

GLÁUCIA GUIMARÃES AMARAL

**FÁRMACOS ISOLADOS OU COMBINADOS NO TRATAMENTO DE RATAS
COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

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

T

A485f
2014

Amaral, Gláucia Guimarães, 1982-
Fármacos isolados ou combinados no tratamento de ratas
com osteoporose induzida / Gláucia Guimarães Amaral. –
Viçosa, MG, 2014.
xii, 49f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Rilene Ferreira Diniz Valadares.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.36-49.

1. Patologia experimental. 2. Ratos. 3. Osteoporose.
4. Ovariectomia. 5. Glicocorticoide. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 616.02733

GLÁUCIA GUIMARÃES AMARAL

**FÁRMACOS ISOLADOS OU COMBINADOS NO TRATAMENTO DE RATAS
COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

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

Aprovada: 29 de abril de 2014.

Mário Jefferson Q. Louzada

Edenio Detmann

Fabício Luciani Valente

Luciana Navajas Rennó

Rilene Ferreira. D.Valadares
(Orientadora)

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

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Veterinária que me acolheram durante todo meu percurso.

À FAPEMIG pela bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À minha mãe e irmãos pelo apoio incondicional nesta trajetória.

Ao professor Aloísio, por ter sido, professor, orientador, co-orientador, amigo e pai nesses 9 anos de muita cumplicidade.

À professora Rilene que com seu apoio inicial seguido de dedicação final me proporcionaram conquistar o título vislumbrado. Esta concretização se tornou possível graças ao seu comprometimento; foi importante sua paciência e amizade nesta busca.

À Joselita, Marcelo, Marla e Mayara que me acolheram como membro da família.

À Rose, pelo carinho e atenção, grande amiga, sempre presente.

À Lívia, Luciana, Hanna, Andrea e Claiton, grandes amigos atuantes como conselheiros da pós-graduação.

Ao Fabrício disposto a ouvir meus desabafos e me acalmar nos momentos mais desesperadores; sempre com uma palavra confortante para me dizer.

Ao senhor Divino pelo auxílio na execução desta pesquisa; a grande amizade que cultivamos é o mais importante ao longo destes anos.

Aos funcionários da histopatologia Adão e Cláudio e o técnico Carlos Cardoso pela indiscutível colaboração.

Aos professores Luciana e Edenio por estarem sempre dispostos a me auxiliar.

Ao professor Mário Jefferson por ter aceito meu segundo convite e principalmente por me receber em Araçatuba de maneira calorosa e divertida. Ao seu funcionário Pedro pelas boas gargalhadas propiciadas pela sua “veia” cômica. Minha estadia ficou mais leve.

À Bruna Rezende pela ajuda em Araçatuba durante as análises e pelo companheirismo e amizade em Porto de Galinhas, como nos divertimos!

Ao professor Ricardo, sempre disposto a colaborar na construção deste trabalho.

À Bruna, Ana Paula, Josy e Polly, por me aturarem nos momentos mais estressantes do doutorado. E minha york Jollie companheira inseparável.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista. Obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Animais e manejo.....	14
3.2. Preparação da medicação.....	15
3.3. Indução por ovariectomia ou pelo uso de glicocorticoide e tratamentos..	15
3.4. Eutanásia e coleta dos ossos.....	16
3.5. Índices Bioquímicos.....	16
3.6. Análise Densitométrica.....	17
3.7. Testes Biomecânicos.....	17
3.8. Exame Histomorfométrico.....	18
3.9. Análise Estatística.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÕES.....	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BMU	Unidade Multicelular Básica
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
DMO _{areal}	Densidade mineral óssea areal
DVT	Departamento de Veterinária
DXA	Absorção de raios X de dupla energia
FA	Fosfatase Alcalina
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
FM _{colo}	Força máxima do colo do fêmur
FM _{diáfise}	Força máxima da diáfise do fêmur
FPP	Farnesil Pirofosfato
FPPS	Farnesil Pirofosfato Sintase
GGPP	Geranilgeranil Pirofosfato
HE	Hematoxilina-Eosina
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
PP	Pirofosfato
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor ativador nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador nuclear Kappa B
RIG _{colo}	Rigidez do colo do fêmur
RIG _{diáfise}	Rigidez da diáfise do fêmur
TNF α	Fator α de Necrose Tumoral
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
VTO	Volume trabecular ósseo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ação RANKL/RANK/OPG no mecanismo de ativação e inibição dos osteoclastos.....4
- Figura 2 - Diagrama da via do mevalonato - mecanismo de ação das estatinas e bisfosfonatos na cascata da prenilação de proteínas.....7
- Figura 3 - Mecanismos que resultam em perda óssea pelo uso glicocorticoide.....9
- Figura 4 - Fotomicrografias do osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de fêmur de ratas.....32
- Figura 5 - Fotomicrografias do osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de tíbia de ratas.....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança para os parâmetros bioquímicos dos grupos sem indução e com osteoporose induzida por ovariectomia.....	19
Tabela 2 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança para os parâmetros bioquímicos dos grupos sem indução e com osteoporose induzida por glicocorticoide.....	20
Tabela 3 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança da densidade mineral óssea areal, força máxima, rigidez e volume trabecular ósseo para os grupos sem indução e com osteoporose induzida por ovariectomia.....	22
Tabela 4 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança da densidade mineral óssea areal, força máxima, rigidez e volume trabecular ósseo para os grupos sem indução e com osteoporose induzida por glicocorticoide.....	22
Tabela 5 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança dos parâmetros bioquímicos dos grupos osteoporóticos induzidos por ovariectomia ou glicocorticoide.....	23
Tabela 6 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança da densidade mineral óssea areal, força máxima, rigidez e volume trabecular ósseo dos grupos osteoporóticos induzidos por ovariectomia ou glicocorticoide.....	24
Tabela 7 – Médias, coeficientes de variação e probabilidades de parâmetros sanguíneos de ratas com osteoporose induzida por ovariectomia tratadas com medicamentos isolados ou combinados.....	24

Tabela 8 – Médias, coeficientes de variação e probabilidades de parâmetros sanguíneos de ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide tratadas com medicamentos isolados ou combinados.....25

Tabela 9 – Médias, coeficientes de variação e probabilidades da densidade mineral óssea areal do fêmur e da tíbia, força máxima e rigidez do fêmur e volume trabecular ósseo do fêmur e da tíbia de ratas com osteoporose induzida por ovariectomia tratadas com medicamentos isolados ou combinados.....28

Tabela 10 – Médias, coeficientes de variação e probabilidades da densidade mineral óssea areal do fêmur e da tíbia, força máxima e rigidez do fêmur e volume trabecular ósseo do fêmur e da tíbia de ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide tratadas com medicamentos isolados ou combinados.....29

RESUMO

AMARAL, Gláucia Guimarães, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2014. **Fármacos isolados ou combinados no tratamento de ratas com osteoporose induzida.** Orientadora: Rilene Ferreira Diniz Valadares. Coorientadores: Aloísio da Silva Pinto e Fabrício Luciani Valente.

Dois experimentos foram conduzidos, utilizando 108 ratas Wistar, com o objetivo de avaliar os efeitos do uso isolado ou combinado de alendronato, atorvastatina e ipriflavona no tratamento da osteoporose induzida por ovariectomia ou por glicocorticoide. A ovariectomia foi feita em 48 ratas Wistar por incisão retroumbilical e a indução por glicocorticoide foi feita em outras 48 ratas Wistar pela administração semanal de dexametasona, por via intramuscular, na dose de 7,5 mg/Kg de peso corporal, durante cinco semanas. Após 75 dias da cirurgia e ao final da quinta semana da administração de dexametasona, oito tratamentos com seis repetições foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado aos 48 animais de cada grupo. Os tratamentos foram controle, sem medicação; D1 - 0,06 mg de alendronato; D2 - 0,36 mg de atorvastatina; D3 - 30 mg de ipriflavona; D1+D2 - 0,03 mg de alendronato + 0,18 mg de atorvastatina; D1+D3 - 0,03 mg de alendronato + 15 mg de ipriflavona; D2+D3 - 0,18 mg de atorvastatina + 15 mg de ipriflavona; D1+D2+D3 - 0,02 mg de alendronato + 0,12 mg de atorvastatina + 10 mg de ipriflavona. Dois grupos compostos por seis animais cada foram mantidos sem indução e submetidos ao estresse de aplicação intramuscular de solução fisiológica ou à SHAM cirurgia, para comparação com os grupos osteoporóticos sem medicação. A medicação foi administrada durante 30 dias. Foi feita uma coleta de amostra de sangue de cada animal antes da eutanásia para avaliação de parâmetros bioquímicos séricos. Após a dissecação do tecido muscular, os ossos fêmur e tíbia foram coletados para estudo densitométrico, biomecânico e histomorfométrico. Os parâmetros bioquímicos séricos e ósseos dos grupos osteoporóticos medicados foram comparados ao grupo sem medicação, utilizando o procedimento GLM do SAS e o teste Dunnett a 0,05. Para a comparação entre os grupos sem indução e os osteoporóticos sem medicação e entre as formas de indução foi avaliado o intervalo de confiança das médias. Para todos os procedimentos estatísticos adotou-se $\alpha = 0,05$. Entre os grupos não induzido e osteoporótico sem medicação, em ambas formas de indução, não houve diferença

($P > 0,05$) para os parâmetros bioquímicos séricos, entretanto, foi observada menor ($P < 0,05$) densidade mineral óssea areal e volume trabecular ósseo, para os grupos osteoporóticos. Os medicamentos não afetaram os parâmetros bioquímicos séricos, mas a associação de ipriflavona e atorvastatina ou a associação tripla (incluindo o alendronato) aumentou ($P < 0,05$) a densidade mineral óssea areal e o volume trabecular ósseo. Conclui-se que essas associações de ipriflavona e atorvastatina ou a associação tripla podem ser uma alternativa ao uso isolado do alendronato, apresentando como vantagem a redução da dose e dos efeitos colaterais.

ABSTRACT

AMARAL, Gláucia Guimarães, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2014.
Isolate or combined use of drugs in treatment of rats with induced osteoporosis.
Advisor: Rilene Ferreira Diniz Valadares . Co-advisors : Aloisio da Silva Pinto and Fabricio Luciani Valente.

Two experiments were conducted using 108 female Wistar rats to evaluate the effects of isolate or combined use of alendronate, ipriflavone and atorvastatin in treatment of ovariectomy or glucocorticoid-induced osteoporosis. The ovariectomy was performed by retroumbilical incision in 48 female Wistar rats and the intramuscular administration of dexamethasone in other 48 female Wistar rats was performed at a dose of 7.5 mg/kg body weight, once a week, during 5 weeks. Seventy-five days after surgery and at the end of the fifth week of dexamethasone administration, eight treatments were distributed to the rats in random design, resulting in 6 replications per treatment. The treatments were: control – without medication; D1 - 0.06 mg alendronate; D2 - 0.36 mg atorvastatin; D3 - 30 mg ipriflavone; D1 + D2 - 0.03 mg alendronate + 0.18 mg atorvastatin; D1 + D3 - 0.03 mg alendronate + 15 mg ipriflavone; D2 + D3 - + 0.18 mg atorvastatin + 15 mg ipriflavone; D1 + D2 + D3 - 0.02 mg alendronate + 0.12 mg atorvastatin + 10 mg ipriflavone. Two groups, each of them with six animals, were maintained without induction and subjected to saline intramuscular administration or SHAM surgery for comparison the osteoporotic groups without medication. The medication was administered for 30 days. Blood samples were collected prior to euthanasia for evaluation of serum biochemical parameters. After dissection of muscle tissue, tibia and femur bones were collected for densitometric, histomorphometric and biomechanical study. Serum biochemical and bone parameters of the osteoporotic treated groups were compared to the group without medication, using the GLM procedure of SAS and the Dunnett test. Effects of osteoporosis and type of osteoporosis-induction was evaluated by confidence interval of the mean. For all statistical procedures was adopted $\alpha = 0.05$. There were no difference ($P > 0.05$) for serum biochemical parameters between groups without induced-osteoporosis and osteoporotic without medication, in both forms of induction, however, lower ($P < 0.05$) areal bone mineral density and bone trabecular volume were observed for osteoporotic groups. The drugs did not affect serum biochemical parameters, but the combination of ipriflavone and atorvastatin or the

triple combination (including alendronate) increased ($P < 0.05$) areal bone mineral density and bone trabecular volume. We conclude that the association of ipriflavone and atorvastatin or triple association may be an alternative to the isolate use of alendronate, showing the advantage of reducing the dose and side effects.

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma desordem metabólica do tecido ósseo, com perda de massa e redução da densidade, acompanhada por danos na microarquitetura, aumentando os riscos de fratura (Lindsay, 1993; Undurti, 2013). Esta constitui uma condição crônica, que afeta a qualidade de vida do paciente, cria significativa carga para a sociedade, sendo um problema mundial de saúde, com alta morbidade e mortalidade. A cada ano a busca por drogas para o tratamento da osteoporose vem aumentando os custos para os serviços de saúde de muitas regiões em todo o mundo (Hamdy, 2002; Gass e Dawson-Hughes, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima a prevalência da osteoporose em torno de 20 a 30% em mulheres com mais de 50 anos de idade; entretanto, segundo Woolf e Pfleger (2003), a prevalência não é bem esclarecida por ser uma doença frequentemente assintomática.

Diversos fatores de risco para a osteoporose têm sido sugeridos, entre eles, baixa absorção de cálcio (Lloyd et al., 1993 ; Prince et al., 1995), baixa atividade física (Ross, 1998), nicotina (Vogel et al., 1997), álcool (Ross, 1998), cafeína (Lloyd et al., 1997), proteína animal e fosfato em excessos (Karlkainen e Lamberg-Allardt, 1996). O risco da osteoporose pode ser reduzido por medicações e por alterações no estilo de vida, que incluem dieta e exercícios (Undurti, 2013).

As alternativas para as terapias farmacológicas envolvem a reposição hormonal, a administração de substâncias estabilizadoras do processo reabsortivo ou de substâncias formadoras de osso, que representam importantes estratégias no campo da saúde pública; todas têm por objetivo impedir a perda adicional de osso e diminuir a probabilidade de futuras fraturas (Kim et al., 2003; Jaime et al., 2005).

Como agentes estabilizadores do processo reabsortivo ou antirreabsortivos podem-se destacar os bisfosfonatos e como formadores de ossos, as estatinas; já os flavonóides teriam atuação na diminuição do processo de remodelação do tecido ósseo (Pinto et al., 2005).

A terapia de combinação medicamentosa tem sido frequentemente usada em doenças crônicas, possibilitando a redução da dose administrada, o que poderia mitigar os efeitos colaterais. No caso da osteoporose, poucos dados de regimes de combinações estão disponíveis e não foi encontrada na literatura descrição da associação dos fármacos alendronato, atorvastatina e ipriflavona.

O alendronato de sódio, um dos mais potentes fármacos dos bisfosfonatos, tem sido largamente utilizado na prevenção da reabsorção óssea sistêmica da osteoporose (Altunda e Gursoy, 2005). Entretanto, fraturas atípicas relacionadas ao uso prolongado de bisfosfonatos tem sido relatadas em estudos observacionais (Schichler et al., 2011; Guisti et al., 2011; Meier et al., 2012; Erviti et al., 2013), desaconselhando a sua utilização. No entanto, o alendronato foi utilizado no presente trabalho para verificar seus efeitos em associação com outros medicamentos, apresentando a vantagem de redução da dose, o que poderia mitigar os efeitos colaterais, não evidenciado na literatura.

