

MAYRA SOARES PÍCCOLO

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, BIOMÉTRICA, BIOMECÂNICA E POR
MICROTOMOGRAFIA NA INDUÇÃO DA OSTEOPOROSE COM
DEXAMETASONA EM RATOS MACHOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

P591a Píccolo, Mayra Soares, 1991-
2019 Avaliação bioquímica, biométrica, biomecânica e por
microtomografia na indução da osteoporose com dexametasona
em ratos machos / Mayra Soares Píccolo. – Viçosa, MG, 2019.
xiv, 86 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Virgínia Ramos Pizziolo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 75-86.

1. Dexametasona. 2. Glicocorticóides. 3. Microtomografia
por raio X. 4. Osteoporose. 5. Ratos como animais de
laboratório. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 573.46

MAYRA SOARES PÍCCOLO

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, BIOMÉTRICA, BIOMECÂNICA E POR
MICROTOMOGRÁFIA NA INDUÇÃO DA OSTEOPOROSE COM
DEXAMETASONA EM RATOS MACHOS**

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

APROVADA: 06 de dezembro de 2018.

Marisa Alves Nogueira Diaz

Marcos Rodrigo de Oliveira

Davilson Bragine Ferreira Júnior
(Coorientador)

Virgínia Ramos Pizzolo
(Orientadora)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me capacitar, iluminar e dar coragem e força para vencer os desafios e realizar meus sonhos.

Aos meus pais, Marco Antônio e Vilma exemplos de dedicação, cuidado, atenção, paciência e amor com seus filhos, que não medem esforços para nos ver crescer, estando presentes e apoiando em todas as etapas de nossas caminhadas, sem esse apoio nada disso seria possível.

Ao meu irmão Matheus, por ser um irmão presente, atencioso e sempre pronto para ajudar.

Ao Leandro, pelo apoio, carinho, incentivo, amor e paciência. Companheiro de todas as horas, você faz parte dessa conquista.

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

A CAPES pelo apoio financeiro.

À Virgínia, por ter confiado e aceito orientar o desenvolvimento deste trabalho, que além de uma excelente profissional, se mostrou uma pessoa maravilhosa.

Ao Davilson, pela orientação, solicitude, ensinamentos e incentivos.

À professora Marisa, pelas ideias e disponibilidade em ajudar.

Ao Marcos, por ter aceitado participar da banca examinadora e por todas as contribuições para a melhoria do trabalho.

Aos estagiários, Danilo, Tauan e Fabiano, pelo auxílio no andamento do experimento.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica, em especial ao Jéferson, pelo bom humor e por estar sempre disponível para ajudar.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA.....	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1. OBJETIVOS GERAIS	6
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
4. REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1. Osteoporose.....	7
4.2. Osteoporose Masculina.....	11
4.3. Glicocorticoides	11
4.4. Indução da Osteoporose por Glicocorticoides (Dexametasona)	14
4.4.1. Ação sobre as Células Ósseas.....	14
4.4.2. Ação sobre Vitamina D, PTH, Cálcio, Sódio, Magnésio, Fósforo e Potássio.....	15
4.4.3. Ação sobre a Fosfatase Alcalina Óssea	19
4.4.4. Ação sobre o Cortisol Endógeno.....	20
4.4.5. Ação sobre a Insulina e Glicose	22
4.4.6. Ação na Produção de Testosterona.....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1. Animais	26
5.2. Protocolo Experimental.....	26
5.3. Eutanásia.....	27
5.4. Coleta dos materiais	28
5.5. Biometria	29
5.5.1. Peso corporal.....	29
5.5.2. Medidas do fêmur direito	29
5.5.3. Índice Seedor	29
5.6. Tomografia.....	29
5.7. Biomecânica.....	30
5.8. Índice Gonadossomático	31
5.9. Histologia	31

5.10. Análises dos Parâmetros Sanguíneos	32
5.11. Índice HOMA-IR	32
5.12. Análise Estatística	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1. Determinação do ganho de peso corporal	34
6.2. Análises da Biometria e Morfologia Óssea	36
6.2.1. Biometria (Índice de Seedor)	36
6.2.2. Análise de Biomecânica	40
6.2.3. Microtomografia	42
6.3. Parâmetros Sanguíneos	53
6.3.1. Cálcio, Vitamina D, Sódio, Potássio, Magnésio e Fósforo	53
6.3.2. Cortisol	57
6.3.3. Glicose e Insulina	60
6.3.4. Fosfatase Alcalina Óssea	63
6.3.5. Testosterona	67
7. CONCLUSÃO	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Atividade de osteoclastos e osteoblastos na remodelação óssea.....	9
Figura 2 - Formula estrutural plana das moléculas de Colesterol, Ciclopentanoperidrofenantreno, Cortisol e Dexametasona.....	12
Figura 3. Formula estrutural plana da molécula 1,25-diidroxicolecalciferol, forma mais ativa da Vitamina D.....	16
Figura 4 - Eixo Cálcio-PTH-Vitamina D.	19
Figura 5- Eixo Hipotálamo-Hipófise e secreção de cortisol.....	21
Figura 6: Divisão dos animais em subgrupos de acordo com os tempos de experimentação, contados a partir do primeiro dia do experimento, e de acordo com a idade dos animais.	28
Figura 7 - Seção transversal do fêmur e as variáveis geométricas, considerando o osso como uma elipse oca.	30
Figura 8: Média de ganho de peso, em gramas, dos animais submetidos ao medicamento com dexametasona pelo período de 4 semanas (G2) e dois meses após o fim deste.....	34
Figura 9: Média de ganho de peso, em gramas, dos animais submetidos ao medicamento com dexametasona pelo período de 8 semanas (G3) e dois meses após o fim deste.....	35
Figura 10 - Imagem da tela inicial do programa CTAn. Selecionando a imagem de interesse a ser analisada	43
Figura 11 - Imagem do aplicativo CTAn. Selecionando o TOP e BUTTOM para determinação do ROI.	44
Figura 12 - Escolha da forma geométrica. Direcionamento por meio de estrutura geométrica, delimitada de acordo com o contorno do osso, da região de interesse.	45
Figura 13 - Imagem da segmentação binária da região de interesse.	46

Figura 14 - Direcionar o processamento da imagem para a região de interesse (ROI).	46
Figura 15 - Processamento final dos dados de porosidade.	47
Figura 16 - Imagens de microtomografia do fêmur, produzidas pelo Microtomógrafo SKYSCAN 1174V2. Efeitos da dexametasona nos grupos tratados por 4 semanas (G2), em relação ao grupo controle (G1), nos diferentes períodos de tempo.	51
Figura 17- Imagens de microtomografia do fêmur, produzidas pelo Microtomógrafo SKYSCAN 1174V2. Efeitos da dexametasona nos grupos tratados por 8 semanas (G3), em relação ao grupo controle (G1), nos diferentes períodos de tempo.	52
Figura 18- Contagem das Células de Leydig, para animais que foram tratados com dexametasona por 4 semanas.....	71
Figura 19- Contagem das Células de Leydig, para animais que foram tratados com dexametasona por 8 semanas.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média de valores das variáveis biométricas ósseas, Peso (g) e Comprimento (cm) dos fêmures, bem com os valores do índice Seedor (g/cm), para os animais tratados com dexametasona por 4 semanas.....	37
Tabela 2- Média de valores das variáveis biométricas ósseas, Peso (g) e Comprimento (cm) dos fêmures, bem com os valores do índice Seedor (g/cm), para os animais tratados com dexametasona por 8 semanas.....	38
Tabela 3 - Média de valores calculados para Resistência Óssea (N/m^2). baseados na força máxima (N) fornecida pelo Instron e nos dados de geometria óssea individual do osso	40
Tabela 4- Média de valores calculados para Resistência Óssea (N/m^2). baseados na força máxima (N) fornecida pelo Instron e nos dados de geometria óssea individual do osso.	41
Tabela 5-Média de valores calculados para Porosidade dos ossos (%) de cada grupo, fornecidos pelo microtomógrafo, obtidos com auxilio de programas específicos.....	48
Tabela 6-Média de valores calculados para Porosidade dos ossos (%) de cada grupo, fornecidos pelo microtomógrafo, obtidos com auxilio de programas específicos.....	49
Tabela 7- Níveis séricos de Cálcio (mg/dL) e Vitamina D (ng/mL), para animais tratados com dexametasona por 4 semanas.....	54
Tabela 8- Níveis séricos de Cálcio (mg/dL) e Vitamina D (ng/dL), para animais tratados com dexametasona por 8 semanas.	55
Tabela 9- Níveis séricos de Cortisol Endógeno (ng/mL), para animais tratados com dexametasona por 4 semanas.....	57
Tabela 10- Níveis séricos de Cortisol Endógeno (ng/mL), para animais tratados com dexametasona por 8 semanas.....	59
Tabela 11- Níveis séricos de Glicose (mg/dL), Insulina ($\mu UI/mL$), e Índice HOMA-IR, para os animais tratados com dexametasona por 4 semanas.	61

Tabela 12- Níveis séricos de Glicose (mg/dL), Insulina (μ UI/mL), e Índice HOMA-IR, para os animais tratados com dexametasona por 8 semanas.	62
Tabela 13- Níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (U/L) e Fosfatase Alcalina Óssea (μ g/L), para animais tratados com dexametasona por 4 semanas.	64
Tabela 14- Níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (U/L) e Fosfatase Alcalina Óssea (μ g/L), para animais tratados com dexametasona por 8 semanas.	66
Tabela 15- Níveis séricos de Testosterona (ng/mL). Índice Gonadossomático (%) e Contagem de Células de Leydig, para os animais tratados com dexametasona por 4 semanas.	68
Tabela 16- Níveis séricos de Testosterona (ng/mL). Índice Gonadossomático (%) e Contagem de Células de Leydig, para os animais tratados com dexametasona por 8 semanas.	69

LISTA DE ABREVIATURAS

3D – Tridimensional

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

AMPc – Adenosina 3',5' – Monofosfato cíclico

AP1 – Proteína Ativadora 1

CRH – Fator Liberador de Corticotrofina

CTAn – Software de Análise de Microtomografia Computadorizada

FAL - Fosfatase Alcalina

FAO - Fosfatase Alcalina Óssea

FGF-23 – Fator de Crescimento Fibroblástico 23

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GRH – Hormônio de Liberação das Gonadotrofinas

HOMA-IR – Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina

IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do tipo 1

IGS – Índice Gonadossomático

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LH – Hormônio Luteinizante

NaPi2a – Proteína Cotransportadora de Sódio e Fosfato

NF- κ B – Fator Nuclear Kappa Beta

PTH – Hormônio da Paratireóide

ROI – Região de Interesse

TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento Beta

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

RESUMO

PÍCCOLO, Mayra Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2018. **Avaliação Bioquímica, Biométrica, Biomecânica e por Microtomografia na Indução da Osteoporose com Dexametasona em Ratos Machos.** Orientadora: Virgínia Ramos Pizzolo. Coorientador: Davilson Bragine Ferreira Junior.

O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos da dexametasona na indução da osteoporose, principal efeito colateral da corticoterapia, em ratos machos, bem como o efeito deste medicamento sobre os parâmetros bioquímicos do metabolismo masculino. Além disso, por meio deste trabalho buscou-se determinar um modelo experimental para estudo da osteoporose secundária em machos, observando o tempo de recuperação dos animais aos efeitos da dexametasona por até 2 meses após o final do tratamento. A indução da osteoporose consistiu na administração de dexametasona na dose de 7,0 mg/kg de peso corporal, por via intramuscular, uma vez por semana durante quatro semanas (G2) e oito semanas (G3), à exceção dos animais do grupo controle (G1). Os animais submetidos à indução da osteoporose foram então distribuídos aleatoriamente, recebendo os seguintes denominações e tratamentos: G2₁ (imediatamente após a interrupção do tratamento de 4 semanas), G2₂ (um mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas), G2₃ (dois meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas), G3₁ (imediatamente após a interrupção do tratamento de 8 semanas), G3₂ (um mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas), G3₃ (dois meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas). No tempo pré-determinado os animais foram eutanasiados e então coletadas amostras de sangue para as dosagens dos níveis séricos de cálcio, fósforo, sódio, vitamina D, cortisol, fosfatase alcalina (FAL), fosfatase alcalina óssea (FAO), testosterona, glicose e insulina. Além disso, foram coletados os fêmures esquerdos para avaliação biométrica, biomecânica e de microtomografia. O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos e 6 repetições. Os grupos foram comparados, com o grupo controle de tempo correspondente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Através das avaliações biométrica, biomecânica e microtomógrafa foi possível verificar, tanto para os animais do grupo G2 quanto para os animais do grupo G3,

aumento de 12,8% da porosidade óssea dos animais do grupo G2 e 10,4% para os animais do grupo G3, e observou-se também diminuição da resistência óssea em até 26,8% para os animais do grupo G2 e 28,5% para os animais do grupo G3, alterações induzidas pela dexametasona, caracterizando a ocorrência de osteoporose nestes animais. Verificou-se também a influência do medicamento dexametasona nos parâmetros bioquímicos sanguíneos, bem como a persistência e intensidade destes efeitos, pelo período de tempo avaliado. Não foram observadas alterações significativas dos níveis séricos de cálcio, potássio, magnésio, fósforo e glicose, tanto nos animais tratados por 4 semanas quanto nos que passaram por 8 semanas de tratamento, quando comparados aos grupos controle de mesma idade. Dentre os parâmetros sanguíneos avaliados, os níveis de testosterona foram os que apresentaram alterações mais expressivas, onde para o grupo G2 observou-se uma diminuição de até 99,3% e para os animais do grupo G3 observou-se redução de até 97,7%, quando comparados aos animais do grupo controle de mesma idade. Já para parâmetros como, insulina, cortisol, vitamina D, sódio e fosfatase alcalina óssea, observaram-se alterações, que variaram de acordo com o tempo a que os animais foram expostos ao medicamento. Concluiu-se que para o estudo futuro de tratamentos para a osteoporose induzida por glicocorticoide, em ratos machos, o protocolo ideal de indução da doença seria a administração do medicamento dexametasona por 4 semanas. E entre o período de um e dois meses após a interrupção do tratamento com dexametasona o animal já está apto a iniciar o futuro protocolo de tratamento da doença, pois foi nesse período que se observou menores efeitos colaterais adjacentes, sem que tenha havido recuperação do quadro de osteoporose.

ABSTRACT

PÍCCOLO, Mayra Soares, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2018. **Biochemical, Biomechanical and Microtomography Evaluation in the Induction of Osteoporosis with Dexamethasone in Male Rats.** Adviser: Virgínia Ramos Pizzolo. Co-Advisor: Davilson Bragine Ferreira Junior.

The objective of the present study was to study the effects of dexamethasone on the induction of osteoporosis, the main side effect of corticosteroid therapy in male rats. As well as the effect of this drug on the biochemical parameters of male metabolism. In addition, this work aimed to determine an experimental model for the study of secondary osteoporosis in males, observing the recovery time of the animals to the effects of dexamethasone for up to 2 months after the end of treatment. The induction of osteoporosis consisted of administration of dexamethasone at a dose of 7.0 mg / kg body weight intramuscularly once weekly for four weeks (G2) and eight weeks (G3), except for the animals in the control group (G1). The animals submitted to the induction of osteoporosis were then randomly assigned to receive the following names and treatments: G21 (immediately after discontinuation of the 4-week treatment), G22 (one month after discontinuation of the 4-week treatment), G23 after discontinuation of the 4-week treatment), G31 (immediately after discontinuation of the 8-week treatment), G32 (one month after discontinuation of the 8-week treatment), G33 (two months after discontinuation of the 8-week treatment) . At the pre-determined time the animals were euthanized and blood samples were collected for serum levels of calcium, phosphorus, sodium, vitamin D, cortisol, alkaline phosphatase (FAL), bone alkaline phosphatase (FA), testosterone, glucose and insulin. In addition, the left femurs were collected for biometric, biomechanical and microtomography evaluation. The biological assay was performed in a completely randomized design with 10 treatments and 6 replicates. The groups were compared, with the corresponding time control group, by the Tukey test at 5% probability. Through biometric, biomechanical and microtomographic evaluations, it was possible to verify, for both G2 and G3 animals, a 12.8% increase in the bone porosity of the G2 group and 10.4% in the animals of the G2 group. group G3, and a decrease in bone strength was observed in up to 26.8% for the animals of group G2 and 28.5% for animals of the G3 group, changes induced by dexamethasone, characterizing the

occurrence of osteoporosis in these animals. The influence of the drug dexamethasone on the blood biochemical parameters, as well as the persistence and intensity of these effects, for the period of time evaluated was also verified. No significant changes in serum calcium, potassium, magnesium, phosphorus, and glucose levels were observed in both the treated and the treated 4 weeks and the 8 week treated groups when compared to the control groups at the same age. Among the blood parameters evaluated, testosterone levels were the ones that presented the most expressive changes, where for the G2 group a decrease of up to 99.3% was observed and for the animals of the G3 group a reduction of up to 97.7 %, when compared to control animals of the same age. Already for parameters such as insulin, cortisol, vitamin D, sodium and bone alkaline phosphatase, changes were observed, which varied according to the time the animals were exposed to the drug. It was concluded that for the future study of glucocorticoid-induced osteoporosis treatments in male rats, the ideal protocol for induction of disease would be the administration of the drug dexamethasone for 4 weeks. And between the period of one and two months after the interruption of the treatment with dexamethasone the animal is already able to start the future protocol of treatment of the disease, because it was during that period that minor side effects were observed adjacent, without there being a recovery of the picture of osteoporosis.

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é a mais comum dentre as doenças osteometabólicas. É uma desordem sistêmica, caracterizada pela perda de massa óssea em determinado volume de osso, como consequência tem-se uma menor densidade óssea, o que prejudica a resistência e a qualidade do osso em que ela ocorre, sendo possível identificar a deterioração da microarquitetura do tecido (LINDSAY et al, 1993). Como resultado deste quadro, tem-se a ocorrência de fraturas ósseas, que comprometem a qualidade de vida, uma vez que diminui a funcionalidade do indivíduo, podendo resultar em invalidez e redução da expectativa de vida em 21% para mulheres e 36% para homens, principalmente quando a fratura em questão é no colo do fêmur, sendo esta a mais grave (CHAU e EDELMAN, 2002; IOANNIDIS, GORDON e ADACHI, 2001; GALSWORTHY e WILSON, 1996).

A doença ocorre em ambos os sexos (feminino e masculino), mas é popularmente conhecida como uma doença da mulher, devido ao alto índice de incidência no período pós-menopausa, acometendo uma em cada três mulheres nessa fase da vida (GALI, 2001). Estes dados, somados ao fato de que as mulheres são mais cuidadosas com relação a saúde, fazem com que a maioria dos estudos voltados para a osteoporose sejam baseados no metabolismo feminino, tendo como alvo os hormônios típicos da mulher, em especial, o estrogênio, cujo nível durante a menopausa cai drasticamente. Como fruto destes diversos estudos, têm-se tratamentos de eficiência comprovada para estes casos, como por exemplo, o uso de reposição hormonal, que previne e controla a osteoporose primária tipo 1, forma como a osteoporose pós-menopausa é classificada (PIAI; et al., 2005).

No que tange aos homens, segundo dados da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM, 2017) estima-se que um em cada cinco apresente a osteoporose em alguma fase da vida, indicando que estudos baseados no metabolismo masculino são igualmente importantes aos realizados baseados no metabolismo das mulheres.

Diferente do que se observa nas mulheres, a forma mais comum da osteoporose em homens, é a secundária, que tem como principal causa o uso de corticoides de forma prolongada. Além disso, também são causas, deste

tipo da doença, o hipogonadismo, doenças gastrointestinais, deficiência de vitamina D, alcoolismo e uso crônico de anticonvulsivantes (OLIVEIRA & GUIMARÃES, 2010).

Dentre os diversos tipos de glicocorticoides disponíveis no mercado, a dexametasona é o mais utilizado por apresentar potente efeito anti-inflamatório, sendo empregado no tratamento de diversas doenças, incluindo distúrbios reumáticos e articulares, doenças autoimunes, distúrbios cutâneos, oculares, glandulares, doenças pulmonares, sanguíneas e gastrointestinais. E uma vez que na maioria dos casos, o tratamento se dá de forma prolongada, os efeitos colaterais sistêmicos destes medicamentos são mais evidentes (KATZUNG, 2017).

A osteoporose é o efeito colateral mais previsível durante a corticoterapia prolongada, para pacientes de ambos os sexos. Porém ocorre com maior intensidade de sintomas nos pacientes do sexo masculino. Nestes casos além da atuação direta sobre a funcionalidade do osso por meio da ação sobre as células do tecido, outro importante mecanismo de indução da osteoporose se dá pela interferência do medicamento no metabolismo da testosterona, hormônio masculino que age diretamente no crescimento ósseo. Esta interferência resulta no que é conhecido como hipogonadismo. A ação no metabolismo da testosterona pode ocorrer por meio direto, atuando no tamanho ou quantidade das células de Leydig produtoras do hormônio, o que acarreta diminuição da produção testicular de testosterona; ou por meio indireto, causando a supressão da secreção do hormônio luteinizante (LH), produzido pela adenoipófise, que tem por função estimular as células de Leyding para produção de testosterona (PRELEVIC, 2001).

Além destes principais impactos causados de forma direta pelos glicocorticoides, são observados também outros efeitos indiretos, que vão interferir no metabolismo ósseo, causados pelo uso destes medicamentos, como, por exemplo, sobre o metabolismo do cálcio, hormônio da paratireoide (PTH) e vitamina D, sobre a glicose, insulina, cortisol endógeno, fosfatase alcalina óssea, dentre outros.

Estudos baseados nos efeitos colaterais decorrentes do uso de glicocorticoides, principalmente a osteoporose, são motivados pelo fato de que estes medicamentos são, na maioria dos casos, insubstituíveis para o

tratamento médico das mais variadas enfermidades, devido principalmente a seus potentes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (POLO, 2003).

Para o estudo da fisiologia da osteoporose masculina, bem como de métodos eficazes para seu tratamento, faz-se necessário o estabelecimento de um modelo experimental, onde seja possível a indução da doença de forma efetiva e persistente, com menor número de efeitos colaterais adjacentes.

Nesses casos, da mesma forma que se dá com as fêmeas, na maioria dos estudos voltados para osteoporose, deve-se induzir a doença pela administração do glicocorticoide, em sobredosagem, uma vez que este vai atuar diminuindo a atividade osteoblástica de formação óssea e/ou agirá aumentando a atividade osteoclástica de reabsorção óssea; inibe também a absorção intestinal e reabsorção renal de íons como cálcio, fósforo e sódio, aumentando a excreção destes íons pela urina, dentre outros mecanismos que contribuem para o quadro da osteoporose de formas indiretas (ATMACA et al., 2013).

A taxa de perda de massa óssea em ratos machos e fêmeas é altamente dependente do método utilizado para induzir a osteoporose, do tipo de osso avaliado, do metabolismo do animal, da geometria óssea, e se essa perda é de osso trabecular ou cortical (RADOMINSKI, et. al., 2004).

FERREIRA JUNIOR (2018) observou que para fêmeas, o período de 4 semanas de administração do medicamento dexametasona, em doses semanais de 7,5 mg/kg, foi possível observar o aparecimento da osteoporose.

2. JUSTIFICATIVA

De forma geral, a indução da osteoporose por glicocorticoide é um processo fisiológico complexo e não totalmente elucidado, principalmente no que se refere a animais machos. Considerando que a progressão dos efeitos colaterais de um medicamento varia de acordo com o metabolismo em questão, sendo, portanto diferente para machos e fêmeas, um teste de tempo para o estabelecimento da doença se fez necessário neste caso. Para isso, neste trabalho, utilizou-se os períodos de 4 e 8 semanas de administração da dexametasona, em dose semanal de 7,0 mg/kg a fim de se determinar um tempo mínimo onde foi possível observar o aparecimento da osteoporose.

Uma vez que a osteoporose secundária induzida por glicocorticoide é o tipo mais comum de osteoporose entre indivíduos do sexo masculino, buscar por meio dos parâmetros bioquímicos, formas de compreender as interações do medicamento, que ocorrem durante a corticoterapia, com o metabolismo masculino, avaliando os efeitos colaterais em ambos os períodos de tratamento, é de extrema importância, sendo muito interessante um protocolo em que seja possível observar a osteoporose na ausência dos demais efeitos colaterais, ou na presença desses efeitos de forma minimizada. A fim de obter esses dados, durante este trabalho foi observada a recuperação, destes animais submetidos ao tratamento de 4 e 8 semanas, por até dois meses após o fim da administração do corticoide, a fim de determinar em que período os animais terão se recuperado dos demais efeitos colaterais, persistindo somente a osteoporose.

