdo médio deste parâmetro em relação aos animais do G2 (normal). Também foi verificado que todos os tratamentos nos animais com osteoporose foram estatisticamente significativos em relação ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Este kit permite dosar fosfatase alcalina total e não apenas a fosfatase alcalina óssea, mas apesar de atualmente não ser mais considerado como um bom marcador para esta doença, o aumento da atividade da fosfatase alcalina total já foi muito utilizado como marcador de remodelação óssea.

**Tabela 32 - Valores médios das dosagens de fosfatase alcalina total em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (U/L)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	71,43 A	-
G2-Ração	62,60 B	- 12
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	54,00 B	- 24
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	49,00 B	- 31
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	47,00 B	- 34
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	54,57 B	- 24
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	54,56 B	- 24
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	49,74 B	- 30
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	58,72 B	- 18
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	74,47 B	+ 4
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	63,67 B	- 11
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	109,27 B	+ 53
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	51,24 B	- 28
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	85,60 B	+ 20

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

Pinto *et al.*, 2005, em estudo para verificar comparativamente os efeitos de alguns medicamentos sobre a osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas, mostrou que os valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO), mostrados na tabela 33, não apresentaram variações significativas entre os grupos controle (G1) e osteoporótico (G2) e também entre os grupos tratados entre si e entre os tratados e os grupos G1 e G2,

respectivamente. Em nosso trabalho foi dosada a fosfatase alcalina total e não a fosfatase alcalina óssea, mas assim como Pinto *et al.*, 2005 não foram observados resultados estatisticamente significativos entre os grupos tratados.

**Tabela 33 – Valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO) em pg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos (Pinto *et al.*, 2005).**

Período	Grupo/Tratamento	FAO pg/dL	DP	Variação % em relação G1	Variação % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	0,042 A	+ 0,018	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,053 A	± 0,026	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	0,039 a	+ 0,011	-5,40	-26,18
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	0,056 a	± 0,03	34,41	4,89
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	0,064 a	+ 0,039	52,70	19,16
14 Dias	G1 Controle	0,041 A	± 0,018	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,040 A	± 0,02	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	0,036 a	± 0,016	-12,76	-11,12
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	0,043 a	± 0,016	4,90	6,87
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	0,047 a	+ 0,031	16,13	18,31
21 Dias	G1 Controle	0,050 A	± 0,022	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,059 A	+ 0,024	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	0,058 a	± 0,016	15,39	-1,57
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	0,043 a	+ 0,025	-15,49	-27,91
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	0,041 a	± 0,023	-18,66	-30,61
28 Dias	G1 Controle	0,065 A	+ 0,02	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,060 A	± 0,019	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	0,061 a	± 0,027	-5,55	1,78
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	0,060 a	+ 0,024	-7,99	-0,85
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	0,050 a	± 0,025	-23,02	-17,04

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A fosfatase alcalina é uma enzima associada à membrana, que está amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em altas concentrações nos ossos, na mucosa intestinal, nas células tubulares renais, no fígado e na placenta (Coles, 1984). É usada como indicador de doença hepática e óssea. Na doença óssea, o nível de enzima aumenta proporcionalmente à produção de novas células ósseas resultante da atividade osteoblástica e da deposição de cálcio nos ossos. Na hepatopatia, o nível sanguíneo aumenta quando a excreção desta enzima é comprometida em virtude de obstrução no trato biliar (Fischbach, 2005).

Segundo Kaneko *et al.*, 1997, a fosfatase alcalina hidrolisa vários tipos de ésteres de fosfato e catalisa a desfosforilação do ATP. Sua concentração enzimática pode ser mensurada, diretamente como massa ou indiretamente pela sua atividade. Pesquisadores têm demonstrado que a menor atividade de fosfatase alcalina e menor excreção de cálcio e creatinina urinária em ratas ovariectomizadas tratados com *Camellia sinensis* tem sido correlacionados com menor degradação de colágeno, reabsorção óssea e osteoporose. (Lindsay *et al.*, 1977; Myburgh *et al.*, 1989; Gert *et al.*, 1994).

Das *et al* 2004, realizaram um trabalho testando o efeito antiosteoporótico de um extrato aquoso de *Camellia sinensis* (chá verde). Para induzir osteoporose as ratas tiveram seus ovários retirados. O seu experimento que durou 28 dias revelou que as ratas ovariectomizadas tiveram um significativo aumento na atividade de fosfatase alcalina. Os animais que foram tratados com o extrato aquoso do chá verde tiveram menor perda urinária de fosfatase alcalina. No estudo, Das *et al* 2004 verificou que houve um maior aumento na atividade da fosfatase alcalina do grupo osteoporótico (ovariectomizado) do que nos grupos que receberam chá verde. Os valores de atividade de fosfatase alcalina e razão urinária cálcio/creatinina analisados neste experimento indicam significativamente que o extrato aquoso de chá preto (*Camellia sinensis*) era eficaz em impedir a perda óssea provocada pela deficiência do hormônio ovariano.

Estudos têm demonstrado que a menor atividade de fosfatase alcalina e menor excreção de cálcio e creatinina urinária em ratas ovariectomizadas tratados com *Camellia sinensis* têm sido correlacionados com menor degradação de colágeno, reabsorção óssea e osteoporose (Lindsay *et al.*, 1997; Myburgh *et al.*, 1989 & Gert *et al.*, 1994). Entre os marcadores de reabsorção óssea e da atividade osteoclástica, são medidas atividades de: fosfatase alcalina, fosfatase alcalina óssea, a enzima fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), hidroxiprolina e outros. Existe uma associação entre o aumento na concentração de TRAP e hidroxiprolina urinária como um indicativo potencial da atividade osteoclástica e degradação de colágeno tipo 1 (Stepan *et al.*, 1996). A atividade da fosfatase alcalina está mais associada à atividade osteoblástica. Outros pesquisadores têm relatado que os compostos bioativos presentes no chá verde influenciam também a atividade osteoblástica do osso.

O osso trabecular tem sido mais responsivo ao tratamento do extrato aquoso do chá verde que o osso cortical. Os osteoblastos regulam a mineralização da matriz formada e produzem fosfatase alcalina (Aubin, 1998). Esta enzima hidrolisa os ésteres de fosfato para aumentar a concentração local de fosfato e a mineralização da matriz extracelular (Lian *et al.*, 1999). Uma das características do fenótipo do osteoblasto maduro é a habilidade destas células em sintetizar fosfatase alcalina que é considerado um bom marcador de diferenciação osteoblástica.

Estudos têm demonstrado que a epigallocatequina, um dos compostos bioativos da *Camellia sinensis*, inibe a formação de osteoclastos e melhora a diferenciação osteoblástica e formação óssea (Yun *et al.*, 2004). A medida da atividade da fosfatase alcalina é considerada durante a diferenciação osteoblástica e esta atividade decresce quando a mineralização chega ao final (Aubin, 2001).

Estudos de Notoya *et al* 2004 demonstraram que a quercetina decresce a atividade da fosfatase alcalina em células osteoblásticas em doses - dependentes. Quercetina induz a diferenciação e a mineralização, como indicado por marcadores característicos de osteoblastos, como a atividade de fosfatase alcalina, síntese de osteocalcina e deposição de cálcio. O mecanismo do efeito indutor da diferenciação de osteoblastos pela quercetina não está bem claro. A quercetina reduz os níveis basais dos receptores de fator de crescimento ligado à insulina (IGF-1) e fosfatidil-inositol 3-quinase em fibroblastos quelóides (Phan *et al.*, 2003). O IGF-1 possui um papel importante na diferenciação dos osteoblastos e a quercetina pode influenciar a diferenciação destas células via supressão da rota do IGF-1(Thomas *et al.*, 1999). Alternativamente, a quercetina pode agir inibindo a ativação de proteínas AP-1. AP-1 é um fator de transcrição dimérico que consiste em um fragmento Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2, ou  $\Delta$ FosB) e um fragmento Jun (JunB, c-Jun ou Jun-D) (Jochum *et al.*, 2000).

A tabela 34 mostra os valores médios das dosagens de gama GT e suas respectivas percentagens de variação. Os animais pertencentes ao G1 (grupo com osteoporose não tratado) tiveram um aumento significativo do conteúdo médio deste parâmetro em relação aos animais do G2 (normal). Observou-se que o G6 (Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1) apresentou a maior

percentagem de redução neste parâmetro (44%), já o G8 (Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3) apresentou a maior percentagem de aumento (2%), quando comparados ao G1 (grupo com osteoporose não tratado). Com exceção do G8, todos os outros grupos apresentaram redução deste parâmetro quando comparados ao G1 e todos os tratamentos foram estatisticamente significativos quando comparados ao G1.

A gama glutamiltransferase (GGT) está presente, principalmente, nas células epiteliais dos ductos renais e biliares e a elevação de sua atividade sérica está relacionada com doenças hepáticas, especialmente aquelas que afetam o sistema de ductos biliares (Braun *et al.*, 1992). É uma enzima de membrana, associada à numerosos tecidos (Meyer *et al.*, 1995) como fígado, rins, pâncreas e intestino.

**Tabela 34 – Valores médios das dosagens de gama GT em sangue de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos e percentagens de variação em relação ao grupo controle com osteoporose (G1).**

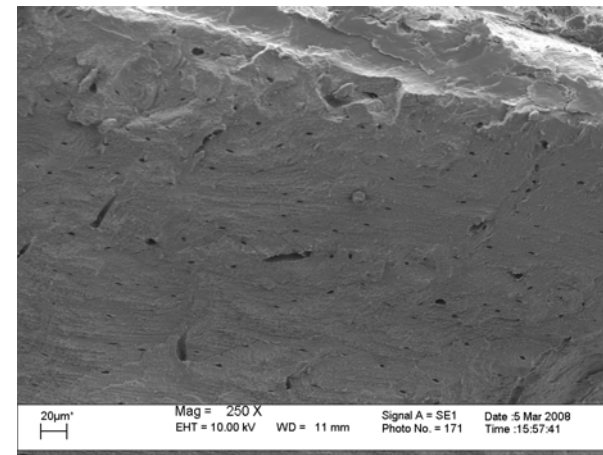
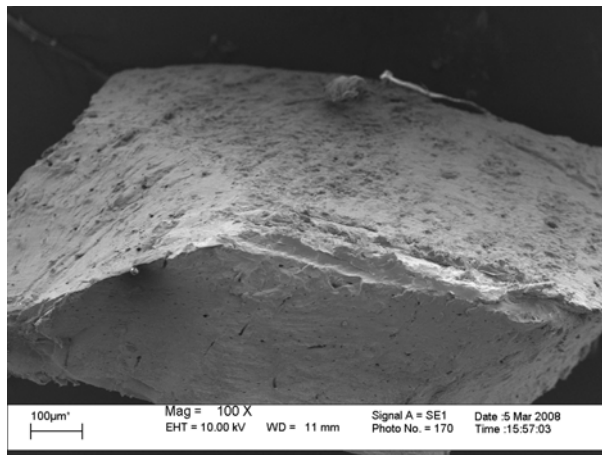
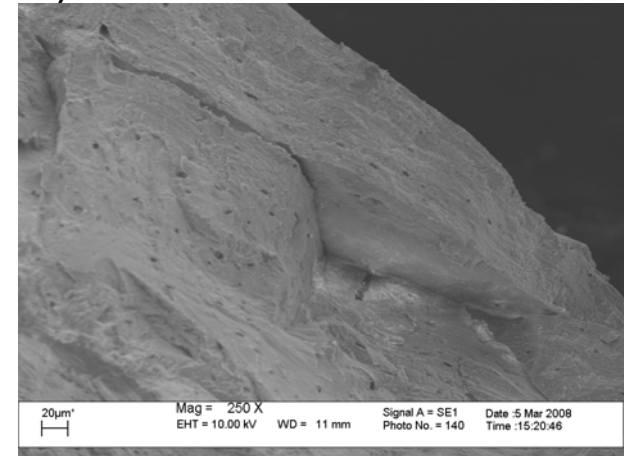
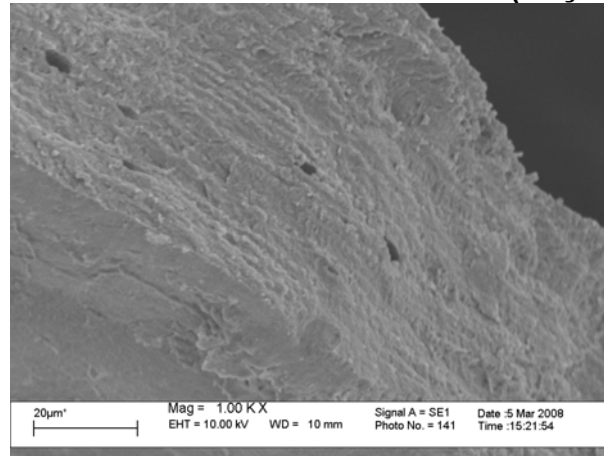
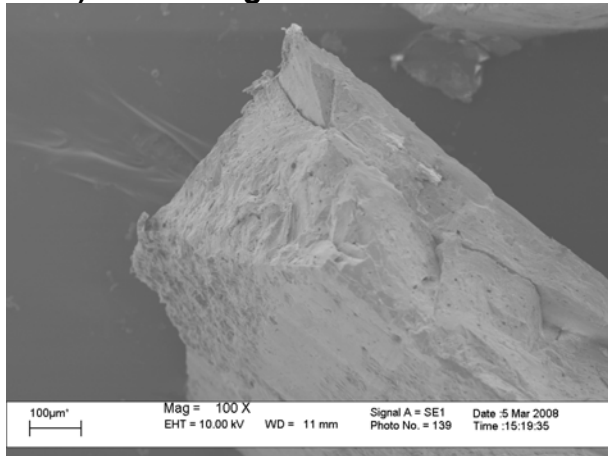
TRATAMENTOS	CONTEÚDO MÉDIO (UI)	% VARIAÇÃO
G1-Ração + Dexametasona (D)	6,43 A	-
G2-Ração	5,41 B	- 16
G3-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1	3,69 B	- 43
G4-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2	5,14 B	- 20
G5-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3	5,13 B	- 20
G6-Ração+(D)+Bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1	3,58 B	- 44
G7-Ração+(D)+Bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2	5,37 B	- 16
G8-Ração+(D)+Bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3	6,57 B	+ 2
G9-Ração+(D)+Flavonóide dose 1	5,38 B	- 16
G10-Ração+(D)+Flavonóide dose 2	5,11 B	- 20
G11-Ração+(D)+Flavonóide dose 3	4,74 B	- 26
G12-Ração+(D)+Fitoterápico dose 1	4,23 B	- 34
G13-Ração+(D)+Fitoterápico dose 2	5,94 B	- 8
G14-Ração+(D)+Fitoterápico dose 3	3,80 B	- 41

Teste de Dunnett a 5% de significância – Letras iguais equivalem a tratamentos não diferentes do grupo doente

*Dosagens utilizadas: bifosfonato dose 1(0,20 mg), dose 2 (0,40 mg) e dose 3 (0,60 mg); sinvastatina dose 1 (0,40 mg), dose 2 (0,70 mg) e dose 3 (1,0 mg); o flavonóide dose 1 (35mg), dose 2 (60 mg) e dose 3 (90 mg) e fitoterápico dose 1(0,01 mg), dose 2 (0,02 mg) e dose 3 (0,03 mg).*

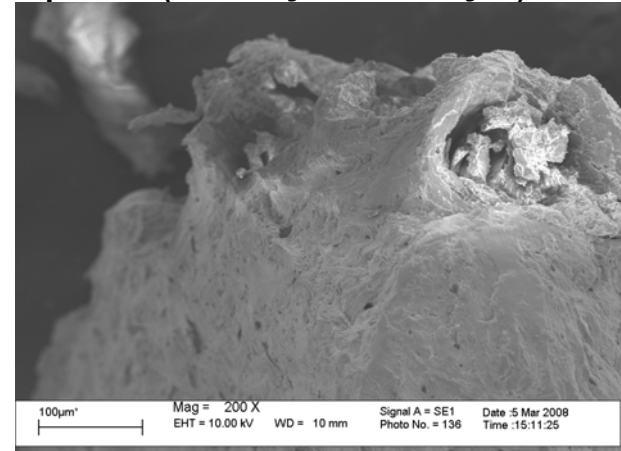
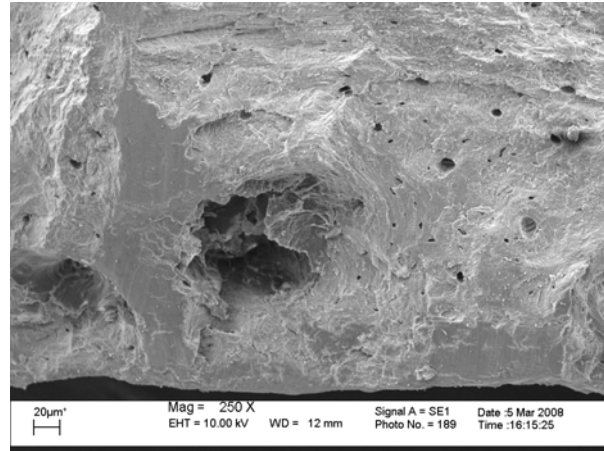
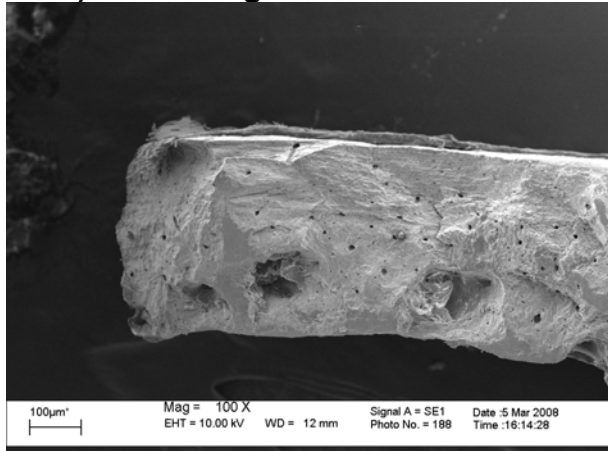
### 5.3) Microfotografias eletrônicas de varredura de ossos de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos.