Tem sido descritos trabalhos com associação dos antirreabsortivos estrógeno/progesterona e risedronato (Harris et al., 2001; Greenspan et al., 2002), estrógeno/progesterona e alendronato (Lindsay et al., 1999; Bone et al., 2000; Greenspan et al., 2003) estrógeno/progesterona e etidronato (Wimalawansa, 1998) e raloxifeno e alendronato (Johnell et al., 2002). Entretanto, em todas as associações descritas não foram testadas reduções nas doses do alendronato.

A associação de um antirreabsortivo com um agente formador de osso tem a finalidade de atuar em dois pontos do ciclo de remodelação, reabsorção e formação. A combinação de um agente formador de osso com um inibidor da reabsorção é vista como muito promissora para a manutenção e aumento da massa óssea (Garcés e Garcia, 2006) e foi descrita nos trabalhos que utilizaram da associação de PTH com calcitonina (Hesch et al., 1998; Hodsman et al., 1997), com estrógeno/progesterona (Lindsay et al., 1997) ou com alendronato (Cosman et al., 2001; Black et al., 2003; Finkelstein et al., 2003). No presente trabalho a estatina foi testada como agente formador de osso alternativamente ao PTH.

Este experimento foi idealizado com o intuito de verificar a eficácia do tratamento da osteoporose na busca por alternativas mais eficazes e menos prejudiciais ao organismo através do uso isolado ou combinado dos fármacos alendronato, atorvastatina e ipriflavona em ratas com osteoporose induzida. As formas de indução da osteoporose foram a ovariectomia, por se tratar de uma simulação da menopausa na mulher e o uso de glicocorticóide, por ser a causa mais comum de osteoporose secundária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O processo de remodelação do tecido ósseo ao longo da vida ocorre em resposta a forças mecânicas e a um ciclo de remodelação óssea composto por células formadoras de osso (osteoblasto) e as envolvidas na reabsorção (osteoclasto), que trabalham acopladas em pequenos conjuntos de células chamadas unidades multicelulares básicas de remodelação (BMU), sendo fundamental para a renovação e preservação da qualidade do esqueleto. Neste processo há constante troca de sinais entre essas células do tecido ósseo, para que ocorra a substituição do osso danificado ou velho (Mundy e Oyajobi, 2003; Hernandez, 2008; Pivonka et al., 2008).

O osteoblasto é estimulado pelo hormônio da paratireóide (PTH) e pela vitamina D, enquanto o osteoclasto é inibido pela calcitonina. Receptores para o estrogênio são encontrados em osteoblastos e osteoclastos que apresentam respostas diferentes, sendo a ação osteoblástica estimulada e a osteoclástica inibida (Levinson e Altkorn, 1999; Wooldft e Dixon, 1999).

Conforme apresentado na Figura 1, estímulos sistêmicos que levam à liberação de PTH, 1,25-diidroxivitamina D, interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6 e TNF α podem desencadear o processo de remodelação por estimular os osteoblastos a produzir RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B). A ligação do RANKL ao receptor RANK, presente na membrana de células hematopoiéticas precursoras dos osteoclastos, induz a formação de osteoclastos multinucleados, ativando-os e aumentando a reabsorção óssea (Robling et al., 2006). Em contrapartida, há substâncias inibidoras da reabsorção óssea tais como o estrogênio e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), que estimulam a produção de osteoprotegerina (OPG), que inibe a ligação entre o RANKL e seu receptor, impedindo o recrutamento, a proliferação e a ativação dos osteoclastos, tendo, portanto, efeito inibitório sobre as células precursoras dos osteoclastos (Robling et al., 2006).

Assim sendo, a relação RANKL/OPG é responsável por controlar a remodelação óssea. Com isso, as alterações na concentração dessas substâncias, induzidas por variações nos níveis de citocinas, administração de glicocorticóide ou deficiência de estrogênio, podem levar ao aumento do número e da atividade dos

osteoclastos, determinando perda na massa óssea (González, 2000; Hofbauer et al., 2000; Kierszbaum, 2008).

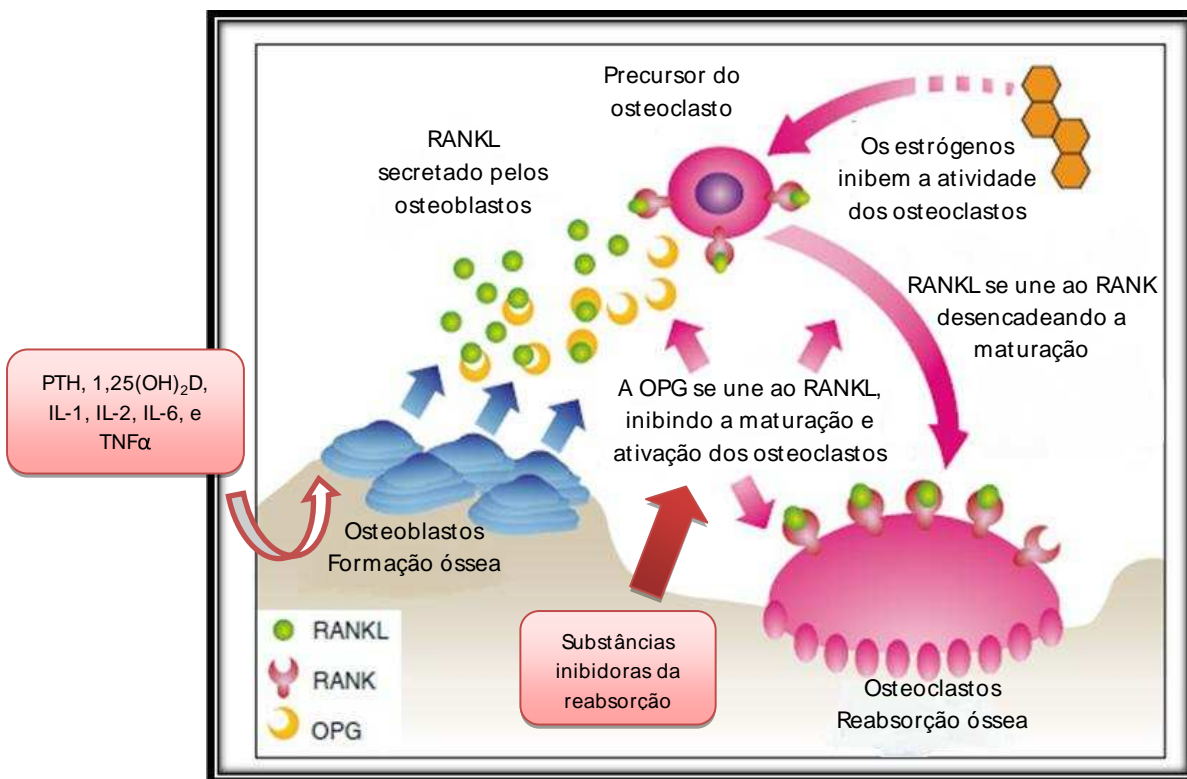


Figura 1- Ação RANKL/RANK/OPG no mecanismo de ativação e inibição dos osteoclastos (Adaptado de Morote e Planas, 2011)

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

A homeostase óssea se mantém até aproximadamente 30 anos no ser humano. Depois deste período, pode-se constatar discreto predomínio da reabsorção sobre a formação óssea, caracterizando estado de osteopenia que tende a ser mais acentuada em mulheres devido à redução dos níveis de estrógeno pós-menopausa, podendo levar à osteoporose (Russo et al., 2002).

Os fármacos utilizados no tratamento da osteoporose são classificados como agentes que impedem a reabsorção ou estimulam a formação de tecido ósseo. Dos agentes antirreabsortivos, podem ser citados o cálcio, estrógenos/progesteronas, calcitonina, bisfosfonatos e vitamina D. Os agentes formadores de osso

compreendem o fluoreto de sódio, esteróides anabólicos, PTH e estatinas (Fernandes et al., 1996; Pinto et al., 2005). O PTH é classificado como agente formador de osso quando administrado em doses mais baixas que a liberada pelo organismo em caso de hipocalcemia (Weinstein e Manolagas, 2000).

Quimicamente, os bisfosfonatos são análogos sintéticos do pirofosfato, nos quais o átomo de fósforo se liga ao carbono, formando ligações P-C-P que são mais resistentes à hidrólise química e enzimática (Hamdy, 1993).

Os bisfosfonatos, internalizados pelos osteoclastos na superfície óssea, inibem diretamente a enzima farnesil pirofosfato sintase, envolvida na síntese de lipídios isoprenóides, farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), requeridos para a prenilação de proteínas (Figura 2). A reação de prenilação que consiste na transferência de um dos lipídios para o terminal C da cisteína da proteína alvo, ancorando-a na membrana celular, é crucial para o funcionamento e sobrevivência dos osteoclastos (Luckman et al., 1998; Rogers, 2004; Rogers et al., 2011).

Adicionalmente, os bisfosfonatos inibem a desmineralização (Vitte et al., 1996), inibem a reabsorção pelos osteoclastos, aumentam a proliferação osteoblástica e a sua maturação (Fogelman et al., 1992; Knoch et al. 2005). Além disso, se ligam aos cristais de hidroxiapatita que podem manter-se por anos, reduzindo, assim, o risco de fraturas em locais, tais como, o colo do fêmur e vértebras lombares (Cauley et al., 2003; McClung et al., 2013). A ação anti-fratura dos bisfosfonatos em pacientes com osteoporose tem sido descrita, dentre outros, por MacLean et al. (2008).

O alendronato de sódio, um dos mais potentes fármacos deste grupo, tem sido utilizado na prevenção da reabsorção óssea sistêmica da osteoporose (Altunda e Gursoy, 2005). Entretanto, fraturas atípicas relacionadas ao uso prolongado de bisfosfonatos têm sido relatadas em estudos observacionais (Schichler et al., 2011; Guisti et al., 2011; Meier et al., 2012; Erviti et al., 2013), desaconselhando a sua utilização. Destacam-se ainda os seus efeitos colaterais tais como náusea, dispepsia, dor abdominal, constipação, diarreia, dor músculo-esquelética, cefaléia, esofagite, úlcera esofágica, gastrite, duodenite, disfagia, estenose esofágica, disfunção renal (albuminúria) e flebite, quando administrado intravenosamente (Adami e Zamberlan, 1996).

As estatinas, tais como a cerivastatina e pravastatina (Mundy et al., 1999), sinvastatina (Maeda et al., 2001), lovastatina (Li et al., 2003) e atorvastatina (Pinto et al., 2005), são os agentes mais efetivos e bem tolerados na terapia das dislipidemias. Estas drogas são inibidoras competitivas da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, a qual catalisa a etapa limitante na via da biossíntese de colesterol, bloqueando a conversão de HMG-CoA em mevalonato. Assim, haverá o comprometimento da formação de farnesilpirofosfato e geranylgeranylpirofosfato, metabólitos importantes na prenilação de proteínas fundamentais na regulação do metabolismo dos osteoclastos, o que resulta em aumento da apoptose destas células (Cumming e Bauer, 2000; Mahley e Bersot, 2001) (Figura 2).

Os efeitos na formação óssea das estatinas são atribuídos ao aumento da transcrição do gene da BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), a qual conduz à diferenciação osteoblástica e à formação óssea, podendo causar ganhos substanciais de tecido ósseo (Mundy, 2001).

Uyar et al. (2009) observaram aumento da densidade mineral óssea areal da região mediana e da metáfise distal do fêmur em ratas ovariectomizadas tratadas com risedronato ou atorvastatina. Esses resultados foram confirmados em estudo de meta-análise, utilizando trabalhos de dezembro de 1999 a agosto de 2012, onde Liu et al. (2013) relacionaram o uso de estatina e o aumento da massa óssea medida por densitometria. Estes autores concluíram que a estatina pode auxiliar no aumento e/ou manutenção do tecido ósseo, tendo um importante papel na formação do osso.

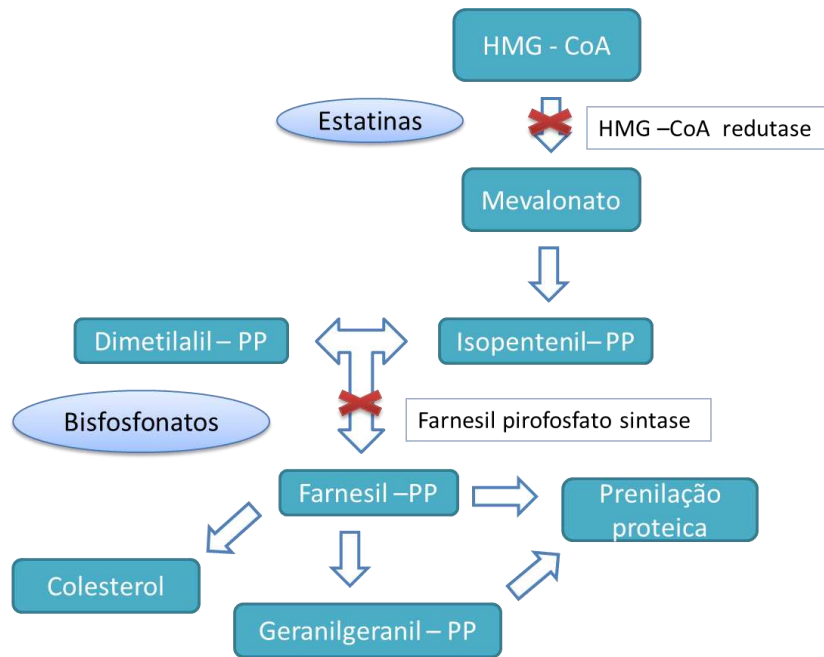


Figura 2 – Diagrama da via do mevalonato - mecanismo de ação das estatinas e bisfosfonatos na cascata da prenilação de proteínas (Adaptado de Rogers et al., 2011).

Os flavonóides são compostos polifenólicos naturais encontrados em alimentos, principalmente nas verduras e frutos. São compostos cuja síntese não ocorre na espécie humana, entretanto possuem uma série de propriedades farmacológicas sobre sistemas biológicos (Peterson e Dwyer, 1998; Nijveld et al., 2001; Imai et al., 2004).

Efeitos favoráveis dos flavonóides à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos foram demonstrados por Katai et al. (1992) e Cheng et al. (1994), enquanto inibição da absorção óssea foi observada por Notoya et al. (1993) e Albanese et al. (1994).

O flavonóide ipriflavona preveniu a perda de massa óssea em pacientes com osteoporose e provocou decréscimo no *turnover* ósseo resultante de hipogonadismo (Gambacciany et al., 1994). Adicionalmente, a capacidade da ipriflavona de induzir aumento de massa óssea após 12 meses de tratamento em mulheres osteoporóticas foi descrita por Cecchetti et al. (1995). A utilização da ipriflavona em ratas ovariectomizadas, durante 30 dias, preveniu completamente a perda da densidade óssea do fêmur e aumentou as taxas de formação óssea, avaliadas por histomorfometria (Arjmandi et al., 2000).

O mecanismo envolvido na ação modulatória dos flavonóides em células do tecido ósseo parece envolver atividade antirreabsortiva (Azria et al., 1993; Passeri et al., 1995). Entretanto, Garcia et al. (2005) atribuíram os efeitos inibidores da formação de osteoclasto e redutores de perda de massa óssea deisoflavonas à leve atividade estrogênica de seus metabólitos (Imai et al., 2004).