Seguindo este procedimento, além de obtermos esta resposta, consegue-se observar como os animais se recuperam após a interrupção do tratamento, e por meio desta observação pode-se inferir sobre a gravidade e intensidade destes efeitos colaterais adjacentes.

Depois disso, têm-se dados suficientes para futuramente pesquisarem-se tratamentos eficazes, alternativos aos disponíveis no mercado, a fim de evitar ou minimizar os danos causados pelos glicocorticoides.

No caso de animais fêmeas, em seu trabalho, de forma semelhante, FERREIRA JUNIOR (2016), pôde elucidar alguns processos fisiológicos desencadeados pela indução da osteoporose em sobredosagem de dexametasona.

O presente trabalho justifica-se então pela necessidade de compreender os mecanismos celulares e fisiológicos envolvidos no uso dos glicocorticoides, tanto na ocorrência de osteoporose em ratos machos, como dos demais efeitos colaterais decorrentes do uso destes medicamentos de forma prolongada, e em sobredosagem no organismo masculino.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem por objetivo avaliar, comparativamente, através de biometria, biomecânica, microtomografia e marcadores bioquímicos e hormonais o processo da osteoporose induzida com dexametasona em ratos machos, bem como os efeitos colaterais adjacentes, além da recuperação dos animais a estes efeitos. E, além disso, estabelecer um modelo experimental ideal para o estudo da doença em animais machos, visto que a maioria das pesquisas realizadas até então são voltadas para a osteoporose em animais fêmeas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir a osteoporose em ratos machos através da administração da dexametasona intramuscular;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos e hormonais: cálcio, sódio, potássio, magnésio, fosfato, vitamina D, testosterona, glicose, insulina, fosfatase alcalina, fosfatase alcalina óssea, cortisol.
- Avaliar a biometria e histomorfometria: óssea e testicular
- Definir qual o melhor tempo de indução da osteoporose, visando a minimização dos efeitos colaterais adjacentes.
- Avaliar, por meio dos parâmetros bioquímicos e hormonais, a evolução da recuperação destes animais aos efeitos colaterais da dexametasona.
- Propor um modelo experimental ideal para o estudo da osteoporose em machos, que sirva como base para pesquisa de novos tratamentos para a doença.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Osteoporose

O tecido ósseo, forma especializada de tecido conjuntivo de consistência rígida, é o principal constituinte do esqueleto. Possui diversas funções associadas, atuando no suporte de tecidos moles, na proteção dos órgãos vitais, na produção de células sanguíneas, e no armazenamento de íons, sendo este a maior reserva de cálcio do organismo (DEMPSTER, 1999).

Os ossos de maneira geral são compostos por matriz óssea; formada por sais de cálcio e fosfato, na forma de cristais de hidroxapatita, o que os tornam rígidos, e colágeno tipo I que confere certa elasticidade ao tecido; além disso, fazem parte de sua composição, os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, células ósseas provenientes de uma mesma linhagem de células osteoprogenitoras (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Osteoclastos são células que surgem pela fusão de células mononucleadas, os monócitos, portanto são grandes e podem ter até 50 núcleos. São responsáveis pela reabsorção óssea e para isto secretam ácidos láctico e cítrico, a fim de diminuir o pH do meio, facilitando a dissolução dos minerais constituintes dos ossos. Secretam, também, enzimas hidrolíticas que tem por função realizar a hidrólise da matriz proteica óssea. (BLAIR e ATHANASOU, 2004).

Já os osteoblastos são as células responsáveis pela formação do tecido ósseo, e para tanto, sintetizam e secretam colágeno tipo 1, proteoglicanos e glicoproteínas, que fazem parte da constituição e mineralização da matriz óssea. Produzem também, osteonectina, glicoproteína que estimula a atividade osteoblástica; e osteocalcina, proteína responsável por facilitar a deposição dos íons cálcio. Além disso, os osteoblastos armazenam minerais e revestem as superfícies ósseas (KINI e NANDEESH, 2012). À medida que os osteoblastos produzem os constituintes da matriz óssea, vão ficando envolvidos por essa nova matriz, nesse momento, diminuem a atividade sintética e passam a agir principalmente na manutenção da matriz óssea, passando então a serem chamados de osteócitos (LIRANI, 2004)

O tecido ósseo é dinâmico, e está em constante processo de remodelação (Figura 1), a fim de preservar sua integralidade e aperfeiçoar suas funções. Para isto conta com a atividade de células especializadas, sendo estas principalmente os osteoclastos e osteoblastos, que em condições normais observa-se que os efeitos catabólicos dos osteoclastos estão em equilíbrio com os efeitos anabólicos dos osteoblastos (SOUZA, et.al., 2010).

A remodelação se dá em uma série de eventos coordenados, o primeiro deles é a ativação. Nesta etapa as células pré-osteoclásticas, da linhagem monócito-macrófago, produzidas pela medula óssea, são estimuladas, diferenciadas e distribuídas para o osso por meio da circulação sanguínea, sob a influência de citocinas e fatores de crescimento, transformando-se em osteoclastos maduros (MODDER, 2008). Depois disso, os osteoblastos preparam a superfície óssea, por meio da liberação das enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, collagenases e gelatinases, que atuam removendo a camada de osteóides não mineralizados desta superfície, em um processo que facilita o acesso dos osteoclastos ao osso mineralizado que será reabsorvido (NULEND, 2005).

Quando os osteoclastos chegam ao osso mineralizado, são ativados por meio de fatores de ativação, iniciando o processo de reabsorção (VAANANEN et. al., 2008), onde a partir desse momento, os osteoclastos agem promovendo a reabsorção do osso pela produção de íons de hidrogênio e pela atividade de enzimas proteolíticas. Essa etapa termina apenas quando os osteoclastos formam uma cavidade de certa profundidade. Quem comanda o fim desta etapa é o fator de transformação de crescimento beta ($TGF-\beta$), que bloqueia o processo de reabsorção e induz a apoptose dos osteoclastos envolvidos. Nesse momento tem-se início a fase reversa onde os osteoclastos desaparecem e macrófagos podem ser vistos na superfície óssea liberando fatores que inibem a atividade dos osteoclastos e estimulam a atividade dos osteoblastos (AMADEI, et. al., 2006).

Os osteoblastos são então atraídos, por meio destes fatores locais, produzidos pelos macrófagos, para o fundo da cavidade formada durante a etapa de reabsorção. E sob a influência de hormônios e fatores de crescimento, iniciam o processo de formação óssea. Os osteoblastos formam os osteóides que começam a mineralizar. Esse processo de formação e

mineralização de osteóides, pelos osteoblastos, se dá até que a cavidade formada anteriormente seja completamente preenchida (KESSEL, 2001). A atividade osteoblástica é então interrompida, uma vez que o fator de necrose tumoral (TNF), liberado pelas células vizinhas, induz a apoptose dos osteoblastos (MUNDY, 1999). Durante o processo de formação óssea, alguns osteoblastos diferenciam-se em osteócitos e ficam submersos na matriz óssea recém-formada, e atuam a partir desse momento, na manutenção do tecido.

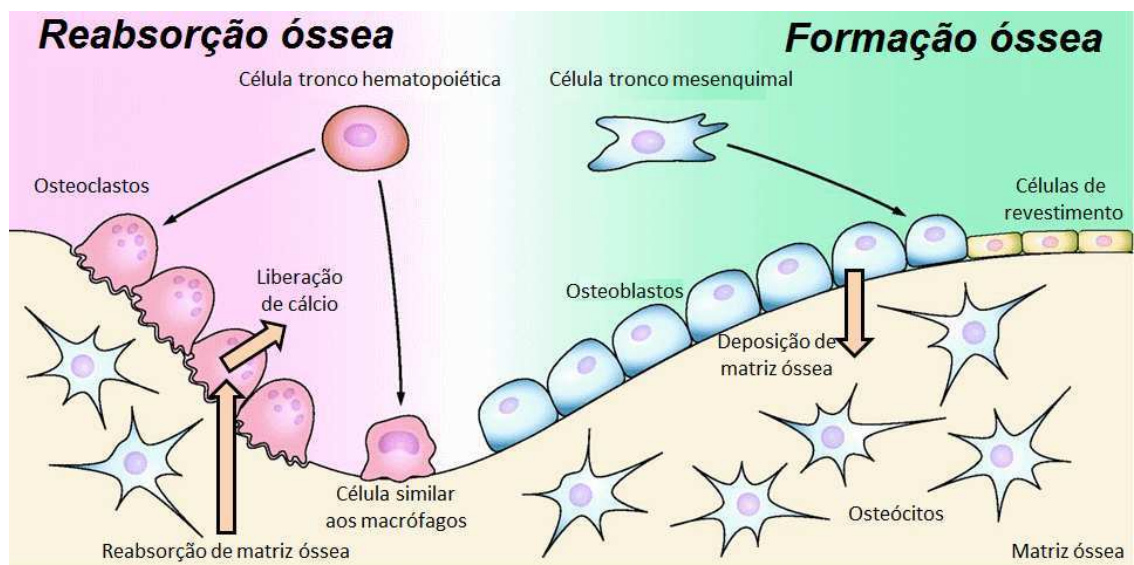


Figura 1- Atividade de osteoclastos e osteoblastos na remodelação óssea.
Fonte: <http://physrev.physiology.org/content/93/2/481>

A osteoporose é, dentre as doença osteometabólica, a mais comum, e ocorre devido ao desequilíbrio entre a atividade dos osteoclastos e osteoblastos (IOANNIDIS G, GORDON M, ADACHI JD, 2001). Nessa condição, é possível observar que a reabsorção óssea é maior que a formação de novo osso. Isso pode ser devido a uma maior atividade dos osteoclastos, acompanhada de atividade normal dos osteoblastos; e/ou pode ser decorrente de uma atividade reduzida dos osteoblastos, onde a atividade osteoclástica não está afetada (GALI,2001).

Como consequência dessa desregulação observa-se diminuição da massa óssea em um determinado volume de osso, o que gera aumento da fragilidade óssea e resulta em fraturas. Embora possa acontecer em qualquer osso do esqueleto, ocorre mais frequentemente nos ossos da coluna, quadril, costelas e punho, o que tem por consequência diminuição da mobilidade, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (GALI, 2001).

O que se observa é que com o aumento da expectativa de vida, tem-se também um aumento nos casos de osteoporose registrados, há uma estimativa que em 2050 o número de fraturas no fêmur chegará a quase 6,3 milhões, em todo mundo, sendo que em 1990 o número de fraturas foi de 1,7 milhões (CARNEIRO et. al., 2013).

A osteoporose pode ser classificada de duas formas, a osteoporose primária, subclassificada em subtipos 1 e 2, sendo a subtipo 1 exclusivamente feminina, uma vez que é decorrente da menopausa, e caracterizada pela rápida perda de osso trabecular, impactando em fraturas vertebrais. E a subtipo 2, relacionada aos processos de envelhecimento do indivíduo, decorrente do aumento dos níveis de PTH (paratormônio), diminuição dos níveis de cálcio e redução natural da atividade osteoblástica. E a osteoporose secundária, decorrente de estados patológicos, como processos inflamatórios, desordens endócrinas e adrenais, uso de drogas, álcool e cigarro, má nutrição e como consequência do uso de glicocorticoides, sendo esta última, a causa mais comum (GALI, 2001 e POLO, 2003).

Atualmente o diagnóstico da osteoporose é realizado por meio do exame de densitometria óssea, onde o aparelho vai mensurar os valores de massa óssea e conseqüentemente a densidade mineral óssea conseguindo prever o risco de fraturas, dos ossos da coluna lombar e do fêmur, que são os ossos mais propensos a ocorrência de fraturas decorrentes de osteoporose.

Após detectada a ocorrência de osteoporose o tratamento pode ser anabólico, como a prática de atividade física, suplementação de vitamina D, suplementação de cálcio, uso de esteroides anabolizantes, uso de hormônio do crescimento, paratormônio (PTH), teriparatida e ranelato de estrôncio. Ou tratamentos anticatabólicos, que inibem a atividade dos osteoclastos, como reposição de estrógeno, estimuladores seletivos de receptores de estrógeno, osteoprotegerina, e bisfosfonatos, sendo o último o mais utilizado (SOUZA, 2010).

4.2. Osteoporose Masculina

A osteoporose é conhecida principalmente como uma doença da mulher, mas ocorre em ambos os sexos e pode trazer severas consequências nos dois casos.

Sabe-se que 1 em cada 3 fraturas ósseas depois dos 50 anos, ocorre em homens, e estas costumam ser ainda mais graves que as fraturas observadas em mulheres. Devido à negligência em relação a saúde óssea por parte dos homens, muitas vezes a doença nem chega a ser diagnosticada ou tratada, sendo descoberta apenas após a ocorrência da fratura (JOHNELL e KANIS, 2006).

Em homens, a osteoporose pode ser classificada como primária, quando está relacionada ao processo natural de envelhecimento, observada em homens acima de 50 anos, e ocorre devido a uma combinação de fatores como, diminuição da absorção de cálcio pelo intestino, declínio da concentração de testosterona, diminuição do tempo de vida dos osteoblastos e baixa ativação da vitamina D (VONDRACEK e HANSEN, 2004). É classificada como secundária, sendo este tipo o mais comum, observada, em alguma fase da vida, de cerca de 40 a 60% dos homens, e dentre os possíveis fatores de risco, tem-se como o mais importante, o uso prolongado de glicocorticoides, correspondendo a 11,4% dos casos de osteoporose secundária. (PRELEVIC, 2001 e STATHOPOULOS et. al., 2014).

Nesse caso, a osteoporose ocorre, principalmente, por via direta, pela ação do medicamento diretamente nas células ósseas; e por via indireta, diminuindo os níveis de vitamina D, suprimindo a produção testicular de testosterona, e aumento dos níveis de paratormônio (PTH) (EASTELL et al, 1998).

4.3. Glicocorticoides

Os glicocorticoides podem ser exógenos, como no caso da dexametasona, ou endógenos, nesse caso são hormônios esteroides, sintetizados e secretados pelo córtex da glândula adrenal. O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise em resposta ao fator a

síntese dos corticosteroides. Fatores como catecolaminas, hormônio antidiurético, febre, hipoglicemia, estresse e ocitocina, podem influenciar na liberação de ACTH e consequentemente na liberação dos glicocorticoides endógenos. Além destes fatores, por meio do mecanismo de feedback, o glicocorticoide exógeno pode atuar nos receptores de cortisol no hipotálamo e hipófise, inibindo a liberação tanto de CRH quanto de ACTH (TORRES et. al., 2012).

Os glicocorticoides são hormônios esteróides derivados do colesterol e tem como estrutura básica um ciclopentanoperidrofenantreno, que consiste em 3 cicloexanos e 1 ciclopentano (Figura 2). Independente de serem naturais ou sintéticos todos os glicocorticoides são variações dessa estrutura, e para serem ativos devem ter um grupo hidroxilo no carbono 11, as demais variações estruturais vão conferir diferentes características à molécula, como tempo de meia vida, efeitos fisiológicos e potencia (PEREIRA et al., 2007).

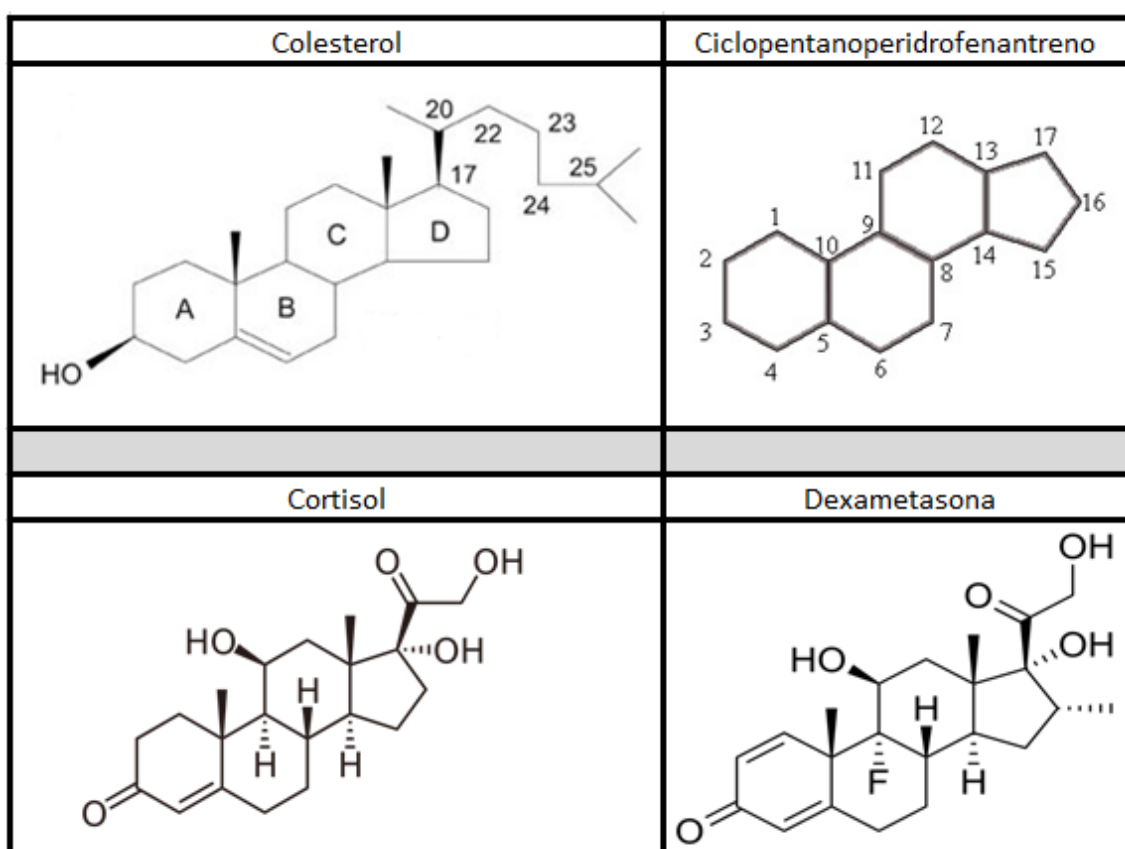


Figura 2 - Fórmula estrutural plana das moléculas de Colesterol, Ciclopentanoperidrofenantreno, Cortisol e Dexametasona.

Os glicocorticoides sintéticos são utilizados com variadas finalidades, uma vez que interferem no metabolismo geral do indivíduo, como em terapias de imunossupressão, terapia antialérgica e antiinflamatória (TORRES et. al., 2012).

O mais potente glicocorticoide sintético é a dexametasona (Figura 2), que tem atividade anti-inflamatória 30 vezes maior que o cortisol, e atua inibindo a transcrição de genes que dão origem a receptores, proteínas que suprimem citocinas e proteínas que controlam a ativação, migração, adesão e recrutamento celular (ALVES, 2017).

Por serem moléculas lipofílicas, os glicocorticoides conseguem atravessar a membrana plasmática por difusão passiva, sem gasto energético. Quando chega ao citoplasma da célula, se ligam aos receptores específicos formando o complexo glicocorticoide-receptor, que após sofrer transformação em sua estrutura se torna capaz de entrar no núcleo da célula, onde vai interferir nos processos de transcrição, já que irá se ligar a regiões promotoras de alguns genes, em um processo de transativação, inibindo por exemplo, o fator nuclear NF- κ B, interleucinas, prostaglandinas, TNF- α e proteína ativadora 1 (AP1), moléculas que são essenciais na resposta inflamatória (SONG et al., 2005).

Embora tenha potente efeito anti-inflamatório, no uso sistêmico dos glicocorticoides são observados inúmeros efeitos colaterais, como interferência no metabolismo de carboidratos, retenção de sódio, redução da captação e utilização das moléculas de glicose, aumentando assim a gliconeogênese. Alteram, também, o metabolismo de lipídeos e proteínas. Além disso, observa-se ação direta sobre as células do tecido ósseo, diminuição da absorção intestinal de cálcio e aumento da excreção desse íon pelos rins, aumento da retenção de sódio e aumento da excreção de potássio pela urina (RANG et al., 2007).

4.4. Indução da Osteoporose por Glicocorticoides (Dexametasona)

4.4.1. Ação sobre as Células Ósseas

Os glicocorticoides podem agir diretamente sobre as células do tecido ósseo.

A chamada fase rápida da indução da osteoporose por glicocorticoides está relacionada com a ação do medicamento dexametasona nos osteoclastos, que são as células ósseas responsáveis pela reabsorção óssea, estimulando a maturação dos precursores deste tipo celular, os monócitos, bem como a atividade de reabsorção dos osteoclastos, resultando em regiões de menor densidade óssea (LANNA et. al., 2003).

A ação sobre os osteoblastos constitui a fase tardia da indução da osteoporose por glicocorticoides, onde o medicamento dexametasona atua estimulando a apoptose dos osteoblastos, diminuindo a taxa proliferativa destas células bem como de seus precursores. Além disso, diminui a atividade deste tipo celular, prejudicando, dessa maneira a síntese de colágeno tipo 1 e proteínas não colágenas, como a osteocalcina, e diminui, conseqüentemente, a taxa de formação óssea. Os glicocorticoides são então repressores da função osteoblástica. Em adição, os glicocorticoides atuam estimulando a degradação de colágeno tipo 1, maior constituinte da matriz óssea e precursor do tecido ósseo, por meio do aumento da expressão de collagenases (CANALI et. al., 2007).

Além de aumento da expressão de enzimas que degradam colágeno, os glicocorticoides atuam também, de forma indireta, diminuindo a produção de prostaglandinas, substâncias cuja função principal é estimular a síntese de proteínas colágenas e não colágenas (AMADEI et. al., 2006). E causam também alterações na ligação ou síntese de fatores de crescimento esquelético, como o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), TGF- β e citocinas (CANALIS & DELANY, 2002).

Essa desproporção na relação da atividade osteoclástica, onde a reabsorção óssea está sendo estimulada, e a atividade osteoblástica, em que se observa deficiência na formação óssea, tem por consequência perda de

densidade e resistência óssea, caracterizando a osteoporose (FERRARI, 2003).

4.4.2. Ação sobre Vitamina D, PTH, Cálcio, Sódio, Magnésio, Fósforo e Potássio

Também de forma indireta, os glicocorticoides podem agir na rápida perda óssea, atuando sobre o metabolismo do cálcio, bem como no metabolismo da vitamina D e no balanço hidroeletrolítico de sódio e potássio (DONATTI, et. al., 2011). Além disso, ainda de forma indireta, agem na secreção de hormônios sexuais e de paratormônio (PTH), e na produção de citocinas, prostaglandinas e fatores de crescimento (PATRÍCIO, et. al., 2006).

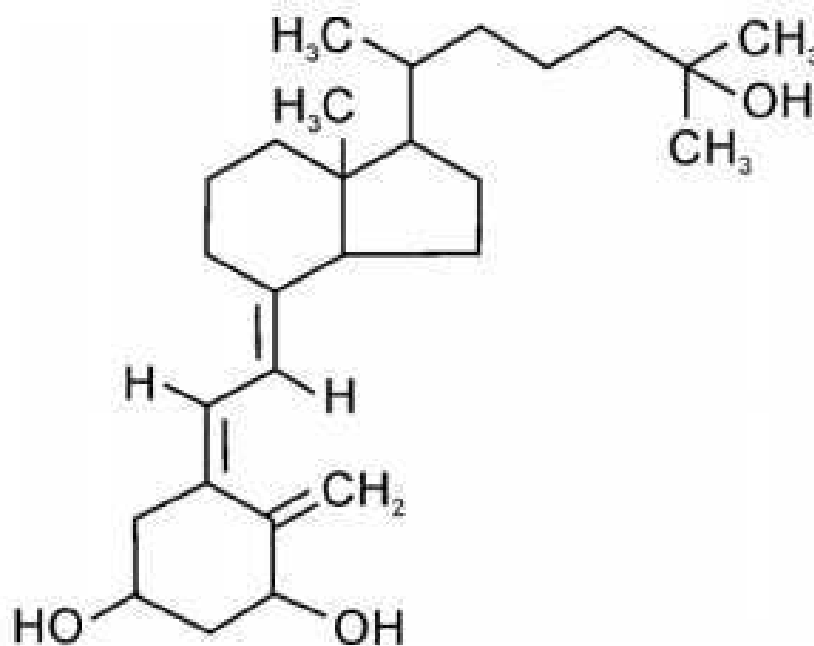
A concentração de cálcio intracelular é regulada de forma precisa uma vez que este íon desempenha papel fundamental em diversos processos fisiológicos, como por exemplo, na coagulação sanguínea, contração muscular e transmissão de impulso nervoso. Dessa forma, são raras as vezes em que se faz possível observar alterações nos níveis sanguíneos deste íon (LEÃO e CARDOSO, 2014).

