

DAVILSON BRAGINE FERREIRA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO ALENDRONATO DE SÓDIO, ATORVASTATINA
CÁLCICA, IPRIFLAVONA E ÓLEO DE LINHAÇA NO TRATAMENTO
DA OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

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

T

F383a
2016
Ferreira Junior, Davilson Bragine, 1973-
Avaliação do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica,
ipriflavona e óleo de linhaça no tratamento da osteoporose
induzida com dexametasona / Davilson Bragine Ferreira Junior.
– Viçosa, MG, 2016.
xi, 120f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Humberto de Queiróz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Osteoporose. 2. Dexametasona. 3. Alendronato.
4. Resistência à insulina. 5. Bifosfonatos. 6. Estatinas.
7. Linhaça. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação
em Bioquímica Aplicada. II. Título.

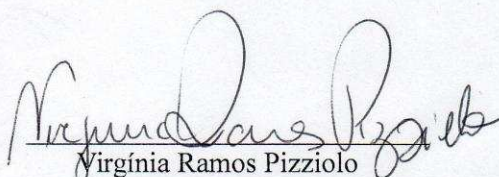
CDD 22 ed. 616.716

DAVILSON BRAGINE FERREIRA JUNIOR

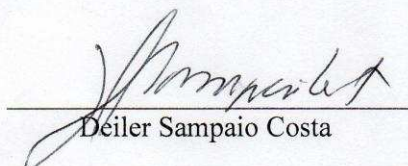
**AVALIAÇÃO DO ALENDRONATO DE SÓDIO, ATORVASTATINA CÁLCICA,
IPRIFLAVONA E ÓLEO DE LINHAÇA NO TRATAMENTOS DA
OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA**

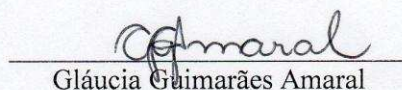
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Doctor *Scientiae*.

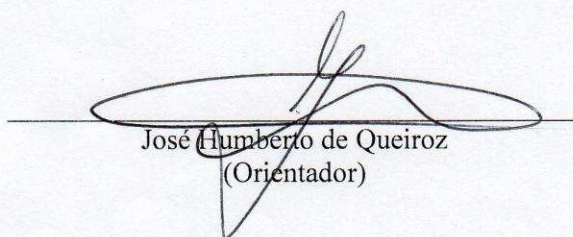
APROVADA: 07 de novembro de 2016.


Virgínia Ramos Pizziolo
(Coorientadora)


Sérgio Luiz Pinto da Matta
(Coorientador)


Déiler Sampaio Costa


Gláucia Guimarães Amaral


José Humberto de Queiroz
(Orientador)

À meus pais **Davilson Bragine
Ferreira e Iara Félix Bragine
Ferreira.**

À minha querida avó, **Zenaida
Bragine Ferreira.**

À **Roberta de Cássia Cardoso
Bragine Ferreira**, minha esposa e
meu alicerce.

À meus filhos, anjinhos da casa, **Yuri
e Sarah.**

“Seria mais fácil fazer como todo mundo faz
O caminho mais curto. Produto que rende mais
Seria mais fácil fazer como todo mundo faz
Um tiro certo. Modelo que vende mais.

Mas nós, dançamos no silêncio
Choramos no carnaval
Não vemos graça nas gracinhas da Tv
Morremos de “rir” no horário eleitoral.

Seria mais fácil fazer como todo mundo faz
Sem sair do sofá. Deixar a Ferrari pra trás
Seria mais fácil fazer como todo mundo faz
O milésimo gol, sentado na mesa de um bar.

Mas nós, vibramos em outra frequência
Sabemos que não é bem assim
Se fosse fácil achar o caminho das pedras,
Tantas pedras no caminho não seria ruim.”

Humberto Gessinger. “Outras Frequências”.

Engenheiros do Hawaii

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, por saúde e paz, bem como sempre me fortalecer, capacitar e iluminar.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela qualidade de ensino e infraestrutura preponderante durante todo o processo de aprendizado e pesquisa.

Ao CNPq pela bolsa e apoio financeiro.

À FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Professor José Humberto de Queiroz por ter acreditado, orientado e apoiado atenciosamente.

Aos meus coorientadores, professora Virginia Ramos Pizziolo e professor Sérgio Luiz Pinto da Matta, pela confiança, por toda infraestrutura disponibilizada, ensinamentos e por todo incentivo que foi distinguido durante o todo o período do curso.

Aos professores e amigos Aloísio da Silva Pinto e Gláucia Guimarães Amaral, por tudo.

Ao Professor Dailer Sampaio Costa

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	x
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2.JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA.....	3
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 Osteoporose.....	4
3.2 Glicocorticóides.....	5
3.2.1 Mecanismo de Indução da Osteoporose pelos Glicocorticóides.....	7
3.2.2 Alterações no Metabolismo de Carboidratos.....	14
3.3 Tratamentos da Osteoporose.....	15
3.3.1 Bisfosfonatos.....	15
3.3.2 Estatinas.....	19
3.3.3 Flavonóides.....	22
3.3.4 Óleo de Linhaça.....	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
5. HIPÓTESES.....	39
6. OBJETIVOS.....	40
6.1 Objetivo Geral.....	40
6.2 Objetivos Específicos.....	40
Capítulo 1- Avaliação Biométrica, Histomorfométrica e de Marcadores Bioquímicos no Uso de Atorvastatina Cálcica no Tratamento da Osteoporose Induzida com Dexametasona.....	41
Resumo.....	41
Abstract	43
Introdução	45
Material e métodos	47
Resultados e discussão	50
Conclusões	61
Referências Bibliográficas	63
Capítulo 2 - Avaliação Biométrica, Histomorfométrica e de Marcadores Bioquímicos no Uso de Ipriflavona no Tratamento da Osteoporose Induzida com Dexametasona.....	67
Resumo.....	67
Abstract	69
Introdução	71
Material e métodos	73
Resultados e discussão	76
Conclusões	88
Referências Bibliográficas	89

Capítulo 3 - Avaliação Biométrica, Histomorfométrica e de Marcadores Bioquímicos no Uso do Óleo de Linhaça no Tratamento da Osteoporose Induzida com Dexametasona.....	93
Resumo.....	93
Abstract	95
Introdução	97
Material e métodos	99
Resultados e discussão	102
Conclusões	114
Referências Bibliográficas	115
7. CONCLUSÕES GERAIS	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação RANKL/RANK/OPG no mecanismo de ativação e inibição dos osteoclastos.....	11
Figura 2 - Diagrama mostrando efeitos diretos e indiretos do glicocorticoide no tecido ósseo conduzindo ao aumento do risco à fraturas.....	17
Figura 3 - Estruturas bisfosfonato e potências relativas aproximadas para a inibição de osteoclastos.....	20
Figura 4- Estruturas dos bisfosfonatos utilizados em estudos clínicos.....	21
Figura 5 – Via do mevalonato onde os bisfosfonatos nitrogenados inibem seletivamente a farnesil pirofosfato sintase em osteoclastos.....	22
Figura 6 - Efeito das estatinas e bisfosfonatos na via do mevalonato.....	26
Figura 7 - Estrutura química do 17-β Estradiol(A), Genisteína(B), Daidzeína(C) e Gliciteína(D).....	29
Figura 8 - Mecanismo de interação dos ácidos graxos e a PPAR _γ	37

RESUMO

FERREIRA JUNIOR, Davilson Bragine, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Avaliação do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona e óleo de linhaça no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Virgínia Ramos Pizziolo e Sérgio Luis Pinto da Matta.

O objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos do alendronato de sódio, da atorvastatina cálcica, da ipriflavona e do óleo de linhaça no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona. A indução da osteoporose consistiu na administração de dexametasona na dose de 7,5mg/kg de peso corporal, por via IM, uma vez por semana durante quatro semanas, à exceção dos animais do grupo controle (G1). Os animais submetidos à indução da osteoporose foram então distribuídos aleatoriamente, recebendo os seguintes denominações e tratamentos: G2 (controle com osteoporose), G3 (Alendronato de Sódio 0,2mg/kg), G4 (Atorvastatina Cálcica 1,2mg/kg), G5 (Ipriflavona 100mg/kg) e G6 (Óleo de Linhaça 2,0ml). Após o período de 30 e 60 dias do início do tratamento os animais foram eutanasiados e então coletadas amostras de sangue para as dosagens dos níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina (FAL), fosfatase alcalina óssea (FAO), paratormônio (PTH), glicose e insulina. Além disso, foram coletados os fêmures esquerdos para avaliação biométrica e histomorfométrica. O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 6 repetições. A princípio foi verificada a existência de distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Através das avaliações biométrica e histomorfométrica foi possível verificar a perda estrutural óssea induzida pela dexametasona, assim como a influência positiva na manutenção tecidual de todos os tratamentos, apesar de somente os grupos tratados com alendronato de sódio obterem valores equiparáveis ao grupo normal. Os valores séricos de cálcio, fósforo e PTH demonstraram alterações

decorrentes do uso da dexametasona, não apresentando nenhuma alteração significativa relativa aos tratamentos. Os níveis séricos de FAO apresentaram alterações positivas nos grupos tratados com atorvastatina cálcica, ipriflavona e óleo de linhaça. Os níveis séricos de FAL, afetados pelas variantes intestinal, renal e hepática, não apresentaram correspondência à FAO. Os valores dos níveis séricos da glicose e insulina puderam demonstrar o quadro de hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina, presentes no processo de indução da osteoporose pela dexametasona. A atorvastatina cálcica ocasionou agravamento da hiperglicemia e hiperinsulinemia potencializando o quadro de resistência a insulina levando à instalação do diabetes mellitus tipo 2. Tanto a ipriflavona como óleo de linhaça foram capazes de ocasionar queda significativa da hiperglicemia com resultados bioquímicos que caracterizam, principalmente, diminuição do quadro de resistência à insulina.

ABSTRACT

FERREIRA JUNIOR, Davilson Bragine, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2016. **Evaluation of alendronate of sodium, atorvastatin calcic, ipriflavone and flexsed oil in the treatment of dexamethasone osteoporosis induced.** Advisor: José Humberto de Queiroz. Co-advisors: Virgínia Ramos Pizzolo and Sérgio Luis Pinto da Matta.

The aim of this study was to investigate the influence of sodium alendronate, atorvastatin calcium, the ipriflavone and linseed oil in the osteoporosis induction process with dexamethasone. The induction of osteoporosis was the administration of dexamethasone at a dose of 7.5mg/kg body weight IM once a week for four weeks, except for the control animals (G1). The animals subjected to induction of osteoporosis were then randomly assigned, receiving the following names and treatments: G2 (control with osteoporosis), G3 (Alendronate Sodium 0.2mg/kg), G4 (Atorvastatin Calcium 1.2 mg/kg), G5 (Ipriflavone 100 mg/kg) and G6 (Flaxseed Oil 2.0ml). Between 30 and 60 after the start of treatment blood samples were collected for measurements of serum levels of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase (FAL), bone specific alkaline phosphatase (FAO), parathyroid hormone (PTH), glucose and insulin. In addition, they collected the left femurs for biometric and histomorphometric measurement. The biological assay was performed according to a completely randomized design with 6 treatments and 6 repetitions. The principle was checked for normal distribution with the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). The groups were compared by Tukey test at 5% probability. Through histomorphometric and biometric evaluations it was possible to verify the structural bone loss induced by dexamethasone, as positive influence on tissue maintenance of all treatments, although only the group treated with alendronate sodium obtain values comparable to the control group. The serum calcium, phosphorus and PTH demonstrated changes resulting from the use of dexamethasone, showing no significant change on the treatments. Serum FAO had positive changes in the groups treated with calcium atorvastatin, ipriflavone and linseed oil. Serum FAL affected by intestinal, renal and hepatic variants showed no correspondence to FAO not recommended its use as a marker of bone

remodeling. The values of serum glucose and insulin were able to demonstrate the consequent hyperglycemia within the increased insulin resistance present in the process of induction of osteoporosis by dexamethasone, and treatment with sodium alendronate no change to the glycemia and insulinemia. The atorvastatin calcium resulted in worsening of the hyperglycemia and hyperinsulinemia potentiating insulin resistance leading to installation of the above diabetes mellitus type 2. Both ipriflavone as linseed oil were able to cause a significant drop in hyperglycemia biochemical results mainly characterized decrease the insulin resistance above.