Recomendam-se modelos animais específicos para a avaliação de agentes farmacológicos para o tratamento da osteoporose clínica (Thompson et al., 1995), sendo a ovariectomia e o uso de glicocorticóide os mais utilizados. Estes modelos permitem estudar a diminuição óssea e a consequente perda de resistência, como também validar estratégias terapêuticas (Bagi et al., 1995), por intermédio de parâmetros bioquímicos, estudos histomorfométricos, densitometria óssea, entre outros (Thorndike e Turner, 1998;Pinto et al., 2005; Ferreira Jr. et al., 2008).

A ovariectomia em ratas adultas propicia marcante redução nas concentrações endógenas de estrógeno, o que acarreta aumento da perda óssea e osteopenia (Wronski et al.,1988; Dempster et al., 1995). Segundo Hughes et al. (1996), o estrógeno é responsável por promover a apoptose de osteoclastos e além disso, quando interage com o receptor osteoblástico inibe a liberação de fatores estimuladores dos osteoclastos ou o aumento de atividade inibidora dos mesmos. Segundo Weinstein e Manolagas (2000), o estrógeno além de ser responsável por induzir apoptose dos osteoclastos pode atuar também,em menor intensidade, provocando apoptose de osteoblastos, acelerando a perda de tecido ósseo. A evidência da osteoporose pode ser obtida aos 60 dias pós-ovariectomia em ratas (Uyar et al., 2009). Características idênticas em relação à perda óssea entre ratas ovariectomizadas e mulheres na pós-menopausa foram observadas, o que possibilita a utilização de ratas ovariectomizadas como modelo experimental para investigar agentes que auxiliem na prevenção da osteoporose humana (Kalu, 1991; Barlet et al., 1994).

O uso crônico de glicocorticóide é a causa secundária mais comum de osteoporose. Nesse caso, ao contrário da osteoporose pós-menopausa, ocorre diminuição acentuada no número de osteoblastos e perda de desenvolvimento da sua principal função nos ossos (Weinstein, 2011).

A indução da osteoporose em ratas foi obtida por Southard et al. (2000) por administração do glicocorticoide dexametasona por via intramuscular durante quatro semanas. A ação dos glicocorticóides (Figura 3) resulta da alteração da atividade

metabólica e proliferativa das células ósseas pela potente repressão da função osteoblástica, por induzir sua apoptose e, provavelmente, estimulação da maturação dos osteoclastos (Brandli et al., 1991; Patschan et al., 2001; Canalis et al., 2007). Adicionalmente, o processo pelo qual o glicocorticóide pode induzir a osteoporose pode ser explicado pelo balanço negativo de cálcio devido a mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal, o que pode levar ao hiperparatireoidismo secundário (Bikle et al., 1993; Reid, 1997).

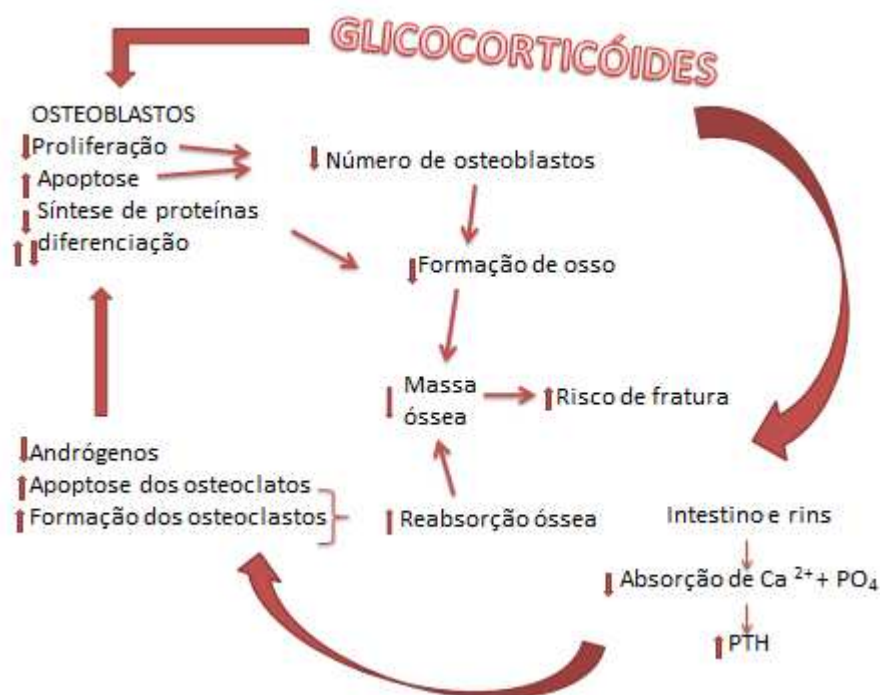


Figura 3 – Mecanismos que resultam em perda óssea pelo uso glicocorticóide (Adaptado de Reid, 2000)

A necessidade de combinar mais de um agente é consequência da inabilidade das terapias atuais de proteger os pacientes osteoporóticos das fraturas durante longos períodos (Garcés e García, 2006) e da impossibilidade da utilização de um único medicamento devido a questões de intolerância ou resistência do organismo (Pinkerton e Dalkin, 2007). Entretanto poucos dados a cerca de uso combinado de medicamentos são disponíveis.

A associação medicamentosa objetiva obter resultados mais satisfatórios no combate à enfermidade. Na osteoporose, por haver agentes atuantes no osso com diferentes mecanismos de ação, antirreabsortivo e formadores de osso seria,

teoricamente, esta uma forte razão para utilizá-los conjuntamente. No entanto, os primeiros estudos não se mostraram tão promissores, segundo Black et al. (2003).

A grande maioria dos estudos tem associado formadores de osso e antirreabsortivos, como por exemplo, hormônio da paratireóide (PTH) e bisfosfonato. Entretanto, segundo Audran (2006) a interação desses dois agentes mostrou-se pouco eficiente.

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

Outros estudos tem associado bisfosfonatos, moduladores seletivos do receptor estrogênico, PTH, estrógeno isolado e associado com progesterona e calcitonina (Pinkerton e Dalkin, 2007).

Os parâmetros bioquímicos sanguíneos são utilizados, hoje em dia, nas avaliações de efetividade de drogas para tratamento da osteoporose, além de terem trazido grandes contribuições científicas sobre fisiologia e fisiopatologia do tecido ósseo (Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002).

As proteínas plasmáticas, devido à sua íntima relação com o metabolismo hepático e às interações com outros tecidos por todo o corpo, ocupam posição central na avaliação do metabolismo proteico (Coles, 1984). A mensuração das proteínas plasmáticas poderia ser indicativo de efeito anabólico no metabolismo proteico, além de poder indicar plena atividade do fígado (Roughead, 2003). Na avaliação do tratamento da osteoporose poderia sinalizar a recuperação ou aumento do tecido ósseo. O padrão de normalidade para as proteínas totais em ratas Wistar são 6,6 a 8,6 g/dL (Diniz et al., 2006); 5,8 a 7,8 g/dL (Harkness e Wagner, 2010) e 6,1 a 7,4 g/dL (Branco et al., 2011).

A albumina, entre as proteínas plasmáticas, é a mais abundante, correspondendo a 50% do total de proteínas (González e Scheffer, 2002). Sintetizada no fígado pelos hepatócitos e catabolizada nos tecidos periféricos, a albumina é a principal responsável pela pressão osmótica intravascular (Fenner, 2003). Em ratas Wistar foram descritos como padrão de normalidade 3,2 a 4,5 mg/dL (Nunes et al., 2004); 3,0 a 4,5 mg/dL (Diniz et al., 2006); 3,8 a 4,8 mg/dL (Harkness e Wagner, 2010) e 3,0 a 3,2 mg/dL (Branco et al., 2011).

O cálcio participa ativamente na estrutura dos ossos e dentes, sendo o elemento presente em maior quantidade na molécula da hidroxiapatita, representando cerca de 20% ou mais do peso de um osso. A concentração plasmática de cálcio é regulada pelas ações do paratormônio (PTH), calcitonina e vitamina D nos ossos, rins e intestino. A queda nesta concentração estimula a secreção de PTH pela paratireoide que, conjuntamente com a vitamina D, mobiliza cálcio dos ossos, aumenta a absorção intestinal e estimula a sua reabsorção nos rins, normalizando a concentração de cálcio. No entanto, quando a concentração de cálcio está elevada, o hormônio calcitonina é secretado, depositando cálcio nos ossos ou excretando-o na urina.

Além dessa função estrutural, o cálcio está envolvido diretamente na contração da musculatura cardíaca, esquelética e lisa, indiretamente na passagem de estímulos nervosos pelo neurônio e está relacionado com a coagulação sanguínea (Horst, 1986). Em ratas Wistar os valores de normalidade descritos são 5,2 a 11,2 (Nunes et al., 2004); 5,0 a 9,3mg/dL (Diniz et al., 2006); 5,1 a 13mg/dL (Harkness e Wagner, 2010) e 5,2 a 9,7mg/dL (Branco et al., 2011).

Cerca de 80% do fósforo se encontra presente nos ossos e dentes, na forma complexada com o cálcio, representando 10% do peso de um osso; os outros 20% se distribuem principalmente no interior das células sanguíneas, hepáticas e de outros órgãos, sendo baixos os níveis de fósforo nos fluidos intersticial e plasma (Horst, 1986). A sua concentração é associada ao cálcio, visto a correlação existente entre eles. Segundo Nakano et al. (2000), o padrão de normalidade em ratas Wistar varia de 6,2 a 8,5 mg/dL.

O estudo do perfil metabólico das enzimas no plasma sanguíneo é de grande ajuda diagnóstica (González e Scheffer, 2002), refletindo os teores dessas enzimas em diferentes órgãos, tecidos ou células. Entretanto enzimas tecido-específicas são mais úteis como teste diagnóstico. O aumento da atividade sérica de enzimas ocorre devido ao extravasamento pelas células lesionadas ou ao aumento da produção enzimática nos tecidos (Baker et al., 2007).

A aspartatoaminotransferase (AST) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial, presente em vários tecidos como fígado, músculo esquelético e cardíaco. Em todas as espécies domésticas, a atividade AST é alta no fígado; portanto na presença de lesão hepática aguda ou crônica a atividade sérica de AST estará elevada (Frape, 1994).

A alanina aminotransferase (ALT) é encontrada no plasma e em vários tecidos corporais, mas é geralmente associada ao fígado. Esta enzima é liberada no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito, resultando em aumento da permeabilidade, mas há baixa correlação entre o grau de lesão hepatocelular e o nível das aminotransferases. Assim, a elevação absoluta das aminotransferases tem grande significado diagnóstico, e não prognóstico, nas hepatopatias agudas (Frape, 1994).

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima associada à membrana celular, que está amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada em altas concentrações nos ossos, na mucosa intestinal, nas células tubulares renais, no fígado e na placenta (Coles, 1984). O aumento da produção de fosfatase alcalina e de sua concentração sérica está associado, entre outras, à maior atividade osteoblástica e várias doenças crônicas (Baker et al., 2007).

Existe uma isoforma da FA específica para o osso denominada fosfatase alcalina óssea (FAO). Secretada pelos osteoblastos, é encontrada em maior concentração plasmática desde a infância até o fim do crescimento longitudinal, quando então a hepática passa a ser a forma circulante mais abundante (Saraiva e Lazaretti-Castro, 2002). AFAO é considerada marcador de formação óssea importante, pois, além de não sofrer influências hepáticas, é mais sensível a pequenas variações no *pool* circulante (Bikle, 1997 ; Vieira, 1999).

No estudo de Linder et al. (2013) foi feita a caracterização das isoformas da FA total em ratos, no qual os autores constataram que as isoformas ósseas presentes no soro dos ratos eram idênticas as do soro humano, indicando, assim, a utilidade desses animais como modelos experimentais para a mensuração da FAO.

A densidade mineral óssea areal (DMO_{areal}) pode explicar até 80% da variabilidade da resistência mecânica do osso e, uma diminuição desta densidade, possui um forte correlação com a fratura em osteoporose (Bell et al., 1967; Mcbroom et al., 1985; Mosekilde et al., 1987; Cortet et al., 1995). A densitometria óssea é referida como um recurso de utilidade para o diagnóstico e orientação terapêutica com vistas ao tratamento de doenças osteometabólicas, estudos de reparações ósseas e procedimentos cirúrgicos (Louzada et al., 2001), na avaliação da eficácia de tratamentos para a osteoporose (Svendsen et al., 1995; Cosman et al., 2001) e para avaliar agentes farmacológicos que agem no aumento da densidade mineral óssea areal por suprimirem o *turnover* ósseo (Jerome e Peterson, 2001).

A utilização da absorção de raios-X de dupla energia (DXA®) para medição da DMO_{areal} é reconhecida como o melhor método não-invasivo (Fogelman e Ryan, 1992), tendo como características favoráveis a velocidade, precisão e baixa exposição à radiação. Analisá-la é de fundamental importância, pois relaciona os valores encontrados com a fragilidade e consequentes lesões ósseas (Prado Filho e Sterman, 2004).

Testes biomecânicos podem também ser considerados de grande importância para estudos da osteoporose pelas informações sobre força máxima e rigidez. *In vivo* o osso é equipado por um sistema mecanosensorial que facilita a adaptação do esqueleto à carga, possibilitando suportar a contração muscular e a gravidade induzida por forças mecânicas, sem que ocorra fratura, permitindo a locomoção (Leppanen et al., 2008; Sehmisch et al., 2009).

Os ossos possuem propriedades elásticas e plásticas. Pelas propriedades elásticas, o osso absorve energia, sendo reversível, ou seja, o osso sofre deformação, mas volta à normalidade. Quando a carga imposta exceder a capacidade da deformação elástica, essa passa a ser denominada plástica por ser permanente (Seeman et al., 2008). Os ossos também possuem propriedades estruturais como rigidez ou flexibilidade, resistência à flexão, torção e compressão e tenacidade (Borer, 2005). A rigidez reflete a resistência estrutural elástica do osso após a aplicação de uma carga. A tenacidade corresponde à energia absorvida pelo osso antes de fraturar e a força máxima indica a maior força aplicada ao osso até a fratura (Borer, 2005; Guadalupe-Grau et al., 2009).

Força máxima e rigidez são importantes propriedades que expressam o enfraquecimento do osso e maior risco de fraturas. Segundo Sedlin e Hirsch (1966) os fatores que influenciam os resultados das propriedades mecânicas no osso, sofrem dependência direta do tipo de osso analisado, da reparação óssea, condições de armazenamento da amostra e tratamentos aos quais os animais foram submetidos. A porosidade em materiais estruturais exerce forte influência nas propriedades mecânicas (Hashin, 1962; Brown, 1964). Nos ossos esse fato também pode ser considerado, assim a força e a rigidez variam inversamente com o aumento da porosidade, ou seja, em indivíduos osteoporóticos. O inverso costuma ocorrer, melhoras nas propriedades mecânicas, com o aumento da densidade óssea (Galante, 1970; Evans, 1973; Carter e Hayes, 1977; Martin, 1993). Assim, tem-se que

menor força e rigidez óssea aumentam a probabilidade para a ocorrência da fratura (Lirane – Galvão e Castro, 2010).