Os ossos servem como amplos reservatórios destes íons, liberando e armazenando cálcio de acordo com a necessidade do meio extracelular, a fim de manter a concentração sérica deste íon controlada. Da mesma forma, ocorre com os íons fosfato, que estão predominantemente armazenados nos ossos, porém, embora sejam controlados por fatores reguladores de cálcio, não são tão bem regulados como no caso do cálcio, sendo assim mais comum observar variações em seus níveis (GUYTON e HALL, 2017).

Para que o cálcio seja bem absorvido e metabolizado é necessário que os níveis de magnésio estejam bem equilibrados, uma vez que o magnésio age estimulando a liberação de calcitonina, hormônio que captura o cálcio do sangue e transporta para os ossos. O magnésio também tem a função de suprimir o paratormônio (PTH), e é essencial no processo de ativação da vitamina D. Por isso a deficiência de magnésio pode ser um fator de risco para a osteoporose (PREMAOR e BRONDANI, 2016).

A vitamina D (Figura 3), substância lipossolúvel, é um grupo de esteróis, derivado do 7-deidrocolesterol, e apresenta função hormonal. À forma ativa

A síntese da forma ativa da vitamina D tem como precursora o composto 7-deidrocolesterol, presente naturalmente na pele, que quando irradiado por raios ultravioletas provenientes do sol, resulta na formação de colecalciferol (vitamina D₃). No fígado, o colecalciferol sofre o primeiro passo de ativação, sendo então convertido em 25-hidroxicolecalciferol, em um processo restrito, uma vez que o produto formado tem efeito inibitório, por feedback negativo, na reação de ativação, impedindo a ação excessiva da vitamina D, mantendo o colecalciferol armazenado no fígado. Em seguida, já nos rins, o 25-hidroxicolecalciferol é convertido em 1,25-diidroxicolecalciferol, sendo esta a forma mais ativa da vitamina D. Nessa última conversão, se faz necessária a presença de PTH, hormônio que determina a funcionalidade da vitamina D no organismo; cálcio e fosfato séricos (SCHUCH et. al., 2009).



16

A vitamina D tem ação principalmente no intestino e nos rins, órgãos envolvidos no metabolismo osteomineral de cálcio e fósforo (MARQUES, 2010). Nas células intestinais, a vitamina D promove o aumento da absorção de cálcio pelo estímulo da expressão de proteínas responsáveis pela captação de cálcio por estas células, e de proteínas responsáveis pelo transporte intracelular e intercelular de cálcio (CASTRO, 2011). Em relação aos íons fosfato e sódio, a vitamina D participa da correção, estimulando a expressão de proteínas cotransportadoras destes íons, nas células intestinais. Nos rins, a vitamina D, regula a expressão de proteínas transportadoras de cálcio, promovendo a reabsorção do cálcio filtrado. Além disso, regula também, a expressão e síntese do fator de crescimento (FGF-23) nas células ósseas, que tem por função inibir a atividade da proteína cotransportadora de sódio e fosfato (NaPi2a) nos túbulos renais, regulando os níveis de fosfato de modo a promover níveis de cálcio e fósforo adequados para a mineralização óssea (SHIMADA, et. al., 2004).

Sendo assim, a deficiência de vitamina D prejudica a mineralização óssea, contribuindo para a perda de densidade óssea e consequentemente o estabelecimento da osteoporose.

Os glicocorticoides, além de por meio do estímulo da atividade osteoclástica, aumentarem a concentração sérica de cálcio, atuam também inibindo a reabsorção intestinal e renal deste íon, uma vez que atua no metabolismo da vitamina D, diminuindo a concentração sérica deste metabólito, o que gera por consequência uma diminuição da síntese de proteínas ligadoras de cálcio. Além disso, os glicocorticoides estimulam a excreção renal de cálcio, bloqueando assim a formação óssea (PATTSCHAN, et. al., 2001).

O hormônio da paratireoide (PTH) atua controlando a concentração extracelular de cálcio e fósforo no tecido ósseo e nos rins, de acordo com os níveis de reabsorção, excreção e intercâmbio destes íons entre o osso e líquido extracelular. A produção e secreção do hormônio são estimuladas por baixos níveis séricos de cálcio, fosfato ou vitamina D, e tem por principal função regular os níveis de cálcio, a fim de prevenir a hipocalcemia (TOMASELLO, S., 2008).

O PTH tem por função aumentar a reabsorção de cálcio e de fosfato a partir do osso, e diminuir a excreção de cálcio pelos rins, dessa forma em

condições onde os níveis séricos destes íons estejam abaixo do desejado, as glândulas paratireoides secretam o paratormônio (PTH) a fim de normalizar essa condição (BRACCO et. al., 2003). Nos ossos o PTH induz a absorção de cálcio e fosfato por meio da ativação de células ósseas, em especial os osteócitos, a fim de promover a reabsorção da matriz óssea, além disso estimula a proliferação dos osteoclastos, tornando a reabsorção mais acentuada, elevando assim os valores séricos dos íons (GRACITELLI, et, al., 2002)

Em relação à excreção desses íons, o PTH causa a rápida perda de fosfato na urina, uma vez que o hormônio em questão reduz a reabsorção tubular dos íons fosfatos, o mesmo observa-se para íons como sódio e potássio. Já no que diz respeito aos íons cálcio, o PTH aumenta a reabsorção tubular, e eleva também a reabsorção de íons magnésio e hidrogênio (CAMPOS e PINHATI, 2013).

Da mesma forma do que o observado nos rins, o PTH aumenta a reabsorção dos íons cálcio e fosfato no intestino, dependente de vitamina D (GUYTON e HALL, 2017) (Figura 4).

Uma vez que os glicocorticoides inibem a reabsorção intestinal e renal de cálcio por mecanismos dependentes de vitamina D cujos níveis se encontram deficientes durante a corticoterapia; e devido a ação direta do medicamento nas células ósseas, observa-se um aumento sérico dos íons cálcio e fósforo, causando como consequência desse quadro, o desenvolvimento de hiperparatireoidismo secundário caracterizado pelo excesso de síntese e liberação de paratormônio, mecanismo compensatório para o controle dos níveis séricos de cálcio, fósforo e vitamina D (PATTSCHAN, et. al., 2001). Esta condição provoca um desequilíbrio no metabolismo do PTH, resultando por consequência um aumento da degradação óssea, decorrente do desequilíbrio da atividade das células envolvidas no processo, contribuindo para a manutenção da osteoporose (SAMPAIO et. al., 2008).

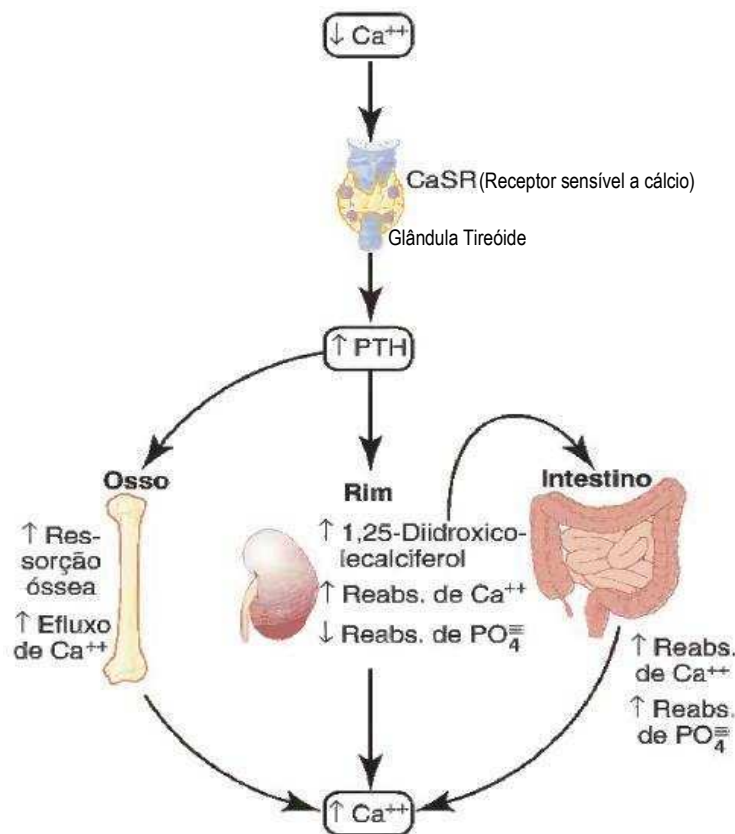


Figura 4 - Eixo Cálcio-PTH-Vitamina D.
Fonte: GUYTON e HALL, 2011 p.1016.

4.4.3. Ação sobre a Fosfatase Alcalina Óssea

A fosfatase alcalina é uma ectoenzima, ou seja, está localizada na superfície externa da célula em que exerce sua atividade. No fígado, por exemplo, é encontrada na superfície de células que se unem para formar os canais biliares. Nos ossos, está presente na superfície dos osteoblastos, células envolvidas na formação do osso. De maneira geral tem a função hidrolítica que remove grupamentos fosfato de diversas moléculas. A dosagem desta enzima é muito frequente na rotina de análises sanguíneas, principalmente quando se deseja investigar distúrbios hepáticos. Utilizar a dosagem de fosfatase alcalina total como marcador de remodelação óssea é inviável, uma vez que neste caso, estão incluídas as variantes hepática, óssea, intestinal e renal (JORGE, et. al., 2014 ; ALLEN, 2003)

As isoenzimas hepática e óssea correspondem a aproximadamente 90% da fosfatase alcalina circulante. Em pacientes jovens a isoenzima óssea é predominante (SARAIVA e LAZARETTI, 2002)

A fosfatase alcalina óssea é o marcador bioquímico de formação óssea, que reflete a atividade osteoblástica, e seu valor se encontra aumentado em animais com doenças ósseas, o que caracteriza um aumento da atividade osteoblástica para reparar o dano no tecido. Logo em casos de osteoporose, espera-se observar um aumento dos níveis de fosfatase alcalina óssea (VIEIRA, 1999).

4.4.4. Ação sobre o Cortisol Endógeno

O cortisol é o mais importante glicocorticoide endógeno, produzido pela glândula adrenal a partir do colesterol, desempenha papel no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, além de ter funções hemodinâmicas, principalmente em situações de estresse, onde estimula o anabolismo. Participa do controle de mecanismos de utilização de substratos para produzir energia e permite a ação de vários hormônios como, por exemplo, as catecolaminas (ERRANTE, et. al., 2014). O cortisol também atua aumentando a pressão arterial e o açúcar no sangue, uma vez que apresenta ação semelhante a do glucagon estimulando a gliconeogênese no fígado, e suprime o sistema imune (GUYTON e HALL, 2017).

A secreção do cortisol é mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise (Figura 5), onde o hipotálamo recebe o estímulo por meio de impulsos nervosos a partir de uma situação de estresse, e libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH), este hormônio induz as células corticotróficas da hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez vai agir sobre as células das adrenais estimulando a produção e secreção dos hormônios adrenocorticais, dentre eles o cortisol (PAULI, et. al., 2005).

O excesso de glicocorticoides endógenos ou exógenos na corrente sanguínea resulta na inibição, por feedback negativo, do eixo hipotálamo-hipófise, e conseqüentemente a inibição da síntese de mais glicocorticoide (BAMBERGER, SCHULTE, & CHROUSOS, 2008).

No caso da administração de glicocorticoides exógenos há diminuição da secreção de CRH e ACTH, inibindo a secreção de glicocorticoides endógenos levando à atrofia reversível da função do córtex adrenal, podendo

levar alguns meses para resposta da função normal após a interrupção do tratamento (RANG et. al., 2007).

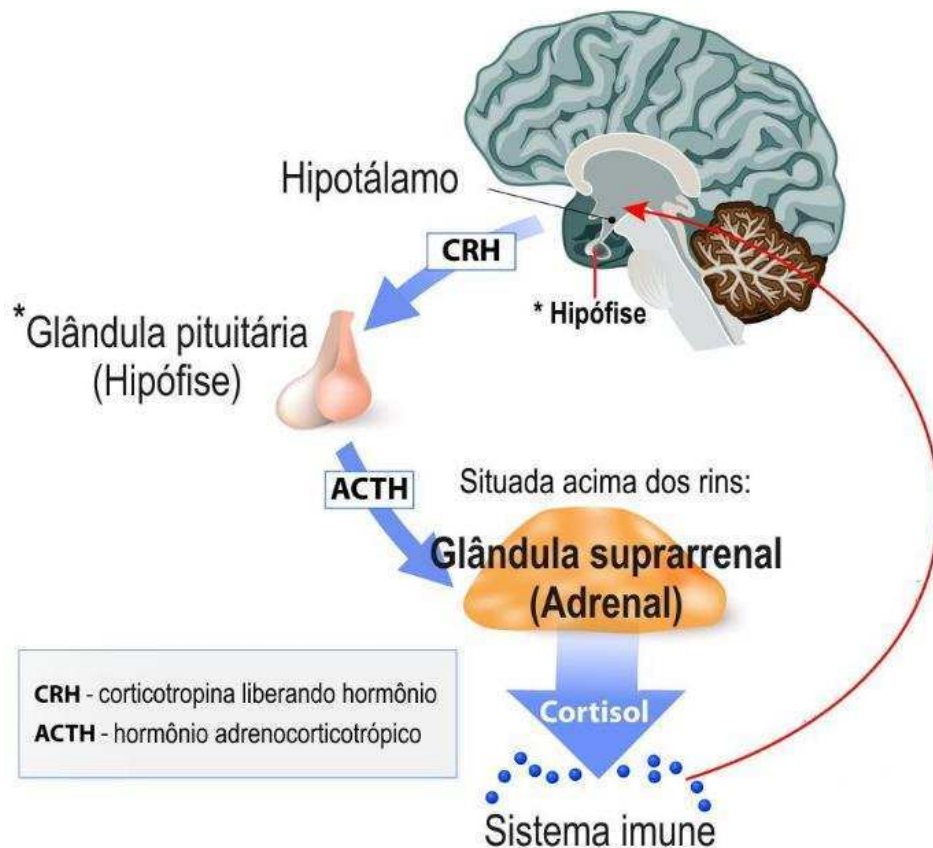


Figura 5- Eixo Hipotálamo-Hipófise e secreção de cortisol.

Fonte: <https://www.medicinamitoseverdades.com.br/blog/o-estresse-aumenta-o-cortisol--engorda-e-cause-doencas>

O hipercortisolismo é comumente observado em pacientes de corticoterapia prolongada ou de altas doses, nessa condição o nível sanguíneo de cortisol se encontra elevado, devido ao cortisol exógeno utilizado, gerando um conjunto de sinais e sintomas decorrentes desse quadro (PEIXOTO et al, 2010).

A síndrome de Cushing exógena ou iatrogênica é considerada a mais comum dentre os tipos da síndrome, devido à vasta utilização de glicocorticoides sintéticos pela população, e se encontra entre as causas ACTH-independente, uma vez que frente a níveis elevados do cortisol, o hipófise sofre retroalimentação negativa, de maneira que os níveis de ACTH são baixos e não se elevam após estímulo com CRH (ROMANHOLI e SALGADO, 2007)

Como manifestação clínica do excesso de cortisol pode-se ter a obesidade, desordens neuropsiquiátricas, hipertensão arterial, fraqueza muscular, diminuição da libido e fertilidade, pele fina, baixa cicatrização, diabetes e osteoporose (CAVALCANTE, et al, 2014).

A Síndrome de Cushing pode interferir na manutenção de massa óssea, sendo hoje a causa mais frequente de osteoporose secundária, onde se observa rápida perda óssea, principalmente de osso trabecular. O quadro de osteoporose secundária é decorrente de alterações no metabolismo mineral, dos componentes celulares do tecido ósseo e distúrbios endócrinos, gerados pelos glicocorticoides e apresentados anteriormente (DRAPER e STEWART, 2005).

4.4.5. Ação sobre a Insulina e Glicose

O hormônio insulina age no metabolismo de macromoléculas como carboidratos, proteínas e lipídeos. É composto por duas cadeias de polipeptídeos unidas por pontes dissulfeto. A biossíntese desta molécula envolve dois precursores inativos, a pré-pró-insulina e a pró insulina, que sofrem uma sequência de clivagens para formar o hormônio ativo, este por sua vez, é armazenado em grânulos no citosol das células β das ilhotas de Langerhans, no pâncreas (CHAMPE e HARVEY, 2009).

É um hormônio anabólico imprescindível no crescimento e diferenciação celular, e na manutenção da homeostase de glicose. É eliminado do citosol das células, por exocitose, quando estimulado pelo aumento do nível de glicose sanguínea. Em condições onde a glicose sanguínea é baixa, a síntese e liberação de insulina são diminuídas. Além disso, a secreção também é estimulada pelo sistema nervoso, via receptores colinérgicos, assim como a estimulação adrenérgica inibe a via (HABER, et. al., 2001).

Dentre os efeitos metabólicos da insulina, podemos destacar seu efeito no fígado, onde diminui a produção de glicose inibindo a gliconeogênese e estimula a síntese do glicogênio, o último também é observado nos músculos. Em relação aos lipídeos, a insulina causa redução na liberação de ácidos graxos, uma vez que inibe a atividade da lipase sensível a hormônio e estimula

a síntese de triacilglicerol pelo aumento da atividade da lipase lipoproteica (KANH, 1985).

A resistência à insulina é um dos efeitos adversos do tratamento crônico e agudo com glicocorticoides, cujo nome, se deve a ação destas substâncias no metabolismo da glicose, diminuindo a captação e utilização da glicose, além de estimular a gliconeogênese, fazendo com que o nível de glicose sanguínea aumente. RAFACHO e colaboradores (2014), viu que em ratos tratados com dexametasona, as ilhotas pancreáticas sofrem adaptações, e observou um aumento na proliferação de células β , circunstâncias em que se observa o aumento da capacidade secretória de insulina, pelo pâncreas. Esta anormalidade metabólica está relacionada à ocorrência de diabetes tipo 2 (BERTUZZI, et. al., 2016). Quando em situação de resistência a insulina, o pâncreas produz insulina com o estímulo gerado pela glicose, entretanto esta não age adequadamente, assim a glicose não é capaz de entrar nas células dos tecidos, para a síntese de glicogênio, e se acumula no sangue, o que resulta em uma hiperinsulinemia compensatória a fim de se obter uma resposta fisiológica adequada (PINHEIRO et al., 2009 ; FERREIRA et al., 2007).

Para avaliação da resistência a insulina, uma alternativa às técnicas convencionais, tem-se o Modelo de Avaliação da Homeostase da Resistência à Insulina (HOMA-IR), que fornece uma medida indireta da resistência à insulina ao avaliar a relação entre os níveis de insulina e de glicemia em jejum. Este método tem sido muito utilizado por ser de fácil aplicação, rápido e de ter menor custo (VASQUES, et al, 2008).

4.4.6. Ação na Produção de Testosterona

A testosterona é o principal hormônio esteróide masculino, e está diretamente relacionado a processos como o desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino, aumento da massa muscular, promoção das características sexuais secundárias e aumento e maturação do tecido ósseo, sendo consequentemente atuante na prevenção da osteoporose (MINER e ROSENBERG, 2014)

Em ambos os sexos, a síntese de testosterona ocorre em pequena quantidade no córtex das glândulas adrenais sob o controle da corticotropina.

Nas mulheres também é produzido em pequena quantidade pelos ovários, e nos homens em grande quantidade pelas células de Leydig nos testículos, nesses casos a produção esta sob o controle do hormônio de liberação das gonadotrofinas (GRH), produzido no hipotálamo (SILVA, et. al., 2002)

O GRH age na hipófise que promove a liberação de hormônio folículo estimulante (FSH) que por sua vez estimula a gametogênese, bem como, a liberação do hormônio luteinizante, pela adenoipófise. O hormônio luteinizante estimula a síntese de testosterona pelas células de Leydig, nos testículos (HEINDEL e TREINEN, 1989).

Os glicocorticoides endógenos e exógenos, inibem, por feedback negativo, a liberação de GRH pelo hipotálamo, inibindo por consequência a liberação de LH e testosterona (RANG et. al., 2007).

As células de Leydig são células poligonais, eosinófilas de núcleo vesicular arredondado e citoplasma granular. Estas células se encontram nos testículos entre os túbulos seminíferos. Em ratos, a diferenciação morfológica de células de Leydig inicia-se entre o 15º e o 17º dia pós-concepção, coincidindo com a formação do cordão testicular. Há dois tipos de populações de células esteroideogênicas, as células de Leydig fetais e as células de Leydig adultas (pós-natal). (HAIDER, 2007).

São observadas três fases na diferenciação das células de Leydig pós-natal. Entre o 14º e 28º dia pós-natal, inicia-se a primeira fase, caracterizada pela diferenciação de células mesenquimais em células de Leydig progenitoras. A segunda fase é observada a partir do 28º dia pós-natal quando as células de Leydig progenitoras são denominadas adultas imaturas; observa-se aumento no número de células por divisões mitóticas, de modo que, aos 35 dias, elas passam a produzir baixos níveis de testosterona. A terceira fase ocorre a partir do 56º dia quando passam a ser consideradas adultas maduras e produzem ativamente testosterona, nessa fase a proliferação e diferenciação das células de Leydig depende da presença de gonadotrofinas. O LH se destaca nesse papel, sendo necessário para manter a atividade fisiológica destas células (PACCOLA, 2010).

A fim de se obter informação sobre o estado de funcionalidade das gônadas pode-se recorrer ao índice gonadossomático que é obtido pela razão entre o peso do testículo pelo peso do animal, vezes 100. Quanto mais

avançada é a fase reprodutiva do indivíduo, maior é o índice gonadossomático. Logo, baixos valores do índice inferem baixos níveis de testosterona, uma vez que o tamanho testicular está relacionado de forma diretamente proporcional aos níveis de testosterona (LISE, et. al., 1999 ; SOUZA, et. al., 2007).

O colesterol é o precursor de todos os hormônios esteroides, sendo essencial para a síntese de testosterona. As células de Leydig utilizam o colesterol armazenado na matriz intracelular por meio da síntese “de novo”, ou podem fazer uso de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) extracelular, e produzir testosterona. Essa síntese é regulada, principalmente pelo hormônio luteinizante (LH), que sinaliza a conversão de colesterol a pregnolona, principal precursor dos hormônios esteroides (GEBARA, 2002). Depois de produzida e secretada pelas células de Leydig, a testosterona cai na corrente sanguínea, onde será endereçada para as células alvo.

No tecido ósseo, a testosterona age nas células osteoblásticas, responsáveis pela formação óssea, que tem em sua superfície, receptores para esteroides, que por sua vez, estimulam a proliferação e diferenciação deste tipo celular, bem como agem no tecido ósseo inibindo a reabsorção óssea, por meio da ação sobre o AMPc produzido pelo PTH (AMADEI, 2006).

A osteoporose, apresentada em pacientes, do sexo masculino, em corticoterapia prolongada ou de doses altas, pode ser também, um efeito secundário ao hipogonadismo que estes medicamentos causam nos pacientes. Nesse caso, os glicocorticoides podem agir de forma direta diminuindo a produção testicular de testosterona, ou de forma indireta, por meio da supressão da secreção de hormônio gonadotrófico hipotalâmico (PRELEVIC, 2001).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da raça *Wistar*, adultos jovens, uma vez que a idade pode interferir na aparência da osteoporose; pesando em média 130g, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Durante todo experimento, foram alimentados com ração padronizada comercial, para ratos de laboratório, e água “*ad libitum*”.

Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Biofármacos (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-UFV/ casa 26 – Vila Gianetti), em ambiente climatizado entre 22 e 24°C, com fotoperíodo de 12 horas, em gaiolas de polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável em forma de grade, contendo, em cada uma, 1 (um) animal. As gaiolas foram higienizadas três vezes por semana.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), protocolo 26/2017.