1. Introdução Geral

A osteoporose é uma doença de fragilidade esquelética caracterizada por baixos níveis de massa óssea resultando muitas vezes em fraturas. Estima-se que 1 em cada 2 mulheres e 1 em cada 4 homens com mais de 50 anos de idade terá alguma experiência de fratura relacionada a osteoporose (Christenson et al., 2012).

A osteoporose induzida por glicocorticoides é uma complicação grave e comum nos tratamentos prolongados com esses fármacos. Normalmente são verificados nesses casos diminuição da formação óssea, assim como, incremento na sua reabsorção (Sasaki et al., 2001).

Além disso, no músculo esquelético, os glicocorticoides causam resistência à insulina, o que resulta em menor captação de glicose e redução da síntese do glicogênio muscular. Nesse tecido, também se verifica inibição da síntese proteica e aumento no catabolismo de proteínas que resultam em hipotrofia muscular. Os aminoácidos mobilizados, a partir do tecido muscular, são utilizados na gliconeogênese hepática. A resistência à insulina e o aumento na gliconeogênese, conjuntamente, resultam na hiperglicemia (Pinheiro et al., 2009).

O alendronato de sódio, que tem demonstrado ser um dos mais potentes fármacos, pertencentes ao grupo dos bisfosfonatos, atua primordialmente como agente antirreabsortivo e é largamente utilizado na prevenção da reabsorção óssea sistêmica na osteoporose (Altunda & GURSOY, 2005).

Entretanto estudos de Lehman et al. (2004) em coelhos normais verificaram a não consolidação de fraturas espinhais presumivelmente pelo desequilíbrio de atividade osteoclástica e osteoblástica ocasionado por esse fármaco.

Alguns estudos demonstraram que não somente a osteoporose, mas fármacos com propriedades antirreabsortivas, dentre eles os do grupo dos bisfosfonatos promovem a não consolidação dessas fraturas presumivelmente pelo desequilíbrio de atividade osteoblástica e

osteoclástica atuando por retardar a reabsorção óssea ao invés de estimular a formação de novo tecido ósseo (Davis et al., 2010).

Apesar do maior emprego dos fármacos antirreabsortivos, principalmente os bisfosfonatos, no tratamento da osteoporose, os agentes biomedicinais que podem ser utilizados no tratamento da mesma, de acordo com suas propriedades farmacológicas, podem ser divididos em antirreabsortivos e agentes formadores de osso (Kim et al., 2003).

Neste sentido, estudos de Mundy (2001), evidenciaram que as estatinas, dentre elas a Atorvastatina Cálcica, podem causar ganhos substanciais de massa óssea devido a seus efeitos promotores sobre o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), o qual conduz ao aumento da diferenciação osteoblástica e formação de novo tecido ósseo. Ocorre aumento da transcrição do gene do BMP-2, sendo este o provável mecanismo responsável pelos seus efeitos.

Estudos de Chehngsamans et al. (2010), com estatinas, verificaram aumento da atividade de fosfatase alcalina óssea, mineralização de matriz óssea e número de osteoblastos.

Atmaca et al. (2008), verificaram que isoflavonas, através de sua semelhança estrutural e funcional ao 17-beta-estradiol, apresentaram um efeito inibitório sobre a atividade osteoclástica, assim como aumento da BMP-2 com conseqüente aumento da diferenciação osteoblástica. A síntese de interleucinas (IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF α)), prostaglandina e do fator estimulador de macrófagos, importantes agentes reabsortivos, é inibida pela isoflavona.

Além dessas substâncias o Óleo de Linhaça, pela presença do ácido alfa-linolênico (ômega-3), tem demonstrado benefício em diminuir a atividade osteoclástica e aumentar a atividade osteoblástica, resultando em uma inibição da reabsorção óssea e promoção da formação óssea. Seu mecanismo de ação baseia-se no controle de citocinas pró-inflamatórias dentre elas a IL-6 (promotora de diferenciação e ativação osteoclástica), TNF α (estimulador da reabsorção óssea e inibição da formação óssea) e prostaglandinas (potente ativador da remodelação óssea) (Boulbaroud et al., 2008).

Ainda dietas ricas em ômega 3 causaram aumento das concentrações séricas de calcitonina e estrógenos e um decréscimo de paratormônio (PTH) (Orchand et al., 2012).

2. Justificativa e Relevância

A osteoporose induzida por glicocorticoides é uma complicação grave e comum nos tratamentos prolongados com esses fármacos.

Apesar das alternativas terapêuticas, atualmente aprovadas para o tratamento da osteoporose induzida pela dexametasona, um grande número de pacientes sofrem cirurgias de osteossíntese ou substituição de articulações que possuem como causas fraturas decorrentes da perda da densidade óssea diretamente relacionada com esta.

Atualmente, na linha de frente do tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides se encontram os medicamentos do grupo dos bisfosfonatos e, dentre eles, o alendronato de sódio tem demonstrado ser um dos mais potentes desse grupo atuando primordialmente como agente antirreabsortivo.

Esses agentes farmacológicos atuam por diminuir a reabsorção óssea desacelerando a taxa de perda óssea. Visto que a remodelação óssea é um processo acoplado, essas drogas antirreabsortivas terminam também diminuindo a taxa de formação óssea. Assim a terapia antirreabsortiva não pode levar a ganhos substanciais de densidade mineral óssea.

Muito embora o uso seja maior dos fármacos antirreabsortivos, principalmente os bisfosfonatos, no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona, os agentes biomedicinais podem ser divididos em antirreabsortivos e agentes formadores de osso.

Estudos com atorvastatina cálcica, ipriflavona e óleo de linhaça verificaram a potencial capacidade de atuação desses como agentes formadores de osso, demonstrando assim, efeitos benéficos na prevenção e tratamento da osteoporose.

Tendo em vista o exposto, o presente estudo justifica-se pela necessidade da busca de agentes biomedicinais mais eficazes no

controle e tratamento da osteoprose induzida pela dexametasona, assim como elucidar os mecanismos celulares, moleculares e fisiológicos envolvidos na atuação desses potenciais agentes formadores de tecido ósseo.

3. Revisão de Literatura

3.1 Osteoporose

É a redução da massa óssea com distorção na sua microarquitetura causando fragilidade óssea e aumentando o risco para a ocorrência de fraturas. A causa dessa diminuição da massa óssea é o declínio de sua formação nas células, resultado da deficiência dos osteoblastos ou aumento da reabsorção causada pelos osteoclastos. A osteoporose é uma doença multifatorial, que apresenta fatores intrínsecos sobre os quais não podemos intervir e os extrínsecos os quais, podemos realizar intervenções (Mendes, 2009).

Segundo Polo (2003), a osteoporose generalizada deve ser considerada como uma síndrome, que pode ser ocasionada por grande número de fatores. Ela pode ser dividida em 2 grupos: primária, na qual as causas fundamentais não são bem conhecidas (osteoporose idiopática juvenil, osteoporose do adulto jovem, osteoporose involutiva) e secundárias, cujos elementos etiopatogênicos são hipercortisolismo, hipogonadismo, hipertireoidismo, diabetes mellitus, hiperparatireoidismo, uso de anticonvulsivantes, gastrectomia, síndrome de má absorção, artrite reumatoide, doenças do colágeno, doenças neurológicas crônicas e neoplasias.

A osteoporose induzida por glicocorticoides é uma complicação grave e comum nos tratamentos prolongados com esse fármaco (Sasaki et al., 2011).

Os glicocorticoides são utilizados por praticamente todas as especialidades médicas. Cerca de 0,5% da população geral do Reino Unido utiliza esses medicamentos, chegando a uma frequência de 1,75% das mulheres acima de 55 anos. A incidência de fraturas vertebral e não

vertebral é elevada, variando de 30%-50% em pessoas que usam GC por mais de três meses (Rodrigues et al., 2012).

3.2 Glicorticóides

A estrutura molecular básica dos glicocorticoides é o ciclopentanoperidrofenantreno, derivado do colesterol que consiste em 3 anéis hexano e 1 anel pentano. Todos os glicocorticoides, naturais e sintéticos, são variações dessa estrutura básica e precisam, para ter efeito, de um grupo 11-hidroxilo. Variantes dessa estrutura levam às diferenças na potência, meia vida, metabolismo e efeitos fisiológicos (Pereira et al., 2007).

A molécula de glicocorticoide não ligada à proteína entra na célula por difusão passiva e liga-se a um receptor citoplasmático próprio (GR ou glucocorticoid receptor (receptor de glicocorticoide)) que a transporta ao núcleo e altera diretamente a transcrição de 10 a 100 genes. Os glicocorticoides encontram-se em praticamente todas as células do organismo. Dentro do núcleo, ocorre a alteração da transcrição de genes vinculados à inflamação e imunidade. Uma vez no núcleo provocam a inibição do fator nuclear NF-B e do AP1 (fatores de transcrição chave na resposta inflamatória) (Pereira et al., 2007).

Os glicocorticoides têm uma relação complexa com o metabolismo ósseo. Em condições normais, participam da diferenciação e ativação dos osteoblastos, porém, em excesso, os glicocorticoides interferem diretamente na via de receptores celulares, na proliferação, diferenciação e apoptose dessas células ósseas (Souza et al., 2010).

A osteoporose, com fraturas resultantes, constitui em complicações das interações do glicorticóide com o tecido ósseo e está relacionada à significativa dor e extrema incapacidade do indivíduo acometido (Grossman et al., 2010).

O uso de glicocorticoides provoca perda de massa óssea, sobretudo de osso trabecular (tipo de osso predominante nas vértebras), e essa perda é mais pronunciada nos primeiros meses da terapia. Há perda de 10%-20% de osso trabecular nos primeiros seis meses de uso de

glicocorticoides, e de 2% ao ano nos anos subsequentes. Também ocorre perda de osso cortical (em maior proporção em ossos longos) em 2%-3% no primeiro ano, e depois uma perda lenta e contínua é mantida. É importante ressaltar que o risco de fratura para uma mesma densidade mineral óssea (DMO) é maior na osteoporose induzida por glicocorticoide (OPIG) que na osteoporose pós-menopausa ou senil (Rodrigues, et al., 2012).

Um rápido declínio na Densidade Mineral Óssea (DMO) começa nos 3 primeiros meses de uso do glicocorticoide atingindo o pico com 6 meses, seguido de uma perda mais lenta e constante com o uso contínuo (Grossman et al., 2010).

Segundo Jilka (2003), a osteoporose secundária, causada por glicocorticoides, está associada à redução direta que o fármaco causa na quantidade de osteoblastos (aumento da apoptose de osteoblastos), resultando em rápida perda de tecido ósseo.

Além disso, o uso de glicocorticoides acarreta nos osteoblastos a supressão da produção de osteoprotegerina (OPG), que, em níveis normais, limita a liberação de enzimas pró-osteoclastogênicas ocasionando, conseqüentemente, aumento da reabsorção óssea (Jilka, 2003).

A Osteoprotegerina (OPG), conhecida também como Fator Inibidor de Osteoclastos (OCIF) ou Fator de Ligação ao Osteoclasto (OBF), é o fator chave que inibe a diferenciação e ativação dos osteoclastos. É uma glicoproteína dimérica pertencente à família TNF que atua inibindo a ligação RANKL ao RANK inibindo assim o recrutamento, proliferação e ativação dos osteoclastos (Usha, 2012).

Segundo Van Staa et al. (2005), é verificado um risco aumentado tanto de fraturas vertebrais como não vertebrais relacionado com doses de prednisolona equivalentes à 2,5-7,5 mg por dia, sendo ainda que este risco pode estar mais fortemente relacionado ao uso diário ao invés de doses cumulativas de glicocorticoides.

Tem-se demonstrado que mais de um terço dos indivíduos tratados com glicocorticoides por 5 a 10 anos terá uma fratura por osteoporose. O paciente pode permanecer assintomático por vários anos, e a perda óssea ocorre muito antes de outros sinais evidentes como atrofia cutânea, equimoses, perda muscular proximal e obesidade do tronco. No entanto, estudos têm mostrado que menos de 50% dos pacientes em tratamento com glicocorticoide em longo prazo são avaliados em relação à osteoporose, e menos de 25% são tratados (Pereira et al., 2007).