Avaliações ósseas pela histomorfometria permitem análises estática e dinâmica, bem como a detecção de alterações tissulares na unidade metabólica óssea, particularmente em osso trabecular, tornando possível a avaliação patológica da mesma com a definição do elemento funcional predominante (Borelli, 1998; Pinto et al., 2005). A histomorfometria se caracteriza por ser um método de extrema valia utilizado para a verificação da remodelação óssea, precisando a extensão da perda óssea e das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo, sendo capaz de identificar alterações osteometabólicas como a osteoporose (Junqueira e Carneiro, 2008). Este método é considerado padrão-ouro para a quantificação da remodelação óssea (Eastell et al., 1988; Eriksen et al., 1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e manejo

Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela CEUA da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob o protocolo número 85/2012.

Procedentes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, 108 ratas da raça *Wistar* com 30 dias de idade foram mantidas no Laboratório de Biofarmacosem ambiente climatizado à temperatura média de 22°C, com período de luz de 12 horas, em *rack* ventilado (Alesco), contendo 36 caixas, que foram higienizadas três vezes por semana.

As ratas tiveram livre acesso à água e à ração padronizada comercial para ratos de laboratório, desde 30 dias até 6 meses, quando atingiram a idade adulta e o peso corporal de 250 ± 20 g. Neste momento foi efetuada a indução de osteoporose em 96 ratas, sendo que em 48 ratas por ovariectomia e em 48 com o uso de glicocorticóide intramuscular. Doze ratas foram mantidas sem indução, sendo que seis foram submetidas ao estresse de aplicação intramuscular de solução fisiológica e seis submetidas a SHAM cirurgia.

3.2. Preparo da medicação

Os fármacos alendronato, atorvastatina, ipriflavona e suas associações foram adquiridos de farmácia de manipulação comercial, bem como os veículos administrados ao grupo sem medicação. O volume diário administrado aos animais, 0,03mL, continha as doses dos medicamentos de cada tratamento (0,06 mg de alendronato, 0,36 mg de atorvastatina ou 30 mg de ipriflavona para as drogas individuais; 0,03 mg de alendronato + 0,18 mg de atorvastatina, 0,03 mg de alendronato + 15 mg de ipriflavona ou 0,18 mg de atorvastatina + 15 mg de ipriflavona para as associações duplas; 0,02 mg de alendronato + 0,12 mg de atorvastatina + 10 mg de ipriflavona para a associação tripla).

3.3. Indução por ovariectomia ou pelo uso de glicocorticoide e tratamentos

A ovariectomia foi realizada em 48 animais por incisão retroumbilical, dando acesso à cavidade abdominal, sob anestesia geral, utilizando da associação de quetamina e xilazina nas doses de 33 e 13mg/Kg de peso corporal, respectivamente (Anbinder et al., 2007). Para a indução com glicocorticoide, em 48 animais, foi administrado semanalmente dexametasona, por via intramuscular, na dose de 7,5 mg/Kg de peso corporal, durante cinco semanas (Southard et al., 2000).

Os animais induzidos foram distribuídos aleatoriamente e mantidos nas caixas, recebendo água e alimentação diariamente.

Após 75 dias da cirurgia (Uyaret al., 2009) e ao final da quinta semana da administração da dexametasona, os animais foram medicados com três fármacos isolados ou suas associações, perfazendo oito tratamentos com seis repetições para cada forma de indução: o controle, composto por ratas ovariectomizadas sem medicação, que receberam 0,03 mL do veículo; os animais tratados com 0,06 mg de alendronato (D1), 0,36 mg de atorvastatina (D2); 30 mg de ipriflavona (D3), 0,03 mg de alendronato + 0,18 mg de atorvastatina (D1+D2); 0,03 mg de alendronato + 15 mg de ipriflavona (D1+D3), 0,18 mg de atorvastatina + 15 mg de ipriflavona (D2+D3) e 0,02 mg de alendronato + 0,12 mg de atorvastatina + 10 mg de ipriflavona (D1+D2+D3). Todos os fármacos e suas associações foram administrados diariamente por via oral, em 0,03 mL de veículo, durante 30 dias.

3.4. Eutanásia e coleta dos ossos

Ao final do experimento os animais foram submetidos à eutanásia com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 50mg/Kg de peso corporal) e os ossos de cada animal (tíbia e fêmur) esquerdos e direitos foram isolados e coletados para posteriores análises.

3.5. Parâmetros Bioquímicos

Imediatamente antes dos animais serem eutanasiados, foram coletados através de punção da veia cava caudal 5mL de sangue em tubos *vacutainer* com acelerador de coagulação. Em seguida, procedeu-se à centrifugação em 1.765xg durante cinco minutos. O soro obtido foi utilizado para as dosagens dos níveis séricos de cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e fosfatase alcalina óssea (FAO).

As dosagens sorológicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Zootecnia da UFV, utilizando o analisador bioquímico automático BS 200E, marca Mindray, para cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, aspartatoaminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA). Para a mensuração da FAO, foi utilizado o equipamento de quimioluminescência *Access Immunoassay System da Beckman Coulter*. As quantificações de cálcio e fósforo foram efetuadas através de reação colorimétrica de ponto final e leitura a 600 a 680nm e 340nm, respectivamente, sendo os resultados expressos em mg/dL. A albumina e as proteínas totais foram avaliadas por método colorimétrico com leitura a 630nm e 545nm, respectivamente, e os resultados expressos em g/dL. As enzimas AST, ALT e FA foram analisadas pelo teste cinético. As leituras foram efetuadas a 340nm para AST e ALT e a 405nm para FA e os resultados expressos em UI/L. Os resultados da análise de FAO foram expressos em pg/mL.

3.6. Análise Densitométrica

A tíbia e o fêmur direitos de cada animal foram identificados e envolvidos em gaze umedecida com solução fisiológica e conservados em *freezer* a -20°C . Para a análise densitométrica, os ossos foram transferidos para refrigerador comum, sendo mantidos por 24 horas. Em seguida, permaneceram à temperatura ambiente até atingir equilíbrio térmico, quando foram analisados, na Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - Unesp / Campus de Araçatuba, utilizando densitômetro ósseo de Raio-X com Smart Scan modelo DPX-ALPHA, com *software* especial para pequenos animais.

A densidade mineral óssea areal ($\text{DMO}_{\text{areal}}$), em g/cm^2 , foi mensurada pelo conteúdo mineral ósseo (CMO), expresso em g, e pela área, expressa em cm^2 , segundo a seguinte relação: $\text{DMO}_{\text{areal}} = \text{CMO} / \text{ÁREA}$. Valores esses obtidos automaticamente pelo sistema após o delineamento digital dos ossos escaneados.

3.7. Testes Biomecânicos

O fêmur direito de cada animal foi identificado e envolto em gaze umedecida em solução fisiológica e armazenado em *freezer* a -20°C . Para obtenção da força máxima e rigidez os testes mecânicos, flexão simples em três pontos (terço médio da diáfise do fêmur) e flexo-compressão na região proximal do fêmur (colo do fêmur), foram realizados na máquina universal de ensaio EMIC[®], modelo DL 3000* do Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia – UNESP/Araçatuba – SP com carga aplicada a uma velocidade de 5mm/min (Vicentini et al., 2007).

O ensaio de flexão de três pontos consistiu em apoiar o fêmur horizontalmente entre dois suportes distanciados entre si em 20 mm e a carga de 2000N aplicada no centro da amostra. O computador automaticamente registrou a deformação correspondente a cada incremento de carga aplicada. Construiu-se um gráfico carga vs deformação que possibilitou a obtenção da força máxima que é a maior força aplicada à amostra e da rigidez que é dada pela inclinação da curva na fase elástica. Quanto maior a rigidez menor a deformação resultante da aplicação da carga.

No colo do fêmur foi realizada a flexo-compressão sendo a amostra fixada verticalmente em um aparato mecânico, sendo calculado os mesmos parâmetros, força máxima e rigidez.

3.8. Exame Histomorfométrico

Para o estudo histomorfométrico, a tíbia e o fêmur esquerdos de cada animal foram coletados e mantidos em formol 10% neutro tamponado, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, foram descalcificados e processados rotineiramente para estudo histológico.

Foi utilizada a coloração de hematoxilina e eosina e aplicado o método de cálculo planimétrico por contagem de pontos para avaliação do volume trabecular ósseo (VTO).

O percentual do volume trabecular ósseo dos animais experimentais foi efetuado conforme Pinto et al. (2006). O cálculo do volume ocupado foi obtido a partir de uma imagem amostral de osso trabecular imediatamente abaixo da linha de crescimento, excluindo tecido cartilaginoso, de cada corte histológico do fêmur e da tíbia, em microscópio óptico equipado com câmara digital (Olympus Biological BX53). Estas imagens foram analisadas através do sistema para análises de imagem Image-Pro Plus versão 4.5.0.29, com aumento final de 200X. Uma grátícula composta por 494 interseções foi aplicada sobre a imagem, sendo uma área de 100 interseções isolada para a mensuração. Estas interseções foram computadas como pontos coincidentes à trabécula óssea ou ao espaço intertrabecular. Realizou-se 6 repetições, sendo, assim, para cada animal, computados um total de 600 pontos, perfazendo, portanto, 3600 pontos por grupo de 6 animais de cada tratamento.

3.9. Análise Estatística

A osteoporose foi induzida por ovariectomia em um grupo de 48 animais e por glicocorticóide em outro grupo de 48 animais. Os animais de cada grupo receberam oito tratamentos, segundo delineamento inteiramente casualizado, resultando em seis repetições por tratamento. Os índices bioquímicos séricos e os parâmetros ósseos dos grupos induzidos medicados foram comparados aos grupos sem

medicação (induzido por ovariectomia ou glicocorticoide), utilizando o procedimento GLM do SAS e o teste de Dunnett.

Dois grupos de seis animais cada foram mantidos sem indução e foram utilizados como referência para comparação com os grupos induzidos (por ovariectomia ou por glicocorticoide) sem medicação. O intervalo de confiança da média foi utilizado para comparar os índices bioquímicos séricos e parâmetros ósseos entre esses grupos. Diferença significativa entre as situações foi considerada no caso de ausência de sobreposição entre os intervalos de confiança das médias.

O efeito dos métodos de indução de osteoporose foi avaliado utilizando-se o intervalo de confiança das médias dos índices bioquímicos séricos e parâmetros ósseos dos grupos induzidos por ovariectomia ou glicocorticoide. Diferença significativa entre métodos foi considerada no caso de ausência de sobreposição entre os intervalos de confiança das médias.

Para todos os procedimentos estatísticos adotou-se $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2 as médias e os limites inferior e superior dos intervalos de confiança para os parâmetros bioquímicos dos grupos sem indução e com osteoporose induzida por ovariectomia ou glicocorticoide, respectivamente. Observa-se não haver diferença significativa ($P > 0,05$) dos parâmetros bioquímicos entre os grupos sem indução e com osteoporose induzida, seja por ovariectomia ou glicocorticoide. Trabalhos de Pinto et al. (2006), Ferreira Jr. et al. (2008) e Sequetto (2008) também demonstraram esse comportamento.

TABELA 1 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança para os parâmetros bioquímicos dos grupos sem indução e com osteoporose induzida por ovariectomia

Variável	Método	Média	EPM	Limite Inferior	Limite Superior
Prot. Totais (g/dL)	S/indução	8,3	0,70	6,8	9,6
	OSH	7,0	0,33	6,3	7,7
Albumina (g/dL)	S/indução	4,1	0,30	3,4	4,7
	OSH	3,2	0,11	2,9	3,5
Cálcio (mg/dL)	S/indução	10,2	0,20	9,8	10,6
	OSH	10,0	0,19	9,6	10,4
Fósforo (mg/dL)	S/indução	7,9	0,60	6,7	9,1
	OSH	6,2	0,30	5,6	6,8
AST (U/L)	S/indução	127,5	26,9	73,2	181,8
	OSH	71,6	8,7	54,0	89,2
ALT (U/L)	S/indução	46,2	6,5	39,7	52,7
	OSH	30,7	4,7	21,2	40,2
FA (U/L)	S/indução	68,8	15,2	38,1	99,5
	OSH	78,6	16,7	44,7	112,5

médias seguidas por () diferem em relação ao grupo sem indução (P<0,05).

TABELA 2 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança para os parâmetros bioquímicos dos grupos sem indução e com osteoporose induzida por glicocorticoide

Variável	Método	Média	EPM	Limite Inferior	Limite Superior
Prot. Totais (g/dL)	S/indução	9,2	0,81	7,6	10,8
	Glico	8,5	0,32	7,8	9,2
Albumina (g/dL)	S/indução	4,3	0,32	3,6	4,9
	Glico	3,5	0,12	3,3	3,7
Cálcio (mg/dL)	S/indução	10,3	0,30	9,7	10,9
	Glico	9,3	0,24	8,8	9,8
Fósforo (mg/dL)	S/indução	8,4	0,75	6,9	9,9
	Glico	6,6	0,33	5,9	7,6
AST (U/L)	S/indução	144,5	26,8	90,4	198,6
	Glico	88,0	12,2	63,4	112,6
ALT (U/L)	S/indução	48,0	4,3	39,3	56,7
	Glico	29,2	5,7	17,7	40,7
FA (U/L)	S/indução	61,0	16,8	27,1	94,9
	Glico	88,8	15,3	57,9	119,7

médias seguidas por () diferem em relação ao grupo sem indução (P<0,05).

Ressalta-se que as concentrações de cálcio e de fósforo se mantiveram dentro da normalidade tanto para os animais com osteoporose induzida como para os que não foram submetidos à indução, o que condiz com Amadei et al. (2006) e Motta (2009) que destacam não haver alteração, em humanos, nas concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo na osteoporose. Esse resultado pode ser explicado pelos processos envolvidos no controle de cálcio e fósforo, visto que suas concentrações são dependentes. A homeostase de cálcio e fósforo envolve a interação coordenada de três sistemas de órgãos – ossos, intestino e rins- e de três

hormônios – paratormônio, calcitonina e vitamina D. Qualquer alteração sanguínea de cálcio é rapidamente corrigida principalmente pelo hormônio da paratireóide (PTH). Assim, quando a concentração de cálcio no sangue é baixa, o PTH e a vitamina D mobilizam cálcio dos ossos, aumentam a absorção intestinal e estimulam a reabsorção nos rins, normalizando a concentração. Em contrapartida, quando a concentração é alta, a calcitonina assegura que o cálcio seja deslocado de volta para os ossos ou excretado pela urina (Guyton e Hall, 2002; Koeppen e Stanton, 2009).

Não houve alteração na concentração plasmática de FA resultante da osteoporose, entretanto na literatura observam-se controvérsias. Segundo Motta (2009) e Saraiva e Lazaretti-Castro (2002), alterações não são frequentes, mantendo-se a concentração sérica dentro dos valores de normalidade. A mensuração de FA sérica inclui os teores da isoforma da FA específica para o osso denominada fosfatase alcalina óssea (FAO), que, sendo secretada pelos osteoblastos, pode apresentar aumento em casos de remodelação óssea (Christiasen et al., 1999 ; Kress et al., 1999). Assim, a FA sérica poderia acompanhar esse perfil; entretanto, alguns autores (Pinheiro, 2009; Fernandes et al., 2014) descreveram diminuição da FAO com a remodelagem. Segundo Allen (2003), a interpretação da FA total é complicada por poder ser afetada pelas variantes óssea, intestinal, renal e hepática, não se recomendando a sua utilização como marcador da remodelação óssea. Para Stepan et al. (1987), Hill et al. (1989) e Devareddy et al. (2008), apesar da atividade da FA plasmática não ser específica do tecido ósseo, pode ser utilizada como indicador da taxa de formação óssea por poder estar aumentada devido ao processo de remodelação óssea, refletindo a taxa de formação óssea.