5.2. Protocolo Experimental

Considerando que a taxa de perda de massa óssea em ratos é altamente dependente do metabolismo do animal é possível que haja diferenças no processo de indução da osteoporose no que se refere aos animais serem machos ou fêmeas. Para isso, uma vez que não se sabia se 30 dias seriam suficientes para observa-se a ocorrência de osteoporose persistente em machos, uma vez que esse processo em animais machos é pouco estudado, optou-se por realizar o experimento em dois tempos diferentes. Sendo um deles de administração da droga dexametasona por 4 semanas e o outro por 8 semanas, bem como a avaliação por até dois meses após a interrupção de cada um destes tratamentos, a fim de observarmos os efeitos colaterais adjacentes que a dexametasona pode causar no metabolismo masculino, além da osteoporose, e que podem influenciar em futuras pesquisas que utilizem o modelo experimental que iremos propor para o estudo de tratamentos para a osteoporose induzida por

glicocorticoides em ratos macho. Por isso os grupos tratados por 4 e 8 semanas foram subdivididos, posteriormente, em três subgrupos diferentes cada, sendo em cada caso, um para avaliar o efeito da dexametasona imediatamente após a suspensão do tratamento, outro para avaliar como estaria a recuperação do organismo frente aos efeitos colaterais adjacentes da droga dexametasona nestes animais após um mês da suspensão do medicamento dexametasona e o ultimo para avaliar como estaria a recuperação do organismo frente aos efeitos colaterais adjacentes da droga dexametasona nestes animais depois de dois meses do final da administração do glicocorticoide.

Então após o período de adaptação de uma semana, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais.

- G1 = Controle sem osteoporose
- G2 = Animais tratados com dexametasona por 4 semanas
- G3 = Animais tratados com dexametasona por 8 semanas

Em seguida, à exceção dos 24 animais do grupo 1 (G1), por se tratar do grupo controle sem osteoporose, deu-se início ao processo de indução da osteoporose com a administração do glicocorticoide dexametasona, por via intramuscular, na dose semanal de 7,0 mg/Kg de peso corporal do animal, por 4 semanas nos 18 animais do grupo 2 (G2) e 8 semanas nos 18 animais do grupo 3 (G3).

5.3. Eutanásia

Passados 30 dias do início do experimento, seis animais do grupo 1 (G1₁) e seis animais do grupo 2 (G2₁), foram eutanasiados; em seguida, passados 60 dias do início do experimento, seis animais do grupo G1 (G1₂), seis animais do grupo G2 (G2₂) e seis animais do grupo G3 (G3₁) foram eutanasiados, após 90 dias do início do experimento, foram seis animais do grupo G1 (G1₃), seis animais do grupo G2 (G2₃) e seis animais do grupo G3 (G3₂), e finalmente, em 120 dias de experimento, foi feita a eutanásia de seis animais do grupo G1 (G1₄) e seis animais do grupo G3 (G3₃).

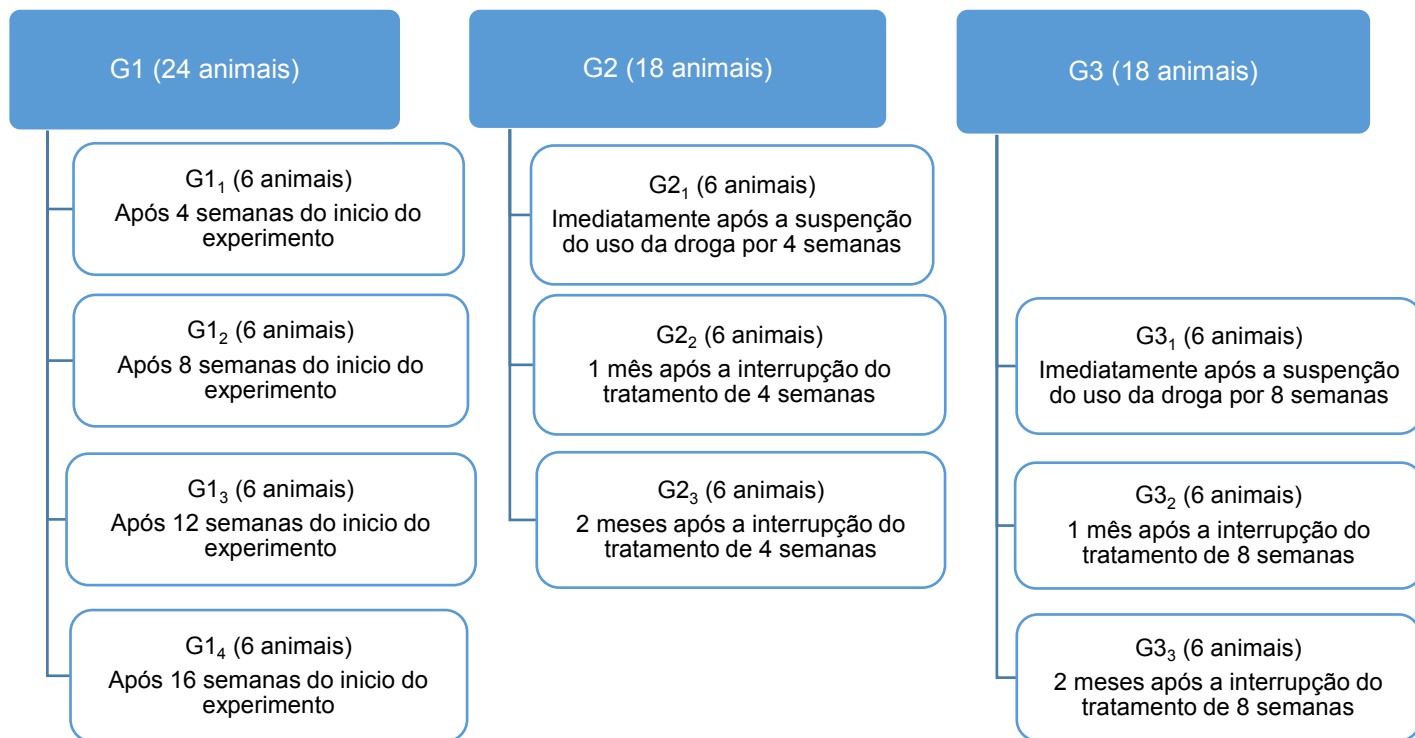


Figura 6: Divisão dos animais em subgrupos de acordo com os tempos de experimentação, contados a partir do primeiro dia do experimento, e de acordo com a idade dos animais.

No procedimento da eutanásia, os animais foram submetidos a anestesia dissociativa com solução, via intramuscular, de cloridrato de ketamina (50mg/ml) com cloridrato de xilazina (23mg/ml), em dosagem apropriada para o peso dos animais, pesados antes da eutanásia; para em seguida ser realizada a laparotomia e posterior punção da veia cava caudal; causando assim a parada cardíaca e morte do animal.

Os animais se encontravam em jejum de 12 horas, para serem submetidos ao procedimento.

5.4. Coleta dos materiais

Por meio da punção da veia cava caudal, coletou-se, aproximadamente, 5 ml de sangue de cada animal, as amostras foram centrifugadas a 3600 rpm por 15 minutos, obtendo-se o soro para posteriores análises dos parâmetros bioquímicos e hormonais.

Fez-se também a coleta e pesagem dos testículos e fêmures dos animais. O fêmur direito foi congelado, e os testículos foram armazenados em tubos falcon

contendo fixador formol 3,7%, pelo período de 24 horas, sendo em seguida transferidos para álcool 70%, até o processamento histológico.

5.5. Biometria

5.5.1. Peso corporal

Realizou-se, semanalmente, a pesagem de todos os animais, em balança semi-analítica, a fim de determinar a dosagem de dexametasona a ser administrada em cada animal, bem como para observar o ganho de peso dos mesmos, a cada semana, durante o tratamento e até 2 meses após o fim do deste.

5.5.2. Medidas do fêmur direito

Para a análise de biomecânica e determinação do índice Seedor, obteve-se as medidas de comprimento e diâmetros dos fêmures direito, realizadas com paquímetro digital 150 mm e resolução 0,01 mm/0,0005 Metrotools®. Além disso, os ossos foram pesados antes de serem submetidos ao congelamento para preservação de sua estrutura.

5.5.3. Índice Seedor

Calculou-se o índice Seedor, indicativo para densidade óssea. Para calculá-lo divide-se o peso do osso, em gramas, pelo comprimento do mesmo osso, em centímetros, e quanto menor for o valor obtido sugere-se uma menor densidade mineral óssea (Seedor, 1991).

5.6. Tomografia

Os fêmures direito foram submetidos à microtomografia utilizando o aparelho Microtomógrafo SKYSCAN 1174v2 Compact X-ray micro CT, no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, para determinação da porosidade óssea. Por meio dessa técnica se faz possível a visualização das secções transversais do osso de forma não destrutiva, medindo-

se a absorção da radiação de acordo com a composição química e densidade de cada osso. Sendo uma técnica mais sensível para a determinação de massa óssea e observação da microarquitetura do osso se comparada aos métodos convencionais consolidados, como a análise histológica. A técnica tem por vantagem a possibilidade de se determinar facilmente a região a ser analisada, não haver a necessidade de se preparar a amostra, e por não se observar as interferências na imagem comumente observada em processos histológicos, como a presença de artefatos e deficiência no corte, obtêm-se ainda uma imagem em alta resolução da estrutura completa e a amostra permanece intacta ao final da análise. Constituindo uma nova forma para análise 3D de tecidos duros.

5.7. Biomecânica

O teste de flexão e resistência à quebra foi realizado com o auxílio do aparelho Instron (modelo 3367, USA), no Laboratório de Embalagens do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa (DEAL/UFV).

Os fêmures direito coletados foram testados na mesma posição, com as suas extremidades apoiadas em dois suportes apropriadamente afastados de acordo com o comprimento de cada osso, sendo a carga, de 1 Kn (100 kg), aplicada no centro da diáfise, seguindo-se as especificações da Sociedade Americana de Engenharia Agrícola (ANSI/ASAE S459, 1992). A velocidade da máquina foi de 2 mm/min. O momento da ruptura do osso foi registrado em força máxima aplicada (N).

Para determinar a resistência óssea, considera-se o osso:

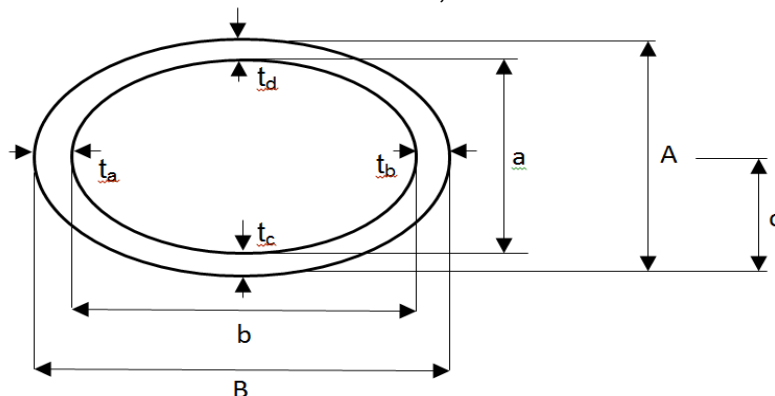


Figura 7 - Seção transversal do fêmur e as variáveis geométricas, considerando o osso como uma elipse oca.

Com os valores de força máxima aplicada, fornecidos pelo aparelho, pode-se calcular a resistência à flexão (RF), ou módulo de ruptura.

$$RF = \frac{FLc}{4I},$$

Onde F é a força máxima aplicada (N), L é distância entre os apoios (m) diferente para cada osso, c é a posição da seção transversal onde a tensão é máxima, ou seja, região de diáfise do osso, equivalente à metade do comprimento do osso, e I é o momento de inércia, fornecida pela fórmula:

$$I = 0,049 [(B.A^3) - (b.a^3)]$$

Onde b = B - (t_a + t_b) e a = A - (t_c + t_d) (Figura 7)

5.8. Índice Gonadossomático

O índice gonadossomático (IGS) é calculado dividindo o peso dos testículos (Ptest), pelo peso do animal (Panim) e multiplicado por 100, conforme a fórmula:

$$IGS = \frac{P_{testículo}}{P_{animal}} \times 100$$

5.9. Histologia

Os testículos, fixados em formol 10% por 24 horas, e posteriormente, mantidos em álcool 70%, foram submetidos ao processamento histológico, para confecção de lâminas histológicas.

Para as lâminas de testículo, foram obtidos seis cortes histológicos para cada animal, de quatro micrômetros de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer®, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Estes cortes foram obtidos de forma seriada, montados sobre lâmina de vidro e corados com coloração hematoxilina-eosina.

Para cada corte foram contadas as células de Leyding presentes na imagem selecionada aleatoriamente, sobre aumento de 200x, utilizando o

programa Image-Pro. Uma vez que estas células são responsáveis pela produção de testosterona. A fim de observar se a dexametasona teve alguma interferência na quantidade de células de Leydig presente na imagem, se comparada aos grupos controle de mesma idade.

5.10. Análises dos Parâmetros Sanguíneos

Parte do sangue coletado foi acondicionada em tubo de coleta de sangue fluoretado, para quantificação dos níveis séricos de glicose. A outra parte foi acondicionada em tubo de coleta de sangue com heparina, para quantificação dos demais parâmetros. Em ambos os casos, os tubos foram submetidos a centrifugação, para obtenção do soro para dosagem dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos de interesse. São esses, fosfatase alcalina (FAL), íons cálcio, fósforo, potássio, magnésio e sódio, glicose, insulina, cortisol, testosterona, vitamina D e fosfatase alcalina óssea (FAO).

As dosagens hormonais foram realizadas utilizando o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System II da Beckman Coulter, utilizando “kits” específico para dosagem também da mesma indústria, os demais parâmetros foram quantificados por espectrofotometria, utilizando o Aparelho AU480 Chemistry System – Beckman Coulter, utilizando “kits” específicos da marca Bioclin.

5.11. Índice HOMA-IR

Índice utilizado para diagnosticar resistência à insulina, onde o cálculo é realizado para avaliar a relação entre a quantidade de açúcar e a quantidade de insulina no sangue.

$$HOMA - IR = \frac{\left(\left(\text{glicemia em jejum} \left(\frac{mg}{dL} \right) \times 0,0555 \right) \times \text{insulina em jejum} \left(\frac{UI}{mL} \right) \right)}{22,5}$$

5.12. Análise Estatística

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 tratamentos em 6 repetições. Os resultados obtidos por cada grupo foram comparados com o grupo controle através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no Software SAEG/UFV.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Determinação do ganho de peso corporal

Durante todo experimento o peso de todos os animais foi monitorado semanalmente, a fim de regular a dosagem do medicamento (7mg/kg), bem como para acompanhar o desenvolvimento destes animais, a fim de estabelecer uma relação entre o uso prolongado de glicocorticoide por 4 (G2) e 8 semanas (G3), e a influência no ganho de peso do animal, quando comparados aos animais dos grupos controle (G1) com mesma idade.

Nas figuras a seguir, têm-se os valores de ganho de peso, em gramas, por semana. Na Figura 11 podemos observar os dados referentes ao grupo G2, que recebeu o medicamento por 4 semanas, os valores são referentes aos períodos imediatamente após o final do tratamento e por até dois meses após a interrupção da administração da dexametasona.

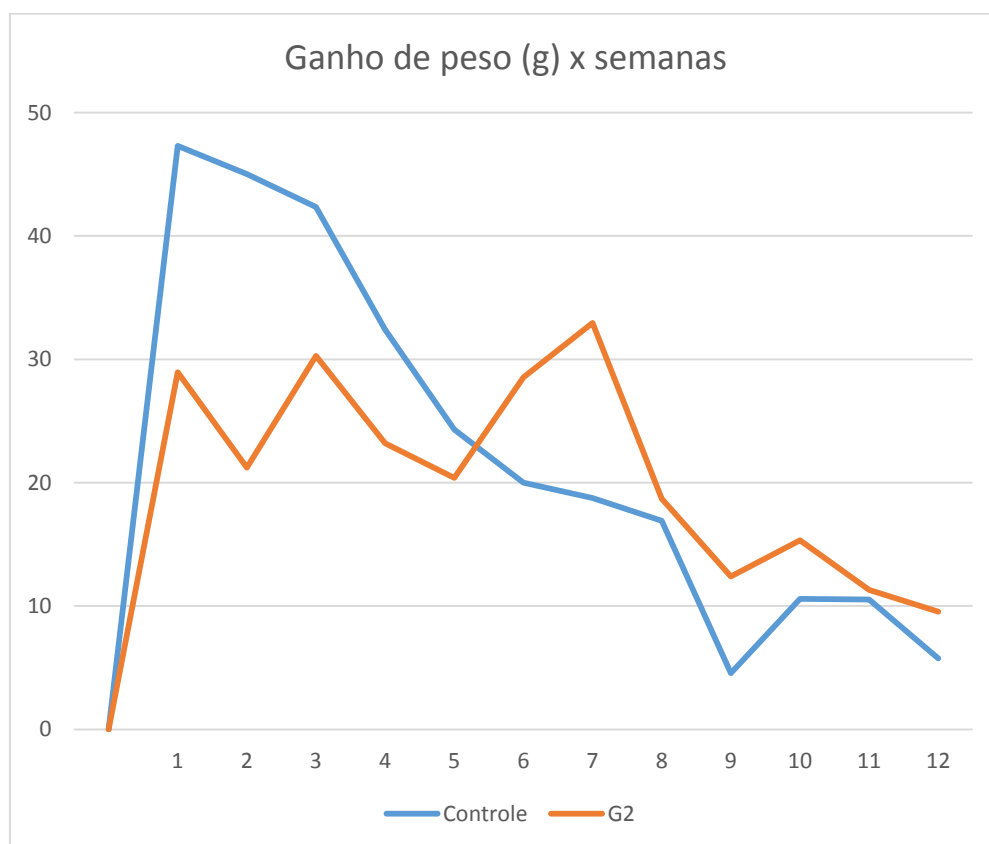


Figura 8: Média de ganho de peso, em gramas, dos animais submetidos ao medicamento com dexametasona pelo período de 4 semanas (G2) e dois meses após o fim deste.

Na Figura 12, têm-se os dados referentes ao grupo G3, que foi submetido a 8 semanas de injeções de glicocorticoide dexametasona, os valores obtidos são referentes aos períodos imediatamente após o final do tratamento e por até dois meses, após a interrupção do uso do medicamento dexametasona.

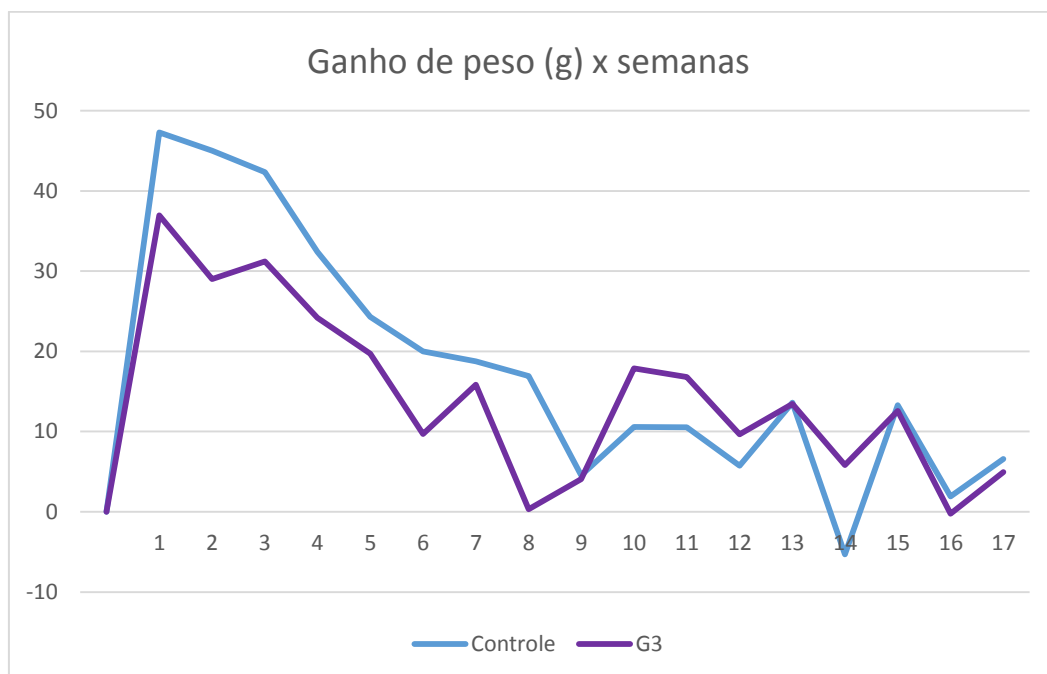


Figura 9: Média de ganho de peso, em gramas, dos animais submetidos ao medicamento com dexametasona pelo período de 8 semanas (G3) e dois meses após o fim deste.

Com base nas duas figuras apresentadas, foi possível observar que durante o período a que estavam sendo submetidos às injeções de dexametasona, independente de se tratados por 4 semanas ou por 8 semanas (G2₁ e G3₁, respectivamente) o ganho de peso, se comparado aos grupos controle de mesma idade, foi consideravelmente menor. CALDEFIE-CHÉZET e colaboradores (2001), observou que em ratos adultos e idosos, submetidos a tratamento por 3 e 5 dias, a dexametasona atuou estimulando de forma excessiva a liberação de leptina, um mediador envolvido na saciedade, gerando uma anorexia transitória, o que endossa e explica os resultados encontrados em nosso trabalho.

SANTOS e colaboradores (2007), avaliando alguns parâmetros metabólicos como glicose, insulina, proteínas e colesterol plasmáticos, em animais tratados com dexametasona, também observou redução significativa da massa corpórea de ratos machos tratados com 1mg/Kg de dexametasona por 24h, 72h e 120h.

Porém, é possível observar que após a interrupção abrupta da administração do glicocorticoide, todos os demais animais submetidos ao tratamento (G2₂, G2₃,

G3₂ e G3₃) ganharam mais peso que os animais do grupo controle, nos mesmos períodos de tempo. O mesmo também foi observado por SANTOS e colaboradores (2007), que em seu trabalho com ratos machos observou após a suspensão da administração da dexametasona, aumento da massa corporal dos animais tratados.

6.2. Análises da Biometria e Morfologia Óssea

A osteoporose é o principal efeito colateral da corticoterapia, e por meio dos testes de biometria, biomecânica e pelo diagnóstico de imagem por meio da microtomografia, dos fêmures dos animais, buscou-se estabelecer qual o tempo de tratamento, 4 ou 8 semanas, utilizando-se 7,0mg/kg, de dexametasona, é necessário para que seja possível observar o estabelecimento da osteoporose. Bem como em qual tratamento a doença persistirá por mais tempo após a suspensão do medicamento, avaliando-se a qualidade do osso por até dois meses após o final do tratamento. Observando assim, se haverá diferença na severidade do quadro de osteoporose de acordo com o tempo que o glicocorticoide foi administrado. Uma vez que a regressão natural da doença é fator limitante para a proposição de tratamentos efetivos para a osteoporose persistente. Como consequência da análise destes resultados, poderemos propor um método de indução da osteoporose com dexametasona, que seja eficiente, no que se refere à perda de qualidade do osso.

6.2.1. Biometria (Índice de Seedor)

Avaliando os parâmetros peso e comprimento dos fêmures, pode-se observar que as duas variáveis apresentaram valores estatisticamente inferiores, no que se refere, de maneira geral, aos animais submetidos ao tratamento com o glicocorticoide por 4 ou 8 semanas, quando comparados aos animais dos grupos controle de mesma idade. Essa diminuição tanto de comprimento, quanto do peso dos ossos dos animais tratados com dexametasona por 4 ou 8 semanas, também foi observada por um e por dois meses após a interrupção dos tratamentos. O que demonstra uma deficiência no desenvolvimento da estrutura óssea destes animais.

Utilizando estes parâmetros, calcula-se o Índice Seedor (relação peso x comprimento dos ossos).

Na tabela 1 tem-se a média dos valores de peso e comprimento dos ossos, bem como o Índice de Seedor, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 4 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 1 - Média de valores das variáveis biométricas ósseas, Peso (g) e Comprimento (cm) dos fêmures, bem com os valores do índice Seedor (g/cm), para os animais tratados com dexametasona por 4 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Peso (g)		Comp. (cm)		Seedor (g/cm)	
		Valor	Σ	Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 4 semanas	G1₁	0,748 a	$\pm 0,100$	3,533 a	$\pm 0,131$	0,211 a	$\pm 0,024$
	G2₁	0,540 b	$\pm 0,053$	3,024 b	$\pm 0,074$	0,178 b	$\pm 0,015$
1 mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₂	0,759 a	$\pm 0,048$	3,793 a	$\pm 0,110$	0,200 a	$\pm 0,013$
	G2₂	0,628 b	$\pm 0,055$	3,587 b	$\pm 0,096$	0,175 b	$\pm 0,012$
2 meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₃	1,177 a	$\pm 0,065$	3,995 a	$\pm 0,051$	0,295 a	$\pm 0,013$
	G2₃	0,901 b	$\pm 0,043$	3,742 b	$\pm 0,065$	0,241 b	$\pm 0,012$

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo tratado com dexametasona por 4 semanas.