Devido à elevada frequência do uso de glicocorticoide e ao aumento da morbidade e da mortalidade relacionadas a seu uso, diversas recomendações elaboradas por várias sociedades internacionais têm sido descritas na literatura, porém, não há consenso entre elas (Rodrigues et al., 2012).

3.2.1 Mecanismo de Indução da Osteoporose pelos Glicocorticoides

3.2.1.1 Ação Direta nas Células Ósseas

Em seres humanos a osteoprose induzida por glicocorticoides ocorre em duas fases: uma rápida, fase em que a densidade mineral óssea (DMO) é reduzida, presumivelmente devido à reabsorção óssea excessiva (osteoclastos), e uma tardia, fase progressiva, em que a DMO diminui devido à prejudicada formação óssea (osteoblastos e osteócitos) (Canali et al., 2007).

O esqueleto adulto é continuamente renovado pelo processo de remodelação óssea, onde, discretas porções de osso são reabsorvidas por osteoclastos, e, em seguida, substituídas por ação dos osteoblastos. Estas atividades ocorrem nas superfícies do osso trabecular e cortical, incluindo a superfície intracortical, em locais denominados unidades multicelulares básicas (BMUs) (Brendan & Lianping, 2007).

A remodelação óssea envolve uma interação complexa entre diversos tipos de células, incluindo os osteoclastos e células da linhagem de osteoblastos, bem como uma vasta gama de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (Cristina et al., 2009).

Os osteoblastos são originários das células tronco mesenquimais (células osteoprogenitoras) do estroma da medula óssea e são responsáveis pela síntese da matriz óssea e sua subsequente mineralização, assim como, responsáveis pela regulação da atividade dos osteoclastos (Usha, 2012).

Alguns osteoblastos ficam aprisionados em sua própria matriz óssea dando origem aos osteócitos que aos poucos param de produzir o osteóide (matriz óssea recém mineralizada). Os osteócitos são a maioria das células no tecido ósseo; estas células comunicam umas com as outras e com o meio que a envolve através de extensões de sua membrana plasmática, atuando como sensores mecânicos, instruindo osteoclastos onde e quando reabsorver, e osteoblastos onde e quando a formar osso (Usha, 2012).

Os Osteoclastos são células ósseas multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea e são derivadas de precursores de linhagem hematopoiéticas (monócito/macrófago) (Cristina et al., 2009).

Muito progresso tem sido feito na compreensão dos factores que regulam a osteoclastogênese, que inclui o Fator Estimulante de Colônias 1 / Fator de Estimulação de Colônias de Macrófagos (CSF-1) (M-CSF), Ligando do Receptor Ativador do NF-kB (RANKL), Osteoprotegerina (OPG), 1, 25-di-hidroxitamina D 3 (1,25D), hormônio da paratiróide (PTH), e vários citocinas pró-inflamatórias (Cristina et al., 2009).

O sistema Receptor Ativador do Fator Nuclear-kB (RANK) seu Ligante (RANKL) e a Osteoprotegerina (OPG) atuam como os principais mecanismos celulares com papel na regulação da reabsorção óssea (Figura 1) (Brendan & Lianping, 2007).

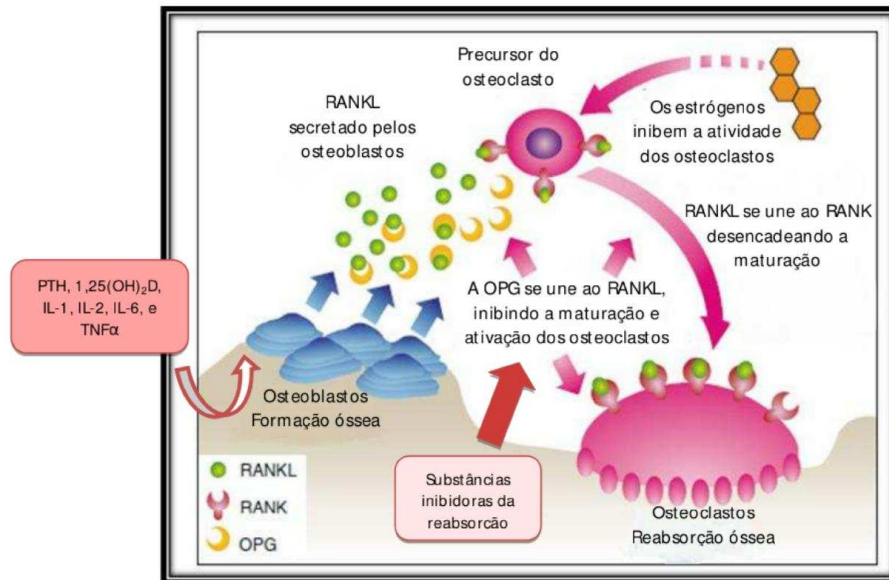


Figura 1- Ação RANKL/RANK/OPG no mecanismo de ativação e inibição dos osteoclastos (Adaptado de Amaral et al., 2014).

O Ligante do Receptor Ativador do NF- κ B (RANKL) é uma proteína trimérica que existe em ambas as formas, ligada a membrana ou secretada, e é essencial para a formação de osteoclastos. A RANKL estimula a formação de osteoclasto ligando-se ao receptor RANK encontrado nas Células Precursoras de Osteoclastos (OCPs) (Natalie & Kong, 2014).

Na remodelação óssea, células da linhagem dos osteoblastos, incluindo as células mais maduras e imaturas (células estromais e osteócitos, respectivamente) apoiam a osteoclastogênese na remodelação expressando RANKL (Natalie & Kong, 2014).

A sinalização RANKL / RANK regula a formação de osteoclastos a partir dos seus precursores, bem como a sua activação e sobrevivência em remodelação óssea normal e numa variedade de condições patológicas. A OPG protege o esqueleto ósseo da excessiva reabsorção pela ligação ao RANKL impedindo-a de se ligar a seu receptor, RANK (Brendan & Lianping, 2007).

Os osteoclastos são membros da família dos monócitos / macrófagos que se diferenciam sob a influência de duas citocinas necessárias, a saber, fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) e o Ligante do Receptor Ativador do fator NF-kB (RANK-L) (Canali et al., 2007).

Os glicocorticoides aumentam a expressão de M-CSF e G-RANK e diminuem a expressão de Osteoprotegerina (OPG), em células do estroma e osteoblásticas. Causam, também, abrupta redução dos níveis séricos de osteoprotegerina (OPG) poucos dias após o início da terapia com glicocorticoide (Sasaki et al., 2001).

O aumento das taxas de reabsorção óssea encontrados aparentemente envolve o Ligante do Receptor Ativador do Fator NF-kB (RANK-L), sendo que o RANK-L é um sinal do osteoblasto que se liga a um receptor no osteoclasto em associação com o Fator de Estimulação de Colônias (CSF)-1 induzindo a osteoclastogênese. (Canalis & Delany, 2002)

A Osteoprotegerina funciona como um receptor armadilha que se liga ao RANK-L prevenindo sua ligação ao receptor no osteoclasto e subsequente osteoclastogênese. (Canalis & Delany, 2002)

Os glicocorticoides diminuem o número e a função de osteoblastos. Estes efeitos conduzem a uma supressão da formação de osso, uma característica central na patogênese da osteoporose induzida por glicocorticoide. Os glicocorticoides diminuem a replicação das células da linhagem dos osteoblastos, reduzindo o conjunto de células que pode diferenciar-se em osteoblastos maduros. Além disso, os glicocorticoides prejudicam a diferenciação dos osteoblastos assim como sua maturação (Canali et al., 2007).

Em adição à ação direta dos glicocorticoides nas células de formação óssea muitos desses efeitos são indiretamente mediados por alterações na síntese ou ligação com Fatores de Crescimento Esquelético. (Canalis & Delany, 2002)

As células ósseas secretam varios fatores de crescimento e citocinas, mas os glicocorticoides impactam principalmente os fatores de

crescimento semelhantes à insulina (IGF)-1 e fatores transformadores do crescimento (TGF)- β . (Canalis & Delany, 2002)

O IGF -1 atua aumentando a formação óssea e síntese de colágeno tipo 1 e diminuindo a degradação de colágeno ósseo e apoptose de osteoblasto. Os glicorticoides suprimem a transcrição genética do IGF -1, mas não alteram o número de receptores IGF-1 ou sua afinidade em osteoblastos (Canali et al., 2007).

O TGF- β estimula a síntese de colágeno e outras proteínas da matriz óssea sendo que os glicorticoides deslocam a ligação do TGF- β dos receptores de transdução da sinalização para ligação com proteínas não sinalizantes (Canalis et al., 2007).

Além disso, os glicorticoides diminuem a produção de prostaglandina E2 no osso, cujo efeito principal é estimular a síntese de proteínas colágenas e não colágenas. Este parece ser somente um mecanismo coadjuvante na osteoporose induzida por glicorticoides, desde que a perda óssea não pode ser reproduzida por drogas que inibem a síntese de prostaglandinas, como a indometacina.

3.2.1.2 Alteração na Produção do Hormônio do Crescimento

(GH)

Pode-se dizer que o sistema GH/IGF-1 e a herança genética são o grupo de fatores que influenciam diretamente o desenvolvimento ósseo (Tágli, 2013).

O hormônio de crescimento (GH) exerce a maior parte de suas funções através de intermediários chamados somatomedinas ou fator de crescimento semelhante à insulina (IGFs). Em resposta ao GH, células de diferentes tecidos do corpo humano secretam IGFs que entram na corrente sanguínea ou agem no próprio local. Durante a puberdade, com a elevação dos hormônios sexuais, ocorre um aumento dos picos e da amplitude de GH, fazendo com que ocorra um aumento na velocidade de crescimento ósseo, primeiro nas meninas e posteriormente nos meninos devido às diferentes velocidades maturacionais (Tágli, 2013).

A secreção de hormônio de crescimento (GH) é modulada por uma interação complexa entre dois fatores hipotalâmicos: o hormônio liberador do GH (GH-releasing hormone, GHRH) e a somatostatina (SRIF). Recentemente foi sugerida a existência de uma terceira via fisiológica de regulação deste hormônio, mediada pelos GHS (growth hormone secretagogues) e provavelmente pelo peptídeo endógeno, grelina. Os glicocorticoides (GCs) influenciam a secreção de GH atuando em diversos níveis, apesar dos mecanismos envolvidos nessas múltiplas ações não estarem totalmente elucidados. Além disso, esses esteroides têm efeitos estimulatórios ou inibitórios na liberação de GH, dependendo do modelo experimental, duração da exposição, dose, tipo e via de administração, entre outros. Embora controversa, a administração aguda de GCs aumenta a secreção de GH em humanos. No entanto, quando presente em níveis suprafisiológicos por períodos mais longos (meses ou anos), os GCs inibem a liberação de GH (Silva & Lengyel, 2003).

3.2.1.3 Alterações na Produção dos Esteroides Gonadais

Os glicocorticoides inibem a secreção hipofisária das gonadotrofinas, a secreção ovariana e testicular de estrógenos e testosterona e a secreção adrenal de androstenediona e dehidroepiandrosterona (Canalis & Delany, 2002).

No caso de deficiência de estrógenos é verificado aumento dos níveis do Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α secretados pelas células T que desempenha um papel central no estímulo da reabsorção óssea (Canalis & Delany, 2002).

3.2.1.4 Alterações na Secreção do Paratormônio (PTH)

A produção e secreção de PTH podem ser estimuladas por hipocalcemia, hiperfosfatemia e deficiência de vitamina D. Devido a sua principal função em prevenir a hipocalcemia, o PTH estimula osteoclastos a lisar o osso, liberando cálcio na circulação. Normalmente esse processo

de homeostase controla a atividade de osteoclastos e osteoblastos, mas o hiperparatireoidismo secundário provoca um desequilíbrio das atividades dessas células, levando ao aumento de degradação óssea, e à osteodistrofia (Câmara, 2015).