#### 5.3.1) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas controles (Ração- G1)



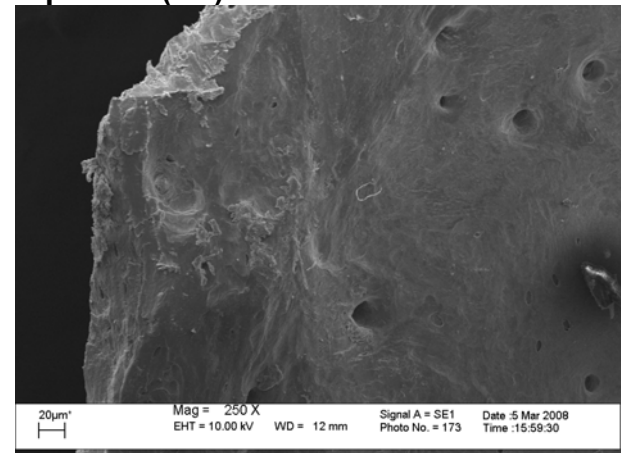
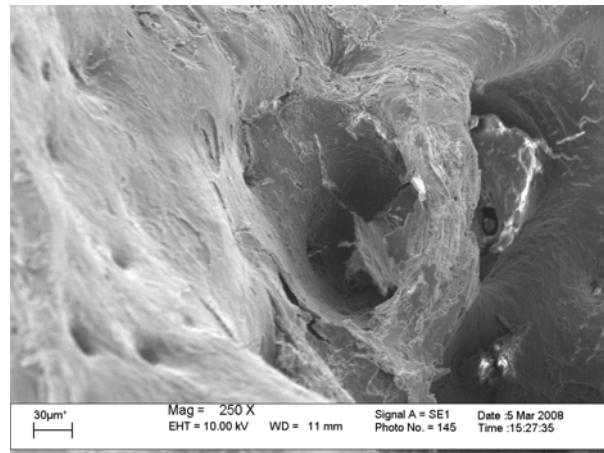
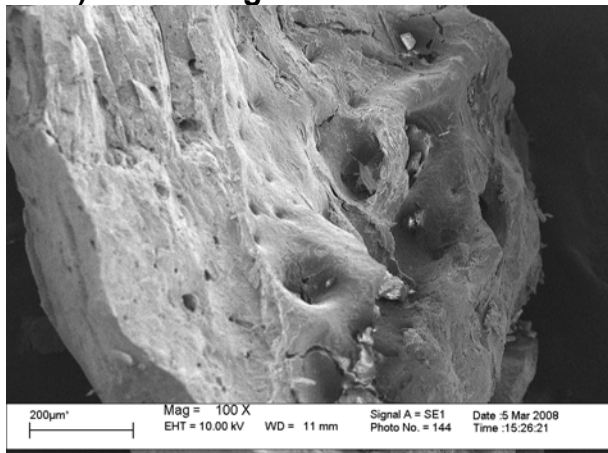
*Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.*

### 5.3.2) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas controles com osteoporose (verificação da indução)



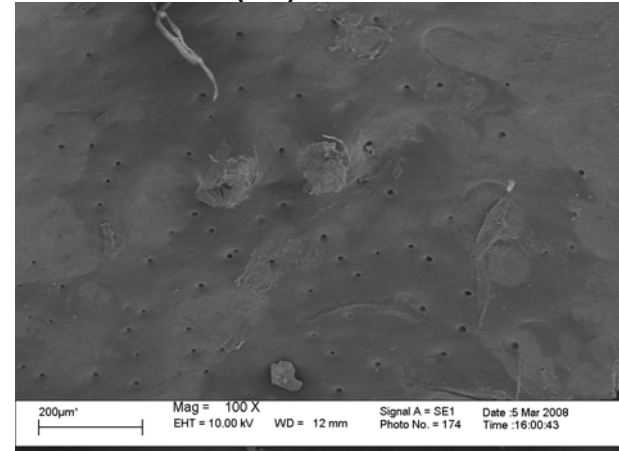
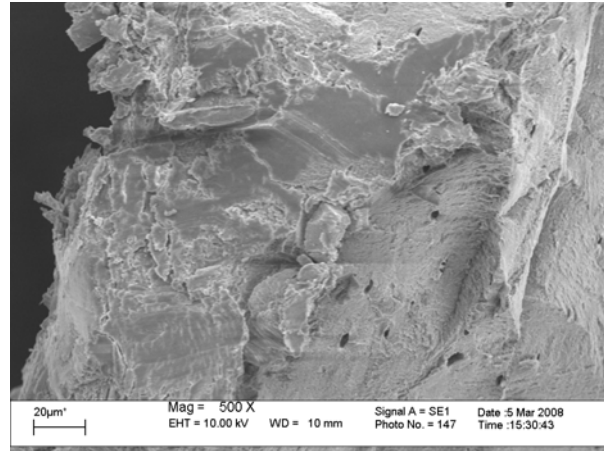
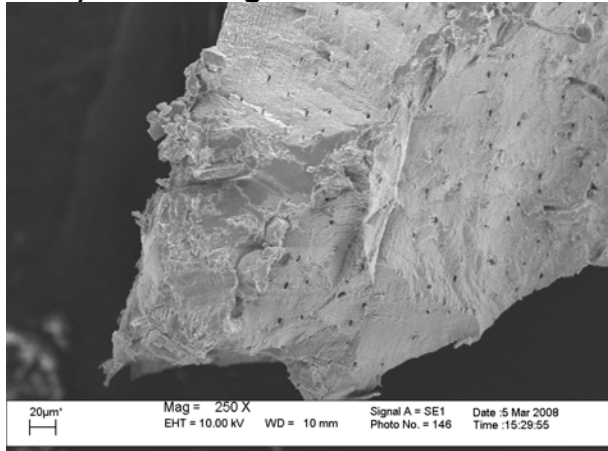
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

### 5.3.3) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas controles com osteoporose (G2)



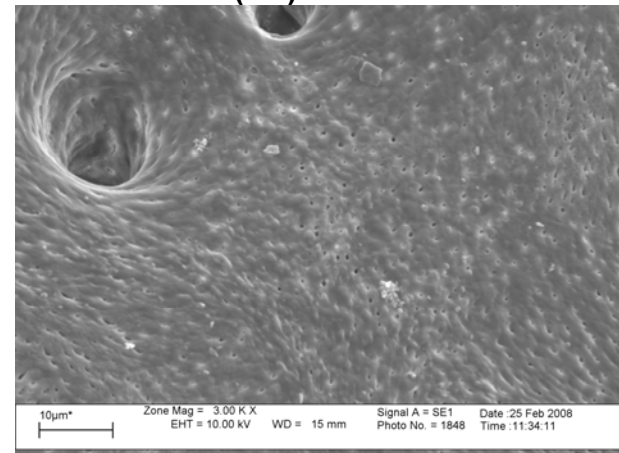
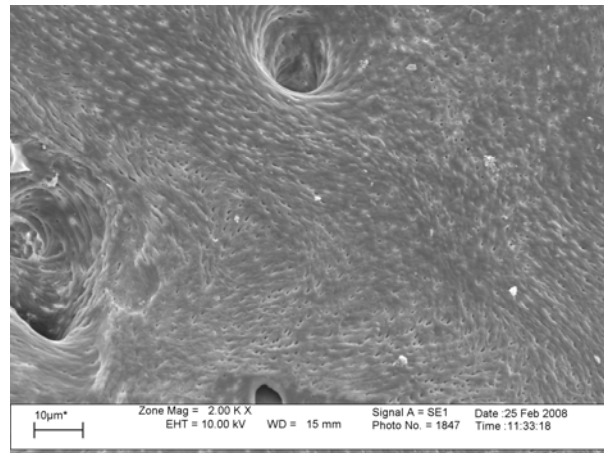
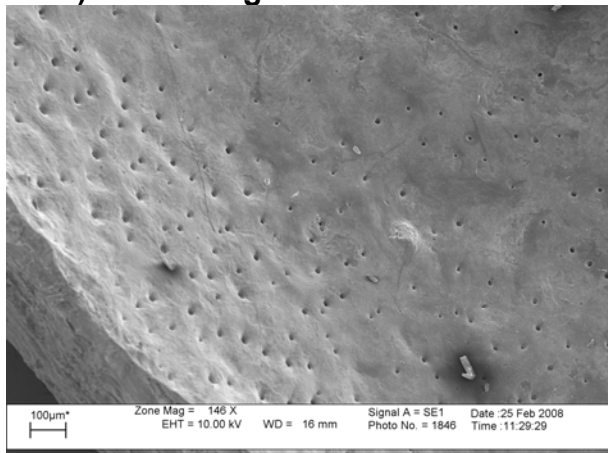
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

### 5.3.4) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com bifosfonato dose 1 (G3)



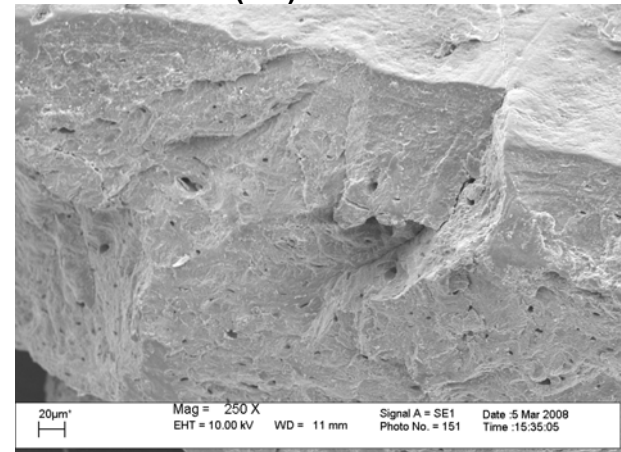
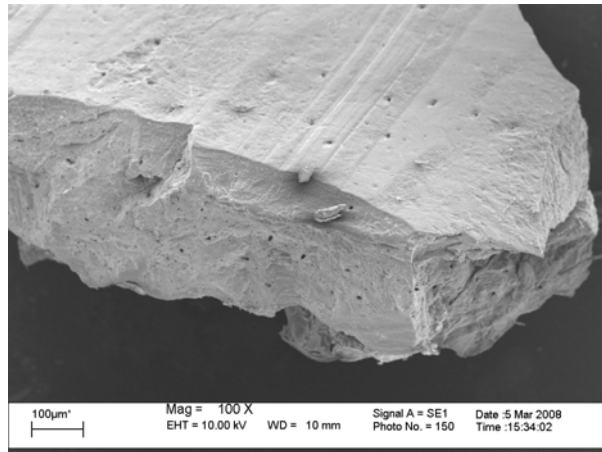
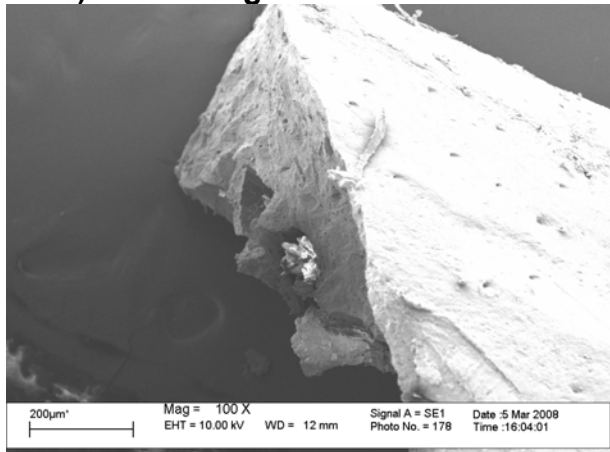
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

### 5.3.5) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com bifosfonato dose 2 (G4)



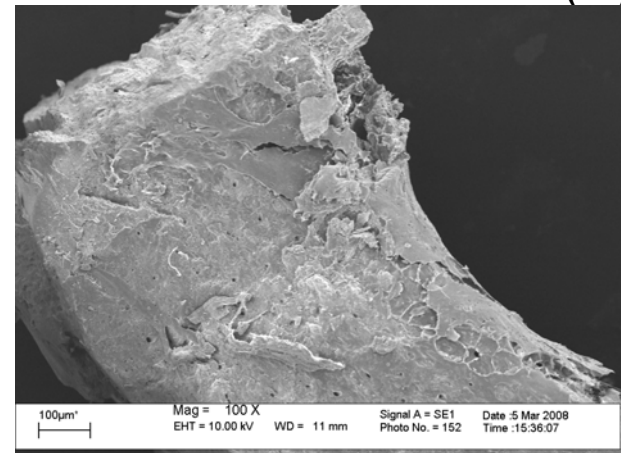
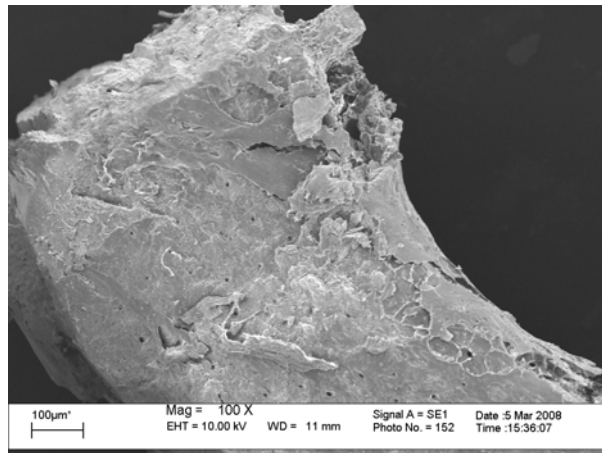
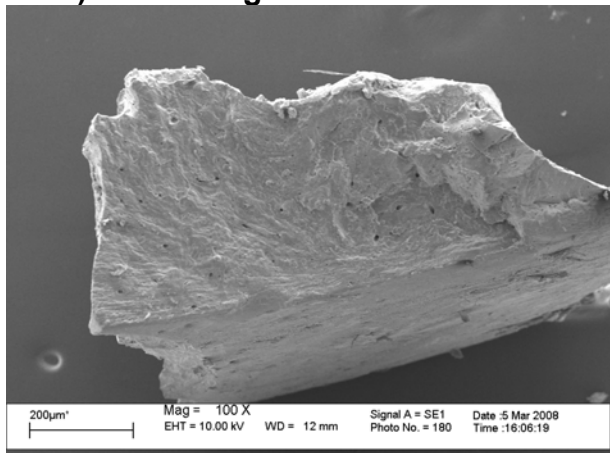
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

### 5.3.6) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com bifosfonato dose 3 (G5)



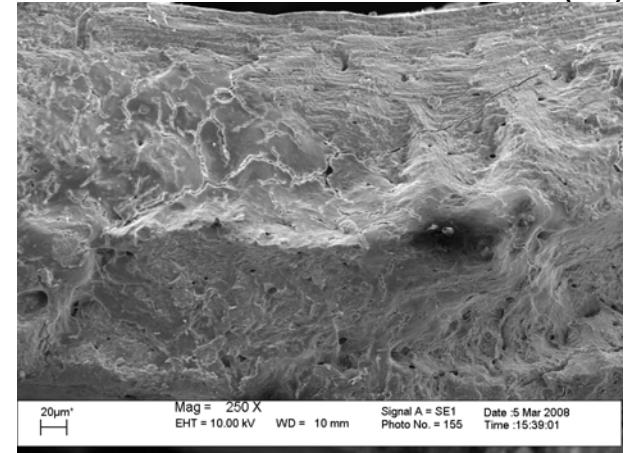
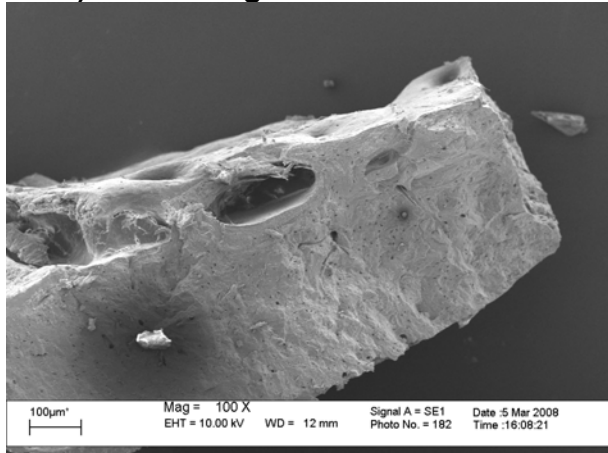
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

### 5.3.7) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1 (G6)



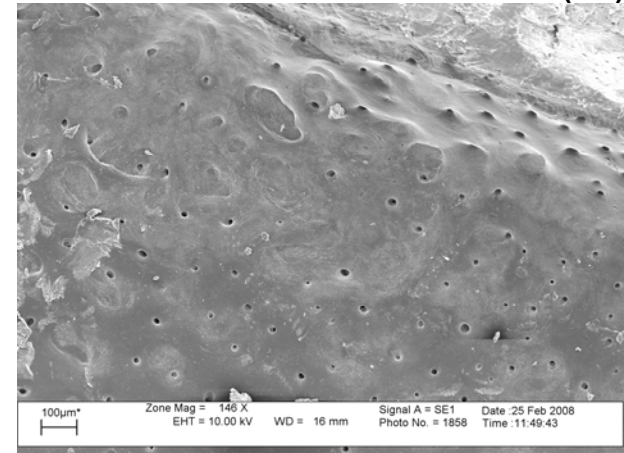
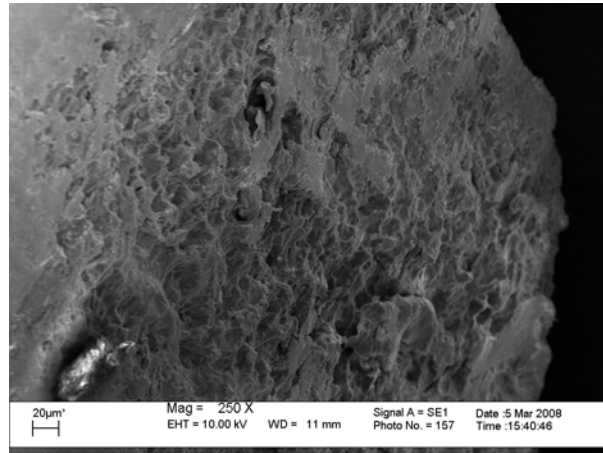
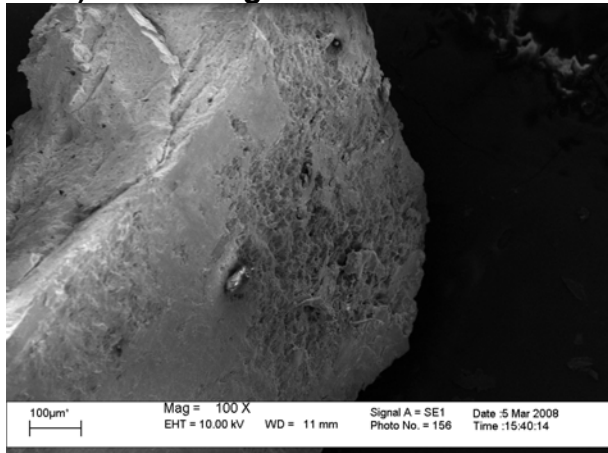
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco

**5.3.8) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2 (G7)**



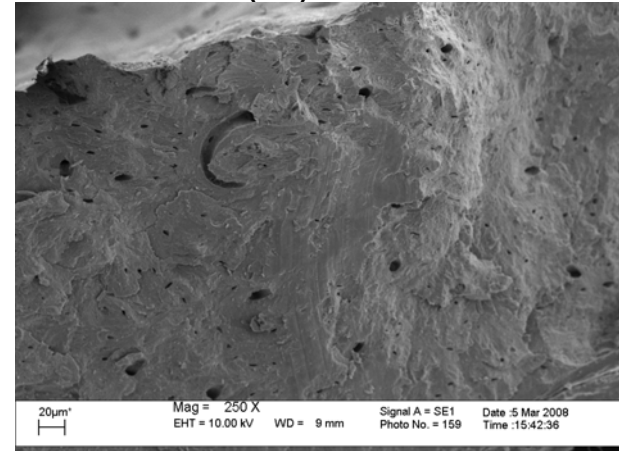
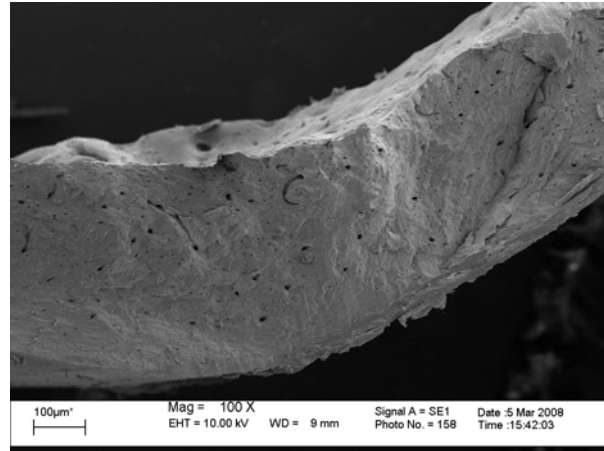
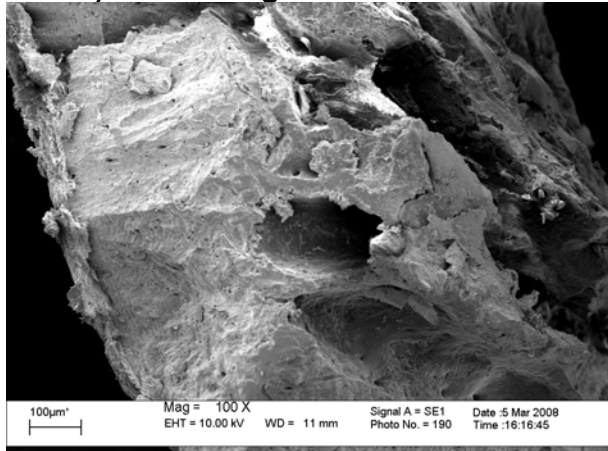
*Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.*

**5.3.9) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3 (G8)**



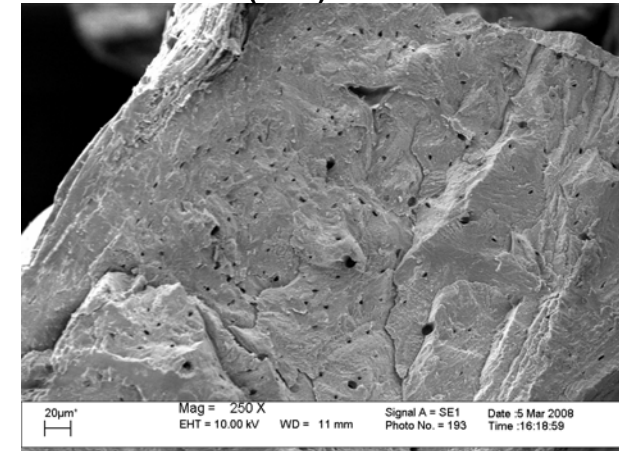
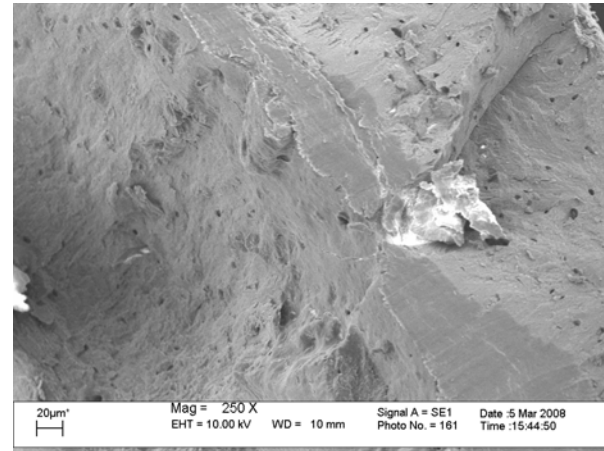
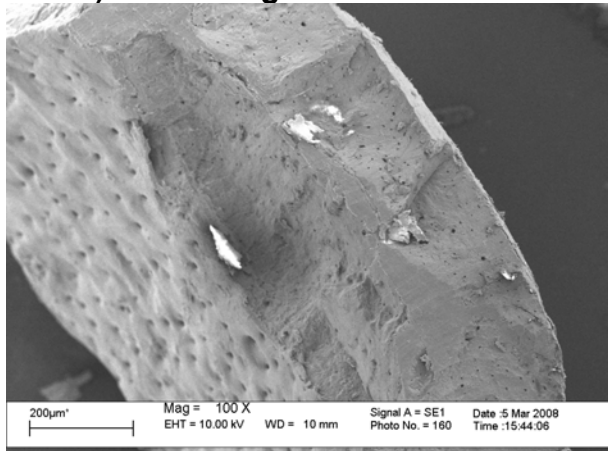
*Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.*

### 5.3.10) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com Flavonóide dose 1 (G9)



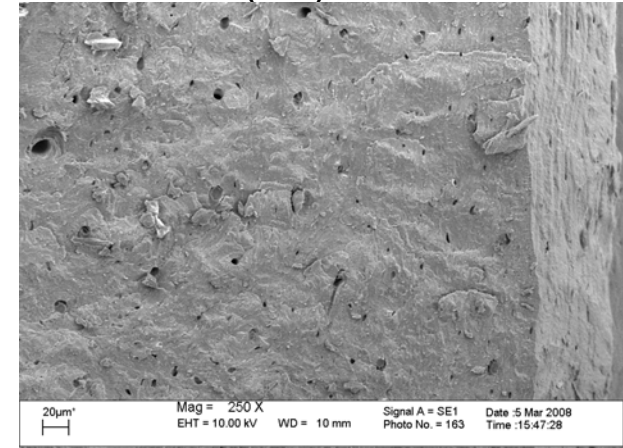
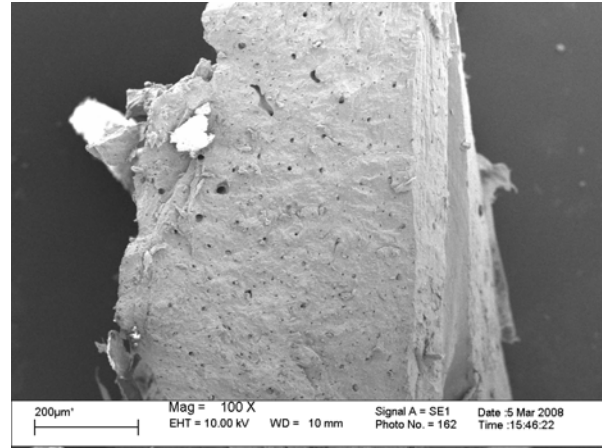
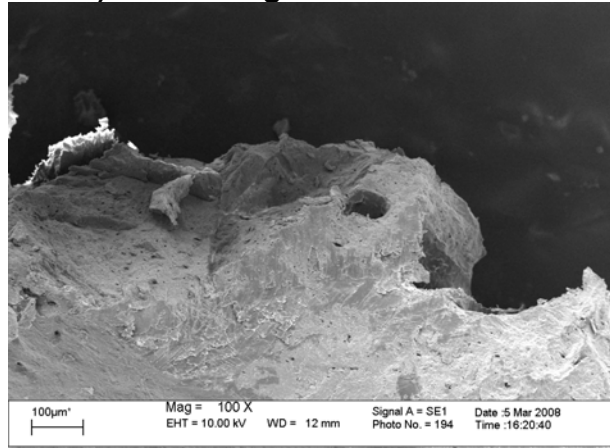
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

### 5.3.11) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com Flavonóide dose 2 (G10)



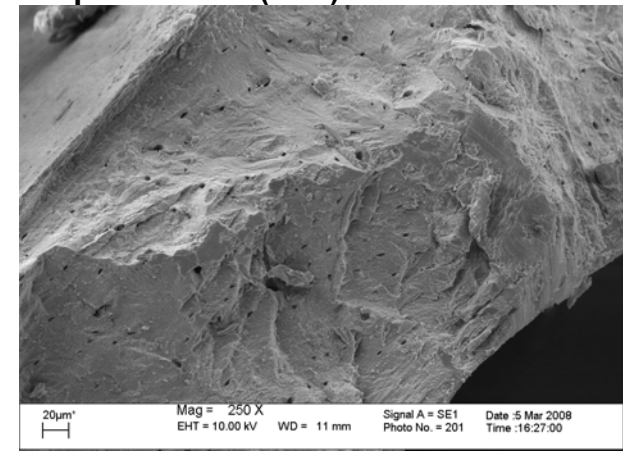
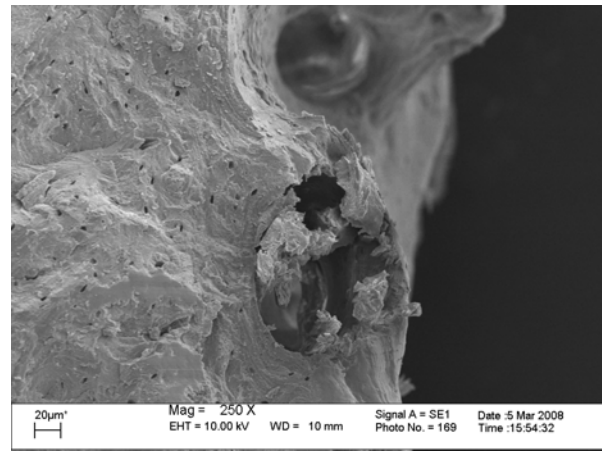
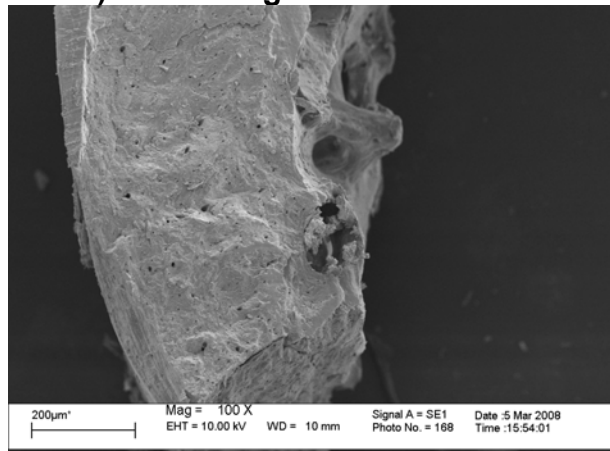
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

### 5.3.12) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com Flavonóide dose 3 (G11)



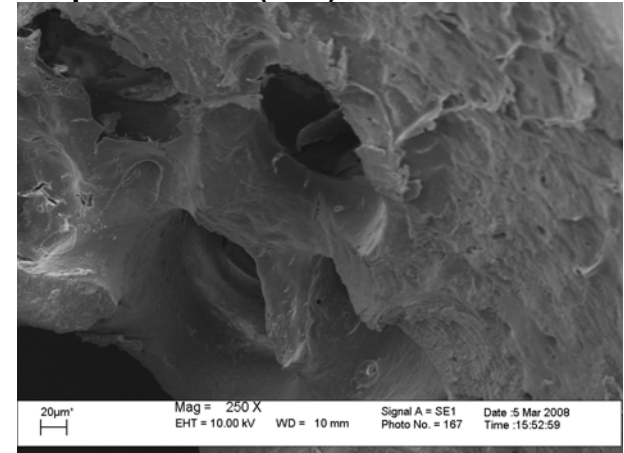
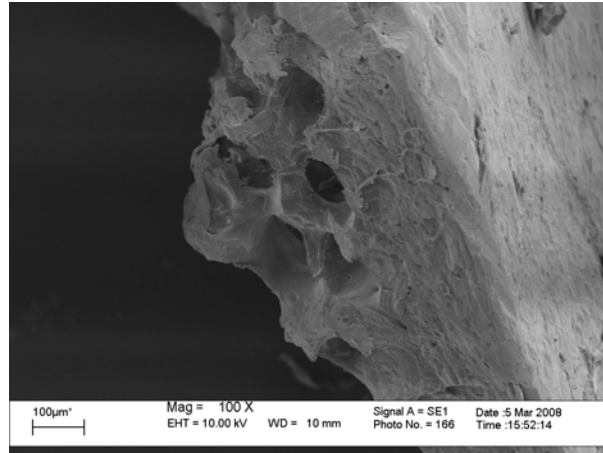
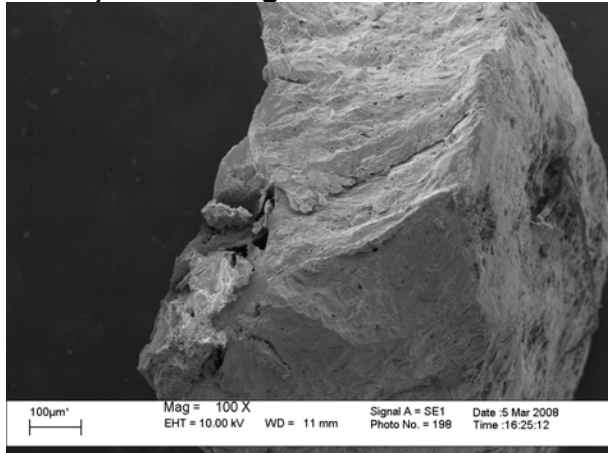
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

### 5.3.13) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com Fitoterápico dose 1 (G12)



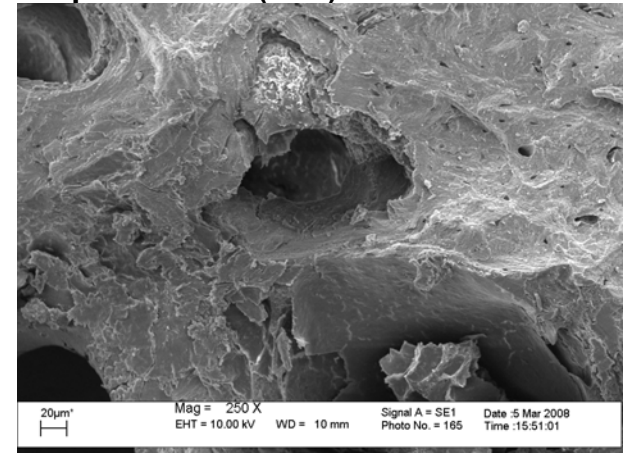
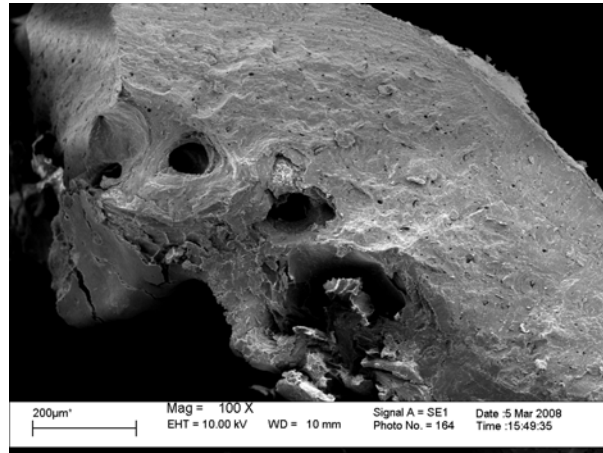
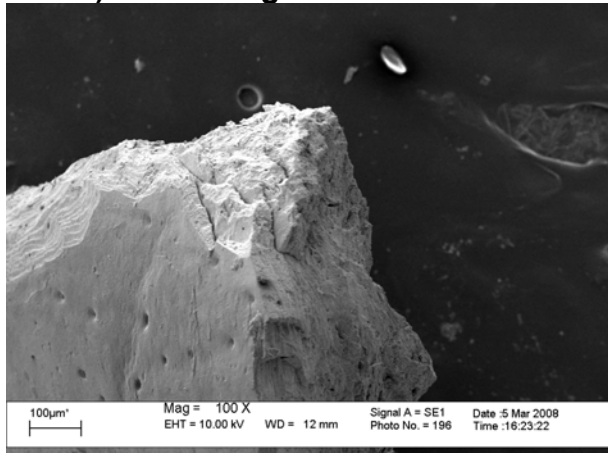
Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.