Essa ausência de efeito da osteoporose sobre os parâmetros bioquímicos tem implicação prática, lançando questionamento sobre a efetividade de sua utilização para avaliação de estados osteoporóticos.

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentados as médias e os limites inferior e superior dos intervalos de confiança dos parâmetros ósseos para os grupos sem indução e com indução da osteoporose por ovariectomia ou glicocorticoide, respectivamente. Podem-se destacar as diferenças entre os grupos não induzido e com indução por ovariectomia ou glicocorticoide ($P < 0,05$) para a densidade mineral óssea areal, seja do fêmur ($DMO_{f_{areal}}$) ou da tíbia ($DMO_{t_{areal}}$). Redução da densidade óssea nos

animais osteoporóticos em relação aos grupos sem indução também foram observados por Guillerminet et al. (2009), Zhao et al. (2011) e Khan et al. (2013). Segundo Mosekilde et al. (1987) e Holroyd et al.(2008), na osteoporose o *turnover* ósseo desequilibrado leva à absorção mais acentuada que a formação de tecido ósseo, o que reduz o conteúdo mineral ósseo, aumentando o risco de fraturas. Assim, a mensuração da densidade mineral óssea areal é considerado o melhor método, não invasivo, para prever fraturas, devido à forte relação existente entre a DMO_{areal} e a osteoporose (Fogelman e Ryan, 1992).

TABELA 3 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança dos intervalos de confiança da densidade mineral óssea areal, força máxima, rigidez e volume trabecular ósseo para os grupos sem indução e com osteoporose induzida por ovariectomia

Variável	Método	Média	EPM	Limite Inferior	Limite Superior
$DMO_{f_{areal}}$ (g/cm ²)	S/indução	0,195	0,02	0,155	0,235
	OSH	0,130*	0,006	0,118	0,142
$DMO_{t_{areal}}$ (g/cm ²)	S/indução	0,146	0,007	0,136	0,160
	OSH	0,103*	0,006	0,097	0,109
FM_{colo} (N)	S/indução	113,1	7,8	97,3	128,9
	OSH	94,0	8,0	77,8	110,2
$FM_{diáfise}$ (N)	S/indução	134,5	7,5	119,3	149,7
	OSH	116,3	6,5	103,1	129,5
RIG_{colo} (x10 ³ N/m)	S/indução	370,2	34,4	300,7	439,7
	OSH	255,8	39,7	175,6	336,0
$RIG_{diáfise}$ (x10 ³ N/m)	S/indução	217,1	19,4	177,9	256,3
	OSH	183,1	13,5	155,8	210,4
VTO	S/indução	66,5	2,7	61,0	72,0
Fêmur %	OSH	27,0*	3,0	21,0	33,0
VTO	S/indução	65,5	2,7	60,0	71,0
Tíbia%	OSH	24,5*	2,4	19,7	29,3

médias seguidas por () diferem em relação ao grupo sem indução (P<0,05).

TABELA 4 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança da densidade mineral óssea areal, força máxima, rigidez e volume trabecular ósseo para os grupos sem indução e com osteoporose induzida por glicocorticoide

Variável	Método	Média	EPM	Limite Inferior	Limite Superior
DMOf _{areal} (g/cm ²)	S/indução	0,208	0,01	0,188	0,228
	Glico	0,117*	0,005	0,112	0,122
DMOt _{areal} (g/cm ²)	S/indução	0,149	0,007	0,136	0,164
	Glico	0,107*	0,006	0,101	0,113
FM _{colo} (N)	S/indução	101,9	16,2	69,2	134,7
	Glico	94,6	6,8	80,9	108,3
FM _{diáfise} (N)	S/indução	130,2	7,4	115,3	145,1
	Glico	119,6	5,5	108,5	130,7
RIG _{colo} (x10 ³ N/m)	S/indução	379,2	35,6	307,3	451,0
	Glico	282,7	42,8	196,2	369,2
RIG _{diáfise} (x10 ³ N/m)	S/indução	281,9	29,3	159,7	278,1
	Glico	175,9	15,4	144,8	207,0
VTO	S/indução	67,0	2,6	61,8	72,3
Fêmur %	Glico	28,0*	2,7	22,5	33,5
VTO	S/indução	66,0	3,4	53,1	72,9
Tíbia %	Glico	27,8*	1,9	24,0	31,6

médias seguidas por () diferem em relação ao grupo sem indução (P<0,05).

A força máxima e rigidez não foram afetadas (P>0,05) pela osteoporose induzida por ovariectomia ou por glicocorticoide quando comparados ao grupo sem indução. No presente trabalho ratas osteoporóticas apresentaram valores de força máxima e de rigidez próximos aos obtidos por Guillerminent et al. (2010) e Zhao et al. (2011) de 98±7,5N e 167±20x10³N/m, respectivamente. A ausência de efeito da ovariectomia sobre estas variáveis foi descrita por Guillerminent et al. (2010); Silva et al (2009) e Zhao et al. (2011). Entretanto, Dai et al. (2008) e Huang et al. (2008) relataram que ratas ovariectomizadas tiveram a resistência óssea reduzida em comparação aos grupos SHAM, após seis meses a cirurgia. Ressalte-se que no presente trabalho os animais iniciaram a medicação 75 dias após a cirurgia. Khan et al. (2013) demonstraram que o uso de glicocorticoide reduziu a força máxima e rigidez no teste de flexão de três pontos, diferindo do que foi encontrado neste estudo.

Observou-se diminuição (P<0,05) do volume trabecular ósseo em ratas osteoporóticas, semelhante aos resultados de Pinto et al. (2006), Ferreira Jr. et al. (2008), Sequetto (2008) e Fernandes (2010). O aumento da reabsorção na osteoporose leva ao estreitamento das trabéculas ósseas (Borelli, 1998), aumentando a porosidade do osso, e conseqüentemente, sua fragilidade (Eriksen et al., 1993).

As Tabelas 5 e 6 apresentam as médias e os limites inferior e superior dos intervalos de confiança para os parâmetros bioquímicos e ósseos, respectivamente dos grupos induzidos por ovariectomia ou glicocorticoide. A sobreposição em todos os intervalos de confiança das médias possibilitou inferir que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os métodos de indução.

TABELA 5 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança dos parâmetros bioquímicos dos grupos osteoporóticos induzidos por ovariectomia ou glicocorticoide.

Variável	Método	Média	EPM	Limite Inferior	Limite Superior
Prot. Totais (g/dL)	Glico	8,5	0,32	7,8	9,2
	OSH	7,3	0,33	6,6	8,0
Albumina (g/dL)	Glico	3,5	0,12	3,3	3,7
	OSH	3,2	0,11	3,0	3,4
Cálcio (mg/dL)	Glico	9,3	0,24	8,8	9,8
	OSH	10,0	0,19	9,6	10,4
Fósforo (mg/dL)	Glico	6,6	0,33	5,9	7,3
	OSH	6,2	0,30	5,6	6,8
AST (U/L)	Glico	88,0	12,2	63,4	112,6
	OSH	71,6	8,7	54,0	89,2
ALT (U/L)	Glico	29,2	5,7	17,7	40,7
	OSH	30,7	4,7	21,2	40,2
FA (U/L)	Glico	88,8	15,3	57,9	119,7
	OSH	78,6	16,8	44,7	112,5
FAO (pg/dL)	Glico	7,8	1,6	4,57	11,0
	OSH	5,9	1,0	3,93	7,97

* médias seguidas por (*) diferem os métodos de indução ($P < 0,05$).

TABELA 6 – Médias e limites inferior e superior dos intervalos de confiança da densidade mineral óssea areal, força máxima, rigidez e volume trabecular ósseo dos grupos osteoporóticos induzidos por ovariectomia ou glicocorticoide.

Variável	Método	Média	EPM	Limite Inferior	Limite Superior
DMOf _{areal} (g/cm ²)	Glico	0,117	0,005	0,112	0,122
	OSH	0,130	0,006	0,118	0,142
DMOt _{areal} (g/cm ²)	Glico	0,107	0,006	0,101	0,113
	OSH	0,103	0,006	0,097	0,109
FM _{colo} (N)	Glico	94,6	6,8	80,9	108,3
	OSH	94,0	8,0	77,8	110,2
FM _{diáfise} (N)	Glico	119,6	5,5	108,5	130,7
	OSH	116,3	6,5	103,1	129,5
RIG _{colo} (x10 ³ N/m)	Glico	282,7	42,8	196,2	369,2
	OSH	255,8	39,7	175,6	336,0
RIG _{diáfise} (x10 ³ N/m)	Glico	175,9	15,4	144,8	207,0
	OSH	183,1	13,5	155,8	210,4
VTO Fêmur %	Glico	28,0	2,7	22,5	33,5
	OSH	27,0	3,0	21,0	33,0
VTO Tíbia %	Glico	27,8	1,9	24,0	31,6
	OSH	24,5	2,4	19,7	29,3

médias seguidas por () diferem os métodos de indução ($P < 0,05$).

Estão apresentadas nas Tabelas 7 e 8, as médias dos parâmetros bioquímicos sanguíneos de ratas com osteoporose induzida por ovariectomia e glicocorticoide (controles), respectivamente, recebendo medicamentos isolados ou combinados. Verifica-se que não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos em relação

TABELA 7 – Médias, coeficientes de variação e probabilidades de parâmetros sanguíneos de ratas com osteoporose induzida por ovariectomia tratadas com medicamentos isolados ou combinados

Parâmetro	Controle	D1	D2	D3	D1+D2	D1+D3	D2+D3	D1+D2+D3	CV (%)	Valor P
Prot. Totais (g/dL)	7,0	7,0	6,9	7,3	6,9	7,2	7,3	6,4	11,6	0,561
Albumina (g/dL)	3,2	3,2	3,2	3,5	3,5	3,4	3,4	3,2	8,4	0,113
Cálcio (mg/dL)	10,0	9,3	9,1*	9,6	9,0*	9,5	9,7	9,6	5,0	0,014
Fósforo (mg/dL)	6,2	7,1	6,7	6,9	6,4	6,8	7,8*	7,4*	10,8	0,010
AST (U/L)	71,6	77	71,2	68,0	121,3*	70,0	74,6	78,3	26,9	0,002
ALT (U/L)	30,6	25,3	31,0	26,6	35,5	29,2	31,3	35,8	37,4	0,738
FA (U/L)	78,6	86,6	77,0	120,6	112,3	121,5	109,8	95,3	41,0	0,366
FAO (pg/mL)	5,9	0,3*	1,0*	2,7	2,3	1,5*	0,2*	0,2*	137,9	0,005

médias seguidas por () diferem em relação ao controle ($P < 0,05$).

D1- Alendronato, D2 – Atorvastatina, D3 – Ipriflavona.

TABELA 8 – Médias, coeficientes de variação e probabilidades de parâmetros sanguíneos de ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide tratadas com medicamentos isolados ou combinados

Parâmetro	Controle	D1	D2	D3	D1+D2	D1+D3	D2+D3	D1+D2+D3	CV (%)	Valor P
Prot. Totais (g/dL)	8,5	8,2	8,5	7,5	9,2	8,6	9,1	7,0*	9,4	<0,001
Albumina (g/dL)	3,6	3,5	4,0	3,8	4,0	4,0	4,1	4,1	7,8	0,135
Cálcio (mg/dL)	9,3	9,8	10,0	9,8	10,0	10,1	10,4*	9,0	6,2	0,006
Fósforo (mg/dL)	6,6	6,3	8,4*	7,7	6,7	6,4	6,7	6,8	11,8	<0,001
AST (U/L)	88,0	98,0	115,0	108,0	113,0	75,0	83,0	80,0	31,4	0,148
ALT (U/L)	29,1	25,5	34,1	38,3	32,8	31,2	37,2	36,5	41,9	0,757
FA (U/L)	89,0	95,0	107,2	86,3	101,2	95,6	93,0	94,8	39,4	0,987
FAO (pg/mL)	7,8	1,6	2,3	1,3*	3,5	1,3*	0,2*	3,1	147,6	0,007

médias seguidas por () diferem em relação ao controle ($P < 0,05$).

D1- Alendronato, D2 – Atorvastatina, D3 – Ipriflavona.

ao controle para a concentração plasmática de proteínas totais nas ratas ovariectomizadas, sendo a média de 7,0g/dL. Para as ratas osteoporóticas induzidas por glicocorticoide observou-se uma diminuição em relação ao controle ($P<0,05$) com a associação das três medicações, no entanto este valor se encontra dentro do padrão de normalidade descrito na literatura para ratas Wistar de 6,6 a 8,6 g/dL (Diniz et al., 2006); 5,8 a 7,8 g/dL (Harkness e Wagner, 2010) e 6,1 a 7,4 g/dL (Branco et al., 2011).

Não houve efeito dos medicamentos sobre a albumina sérica ($P>0,05$) para ambas as formas de induções, obtendo-se médias de 3,3g/dL para a ovariectomia e 3,9g/dL para o uso do glicocorticoide, que se encontram na faixa do padrão de normalidade descrito na literatura para ratas Wistar de 3,2 a 4,5 mg/dL (Nunes et al., 2004); 3,0 a 4,5 mg/dL (Diniz et al., 2006); 3,8 a 4,8 mg/dL (Harkness e Wagner, 2010) e 3,0 a 3,2 mg/dL (Branco et al., 2011).

Em ratas ovariectomizadas observou-se que a atorvastatina isoladamente ou em associação com o alendronato proporcionou queda ($P<0,05$) na concentração sérica de cálcio em relação ao controle de 10,0 para 9,1 mg/dL e 10,0 para 9,0 mg/dL, respectivamente. Já em ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide houve aumento ($P<0,05$) decorrente da administração associada de atorvastatina e ipriflavona, de 9,3 para 10,4 mg/dL. Entretanto todos os valores obtidos se encontram dentro da normalidade de 5,2 a 11,2 (Nunes et al., 2004); 5,0 a 9,3mg/dL (Diniz et al., 2006); 5,1 a 13mg/dL (Harkness e Wagner, 2010) e 5,2 a 9,7mg/dL (Branco et al., 2011).

A administração da associação de atorvastatina e ipriflavona e das três medicações promoveu o aumento na concentração de fósforo ($P<0,05$) para as ratas ovariectomizadas, enquanto para as ratas osteoporóticas induzidas por glicocorticoide aumento ($P<0,05$) foi verificado com o uso isolado de atorvastatina; entretanto estes valores se mantiveram dentro dos padrões de normalidade descrito na literatura para ratas Wistar de 6,2-8,5 mg/dL, segundo Nakano et al (2000).

Alterações em cálcio e fósforo não costumam ser observadas em humanos na osteoporose, devido à interação coordenada entre os ossos, intestino e rins para a manutenção da homeostasia (Amadei et al., 2006; Motta, 2009). Variações significativas de cálcio e fósforo também não foram encontradas por Pinto et al. (2005) após a indução de osteoporose em ratas com glicocorticoide e tratamento

com alendronato, atorvastatina e ipriflavona separadamente. De forma similar Ferreira Jr. et al.(2008), que trataram a osteoporose induzida por glicocorticoide com bisfosfonatos (alendronato e risedronato) ou estatinas (atorvastatina e lovastatina), não observaram variações significativas de cálcio e fósforo, assim como Sequetto (2008) no tratamento da osteoporose induzida por dexametasona, utilizando alendronato de sódio, sinvastatina, crisina e tintura de *Camellia sinensis*

Observou-se aumento ($P < 0,05$) nos teores séricos de AST para as ratas ovariectomizadas apenas em resposta à associação de alendronato e atorvastatina, valor esse que se encontra dentro dos padrões de normalidade. Para as ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide, o efeito dos tratamentos não foi observado ($P > 0,05$), obtendo-se a média de 95 UI/L, que encontra-se dentro dos padrões de normalidade para ratas Wistar de 75,7 a 142,3 (Branco et al., 2011), 102 a 130 UI/L (Kurata et al., 2000).