Segundo Canalis & Delany (2002), apesar de estudos prévios sugerirem que os glicocorticoides causem hiperparatireoidismo secundário, o simples fato de ocorrer decréscimo da absorção intestinal e aumento da excreção urinária do cálcio ocasionando um aumento das taxas de reabsorção óssea não podem explicar o hiperparatireoidismo secundário.

Ainda, segundo Canalis & Delany (2002), os níveis séricos do Hormônio da Paratireoide (PTH) em pacientes expostos aos glicocorticoides não seguem os valores obtidos nos casos de hiperparatireoidismo. Além disso, pacientes expostos ao glicocorticoide desenvolvem a doença óssea caracterizada por decréscimo da remodelação óssea enquanto que é encontrado aumento de remodelação óssea no hiperparatireoidismo.

A figura 2 representa um resumo dos eventos fisiológicos provocados pelos glicocorticoides que culminam na diminuição da quantidade e qualidade da estrutura óssea aumentando preponderantemente o risco de fraturas ósseas.

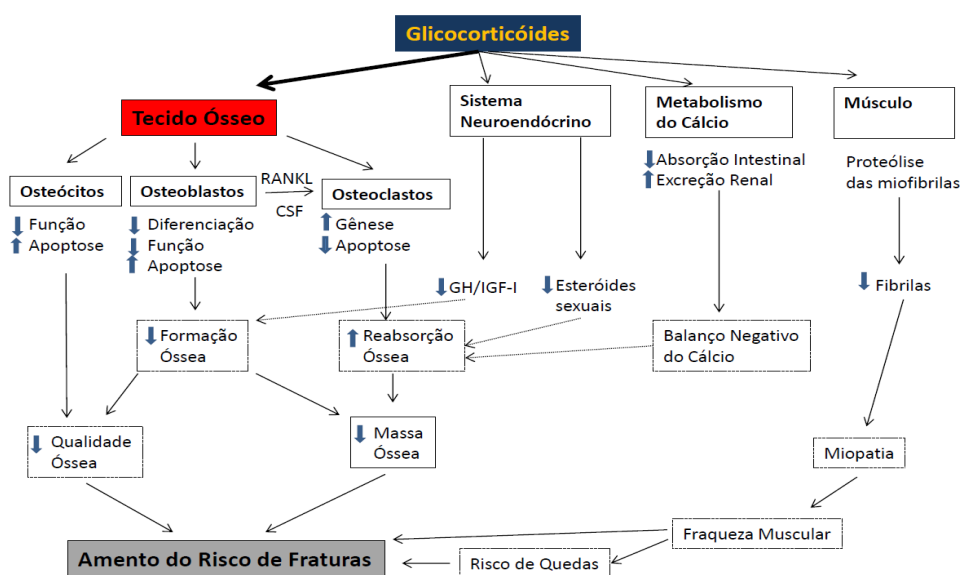


Figura 2 - Diagrama mostrando efeitos diretos e indiretos do glicocorticoide no tecido ósseo conduzindo ao aumento do risco à fraturas (Adaptado de Canali et al., 2007).

3.2.2 Alterações no Metabolismo de Carboidratos Ocasionado pelos Glicocorticoides

Os glicocorticoides são hormônios sintetizados e secretados pelo córtex adrenal. Esta classe de hormônios exerce inúmeras ações fisiológicas no organismo quando disponíveis em concentrações normais. Os glicocorticoides atuam normalmente sobre o metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras e são secretados em maiores quantidades em situações traumáticas e estressantes. Entretanto, quando as concentrações plasmáticas dos glicocorticoides excedem o normal, podem induzir distúrbios metabólicos (Santos et al., 2007).

O termo glicocorticoide deve-se à ação dessas substâncias no metabolismo de carboidratos. No músculo esquelético, os glicocorticoides causam aumento da resistência à insulina, o que resulta em menor captação de glicose e redução da síntese do glicogênio muscular. Nesse tecido, também se verifica inibição da síntese proteica e aumento no catabolismo de proteínas que resultam em hipotrofia muscular. Os aminoácidos mobilizados, a partir do tecido muscular, são utilizados na gliconeogênese hepática (Pinheiro et al., 2009).

A glicose é a principal fonte de carboidrato do organismo e sua concentração sérica está intimamente ligada à insulina. Após uma refeição rica em carboidratos, a glicose que é absorvida para o sangue causa uma rápida secreção de insulina. Esta por sua vez, provoca captação, armazenamento e uso rápido da glicose por quase todos os tecidos corporais especialmente músculos, tecido adiposo e fígado (Gross et al., 2002).

A resistência à insulina ocorre quando os tecidos corporais responsáveis pela captação e uso da glicose não respondem adequadamente a insulina produzida pelo organismo (Ferreira et al., 2007).

A elevação dos níveis de insulina pode ser explicada parcialmente como resposta adaptativa das células B pancreáticas a eventos periféricos como a resistência à insulina desenvolvida na presença de

concentrações elevadas de glicocorticoides. Diversos autores demonstraram o efeito direto dos glicocorticoides sobre tecidos periféricos insulino-dependentes como o tecido muscular, adiposo e hepático (Santos et al., 2007).

Além disso, os glicocorticoides têm sido descritos como promotores da diferenciação e proliferação dos adipócitos em humanos. Esses adipócitos tendem a se acumular no tecido adiposo visceral, o que está associado ao quadro de resistência insulínica presente na maioria dos pacientes com hipercortisolismo (Romanholi & Salgado, 2007).

Segundo Geloneze & Tambascia (2006), o aumento dos níveis circulantes de lipídios decorrentes da dislipidemia ocasionada pelo uso crônica dos glicocorticoides também podem contribuir para o agravamento da resistência periférica à insulina.

3.3 Tratamentos da Osteoporose.

3.3.1 Bisfosfonatos

Estruturalmente, os bisfosfonatos são derivados quimicamente estáveis de pirofosfato inorgânico (PPi), um composto de ocorrência natural em que dois grupos fosfato estão ligados por esterificação (Figura 3) (Drake et al., 2008).

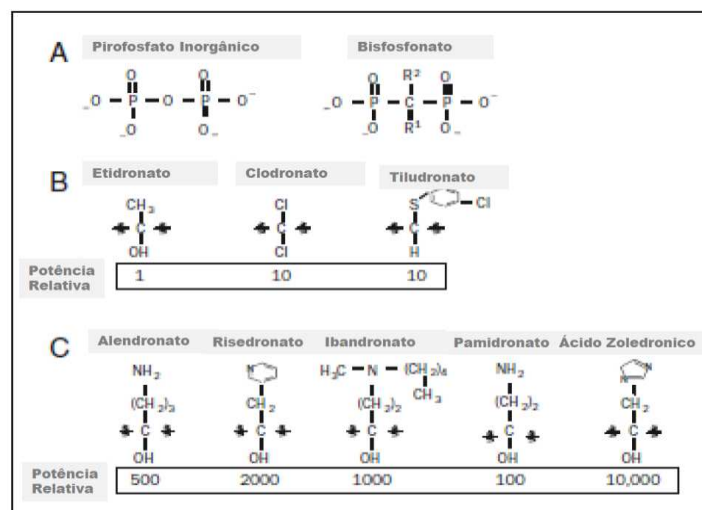


Figura 3 - Estruturas bisfosfonato e potências relativas aproximadas para a inibição de osteoclastos. (Adaptado de Drake et al., 2008)

Assim como seu análogo natural PPI, os bisfosfonatos têm uma afinidade muito elevada pelo componente mineral do tecido ósseo ligando-se de maneira estável aos cristais de hidroxiapatita inibindo sua quebra e suprimindo eficazmente a reabsorção óssea. (Russell, 2006)

As modificações da estrutura química dos bisfosfonatos ampliaram as diferenças entre concentração necessária para sua eficácia de atividade antirreabsortiva na matriz mineral óssea. (Drake et al., 2008).

A fração P-C-P é a responsável pela forte afinidade dos bisfosfonatos para a ligação com a hidroxiapatita permitindo um número de variações na sua estrutura com base na substituição nas posições R1 e R2 no átomo de carbono. A capacidade dos bisfosfonatos de se ligarem aos cristais de hidroxiapatita foi ampliada quando a cadeia lateral R1 era um grupo hidroxila (ex.: etidronato) em vez de um halogênio (ex.: clodronato). A presença do grupo hidroxila na posição R1 aumenta a afinidade para o cálcio (Figura 4) (Russell, 2006).

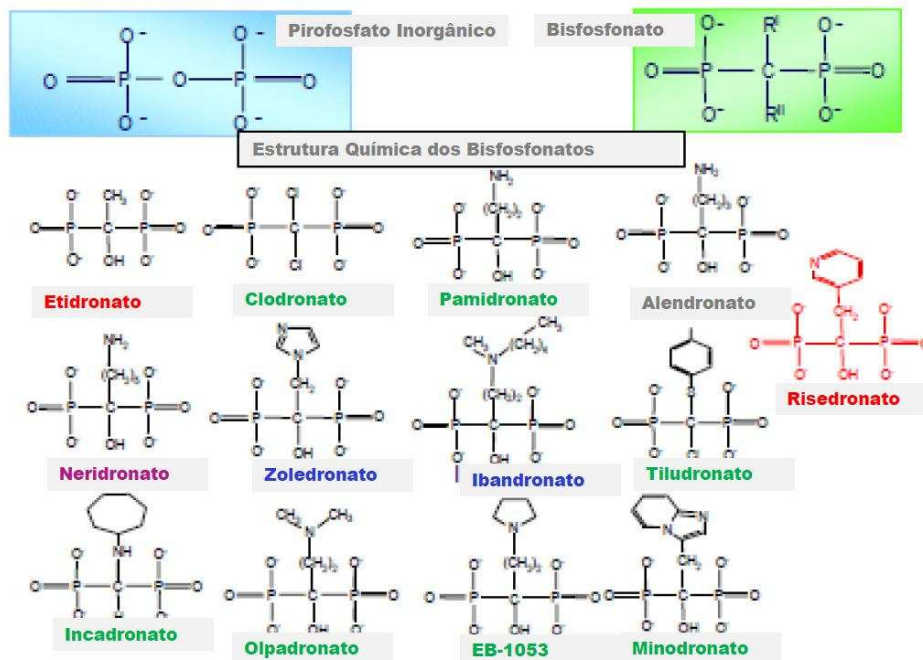


Figura 4- Estruturas dos bisfosfonatos utilizados em estudos clínicos (Adaptado de Russell, 2006).

Após o bem sucedido uso clínico de clodronato e etidronato na década de 1970 à 1980, estudos com bisfosfonatos com diferenças nas

cadeias laterais R2, mas com o R1 inalterado, apresentaram ação antireabsortiva mais potentes. Em particular bisfosfonatos contendo um átomo de nitrogênio primário em uma cadeia alquil (tal como no pamidronato e alendronato) demonstraram ser de 10 a 100 vezes mais potente do que o etidronato e o clodronato.

Os bisfosfonatos nitrogenados (alendronato, risedronato, ibandronato, pamidronato e ácido zoledrônico) além de apresentarem a capacidade antirreabsortiva através da ligação com a hidroxiapatita atuam predominantemente inibindo a ativação da farnesil difosfato sintase na via do mevalonato ocasionando apoptose de osteoclastos com consequente diminuição da reabsorção óssea (Figura 5) (Lin et al., 2015).

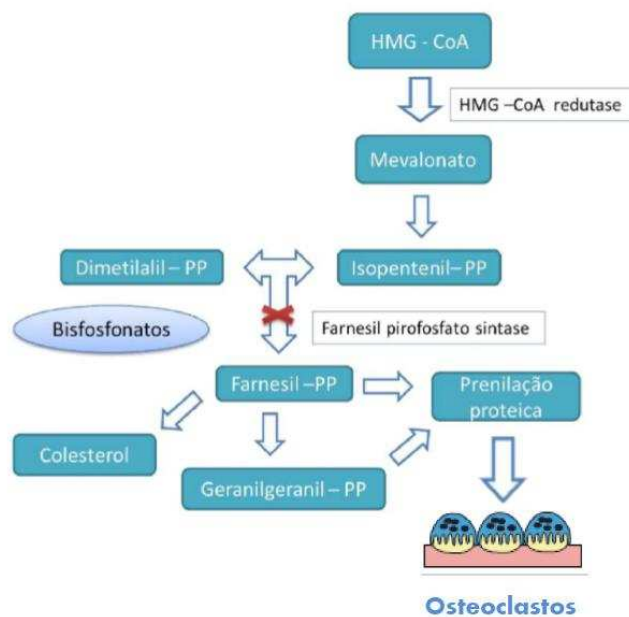


Figura 5 – Via do mevalonato onde os bisfosfonatos nitrogenados inibem seletivamente a farnesil pirofosfato sintase em osteoclastos (Adaptado de Amaral et al., 2014).