**5.3.14) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com Fitoterápico dose 2 (G13)**



*Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.*

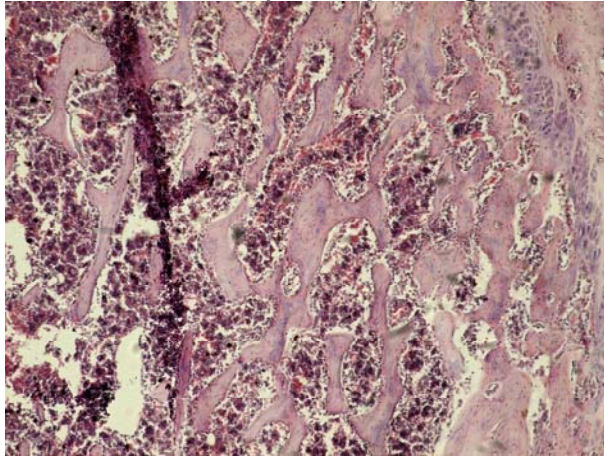
**5.3.15) Microfotografia eletrônica de varredura de ossos de ratas tratadas com Fitoterápico dose 3 (G14)**



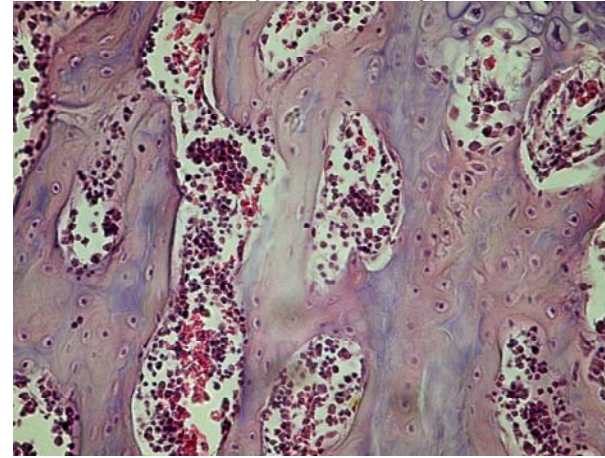
*Mag: magnitude do aumento; EHT: potência do microscópio eletrônico de varredura; WD: foco.*