Com base nos valores obtidos pelo cálculo do Índice de Seedor é possível observar para o grupo de animais que recebeu o tratamento por 4 semanas quando avaliados imediatamente após o final do tratamento com o glicocorticoide (G2₁), uma redução de 15,6% no valor do Índice de Seedor, quando comparado com o controle de mesma idade (G1₁). Depois de um mês da interrupção do tratamento com dexametasona (G2₂) a redução no índice foi de 12,5% em relação ao controle de mesma idade (G1₂), e finalmente após 2 meses da interrupção do tratamento com dexametasona (G2₃), observa-se uma redução de 18,30%, se comparados com o grupo controle de mesma idade (G1₃).

Na tabela 2, tem-se a média dos valores de peso e comprimento dos ossos, bem como o Índice de Seedor, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 8 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 2- Média de valores das variáveis biométricas ósseas, Peso (g) e Comprimento (cm) dos fêmures, bem com os valores do índice Seedor (g/cm), para os animais tratados com dexametasona por 8 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Peso (g)		Comp. (cm)		Seedor (g/cm)	
		Valor	Σ	Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 8 semanas	G1₂	0,759 a	± 0,048	3,793 a	± 0,110	0,200 a	± 0,013
	G3₁	0,568 b	± 0,016	3,506 b	± 0,060	0,162 b	± 0,005
1 mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₃	1,177 a	± 0,065	3,995 a	± 0,051	0,295 a	± 0,013
	G3₂	0,876 b	± 0,062	3,662 b	± 0,083	0,239 b	± 0,012
2 meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₄	0,983 a	± 0,026	3,931 a	± 0,106	0,250 a	± 0,006
	G3₃	0,851 b	± 0,097	3,915 a	± 0,127	0,217 b	± 0,020

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G3 grupo tratado com dexametasona por 8 semanas.

Para os animais submetidos à dexametasona por um período de 8 semanas, a redução do Índice de Seedor, observada para o grupo G3₁, referente aos animais avaliados imediatamente após a interrupção da administração do medicamento, foi de 19,0% quando comparado com grupo controle de mesma idade (G1₂). Depois de um mês da interrupção do tratamento (G3₂) a redução no índice foi de 18,9% comparando com grupo controle de mesma idade (G1₃) e após 2 meses da redução do tratamento com dexametasona, a redução do Índice de Seedor observada foi de 13,2%, quando comparados ao grupo controle de mesma idade (G1₄).

Para ambos os tratamentos (4 e 8 semanas de uso da dexametasona) se compararmos os valores do Índice de Seedor entre os grupos (imediatamente após a suspensão da dexametasona, um mês após a interrupção do tratamento e dois meses após a interrupção do tratamento) de um mesmo tratamento, não observa-se diferença estatística, configurando uma osteoporose persistente.

E consequentemente por meio do índice de Seedor, foi possível observar que, de forma geral, os fêmures dos animais que foram expostos a dexametasona, tanto por 4 quanto por 8 semanas, tiveram uma menor relação peso x comprimento, o que confirma uma menor densidade óssea quando comparados aos grupos controle, nos mesmos períodos de tempo. E que tanto para os animais submetidos ao tratamento por 4 semanas, quanto os animais submetidos ao tratamento por 8 semanas, observados por um e dois meses após a interrupção da administração da droga,, a densidade óssea ainda se mostrou menor quando comparada aos grupos controle de mesma idade.

Uma vez que a osteoporose é caracterizada pela diminuição da densidade óssea, com base nos dados das Tabelas 1 e 2, e avaliando os valores obtidos para o Índice de Seedor, foi possível concluir que 4 semanas de administração da droga, em doses semanais de 7,0 mg/kg, é o suficiente para causar prejuízo no desenvolvimento ósseo e induzir a osteoporose secundária em ratos. Especialmente se considerarmos que a porcentagem de perda de densidade óssea para animais submetidos ao tratamento por 4 semanas é estatisticamente equivalente a porcentagem de perda de densidade dos animais submetidos ao tratamento de 8 semanas, comparando entre os animais de mesma idade. E da mesma forma que observada para os animais submetidos a 8 semanas de tratamento, para os que receberam a droga por 4 semanas a osteoporose estabelecida também foi registrada nos dois meses seguintes à interrupção do tratamento.

A perda de qualidade óssea de ratas tratadas com dexametasona, por 30 e 60 dias, em dose semanal de 7,5 mg/kg, também foi observada por FERREIRA JUNIOR e colaboradores (2018), onde estas, a partir de 30 dias apresentaram menor densidade óssea, pelo índice de Seedor, se comparada ao grupo controle sem osteoporose.

Da mesma forma, ALMEIDA PAZ e colaboradores (2009), em seu trabalho a respeito da qualidade óssea de aves, inferiu que um menor valor de Índice de

Seedor está relacionado a uma menor densidade óssea, e consequentemente uma qualidade óssea inferior.

6.2.2. Análise de Biomecânica

Fazendo uso dos mesmos ossos utilizados para calcular o Índice Seedor, realizou-se o teste de biomecânica, e buscou-se avaliar a resistência óssea, uma vez que a consequência mais séria da osteoporose é a ocorrência de fraturas ósseas nos indivíduos doentes, decorrentes de uma perda de resistência óssea. Utilizou-se o aparelho Instron para determinar a força máxima (N) necessária para a ruptura de cada osso. A partir deste dado, em associação aos dados da geometria óssea individual de cada amostra, coletados com o auxílio do paquímetro, foi possível calcular a resistência óssea.

Na tabela 3, tem-se a média dos valores de resistência ósseas calculadas, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 4 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 3 - Média de valores calculados para Resistência Óssea (N/m^2). baseados na força máxima (N) fornecida pelo Instron e nos dados de geometria óssea individual do osso

Período	Grupo/ Tratamento	Resistência à Flexão (N/m^2)	
		Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 4 semanas	G1₂	89,66 a	$\pm 6,23$
	G2₁	69,85 b	$\pm 4,85$
1 mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₂	123,76 a	$\pm 4,26$
	G2₂	90,57 b	$\pm 5,34$
2 meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₃	148,76 a	$\pm 2,78$
	G2₃	129,52 b	$\pm 4,12$

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo tratado com dexametasona por 4 semanas

Por meio da tabela 3 pode-se verificar que para os animais do grupo G2₁, avaliados imediatamente após o final do tratamento de 4 semanas com dexametasona, tem-se uma redução de 22,09% na resistência óssea, quando comparados ao controle de mesma idade (G1₁), passado um mês da interrupção da administração de dexametasona (G2₂), observa-se redução de 26,82% na resistência óssea dos animais quando comparados ao controle G1₂ de mesma idade, e para o grupo analisado dois meses após a interrupção do tratamento (G2₃), observa-se redução de 12,93% na resistência óssea, quando comparado aos animais do grupo controle de mesma idade (G1₃).

Na tabela 4, tem-se a média dos valores de resistência ósseas calculadas, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 8 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 4- Média de valores calculados para Resistência Óssea (N/m²). baseados na força máxima (N) fornecida pelo Instron e nos dados de geometria óssea individual do osso.

Período	Grupo/ Tratamento	Resistência à Flexão (N/m ²)	
		Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 8 semanas	G1₂	123,76 a	± 4,26
	G3₁	94,91 b	± 1,37
1 mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₃	148,76 a	± 2,78
	G3₂	123,26 b	± 3,84
2 meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₄	184,15 a	± 21,4
	G3₃	131,72 b	± 5,69

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G3 grupo tratado com dexametasona por 8 semanas.

Analisando os valores de resistência óssea obtidos para os animais tratados por 8 semana com dexametasona, podemos ver que imediatamente após a interrupção do tratamento (G3₁) a redução da resistência óssea foi de 23,31% em relação ao grupo controle G1₂ de mesma idade, após 1 mês da interrupção do uso da dexametasona (G3₂) registrou-se uma diminuição de 17,14% da resistência óssea, em relação ao controle G1₃ de mesma idade. E finalmente

após dois meses da interrupção do tratamento com dexametasona (G3₃) observou-se a maior diferença de resistência óssea em relação ao controle de mesma idade G1₄, onde a diminuição da resistência óssea foi de 28,47%.

Baseados nos resultados obtidos no teste de biomecânica, podemos afirmar que ambos os tratamentos (4 e 8 semanas) reduziram a resistência óssea dos animais submetidos ao tratamento com dexametasona quando comparados a animais controle de mesma idade. Sendo dessa forma indicativo de osteoporose para esses animais. E da mesma forma que observado pelo Índice de Seedor, 4 semanas de administração da dexametasona também já foi suficiente para que se observe redução, estatisticamente significativa, nos valores de resistência óssea quando comparados aos controles de mesma idade. Além disso, a diminuição da resistência para animais submetidos a 4 e 8 semanas de dexametasona, da mesma forma que se observou no teste de biometria, foram estatisticamente iguais, e em ambos os casos essa redução na resistência óssea perdurou por até dois meses após a suspensão do tratamento. Isto demonstra que um experimento de 4 semanas com dexametasona em dose semanal de 7,0mg/Kg, já é o suficiente para o estudo da osteoporose persistente em ratos machos. GIRO, 2006 realizando uma avaliação da biomecânica do osso de ratas com osteoporose induzida por ovariectomia, observou que a osteoporose exerce uma influência negativa nas características biomecânicas do tecido ósseo. FERREIRA JUNIOR (2016), em trabalho de osteoporose induzida em ratas, pela administração de 7,5mg/kg, de dexametasona, pelo período de 4 semanas, observou diminuição da resistência óssea destes animais, pelo teste de biomecânica.

6.2.3. Microtomografia

Utilizando os mesmos ossos expostos às técnicas anteriores de biometria e biomecânica, realizou-se a microtomografia, a fim de, por meio de exame de imagem, visualizar a microarquitetura desses ossos e determinar a porosidade dos mesmos. Considerando que quanto maior a porosidade de um osso, menor é sua densidade óssea, e por consequência disso sua resistência também será menor, há um aumento dos riscos da ocorrência de fraturas nesses casos, configurando assim a ocorrência de osteoporose nestes animais. Para aquisição

das imagens utilizadas nas análises da porosidade, realizamos duas etapas. Primeiro a obtenção da imagem radiográfica, ao longo de diversas projeções ao longo de 360 graus. Depois disso a partir da imagem obtida no primeiro passo e por meio do programa NRecon, reconstrói-se as imagens das secções transversais

Com as imagens das secções transversais reconstruídas, utilizou-se o programa CTAn, e seguiram-se os seguintes passos:

1º) Seleciona-se a imagem do osso de interesse, por meio do ícone em destaque na Figura 9, onde é possível importar dos arquivos, a imagem obtida na microtomografia, para o programa CTAn.

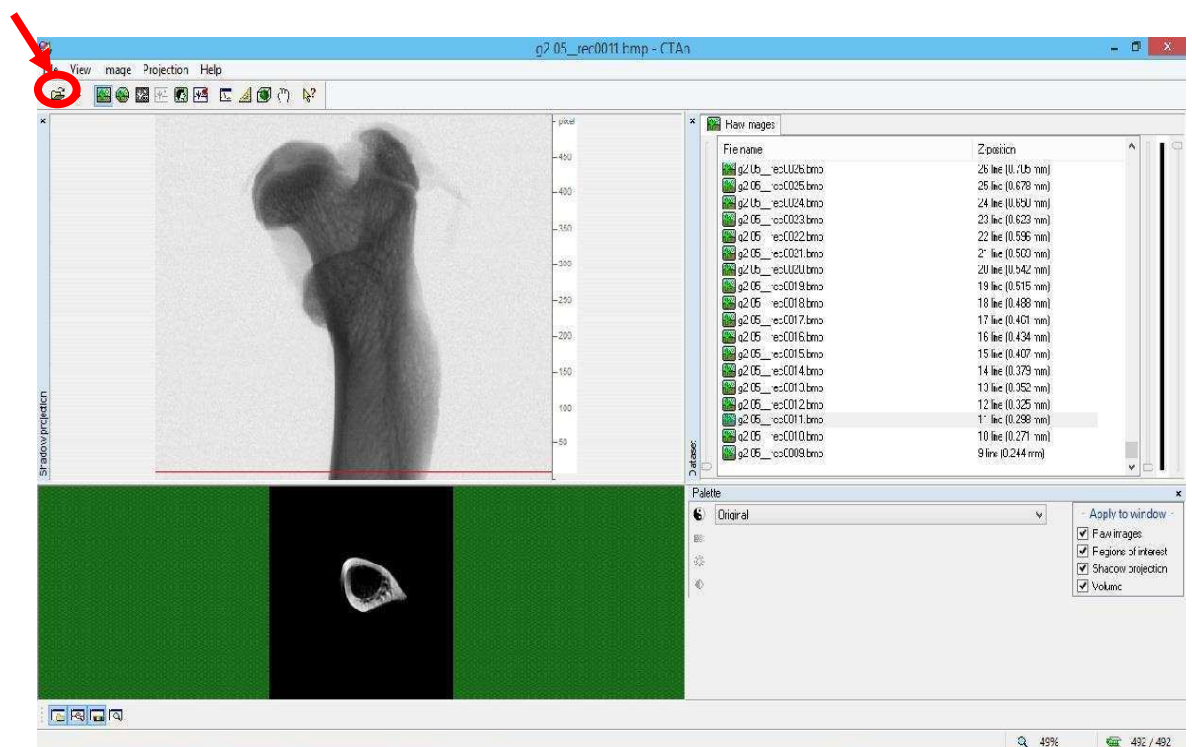


Figura 10 - Imagem da tela inicial do programa CTAn. Selecionando a imagem de interesse a ser analisada

2º) Em seguida, separadamente, determina-se o TOP e o BOTTOM da região de interesse (ROI) (Figura 10), por meio dessa determinação tem-se a seleção da quantidade de fatias (slices) que farão parte dessa região. No caso dos fêmures, selecionou-se a parte próxima a placa epifisária, região de crescimento do osso. Neste trabalho padronizou-se o ROI composto de um total de 60 slices a 80 slices, dependendo do tamanho do osso em questão.

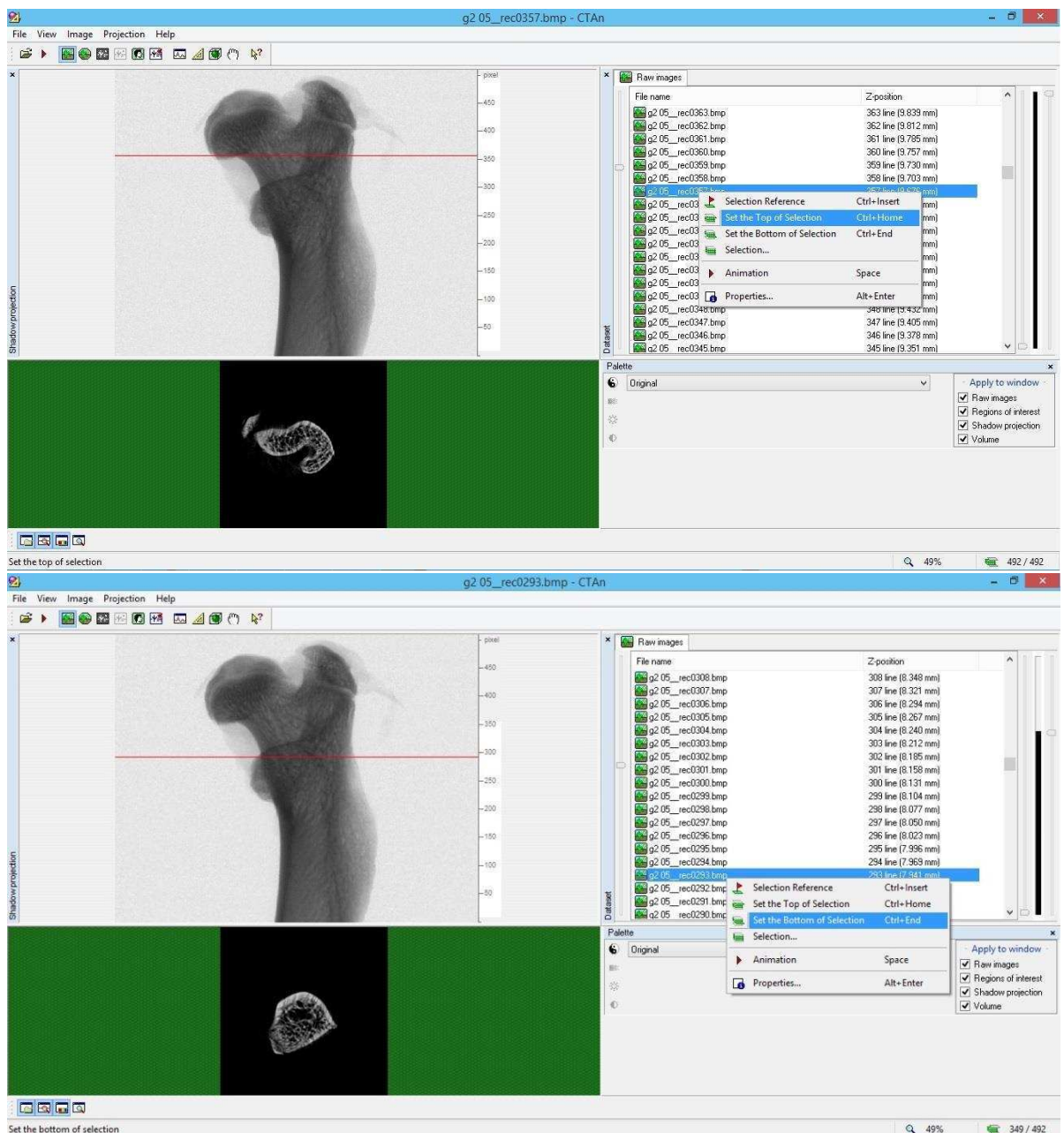


Figura 11 - Imagem do aplicativo CTAn. Selecionando o TOP e BUTTOM para determinação do ROI.

3º) Depois de determinada a área de interesse, por meio da seleção do top e buttom, realiza-se a interpolação dos ROI's (Figura 5), onde unimos todos os slices em uma única estrutura para permitir os cálculos volumétricos da estrutura formada, de acordo com a forma geométrica que definirmos nessa etapa seguindo os seguintes passos:

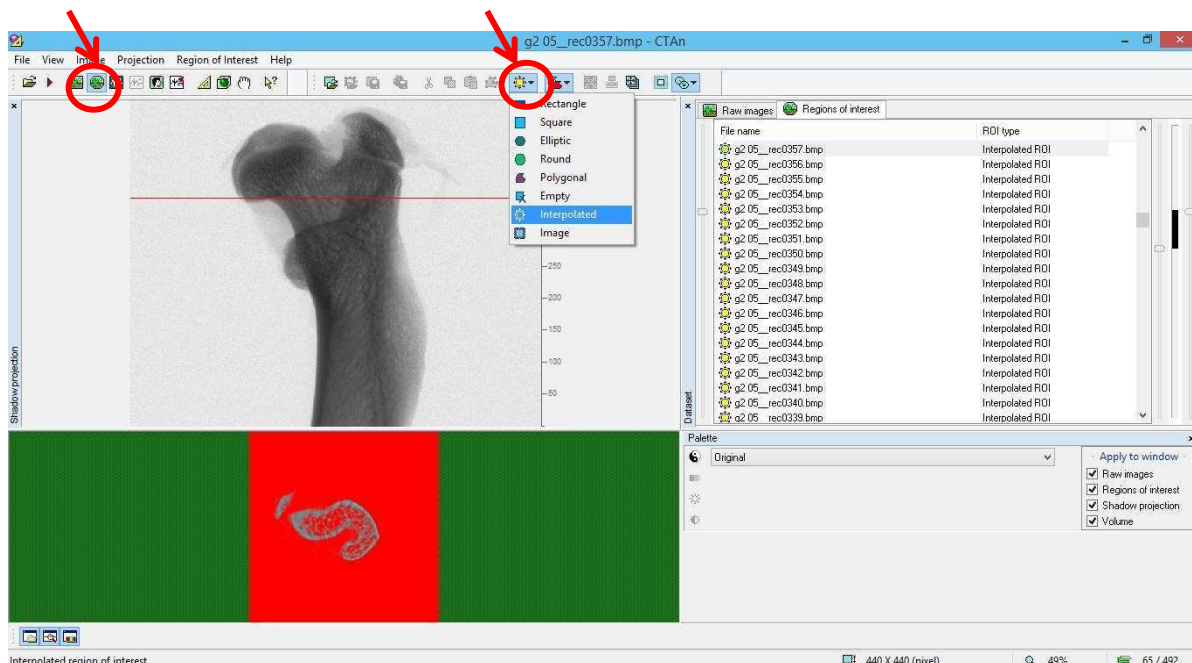


Figura 12 - Escolha da forma geométrica. Direcionamento por meio de estrutura geométrica, delimitada de acordo com o contorno do osso, da região de interesse.

4º) Depois da interpolação dos ROI's, dá-se início ao processamento da imagem para obtenção da média de porosidade para a ROI, e por comparação entre os animais do grupo controle e os animais dos grupos submetidos ao tratamento, inferir a ocorrência ou não da osteoporose nestes animais. Num primeiro momento procedemos a binarização para diferenciar o osso do restante do tecido (Figura 6). O resultado desse processo é uma imagem preta e branca, onde a parte branca corresponde ao tecido ósseo e a fase preta à parte vazia.

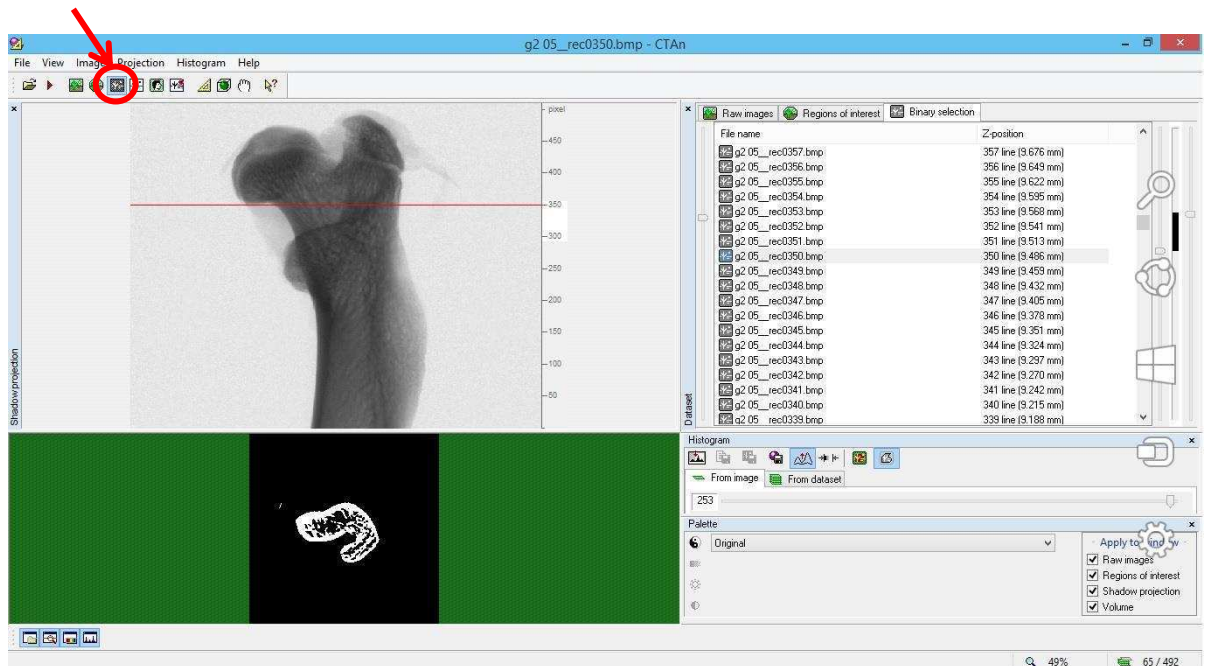


Figura 13 - Imagem da segmentação binária da região de interesse.

5º) Para que os dados fornecidos pelo programa, na fase de processamento da imagem, sejam referentes apenas à região de interesse, seleciona-se “FROM DATASET”, como indicado na Figura 7.