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

Recentemente, estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm indicado que os bisfosfonatos, adicionalmente à sua propriedade antirreabsortiva, atuam promovendo a atividade osteoblástica e conseqüentemente à formação de tecido ósseo. Estudos de Knoch et al. (2005), em cultura de células de medula óssea humana tratadas com os bisfosfonatos alendronato, risedronato e zoledronato evidenciaram a proliferação celular e diferenciação osteogênica determinada pelo aumento da contagem de células assim como aumento de atividade celular, verificado pelo aumento dos níveis de fosfatase alcalina.

Segundo Im et al. (2004), os bifosfonatos alendronato e risedronato, tanto em cultura de células trabeculares óssea humanas, como em cultura de células de linhagem osteoblástica MG-63, demonstraram através de testes de fosfatase alcalina e de cadeias de polimerase transcriptase reversa promoção de significativo aumento no número de células, assim como diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos.

Os bisfosfonados são considerados os agentes de escolha tanto para prevenção quanto para tratamento da osteoporose induzida por GC. Agem ligando-se à hidroxiapatita na superfície óssea e prevenindo a reabsorção mediada por osteócitos assim como a apoptose de osteoblastos (Pereira et al., 2007).

Segundo Drake et al.(2008),o risedronato e alendronato têm sido aprovado para uso clínico na prevenção e tratamento da osteoporose induzida por glicorticoides sendo que ambos demonstram maior eficácia quando os níveis de vitamina D e cálcio são adequados.

O alendronato tem sido descrito reduzindo a perda óssea em pacientes tratados com moderada e altas doses de prednisona para doenças heterogêneas, no entanto não há dados disponíveis sobre os grupos de pacientes com as mesmas doenças subjacentes que recebem a dose baixa crônica de tratamento com prednisona (Lems et al., 2006).

Estudos de Lems et al. (2006), observaram um efeito positivo do alendronato na Densidade Mineral Óssea da coluna lombar e nos marcadores de turnover ósseo em pacientes tratados com uma dose

baixa de prednisona. Estes dados suportam a evidência clínica que a prescrição de alendronato não só é útil em doentes tratados com doses elevadas de prednisona, mas também em pacientes cronicamente tratados com baixa dose de prednisona.

Os bisfosfonatos são os agentes mais largamente utilizados no controle e tratamento da osteoporose devido sua eficiência e baixo custo. No entanto apesar de reduzirem a incidência de fraturas não apresentam ganho em formação óssea. Além disso, o seu uso prolongado demonstra vários efeitos colaterais como: fraturas subtrocantéricas do fêmur, osteonecrose de mandíbula, irritação esofágica entre outros, causando impacto negativo à adesão ao tratamento pelo paciente (Drake et al., 2008).

Muito embora o uso seja maior dos fármacos antirreabsortivos, principalmente os bisfosfonatos, no tratamento da osteoporose induzida pelos glicorticoides, agentes biomedicinais com propriedades formadoras de tecido ósseo apresentariam potencial reposição tecidual com melhores resultados em densidade trabecular óssea, diminuição da ocorrência de fraturas, assim como melhor recuperação em caso de fraturas ósseas (Kim et al., 2003).

3.3.2 Estatinas

A descoberta dos inibidores da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, ou simplesmente estatinas, revolucionou o tratamento da hipercolesterolemia, o principal fator de risco de doença coronariana. As estatinas são os agentes hipolipidêmicos mais usados na atualidade devido à sua eficácia na redução do nível de colesterol sanguíneo e às suas excelentes tolerabilidade e segurança (Anbinder et al., 2006).

Certos bisfosfonatos, principalmente os nitrogenados atuam predominantemente diminuindo a reabsorção óssea inibindo a ativação da farnesil difosfato sintase na via do mevalonato. Interessantemente a inibição da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase demonstrou ação semelhante na via do mevalonato resultando na

redução da atividade osteoclástica com efeitos ósseos semelhantes aos bisfosfonatos (Figura 6) (Lin et al., 2015).

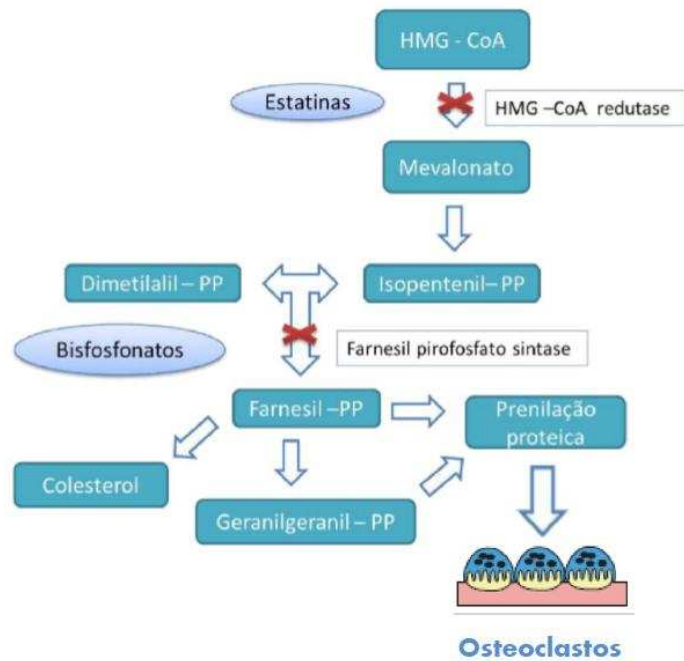


Figura 6 - Efeito das estatinas e bisfosfonatos na via do mevalonato (Adaptado de Amaral et al., 2014).

Lin et al.(2015), verificaram em ratas ovariectomizadas que doses de atorvastatina utilizadas no tratamento de dislipidemias não somente diminuíram os níveis séricos de lipídeos mas também promoveram melhora biomecânica óssea assim como aumento de colágeno no tecido ósseo.

Estudos relataram a ação das estatinas na formação óssea pela estimulação da expressão da proteína morfogenética óssea (BMP)-2, a qual conduz a diferenciação osteoblástica e consequente formação óssea. Ocorre aumento da transcrição do gene da BMP-2 nos osteoblastos, sendo este o provável responsável pelos seus efeitos (Mundy, 2001).

Estudos de Leem et al. (2002) com a lovastatina verificaram aumento da atividade de fosfatase alcalina óssea, mineralização de matriz óssea e osteogênese de células ósseas *in vitro*.

Visto isso, passou-se a acreditar que as estatinas, se seletivamente direcionadas ao osso, poderiam apresentar efeitos benéficos no tratamento da osteoporose e de fraturas. Tais observações suscitaram grande interesse na comunidade científica e vários estudos foram realizados, demonstrando a ação das estatinas na melhoria da densidade óssea e na redução do número de fraturas (Anbinder et al., 2006).

As estatinas têm demonstrado capacidade de diminuição da reabsorção óssea, aumento da densidade mineral óssea (DMO) e aumento da formação óssea (Mardegan Issa et al., 2015).

Uma explicação para esses resultados é que as estatinas diminuem o nível de metaloproteinases (MMPs), que são proteases extracelulares de matriz envolvidas na resposta inflamatória e diferenciação celular em cartilagem e tecido ósseo (Mardegan Issa et al., 2015).

Woo et al. (2000), verificaram que a mevastatina suprimia a reabsorção óssea através da inibição da fusão de pré osteoclastos e interrompendo a formação do anel de actina nos osteoclastos.

Segundo Kaji et al. (2005), as estatinas são capazes de aumentar os níveis de osteoprotegerina e de reduzir o ligando receptor do ativador de NF-kB (RANKL) em culturas de células ósseas de rato.

Os osteoblastos estão localizados nas proximidades das células endoteliais sendo que a invasão vascular é um pré-requisito para a formação endotelial óssea com posterior neoformação óssea sendo que importante interação ocorre entre as células endoteliais e os osteoblastos e o fator angiogênico de crescimento endotelial (VEGF) parece estar envolvido nesta comunicação intercelular (Maeda et al., 2003).

Várias variantes de VEGF, bem como os seus receptores, estão expressos em osteoblastos sendo que a presença desta citocina tem demonstrado induzir aumento na atividade da fosfatase alcalina assim como melhorar a resposta ao PTH (Maeda et al., 2003).

Em estudos de Maeda et al.(2003), foi demonstrada a capacidade das estatinas de estimular a expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF) via inibição da prenilação proteica em células osteoblasticas.

Estudos de Kaji et al.(2008), reportaram que a Smad3, uma molécula fundamental na transdução da sinalização do TGF- β para o núcleo, promove aumento na produção do colágeno tipo I (Col1), aumento da atividade da fosfatase alcalina e capacidade de mineralização de células osteoblasticas de ratos. Além disso, foi verificado que tanto o PTH como os glicorticoides modulam a via Smad3 nas células osteoblasticas independentemente do TGF- β . As estatinas foram capazes de aumentar, em cultura de células osteoblásticas, o nível da Smad3 independentemente da indução do receptor TGF- β . Além disso, foi suprimida a apoptose de osteoblastos através da via TGF- β -Smad3. (Kaji et al., 2008)

3.3.3 Flavonoides

Evidências científicas através de estudos em humanos, animais e sistemas de culturas de células sugerem que as isoflavonas, que são compostos presentes na soja, especificamente a genisteína e a daidzeína desempenham um papel importante na prevenção de doenças crônicas como câncer, diabetes mellitus, osteoporose e doenças cardiovasculares (Zafra-Gómez et al., 2010).

As isoflavonas são compostos químicos fenólicos que pertencem à classe dos fitoestrógenos, com estrutura química bastante semelhante ao estrógeno humano (Figura 7), sendo assim, se comportando como estrógenos verdadeiros, ligando-se aos receptores de estrógeno com a vantagem de não causarem os mesmos efeitos colaterais (Zakir & Freitas, 2015).

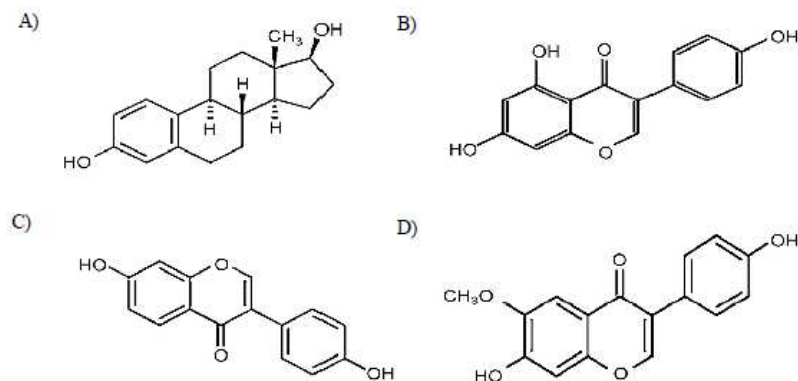


Figura 7 - Estrutura química do 17-β Estradiol (A), Genisteína (B), Daidzeína(C) e Gliciteína(D) (He & Chen , 2013).

Uma das formas de ação das isoflavonas, particularmente da genisteína, é o bloqueio de fosforilações específicas como a do fator NFκB que participa em processos inflamatórios e na osteoporose (Zakir & Freitas, 2015)

Estudos com animais têm mostrado que extratos enriquecidos com isoflavonas aumentam a massa óssea. Estudos *in vitro*, além de confirmar estas evidências, estendem os conhecimentos da resposta observada em modelos-animais, estabelecendo que ambos, a genisteína e o estradiol são tóxicos às células ósseas em altas concentrações (10^{-4} M) e que, em baixas concentrações, a genisteína e o estradiol aumentam a produção de biomarcadores ósseos e fosfatase alcalina de maneira similar (Esteves & Monteiro, 2001).