Os teores de ALT não foram alterados pelos medicamentos ($P > 0,05$) em ambas formas de indução, sendo as médias de 30,6 UI/L para a ovariectomia e 33,2 UI/L para o uso de glicocorticoide. Esses valores se encontram dentro do padrão de normalidade para ratas Wistar de 24 a 35 UI/L (Kurata et al., 2000) ou até 62 UI/L (Branco et al., 2011).

As aminotransferases AST e ALT são indicadores de alteração funcional ou estrutural da célula hepática (Motta, 2009), o que poderia ocorrer em resposta à associação dos medicamentos, tendo em vista que a atorvastatina e a ipriflavona são metabolizadas ativamente pelo fígado (Katzung, 2010). Em geral, parece não ter havido comprometimento hepático, sugerindo, assim, a viabilidade na utilização da associação medicamentosa quando indicada.

Não houve efeito dos medicamentos sobre a FA ($P > 0,05$) em ambas induções, obtendo-se média de 100,2 UI/L para ratas ovariectomizadas e 95,3 UI/L para a indução por glicocorticoide, que se encontram na faixa do padrão de normalidade descrito na literatura para ratas Wistar de 88 a 130 UI/L (Nakano et al., 2000), 77 a 156 UI/L (Branco et al., 2011).

O uso isolado de alendronato ou atorvastatina e suas associações promoveu redução na concentração sérica de FAO ($P < 0,05$) para ratas ovariectomizadas, enquanto o uso isolado de ipriflavona e suas associações reduziu ($P < 0,05$) a concentração sérica de FAO em ratas com osteoporose induzida por

glicocorticoide. Ressalta-se que as comparações foram feitas com animais osteoporóticos e não foi encontrada na literatura padrão de normalidade para a FAO em ratos. Estudos feitos por Pinto et al. (2006), Ferreira Jr. et al. (2008) e Sequetto (2008) não indicaram efeitos dos tratamentos com bisfosfonatos, estatinas e flavonóides sobre os teores de FAO na osteoporose induzida de ratas. No entanto, Christiasen et al. (1999) e Kress et al. (1999), em trabalhos com seres humanos, apresentaram resultados que corroboram o presente trabalho. Os autores demonstraram aumento dos valores séricos de FAO nas mulheres osteoporóticas, o que foi restabelecido após terapêutica com alendronato (Kress et al., 1999) e reposição hormonal (Christiasen et al., 1999). O aumento dos níveis séricos de FAO na osteoporose pode ser entendido como resposta do organismo ao aumento excessivo de reabsorção quando há queda do estrógeno. Sendo o processo de *turnover* ósseo intimamente acoplado, os processos de reabsorção e formação óssea aumentam ou diminuem na mesma direção em caso de normalidade, com similar magnitude (Kress et al., 1999). Assim, a queda nos teores séricos de FAO ($P < 0,05$) decorrente da medicação pode sinalizar uma redução da remodelação óssea desordenada gerada pela osteoporose e restauração do tecido ósseo.

As Tabelas 9 e 10 apresentam as médias da densidade mineral óssea areal do fêmur e da tíbia, força máxima e rigidez do fêmur e volume trabecular ósseo do fêmur e da tíbia de ratas com osteoporose induzida por ovariectomia e glicocorticoide (controles), respectivamente, tratadas com medicamentos isolados ou combinados.

Pode-se verificar aumento ($P < 0,05$) da densidade mineral óssea areal do fêmur devido à associação de alendronato, atorvastatina e ipriflavona para ambas formas de indução. Para as ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide, adicionalmente, houve aumento ($P < 0,05$) em resposta a todas as medicações isoladas ou combinadas, com exceção da associação de alendronato e atorvastatina.

Para a tíbia observou-se aumento da DMO_{areal} ($P < 0,05$) em resposta à associação de atorvastatina e ipriflavona e das três medicações para as ratas ovariectomizadas e ao uso isolado de alendronato, para as ratas induzidas por glicocorticoide.

TABELA 9 – Médias, coeficientes de variação e probabilidades da densidade mineral óssea areal do fêmur e da tibia, força máxima e rigidez do fêmur e volume trabecular ósseo do fêmur e da tibia de ratas com osteoporose induzida por ovariectomia tratadas com medicamentos isolados ou combinados

Parâmetro	Controle	D1	D2	D3	D1+D2	D1+D3	D2+D3	D1+D2+D3	CV (%)	Valor P
DMOf _{areal} (g/cm ²)	0,130	0,146	0,128	0,140	0,132	0,135	0,146	0,226*	10,4	<0,001
DMOt _{areal} (g/cm ²)	0,103	0,126	0,116	0,111	0,117	0,113	0,128*	0,140*	12,8	0,006
FM _{colo} (N)	94,1	115,3	131,0*	131,1*	117,7	127,6*	118,9	135,5*	16,2	0,021
FM _{diáfise} (N)	116,4	151,9*	127,2	140,6	135,4	132,3	134,8	139,0	11,8	0,030
RIG _{colo} (x10 ³ N/m)	255,8	447,9*	256,8	389,5	355,6	401,0	363,4	467,1*	26,5	0,002
RIG _{diáfise} (x10 ³ N/m)	183,1	257,2*	215,0	261,8*	223,6	253,6*	230,9	245,3*	14,2	0,002
VTO Fêmur %	27,0	68,6*	68,8*	63,2*	70,5*	69,6*	61,3*	69,3*	11,6	<0,001
VTO Tibia %	24,5	61,5*	66,0*	64,0*	68,5*	68,2*	64,2*	62,2*	9,6	<0,001

médias seguidas por () diferem em relação ao controle (P< 0.05).

D1- Alendronato, D2 – Atorvastatina, D3 – Ipriflavona.

TABELA 10 – Médias, coeficientes de variação e probabilidades da densidade mineral óssea areal do fêmur e da tibia, força máxima e rigidez do fêmur e volume trabecular ósseo do fêmur e da tibia de ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide tratadas com medicamentos isolados ou combinados

Parâmetro	Controle	D1	D2	D3	D1+D2	D1+D3	D2+D3	D1+D2+D3	CV (%)	Valor P
DMOf _{areal} (g/cm ²)	0,117	0,188*	0,150*	0,149*	0,130	0,142*	0,142*	0,188*	8,9	<0,001
DMOt _{areal} (g/cm ²)	0,107	0,132*	0,105	0,113	0,118	0,118	0,111	0,126	12,2	0,002
FM _{colo} (N)	94,6	131,6*	114,0	133,9*	126,3*	127,8*	130,8*	143,4*	13,3	<0,001
FM _{diáfise} (N)	119,6	138,9	130,5	129,4	145,2*	136,4	131,9	133,3	10,0	0,009
RIG _{colo} (x10 ³ N/m)	282,6	452,9*	300,8	357,3	325,7	347,6	514,9*	475,6*	27,5	0,001
RIG _{diáfise} (x10 ³ N/m)	175,9	241,2*	210,5	240,5*	238,2*	251,6*	239,0*	267,7*	16,2	0,007
VTO Fêmur %	28,0	67,2*	66,6*	68,2*	60,8*	66,8*	68,3*	63,4*	10,9	<0,001
VTO Tibia %	27,8	66,5*	62,8*	68,0*	63,5*	63,0*	64,3*	68,3*	7,7	<0,001

médias seguidas por () diferem em relação ao controle (P< 0.05).

D1- Alendronato, D2 – Atorvastatina, D3 – Ipriflavona.

Os aumentos na DMO_{areal} sugerem resposta positiva no restabelecimento do tecido ósseo ao tratamento aplicado. Se os resultados forem analisados em relação

aos animais sem indução (intervalo de confiança das médias nas Tabelas 3 e 4), observa-se que a $DMOf_{areal}$ e $DMOt_{areal}$ das ratas ovariectomizadas tratadas apresentaram-se dentro do intervalo de confiança dos animais sem indução, sugerindo, assim, uma restauração do tecido ósseo. No caso das ratas com indução da osteoporose por glicocorticoide, somente o uso isolado de alendronato e a associação tripla apresentaram valores de $DMOf_{areal}$ dentro do intervalo de confiança da média dos animais sem indução. Já para os valores da tíbia, nenhum tratamento mostrou ter havido restauração da DMO_{areal} para a normalidade.

O aumento na densidade mineral óssea areal também foi observado por Uyar et al. (2009) com o uso de risedronato (bisfosfonato) e atorvastatina (estatina) e por Amaral (2010) que utilizou etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona isolados e associados no tratamento de ratas ovariectomizadas. Khan et al. (2013) observaram em ratas, cuja osteoporose foi induzida com glicocorticoide, diminuição da $DMOf_{areal}$, que foi restabelecida com o uso de um flavonóide. A utilização de ipriflavona por 30 dias em ratas ovariectomizadas preveniu completamente a perda da densidade óssea do fêmur e aumentou as taxas de formação óssea, avaliadas por histomorfometria (Arjmandi et al., 2000).

Em ratas ovariectomizadas a força máxima medida no colo do fêmur foi aumentada ($P < 0,05$) com o uso isolado de atorvastatina e ipriflavona, com a associação de alendronato e ipriflavona, e com a associação tripla. Para as ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide o uso de praticamente todas as medicações e suas associações, exceto a atorvastatina isoladamente, promoveu aumento ($P < 0,05$) da força máxima medida no colo do fêmur. Já para a diáfise do fêmur nas ratas ovariectomizadas, o aumento da força máxima ($P < 0,05$) foi encontrado com o uso isolado de alendronato, enquanto que para as ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide o aumento ($P < 0,05$) foi observado com a associação de alendronato com atorvastatina.

A rigidez medida no colo do fêmur foi aumentada ($P < 0,05$) com o uso isolado de alendronato e com a associação das três medicações (alendronato, atorvastatina e ipriflavona) para as ratas ovariectomizadas; para ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide, o aumento ($P < 0,05$) da rigidez medida no colo do fêmur foi observada com o uso isolado de alendronato e com as associações de atorvastatina com ipriflavona e dos três medicamentos.

Para as ratas com osteoporose induzida por ovariectomia, foi obtido aumento ($P < 0,05$) da rigidez medida na diáfise do fêmur, nos tratamentos isolados ou combinados de alendronato ou ipriflavona, bem como na associação tripla; para as ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide, o aumento ($P < 0,05$) da rigidez medida na diáfise do fêmur não foi observado com o uso isolado de atorvastatina. Khan et al. (2013), utilizando ratas com osteoporose induzida por glicocorticoide, obtiveram aumento dos parâmetros biomecânicos com a administração de flavonóide para restaurar o tecido ósseo.

O aumento de força máxima e da rigidez medidos no colo ou diáfise do fêmur observados nos tratamentos poderiam ser um indicativo de melhora na restauração óssea (Lirane–Galvão e Castro, 2010); entretanto a osteoporose não apresentou efeito sobre esses parâmetros (Tabelas 3 e 4), o que está de acordo com Guillermin et al. (2009), Silva et al (2009) e Zhao et al. (2011).

Quanto ao volume trabecular ósseo, observa-se que todos os tratamentos proporcionaram aumento ($P < 0,05$) em relação ao controle osteoporótico sem medicação, seja o ovariectomizado ou o com uso de glicocorticoide. Avaliando-se esses resultados em relação ao intervalo de confiança da média dos animais sem indução (Tabelas 3 e 4), pode-se constatar que estão dentro desse intervalo, o que sugere que os medicamentos isolados ou combinados foram efetivos em restabelecer o tecido ósseo dos animais osteoporóticos. Utilizando a histomorfometria muitos estudos identificaram alterações osteometabólicas na osteoporose (Pinto et al. ,2005; Silva, 2006; Ferreira Jr. et al., 2008; Uyar et al., 2009; Amaral, 2010). No presente trabalho todas as medicações e suas associações foram positivas em restaurar o tecido ósseo, o que viabiliza a ideia das associações serem alternativas no combate à osteoporose.

Nas Figuras 4 e 5, respectivamente, são apresentadas fotomicrografias de cortes histológicos da região do terço proximal dos ossos fêmur e tibia esquerdos dos animais com osteoporose induzida por ovariectomia ou por aplicação de glicocorticoide. Pode ser observada diminuição trabecular óssea, identificada principalmente pela menor espessura das trabéculas ósseas nos grupos osteoporóticos localizados ao centro das imagens, havendo, portanto, maior área de medula óssea nestes grupos. Em relação aos grupos tratados, distribuídos ao redor do grupo controle no sentido horário, pode ser observado aumento na espessura das trabéculas ósseas e redução dos espaços intertrabeculares ocupados por

medula óssea, ratificando a restauração do tecido ósseo pelo uso isolado ou associado dos medicamentos, corroborando os resultados das Tabelas 9 e 10.

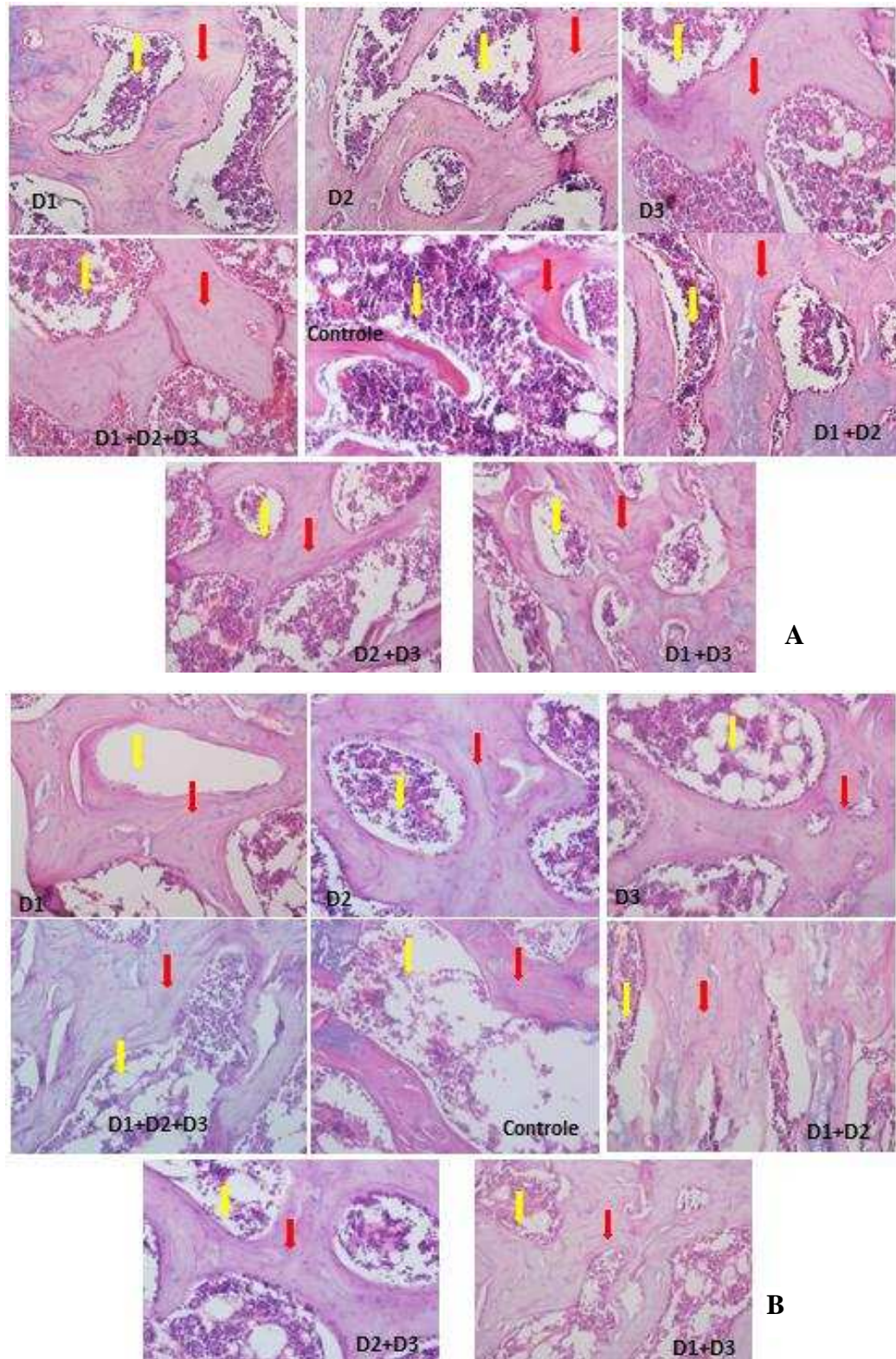


Figura 4 – Fotomicrografias do osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de fêmur (A) e tíbia (B) de ratas ovariectomizadas. HE – 200X