**5.4) Histopatologia óssea de ratas adultas (120 dias) submetidas a diferentes tratamentos.**

**5.4.1) Histopatologia óssea de ratas controles (Ração- G1)**

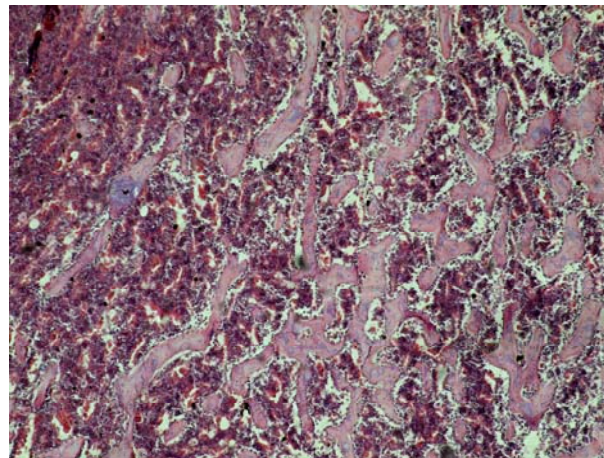


10x

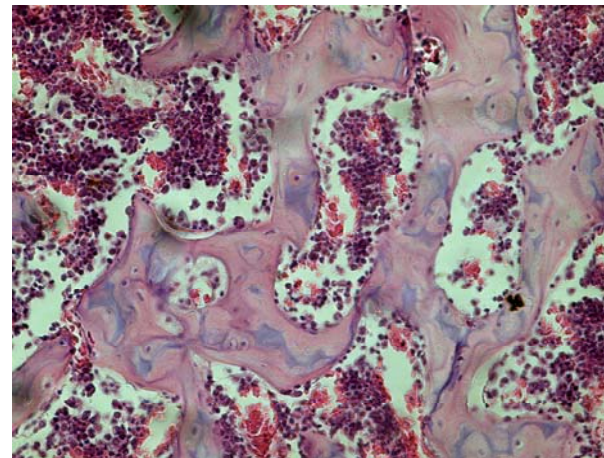


40x

**5.4.2) Histopatologia óssea de ratas controles com osteoporose (G2)**

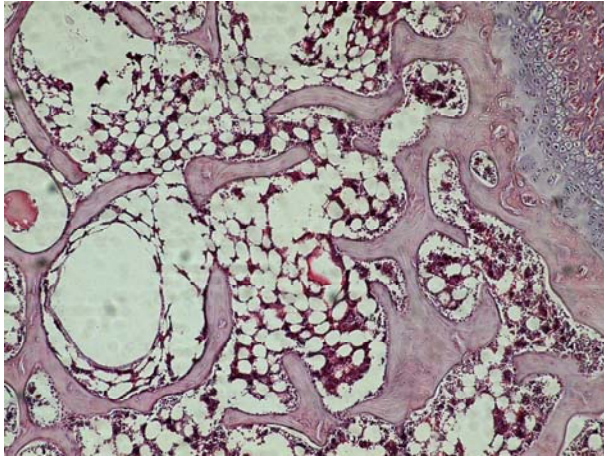


10x

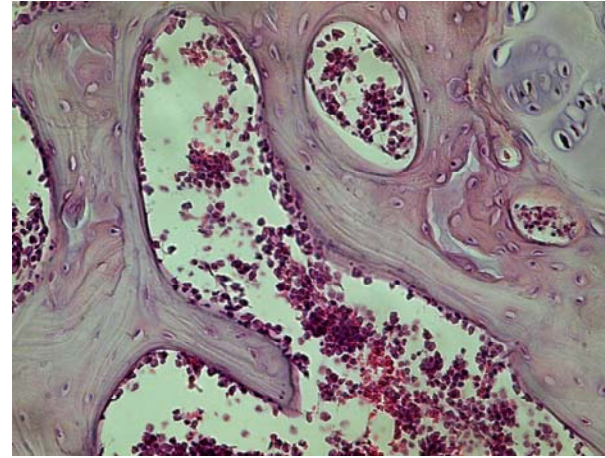


40x

**5.4.3) Histopatologia óssea de ratas tratadas com bifosfonato dose 1 (G3)**

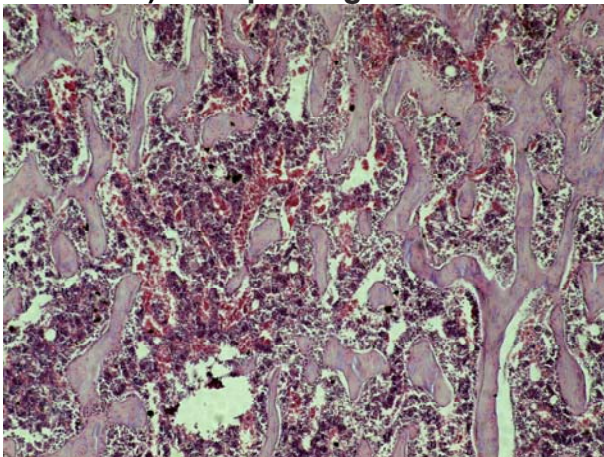


10x

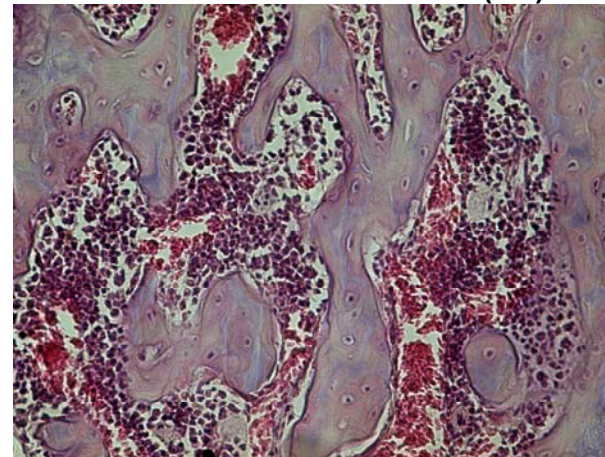


40x

**5.4.4) Histopatologia óssea de ratas tratadas com bifosfonato dose 2 (G4)**

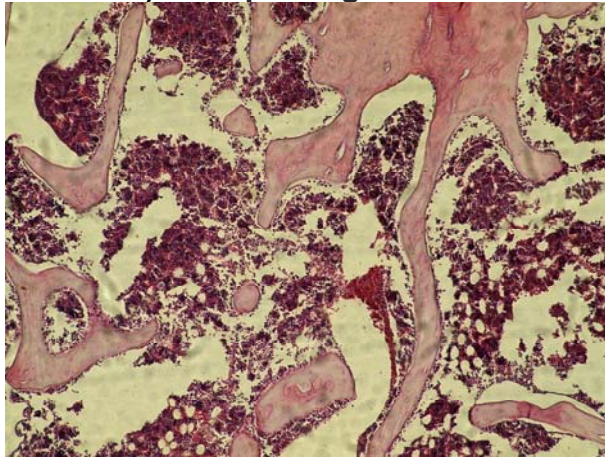


10x

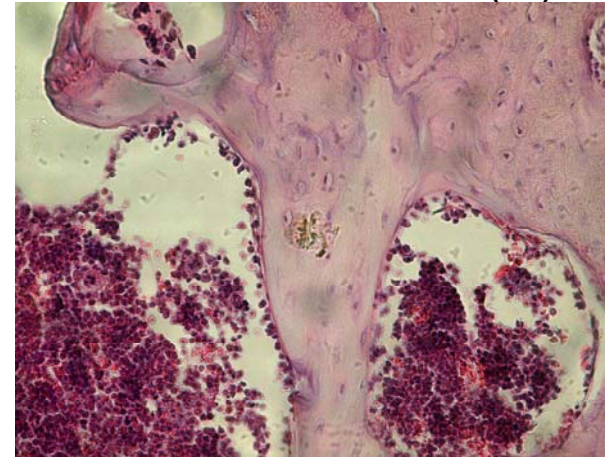


40x

**5.4.5) Histopatologia óssea de ratas tratadas com bifosfonato dose 3 (G5)**

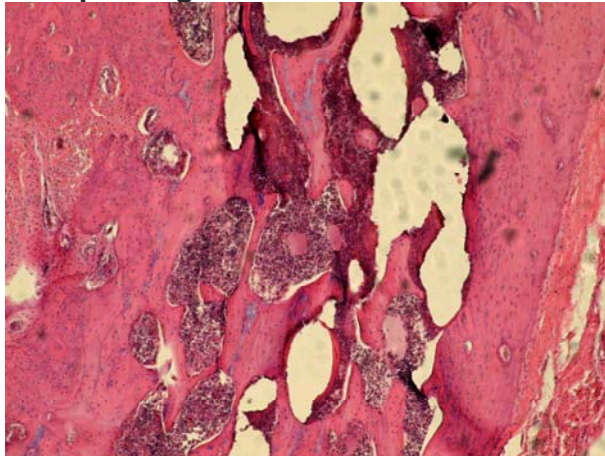


10x

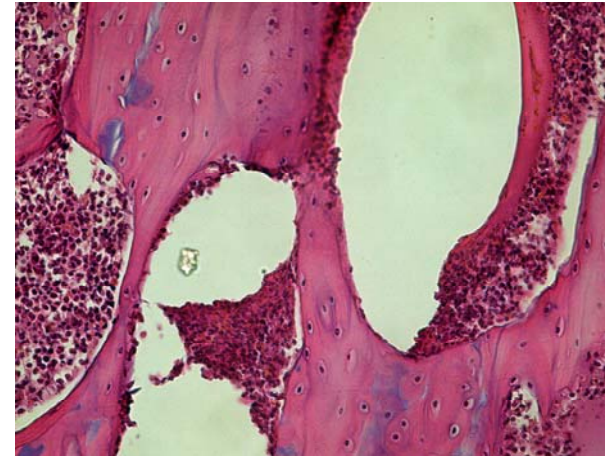


40x

**5.4.6) Histopatologia óssea de ratas tratadas com bifosfonato dose 1 + sinvastatina dose 1 (G6)**

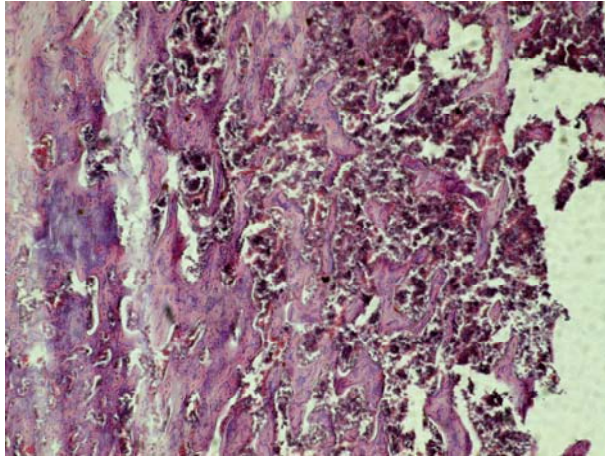


10x

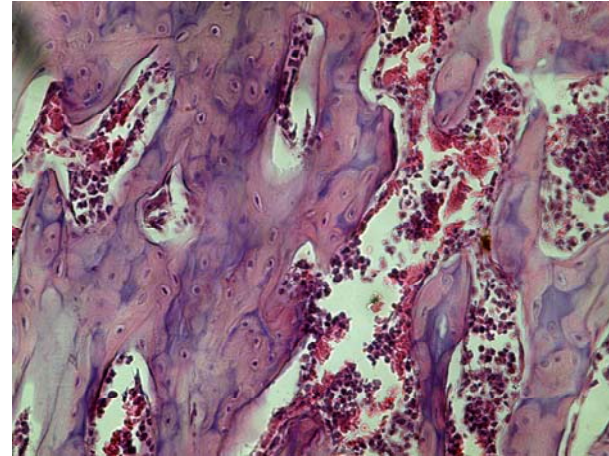


40x

**5.4.7) Histopatologia óssea de ratas tratadas com bifosfonato dose 2 + sinvastatina dose 2 (G7)**

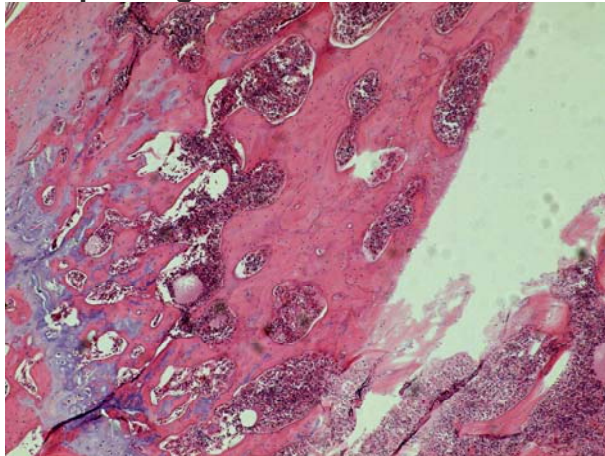


10x

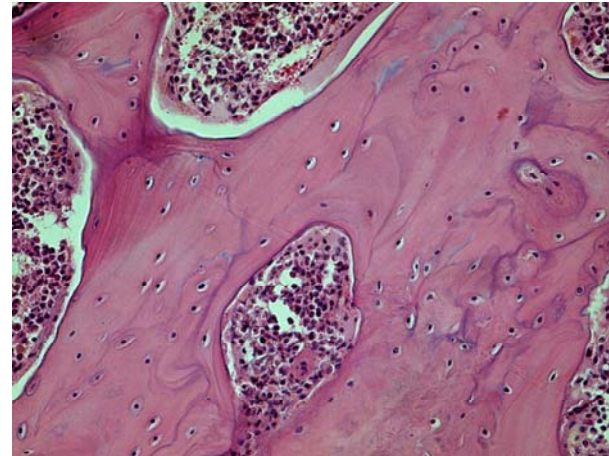


40x

**5.4.8) Histopatologia óssea de ratas tratadas com bifosfonato dose 3 + sinvastatina dose 3 (G8)**

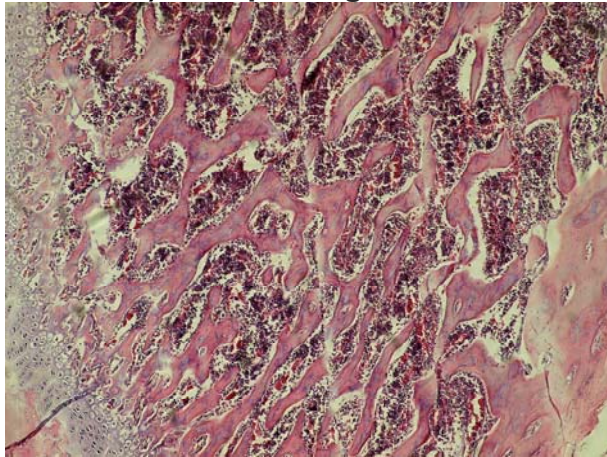


10x

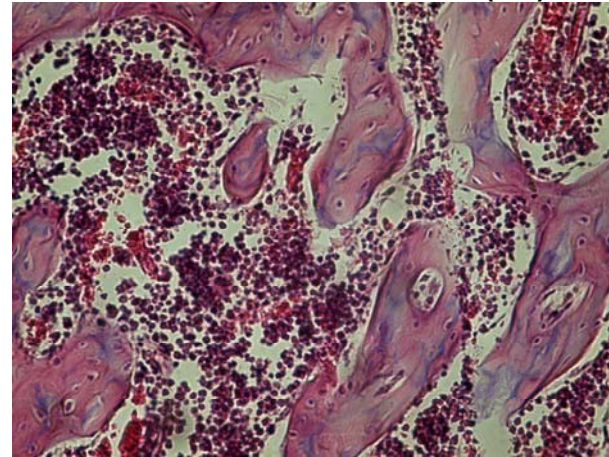


40x

**5.4.9) Histopatologia óssea de ratas tratadas com Flavonóide dose 1 (G9)**

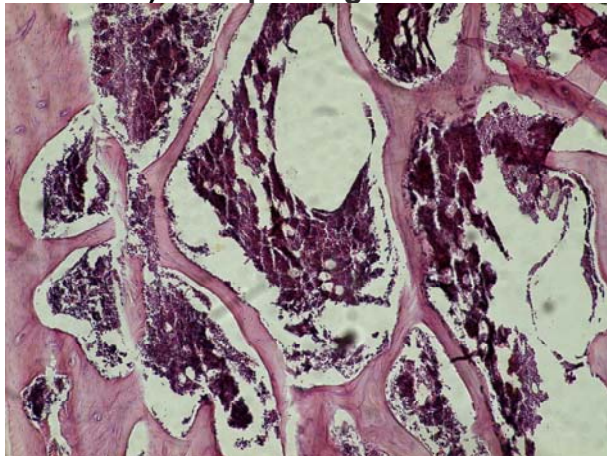


10x

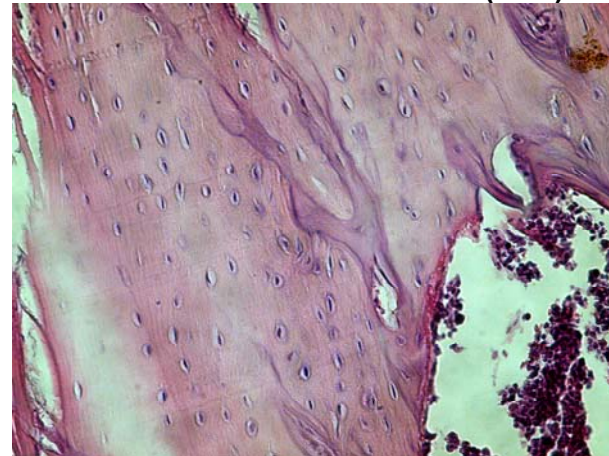


40x

**5.4.10) Histopatologia óssea de ratas tratadas com Flavonóide dose 2 (G10)**

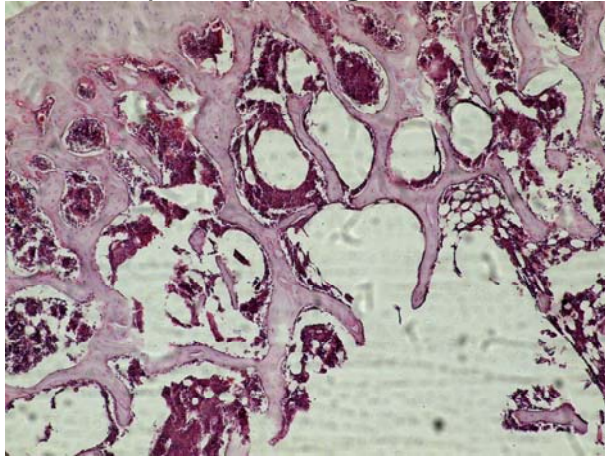


10x

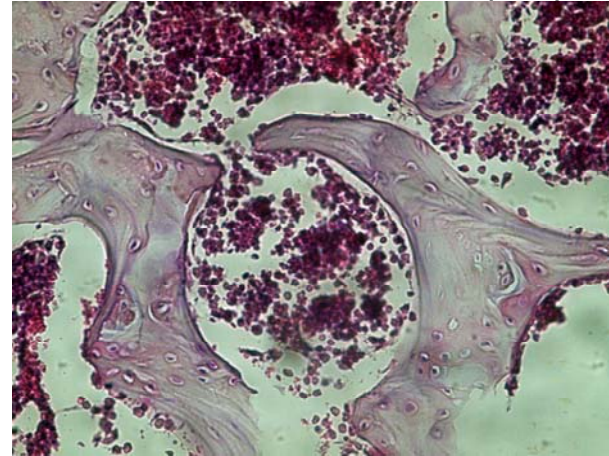


40

**5.4.11) Histopatologia óssea de ratas tratadas com Flavonóide dose 3 (G11)**

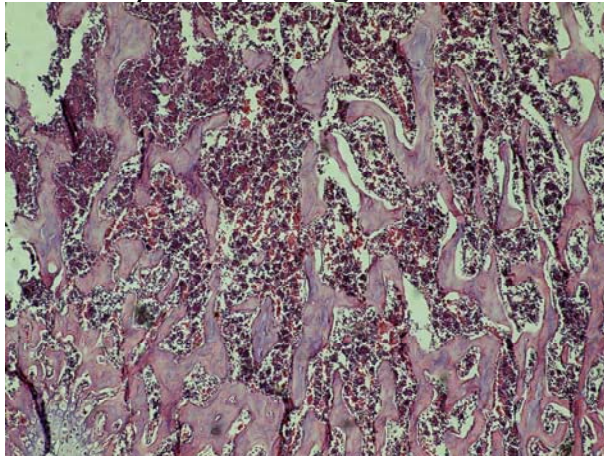


10x

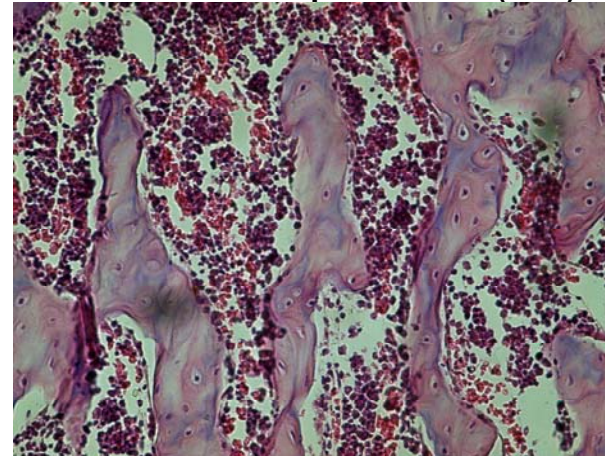


40x

**5.4.12) Histopatologia óssea de ratas tratadas com Fitoterápico dose 1 (G12)**

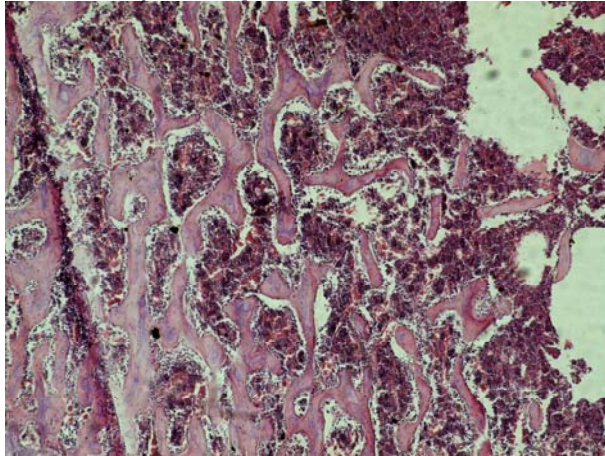


10x

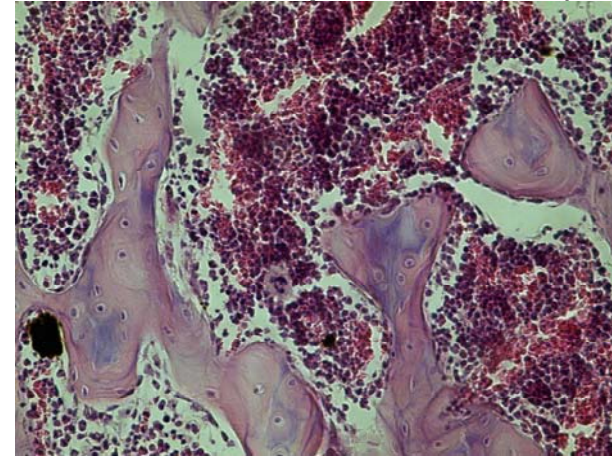


40x

**5.4.13) Histopatologia óssea de ratas tratadas com Fitoterápico dose 2 (G13)**

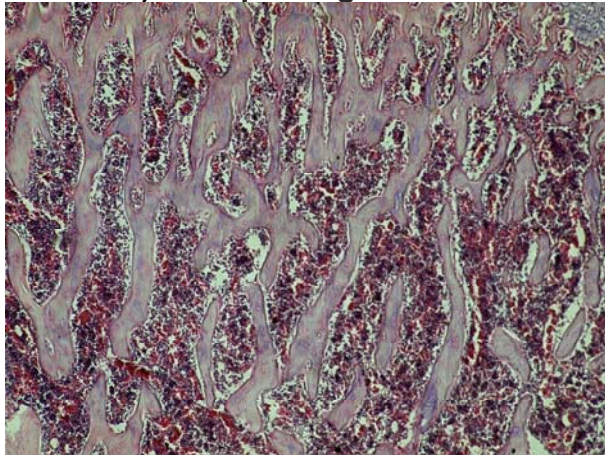


10x

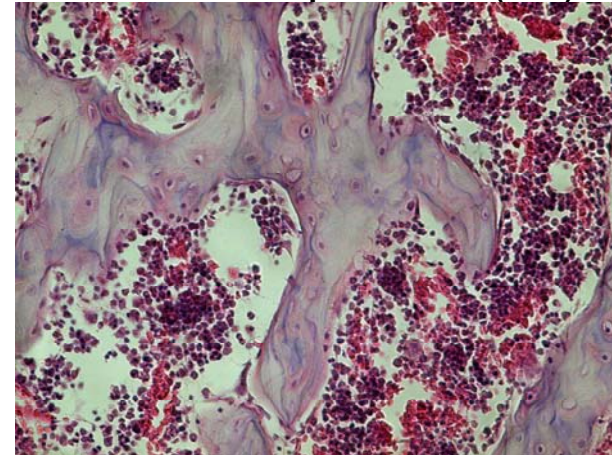


40x

**5.4.14) Histopatologia óssea de ratas tratadas com Fitoterápico dose 2 (G14)**



10x



40x

As Figuras do item 5.4 mostram os cortes histológicos da região do terço proximal do fêmur esquerdo dos animais aos 30 dias de tratamento. A Figura do item 5.4.1 (ratas controle ração - G1) mostra trabéculas ósseas de espessura normal, contendo restos de matriz cartilaginosa com os componentes celulares e não celulares preservados e tecidos mesenquimal e hemocitopoético normais. A Figura do item 5.4.2 (ratas controle com osteoporose - G2) mostra discreta diminuição da espessura das trabéculas ósseas mantendo os demais componentes ósseos preservados nestes animais que receberam dexametasona; comparado ao G1 (controle - ração) evidencia o efeito desse glicocorticóide na indução da osteoporose. 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. 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.*, 2001).

A figura do item 5.4.3 (G3) mostra uma diminuição expressiva da espessura das trabéculas ósseas que se apresentam finas e esparsas, com diminuição da quantidade de tecido ósseo, preservação de seus componentes e medula óssea preservada. Já a figura do item 5.4.4 (G4) mostra trabéculas ósseas de espessura normal, contendo restos de matriz cartilaginosa. Componentes celulares e não celulares se encontram preservados e tecidos mesenquimal e hemocitopoético normais; para estes animais, tratados com o bifosfonato alendronato de sódio na dosagem de 0,40 mg, houve uma notável recuperação óssea com a matriz bastante semelhante ao G1 (ratas controle ração). A figura do item 5.4.5 (G5) também mostra uma diminuição expressiva da espessura das trabéculas ósseas semelhante ao G3, o que indica que na dosagem de 0,60 mg o tratamento com o alendronato de sódio também não apresentou o efeito desejado.

As figuras dos itens 5.4.6, 5.4.7 e 5.4.8 mostram os tratamentos nos quais foram realizadas associações de bifosfonato e sinvastatina. Para os animais do G6 (item 5.4.6) observou-se aumento da espessura das trabéculas ósseas com preservação dos componentes do tecido ósseo e medula óssea vermelha. A

figura em maior aumento do item 5.4.7 mostra trabéculas de espessura normal com restos de matriz cartilaginosa e tecido ósseo, mesenquimal e hemocitopoético preservados. Já para o grupo G8 (item 5.4.8) foi observado um aumento expressivo da espessura das trabéculas preservando os componentes dos tecidos ósseos e medulares com predominância do tecido ósseo em detrimento ao mesenquimal, o que indica este como o melhor tratamento para a recuperação da espessura das trabéculas ósseas nestes animais com osteoporose induzida por dexametasona.

As figuras dos itens 5.4.9, 5.4.10 e 5.4.11 mostram os tratamentos com o flavonóide crisina nas doses 1, 2 e 3, respectivamente. As figuras do item 5.4.8 (G8) mostram trabéculas ósseas de espessura normal, contendo restos de matriz cartilaginosa com componentes celulares e não celulares preservados e tecidos mesenquimal e hemocitopoético normais. Já para o G9 (item 5.4.9) observamos a diminuição expressiva da espessura das trabéculas ósseas que se apresentam finas e esparsas com diminuição da quantidade de tecido ósseo e preservação de seus componentes, o que caracteriza um tratamento de baixa eficiência na recuperação da espessura das trabéculas ósseas destes animais; a medula óssea neste grupo encontra-se preservada e em maior aumento podemos observar detalhes desta matriz: fibras colágenas e células ósseas – osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. O item 5.4.10 (G10) mostra trabéculas ósseas de espessura normal, contendo restos de matriz cartilaginosa com componentes celulares e não celulares preservados e tecidos mesenquimal e hemocitopoético normais, pode-se observar a região próxima ao disco epifisário com trabéculas de estrutura e espessura usuais.

As figuras dos itens 5.4.12, 5.4.13 e 5.4.14 mostram os tratamentos com extrato hidroalcoólico de *Camellia sinensis* nas doses 1, 2 e 3, respectivamente. Para estes 3 tratamentos foram observados os mesmos aspectos ósseos com trabéculas ósseas de espessura normal, contendo restos de matriz cartilaginosa, componentes celulares e não celulares preservados e tecidos mesenquimal e hemocitopoético normais, desta forma estes tratamentos recuperaram parte da espessura das trabéculas ósseas, mas não mostraram nenhuma relação dose-dependente.

## 6) CONCLUSÕES:

Diante dos resultados obtidos, observamos que a maior parte das análises dos parâmetros sanguíneos avaliados neste experimento, mostrou-se estatisticamente diferente entre os grupos tratados e os animais doentes (controle com osteoporose), o que pôde ser sugerido como uma melhora do quadro clínico desses animais. Apenas para alguns parâmetros hematológicos avaliados como: mielócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média e amplitude de distribuição do tamanho das hemácias, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle com osteoporose e os outros grupos tratados.

As observações das microfotografias eletrônicas de varredura permitiram identificar maior número de poros nos ossos dos animais doentes (controle com osteoporose) e uma diminuição destes nos animais pertencentes aos grupos tratados. Isto também pôde ser observado através da avaliação da histopatologia óssea, que mostrou uma recuperação no tamanho das trabéculas ósseas nos animais tratados quando comparados ao controle osteopórotico.

Nossa metodologia experimental com teste de três diferentes dosagens para cada tratamento utilizado seguiu fielmente o modelo conhecido e já estabelecido para o estudo da osteoporose induzida por glicocorticóides em ratas da raça *Wistar*. Os resultados de nossas dosagens sanguíneas evidenciaram que a osteoporose é uma doença esquelética sistêmica que não provoca grande alteração dos parâmetros sanguíneos rotineiramente avaliados pelos clínicos, assim, estes marcadores bioquímicos não se mostraram eficazes para o diagnóstico e acompanhamento desta patologia óssea. A análise histopatológica mostrou tratamentos com aumentos expressivos da espessura das trabéculas ósseas com componentes celulares preservados (G6 e G8). Na osteoporose, os componentes celulares e não celulares do tecido ósseo estão preservados, observando apenas uma diminuição da quantidade deste tecido. O córtex do osso torna-se mais delgado e a espessura das trabéculas diminui, prejudicando o suporte tridimensional que confere resistência ao órgão que fica mais suscetível a fraturas.

## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aklilu, M., Kindler, H.L., Donehower, R.C., Mani, S., Vokes, E.E., 2003. Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. *Annals of Oncology* 14, 1270–1273.

Alekel, D.L.; Germain, A. S.; Peterson, C.T.; Hanson, K.B.; B.CEPPA, Curitiba, v. 23, n. 2, jul./dez. 2005

Allen, S. W; Mueller, L., Williams, S. N; Quattrochi, L. C.; Raucy, J. The use of a high-volume screening procedure to assess the effects of dietary flavonoids on human CYP 1A1 expression. *Drug Metabolism and Disposition*, Baltimore, v.29, p.1074-1079, Aug. 2001.

Amaya-Farfan, J. Fatores nutricionais que influem na formação e manutenção do osso. *Revista de Nutrição Puccamp, Campinas*, v.7, n.2, p.148-172, 1994.

Ana Lia Anbinder, A. L.; Prado, F. A.; Prado, M. A.; Balducci, I.; Rocha, R. F. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. *Braz Oral Res* 2007;21(3):247-52

Anbinder A.L., Prado F.A.,Prado M.A., Balducci I., Rocha R.F. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. *Braz Oral Res* 2007;21(3):247-52.

Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, *et al.* Dietary soybean protein prevents bone loss in a ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 1996; 126:161-7.

Arjmandi BH, Liu CC, Yu S, Kalu DN. Effect of growth hormone on trabecular bone loss, Osteoclasts, Osteoblasts and their marrow progenitors. *J Bone Miner Res* 1994; 9 (1): S 382.

Arjmandi, B.H.; Getliger, M.J.; Goyal, N.V.; Alekel, L.; Hasler, C.M.; Juma, S.; Drum, M.L.; Hollis, B.W.; Kukreja, S.C. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, p. 1358S-1363S, 1998b.

Asfar, S. *et al.* Effect of green tea in prevention and reversal of fasting-induced intestinal mucosa damage. *Nutrition*, v. 19, p. 536-540, 2003.

Aubin JE. Advances in osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 1998;76:899–910.

Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2:81–94.

Aucamp, J. *et al.* Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (*Camellia sinensis*). *Anticancer Res.*, v. 17, p. 4381-4386, 1997.

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

Bailey, D.G., Arnold, J.M., Munoz, C., Spence, J.D., 1993. Grapefruit juice felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 53, 637–642.

Balentine, D. A. Manufacturing and chemistry of tea. In: Huang, M. *et al.* Phenolic compounds in food and their effects on health I: analysis, occurrence, & chemistry. Washington: American Chemical Society, 1992. 338p. p. 102-117.

Balentine, D.A.; Wiseman, S.A.; Bouwens, L.C.M. The chemistry of tea flavonoids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 37, n. 8, p. 693-704, 1997.

Barnes S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr* 1995; 125 Suppl:777S- 783S.

Bauer DC, Mundy GR, Jamal SA, *et al*: Statin use, bone mass and fracture: an analysis of two prospective studies. *J Bone Miner Res* 14 (suppl 1): S179, 1999

Baylink DJ, Duane PB, Farley SM. Monofluorophosphate physiology: the effect of fluoride on bone. *Caries Res*, 17(suppl):56,1983.

Bedani R.; Rossi E.A. isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. *B.CEPPA, Curitiba*, v. 23, n. 2, p. 231-264, jul./dez. 2005

Benhamou, C.L. Effects of osteoporosis medications on bone quality. *Joint Bone Spine* 2006.

Bixby, M. *et al*. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sci.*, v. 77, n. 3, p. 345-358, 2005.

Black DM, Cummings ST, Karpf DB *et al*. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. *Lancet*, 348:1535,1996.

Black LJ, Sato M, Rowley ER. Raloxifene prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest*, 93:63,1994.

Bode A, Dong Z. Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer. *Lancet Oncol* 2000; 1: 181–188.

Boonen, S.; Lesaffre, E.; Dequeker, J.; Aerssens, J.; Nijs, J.; Pelemans, W.; Bouillon, R. Relationship between baseline IGF-I and femoral bone density in women aged over 70 years: potential implications for prevention of aged-related bone loss. *The Journal of the American Geriatrics Society*, v. 44, p. 1301-1306, 1996.

Brandli DW, Golde G, Greenwald M, Silverman ST. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a cross-sectional study. *Steroids* 1991; 56:518-523.

Brashear, W.T., Kirschner, A.S., Cassidy, A., Heubi, J.E., 2001. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition* 131, 1362S–1375S.

Braun, J.P.: Rico, A.G.; Bernard, P. Blood biochemistry in calf, foal and goat during the first two weeks of life. *Clin. Chem.*, v.29, n.6, p. 1210-1216, 1992.

Brezinski, A.; Debi, A. Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, v. 85, p. 47-51, 1999.

British Pharmacopoea, v.II, Strasbourg: Council of Europe. 2000.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, *et al.* Cloning and characterization of an extracellular  $\text{Ca}(2^+)$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993;366:575-80.

Brownlow, M.A.; Hutchins, D.R. The concept of osmolality: its use in the evaluation of “dehydration” in the horse. *Equine vet. J.*, V.14, n.2, p. 106-110, 1982.

Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon J, *et al.* Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995; 377: 552–557.

Bryant, H.U.; Dere, W.H. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 217, p. 45-52, 1998.

Buchler, M., König, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H., Horie, T., Keppler, D., 1996. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in

hyperbilirubinemic mutant rats. *Journal of Biological Chemistry* 271, 15091–15098.

Buchler, P., Gukovskaya, A.S., Mouria, M., Buchler, M.C., Buchler, M.W., Friess, H., Pandol, S.J., Reber, H.A., Hines, O.J., 2003. Prevention of metastatic pancreatic cancer growth in vivo by induction of apoptosis with genistein, a naturally occurring isoflavonoid. *Pancreas* 26, 264–273.

Campo V.L.; Carvalho I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Quím. Nova* vol.30 nº.2 São Paulo Mar./Apr. 2007

Campo, Vanessa Leiria; Carvalho, Ivone. Hypolipemic statins and new therapeutic trends. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, 2007.

Canalis E, McCarhy TL, Centrella M. Growth factors and cytokines in bone metabolism. *Ann Rev Med*, 42:17,1991.

Canalis E. Inhibitory actions of glucocorticoids on skeletal growth - is local insulin-like growth factor I to blame? *Endocrinology* 1998; 139: 3041-3042.

Canalis E. Mechanism of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1996;81:3444-7.

Canalis E: Growth factors, bone metabolism and metabolic bone diseases. *Endocrinologist* 6: 89-94, 1996.

Cardoso, C.A. Influência de kits disponíveis comercialmente sobre os valores de constituintes bioquímicos em eqüinos hípidos. Viçosa, 2007.

Carvalho D.C.L.; Carvalho M.M.; Cliquet A.Jr. Osteoporose por desuso: aplicação na reabilitação do lesado medular. *Acta Ortop. Bras.* Vol.9, n.3, 2001.