Vários possíveis mecanismos têm sido sugeridos para explicar os efeitos benéficos das isoflavonas de soja no tecido ósseo, os quais podem ajudar a prevenir o desenvolvimento da osteoporose. Tem-se sugerido que os osteoblastos e os osteoclastos são as células alvo para a ação da genisteína e da daidzeína. Estudos em cultura de células semelhantes a osteoblastos sugerem que a genisteína combina com receptores de estrógenos e exerce seus efeitos pelo mesmo mecanismo que este hormônio. Por outro lado, ela pode também exercer efeitos por outros mecanismos, independentes de receptores para estrógenos. (Esteves & Monteiro, 2001).

Alguns investigadores têm sugerido que a genisteína inibe a topoisomerase II, interferindo assim, com a progressão do ciclo celular, enquanto que outros sugerem que a genisteína ativa receptores peptídicos ligados à membrana, iniciando outros efeitos independentes de estrógenos. Por exemplo, os osteoclastos são dependentes da atividade de receptores tirosina quinase (PTK), então os inibidores de PTK são candidatos à prevenção da osteoporose. A genisteína e a daidzeína, isoflavonas naturais, são inibidoras de PTK e poderiam agir por este mecanismo (Esteves & Monteiro, 2001).

Atmaca et al. (2008), verificaram que isoflavonas, através de sua semelhança estrutural e funcional com o 17-beta-estradiol, apresentaram um efeito inibitório sobre a atividade osteoclástica, assim como aumento da BMP-2 com conseqüente aumento da diferenciação osteoblástica. A síntese de interleucinas (IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF α)), prostaglandina e do fator estimulador de macrófagos, importantes agentes reabsortivos, é inibida pela isoflavona.

A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopirano-4-ona) é uma isoflavona sintética, derivada da daidzeína, sendo comercializada com a finalidade de prevenir e/ou tratar a osteoporose (Bellei et al., 2012).

O fitoestrógeno sintético ipriflavona tem demonstrado capacidade de inibir a atividade reabsortiva e estimular a atividade osteoblástica tanto *in vitro* como em estudos em animais (Iwasaki et al., 2012).

Segundo Fernandes et al. (2011), os fitoestrógenos exercem sua ação biológica através de diversos mecanismos como: mimetizam a ação dos estrogênios endógenos, agem como antagonistas do estrogênio, alteram o padrão de síntese e metabolismo dos estrogênios endógenos e modificam os receptores hormonais.

Pequenas doses de ipriflavona demonstraram, *in vitro*, otimizar a proliferação de osteoblastos e inibir a atividade de osteoclastos maduros. Já altas doses de ipriflavona inibiram a proliferação de osteoblastos, indicando ser a ação da ipriflavona sobre as células osteoblásticas e osteoclásticas dose dependente. Os metabólitos da ipriflavona são

capazes de inibir a reabsorção óssea através da inibição da estimulação paratiroideana (Fernandes et al., 2011).

3.3.4 Óleo de Linhaça

Linum usitatissimum L., popularmente conhecida como linhaça ou linho, é uma planta pertencente à família das *Lináceas* originária da Ásia. Da casca da planta é retirada a fibra do linho, matéria-prima para a fabricação de tecidos, e da cápsula se obtém a semente. Apesar de usada há milênios na alimentação humana, a maior parte de seu cultivo é destinada às indústrias de óleo, para tintura e para ração animal (Anne Tiffany, et al., 2011).

A linhaça (*L. usitatissimum*) é uma das 6 plantas atualmente reconhecidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US National Cancer Institute - NCI) por suas propriedades específicas no combate ao câncer. Parte desse reconhecimento deve-se a notável característica de ser a fonte mais rica de precursores lignana (esteroide vegetal de ação análoga ao estrógeno de mamíferos) na dieta humana (Bombo, 2006; Marques, 2008).

Nos mamíferos, os precursores da lignana vegetal como o seicoisolariciresinol diglicosídeo são convertidos primeiramente em enterodiol pela ação das bactérias no trato gastrointestinal e posteriormente oxidadas a enterolactona. Devido ao fato que o enterodiol e a enterolactona serem estruturalmente similares tanto aos estrogênios sintéticos como aos de ocorrência natural, ambos apresentam atividades estrogênica fraca e, portanto, podem desempenhar um papel na prevenção de cânceres dependentes de estrogênios (Santos, 2008).

Por conta dessa similaridade com o estrogênio, as lignanas têm sido relacionados positivamente com a menopausa. Em um estudo realizado em Santa Maria – RS, com 30 mulheres, 36,4% tiveram os sintomas da menopausa aliviados consumindo 10g/dia do grão de linhaça (Colpo et al., 2006) (Cordeiro et al., 2009).

O óleo de linhaça é composto por 57% de ácidos graxos poli-insaturados α -linolênico (ALA, 18:3n-3 (Ômega-3 (ω -3))), 16% de ácidos graxos poli-insaturados linoleico (AL, 18:2n-6 (Ômega-6 (ω -6))), 18% de ácidos graxos monoinsaturados e somente 9% de ácidos graxos saturados. A predominância de Omega-3 é três vezes superior ao Omega-6, fazendo com que seja a maior fonte vegetal deste ácido linolênico, cinco vezes mais abundante que em nozes ou óleo de canola (Cupersmid et al., 2012).

O ALA e o AL, depois de ingeridos, podem ser transformados em prostaglandinas e leucotrienos com atividades imunomoduladoras. Além disso, o ALA constitui fonte energética e matéria-prima do tecido nervoso, bem como de substâncias que regulam a pressão arterial/frequência cardíaca, a coagulação, a dilatação vascular e a lipólise. Além de ser composto por aproximadamente 40% de lipídeos, o grão também contém aminoácidos essenciais (destacando-se a metionina e a cisteína), lignanas, fibras alimentares solúveis e insolúveis, goma, ácidos fenólicos, flavonoides, ácido fítico, vitaminas (B₁, B₂, C, E, caroteno) e minerais (ferro, zinco, potássio, magnésio, fósforo, cálcio), os quais também são responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde, reforçando as propriedades funcionais da linhaça (Anne et al., 2011).

Em humanos, os ácidos linoleico (18:2n-6, AL) e alfa-linolênico (18:3n-3, ALA) são necessários para manter sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo a partir dos ácidos graxos provenientes da síntese de novo (Martin et al., 2006).

Tanto o ALA como o AL têm sido alvos de inúmeros estudos nas últimas décadas, os quais esclareceram muitas das suas funções no organismo humano destacando a importância do seu uso na fase gestacional, nos primeiros meses após o nascimento, na terceira idade

e em diversas doenças, principalmente degenerativas (Martin et al., 2006).

Uma das mais importantes funções dos ácidos graxos $\omega-3$ e $\omega-6$ está relacionada à sua conversão enzimática em eicosanoides. Os eicosanoides desempenham diversas atividades, dentre elas modulam a resposta inflamatória, a resposta imunológica, têm importante papel na agregação plaquetária, no crescimento e na diferenciação celular (Martin et al., 2006).

Por desempenhar essas funções de extrema importância a razão $\omega-6 / \omega-3$ na dieta tem grande influência sobre a produção de ácidos graxos polinsaturados (AGPI) da família $\omega-3$, sendo que razões elevadas resultam na diminuição da produção do ácido eicosapentanóico (EPA). Embora esta conversão de ALA em EPA seja baixa em humanos (em torno de 5%), além de ser precursor do EPA, que por sua vez é precursor dos eicosanoides, o ALA se incorpora aos fosfolípidos das membranas das células, interferindo na conversão do ácido linoleico a ácido araquidônico e bloqueia a conversão do ácido araquidônico em eicosanoides pró-inflamatórios. O ALA também bloqueia a formação de citocinas (Cupersmid et al., 2012).

Há evidências crescentes de que a falta de certos ácidos graxos na dieta contribui para a perda óssea. Além disso, a osteoclastogênese é regulada por uma série de citocinas, fatores de crescimento e eicosanóides. Os eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e compostos relacionados) são formados a partir da cadeia longa de ácidos graxos poliinsaturados liberados a partir de fosfolípidos de membrana. A quantidade e o tipo de eicosanóides produzidos refletem os tipos de ácidos graxos disponíveis. A composição de ácidos graxos da membrana é por sua vez influenciada pela fonte dietética de ácidos graxos (Maggio et al., 2009).

Há pelo menos três principais vias de ação pelo qual o ácido graxo ômega-3 pode afetar a remodelação óssea. O ômega-3 pode modular a absorção de cálcio, as citocinas inflamatórias e receptores ativados por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ) (Maggio et al., 2009).

Estudos sugerem que os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LCPUFAs) podem promover a absorção intestinal de cálcio, através do aumento da Ca^{2+} ATPase, a enzima responsável pela absorção de cálcio ativo no intestino. A atividade de Ca^{2+} ATPase nas membranas basolaterais de enterócitos duodenais tratadas com ácido docosahexaenóico (DHA) é aumentada em comparação com a membrana não tratada e tratada com ácido eicosapentaenóico (EPA) (Haag et al., 2003)

Estudos de Ferrucci et al.(2006), demonstraram que a ingestão de LCPUFAs, especialmente os ácidos graxos ômega-3, foi responsável por menores níveis séricos de marcadores pró-inflamatórios (IL-6, IL1, $\text{TNF}\alpha$ e proteína C-reativa).

Os ácidos graxos do tipo ômega-3 inibem a produção de IL-1 e $\text{TNF}\alpha$, sendo que os de cadeia longa (EPA, DHA) substituem parcialmente os ácidos graxos ômega-6, nas membranas celulares. O aumento da relação ômega-3 / ômega-6 resulta em alterações da função da membrana, com subsequente diminuição de IL-1, IL-6 e $\text{TNF}\alpha$. (Ferrucci et., 2006).

Os osteoblastos derivam a partir de células tronco mesenquimais pluripotentes, que podem se diferenciar em osteoblastos maduros ou adipócitos. O mecanismo de regulação da diferenciação de células tronco em osteoblastos é realizado pelo fator de transcrição nuclear $\text{PPAR}\gamma$ que é expresso no tecido adiposo e medula óssea (Akune et al., 2004).

O aumento da proporção na dieta de ácidos graxos ômega-3 em relação aos ácidos graxos ômega-6 pode diminuir a ativação de $\text{PPAR}\gamma$ e promover a osteoblastogênese em vez de aumento de adiposidade na medula óssea (Figura 8) (Vanek & Connor, 2004).

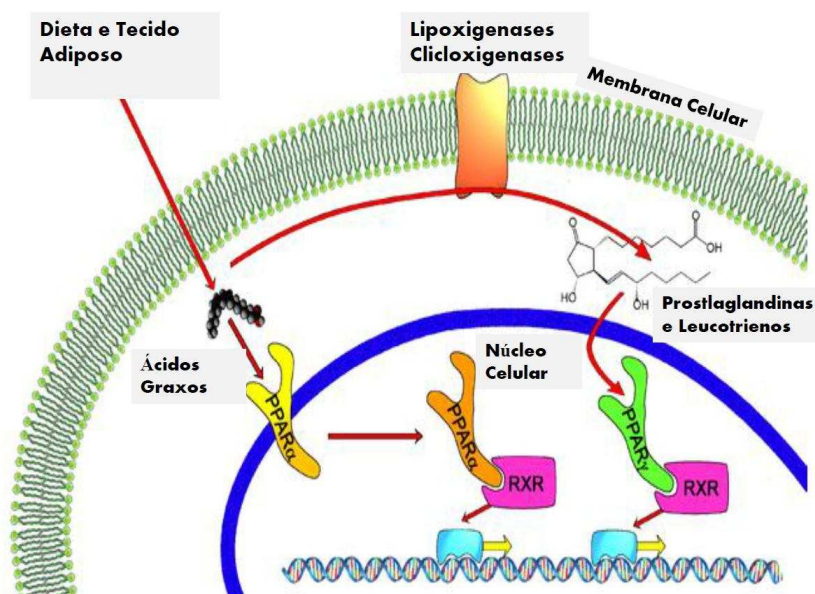


Figura 8 - Mecanismo de interação dos ácidos graxos e a PPAR γ (Adaptado de Somoza, 2006).