Seta amarela: região medular

Seta vermelha: trabécula óssea

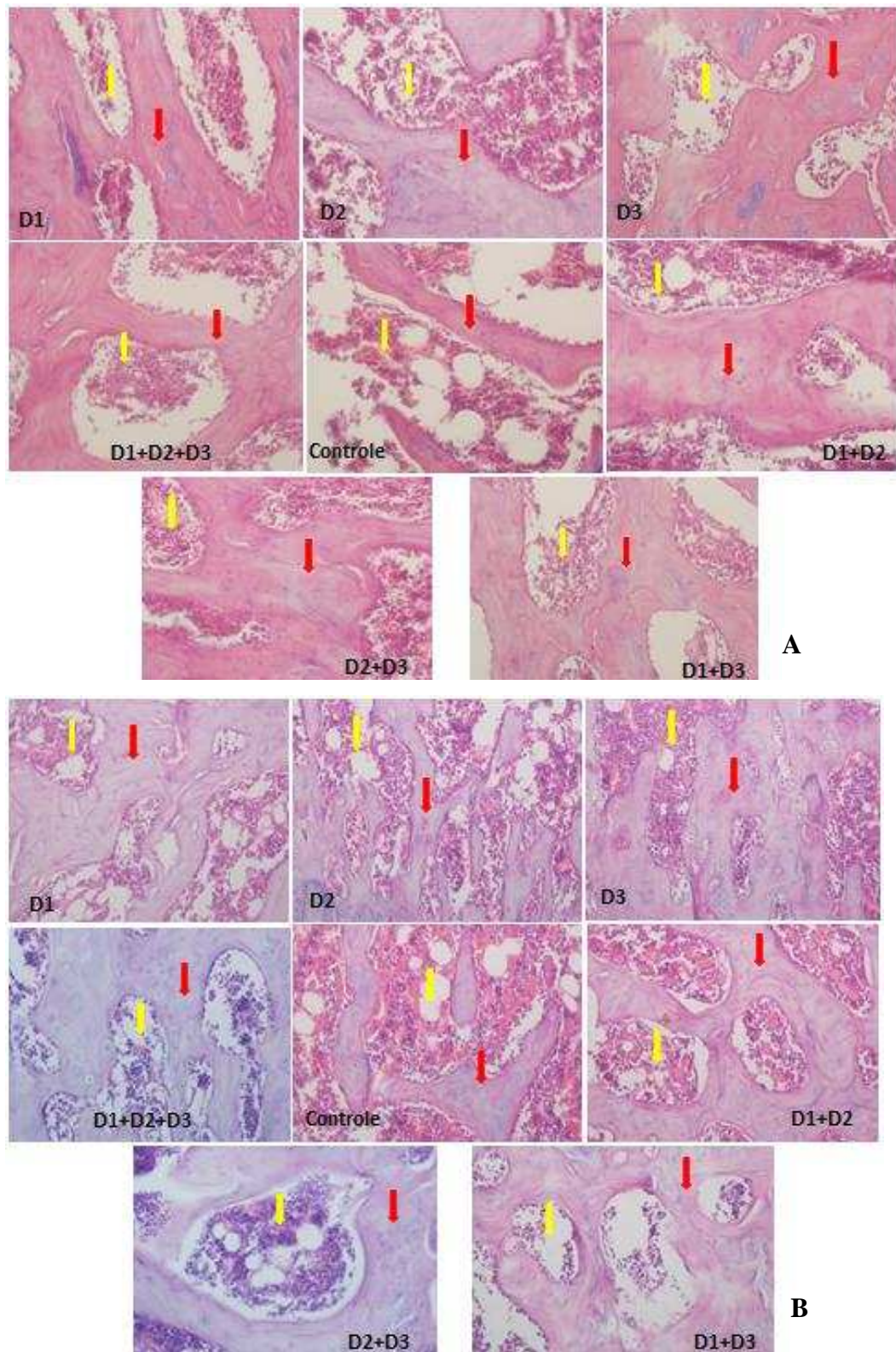


Figura 5 – Fotomicrografias do osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de fêmur (A) e tíbia (B) de ratas com uso de glicocorticoide. HE – 200X

Seta amarela: região medular

Seta vermelha: trabécula óssea

No presente estudo, sendo a restauração do tecido ósseo sugerida pelo aumento da DMO_{areal} , $DMO_{\text{t areal}}$, FM_{colo} , RIG_{colo} , $RIG_{\text{diáfise}}$, VTO_{f} e VTO_{t} , verifica-se que o alendronato isoladamente seria indicado para ratas com osteoporose induzida por glicocorticóide. Entretanto, sua efetividade pode ser diminuída, desaconselhando a sua utilização, com o uso prolongado. Fraturas atípicas tem sido relatadas relacionadas ao uso prolongado de bisfosfonatos em estudos observacionais (Schichler et al., 2011; Guisti et al., 2011; Meier et al., 2012; Erviti et al., 2013). Destacam-se ainda os seus efeitos colaterais tais como náusea, dispepsia, dor abdominal, constipação, diarreia, dor músculo-esquelética, cefaléia, esofagite, úlcera esofágica, gastrite, duodenite, disfagia, estenose esofágica, disfunção renal (albuminúria) e flebite quando administrada intravenosamente (Adami e Zamberlan, 1996).

Alternativamente, verificou-se a efetividade da ipriflavona para aumentar DMO_{areal} , FM_{colo} , $RIG_{\text{diáfise}}$, VTO_{f} e VTO_{t} , estando descrita na literatura sua baixa toxicidade e pouco expressivos os efeitos colaterais (Havsteen, 2002). Além disso, a associação da ipriflavona com atorvastatina mostrou-se efetiva em aumentar DMO_{areal} , FM_{colo} , RIG_{colo} , $RIG_{\text{diáfise}}$, VTO_{f} e VTO_{t} , ressaltando-se a vantagem da dose utilizada ser metade daquela da medicação isolada. Isto tem grande utilidade para a saúde pública, devido à redução não somente da dose, mas também dos efeitos colaterais que podem ser bem prejudiciais ao organismo. Para as estatinas, náusea, diarreia, cefaléia, insônia, perda da memória, disfunção hepática, alteração do paladar, dores musculares, mialgia, rabdomiólise, disfunção sexual, ginecomastia, opacidade do cristalino e neuropatia periférica tem sido descritas (Marques, 2001).

Considerando ainda a restauração do tecido ósseo sugerida pelos parâmetros ósseos, verifica-se que a associação tripla seria indicada para ratas com osteoporose induzida por ovariectomia.

Assim, sugere-se que as associações realizadas neste experimento poderiam ser utilizadas como alternativa na terapêutica da osteoporose quando necessário. Essas medicações poderiam ser uma alternativa ao uso isolado do alendronato, que pode apresentar muitos efeitos colaterais e cuja eficácia pode diminuir com o uso prolongado.

5. CONCLUSÕES

Os parâmetros bioquímicos sanguíneos de rotina parecem não ser indicados para detectar alterações decorrentes da osteoporose, bem como para avaliar os efeitos da medicação, devido à ausência de alterações consistentes.

Considerando as respostas sobre densidade mineral óssea areal e o volume trabecular ósseo, recomenda-se o uso da associação de ipriflavona e atorvastatina ou a associação tripla (incluindo o alendronato), devido às vantagens decorrentes da diminuição da dose aplicada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adami, S.; Zamberlan, N. Adverse Effects of Bisphosphonates – A comparative review. **Drug Safety Journal**, v.14, p.158-70, 1996.

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

Allen, M.J. Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. **Veterinary Clinical Pathology**, v.32, n.3, p.101-113, 2003.

Altunda, H.; Gursoy, B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.99, p.285-291, 2005.

Amadei, S.U.; Silveira, V.A.S.; Pereira, A.C.; Carvalho, Y.R.; Rocha, R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Journal Brazilian Pathology Medicine Laboratory**, v.42, n.1, p. 5-12, 2006.

Amaral, G.G. **Uso isolado ou combinado de etidronato, risedronato, pravastatina e ipriflavona no tratamento da osteoporose induzida por ovariectomia em ratas**. 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa, 2010.

Anbinder, A.L.; Prado, F.A.; Prado, M.A.; Balducci, I.; Rocha, R.F. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. **Brazilian Oral Research**, v.21, n. 3, p.247-252, 2007.

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

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

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

Bagi, C.M.; Wilkie, D.; Georgelos, K.; Williams, D.; Bertolini, D. Morphological and structural characteristics of the proximal femur in human and rat. **Bone**, v.3, n. 21, p.261-267, 1995.

Baker, D.C.; Campbell, T.W.; Denicola, D.; Fettman, M.J.; Lassen, E.D.; Rebar, A.; Weiser, G. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2007, 575 p.

Barlet, J.P.; Coxam, V.; Davicco, M.J.; Gaumet, N. Animal models of postmenopausal osteoporosis. **Reproduction Nutrition Development**, v.34, p.221–236, 1994.

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

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

Bikle, D.D.; Halloran, B.; Fong, L.; Steinbach, L.; Shellito, J. Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.76, n.2, p.456-461, 1993.

Black, D.M.; Greenspan, S.L.; Ensrud, K.E.; et al. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v.349, p.1207–15, 2003.

Bone, H.G.; Greenspan, S.L.; Mckeever, C.; et al. Alendronate and estrogen effects in postmenopausal women with low bone mineral density. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, p.720–6, 2000.

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

Borer, K.T. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis. **Sports Medicine**, v. 35 n.9, p. 779-830, 2005

Branco, A.C.S.C.; Diniz, M.F.F.M.; Almeida, R.N.; Santos, H.B.; Oliveira, K.M.; Ramalho, J.A.; Dantas, J.G. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.15, n.2, p.209-214, 2011.

Brandli, D.W.; Golde, G.; Greenwald, M.; Silverman, S.T. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a cross-sectional study. **Steroids**, v.56, p.518-523, 1991.

Brown, S.D.; Biddulph, R.B.; Wilcox, P.D. A strength porosity relation involving different pore geometry and orientation. **Journal of the American Ceramic Society**, v.47, p.320-323, 1964.

Canalis, E.; Mazziotti, G.; Giustina, A.; Bilezikian, J.P. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. **Osteoporosis International**, v.18, p.1319–1328, 2007.

Carter, D.R., Hayes, W.C. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v.59, n.7, p.954-962, 1977.

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

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

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

Christiansen, C.; Hassager, C.; Riis, B.J. **Metabolic Bone Disease: Biochemical Markers of Bone Turnover**, p. 313-326, 1999.

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

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

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

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

Dai, R.; Ma, Y.; Sheng, Z.; Jin, Y.; Zhang, Y.; Fang, L.; Fan, H.; Liao, E. Effects of genistein on vertebral trabecular bone microstructure, bone mineral density, microcracks, osteocyte density, and bone strength in ovariectomized rats. **Journal Bone Mineral Metabolism**, v.26, n.4, p.342-9, 2008.

Dempster, D.W.; Birchman, R.; Xu, R.; Lindsay, R.; Shen, V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. **Bone**, v.16, p.157–161, 1995.

Devareddy, L.; Hooshmand, S.; Collins, J.K.; Lucas, E.A.; Chai, S.C.; Arjmandi, B.H. Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, p. 694–699, 2008.

Diniz, M.F.F.M.; Medeiros, I.A.; Santos, H.B.; Oliveira, K.M.; Vasconcelos, T.H.C.; Aguiar, F.B.; Toscano, M.; Ribeiro, E.A.N. et al. Padronização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e ratos Wistar, **Revista Brasileira da Saúde**, v.10, n.2, p. 171-176, 2006.

Eastell, R.; Delmas, P.D.; Hodgson, S.F.; Eriksen, E.F.; Mann, K.G.; Riggs, B.L. Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v.6, p. 741-748, 1988.

Eriksen, E.F.; Charles, P.; Melsen, F.; Mosekilde, L.; Risteli, L.; Risteli, J. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. **Journal Bone Mineral Research**, v.8, p.127-132, 1993.

Erviti, J.; Alonso, Á.; Oliva, B.; Gorricho, J.; López, A.; Timoner, J. *et al.* Oral bisphosphonates are associated with increased risk of subtrochanteric and diaphyseal fractures in elderly women: a nested case-control study. **BMJ Open**, 2013.

Evans, F.G. Mechanical properties of bone. **Journal of Biomechanics**, v.8, p.81-86, 1973.

Fenner, W. R. **Consulta rápida em clínica veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 514 p.

Fernandes, C.E.; Mello, R.; Wehba, S.; Machado, R.B. **Osteoporose pós-menopausa**, 1996. Disponível em www.menopausiaenlinea.com. Acesso em 09/07/2013

Fernandes, B.B. **Influência de diferentes tipos de exercício sobre parâmetros ósseos em ratas ovariectomizadas e inteiras**. 2010. 73f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Departamento de Educação Física - Universidade Federal de Viçosa, 2010.

Fernandes, B.B.; Del Carlo, R.J.; Peluzio, M.C.G.; Drummond, L.R.; Silva, C.H.O.; Louzada, M.J.Q.; Freitas, J.S.; Castro, C.A.; Silva, K.A.; Natali, A.J. Efeitos do treinamento em natação sobre propriedades mecânicas e estruturais do fêmur de ratas ovariectomizadas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 594-603, 2014.

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

Finkelstein, J.S.; Hayes, A.; Hunzelman, J.L.; Wyland, J.J.; Lee, H.; Neer, R.M. The effects of parathyroid hormone, alendronate, or both in men with osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v.349, p.1216–2, 2003.

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

Frape, D. L. Diet and exercise performance in the horse. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.53, n.1, p.189-206, 1994.

Galante, J.; Rostoker, W.; Ray, R.D.; Physical properties of trabecular bone. **Calcified Tissue Research**, v.5, n.3, p.236-246, 1970

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

Garcés, C.; García, L.E. Combination of anabolic and antiresorptive agents for the treatment of osteoporosis. **Maturitas**, v.54, p.47-54, 2006.