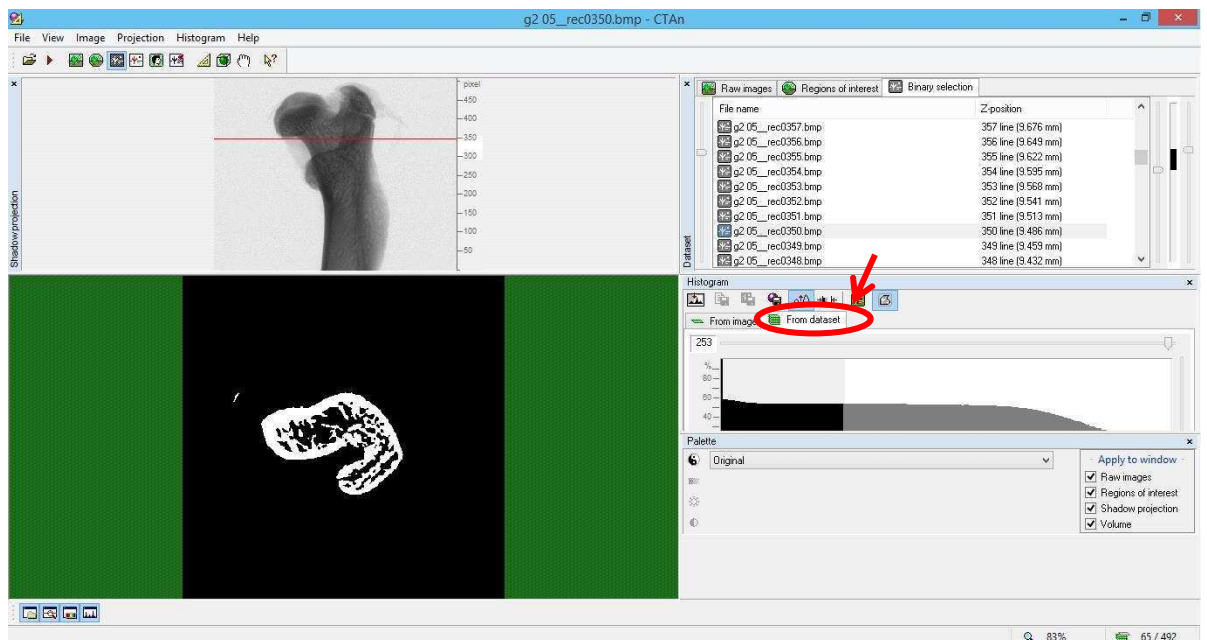


Figura 14 - Direcionar o processamento da imagem para a região de interesse (ROI).

6º) Para finalizar seleciona-se “BONE MINERAL DENSITY”, como indicado na Figura 8.

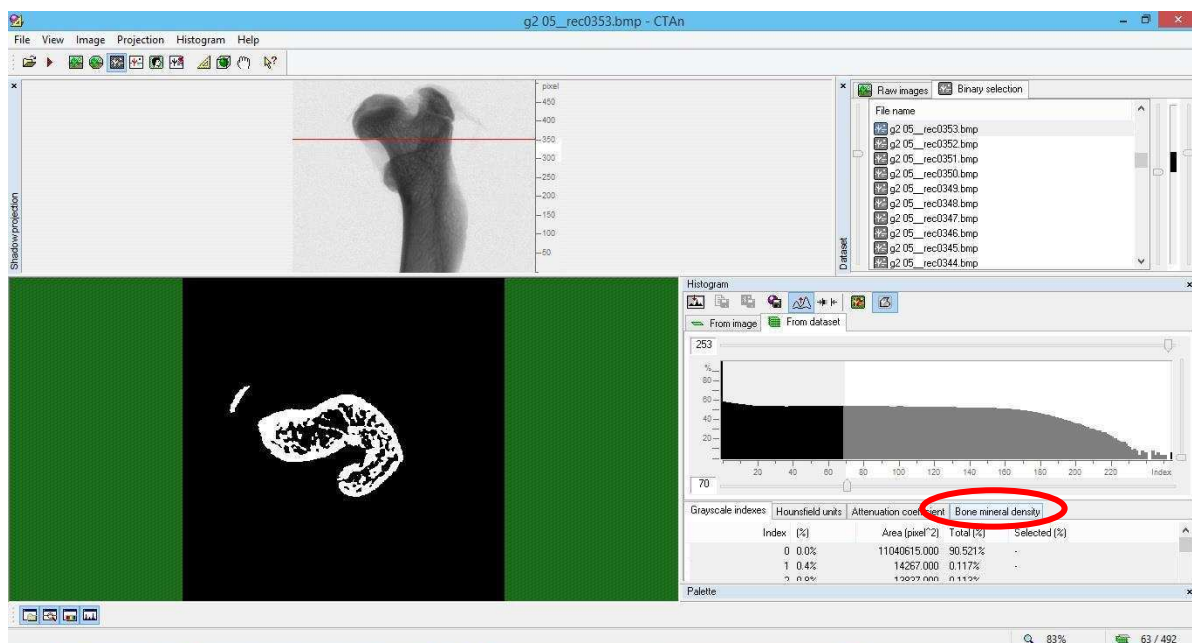


Figura 15 - Processamento final dos dados de porosidade.

O programa fornece o valor da porosidade do osso, baseado na escala de cinza, onde são quantificados os pontos pretos da imagem selecionada, e quanto maior for o valor fornecido, menor a densidade óssea para aquela região de interesse.

Dessa forma, por meio do programa CTAn (Computed Tomography – Analyser), obtivemos os valores de porosidade para a área de trabalho determinada, próxima à região da placa epifisária, região de crescimento ósseo.

Na tabela 5, tem-se a média dos valores de porosidade óssea, fornecidos pelo programa utilizado, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 4 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 5-Média de valores calculados para Porosidade dos ossos (%) de cada grupo, fornecidos pelo microtomógrafo, obtidos com auxílio de programas específicos.

Período	Grupo/ Tratamento	Porosidade (%)	
		Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 4 semanas	G1₁	2,65 b	± 0,104
	G2₁	2,99 a	± 0,112
1 mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₂	2,70 b	± 0,672
	G2₂	2,82 a	± 0,033
2 meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₃	2,91 b	± 0,087
	G2₃	3,06 a	± 0,068

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo tratado com dexametasona por 4 semanas.

Com base na Tabela 5, para os animais que receberam o medicamento dexametasona pelo período de 4 semanas, podemos observar que a maior diferença de porosidade foi observada nos animais avaliados imediatamente após o final do tratamento com a dexametasona, onde para G2₁ observou-se um aumento de 12,83% na porosidade óssea, comparado com o grupo controle de mesma idade G1₁. Um mês após a interrupção do tratamento (G2₂) o aumento da porosidade observada em relação aos grupos controle de mesma idade (G1₂), foi de 4,44%. Valores estes que persistiram no mês seguinte. (G2₃).

Na tabela 6, tem-se a média dos valores de porosidade óssea, fornecidos pelo programa utilizado, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 8 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 6-Média de valores calculados para Porosidade dos ossos (%) de cada grupo, fornecidos pelo microtomógrafo, obtidos com auxílio de programas específicos.

Período	Grupo/ Tratamento	Porosidade (%)	
		Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 8 semanas	G1₂	2,70 b	± 0,672
	G3₁	2,98 a	± 0,016
1 mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₃	2,91 b	± 0,087
	G3₂	3,08 a	± 0,016
2 meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₄	2,96 b	± 0,122
	G3₃	3,11 a	± 0,019

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G3 grupo tratado com dexametasona por 8 semanas.

No que se refere aos animais que receberam o medicamento dexametasona pelo período de 8 semanas, podemos avaliar que a maior diferença de porosidade também foi observada nos animais avaliados imediatamente após o final do tratamento com a dexametasona, onde para G3₁ observou-se um aumento de 10,37% na porosidade óssea, comparado com o grupo controle de mesma idade G1₂. Um mês após a interrupção do tratamento (G3₂) o aumento da porosidade observada em relação aos grupos controle de mesma idade (G1₂), foi de 5,84%. Valores estes que persistiram no mês seguinte. (G2₃).

Analisando os valores das tabelas 5 e 6, pode-se observar, que há, de maneira geral, maior porosidade nos ossos dos animais submetidos ao tratamento com glicocorticoide tanto por 4 quanto por 8 semanas, e mesmo depois de dois meses da interrupção do tratamento, em relação aos grupos controle de mesma idade. Segundo ROSA e colaboradores (2013) a osteoporose é caracterizada pelo aumento da porosidade dos ossos, como resultado da diminuição da densidade óssea. Dessa forma, os resultados dos nossos testes

de microtomografia, serviram para corroborar os resultados obtidos anteriormente, uma vez que na biometria observou-se menor densidade e na biomecânica menor resistência óssea. Conclui-se então que a osteoporose persistiu em todos os animais tratados com dexametasona, independente do tempo de tratamento (por 4 ou 8 semanas), e se compararmos a porcentagem de aumento da porosidade dos animais tratados por 4 semanas, com os animais tratados por 8 semanas, a diferença não é estatisticamente significativa, e mais uma vez podemos concluir então, que para a indução da osteoporose, de forma persistente por até dois meses, basta o tratamento com 7,0mg/Kg de dexametasona por 4 semanas. Corroborando com o observado FERNANDES, 2014, em seu trabalho que buscou avaliar perda óssea em ratos machos, decorrente de periodontite, concluiu que a microtomografia é um método capaz de detectar a perda óssea, não necessitando de estudo histológico para confirmação dos dados. Bem como no trabalho da análise de estrutura óssea de fêmur de rato macho e ossos humanos, feito por microtomografia LIMA et. al., 2009 que concluiu que a microtomografia é uma técnica que pode ser potencialmente utilizada para análise de microestruturas ósseas.

A diferença de porosidade pôde ser constatada não somente pelos valores numéricos fornecidos pelo programa utilizado para o processamento das imagens obtidas na microtomografia, essa diferença pode ser observada ao comparar as imagens como exemplificado nas Figuras 16 e 17.

Na figura 16 consegue-se observar que para os animais tratados com dexametasona por 4 semanas, em comparação com animais do grupo controle de mesma idade, há uma diminuição da cortical óssea, bem como aumento dos poros presentes na estrutura. Estes fatores contribuem para a fragilidade óssea e consequentemente para a diminuição da resistência desse tecido, caracterizando a ocorrência de osteoporose. Além disso, pode-se destacar também uma melhora no quadro da doença quando compara-se a imagem obtida para o animal tratado com a dexametasona por 4 semanas imediatamente após a interrupção do uso da droga com o animal tratado após 2 meses da interrupção do tratamento, onde para este último já é possível notar uma melhora na espessura da cortical óssea, demonstrando o início de regressão do quadro de osteoporose.

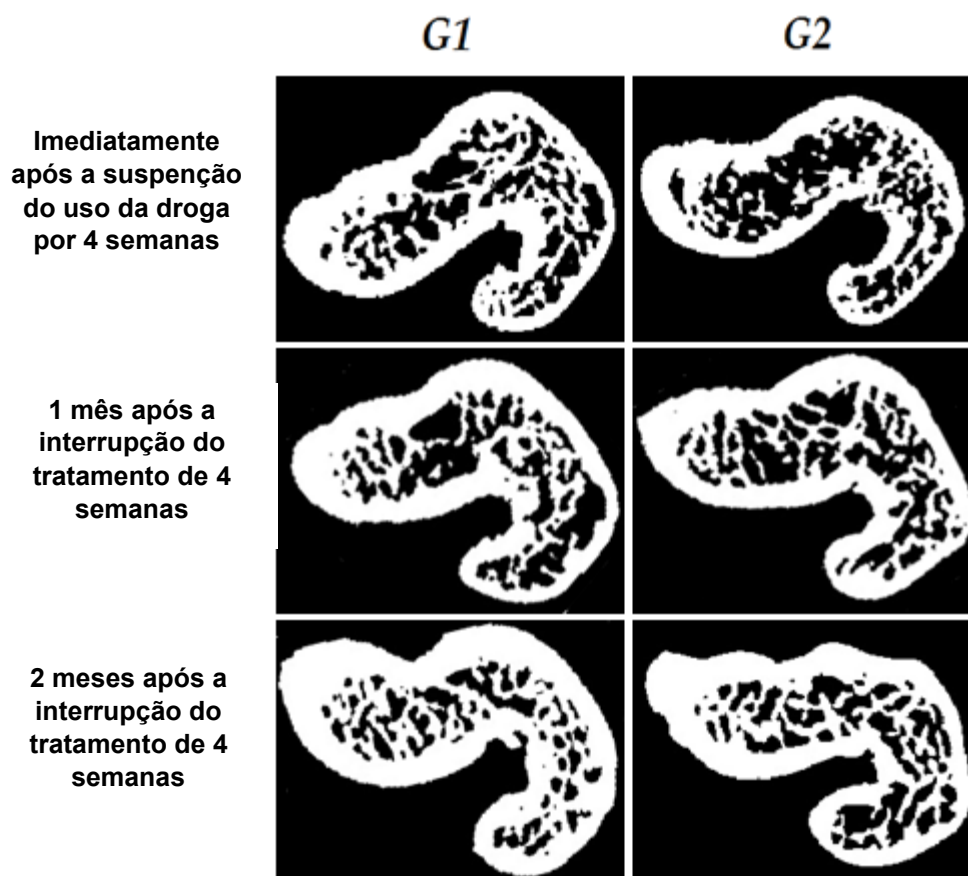


Figura 16 - Imagens de microtomografia do fêmur, produzidas pelo Microtomógrafo SKYSCAN 1174V2. Efeitos da dexametasona nos grupos tratados por 4 semanas (G2), em relação ao grupo controle (G1), nos diferentes períodos de tempo.

Na Figura 17, tem-se um comparativo entre os animais tratados com dexametasona por 8 semanas, imediatamente após a suspensão do uso da droga, 1 mês após a interrupção do tratamento e 2 meses após a interrupção do tratamento, com os animais do grupo controle de idades equivalentes. E da mesma forma que para os animais tratados por 4 semanas, consegue-se observar que para os animais tratados com dexametasona por 8 semanas, em comparação com animais do grupo controle de mesma idade, tem-se uma diminuição expressiva da cortical óssea, bem como aumento da porosidade da estrutura. O que representa uma menor densidade óssea, que tem por consequência o aumento do risco de fraturas e caracteriza a ocorrência da osteoporose nestes animais. Esta diferença entre animais do grupo tratado (G3) e animais do grupo controle, está bem evidente se observarmos as imagens referentes ao animal do grupo controle e animal do grupo tratado por 8 semanas, 1 meses após a interrupção do tratamento onde esta diferença na espessura da cortical e aumento do numero de poros no tecido é notória.

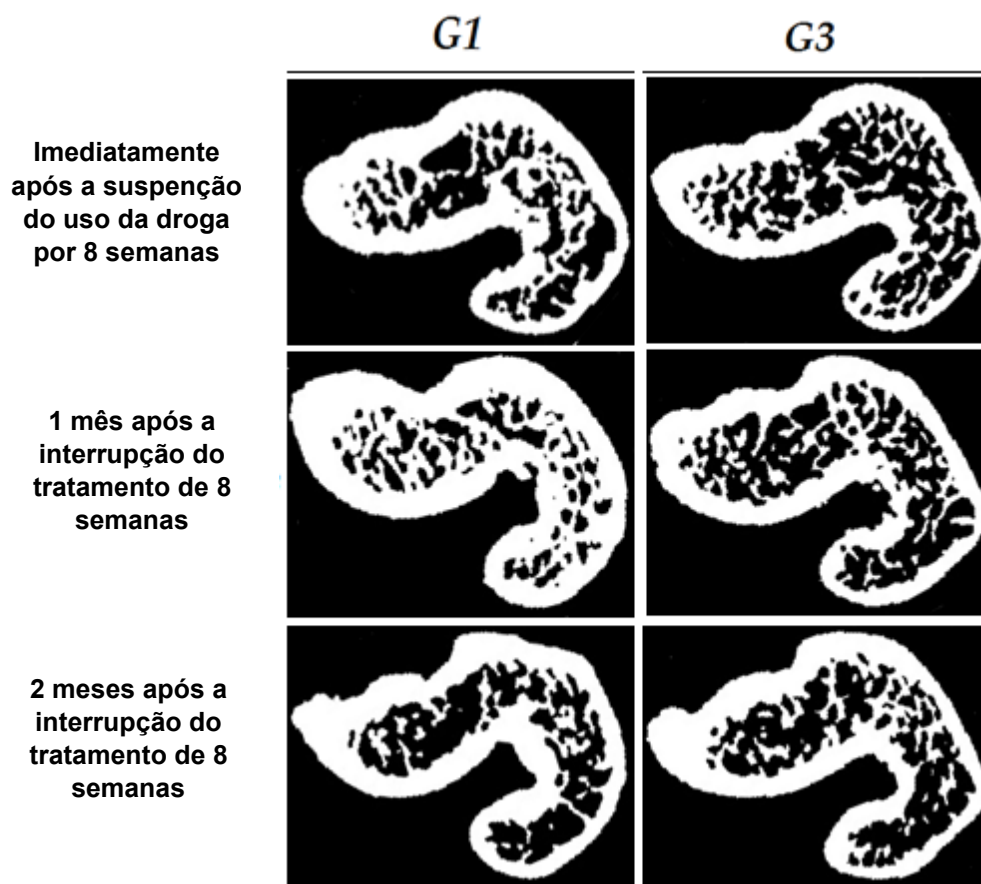


Figura 17- Imagens de microtomografia do fêmur, produzidas pelo Microtomógrafo SKYSCAN 1174V2. Efeitos da dexametasona nos grupos tratados por 8 semanas (G3), em relação ao grupo controle (G1), nos diferentes períodos de tempo.

Com base nos parâmetros analisados anteriormente, por teste de biometria, biomecânica e microtomografia, podemos confirmar que a injeção de 7,0mg/Kg de dexametasona em dose semanal é capaz de induzir a osteoporose em ratos machos e que no tratamento com o medicamento por 4 semanas já se é possível observar efeitos estatisticamente semelhantes aos observados nos animais tratados por 8 semanas com o glicocorticoide, além disso, da mesma forma que foi observado nos animais tratados com dexametasona por 8 semanas, a osteoporose induzida com o tratamento de 4 semanas persistiu após a interrupção do tratamento, não regredindo de forma natural, quadro importante para a futura proposição de tratamentos a doença, não se fazendo necessário estender o período de aplicação da droga por 8 semanas para que se observe essa persistência da doença.

6.3. Parâmetros Sanguíneos

A fim de avaliarmos como o tratamento, prolongado e de doses elevadas, com glicocorticoide agem no organismo masculino, de maneira mais abrangente, tanto em um tratamento de 4 quanto em um tratamento de 8 semanas, realizou-se análises sanguíneas quantificando parâmetros que inferem sobre a saúde do indivíduo. Permitindo que seja observada a diferença de intensidade dos efeitos colaterais de acordo com o tempo a que os animais ficaram expostos a dexametasona. E, além disso, com base neste estudo dos efeitos colaterais da dexametasona no organismo, pode-se propor uma metodologia de indução da osteoporose em que seja possível observar a ocorrência da doença de forma prolongada, porém com o menor número de efeitos colaterais adjacentes, ou pelo menos, efeitos colaterais mais brandos. Uma vez que estes efeitos podem interferir na proposta de tratamento, prejudicando os resultados.

6.3.1. Cálcio, Vitamina D, Sódio, Potássio, Magnésio e Fósforo

Nas tabelas 7 e 8 podemos observar os valores para os parâmetros sanguíneos relacionados ao tecido ósseo, cálcio e vitamina D, para os animais tratados com dexametasona por 4 e 8 semanas, respectivamente.

Quando analisamos os valores dos níveis séricos de vitamina D, para o grupo tratado com dexametasona por 4 semanas (Tabela 7), tanto imediatamente após a interrupção do tratamento, quanto depois de 1 e 2 meses da interrupção do uso da dexametasona, observa-se que os valores foram inferiores, em relação aos grupos controle de mesma idade.

Tabela 7- Níveis séricos de Cálcio (mg/dL) e Vitamina D (ng/mL), para animais tratados com dexametasona por 4 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Vitamina D (ng/mL)		Cálcio (mg/dL)	
		Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 4 semanas	G1₁	57,14 a	± 15,04	11,10 a	± 0,502
	G2₁	18,58 b	± 3,889	10,95 a	± 0,583
1 mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₂	50,07 a	± 5,078	10,62 a	± 0,341
	G2₂	15,39 b	± 1,847	10,97 a	± 0,1612
2 meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₃	31,33 a	± 2,101	10,948 a	± 0,4125
	G2₃	25,37 b	± 5,017	10,763 a	± 0,5158

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo tratado com dexametasona por 4 semanas.

Para estes animais, imediatamente após a interrupção do tratamento (G2₁) a diminuição nos níveis de vitamina D foi de 67,48%, quando comparado ao controle de mesma idade (G1₁). Para estes mesmos animais, um mês depois da interrupção do tratamento (G2₂) observou-se uma redução de 69,26% em relação ao controle de mesma idade (G1₂). A menor diferença dos níveis de vitamina D para os animais tratados por 4 semanas, em relação ao controle de mesma idade (G1₃), foi de 19,02% observada no G2₃, indicando uma possível recuperação do nível da vitamina D, atingindo níveis compatíveis com a normalidade, a partir desse momento.

Em relação aos níveis séricos de cálcio, não foram observadas diferenças significativas entre os animais que fizeram uso da dexametasona por 4 semanas e os animais dos grupos controles de mesma idade. Tal fato pode ser justificado pelo fato de que o cálcio possui um mecanismo regulatório da homeostase muito preciso, logo, qualquer alteração é prontamente corrigida, não sendo possíveis assim, variações significativas nos níveis plasmáticos deste íon.

Em relação ao grupo tratado com dexametasona por 8 semanas (Tabela 8), observa-se diminuição nos níveis de vitamina D apenas quando se analisa os animais imediatamente após o final do tratamento, nos períodos avaliados posteriormente observa-se aumento destes níveis.

Tabela 8- Níveis séricos de Cálcio (mg/dL) e Vitamina D (ng/dL), para animais tratados com dexametasona por 8 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Vitamina D (ng/mL)		Cálcio (mg/dL)	
		Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 8 semanas	G1₂	50,07 a	$\pm 5,078$	10,62 a	$\pm 0,341$
	G3₁	30,61 b	$\pm 3,113$	10,89 a	$\pm 0,4851$
1 mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₃	31,33 a	$\pm 2,101$	10,948 a	$\pm 0,4125$
	G3₂	47,26 b	$\pm 7,504$	10,603 a	$\pm 0,1181$
2 meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₄	28,05 a	$\pm 0,902$	10,52 a	$\pm 0,636$
	G3₃	49,66 b	$\pm 5,429$	10,54 a	$\pm 0,540$

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G3 grupo tratado com dexametasona por 8 semanas

Avaliando os valores da tabela 8, pode-se observar que imediatamente após a suspensão do tratamento com dexametasona, para os animais tratados por 8 semanas, uma redução de 38,86% quando comparados ao grupo controle de mesma idade (G1₂). Para G3₂, referente aos animais avaliados após um mês da interrupção do tratamento de 8 semanas, observa-se aumento de 50,84% nos níveis de vitamina D, quando comparados ao controle de mesma idade (G1₃), e para os animais avaliados dois meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas, observou-se também aumento nos níveis de vitamina D, chegando a 77,04% quando comparados com grupo controle de mesma idade (G1₄).

Para os níveis de cálcio, de forma semelhante ao observado para os animais tratados com dexametasona por 4 semanas, não observou-se diferenças significativas nos valores obtidos para os animais tratados em relação aos grupos controle de mesma idade.

Embora a vitamina D exerça diversos papéis no metabolismo, sua principal função está relacionada a regulação da fisiologia osteomineral, de maneira especial, do metabolismo do cálcio. Os baixos níveis de vitamina D observados, contribuem para a perda da qualidade óssea, e por consequência para a ocorrência da osteoporose, uma vez que tem por função auxiliar a absorção de cálcio pelo intestino e pelos rins, portanto espera-se que durante a osteoporose os níveis de vitamina D estejam mais baixos quando comparados ao controle (CASTRO, 2011). Além do papel no metabolismo do cálcio, a vitamina D exerce outras funções importantes, como na proliferação e diferenciação celular, no sistema neuromuscular, regulação da pressão arterial e no sistema imune, onde baixos níveis de vitamina D estão relacionados a prevalência de algumas doenças autoimunes como diabetes mellitus insulina-dependente, esclerose múltipla, artrite reumatoide, lúpus eritematoso e doença inflamatória intestinal (PETERS e MARTINI, 2014).

De forma semelhante aos íons cálcio, também não foram observadas diferença significativa nos níveis de íons, fósforo, magnésio, potássio e sódio, em relação ao grupo controle, para nenhum dos dois tratamentos e em nenhum dos tempos avaliados.

Corroborando com este resultado, tem-se o trabalho de CECCHETTIN e colaboradores (1995), onde trabalhando com ratas com osteoporose pós menopausa, os autores observaram que durante a doença não houveram alterações nos níveis séricos destes íons. FERREIRA JUNIOR (2016), trabalhando com ratas com osteoporose induzida por dexametasona pelo período de 4 semanas, também não observou diferença significativa nos níveis de cálcio e fósforo para os animais tratados com o medicamento, em relação ao grupo controle.