Segundo Orchard et al.(2012), dietas ricas em ômega-3 causaram aumento dos níveis séricos de calcitonina e estrógenos, assim como, um decréscimo de PTH.

A Calcitonina (CT) é um peptídeo com 32 aminoácidos que atua, em situação de hipercalcemia, inibindo a reabsorção óssea mediada por osteoclastos. É secretada pelas células parafoliculares C da tireóide e outras células neuroendócrinas. Além da inibição de reabsorção óssea a CT, ao contrário do PTH, atua aumentando a excreção de cálcio e fósforo, consequentemente, resultando em hipocalcemia e hipofosfatemia (Usha, 2012).

O estrogênio é considerado o mais importante hormônio que afeta o metabolismo ósseo em mulheres. Ele atua inibindo a produção de várias citocinas que estejam envolvidas dentro reabsorção óssea estimulando a formação de osteoclastos (Ashish et al., 2014).

Em nível molecular, os estrogênios favorecem a apoptose de osteoclastos, diminuindo a produção de citocinas, tais como Interleucina 1 (IL1), a Interleucina 6 (IL6), o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e Fator de Estimulação de Colônias de Macrófagos (M-CSF). Além disso, os

estrogênios aumentam a expressão do Fator de Transformação do Crescimento β (TGF- β) e Osteoprotegerina (OPG) (inibidores da atividade de osteoclastos), enquanto diminuem a expressão do RANKL (ativador da atividade de osteoclastos) (Karsenty, 2012).

O hormônio da paratireóide (PTH) regula o cálcio sérico e concentrações de fósforo através da sua ação em receptores celulares nos tecidos ósseo, do intestino e rins. Altos níveis de PTH, como vistos no hiperparatireoidismo primário e secundário, aumentam a reabsorção óssea mediada pelo aumento da atividade osteoclástica, assim como, baixos níveis, especialmente episódicos, parecem aumentar a formação óssea mediada por pelo aumento da atividade osteoblástica (Usha, 2012).

Os efeitos no tecido ósseo do PTH são mediados através dos osteoblastos sendo estes os maiores expressores de receptores celulares de PTH. Entretanto os osteoblastos se comunicam com os osteoclastos através da via de comunicação celular RANK-OPG (Osteoprotegerina) (Usha, 2012).

Além disso, o PTH aumenta a reabsorção de cálcio nos rins, predominantemente no túbulo contorcido distal e inibe a reabsorção de fosfato no túbulo proximal, causando hipercalcemia e hipofosfatemia (Usha & B, 2012).

Atualmente os bisfosfonatos são os agentes biomedicinais aprovados e largamente utilizados para controle e tratamento da osteoporose induzida por glicorticoides, mas seu mecanismo de ação pautado em sua propriedade antirreabsortiva não o torna totalmente eficaz no controle e tratamento da mesma, chegando a interferir negativamente, principalmente em casos de fratura óssea presente.

Estudos da fisiopatologia da osteoporose têm apontado que melhores resultados no controle e tratamento da mesma podem ser obtidos com uso de agentes formadores de tecido ósseo.

Para tal, faz-se relevante elucidar mecanismos ação de agentes biomedicinais, como a atorvasatina, a ipriflavona e o óleo de linhaça,

verificando váriaveis fisiologicas, celulares e teciduais durante o tratamento da osteoporose induzida pela dexametasona.

4. Referências Bibliográficas

AKUNE T.;O.S.;KAMEKURA,S.;YAMAGUCHI,M.; CHUNG,U.I.;KUBOTA, N. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. **Journal of Clinical Investigation**, v.113,p. 846-55, 2004.

ALTUNDA, H.;GÜVENER,O. The effect of alendronate on resorption of the alveolar bone following tooth extraction. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.33, p.286–293, 2004.

ANBINDER, A.L.;QUIRINO,M.R.S.;ROCHA,R.F. Statins and bone tissue: a literature review. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.35, n.4, p.239-246, 2006.

ANNE,Y.C.M.;HAUTRIVE,T.P.;MOURA,G.B.;CALLEGARO,M.G.K.HECKT HEUER,L.H.R. Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) sob diferentes formas de preparo na resposta biológica em ratos. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.24,p.131-141, 2011.

AMARAL,G.G.;DELCARLO,R.J.;OLIVEIRA,T.T.;LOUZADA,M.J.Q.;VALADARES,R.F.D.;RIBEIRO,M.D.;PINTO,A.S. Uso isolado e combinado de bisfosfonatos, estatina e flavonóide em ratos osteoporóticos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v36, p.105-110, 2014.

ASHISH,K.;TANDON,R.;BHARDWAJ,M.;CHANDRA,P.Effect s of Drugs in Orthodontic Tooth Movement: A Review. **Journal of Dentofacial Sciences**, v.3, p.13-17,2014.

ATMACA, A.;KLEEREKOPER,M.; BAYRAKTAR,M.; KUCUK,O. Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis. **Menopause**, v.15,p.748–57, 2008.

BELLEI,P.M.;TERRA,M.M.;PETERS,V.M.;GUERRA,M.O.;ANDRADE,A.T. L. Efeito da ipriflavona sobre ratas Wistar e suas ninhadas. **Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia**, v. 34, n. 1, p.22-27, 2012 .

BENFORD,H.L.;MCGOWAN,N.W.A.;HELFRICH,M.H.;NUTALL,M.E.;ROGER,M.J. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3-activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone**, v.28, n.5, p.465 - 473, 2001.

BOMBO,A.J. **Obtenção e caracterização nutricional de snacks de milho (*Zea mays* L.) e linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BOULBAROUD,S.;MESFOUI,A.; ARFAUI,A.;QUICHOU, A.; EL-HESSNI,A. Preventive effects of flaxseed and sesame oil on bone loss ovariectomized rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.11,p.696-701,2008.

BRENDAN,F.B.;LIANPING,X. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Research & Therapy**, v.9, 29, p.1-7, 2007.

CÂMARA,B. Relação entre Vitamina D, Paratormônio, Cálcio e Fósforo na Doença Renal Crônica, 2015. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadiao.com.br/2015/03/relacao-entre-vitamina-d-paratormonio.html>>. Acesso em: 02 de agosto de 2016.

CANALIS,E.;DELANY,A. M. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.966, p.73-81, 2002.

CANALI,E.;MAZZIOTTI,A.;GIUSTINA,J.;BILEZIKIAN,P. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. **Osteoporosis International Journal**, v. 18, p.1319–1328, 2007.

CARRARA,C.L.;ESTEVES, A.P.;GOMES,R.T.;GUERRA,L.L.. Uso da semente de linhaça como nutracêutico para prevenção e tratamento da arterosclerose. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, p.1- 9, 2009.

CHEHENGSA MANS,S.;RATTANAMONGKOU GUL,S.;SUWANWALAIKORN, S.;KAUFMAN,L. Effects of statin vs. non statin lipid-lowering therapy on bone formation on bone mineral density biomarkers in patients with hyperlipidemia. **Bone**, v.46, p.1011-1015, 2010.

CHRISTENSON,E.S.;JIANG,X.;KAZAN,R.;SCHNATZ,P.Osteoporosis management in post-menopausal womem. **Minerva ginecologica**, v.54, p. 181-194, 2012.

COLPO,E.;FRIEDRICH,L.;OLIVEIRA,V.R.;ROSA,C.S. Benefícios do uso da semente de linhaça. **Nutrição em Pauta**, v.81, p.25-8, 2006.

CORDEIRO,R.;FERNANDES,P.L.;BARBOSA,L.A.Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p.3, 2009.

CUPERSMID,L.;FRAGA,A.P.R;ABREU,E.S.;PEREIRA,I.R.O. Linhaça: Composição química e efeitos biológicos. **e-Scientia**, v.5, p.33-40, 2012.

DAVIS,S.;SACHDEVA,A.;GOECKERITZ, B.;OLIVER, A. Approved treatments for osteoporosis and what's in the pipeline. **Drug Benefit Trends**, v.22, p.121–124,2010.

DRAKE, M.T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings**, v.83, p.1032–1045, 2008.

ESTEVEZ, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.14, p.43-52, 2001.

FERNANDES, E.S.; SANTOS, T.R.; OLIVEIRA, T.T.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; ANDRADE, A.T. Avaliação do potencial interceptivo da ipriflavona em ratos wistar. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais**, v.2, n.1, p.7-12, 2011.

FERREIRA, A.P.; OLIVEIRA, C.E.R.; FRANCA, N.M. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina. **Journal of Pediatrics**, v.83, n.1, p.21-26, 2007.

FERRUCCI, L.; CHERUBINI, A.; BANDINELLI, S.; BARTALI, B.; CORSI, A.; LAURETANI, F. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, p.439-46, 2006.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 208-215, 2006.

GROSS, J.L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHELT, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.1, p.16-26, 2002.

GROSSMAN, J.M.; GORDON, R.; RANGANATH, V.K.; DEAL, C.; CAPLAN, L.; CHEN, W.; CURTIS, J.R.; FURST, D.E.; MAHON, M.; PATKAR, N.M.; VOLKMANN, E.; SAAG, K.G. American College of Rheumatology 2010 Recommendations for the Prevention and Treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Arthritis Care & Research**, v. 62, n.11, p.1515–1526, 2010.

HAAG, M.; MAGADA, O.N.; CLAASSEN, N.; BOHMER, L.H.; KRUGER, M.C. Omega-3 fatty acids modulate ATPases involved in duodenal Ca absorption. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.68, p.423-9, 2003.

HE, F.J.; CHEN, J.Q. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. **Food Science and Human Wellness**, v.2, p.146-161, 2013.

IM,G.;QURESHI,S. A.;KENNEY,J.;RUBASH,H. E.;SHANBHAG,A. S.
Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates.
Biomaterials, v.25, p.4105–4115, 2004.

IWASAKI,T.;MUKAI,M.;TSUJIMURA,T.;TATSUTA,M.;NAKAMURA,H.;TER
ADA, N.; et al. Ipriflavone inhibits osteolytic bone metastasis of human
breast cancer cells in a nude mouse model. **International Journal of
Cancer**, v.100, n.4, p.381-7, 2002.

JILKA,R.L. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology
of osteoporosis. **Medical and Pediatric Oncology**, v.41, n.3, p.182-185,
2003.

KAJI,H.;KANATANI,M.;SUGIMOTO,T.;CHIHARA,K. Statins modulate the
levels of osteoprotegerin/receptor activator of NF B ligand mRNA in
mouse bone-cell cultures . **Hormone and Metabolic Research**, v.37,
p.589 – 592, 2005.

KAJI,H.;NAITO,J.; INOUE,Y.;SOWA,H.;SUGIMOTO,T.;CHICHARA,K.
Statin Suppresses Apoptosis in Osteoblastic Cells: Role of Transforming
Growth Factor-β-Smad3 Pathway. **Hormone and Metabolic Research**,
v.40, p.746 – 751, 2008

KARSENTY, G. The mutual dependence between bone and gonads.
Journal of Endocrinology, v.213, p.107-114, 2012.

KIM,S.; LEE, M.; RHEE, M. Studies on the Effects of Biomedical Agents
on Serum Concentration of Ca²⁺, 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,A.S. Effects of bisphosphonates on
proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal
cells. **Biomaterials**, v.26, p.6941–6949, 2005.

LEEM,K.;PARK,S.Y.;LEE,D.H.;KIM,H. Lovastatin increases longitudinal
bone growth and bone morphogenetic protein-2 levels in the growth plate
of Sprague–Dawley rats. **European Journal of Pediatrics**, v.161, p.406–
407, 2002.

LEHMAN,R. A.;KUKLO,T.R.;FREEDMAN,B.A.;COWART,J.R.;MENSE,M.
G.;RIEW,D. The Effect of alendronate sodium on spinal fusion: a rabbit
model. **The Spine Journal**, v.4, p.36-43, 2004.

LEMS,W.F.;LODDER,M.C.;LIPS,P.;BIJLSMA ,J.W.;GEUSENS,P.;
SCHRAMEIJER ,N.C. M.;VAN DE VEM,C.N.;DIJKMANS,B.A.C. Positive
effect of alendronate on bone mineral density and markers of bone
turnover in patients with rheumatoid arthritis on chronic treatment with low-
dose prednisone: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.
Osteoporosis International , v.17, p.716–23, 2006.