Garcia, P.; Robinson, V.L.J.; Borysenko, C.W.; Lehmann, T.; Kalla, S.E.; Blair, H.C. Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells by estrogen and phytoestrogens. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p.13720–13727, 2005.

Gass, M., Dawson-Hughes, B. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview. **American Journal of Medicine**, v.119, p. S3–S11, 2006.

Giusti, A.; Hamdy, N.A.; Dekkers, O.M.; Ramautar, S.R.; Dijkstra, S.; Papapoulos, S.E. Atypical fractures and bisphosphonate therapy: A cohort study of patients with femoral fracture with radiographic adjudication of fracture site and features. **Bone**, v.48, n.5, p. 966-971, 2011.

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

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

Greenspan, S.L.; Emkey, R.E.; Bone, H.G.; et al. Significant differential effects of alendronate, estrogen, or combination therapy on the rate of bone loss after discontinuation of treatment of postmenopausal osteoporosis. **Annals of Internal Medicine**, v.137, p.875–83, 2002.

Greenspan, S.L.; Resnik, N.M.; Parker, R.A. Combination the rapy with hormone replacement and alendronate for prevention of bone loss in elderly women. **JAMA**, v.289, p.2525–33, 2003.

Guadapule-Grau, A.; Fuentes, T.; Guerra, B.; Calbet, A.L. Exercise and bone mass in adults. **Sports Medicine**, v.39 n.6, p. 439-468, 2009.

Guillerminet, F.; Beaupied, H.; Fabien-Soulé, V.; Tomé, D.; Benhamou, C.L.; Roux, C.; Blais, A. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An in vitro and in vivo study **Bone**, v.46, p.827–834, 2010.

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

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

Hamdy, R.C. Osteoporosis, the deafening silent epidemic. **Southern Medical Journal**, v.95, p.567-75, 2002.

Harkness, S.E.; Wagner, J.E. **Biology and Medicine of Rabbits and Rats**, 5. ed., Wiley-Blackwell, 2010, 455p.

Harris, S.T.; Eriksen, E.F.; Davidson, M., et al. Effect of combined risedronate and hormone replacement therapies on bone mineral density in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p.1890–7, 2001.

Hashim, Z. Elastic moduli of heterogeneous materials. **Journal of Applied Mechanics**, v.29, p.143, 1962.

Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p. 67– 202, 2002.

Hench, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v.19, p.1419–1423, 1998.

Hernandez, C.J. How can bone turnover modify bone strength independent of bone mass? **Bone**, v.42, n.6, p.1014-1020, 2008.

Hesch, R.D.; Busch, U.; Prokop, M.; Delling, G.; Rittinghaus, E.F. Increase of vertebral density by combination therapy with pulsatile 1–38hPTH and sequential addition of calcitonin nasal spray in osteoporotic patients. **Calcified Tissue International**, v.44, p.176–80, 1998.

Hill, C.S.; Wolfert, R.L. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. **Clinical Chimica Acta**, v.186, p.315-320, 1989.

Hodsman, A.B.; Fraher, L.J.; Watson, P.H.; et al. A randomized controlled trial to compare the efficacy of cyclical parathyroid hormone *versus* cyclical parathyroid hormone and sequential calcitonin to improve bone mass in postmenopausal women with osteoporosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.82, p.620–8, 1997.

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

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

Horst, R. L. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 2, p. 604-616, 1986.

Huang, T. H.; Lin, S. C.; Chang, F. L.; Hsieh, S. S.; Liu, S. H. ; Yang, R. S. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. **Journal of Applied Physiology**, v.95, n.1, p.300-7, 2003.

Hughes, D. E. *et al.* Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. **Nature Medicine**, v. 2, n. 10, p.1132-6, 1996

Imai,Y.; Tsukahara, S.; Asada, S.; Sugimoto,Y. Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance, **Cancer Research** v.64, p.4346–4352, 2004.

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

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

Johnell, O., Scheele, W.H.; Reginster, J.Y.; Need, A.G.; Seeman, E. Additive effects of raloxifene and alendronate on bone density and biochemical markers of bone remodeling in postmenopausal women with osteoporosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v.87,p. 985–92, 2002.

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

Kalu, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Mineral**, v.15, p.175– 191, 1991.

Karlkainen, M.;Lamberg-Allardt, C. An acute intake of phosphate increases parathyroid hormone secretion and inhibits bone formation in young women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.11, p.1905-1912, 1996.

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

Katzung, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10ªed. São Paulo: Editora McGraw-Hill; 2010.1088p.

Khan, M.P.; Mishra, S.J.; Sharan, K.; Yadav, M.; Singh, A.K.; Srivastava, A.; Kumar, S.; Bhaduarua, S.; Mauryad,R.; Sanyal,, S.; Chattopadhyay, N. A novel flavonoid C-glucoside from *Ulmus wallichiana* preserves bonemineral density, microarchitecture and biomechanical properties inthe presence of glucocorticoid by promoting osteoblast survival: Acomparative study with human parathyroid hormone **Phytomedicine** v.20, p.1256– 1266, 2013.

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

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

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

Koeppen, M.B.; Stanton, A.B. **Fisiologia – Berne & Levi**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 864p.

Kress, B.C.; Mizrahi, I. A.; Armour, K.W.; Marcus, R.; Emkey, R.D.; Santora, A.C. Use of Bone Alkaline Phosphatase to Monitor Alendronate Therapy in Individual Postmenopausal Osteoporotic Women**Clinical Chemistry**, v.4 n.7, p.1009–1017, 1999.

Kurata, M.; Tsujimura, Y.; Shirai, N.; Kato, M.; Futura, C.; Shimoya, M.; lidaka, T.; Sato, Y. Comparison of general toxicological parameters between Crj:CD(SD)IGS and Slc:SDrats. **Biological reference data on rats**, Best Printing Co. Lta, Tokyo, 2000. 277p

Leppanen, O. V., Sievanen, H., Jokihara, J., Pajamaki, I., Kannus, P. E Jarvinen, T. L. Pathogenesis of age-related osteoporosis: impaired mechano-responsiveness of bone is not the culprit. **PLOS ONE**, v.3, n.7, p.2540-2543, 2008.

Levinson, W.; Altkorn, D. Prevenção primária da osteoporose pós-menopausa. **Journal of the American Medical Association**, v.3, n.10, p.2607-2609, 1999.

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

Linder, C.H.; Englund, U. H.; Narisawa, S.; Millán, J.L.; Magnusson, P. Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse sérum. **Bone**, v.53, p. 399-408, 2013.

Lindsay R. Prevention and treatment of osteoporosis. **Lancet**, v.341, p.801-805, 1993.

Lindsay, R.; Nieves, J.; Formica, C.; et al. Randomized controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral-bone mass and fracture incidence among post menopausal women on estrogen with osteoporosis. **Lancet**, v.350, p.550–555, 1997.

Lindsay, R.; Cosman, F.; Lobo, R.A.; et al. Addition of alendronate to ongoing hormone replacement therapy in the treatment of osteoporosis: a randomized, controlled clinical trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.84,p.3076–81, 1999.

Lirane-Galvão, P.A.; Castro, M.L. Physical approach for prevention and treatment of osteoporosis. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v.54, n.2, p. 171-178, 2010.

Liu, J.; Zhu, L.; Yang, X.; Huang, H.; Ye, D. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and bone mineral density: A meta-analysis. **Bone**, v. 54, p. 151-156, 2013.

Lloyd, T.; Andon, M.B.; Rollings, N.; Martel, J.K.; Landis, J.R.; Demers, L.M.; Egli, D.F.; Kieselhorst, K.; Kulin, H.E. Calcium supplementation and bone mineral density in adolescent girls. **JAMA**, v. 270, p.841-844, 1993.

Lloyd, T.; Rollings, N.; Egli, D.F.; Kieselhorst, K.; Chinchilli, V.M. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.65, p.1826-1830,1997.

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

Luckman, S.P.; Hughes, D.E.; Coxon, F.P.; Graham, R.; Russell, G.; Rogers, M.J. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. **Journal Bone and Mineral Research**, v.13, p.581-589,1998.

Macleane, C.; Newberry, S.; Maglione, M.;et al. Systematic review: comparative effectiveness of treatments to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis. **Annals Internal Medicine**. , v.148, p.197-213, 2008.

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

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

Marques, F.B. Fármacos inibidores da redutase da HMG-CoA. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 17, n.1, p.142-148, 2001.

Martin, R.B.; Boardman, D.L. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. **Journal of Biomechanics**, v.26, n.9, p.1047-1054, 1993

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

Mcclung, M.; Harris, S.T.; Miller, P.D.; Bauer, D.C.; Davison, K.S.; Dian, L.; Hanley, D.A.; Kendler, D.L.; Yuen, C.K.; Lewiecki, M. Bisphosphonate Therapy for Osteoporosis: Benefits, Risks, and Drug Holiday. **The American Journal of Medicine**, v. 126, p. 13-20, 2013.

Meier, R.P.; Perneger, T.V.; Stern, R.; Rizzoli, R.; Peter, R.E. Increasing occurrence of atypical femoral fractures associated with bisphosphonate use. **Archives of Internal Medicine**, v.172, n.12, p. 930-936, 2012.

Morote, J. e Planas, J. Pérdida de masa ósea en pacientes con cáncer de próstata sometidos a deprivación androgénica. **Actas Urológicas Españolas**, v.35, n.4, p.232—239, 2011.

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

Motta, V.T. **Bioquímica Clínica para o Laboratório - Princípios e Interpretações**. 5ª ed. Editora Medbook; 2009. 400p.

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

Mundy, G.R. Statins and their potential for osteoporosis. **Bone**, v.29, n.6, p.495-497, 2001.

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

Nakano, Y. ; Iizuka, K.; Motizuki, H.; Kai, K.; Umeda, A.; Nakajima, M.; Sasaki, M. Background data of general toxicological parameters in rats at 9, 12, 18 weeks of age. **Biological reference data on rats**, Best Printing Co. Lta, Tokyo, 2000. 277p

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

Notoya, K.; Yoshida, K.; Taketomi, S.; Yamazaki, I.; Kumegawa, M. Inhibitory effects of ipriflavone on osteoclast-mediated bone resorption and new osteoclast-mediated

formation in long-term cultures of mouse unfractionated bone cells. **Calcified Tissue International**, v.53, p.206-209, 1993.

Nunes, D.C.S.; Favali, C.B.F.; Souza-Filho, A.A.; Silva, A.C.M.; Figueiras, T.M.; Lima, M.G.S. Evaluation of cellular profile and main constituents the rat and mouse blood from the animal house of the Federal University of Ceará, Brazil, **Revista de Medicina UFC**, v.34 (1-2), p.21-29, 2004.

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

Patschan, D.; Loddenkemper, K.; Buttgereit, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Bone** v.29, n.6, p.498-505, 2001.

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

Pinheiro, P.G. **Efeito antiinflamatório da atorvastatina na periodontite induzida por ligadura em ratos**. 2009.77f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Ceará, 2009.

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

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

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

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

Prado Filho, J.R.C.; Serman, F.A. Evaluation of mineral bone density in thoroughbred horses under an initial training programme. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, n.6, p. 384-388, 2004.

Prince, R.; Devine, A.; Dick, I.; Criddle, A.; Kerr, D.; Kent, N.; Price, R.; Randell, A. The effects of calcium supplementation (milk powder or tablets) and exercise on bone density in postmenopausal women. **The Journal of Bone and Mineral Research**, v.10, p.1068-1075, 1995.

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

Reid, I.R. Glucocorticoid-induced osteoporosis.**Baillière´s Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.14, n.2, p. 279-298, 2000.

Robling, A. G., Castillo, A. B.;Turner, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annual Review Biomedical Engineering**, v.8, p.455-98. 2006.

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

Rogers, M.J., Crockett, J.C., Coxon, F.P., Mönkkönen, J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Bone**, v. 49, p. 34–41, 2011.

Ross, P.D. Risk factors for osteoporotic fracture. **Endocrinology Metabolism Clinical of North American**, v.27, p.289-301, 1997.

Ross, P.D. Risk factors for osteoporotic fracture. **Endocrinology Metabolism Clinical of North American**, v.27, p.289-301, 1998.

Roughead, Z.K. Metabolism of proteins. **Journal of Nutrition**, v.133, p.863S-866S, 2003.

Russo, L.A.T., Gregório, L.H., Carneiro, R.A., Danowski, J.S., Grossi, R. **Osteoporose**.Rio de Janeiro, Editora Record, 2002. 157p.

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

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

Schilcher, J.; Michaëlsson, K.; Aspenberg, P. Bisphosphonate use and atypical fractures of the femoral shaft. **The New England Journal of Medicine**, v.364, n.18, p. 1728-1737, 2011.

Sedlin, E.D., Hirsch, C. Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. **Acta Orthopaedica Scandinavica** v. 37, p. 29-48, 1966.

Seeman, E. Bone quality: the material and structural basics of bone strength. **Journal Bone Mineral Metabolism**, v.26 n.1, p1-8, 2008.

Sehmisch, S., Galal, R., Kolios, L., Tezval, M., Dullin, C., Zimmer, S., Stuermer, K. M. E Stuermer, E. K. Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model.**Osteoporos International**, Mar 13. 2009.

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

Silva, R.M.; Neto, F.C.P.; Bertocello, D. Efeitos da sinvastatina sobre propriedades biomecânicas de ossos de ratas ovariectomizadas. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.18 n.1, p.31-36, 2008.

Southard, T. E.; Southard, K. A.; Krizan, K.E.; Hillis, S.L.; Haller, J.W.; Keller, J.; Vannier, M. W. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis, **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 89, p.244-249, 2000.

Stepan, J.J.; Pospichal, J.; Presl, J.; Pacovsky, V. Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. **Bone**, v.8, p.279-284, 1987.

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

Thompson, D.D.; Simmons, H.A.; Pirie, C.M.; Ke, H.Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v.4, n.17, p. 115-119, 1995.

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

Undurti, N D. Catechins and osteoporosis. **Nutrition**, v.29, n.4, p. 697-699, 2013.

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

Vicentini, C. R., Rosa, R. A. C., Ciarlini, L. D. R. P., Santos, P. H., Louzada, M.J.Q. Análise Biomecânica em fêmures de ratos submetidos à ausência de carga e atividade física em esteira. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.1, Jun, p.62-71. 2007.

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

Vitte, C.; Fleish, H.; Guenther, H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, v.137, p.2324-2333, 1996.

Vogel, J.M.; Davis, J.W.; Nomura, A. The effects of smoking on bone mass and the rates of bone loss among elderly Japanese-American men. **Journal Bone Mineral Research**, v.12, p.1495-1501, 1997.

Weinstein, R.S. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. **The New England Journal of Medicine**, v.365, p.62–70, 2011.

Weinstein, R.S. e Manolagas, S.C. Apoptosis and Osteoporosis **American Journal of Medicine**, v.108, p.153–164, 2000.

Wimalawansa, S.J. A 4-year randomized controlled trial of hormone replacement and bisphosphonate, alone or in combination, in women with postmenopausal osteoporosis. **American Journal of Medicine**, v.104, p.219–26, 1998.

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

Wolf A.D, PfliegerB. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bulletin of the World Health Organization**, v.81, n.9, p.646–56, 2003.

Wronski, T.J.; Cintron, M.; Dann, L.M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**, v.43, p.179– 183, 1988.

Zhao,X.; Wu,Z.; Zhang,Y., Yan,Y.; He, Q.; Cao, P.; Lei, W. Anti-osteoporosis activity of Cibotium barometz extract on ovariectomy-induced bone loss in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p.1083–1088, 2011.