Dessa forma, levando em conta que em um modelo experimental para o estudo de tratamentos para osteoporose induzida por glicocorticoides em ratos macho, necessita que haja o menor número de efeitos colaterais adjacentes possíveis, em relação aos níveis de vitamina D, o mais indicado seria a indução

por 8 semanas e iniciar os testes com novos tratamentos um mês após a suspensão da dexametasona,

6.3.2. Cortisol

Por meio da dosagem de cortisol, pode-se observar que imediatamente após a interrupção dos tratamentos com o glicocorticoide exógeno dexametasona, tanto para o grupo tratado por 4 semanas (G2₁), quanto para o grupo tratado por 8 semanas (G3₁).

Na tabela 9, tem-se a média dos valores dos níveis de cortisol endógeno, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 4 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 9- Níveis séricos de Cortisol Endógeno (ng/mL), para animais tratados com dexametasona por 4 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Cortisol (ng/mL)	
		Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 4 semanas	G1₁	6,93 a	± 0,573
	G2₁	1,39 b	± 0,047
1 mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₂	6,18 a	± 1,509
	G2₂	1,36 b	± 0,053
2 meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₃	2,88 a	± 0,682
	G2₃	3,02 a	± 1,459

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo tratado com dexametasona por 4 semanas.

Avaliando os dados disponíveis na tabela 9, podemos observar que os níveis de cortisol endógeno para os animais que receberam o tratamento com dexametasona por 4 semanas, foram estatisticamente menores durante todo período de observação. Imediatamente após a suspensão do uso da dexametasona a redução, em relação ao grupo controle de mesma idade, foi de 79,94%. Esse fenômeno provavelmente foi uma consequência do feedback negativo ocasionado pela administração do glicocorticoide exógeno, que gerou uma elevada concentração de cortisol no sangue inibindo a secreção de CRH e consequentemente a liberação de ACTH, hormônio que estimula a produção do cortisol endógeno. Para G2₂, referente aos animais tratados por 4 semanas e avaliados após um mês da interrupção do tratamento, essa diminuição nos níveis do cortisol persistiu, em relação ao grupo G2₁, com redução de 77,99% quando comparado com o grupo controle de mesma idade (G1₂), e no caso dos animais tratados também por 4 semanas mas avaliados após dois meses do final do tratamento (G2₃), os valores atingiram a normalidade quando comparados com o grupo controle de mesma idade (G1₃). De forma semelhante ao observado para o os animais tratados por 4 semanas com dexametasona, PAULI et. al., 2005 observou em seu trabalho, que o uso crônico, de 10 semanas, de dexametasona por ratos wistar jovens, interferiu no eixo hipotálamo-hipófise alterando os níveis de ACTH, responsável por estimular a produção de cortisol, gerando diminuição na produção deste hormônio. Ademais ROMANHOLI e SALGADO, 2007 afirmam que os glicocorticoides exógenos atuam no eixo hipotálamo-hipófise, suprimindo a produção de ACTH por feedback negativo, gerando, por consequência, diminuição dos níveis de cortisol endógeno.

Na tabela 10, tem-se a média dos valores dos níveis de cortisol endógeno, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 8 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 10- Níveis séricos de Cortisol Endógeno (ng/mL), para animais tratados com dexametasona por 8 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Cortisol (ng/mL)	
		Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 8 semanas	G1₂	6,18 a	± 1,509
	G3₁	3,93 b	± 1,101
1 mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₃	2,88 a	± 0,682
	G3₂	5,03 b	± 1,504
2 meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₄	1,78 a	± 0,290
	G3₃	5,14 b	± 1,481

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G3 grupo tratado com dexametasona por 8 semanas.

Analizando a tabela 10, para os animais tratados com dexametasona por 8 semanas, pode-se observar redução de -36,4% nos níveis de cortisol, para os animais avaliados imediatamente após a suspensão do uso da dexametasona, em relação ao grupo controle de mesma idade. Porém, diferente do observado para os animais tratados por 4 semana, em que os níveis de cortisol se mantiveram inferiores em relação ao grupo controle, para os animais tratados com dexametasona pelo período de 8 semanas, avaliados um mês após a interrupção do tratamento com glicocorticoide (G3₂), observa-se que os níveis de cortisol tiveram um aumento em relação ao grupo controle de mesma idade (G1₃) de 74,65% caracterizando uma super produção de cortisol endógeno, decorrente da suspensão abrupta do medicamento. Essa super produção persistiu para os animais avaliados dois meses após a suspensão da administração do medicamento (G3₃) e observou-se um aumento de 188,76% dos níveis de cortisol, quando comparado ao grupo controle de mesma idade (G1₄). Esta condição de hipercortisolismo, pós corticoterapia, à semelhança com o início da

Síndrome de Cushing iatrogênica ACTH independente, são observadas diversas alterações do metabolismo. Além da perda óssea, há aumento da pressão arterial, intolerância a glicose, depressão, dificuldades cognitivas, fraqueza muscular, disfunção erétil, diminuição da fertilidade e libido (NEWELL-PRICE et. al., 2006 e CASTRO e MOREIRA, 2002). Dessa forma, o ideal para um modelo experimental de osteoporose induzida por dexametasona em ratos machos, é que seja possível observar a ocorrência da osteoporose, porém sem que se observe de forma adjacente o possível aparecimento da Síndrome de Cushing. Sendo assim, a fim de estudar a indução da osteoporose sem os efeitos da Síndrome de Cushing, o tratamento por 4 semanas é o mais adequado, iniciando o teste do tratamento para osteoporose nestes animais entre os períodos de um e dois meses após a suspensão do tratamento com dexametasona, pois nesse período foi possível observar que os níveis de cortisol endógeno foram compatíveis com os do grupo controle de mesma idade

Observar sinais que indicam uma possível ocorrência da Síndrome de Cushing nos animais submetidos ao tratamento por 8 semanas, foi importante, pois serviram como parâmetro para afirmarmos que para os animais submetidos ao tratamento por 4 semanas mesmo após sofrerem a interrupção abrupta do tratamento, não tem-se este mesmo comportamento de aumento abrupto dos níveis de cortisol, à semelhança da Síndrome de Cushing.

Segundo CASTRO e MOREIRA (2002), a primeira fase de um diagnóstico de Síndrome de Cushing é a observação do hipercortisolismo, onde os níveis de cortisol endógeno se encontram elevados, sendo este um dos efeitos colaterais da síndrome de retirada que se instala nos animais que não sofrem desmame do medicamento.

6.3.3. Glicose e Insulina

Considerando que os glicocorticoides atuam no metabolismo de carboidratos, reduzindo a captação e utilização da glicose sanguínea, um aumento nos níveis de glicose poderia ser observado nos animais submetidos ao tratamento com a dexametasona. Entretanto é possível observar que os níveis de glicose se mantiveram normais em todos os animais que receberam o medicamento tanto por 4 quanto por 8 semanas, quando comparados aos grupos controle de mesma

idade. Tal fato pode ser justificado pelo aumento dos níveis de insulina de jejum observados.

Na tabela 11, tem-se a média dos valores dos níveis de glicose, insulina e índice HOMA-IR, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 4 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 11- Níveis séricos de Glicose (mg/dL), Insulina (μ UI/mL), e Índice HOMA-IR, para os animais tratados com dexametasona por 4 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Glicose (mg/dL)		Insulina (μ UI/mL)		Índice HOMA-IR	
		Valor	Σ	Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 4 semanas	G1₁	186,4 a	$\pm$ 80,28	0,29 a	$\pm$ 0,026	0,13 b	$\pm$ 0,059
	G2₁	202,8 a	$\pm$ 29,52	0,55 b	$\pm$ 0,068	0,27 a	$\pm$ 0,054
1 mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₂	242,2 a	$\pm$ 43,6	0,22 a	$\pm$ 0,028	0,13 b	$\pm$ 0,026
	G2₂	191,6 a	$\pm$ 58,57	0,59 b	$\pm$ 0,081	0,28 a	$\pm$ 0,112
2 meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₃	254,6 a	$\pm$ 10,65	0,31 a	$\pm$ 0,047	0,19 a	$\pm$ 0,024
	G2₃	190,67 _b	$\pm$ 27,61	0,39 a	$\pm$ 0,104	0,18 a	$\pm$ 0,069

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo tratado com dexametasona por 4 semanas.

Quando avaliados imediatamente após o termino dos tratamentos, os animais que receberam o tratamento por 4 semanas (G2₁), demonstraram um aumento de 89,7% nos níveis de insulina em relação aos animais controle de mesma idade (G1₁). Este quadro caracteriza a ocorrência de resistência à insulina por compensação, comprovada pelo índice HOMA-IR que tem por função avaliar a resistência a insulina. O aumento observado no índice HOMA-IR para estes animais (G2₁), foi de 107,7%, quando comparados ao grupo controle de mesma idade (G1₁). O quadro de resistência a insulina persistiu no mês seguinte após a interrupção do tratamento (G2₂), onde o aumento de insulina foi de 168,2% comparado com o controle de mesma idade G1₂ o que resultou em um aumento de 115,4% no índice HOMA-IR, também comparado como controle de mesma idade. Com dois meses do termino da administração da dexametasona (G2₃), os

valores tanto dos níveis de insulina quanto do índice HOMA-IR atingiram a normalidade, quando comparados ao controle de mesma idade (G1₃).

Se a produção de insulina destes animais submetidos aos tratamentos com dexametasona, que apresentaram quadro de resistência a insulina e que apresentaram alterações no índice HOMA, tivessem se mantido em níveis estatisticamente equivalentes aos grupos controle de mesma idade, não seria possível atingir a homeostase da glicose sanguínea e provavelmente haveria aumento nos níveis séricos de glicose, nestes animais. O aumento de glicose ocorreria uma vez que os glicocorticoides atuam reduzindo a captação de glicose sanguínea, reduzem também a utilização da glicose, e, além disso, estimulam a gliconeogênese (PINHEIRO, et al, 2009).

Para os animais que receberam o tratamento por 8 semanas, a alteração nos níveis de insulina, bem como no índice HOMA-IR persistiu por todo o período de observação. Na tabela 12, tem-se a média dos valores dos níveis de glicose, insulina e índice HOMA-IR, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 8 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 12- Níveis séricos de Glicose (mg/dL), Insulina (μUI/mL), e Índice HOMA-IR, para os animais tratados com dexametasona por 8 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Glicose (mg/dL)		Insulina (μUI/mL)		Índice HOMA-IR	
		Valor	Σ	Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 8 semanas	G1₂	242,2 a	± 43,6	0,22 a	± 0,028	0,13 b	± 0,026
	G3₁	218,5 a	± 23,02	0,33 b	± 0,030	0,17 a	± 0,021
1 mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₃	254,6 a	± 10,65	0,31 a	± 0,047	0,19 a	± 0,024
	G3₂	194 b	± 42,28	0,26 a	± 0,091	0,13 a	± 0,072
2 meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₄	257 a	± 47,76	0,33 a	± 0,059	0,20 a	± 0,046
	G3₃	248,6 a	± 70,31	0,19 b	± 0,015	0,12 b	± 0,035

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G3 grupo tratado com dexametasona por 8 semanas.

Avaliando os dados da tabela 12, observa-se que imediatamente após a suspensão do tratamento com dexametasona (G3₁) houve aumento de 50% nos níveis de insulina, em relação ao grupo controle de mesma idade (G1₂), o que resultou em um aumento de 30,8% no índice HOMA-IR destes animais, também comparado com o controle de mesma idade.

Para os animais que receberam o tratamento por 8 semanas e avaliados depois de um mês do término da administração do medicamento, observou-se redução de 16% nos níveis de insulina, e de 31,5% no índice HOMA-IR, quando comparados ao grupo controle de mesma idade, e finalmente depois de dois meses da suspensão do tratamento, observa-se diminuição de 42,42% nos níveis de insulina, e de 40% no índice HOMA-IR. Essa redução tanto nos níveis de insulina, quanto no Índice HOMA-IR, poderia representar um indício do início do aparecimento de diabetes, uma vez que a diabetes tipo 2 é caracterizada pela produção insuficiente de insulina, pelo pâncreas (GROSS et. al., 2002), porém deveria ser acompanhado de um aumento nos níveis de glicose sanguínea, o que nesse período ainda não pôde ser observado.

Para um modelo experimental ideal de estudo da osteoporose, o animal não deveria apresentar nenhuma doença adjacente, como no caso da diabetes. Logo, o mais indicado seria utilizar o modelo de indução da osteoporose de 4 semanas de tratamento com dexametasona, iniciando o teste do tratamento para osteoporose nos animais entre os períodos de um e dois meses após a suspensão do tratamento com dexametasona, pois foi nesse período que os níveis de insulina destes animais se regularizaram.

Segundo OLIVEIRA, 2004, este mesmo quadro, onde os níveis de glicose se mantêm normais e os níveis de insulina são elevados, é observado nos estágios iniciais da diabetes em indivíduos obesos.

Em ratos machos tratados com dexametasona por cinco dias na dosagem de 1mg/kg, PROTZEK, et. al., 2016, observou desequilíbrio na homeostase da glicose, e verificou aumento da resistência a insulina.

6.3.4. Fosfatase Alcalina Óssea

Na dosagem de fosfatase alcalina óssea, pode-se observar que ao final do tratamento tanto de 4 quanto de 8 semanas (G2₁ e G3₁) e um mês após o a

suspensão do uso do medicamento nos dois tratamentos (G2₂ e G3₂), observou-se um aumento dos níveis de fosfatase alcalina total, porém não podemos utilizar este parâmetro para inferir sobre danos no tecido ósseo, uma vez que este indicador engloba as variáveis relativas a diversos tecidos e não somente referente ao tecido ósseo. Para avaliarmos sobre o osso de forma específica temos a isoenzima fosfatase alcalina óssea que nos diz especificamente sobre a atividade osteoblástica e consequentemente sobre a formação óssea.

Na tabela 13, tem-se a média dos valores dos níveis fosfatase alcalina total, que como já foi dito não nos fornece dados sobre a qualidade óssea, não servindo de parâmetro para o diagnóstico da osteoporose; e fosfatase alcalina óssea, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 4 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 13- Níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (U/L) e Fosfatase Alcalina Óssea (µg/L), para animais tratados com dexametasona por 4 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Fosfatase Alcalina (U/L)		Fosfatase Alcalina Óssea (µg/L)	
		Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 4 semanas	G1₁	117,25 a	± 11,7	0,10 a	± 0,079
	G2₁	144,75 b	± 17,7	0,19 b	± 0,019
1 mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₂	73,00 a	± 4,58	0,06 a	± 0,006
	G2₂	103,80 b	± 20,4	0,23 b	± 0,101
2 meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1₃	76,80 a	± 10,4	0,12 a	± 0,021
	G2₃	85,00 a	± 16,9	0,08 a	± 0,051

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo tratado com dexametasona por 4 semanas.

A partir da dosagem da fosfatase alcalina óssea, pode-se observar, avaliando os dados da tabela 13, que para os animais que receberam tratamento por 4 semanas com dexametasona houve um aumento de 90% dos níveis dessa isoenzima, imediatamente após a suspensão do tratamento ($G2_1$) quando comparado ao grupo controle de mesma idade ($G1_1$) e observa-se também, aumento de 283,3% um mês após a interrupção do tratamento ($G2_2$) se comparado ao controle de mesmo tempo ($G1_2$), nos animais tratados com dexametasona por 4 semanas, avaliados depois de dois meses do fim da administração do medicamento ($G2_3$), não foi observada diferença estatística na dosagem da fosfatase alcalina óssea, se comparada ao controle de mesma idade ($G1_3$). A fosfatase alcalina óssea está diretamente relacionada com a atividade dos osteoblastos, o aumento desta atividade pode ser observada em doença óssea, uma vez que como forma de compensar o aumento da reabsorção há o aumento da formação óssea (VIEIRA, 1999).

Na tabela 14, tem-se a média dos valores dos níveis fosfatase alcalina total, e fosfatase alcalina óssea, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 8 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 14- Níveis séricos de Fosfatase Alcalina Total (U/L) e Fosfatase Alcalina Óssea (µg/L), para animais tratados com dexametasona por 8 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Fosfatase Alcalina (U/L)		Fosfatase Alcalina Óssea (µg/L)	
		Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 8 semanas	G1₂	73,00 a	± 4,58	0,06 a	± 0,006
	G3₁	105,80 b	± 23,5	0,08 b	± 0,008
1 mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₃	76,80 a	± 10,4	0,12 a	± 0,021
	G3₂	94,40 b	± 10,4	0,09 b	± 0,006
2 meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1₄	79,75 a	± 15,4	0,14 a	± 0,024
	G3₃	81,25 a	± 14,1	0,07 b	± 0,006

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G3 grupo tratado com dexametasona por 8 semanas.

No caso dos animais que receberam injeções semanais de dexametasona por 8 semanas, observa-se de forma semelhante aos animais tratados com dexametasona por 4 semanas, um aumento nos níveis de fosfatase alcalina óssea imediatamente após o fim do tratamento (G3₁) de 33,3%, quando comparado ao grupo controle de mesma idade (G1₂), porém nos meses seguintes, foi possível notar uma queda nestes valores chegando a 25% para G3₂ correspondente aos animais tratados por 8 semanas avaliados um mês após a suspensão do tratamento e de 50% para G3₃ referente aos animais avaliados após 2 meses da suspensão do tratamento, quando comparados com os grupos controle de mesma idade (G1₃ e G1₄, respectivamente). Esta queda nos níveis da fosfatase alcalina óssea se dá em decorrência da ação do glicocorticoide nos osteoblastos, diminuindo a quantidade e atividade destas células. Em trabalho semelhante, PINTO, 2004, avaliando ratas osteoporóticas não observou alterações estatisticamente significantes nos níveis de fosfatase alcalina total e fosfatase alcalina óssea, para os animais tratados com dexametasona em relação ao controle. Já FERREIRA JUNIOR (2016),

observando a indução de osteoporose com dexametasona em ratas, observou que os valores de fosfatase alcalina óssea, para os animais que receberam o tratamento com dexametasona, foram inferiores ao grupo controle.

De acordo com esse parâmetro, conclui-se que para um modelo experimental ideal de estudo da osteoporose, o mais indicado seria utilizar o modelo de indução da osteoporose de 4 semanas de tratamento com dexametasona, iniciando o teste do tratamento para osteoporose nos animais entre os períodos de um e dois meses após a suspensão do tratamento com dexametasona, pois foi nesse período que os níveis de fosfatase alcalina óssea destes animais se regularizaram.

6.3.5. Testosterona

Os níveis de testosterona, dos animais que passaram pelo tratamento com dexametasona, de uma maneira geral, sofreram uma grande diminuição independente do tempo de tratamento ser de 4 ou 8 semanas, sugerindo a ocorrência de hipogonadismo, fator que contribui para o aparecimento da osteoporose, uma vez que a testosterona está relacionada ao crescimento ósseo, agindo sobre os osteoblastos estimulando a formação óssea (AMADEI,2006) .

Na tabela 15, tem-se a média dos valores dos níveis de testosterona, do Índice Gonadossomático (%) e Contagem de células de Leydig, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 4 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 15- Níveis séricos de Testosterona (ng/mL). Índice Gonadossomático (%) e Contagem de Células de Leydig, para os animais tratados com dexametasona por 4 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Testosterona (ng/mL)		Índice Gonadossomático (%)		Células de Leydig	
		Valor	Σ	Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 4 semanas	G1 ₁	116,68 a	± 3,934	1,031 b	± 0,112	77,50 a	±1,87
	G2 ₁	0,71 b	± 0,136	1,273 a	± 0,131	67,79 a	± 7,75
1 mês após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1 ₂	121,81 a	± 2,065	0,848 b	± 0,091	73,8 a	± 3,86
	G2 ₂	0,81 b	± 0,143	0,996 a	± 0,053	65,99 a	± 5,46
2 meses após a interrupção do tratamento de 4 semanas	G1 ₃	83,62 a	± 16,601	0,751 b	± 0,048	78,6 a	± 4,89
	G2 ₃	1,87 b	± 0,616	0,818 b	± 0,062	69,3 a	± 10,07

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo tratado com dexametasona por 4 semanas.

Imediatamente após a suspensão dos tratamentos os valores de testosterona tiveram uma redução de 99,39% para os animais que foram submetidos ao tratamento por 4 semanas com dexametasona (G2₁) quando comparados aos controles de mesma idade, G1₁. Depois de um mês que o tratamento havia sido interrompido (G2₂), a redução observada foi de 99,33% também quando comparados aos controles de mesma idade G1₂. E finalmente dois meses após o final da administração da droga, observou-se redução de 97,76% para os animais que foram submetidos ao tratamento por 4 semanas com dexametasona (G2₃), quando comparados aos controles de mesma idade G1₃.

Avaliando os valores calculados do índice de funcionalidade das gônadas (Índice Gonadossomático) pode-se observar que para os animais que receberam tratamento por 4 semanas, houve um aumento de 23,47% no índice gonadossomático, imediatamente após a suspensão do tratamento (G2₁) quando comparado ao grupo controle de mesma idade (G1₁) e aumento de 17,45% no mês seguinte ao término do tratamento (G2₂) se comparado ao controle de mesmo tempo (G1₂), nos animais tratados com dexametasona por

4 semanas, avaliados depois de dois meses do fim da administração do medicamento (G2₃), não foi observada diferença estatística para o índice em questão, se comparada ao controle de mesma idade (G1₃).

Na tabela 16, tem-se a média dos valores dos níveis de testosterona, do Índice Gonadossomático (%) e Contagem de células de Leydig, para os animais submetidos ao tratamento com dexametasona por 8 semanas imediatamente após a interrupção da administração da droga e por até dois meses após a suspensão do uso do medicamento.

Tabela 16- Níveis séricos de Testosterona (ng/mL). Índice Gonadossomático (%) e Contagem de Células de Leydig, para os animais tratados com dexametasona por 8 semanas.

Período	Grupo/ Tratamento	Testosterona (ng/mL)		Índice Gonadossomático (%)		Células de Leydig	
		Valor	Σ	Valor	Σ	Valor	Σ
Imediatamente após a suspensão do uso da droga por 8 semanas	G1 ₂	121,81 a	± 2,065	0,848 b	± 0,091	73,8 a	± 3,86
	G3 ₁	1,55 b	± 0,049	1,153 a	± 0,136	61,91 b	± 6,65
1 mês após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1 ₃	83,62 a	± 16,601	0,751 b	± 0,048	78,6 a	± 4,89
	G3 ₂	2,03 b	± 0,757	0,929 a	± 0,074	74,03 a	± 3,54
2 meses após a interrupção do tratamento de 8 semanas	G1 ₄	62,82 a	± 2,408	0,734 a	± 0,102	78,83 a	± 7,19
	G3 ₃	2,34 b	± 0,668	0,816 a	± 0,073	78,99 a	± 4,49

Em cada período, médias seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G3 grupo tratado com dexametasona por 8 semanas.

Avaliando os dados da tabela 16, podemos observar que Imediatamente após a suspensão dos tratamentos os valores de testosterona tiveram uma redução de 98,73% para os animais que foram submetidos ao tratamento por 8 semanas com dexametasona (G3₁) quando comparados aos controles de mesma idade, G1₂. Depois de um mês que o tratamento havia sido interrompido (G3₂), a redução observada foi de 97,57% também quando comparados aos controles de mesma idade G1₃. E finalmente dois meses após o final da administração da droga, observou-se redução de 96,27% para os

animais que foram submetidos ao tratamento por 8 semanas com dexametasona (G3₃), quando comparados aos controles de mesma idade G1₄.

Além disso, observa-se também uma queda nos valores calculados para o Índice Gonadossomático, chegando a 23,70% para G3₂ correspondente aos animais tratados por 8 semanas avaliados um mês após a suspensão do tratamento e para G3₃ referente aos animais avaliados após 2 meses da suspensão do tratamento, não foi observada diferença estatística, quando comparados com os grupos controle de mesma idade (G1₃ e G1₄, respectivamente). A possível causa para o quadro é a ocorrência de uma hipertrofia, onde há aumento de tamanho e do volume das células, sem que haja aumento do número delas, para tentar compensar a baixa produção hormonal.