Carvalho, D. C. L.; Rosim, G. C.; Gama, L. O. R.; Tavares, M. R.; Tribioli, R. A.; Santos, I. R.; Cliquet, Jr. A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. *Rev. Saúde Pública*, 36(5):647-54, 2002.

Castro L.F., Silva A.T.A., Chung M.C., Ferreira A.G., Ferreira E.I. Bifosfonatos (Bfs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 3, 456-460, 2004.

Chatterjee M, Agarwal R, Mukhtar H. Ultraviolet B radiation-induced DNA lesions in mouse epidermis: an assessment using a novel <sup>32</sup>P-postlabelling technique. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 590–595.

Chavassieux PM, Arlot ME, Roux JP *et al.* Effects of alendronate on bone quality and remodeling in glucocorticoid-induced osteoporosis: a histomorphometric analysis of transiliac biopsies. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000; 15: 754-762.

Chen Z, Schell J, Ho C, Chen K. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett* 1998; 129: 173–179.

Chen, L; Lee, M.; Yang, C. Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metab. Dispos.*, v. 25, n. 9, p. 1045-1050, 1997.

Cheng SL, Zhang SF, Nelson TL, Warlow PM, Civitelli R. Stimulatory of human osteoblasts differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. *Calcif Tissue Int* 1994; 55:356-362.

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. *J. Nutr.* 133: 1892-1897, 2003.

Chua, C.C., Chua, B.H., Chen, Z., Landy, C., Hamdy, R.C., 2002. TGF-beta1 inhibits multiple caspases induced by TNF-alpha in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1593, 1–8.

Chung J, Han J, Hwang E, *et al.* Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB J* 2003; 17: 1913–1915.

Chung YS, Lee MD, Lee SK, Kim HM, Fitzpatrick LA: HMG-CoA reductase inhibitors increased BMD in type 2 diabetes mellitus patients. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1137-42, 2000.

Civitelli R, Agnusdei D, Nardi P, Zacchei F, Avioli LV, Gennari C. Effects of 1-year treatment with estrogens on bone mass, intestinal calcium absorption, and 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase reserve in postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 42:77,1988.

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.; Pova L.C. Phytoestrogens: position of the Department of Female Endocrinology of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol. 46, n. 6, 2002.

Clarkson TB, Anthony MS, Hughes CL. Estrogenic soybean isoflavones and chronic disease. Risks and benefits. *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6:11-6.

Clarkson TB, Anthony MS, Williams JK, Honore EK, Cline JM. The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217:365-8.

Cohn SH, Abesamis C, Yasamura S, Aloia JF, Zanzi I, Ellis KJ. Comparative skeletal mass and radial bone mineral content in black and white women. *Metabolism*, 26:171,1977.

Cole, S.P., Sparks, K.E., Fraser, K., Loe, D.W., Grant, C.E., Wilson, G.M., Deeley, R.G., 1994. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Research* 54, 5902–5910.

Coles, E.H. *Patologia clínica veterinária*. 3 ed. São Paulo: Manole, 1984, 556 p.

Collier, P.D.; Bryce, T.; Mallows, R.; Thomas, P.E.; Frost, D.J.; Korver, O.; Wilkins, C.K. The theaflavins of black tea. *Tetrahedron*, v. 29, n. 1, p. 125-142, 1973.

Comisión Europea. Informe sobre la osteoporosis en la Comunidad Europea: Accion para la prevención. Luxemburgo : Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, 1998. 116p.

Conselho Regional de Farmácia. Medicamentos fitoterápicos. Disponível em < [www.crfsp.org.br](http://www.crfsp.org.br) > Acesso em 22 de setembro de 2006.

Consenso Brasileiro de Osteoporose 2002.

Consensus Development Conference. Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment of Osteoporosis. *Am J Med*, 94:646,1993.

Cooper GS, Umbach DM: Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A metanalysis. *J Bone Miner Res* 11: 1841-9, 1996.

Cooper, C.; Campion, G.; Melton, L.J. Hip fractures in the elderly: a world–wide projection. *Osteoporosis International*, v. 2, p. 285-289, 1992.

Craig A, *et al.* Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *Journal American Academy of Dermatology* 2001; 44 3: 425-432.

Critchfield JW, Butera ST and Folks TM, Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12: 39–46, 1996.

Critchfield JW, Coligan JE, Folks TM and Butera ST, Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 94: 6110–6115, 1997.

Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, *et al.* Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel *M*terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:10529-34.

Cui Q, Wang GJ, Su CC, Balian G: lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop Rel Res 344: 8-19, 1997.

Cummings SR, Bauer DC: Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture? JAMA 283: 3255-7, 2000.

Das A. S., Das D., Mukherjee M., Mukherjee S., Mitra C. Phytoestrogenic effects of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (*Rattus norvegicus*) model of osteoporosis. Life Sciences 77 (2005) 3049–3057.

Das A.S., Mukherjee M., Mitra C. Evidence for a prospective anti-osteoporosis effect of black tea (*Camellia Sinensis*) extract in a bilaterally ovariectomized rat model. Asia Pacific J Clin Nutr 2004;13 (2): 210-216.

Dawson-Hughes B, Harris SS, Finneran S: Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. J Clin Endocrinol Metab 80: 3657-61, 1995.

Dawson-Hughes, B. Osteoporosis treatment and the calcium requirement. American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v.67, p.5-6, 1998.

Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH *et al.* Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. N Engl J Med, 337:1641,1997.

Deyhim, F.; Stoecker; Brusewitz, G.H.; Arjmandi, B.H. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutrition Research*, v. 23, p. 123-130, 2003.

Dietrich JW, Canalis EM, Maina DM, Raisz LG. Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinology* 1979; 104:715-721.

Divers, T.J.; Johnston, J.K.; Reef, V.B.; Acland, H. Interpretation of electrolyte abnormalities in clinical disease in the horse. In: *Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*, 32, 1986, Tennessee. *Proceedings...Tennessee: AAEP*, 1986. p.69-80.

Dreosti, I.E. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutr. Rev.*, v. 54, n. 11 (Part II), p. s51-s58, 1996.

Dresser, G.K., Bailey, D.G., Leake, B.F., Schwarz, U.I., Dawson, P.A., Freeman, D.J., Kim, R.B., 2002. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 71, 11–20.

Ducharme, M.P., Warbasse, L.H., Edwards, D.J., 1995. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 57, 485–491.

Duggan, J., Peterson, W.S., Schutz, M., Khuder, S., Charkraborty, J., 2001. Use of complementary and alternative therapies in HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STDs* 15, 159–167.

Eastell R., Reid D.M., Compston J., Cooper C., Fogelman I., Francis R.M. et al. An UK consensus group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *J. Intern. Med.* 1998; 244:271-92.

Ebeling PR, Atley LM, Guthrie JR *et al.* Bone turnover markers and bone density across the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3366, 1996.

Ebranhimpour, A.; Francis, M.D. *Em Bisphosphonate Therapy in Acute and Chronic Bone Loss: Physical Chemical Considerations in Bisphosphonate-related Therapies*; Bijvoet, O.; Fleisch, H. A.; Canfield, R. E.; Russell, R. G. G., eds.; *Bisphosphonate on Bones*, Elsevier: Amsterdam, 1995.

Elmets C, Singh D, Tubesing K, *et al.* Prevention of cutaneous photodamage by polyphenols from green tea. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 425–432.

Enk CD, Sredni D, Blauvelt A, Katz SI. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. *J Immunol* 1995; 154: 4851–4856.

Eriksen EF, Colvard DS, Gerg NJ, Grahan ML, Mann KG, Spelberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal osteoblast-like cells. *Science*, 241: 84, 1988.

Eriksen FF, Hodgson SF, Estell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL. Cancellous bone remodeling in type I (post-menopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J Bone Miner Res*, 5:311,1990.

Eto, S. *et al.* Medical treatment of malignant hypercalcemia. *Gan to-Kagaku-Ryoho*, v. 20, n. 15, p. 2311-8,1993.

Ettinger B. Prevention on osteoporosis: treatment of estradiol deficiency. *Obstet Gynecol*, 72:125, 1988.

European Pharmacopoea, Strasbourg: Council of Europe Strasbourg: Council of Europe. S2001

Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, *et al.* The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 1998;8:274-81.

Farias, F.A.B. Prevalência de osteoporose, fraturas vertebrais, ingestão de cálcio, e deficiência de vitamina D em mulheres na pós-menopausa. Recife, março de 2003. xxv, 164 f.

Farmacopéia Brasileira: 4<sup>a</sup>. Edição. São Paulo: Editora Atheneu, parte II.

Fernandes CE, Wheba S, Melo NR. Osteoporose pós menopausa. *Femina* 1996;24(suppl1):3-26.

Ferrari S, Rizzoli R, Slosman D, Bonjour JP: Familial resemblance for bone mineral mass is expressed before puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 358-61, 1998.

Ferrari, S, Rizzoli, R, Bonjour, J P. Genetic aspects of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol*, v.11, p.294-300, 1999.

Ferrari, S, Rizzoli, R, Manen, D, Slosman, D, Bonjour, J P. Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms ( Fok I) and bone mineral density : interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms. *J Bone Miner Res*, v. 13, p.925-930, 1998.

Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., deTakats, P.G., Anderson, D., Baker, J., Kerr, D.J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clinical Cancer Research* 2, 659–668, 1996.

Finco, D.R. Kidney function. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss M.L. (Ed) *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5 ed. New York: Academic Press, 1997. Cap 17, p.441-484.

Fischbach, F.T. Manual de enfermagem: exames laboratoriais e diagnósticos – 7ª ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 2005.

Fleish H. Bisphosphonates in Bone Disease. From the Laboratory to the patient, 3. ed. New York, London, Parthenon Publishing Group, 1997.

Flicker L, Hopper JL, Larkins RG *et al.* Nandrolone decanoate and intranasal calcitonin as therapy in established osteoporosis. *Osteoporosis Int* 7:29, 1997.

Fonseca D. and Ward W.E. Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. *Bone* 35 (2004) 489– 497.

Frei, B.; Higdon, J. V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J. Nutr.*, v. 133, p. 3275-3284, 2003.

Froes, N.D.T.C.; Pereira, E.S; Negrelli, W.F. Fatores de risco da osteoporose: prevenção e detecção através do monitoramento clínico e genético. *Acta ortop. bras.*, São Paulo, v. 10, n. 1, 2002.

Fuhr, U., Maier-Bruggemann, A., Blume, H., Muck, W., Unger, S., Kuhlmann, J., Huschka, C., Zaigler, M., Rietbrock, S., Staib, A.H., 1998. Grapefruit juice increases oral nimodipine bioavailability. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 36, 126–132.

Fujita, Y.; Yamane, T.; Tanaka, M.; Kuwata, K.; Okuzumi, J.; Takahashi, T.; Fujiki, H.; Okuda, T. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 80, p. 503-505, 1989.

Fukutake M, Takahashi M, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, Wakabayashi K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chem Toxicol* 1996; 34:457-61.

Furlanetto, R.P.; Brandão, C.M.A.; Kasamatsu, T.S.; Castro, M.L.; Vieira, J.G.H. - Calcitonin secretion in hypo and hyperthyroidism. In: Latin-American Thyroid Congress,5, São Paulo,1991, Abstract book. São Paulo,1991,p.21.

Gallager JL, Riggs BL, Deluca HF. Effect of estrogen on calcium and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab, 51:1359,1980.

Gallagher JC, Melton LJ, Riggs BL, Bergstralh E. Epidemiology of fractures of the proximal femur in Rochester, Minnesota, Clin Orthop, 150:163,1980.

Gallagher, J.C., Satpathy, R., Rafferty, K., Haynatzka, V., 2004. The effect of soy protein isolate on bone metabolism. Menopause 11, 290–298.

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

Garland, D.E.; Stewart, C.A; Adkins, R.H.; Hu, S.S.; Rosen, C.; Liotta, F.J.; Weinstein, D.A.: Osteoporosis after spinal cord injury. Journal of Orthopaedic Research 10: 371-378, 1992.

Garnero P, Shih WJ, Gineyts E *et al.* Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. J Clin Endocrinol Metab 79:1693, 1994.

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. J Clin Endocrinol Metabol 1999;84:2390-6.

Genant HK, Cooper C, Poor R, Reid I, Ehrlich G, Kanis J *et al.* Interim report and recommendations of the World Health Organization task-force for osteoporosis. Osteoporos Int. 1999;10(4):259-64.

Gennari C, Adami S, Agnusdei D, *et al.* Effect of chronic treatment with ipriflavone in postmenopausal women with low bone mass. *Calcif Tissue Int* 1997; 61 (Suppl 1):S19-22.

Gennari, L., Becherini, L., Mansani, R, Brandi, M L. Fok I polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *J Bone Miner Res*, v.14, p.1379-1386, 1999.

Gert BJ, Shao P, Hanson UA *et al.* Monitoring boneresorption in early postmenopausal women by na immunoassay for cross-linked collagen peptides in urine. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 135-142.

Giada M.L. R., Filho J.M. The importance of dietary phenolic compounds In the promotion of human health. *UEPG Ci. Biol. Saúde*, Ponta Grossa, 12 (4): 7-15, dez. 2006.

Girasole G, Jilka RL, Passeri G. 17 $\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblastic in-vitro: potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest*, 89:883,1992.

Glantschnig, H., Fisher, J.E.,Wesolowski, G., Rodan, G.A., Reszka, A.A., 2003. M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ.* 10, 1165–1177.

Gohel A, McCarthy MB & Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1999; 140: 5339-5347.

Gomez, C, Naves, M L, Barrios, Y, Diaz, J B, Fernandez, J L, Salido, E, Torres, A, Cannata, J B. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mass, bone

loss and prevalence of vertebral fracture: differences in postmenopausal women and men. *Osteoporos Int*, v.10, p.175-182, 1999.

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

Guiness-Hey M, Hock JM. Increased trabecular bone mass in rats treated with human synthetic parathyroid hormone. *Metab Bone Dis Relat Res* 1984;5:177-81.

Guo, Q. *et al.* ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1427, p.13-23, 1999.

Haack, V.S., Chesters, J.G., Vollendorf, W., Story, J.A., Marlett, J.A. Increasing amounts of dietary fiber provided by foods normalizes physiologic response of the large bowel without altering calcium balance or fecal steroid excretion. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.68, n.3, p.615-622, 1998.

Hahn B.H., Mazzaferri E.L. Glucocorticoid--induced osteoporosis. *Hosp. Pract.* 1995: Aug 15:45-56.

Hallberg, L., Rossander-Hultén, L., Brune M., Gleerup, A. Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *European Journal of Clinical Nutrition*, London, v.46, p.317-327, 1992 .

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed., Oxford: University Press, 1999. Cap. 1-3, p. 1-245.

Han K.K., Júnior J.M.S., Haidar M.A., Girão M.J.B.C., Nunes M.G., Lima G.R., Baracat E.C. Phytoestrogen Effects on Some Clinical and Laboratory Parameters in Climacterium. *RBGO* - v. 24, nº 8, 2002.

Hanley DA. Biochemical markers of bone turnover. In: Henderson JE, Goltzman D, editors. The osteoporosis primer. 1st ed. Cambridge:University Press, 2000:239-52.

Hanson D.A., Weiss M.A.E., Bollen A.M. *et al.* A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 7:1251, 1992.

Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481–504.

Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994;60:573–8.

Harrison, T. R. *Medicina interna*. 13. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, Interamericana, 1996. 2.765 p.

Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67–202.

Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67–202.

Heaney RP, Recker RR, Saville PD. *J Lab Clin Med*, 92:953, 1978.

Heaney RP. Prevención de la fractura osteoporótica en mujeres. In: Avioli LV (ed). *El síndrome osteoporótico. Detección, Prevención y Tratamiento*. Madrid. Ediciones cea, p.53,1989.

Hebert J, Khugyani F, Athar M, *et al.* Chemoprevention of basal cell carcinomas in the ptc11/- Mouse – Green and black tea. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14: 358–362.

Heyse SP, Sartori L, Crepaldi G. Epidemiology of osteoporosis: A study of fracture mortality in Italy. *Calcif Tissue Int*, 46:289,1990.

Hill PA, Tumber A, Meikle MC: Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. *Endocrinology* 138:3849-58, 1997.

Hochberg M., Greenspan S., Wasnich R., Miller P., Thomson D., Ross P. Changes in bone density and turnover explain the reductions in incidence of nonvertebral fractures that occur during treatment with antiresorptive agents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87:1586-92.

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL *et al.* Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteo-protegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999; 140: 4382-4389.

Holmes SJ, Economou G, Whitehouse RW, Adams JE, Shalet SM: Reduced bone mineral density in patients with adult onset growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 669-74, 1994.

Homik JE, Cranney A, Shea B *et al.* A metaanalysis on the use of bisphosphonates in corticosteroid induced osteoporosis. *Journal of Rheumatology* 1999; 26: 1148-1157.

Hong, J. *et al.* Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependente metabolism of arachidonic in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem. Pharmacol.*, v. 62, p. 1175-1183, 2001.

Horcajada-Molteni, M.N., Crespy, V., Coxam, V., Davicco, M.J., Remesy, C., Barlet, J.P., 2000. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *J. Bone Miner. Res.* 15, 2251–2258.

Hu, M., Krausz, K., Chen, J., Ge, X., Li, J., Gelboin, H.L., Gonzalez, F.J., 2003. Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. *Drug Metabolism and Disposition* 31, 924–931.

Imai, Y., Tsukahara, S., Asada, S., Sugimoto, Y., 2004. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Research* 64, 4346–4352.

Jochum, W., David, J.P., Elliott, C., Wutz, A., Plenk Jr., H., Matsuo, K., Wagner, E.F., 2000. Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat. Med.* 6, 980– 984.

Johansen JS, Hassager C, Podenphant J, Riis BJ, Hartwell D, Thomsen K Christiansen C. Treatment of postmenopausal osteoporosis: Is the anabolic steroid nandrolone decanoate a candidate? *Bone Miner*, 6:77,1989.

Johnson, D.R., Finch, R.A., Lin, Z.P., Zeiss, C.J., Sartorelli, A.C., 2001. The pharmacological phenotype of combined multidrug-resistance MDR1a/1band mrp1-deficient mice. *Cancer Research* 61, 1469–1476.

Júnior J. W. R. B., Souza A. W. S., Noronha L. K., Furia J. K., Szejnfeld V.L. Estatinas e densidade mineral óssea: mitos e verdades. *Rev Bras Reumatol.* Vol. 42 Nº 2 - Mar/Abr, 2002.

Junior, A.F., Szejnfeld, V.L., Diniz, C.M.C., Santos, L.M., Santos, F.C.S., Neto, J.T., Ramos, L.R. Would postmenopausal and elderly patients receive the same treatment? *Rev Bras Reumatol.* vol. 37, n.4, 1997.

Junqueira & Carneiro. *Histologia Básica*, 9ª edição. Ed. Guanabara Koogan, 1999.

Kajihara, S., Hisatomi, A., Mizuta, T., Hara, T., Ozaki, I., Wada, I., Yamamoto, K., 1998. A splice mutation in the human canalicular multispecific organic anion

transporter gene causes Dubin–Johnson syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253, 454–457.