. Com base nestes resultados, pode-se observar que não houve diferença estatística, nos níveis de testosterona, de um período para outro dentro de um mesmo grupo (grupo tratado por 4 semanas ou grupo tratado por 8 semanas), bem como não foram valores estatisticamente diferente se comparados entre os grupos tratados. Dessa forma, a intensidade do efeito colateral observado em animais submetidos a 4 semanas de tratamento foi equivalente a intensidade observada nos animais submetidos a 8 semanas de tratamento. E mesmo após dois meses de interrupção de ambos os tratamentos, os níveis de testosterona não apresentaram indícios de recuperação. Logo, no que se refere ao menor efeito colateral adjacente na produção de testosterona, o tempo de tratamento nestes casos influenciaram da mesma forma nos resultados.

Trabalhando com touros Weijs et. al., 2015, observou que doses diárias de 20mg de dexametasona pelo período de 5 dias provocaram diminuição da concentração sérica de testosterona nestes animais. O mesmo foi observado por TOHEI (1997), que trabalhando com ratos machos adultos, verificou que duas doses de dexametasona, uma de 0,5mg/kg e outra de 2mg/kg, foram o suficiente para reduzir os níveis de testosterona destes animais.

As contagens de células de Leydig não apresentaram diferenças estatísticas, quando se compara os animais dos grupos tratados tanto por 4 quanto por 8 semanas, com os grupos controle de mesma idade, como pode ser observado por meio das figuras 18 e 19.

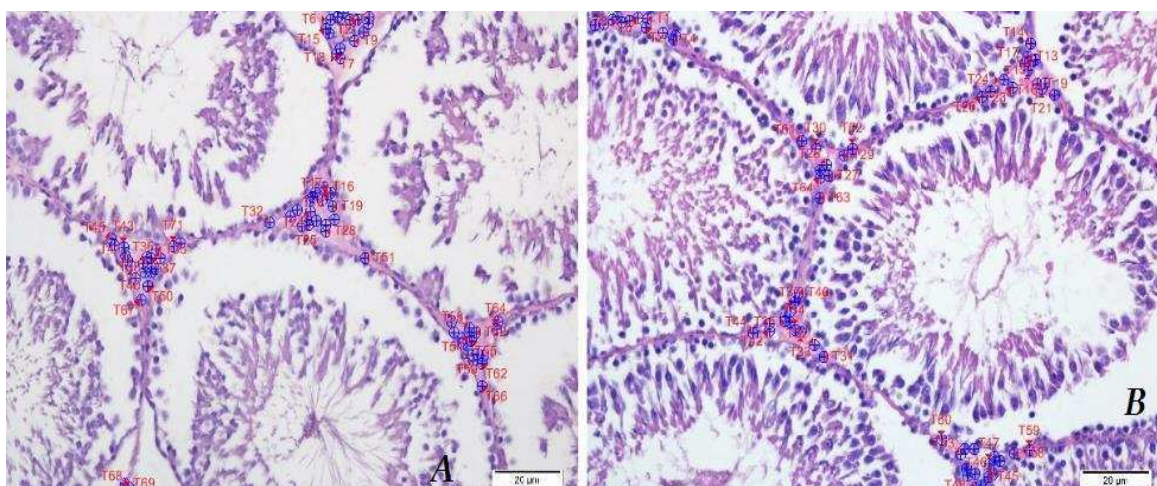


Figura 18- Contagem das Células de Leydig, para animais que foram tratados com dexametasona por 4 semanas.

Na figura 18, o quadrante representado pela letra A, corresponde ao grupo controle ($G1_1$), e o quadrante representado pela letra B, corresponde aos animais tratados com dexamesona por 4 semanas imediatamente após a suspensão do tratamento ($G2_1$). Dá mesma forma, nos demais períodos de tempo, não foram observadas diferenças significativas na contagem das células de Leydig.

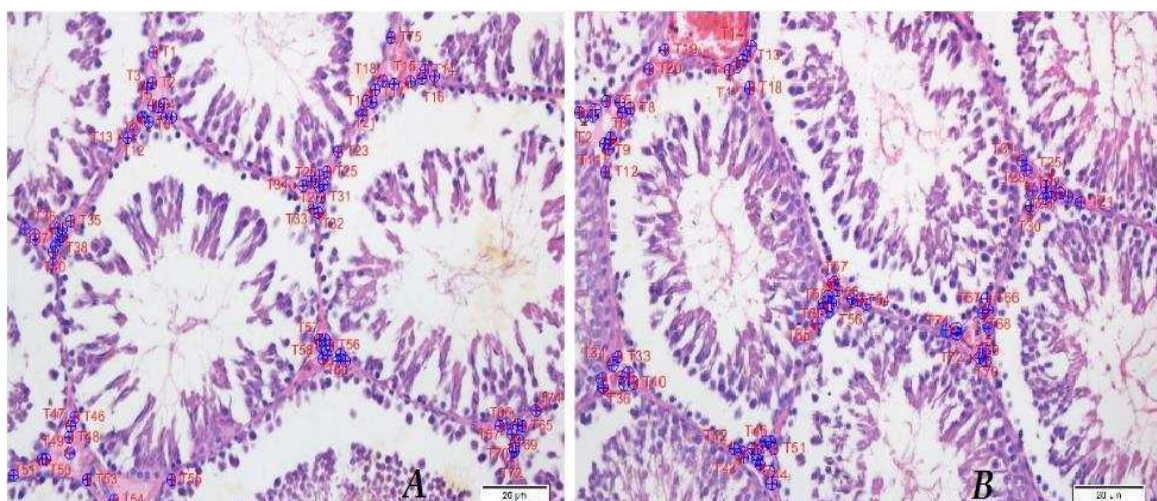


Figura 19- Contagem das Células de Leydig, para animais que foram tratados com dexametasona por 8 semanas.

Na figura 19, o quadrante representado pela letra A, corresponde ao grupo controle ($G1_2$), e o quadrante representado pela letra B, corresponde aos

animais tratados com dexamesona por 8 semanas imediatamente após a suspensão do tratamento (G3₁). Da mesma forma, que o observado para os animais do grupo que recebeu o tratamento com dexametasona por 4 semanas, nos demais períodos de tempo, para os animais tratados por 8 semanas, não foram observadas diferenças significativas na contagem das células de Leydig.

O procedimento da contagem de células demonstra que nesse caso, o glicocorticoide não agiu inibindo a proliferação desse tipo celular. Uma possível justificativa para a diminuição dos níveis de testosterona nesse caso pode ser a inibição da secreção de LH. Como observado por TOHEI (1997), que trabalhando com ratos machos adultos verificou que no tratamento com dexametasona, a testosterona apresentou queda de valores, quando comparados ao grupo controle, e observou também que os níveis de LH, hormônio responsável por estimular a produção de testosterona pelas células de Leydig, nos animais submetidos ao tratamento também eram inferiores que os apresentados no grupo controle.

7. CONCLUSÃO

As análises de biometria, biomecânica e microtomografia possibilitaram constatar a indução da osteoporose por dexametasona em ratos machos, bem como a persistência da doença após a suspensão do medicamento, tanto para o tratamento com dexametasona de 4 quanto para o de 8 semanas. Dessa forma, a fim de otimizar o tempo do experimento de futuros estudos de tratamentos para a osteoporose masculina em ratos machos pode-se fazer uso do processo de indução da doença de 4 semanas com 7,0mg/kg de dexametasona, pois nesse caso já se observa a ocorrência da osteoporose de forma persistente por até 2 meses após a interrupção do tratamento.

Os níveis séricos de cálcio, potássio, fósforo, magnésio, glicose e fosfatase alcalina total, durante o período do experimento, não indicaram isoladamente o estabelecimento da osteoporose. Porém foram observadas alterações significativas nos níveis de vitamina D, sódio, fosfatase alcalina óssea, insulina e testosterona que podem indicar alterações no metabolismo do cálcio, e consequentemente a ocorrência de osteoporose.

Com base na avaliação dos níveis séricos de cortisol endógeno, pôde-se observar o aparecimento de sinais parecidos com a Síndrome de Cushing apenas nos animais tratados por 8 semanas, depois de um mês da suspensão da administração da dexametasona, inviabilizando este protocolo para o modelo experimental proposto para osteoporose, uma vez que associada a Síndrome de Cushing tem-se o aparecimento de variados sintomas que podem interferir no estudo da osteoporose.

Os valores de glicemia se mantiveram normais e observou-se um aumento nos níveis de insulina, para os animais tratados tanto por 4 quanto por 8 semanas, o que demonstrou por meio do Índice HOMA-IR aumento da resistência à insulina. Para os animais tratados por 4 semanas com dexametasona observou-se reversão do quadro de resistência a insulina dois meses após a suspensão da administração do glicocorticoide.

Em relação aos níveis de testosterona, observou-se que tanto o tratamento por 4 semanas quanto o tratamento por 8 semanas, exerceram a mesma influência sobre a produção deste hormônio, reduzindo drasticamente os

níveis. E a queda da produção de testosterona perdurou por todo o período de experimentação, logo o tempo de tratamento com a dexametasona não fez diferença em relação aos resultados obtidos.

Por fim, avaliando todas as variáveis, sugere-se que o modelo experimental ideal para o estudo da osteoporose induzida por dexametasona em ratos machos seja o de indução com uso de dexametasona por 4 semanas, pois nesse caso foi possível observar a ocorrência da osteoporose de forma persistente, com o menor número de efeitos colaterais adjacentes, ou efeitos colaterais semelhantes ao tratamento realizado por 8 semanas. E o ideal para se iniciar o protocolo de estudo de tratamentos da osteoporose induzida por glicocorticoide em ratos machos, é aguardar pelo menos um mês após a interrupção da administração da dexametasona, uma vez que foi entre o período de um mês após a suspensão do medicamento e dois meses, que pôde-se observar que alguns parâmetros como, sódio, cortisol, fosfatase alcalina óssea e insulina haviam atingido valores estatisticamente iguais aos do grupo controle de mesma idade, e ao mesmo tempo o osso ainda apresentava osteoporose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, M.J. Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. **Veterinary Clinical Phatology**, v.32, n.3, p.101-103, 2003.
2. ALMEIDA PAZ, I.C.L. et al. Efeito do cálcio na qualidade óssea e de ovos de poedeiras. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 222, p. 173-183, 2009.
3. ALVES M, et al. Vitamina D - importância da avaliação laboratorial. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v.8, n. 1, p. 32-39, 2013.
4. ALVES, L. P. **Estudo cinético de liberação do acetato de dexametasona em diferentes formulações comerciais**. 2017. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.
5. AMADEI, S. U. et al . A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
6. ATMACA, H.; AYDIN, A.; MUSAOLU, R. Modelo experimental de osteoporose: comparação entre ovariectomia e toxina botulínica tipo A. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 340-343, 2013.
7. BAMBERGER, C. M.; SCHULTE, H. M.; CHROUSOS, G. P. Molecular Determinants of Glucocorticoid Receptor Function and Tissue Sensitivity to Glucocorticoids. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 3, p. 245–261, 2008.

8. BERTUZZI, A.; et al. Insulin Signaling in Insulin Resistance States and Cancer: A Modeling Analysis. **Plos One**, v.11, n 5, DOI:10.1371/journal.pone.0154415, 2016.
9. BLAIR, H. C.; ATHANASOU, N. A. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 1, p. 189-199, 2004.
10. BRACCO, O. L.; KAYATH, M. J.; VIEIRA, J. G. H. Hormônio da paratireóide (1-34) no tratamento da osteoporose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 3, p. 285-291, 2003.
11. CALDEFIE-CHEZET, F. et al. Dexamethasone treatment induces long-lasting hyperleptinemia and anorexia in old rats. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 50, n. 9, p. 1054-1058, 2002.
12. CAMPOS, F.S.; PINHATI, F.R. O controle do cálcio e a hipocalcemia. **Revista Cadernos UNIFOA**, v. 23, n.1, p. 77-85, 2013.
13. CANALI, E.; et al. Glucocorticoid induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. **Osteoporosis International Journal**, v.18, n. 10, p.1319–1328, 2007.
14. CANALIS, E.; DELANY, A. M. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.966, n. 1, p.73-81, 2002.
15. CARNEIRO, M. B.; ALVES, D. P. L.; MERCADANTE, M. T. Fisioterapia no pós-operatório de fratura proximal do fêmur em idosos: Revisão da literatura. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 175-178, 2013.
16. CASTRO, L. C. G. The vitamin D endocrine system. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, n. 8, p. 566-575, 2011.

17. CASTRO, M.; MOREIRA, A. C. Diagnóstico Laboratorial da Síndrome de Cushing. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 97-105, 2002.
18. CAVALCANTE, H. A. O.; et al. **Prevalência e riscos do uso indiscriminado de corticóides orais sem prescrição médica dispensados em algumas farmácias comerciais do município de três lagoas-MS**. 2014. 8f. Monografia (Graduação em Farmácia). Faculdades Integradas de Três Lagoas, Três Lagoas, 2014.
19. CECCHETTIN, M.; et al. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 49, n. 10, p. 465-468, 1995.
20. CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
21. CHAU D.L.; EDELMAN S.V. Osteoporosis and diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 20, n. 3, p. 153-157, 2002.
22. DE SOUZA, M. C. et al., Glicocorticoides e osteoporose: artigo de revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 57-64, 2010.
23. SEIBEL, M. J.; ROBINS, S .P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. 2 ed. San Diego: Academic Press, cap.18, p.261-273, 2006.
24. DONATTI, T. L.; et al. Os glicocorticoides e seus efeitos no crescimento e na mineralização óssea. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n. 1, p. 4-12, 2011.
25. DRAPER, N.; STEWART, P.M. 11b-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. **Journal of Endocrinology**, v. 186, n. 2, p. 251-271, 2005.

26. EASTELL, R.; et al. A UK Consensus Group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. **Journal of Internal Medicine**, v. 244, n. 4, p. 271-292, 1998.
27. ERRANTE, P. R.; et al. Mecanismos de Ação e Resistência ao Uso de Glicocorticoides. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 6, n. 2, p. 01-11, 2014.
28. FARIA, D. E.; et al. Influência de diferentes níveis de energia, vitamina D3 e relação sódio: cloro sobre o desempenho e a qualidade da casca dos ovos de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 467-475, 2000.
29. FERNANDES, P. G. **Aplicação da Microtomografia Computadorizada para a Análise Morfométrica Bi e Tridimensional na Avaliação da Perda Óssea Experimental em Ratos**. 2014. 124f. Tese (Doutorado em Periodontia) - Programa de Pós Graduação em Periodontia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
30. FERRARI, P. Cortisol and renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 575-589, 2003.
31. FERREIRA JUNIOR, D. B.; et al. Perfil biométrico, histomorfométrico e bioquímico no tratamento com atorvastatina cálcica de ratas com osteoporose induzida com dexametasona. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 53, n. 5, p. 607-613, 2018.
32. FERREIRA JUNIOR, D. B. **Avaliação do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona e óleo de linhaça no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona**. 2016. 120f. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Programa de Pós Graduação em Bioquímica Aplicada, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

33. FERREIRA, A. P.; OLIVEIRA, C.E.R.; FRANCA, N.M. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina. **Jornal de Pediatria**, v.83, n.1, p.21-26, 2007.
34. GALI, J. C. Osteoporose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 3-12, 2001.
35. GALSWORTHY, T. D.; WILSON, P. L.: Osteoporosis: it steals more than bone. **The American Journal of Nursing**, v. 96, n. 6, p. 27-33, 1996.
36. GEBARA, O. C. E. et al . Efeitos Cardiovasculares da Testosterona. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 6, p. 644-649, 2002.
37. GIRO, G. **Avaliação radiográfica e biomecânica da influência da osteoporose induzida em ratas e seu tratamento com alendronato e estrógeno, sobre tecido ósseo ao redor de implantes com ósseo integração estabelecida**. Tese (Mestrado em Periodontia) – Programa de Pós Graduação em Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, Araraquara, 2006
38. GRACITELLI, M. E. C.; et al. Paratormônio e Osteoporose: Encontrando o Fio da Meada. Bases Fisiológicas para Utilização do PTH no Tratamento da Osteoporose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 46, n. 3, p. 215-220, 2002.
39. GROSS, J. L.; et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.
40. GUYTON, A.C.; HALL J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a ed., Editora Elsevier, 2011.
41. HABER, E. P.; Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia Metabólica**, v. 45, n. 3, p. 219-227, 2001.

42. HAIDER, S.G. Leydig Cell Steroidogenesis: Unmasking the Functional Importance of Mitochondria. **Endocrinology**, v. 148, n.6, p. 2581-258, 2007.
43. HEINDEL, J.J.; TREINEN, K.A. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. **Toxicologic Pathology**, v. 17, n. 2, p. 411-445, 1989.
44. IOANNIDIS, G.; GORDON, M.; ADACHI, J. D. Quality of life in osteoporosis. **Nursing Clinics of North America**, v. 36, n. 3, p. 481-489, 2001.
45. JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 12, p. 1726-1733, 2006.
46. JORGE, M. L. L. A.; et al. Atividade da fosfatase alcalina no lavado broncoalveolar de equinos de policiamento montado no estado do Rio de Janeiro. **Revista Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 92-96, 2014.
47. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.136-148.
48. KANH, C.R. The Molecular Mechanism of Insulin Action. **Annual Review of Medicine**, v.36, n. 1, p. 429-451, 1985.
49. KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.
50. KESSEL, R. G. Tecido conjuntivo: osso e formação óssea. In: **Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos**. Trad. M.c. Engelhardt. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 7, p. 129-45.
51. LANNA, C. M. M.; MONTENEGRO JR., R. M.; PAULA, F. J. A. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticoide. **Arquivos**

- Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 1, p. 9-18, 2003.
52. LEÃO, L.S.; CARDOSO, F.S.; Efeitos do consumo de cálcio na composição corporal e perda de peso em adultos. **Revista de Atenção à Saúde**, v. 12, n. 40, p. 69-73, 2014.
53. LIMA, L.; et. al. Análise de estrutura óssea através de microtomografia computadorizada. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 2, n. 1, p. 6-10, 2009.
54. LINDSAY, R. Prevention and treatment of osteoporosis. **The Lancet**, v. 341, n.8848, p. 801-805, 1993.
55. LIRANI, A. P. R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato**. 2004. 109f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
56. LISE, M.L.Z.; et al . O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 364-370, 1999.
57. MARQUES, C. D. L.; et al . A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 1, p. 67-80, 2010.
58. MINER, M.; BARKIN, J.; ROSENBERG, M. T. Testosterone deficiency: myth, facts, and controversy. **The Canadian Journal of Urology International**, v. 21, n. 31, p. 39-54, 2014.
59. MODDER, U. I.; KHOSLA, S. Skeletal Stem / Osteoprogenitor Cells: Current Concepts, alternate hypotheses and relationship to the Bone Remodeling Compartment. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 393-400, 2008.

- 60.MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para laboratório: princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. 419 p.
- 61.MUNDY, G. R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. **Bone**, v. 24, n. 5, p. 35-38, 1999.
- 62.NEWELL-PRICE, J.; et al. Cushing's syndrome. **The Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1605-1617, 2006.
- 63.NULEND, J. K.; BACABAC, R. G.; MULLENDER, M.G. Mechanobiology of Bone Tissue. **Pathologie Biologie**, v. 53, n. 10, p. 576-580, 2005.
- 64.OLIVEIRA, C. L.; et al . Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 237-245, 2004 .
- 65.OLIVEIRA, L. G.; GUIMARAES, M. L. R. Osteoporose no homem. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 5, p. 392-396, 2010 .
- 66.PACCOLA, C. C. **Análise morfofuncional e imuno-histoquímica das células de Leydig e dos macrófagos testiculares em ratos, após a exposição à nicotina durante as fases pré-natal e de lactação**. 2010. 267 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Ciências, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, 2010.
- 67.PATRÍCIO, J. P.; et al. Osteoporose induzida por corticoides. **Arquivos de Medicina**. v.20, n.5-6, p.173-178, 2006.
- 68.PATSCHAN, D.; LODDENKEMPER, K.; BUTTGEREIT, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Bone**, v. 29, n. 2, p. 498-505, 2001.
- 69.PAULI, J. R.; et al . Influência do treinamento físico sobre parâmetros do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal de ratos administrados com

dexametasona. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 5, n. 2, p. 142-152, 2005.

70. PAULI, J.R. **Efeitos do treinamento físico sobre aspectos endócrino-metabólicos de ratos administrados com dexametasona**. 2005. 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) – Programa de Pós Graduação em Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.
71. PEIXOTO, I.; et al. Dermatofitose por *Trichophyton rubrum* como infecção oportunista em pacientes com doença de Cushing. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 6, p. 888-890, 2010.
72. PEREIRA, A.L.C.; et al. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v.35, n. 1, p.35-50, 2007.
73. PIAI, C. R.; et al. Efeitos do residronato na reparação óssea de ratos machos e fêmeas com osteopenia. **Brazilian Dental Science**, v. 8, n. 3, p. 77-82, 2005.
74. PINHEIRO, C.H.J.; et al. Exercício Físico Previne Alterações Cardiometabólicas induzidas pelo Uso Crônico de glicocorticoides. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.93, n.3, p.400-408, 2009.
75. POLO, R.G. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 26, n. 3, p. 63-80, 2003.
76. PRELEVIC, G. M. Osteoporosis in men. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 94, n. 12, p. 620-623, 2001.
77. PREMAOR, M. O.; BRONDANI, J. E. Nutrição e saúde óssea: a importância do cálcio, fósforo, magnésio e proteínas. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 60, n. 3, p. 253-263, 2016.

78. PROTZEK, A. O. P.; et al. Hyperinsulinemia caused by dexamethasone treatment is associated with reduced insulin clearance and lower hepatic activity of insulin-degrading enzyme. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, part A, p. 1-8, 2016.
79. RADOMINSKI, S. C.; et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 426-434, 2004.
80. RAFACHO, A.; et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 3, p. 49-62, 2014.
81. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p.470-478, 2007.
82. ROMANHOLI, D. J. P. C.; SALGADO, L. R. Síndrome de Cushing exógena e retirada de glicocorticoides. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 8, p. 1280-1292, 2007.
83. ROSA, F. B.; et al. Osteoporose em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 483-489, 2013.
84. SAMPAIO, E. A.; LUGON, J. R.; BARRETO, F. C. Fisiopatologia do Hiperparatireoidismo Secundário. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 30, n. 1, p. 6-10, 2008.
85. SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002 .
86. SAVARY, I.; et al. Evidence for an alteration of plasma and liver proteins response to Dexamethasone in aging rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.122, n. 1, p. 105-120, 2001.

- 87.SCHUCH, N. J.; GARCIA, V. C.; MARTINI, L. A. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 625-633, 2009.
- 88.SEEDOR, J. G.; QUARRACCIO, H. H.; THOMPSON, D. D. The biophosphonate alendronate (MK 217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Bone and Mineral Research**, v. 6, n. 4, p. 339-346, 1991.
- 89.SHIMADA, T.; et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 3, p. 429-35, 2004.
- 90.SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235-243, 2002.
- 91.SONG, I. H.; et al. New Glucocorticoids on the horizon: repress, don't active!. **Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 7, p. 1199-1207, 2005.
- 92.SOUZA, M. P. G. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 3, p. 220-229, 2010.
- 93.SOUZA, J. A. T.; et al. Biometria testicular, características seminais, libido e concentração de testosterona em ovinos da raça Santa Inês, criados a campo, na microrregião de Campo Maior, Piauí. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.10, n. 1, p. 21-28, 2007.
- 94.SOUZA, M. C.; et al. Glicocorticoides e osteoporose – artigo de revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 57–64, 2010.
- 95.STATHOPOULOS, I. S.; et. al. A review on osteoporosis in men. **Hormones**, v. 13, n. 4, p. 441-457, 2014.
- 96.TOHEI, A.; et al. Effects of repeated stress on the hypothalamic-pituitary testes axis in adult rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, n. 5, p.329-334,1997.

97. TOMASELLO, S.; Secondary Hyperparathyroidism and Chronic Kidney Disease. **Diabetes Spectrum**, v.21, n. 1, p. 19-25, 2008.
98. TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; CARVALHO, V.F. Mecanismos celulares e moleculares da ação anti-inflamatória dos glicocorticoides. **Corpus et Scientia**, v. 8, n. 2, p. 36-51, 2012.
99. KINI, U.; NANDEESH, B. N. Physiology of Bone Formation, and Metabolism. **Radionuclide and Hybrid Bone Imaging**, v.2, N.1 p. 29-57, 2012.
100. VAANANEN, H. K.; LAITALA-LEINONEN, T. Osteoclast lineage and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 132-138, 2008.
101. VASQUES, A. C. J.; et al. Análise crítica do uso dos índices do homeostasis model assessment (HOMA-IR) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células- β pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 1, p. 32-39, 2008.
102. VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415-422, 1999.
103. VONDRACEK, S. F.; HANSEN, L. B. Current approaches to the management of osteoporosis in men. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 61, n. 17, p. 1801-1811, 2004.