Kalu DN, Liu CC Arjmandi BH, Salerno E, Salih MA, Hollis BW. Growth hormone but not rhIGF-I reversed bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Min Res* 1993; 8 (Suppl. 1): S 271.

Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5 ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

Kang K, Hammerberg C, Meunier L, Cooper KD. CD11b<sup>+</sup> Macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potently produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL10 protein. *J Immunol* quarto fascículo, 2000.

Kanis J A: Assessment of fracture risk. Who should be screened? In: Favus MJ. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 5th ed, Washington DC, The American Society for Bone and Mineral Research, 316-23, 2003.

Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Min Res* 1994;9:1137-41.

Katagiri, T., Takahashi, N., 2002. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 8, 147–159.

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

Katiyar S, Matsui M, Elmets C, Mukhtar H. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol* 1999; 69: 148–153.

Katiyar S.K., Mukhtar H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB induced infiltration of leukocytes, depletion of antigenpresenting cells, and oxidative stress. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 15–22.

Kellis Jr., J.T., Vickery, L.E., 1984. Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones. *Science* 225, 1032–1034.

Khosla S: Editorial: Idiopathic osteoporosis-is the osteoblast to blame? *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2792-4, 1997.

Khoury, M.J. Genetic and Epidemiological Approaches to the Search for Gene-Environment Interaction: the Case of Osteoporosis. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore, v.147, p.1-2, 1998.

Kim S R, Kim S D. Studies on soybean isoflavones. *J Agric Sci* 1996; 38:155-65.  
Kleerekoper M, Avioli LV. Osteoporosis Pathogenesis and Therapy. In: Avioli LV, Krane SM (eds). *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. New York, Academic Press, p. 387, 1998.

Kleerekoper M, Peterson EL, Nelson DA. A randomized trial of sodium fluoride as a treatment for postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 1991;1:155-61.

Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol* 1996; 87:897-904.

Kohno, H., Tanaka, T., Kawabata, K., Hirose, Y., Sugie, S., Tsuda, H., Mori, H., 2002. Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *International Journal of Cancer* 101, 461–468.

Koller DL, Ecous MJ, Morin PA *et al*: Genome screen for QTLs contributing to normal variation in bone mineral density and osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3116-20, 2000.

Kondo H, Nakajima N, Yamamoto N, *et al*. BE-14384 substances, new specific estrogen- receptor binding inhibitors. Production, isolation, structure determination and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 1990; 43:1533-42.

Konig, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I., Keppler, D., 1999. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 377–394.

Kramer, J.W.; Hoffmann, W.E. Clinical enzymology. In: Kaneko, J.J.; Harvey J.W.; Bruss, M.L. (Ed) *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5 ed. New York: Academic Press, 1997. Cap12, p. 303-323.

Kripke ML, Cox PA, Alas LG, Yarosh DB. Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7516–7520.

Kuhnau, J., 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* 24, 117–191.

Kung, A.W.C., Luk, K.D.K., Chu, L.W., Chiu, P.K.Y. Age-related osteoporosis in Chinese: an evaluation of the response of intestinal calcium absorption and calcitropic hormones to dietary calcium deprivation. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.68, p.1291-1297, 1998.

Kupferschmidt, H.H., Fattinger, K.E., Ha, H.R., Follath, F., Krahenbuhl, S., 1998. Grapefruit juice enhances the bioavailability of the HIV protease inhibitor saquinavir in man. *British Journal of Clinical Pharmacology* 45, 355–359.

Kwon T W, Song Y S, Kim J S, Moon G S, Kim J I, Hong J H. Current research on the bioactive functions of soyfoods in Korea. *Korea Soybean Digest* 1998; 15:1-12.

Lahti E, Blanco G, Kauppila A. Endometrial changes in postmenopausal breast cancer in patients receiving tamoxifen. *Obstet Gynecol* 81:660,1993.

Langdahl BL, Vestergaard P, Abrahamsen B, Tofteng CL, Kolthoff N, Mosekilde L: Polymorphisms in the promoter of the osteoprotegerin gene are associated with reduced perimenopausal bone mass. *J Bone Miner Res* 17 (suppl 1):S423, 2002.

Lanna C.M.M., Montenegro Jr R.M., Paula F.J.A. Fisiopatologia da Osteoporose Induzida por Glicocorticóide. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 47 nº 1 Fevereiro 2003.

Lee, J. *et al.* Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v. 34, n. 3, p. 443-448, 2002a.

Lee, M. J. *et al.* Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (–)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* v. 10, p. 1025-32, 2002b.

Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A., Yang, C.S., 1995. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 4, 393–399.

Lenchik L., Sartoris D.J. Current concepts in osteoporosis. *American Journal of Roentgenology*, 1997; 168:905-91 1.

Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2001a. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167, 3–23.

Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2003. Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug Metabolism and Disposition* 31, 11–15.

Leslie, E.M., Mao, Q., Oleschuk, C.J., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2001b. Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. *Molecular Pharmacology* 59, 1171–1180.

Levine A. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323–331.

Li CY, Chuda RA, Lam WKW *et al.* Acid phosphatase in human plasma. *J Lab Clin Med* 82:819, 1973.

Li Z., Meredith M.P., Hoseyni M.S. A method to assess the proportion of treatment effect explained by surrogate endpoint. *Stat Med.* 2001; 20: 3175-88.

Lian BJ, Stein GS, Canalis E, Robey PG, Boskey AL. Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolic bone disease and disorder of mineral metabolism*. Philadelphia7 Lippincott Williams & Williams; 1999. p. 24– 8.

Liao, J. K.; Laufs, U.; Pleiotropic Effects Of Statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; Vol. 45: 89-118.

Liberman UA, Weiss SR, Bröll J *et al.* Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Eng J Med*, 333:1437,1995.

Lima e Silva, R.; Bortolozzi, J.; Ramos, P.R.R.; Dierckx, S.M. Polimorfismo genético-bioquímico de enzimas em éguas da raça mangalarga. Arch. Latinoam. Prod. Anim., v.10, n.3, p.149-152, 2002.

Lima, Leonardo Ramos Paes; OLIVEIRA, Tânia Toledo de; NAGEM, Tanus Jorge. Effects of the flavonoid quercetin and the natural dyes bixin and norbixin on blood parameters of rabbits. Rev. Nutr. , Campinas, v. 16, n. 3, 2003 .

Lindsay R, Aitken JM, Anderson JB, Hart DM, Macdonald EB, Clark AC. Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. Lancet, i:1038, 1976.

Lindsay R, Coutts JRT, Hart DM. The effect of endogenous oestrogen on plasma and urinary calcium and phosphate in oophorectomized women. Clin Endocrinol 1977; 6: 87-93.

Lindsay R, Hart DM, Forrest C, Baird C. Prevention spinal osteoporosis in oophorectomized women. Lancet, ii:1151,1980.

Lindsay R, Hart DM, Maclean A, Clarck AC, Kraszewski A, Garnwood J. Bone response to termination of estrogen treatment. Lancet, 1:1321,1978.

Lindsay R. The menopause: sex steroids and osteoporosis. Clin Obstet Gynecol, 30(4):847,1987.

Linseisen, J., Piller, R., Hermann, S., Chang-Claude, J., 2004. Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. International Journal of Cancer 110, 284–290.

Litman, T., Druley, T.E., Stein, W.D., Bates, S.E., 2001. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. Cellular and Molecular Life Sciences 58, 931–959.

Ljunghal S, Johannsson AG, Burman P, Kampe O, Lindh E, Karlsson FA: Low plasma levels of IGF1 in male patients with idiopathic osteoporosis. *J Intern Med* 232: 59-64, 1992.

Lopes R.F., Farias M.L.F. Genetics Aspects, GH/IGF1 Axis Influence and Advance Therapeutic Alternatives in Idiopathic Osteoporosis. *Rev Bras Reumatol*, v. 46, n. 2, p. 110-117, mar/abr, 2006.

Lorentzon M, Lorentzon R, Backstrom T, Nordstrom P: Estrogen receptor gene polymorphism, but not estradiol levels, is related to bone density in healthy adolescent boys: a crosssectional and longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4597-601, 1999.

Love RR, Mazess RB, Barden HS *et al.* Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med*, 326:852,1992.

Lowe C, Gray DH & Reid IR. Serum blocks the osteolytic effect of cortisol in neonatal mouse calvaria. *Calcified Tissue International* 1992; 50: 189-192.

Lu Y-P, Lou Y-R, Li X, *et al.* Stimulatory effect of oral administration of green tea or caffeine on ultraviolet lightinduced increases in epidermal wild-type p53, p21(WAF1/ CIP1), and apoptotic sunburn cells in SKH-1 mice. *Câncer Res* 2000; 60: 4785–4791.

Lu Y-P, Lou Y-R, Xie J-G, *et al.* Topical applications of caffeine or (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12455–12460.

Lucasin Junior, R., Lima, W.L. Osteoporose: exercício como prevenção e tratamento. *Arscurandi: A Revista da Clínica Médica*, p.28-36, 1994.

Luckman, S.P.; Hughes, D.E.; Coxon, F.P.; Russell, Rgg.; Rogers, M., 1998. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translation prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13:581-589.

Lukert B.P. Glucocorticoid and drugs-induced osteoporosis. In: Favus M.J., editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, P.A. 1996. pp 278-82.

Lunder, T. L. Catechins of green tea. In: Huang, M. *et al.* *Phenolic compounds in food and their effects on health II: antioxidants & cancer prevention*. Washington: American Chemical Society, 1992. 338p. p.114-120.

Lyrithis GP, Tsakalakos N, Magiasis B *et al.* Analgesic effect of salmon calcitonin in osteoporotic vertebral fractures: a double-blind, placebo-controlled clinical study. *Calcif Tissue Int* 49:369, 1991.

Makimura M *et al.* Inhibitory Effect of Tea Catechins on Collagenase Activity. *J Periodontol* 1993; 64 7: 630-636.

MaliakaL, P. P.; Coville, P. F.; Wanwimolruk, S. Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, London,v.53, p.569-577, Apr, 2001.

Malloy PJ, Pike JW, Feldman D. Hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds. *Vitamin D*. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1997:765-87.

Malloy PJ, Pike JW, Feldman D. The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocrinol Rev* 1999;20:156-88.

Manual de Biotério – FIOCRUZ. Manual para técnicos em animais de laboratório. Rio de Janeiro, 1994. 132p.

Marchigiano, G. Osteoporosis: primary prevention and intervention strategies for women at risk. Home Care Provid., v.2, p.76-81, 1997.

Marques Neto, J.F, Lederman, R. Osteoporose Brasil: ano 2000. São Paulo : Limay, 1995. 137p.

Marques, D.A.; Soares, S. S.; Medeiros, F. C., Medeiros, M.A.S. Efeitos da isoflavona e estradiol sobre o perfil lipídico (cadioprotetor) em ratas ooforectomizadas como modelo de menopausa. Curso de Ciências Farmacêuticas – UNIFOR, Universidade Federal do Ceará.

Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. Endocrinology 1978; 103:1860-7.

Massey LK, Wise KJ. The effect of dietary caffeine on urinary excretion of calcium, magnesium, sodium and potassium in healthy young females. Nutr Res 1989;4:43–50.

Matkovic V, Jelic T, Wardlaw GM, *et al*. Timing of peak bone mass in caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. J Clin Invest 93: 799-808, 1994.

Matsubara, S.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de Catequinas e Teaflavinas em Chás Comercializados No Brasil. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(2): 401-407, abr.-jun. 2006.

Mazess R.B. On aging bone loss. Clin Orthop, 165:239, 1982.

McClung, M. Biphosphonates. Arq Bras Endocrinol Metab Vol 50 nº 4 Agosto 2006.

McComb R, Bowers G.B., Posen S (Eds). Alkaline Phosphatase. New York. Plenum Press, P.570,1979.

Mckay, D. L.; Blumberg, J. B. The role of tea in human health: an up date. *J. Am. Coll. Nutr.*, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2002.

Meeran SM, Mantena SK, Elmets CA, Katiyar SK. (-)- Epigallocatechin-3-gallate prevents photocarcinogenesis in mice through interleukin-12-dependent DNA repair. *Câncer Res* 2006; 66: 5512–5520.

Melton LJ III, Riggs BL. Epidemiología de las fracturas relacionadas con la edad. In: Avioli LV. (ed) *El síndrome osteoporótico. Detección, Prevención y Tratamiento*. Madrid. Ediciones CEA, p.1, 1989.

Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D., Barnes, S., 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutrition and Câncer* 21, 113–131.

Meyer, D.J.; Coles, E.H.; Rich, L.J. *Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico*. 1.ed. São Paulo: Roca, 1995. 308 p.

Middleton Jr., E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673–751.

Milne M, Quail JM & Baran DT. Dexamethasone stimulates osteogenic differentiation in vertebral and femoral bone marrow cell cultures - comparison of IGF-I gene expression. *Journal of Cell Biochemistry* 1998; 71: 382-391.

Mittal A, Elmets C, Katiyar S. CD11b1 cells are the major source of oxidative stress in UV radiation-irradiated skin: possible role in photoaging and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 2003; 77: 259–264.

Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., Bates, S.E., 1999. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Research* 59, 8–13.

Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, *et al.* Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 1997; 11:1165-79.

Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, *et al.* Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre and post menopausal women. *Bone* 21: 379-83, 1997.

Moore KW, O'Garra A, Malefyt RW, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165–190.

Morazzoni P, *et al.* Phytochemical anti-oxidants for cosmetic application. *Agro Food-Industry Hi- Tech* 1995 : 12-16.

Morley N, Clifford T, Salter L, *et al.* The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and green tea can protect human cellular DNA from ultraviolet and visible radiation-induced damage. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005; 21: 719–726.

Morris, M.E., Zhang, S. Flavonoid–drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sciences* 78 (2006) 2116–2130.

Motta, V.T. *Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações – 4ª ed.*2000. Porto Alegre. Ed. Médica Missau

Mundy G, Garrett R, Harris S, *et al.* Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 286:1946-9, 1999.

Myburgh KH, Noakes TD, Roodt M, Hough FS. Effect of exercise on the development of osteoporosis in adult rats. *J Appl Physiol* 1989; 66: 14-19.

Ni, H., Simile, C., Hardy, A.M., 2002. Utilization of complementary and alternative medicine by United States adults: results from the 1999 national health interview survey. *Medical Care* 40, 353–358.

Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C and Dragsted LO, *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica* 28: 389–401, 1998.

NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake, Optimal calcium intake, *JAMA* 272:1942, 1994.

Nishida, H.; Omori, M.; Fukutomi, Y.; Ninomiya, M.; Nishiwaki, S.; Suganuma, M.; Moriwaki, H.; Muto, Y. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on spontaneous hepatoma in C3H/HeNCrj mice and human hepatoma-derived PLC/PRF/5 cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 85, p. 221-225, 1994.

Notelovitz, M.; Martin, D.; Tesar, R.; Mckenzie, L.; Fields, C. Estrogen therapy and variable resistance weight training increases bone mineral in surgically menopausal women. *J. Bone Miner. Res.* 6:583-590, 1991.

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. *Calcif Tissue Int* 1993;53:206-9.

Oliveira, Tânia Toledo de *et al* . Antioxidant action of the flavonoids derivatives. *Pesq. Agropec. Bras.* , Brasília, v. 34, n. 5, 1999.

Orimo H, Shiraki M, Hayashi Y *et al*. Effects of 1 alpha-hydroxy-vitamin D-3 on lumbar bone mineral density and vertebral fracture in patients with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 54:370, 1994.

Osteoporosis 1995. Basic diagnosis and therapeutic elements for a "National Consensus Proposal". *São Paulo Medical Journal*, 113(Suppl 4) 64p.1995.

Packard PT, Recker RR. Caffeine does not affect the rate of gain in spine bone in young women. *Osteoporosis Int* 1996;6:149–52.

Pak CYC, Sakhaee K, Piziak V. Slow-release sodium fluoride in the management of postmenopausal osteoporosis. *Ann Intern Med* 1994;120:625-32.

Pang J.L., Ricupero D.A., Huang S., Fatma N., Singh D.P., Romero J.R., Chattopadhyay N. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. *Biochemical pharmacology* 71 (2006) 8181-826.

Panizza, S. *Plantas que curam: cheiro de mato*. 28a edição, São Paulo. IBRASA, 1997.

Parfitt A. M. The cellular basis of bone remodeling. The quantum concept reexamined light of recent advances in cell biology of bone. *Calcif Tissue Int*, 36(suppl):537, 1984.

Patschan, D.; Loddenkemper, K.; Buttgereit, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*, v. 29, n. 6, p. 498-505, 2001.

Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T: Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 23: 303-26, 2002.

Peterson G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr* 1995; 125 Suppl:784S-789S.

Peterson, J.; Dwyer, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nut. Res.*, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

Petilli M, Fiorelli G, Benvenuti S, Frediani U, Gori F, Brandi ML. Interactions between ipriflavone and the estrogen receptor. *Calcif Tissue Int* 1995;56:160-5.

Phan, T.T., See, P., Tran, E., Nguyen, T.T.T., Chan, S.Y., Lee, S.T., Huynh, H., 2003. Suppression of insulin-like growth factor signaling pathway and collagen expression in keloid-derived fibroblasts by quercetin: its therapeutic potential use in the treatment and/or prevention of keloids. *Br. J. Dermatol.* 148, 544–552.

Picherit, C.; Bennetau-Pelissero, C.; Chanteranne, B.; Lebecque, P.; Davicco, M.J.; Barlet, J.P.; Coxam, V. Soybean isoflavones dose dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *The Journal of Nutrition*, v. 131, p. 723-728, 2001b.

Picherit, C.; Chanteranne, B.; Bennetau-Pelissero, C.; Davicco, M.J.; Lebecque, P.; Barlet, J.P.; Coxam, V. Dose dependent bone-sparing effects dietary isoflavones in the ovariectomized rat. *British Journal of Nutrition*, v. 85, p. 307-316, 2001a.

Pike JW. The vitamin D receptor and its gene. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds. *Vitamin D*. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1997:105-25.

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. *Rev Bras Reumatol.* 2002;42:343-54.

Pinto, A.S.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J.; Del Carlo, R.J.; Fonseca, C.C.; Moraes, G.H.K.; Bragine, D.F.J.; Cardoso, C.A. Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona sobre a osteoporose induzida com dexametasona em ratas. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 26, n. 1, p. 63-70, 2005.

Piskula, M. K.; Terao, J. Accumulation of (–)-epicatechin metabolites in plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.*, v. 128, p. 1172-1178, 1998.

Pogrud H, Makin M, Robin G. Osteoporosis in patients with fractured femoral neck in Jerusalem. *Clin Orthop*, 124:165,1977.

Polo RG. Osteoporosis inducida por glicocorticóides. *Na Sist Sanit Navar* 2003; 3:63-80.

Posen S, Cornish C, Kleerekoper M. Alkaline phosphatase and metabolic bone disorders. In: Avioli Lv, Krane Sm. (eds) *Metabolic Bone Disease*. New York. Academic Press, Vol I, p.141,1977.

Potschka, H., Fedrowitz, M., Loscher, W., 2003. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood–brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306, 124–131.

Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F., Erdman Jr., J.W., 1998. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 1375S–1379S.

Pottratz ST, Bellido T, Mocharla H, Crabb D, Manologas SC. 17 $\beta$ -estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. *J Clin Invest*, 93:994,1994.

Potts JT. Parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide in the regulation of calcium homeostasis and bone development. DeGroot LJ, Jameson JL, ed. *Endocrinology*, 4th ed., Philadelphia, Saunders, 2001, 969-98.

Pun KK, Chan KWL. Analgesic effect of intranasal salmon calcitonin in the treatment of osteoporotic vertebral fractures. *Clin Ther* 11:205, 1989.

Rackoff P.J., Rosen C.J. Pathogenesis and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Drugs & Aging* 1998:12:477-84.

Rah, D. K. *et al.* Prevention of reactive oxygen species-induced oxidative stress in human microvascular endothelial cells by green tea polyphenol. *Toxicol. Lett.*, v. 155, p. 269-275, 2005.

Ramalho AC, *et al.* Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) no Osso. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2000;44:471-82.

Reddy MS, Weatherford TW 3rd, Smith CA, West BD, Jeffcoat MK, Jacks TM. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol.* 1995;66(3):211-7.

Reed BY, Zerwekh JE, Sakhaee K, Breslau NA, Gorrschalk F, Pak CYC: Serum IGF1 is low and correlated with osteoblastic surface in idiopathic osteoporosis. *J Bone Miner Res* 10: 1218- 24, 1995.

Reid I.R. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* Vol. 14, No. 2, pp. 279-298, 2000

Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis - mechanisms and management. *European Journal of Endocrinology* 1997; 137: 209-217.

Reinli, K., Block, G., 1996. Phytoestrogen content of foods—a compendium of literature values. *Nutrition and Cancer* 26, 123–148.

Rice, L., Samedí, V.G., Medrano, T.A., Sweeney, C.A., Baker, H.V., Stenstrom, A., Furman, J., Shiverick, K.T., 2002. Mechanisms of the growth inhibitory effects of the isoflavonoid biochanin A on LNCaP cells and xenografts. *Prostate* 52, 201–212.

Riemann H, Schwarz A, Grabbe S, *et al.* Neutralization of IL- 12 in vivo prevents induction of contact hypersensitivity and induces hapten-specific tolerance. *J Immunol* 1996; 156: 1799–1803.

Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon WM. Effect of fluoride treatment on fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1990;322:802-9.

Riggs BL. Pathogenesis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol*, 156(5):1342,1987.

Rivadeneira F, Houwing-Duistermaat J, Pols HA *et al*: Insulinlike-growth-factor 1 (IGF1) gene promoter polymorphism and the risk of fracture in the elderly: the Rotterdam study. *J Bone Miner Res* 17(suppl1): S177, 2002.

Rivas JM, Ullrich SE. Systemic suppression of DTH by supernatants from UV irradiated keratinocytes: an essential role for interleukin-10. *J Immunol* 1992; 149: 3865–3871.

Rizzato G & Montemurro L. Reversibility of exogenous corticosteroid-induced bone loss. *European Respiratory Journal* 1993; 6: 116-119.

Rogers J. Estrogens in the menopausal and postmenopausal. *N Engl J Med*, 280:364, 1969.

Romagnoli, E.; Minisola, S.; Carnevale, V.; Scarda, A.; Rosso, R.; Scarnecchia, L.; Pacitti, M.T.; Mazzuoli, G. Effect of estrogen deficiency on IGF-I plasma levels: relationship with bone mineral density in premenopausal women. *Calcified Tissue International*, v. 53, p. 1-6, 1993.

Rosen CJ, Donahue LR. Parathyroid hormone and osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diab* 1996;3:532-9.

Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D *et al*: Association between serum insulin-growth-factor 1 (IGF1) and a simple repeat in IGF1 gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2286-90, 1998.

Rosen CJ, Pollak MF: IGF1 and aging: a new perspective for a new century. Trends Endocrinol Metab 10: 136-42, 1999.

Rosen HN, Dresner-Pollak R, Moses AC *et al.* Specificity of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover. Calcif Tissue Int 54:26, 1994.

Rosen, C J, Donahue, L R. Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection revisited. Proc. Soc Exp Biol Med, v.2, p.1-17, 1998.

Rubin J, Ackert-Bicknell CL, Zhu L *et al.* IGF1 regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappa ligand in vitro and OPG in vivo. J Clin Endocrinol Metab 87: 4273-9, 2002.

Rubin LA, Hawker GA, Peltekova VD, Fielding LJ, Ridout R, Cole DEC. Determinants of peak bone mass: clinical and genetic analyses in a young female Canadian cohort. J Bone Miner Res 1999;14:633-43.

Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. N Eng J Med 1990; 323: 1-6.

Russel R, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL *et al.* The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. J Bone Miner Res. 1999;14(2):53-65.

Russo, L.A.T. Osteoporose Pós-menopausa: Opções terapêuticas. Arq Bras Endocrinol Metab v.45 n. 4 Agosto 2001.

Sainz J, Van Tornout JM, Loro L *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. N Engl J Med 337: 77-82, 1997.

Sainz J, Van Tornout JM, Sayre J, Kaufman F, Gilsanz V: Association of collagen type I  $\alpha$  1 gene polymorphism with bone density in early childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 853-5, 1999.

Salah, N. *et al.* Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chainbreaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 322, n. 2, p. 339-346, 1995.

Santos P.S. Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose. Tese mestrado em Medicina Veterinária – UFV. Maio/2004.

Saraiva G., L.; Lazaretti-Castro M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol 46 nº 1 Fevereiro 2002.

Sarkar S., Mitlab B., Wong M., Stock J.L., Black D.M., Harper K.D. Relationships between bone mineral density and incident vertebral fracture risk with raloxifene therapy. *J Bone Miner Res.* 2002; 17:1-10.

Schade N, Esser C, Krutmann J. Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations. *Photochem Photobiol Sci* 2005; 4: 699–708.

Schmitt DA, Owen-Schaub L, Ullrich SE. Effect of IL-12 on immune suppression and suppressor cell induction by ultraviolet radiation. *J Immunol* 1995; 154: 5114–5120.

Schwarz A, Bhardwaj R, Aragane Y, *et al.* Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the formation of sunburn cells. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 922–927.

Seoud MAF, Johnson J, Weed JC JR. Gynecologic tumors in tamoxifen-treated women with breast cancer. *Obstet Gynecol* 82:165,1993.

Setchell, K.D., Brown, N.M., Desai, P., Zimmer-Nechemias, L., Wolfe, B.E., Siegenthaler, P., Kaye, S.B., Monfardini, S., Renard, J., 1992. Phase II trial with Flavone Acetic Acid (NSC.347512, LM975) in patients with non-small cell lung cancer. *Annals of Oncology* 3, 169–170.

Siess M-H, Le Bon A-M, Canivenc-Lavier M-C, Amiot M-J, Sabatier S, Aubert SY and Suschetet M, Flavonoids of honey and propolis: Characterization and effects on hepatic drugmetabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. *J Agric Food Chem* 44: 2297–2301, 1996.

Siiteri PC. Postmenopausal estrogen production. *Frontiers of Hormone Res*, 3:40, 1975.

Siminoski, K., Josse, R.G. Calcitonin in the treatment of osteoporosi. *Can. Med Assoc. J.*, v.155, n.7, p. 962-5, 1996.

Simões, C.M.O; SchenkeL, E. P.; Gosmann, G.; Palazzo de Mello, J. C.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia - da Planta ao Medicamento*. 5ª ed. Editora da UFSC; editora da UFRGS, Porto Alegre, 2003.

Simonet, W.S.; Lacey, D.L.; Dunstan, C.R., 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89:309-319.

Skibola, C.F.; Smith, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 29, n. 3-4, p. 375-383, 2000.

Skrzydłewska, E. *et al.* Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine*, v. 9, p. 232-238, 2002.

Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston CC: Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 6:561-7, 1991.

Son, Y.-O., *et al.*, Quercetin accelerates TNF- $\alpha$ -induced apoptosis of MC3T3-E1 osteoblastic cells through caspase-dependent and JNK mediated pathways, *Eur. J. Pharmacol.* (2007).

Son, Y.O., Kook, S.H., Choi, K.C., Jang, Y.S., Jeon, Y.M., Kim, J.G., Lee, K.Y., Kim, J., Chung, M.S., Chung, G.H., Lee, J.C., 2006a. Quercetin, a bioflavonoid, accelerates TNF- $\alpha$ -induced growth inhibition and apoptosis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Eur. J. Pharmacol.* 529, 24–32.

Sosa Henriquez, M., Torres Ramires, A, Dominguez, C, Salido, E, Saavedra, P, Betancor, L. Genetic polymorphism of vitamin D receptor gene and osteoporosis. *Med Clin (Barc)*, v.110, p.636-650, 1998.

Stepan JJ. Enzyme tests in bone disease. In: Moss DW, Rosalki SB, eds. *Enzyme tests in diagnosis*. New York: Oxford University Press Inc, 1996; 155-188.

Stepan JJ. Enzyme tests in bone disease. In: Moss DW, Rosalki SB, eds. *Enzyme tests in diagnosis*. New York: Oxford University Press Inc, 1996; 155-188.

Stevenson JC, Hyllyard CJ, Macintyre I. Calcitonin and the calcium regulating hormones in postmenopausal women. *Lancet*, i:965,1981.

Stevenson JC, Lees B, Devenport M, Cust MS, Ganger KF. Deter. Determinants of bone density in normal women: risk factors for future osteoporosis? *BMJ*. 1989 April 8; 298(6678): 924–928.

Stewart, R.H. Considerations in fluid and electrolyte therapy In: Reed, S.M.; Bayly. W.M. (Ed) *Equine internal medicine*. Philadelphia: Saunders, 1998, Cap.4, p. 192-198.

Suzuki Y, Ichikawa Y, Saito E, Homma M. Importance of increased urinary calcium excretion in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. *Metabolism* 1983; 32:151-156.

Szejnfeld VL. Atualização terapêutica em osteoporose. *Rheuma*. 1995;2:4-7.

Takano K, Nakaima K, Nitta M, Shibata F, Nakagawa H. Inhibitory effect of (–)-epigallocatechin 3-gallate, a polyphenol of green tea, on neutrophil chemotaxis in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4571–4576.

Takeo, T. Green tea and semi-fermented teas. In: Wilson, K.C.; Clifford, M.N. (eds.) *Tea: Cultivation to consumption.*, London: Chapman and Hall, 1992, p. 413-414.

Teixeira-Neto, A.R.; Ferraz, G.C.; Mataqueiro M.I.; Lacerda-Neto J.C.; Queiroz-Neto, A. Reposição eletrolítica sobre variáveis fisiológicas de cavalos em prova de enduro de 30 e 60 Km. *Ciência Rural*, v.34, n.5, p.1505-1511, 2004.

Tenório A. S.; Alve, S. B.; Bezerra, A. L.; Souza, G. M. L.; Catanho, M. T. J. A.; Tashiro, T.; Galindo, L. C. M.; Moraes, S. R. A. Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo e a concentração sérica de cálcio em camundongos fêmeas ovariectomizadas. *Acta Cir Bras*. 20(4):280-283, 2005.

Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2223-35.

Thomas, T., Gori, F., Spelsberg, T.C., Khosla, S., Riggs, B.L., Conover, C.A., 1999. Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. *Endocrinology* 140, 5036–5044.

Tsyrllov IB, Mikhailenko VM and Gelboin HV, Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A *P*-450s to different flavonoids. *Biochim Biophys Acta* 1205: 325–335, 1994.

Uitterlinden AG, Arp PP, Paeper BW *et al*: Polymorphisms in the sclerosteosis/van Buchem disease gene (SOST) region are associated with bone-mineral density in elderly whites. *Am J Hum Genet* 75: 1032-45, 2004.

Valentão, P. *et al*. Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small Centaury (*Centaureum erythraea*) infusion: A comparative study with green tea (*Camellia Sinensis*). *Phytomedicine*, v. 10, p. 517-522, 2003.

Vali B., Rao L.G., El-Soheby A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007, vol 18, 341-347.

Van STAA, T.P.; Wegman, S.; Devries, F., 2001. Use of statins and risk of fractures. *Journal of the American Medical Association*, 285:1850-1855.

van Zanden, J.J., Wortelboer, H.M., Bijlsma, S., Punt, A., Usta, M., Bladeren, P.J., Rietjens, I.M., Cnubben, N.H., 2005. Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochemical Pharmacology* 69, 699–708.

Verrastro T., Lorenzi T.F., Neto, S.W. *Hematologia e hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Vogel G: Cholesterol-lowering drugs may boost bones. *Science* 286:1825-6, 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. *Arch Intern Med* 160: 2865, 2000.

Walle T, Eaton EA and Walle UK, Quercetin, a potent and specific inhibitor of the human P-form phenolsulfotransferase. *Biochem Pharmacol* 50: 731–734, 1995.

Wang ZY, *et al.* Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice *Cancer Res* 1992; 52 23: 6657-6665.

Wang, X., Furukawa, T., Nitanda, T., Okamoto, M., Sugimoto, Y., Akiyama, S., Baba, M., 2003. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Molecular Pharmacology* 63, 65–72.

Wattel, A., Kamel, S., Mentaverri, R., Lorget, F., Prouillet, C., Petit, J.P., Fardelonne, P., Brazier, M., 2003. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochem. Pharmacol.* 65, 35–42.

Watts N.B., Cooper C., Lindsay R., Eastell R., Manhart M., Barton I.P., *et al.* Relationships between changes in bone mineral density and vertebral fracture risk associated with risedronate. *J Clin Densitom.* 2004; 7: 256-61.

Weaver, C.M., Proulx, W.R., Heaney, R. Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.70, p.543S-548S, 1999. Supplement.

Whang, K.; Zhao, M.; Oiao, M.; Mundy, G., 2000. Administration of lovastatin locally in low doses in a novel delivery system induces prolonged bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15:S225.

WHO - World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. (ISBN 92 4 154510 0). Printed in England. Geneva 1998.

Wood, R J, Fleet, J C. The genetics of osteoporosis: vitamin D receptor polymorphisms. *Ver Nutr*, v.18, p.233-258, 1998.

Yamaguchi, M.; Gao, Y.H. Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, p. 71- 76, 1998.

Yang C, Wang Z. Tea and cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1038–1049.

Yao L., Jiang Y., Datta N., Singanusong R., Liud X., Duan J., Raymont K., Lisle A., Xu Y. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Austrália. *Food Chemistry* 84 (2004) 253–263.

Yarosh D, Klein J, O'Connor A, *et al.* P. S. effect of topically applied T4 endonuclease V in liposomes on skin cancer in xeroderma pigmentosum: a randomised study. *Lancet* 2001; 357: 926–929.

Young Adult Women? *Preventive Medicine* 31, 562–568 (2000).

Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, *et al.* Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res* 2004;39(5):300 –7.

Yusuf N., Irby C., Katiyar S.K., Elmets C.A. Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23: 48–56.

Zabaglia, S. F. C.; Pedro A.O.; Neto, A.M. P.; Guarisi T.; Paiva, L.H.S.C.; Lane, E. Association between lipid profile and bone mineral density in post-menopausal women. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 14(4):779-786, outubro, 1998.

Zerwekh JE, Sakhaee K, Breslau NA, Gottschalk F, Pak CYC: Impaired bone formation in male idiopathic osteoporosis: further reduction in the presence of concomitant hypercalciuria. *Osteoporosis Int* 2: 128-34, 1992.

Zhang Y., Li X., Lai W.P., Chenc B., Chowe H.K., Wu C.F., Wang N.L., Yao X.S., Wong M.S. Anti-osteoporotic effect of *Erythrina variegata* L. in ovariectomized rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109 (2007) 165–169.

Zhang, D.; Kuhr, S.; Engelhardt, U.H. Influence of catechins and thea flavins on astringent taste of black tea brews, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, n. 195, p. 108-111, 1992.

Zmuda, J M, Cauley, J A, Ferrel, R E. Recent progress in understanding the genetic susceptibility to osteoporosis. *Genet Epidemiol*, v. 16, p.356-367, 1999.

Zmuda, J.M., Cauley J.A., Ferrell, R.E. Vitamin D receptor Gene Variants and Osteoporosis. *Epidemiologic Reviews*, Baltimore, v.22, n.2, p.203-217, 2000.

Zumoff, B. Does postmenopausal estrogen administration increase the risk of breast cancer? Contributions of animal, biochemical and clinical investigative studies to resolution of the controversy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*,v. 217, p. 30-37, 1998.

## 8) APÊNDICE

### Dados Biológicos do Rato (FIOCRUZ, 1994).

*Rattus norvegicus*

Variedade albinus, da raça Wistar

O rato ao nascer é desprovido de pêlos com exceção das vibrissas (pêlos responsáveis pelo tato), com olhos fechados, corpo avermelhado e pavilhão auricular aderido à cabeça e pesa de 5 a 6g. Desde o nascimento, os sexos já podem ser distinguidos. As fêmeas apresentam a distância ano-genital menor do que os machos (esta sexagem no início é difícil, mas com a prática, os erros são mínimos). À medida que os animais crescem, esta diferenciação se torna mais evidente.

No segundo dia de vida, a coloração da pele vai clareando (fica rosada) e do terceiro ao sexto dias, período em que começa a haver crescimento do pêlo, o animal vai tomando a coloração mais próxima da estirpe. Com sete dias, o corpo já está totalmente recoberto de pêlo e nas fêmeas as tetas começam a se evidenciar. Nesta idade o pavilhão auricular começa a se afastar da cabeça. Por volta do décimo primeiro dia, os animais abrem os olhos. Aos 14 dias começam a se alimentar independentemente. Dos 19 aos 21 dias já estão aptos a serem desmamados, quando passam de 35 a 45g.

Os animais atingem a puberdade aos 30 dias. A maturidade sexual se dá aos 50 a 60 dias e os animais devem ser acasalados com 80 a 100 dias, no peso de: machos  $\pm$  250g e fêmeas  $\pm$  150 a 180g.

O período de gestação é de 19 a 22 dias. Os animais permanecem na criação até os 9 meses de idade.

Na fase adulta, os ratos consomem 15g de ração/dia e 20 mL de água/dia.

A temperatura do ambiente deve ser de 20 a 24°C.

A iluminação é controlada devendo ser de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. A isto chama-se fotoperíodo. Períodos prolongados de iluminação ou escuridão interferem no ciclo reprodutivo dos animais.

O rato é onívoro.

## **Animais de Laboratório:**

### Vantagens:

- Fácil manutenção e observação.
- Ciclos vitais curtos (gestação, lactação, puberdade, etc.)
- Permitem a padronização do ambiente.
- Grande quantidade de informações básicas.

### Desvantagens:

- Vivem em ambiente totalmente artificial.
- Dieta padronizada.