LIN,S.;HUANG,J.;FU,Z.;LIANG,Y.;WU,H.;XU,L.;SUN,Y.;LEE,W.Y.W.;WU, T.;QIN,L.;CUI,L.;LI,G. The Effects of Atorvastatin on the Prevention of Osteoporosis and Dyslipidemia in the High-Fat-Fed Ovariectomized Rats. **Calcified Tissue International**, v.96, n.6, p.541-51, 2015.

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

MAGGIO,M.;ARTONI,A.;LAURETANI,F.;BORGHI,L.;NOUVENNE,A.;VAL ENTI,G.;CEDA,G.P. The Impact of Omega-3 Fatty Acids on Osteoporosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, p.4157-4154, 2009.

MARDEGAN ISSA,J.P.;DE LUCIA,C.I.; DOS SANTOS KOTAKE,B.G.; GONZAGA,M.G.;TOCCHINI DE FIGUEIREDO,F.A.; IYOMASA,D.M.; MACEDO, A.P.;ERVOLINO,E. The effect of simvastatin treatment on bone repair of femoral fracture in animal model. **Growth Factors**, v. 33, n. 2, p. 139-148, 2015.

MARQUES, A. C. **Propriedades funcionais da linhaça (Linum usitatissimum L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos**. 2008. 115 f. Dissertação-(Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade de Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

MARTIN,C.A.;ALMEIDA,V.V.;RUIZ,M.R.;VISENTEINER,J.E.L.;MATSHUS HITA,M.SOUZA,N.E.;VISENTEINER,J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.19, p.761-770, 2006.

MENDES, A. A. Proposta de protocolo para orientação a prevenção da osteoporose. **Anuário da produção de iniciação científica discente**, v.12, n.15, 2009.

MICHAEL,F.H.;BINKLEY,N.C.;BISCHOFFFERRARI,H.A.;HANLEY,D.A.;H EANEY,R.P.;MURAD,M.H.;WEAVER,C.M. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.96, p.1911-1930, 2011.

MOROTE,J.;PLANAS,J. Pèrdida de massa ósea em pacientes com câncer de próstata sometidos a deprivación androgênica. **Actas Urológicas Españolas**, v.35, n.4, p.232-239, 2011.

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

- NATALIE, A.S.;KONG,W. N. Implications of Osteoblast-Osteoclast Interactions. **Current Osteoporosis Reports**, v.12, p.98-106, 2014.
- OLIVEIRA,T.M.;PIROZI,M.R.;BORGES,J.T.S. Elaboração de pão de sal utilizando farinha mista de trigo e linhaça. **Alimentos e nutrição**, v.18, n.2, p. 141-150, 2007.
- ORCHAND,T.S.;PAN,X.;CHEEK,F.;ING,S.W.; JACKSON,R.D. A systematic review of omega-3 fatty acids and osteoporosis. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. 253-260, 2012.
- PEREIRA,A.L.C.;BOLZANI,F.C.B.;STEFANI,M.;CHARLÍM,R. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, v.35, n. 1, p.35-50, 2007.
- PINHEIRO,C.H.J.;FILHO,W.M.S.;NETO,J.O.;MARINHO,M.J.F.;NETO,R.M ;SMITH,M.M.R.L.;SILVA,C.A.B. Exercício Físico Previne Alterações Cardiometabólicas induzidas pelo Uso Crônico de glicocorticoides. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.93, n.3, p.400-408, 2009.
- POLO,R.G. Osteoporosis inducida por glicocorticóides. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v.3, p.63-80, 2003.
- RODRIGUES,R.P.;CARVALHO,J.F.;PAULA,P.P.;ZERBINI,C.;DOMICIANO,D.S.;GONÇALVES,H.;DANOWSKI,J.S.;NETO,J.F.;MENDONÇA,M.C.;B EZERRA,M.C.;TERRERI,M.T.;IMAMURA,M.;WEINGRILL,P.;PLAPER,P.G .;RADMINSKI,S.;TOURINHO,T.SZEJNFELD,V.L.;ANDRADA,N.C. Guidelines for the prevention and treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.52, p.569-593, 2012.
- ROMANHOLI,D.J.C.;SALGADO,L.R. Síndrome de Cushing Exógena e Retirada de Glicocorticóides. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.58, n.8, p.1280-1292, 2007.
- RUSSELL,R.G. Bisphosphonates: from bench to bedside. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1068, p.367-401, 2006.
- SANTOS,C.L.;RAFACHO,BOSQUEIRO,J.P. Efeitos da administração de dexametasona *in vivo* sobre Glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p.101-110, 2007.
- SANTOS,F.G. Linhaça (*Linum usitatissimum* L.), fonte de lignanas, utilizadas no controle de câncer de mamas. In: Anais do 12º Congresso de Iniciação Científica e 10º Encontro de Pós-Graduação, Pelotas, 2008. Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CS/CS_00708>. Acesso em: 15 de out. 2012.
- SASAKI,N.;KUSANO,E.; ANDO,Y.;YANO,K.;TSUDA,E.;ASANO,Y. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible

mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.6, p.479-482, 2001.

SILVA,S.R.C.;LENGYEL,A.M.J. Influência dos glicocorticóides sobre o eixo somatotrófico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.47, n4, p.388-397, 2003.

SOMOZA,M. Peroxisome proliferator-activated receptor pathway diagram. In:WikimediaCommons.Disponível em:<<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1257700>>. Acesso em 22 de jul. 2016.

SOUZA,M.C.; ASSEMANY,F.S.;LIMA, A.T.C.;SOUZA,R.F.Glicocorticoides e osteoporose – artigo de revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, n.1, p.57-64, 2010.

TÁGLI,H.D.S. **Adaptações ósseas ao exercício durante o crescimento**. 2013. 31f. Monografia (Graduação em Educação Física)-Escola de Educação Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2013.

USHA,K.; B,N. Physiology of Bone Formation, and Metabolism. **Radionuclide and Hybrid Bone Imaging**, v.2, p.29-57, 2012.

VANSTAA,T.P.;GEUSENS,P.;POLLS,H.A.;DELAET,C.;LEUFKENS,H.G.;COOPER,C. A simple score for estimating the long-term risk of fracture in patients using oral glucocorticoids. **QJM: An International Journal of Medicine**, v.98, p.191-198, 2005.

VANEK,C.;CONNOR,W.E. Do n-3 fatty acids prevent osteoporosis? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.85: 647-658, 2007.

VICENT,C.;KOGAWA,M.; FINDLAY,D.N.;ATKINS,G.J. The generation of osteoclasts from RAW 264.7 precursors. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v.27, p.114-119, 2009.

WOO,J.T.;KASAI, S.;STERN,P.H.;NAGAI,K Compactin suppresses bone resorption by inhibiting the fusion of pre-fusion osteoclasts and disruption the actin ring in osteoclasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.15, p.650-662, 2000.

ZAFRA-GÓMEZ, A.;GARBALLO, A.;GARCÍA-AYUSO,L.E.; MORALES, J.C. Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods. **Food Chemistry**, v.123, p.872-877, 2010.

ZAKIR,M.M.;FREITAS,I.R. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas presentes em produtos derivados da soja. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.02, n.3, p.107-116, 2015.

5. Hipóteses

Os animais do grupo tratado com alendronato de sódio, através da preponderância da atividade antirreabsortiva, apresentarão níveis de paratormônio acima do valor de normalidade e cálcio e fósforo abaixo do valor de normalidade, acentuando o processo de hipocalcemia e hiperparatireoidismo secundário provocado pela dexametasona.

O grupo tratado com alendronato de sódio não apresentará aumento nos valores de fosfatase alcalina e fosfatase alcalina óssea demonstrando a insuficiente atividade formadora de tecido ósseo desse fármaco.

O tratamento com alendronato de sódio não ocasionará nenhuma alteração de glicemia e insulinemia em relação ao grupo que sofreu a indução da osteoporose e não recebeu tratamento.

Na avaliação morfométrica e histomorfométrica os animais tratados com alendronato de sódio apresentarão valores de densidade óssea superiores ao grupo doente, porém inferiores ao padrão de normalidade.

O grupo tratado com atorvastatina cálcica através da propriedade antirreabsortiva, semelhantemente ao alendronato de sódio, apresentará níveis de paratormônio acima do valor de normalidade e cálcio e fósforo abaixo do valor de normalidade.

O grupo tratado com atorvastatina cálcica apresentará valores superiores ao grupo doente, e equiparáveis ao padrão de normalidade, de fosfatase alcalina, fosfatase alcalina óssea e densidade trabecular óssea resultantes da concomitância de propriedades antirreabsortivas e reparadoras de tecido ósseo desse fármaco.

Tanto o grupo tratado com ipriflavona como o grupo tratado com óleo de linhaça, devido à fraca ou inexistente atividade antirreabsortiva, não apresentarão diferenças significativas no processo de hipocalcemia e hiperparatireoidismo secundário gerado pelo uso da dexametasona.

Porém os animais desses grupos, quando avaliados fosfatase alcalina, fosfatase alcalina óssea e densidade trabecular óssea apresentarão melhoras significativas resultantes das propriedades formadoras de osso presentes nesses agentes biomedicinais.

Os tratamentos com atorvastatina cálcica, ipriflavona e óleo de linhaça ocasionarão melhora significativa dos níveis séricos de hiperglicemia e hiperinsulinemia caracterizando diminuição do quadro de resistência a insulina.

6. Objetivos

6.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo verificar através de morfometria, histomorfometria, marcadores bioquímicos os efeitos do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica, ipriflavona e óleo de linhaça em ratas osteoporóticas induzidas com dexametasona.

6.2 Objetivos Específicos

- . Indução da Osteoporose
- . Tratamento da osteoporose com Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica, Ipriflavona e Óleo de Linhaça;
- . Avaliação dos parâmetros bioquímicos, cálcio, fósforo, paratormônio (PTH), fosfatase alcalina (FAL), fosfatase alcalina óssea (FAO), insulina e glicose após 30 e 60 dias de tratamento;
- . Avaliação morfométrica e histomorfométrica óssea verificando o processo de indução da osteoporose assim como a evolução dos tratamentos.

Capítulo 1- Avaliação Biométrica, Histomorfométrica e de Marcadores Bioquímicos no Uso de Atorvastatina Cálcica no Tratamento da Osteoporose Induzida com Dexametasona.

Resumo

O objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos da atorvastatina cálcica no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona. A indução da osteoporose consistiu na administração de dexametasona na dose de 7,5mg/kg de peso corporal, por via intramuscular (IM), uma vez por semana durante quatro semanas, à exceção dos animais do grupo controle (G1). Os animais submetidos à indução da osteoporose foram então distribuídos aleatoriamente, recebendo os seguintes denominações e tratamentos: G2 (controle com osteoporose), G3 (com osteoporose tratado com alendronato de sódio 0,2mg/kg) e G4 (com osteoporose tratado com atorvastatina cálcica 1,2mg/kg). Após o período de 30 e 60 dias do início do tratamento os animais foram eutanasiados e então coletadas amostras de sangue para as dosagens dos níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina (FAL), glicose, fosfatase alcalina óssea (FAO), paratormônio (PTH) e insulina. Além disso, foram coletados os fêmures esquerdos para aferição biométrica e histomorfométrica. O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 6 repetições. A princípio foi verificada a existência de distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Através de avaliações biométricas e histomorfométricas foi possível verificar a perda estrutural óssea induzida pela dexametasona, assim como a influencia positiva na manutenção tecidual tanto dos animais tratados com alendronato de sódio como os tratados com atorvastatina cálcica. Os valores séricos de cálcio, fósforo e PTH demonstraram alterações decorrentes do uso da dexametasona, não apresentando nenhuma alteração significativa relativa aos tratamentos. Os níveis séricos de FAO apresentaram alterações positivas nos grupos tratados com atorvastatina cálcica com valores superiores, inclusive, ao

grupo controle que não foi submetido à indução da osteoporose (G1). Os níveis séricos de FAL não apresentaram correspondência à FAO. Os resultados também puderam demonstrar o quadro de hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina, presentes no processo de indução da osteoporose pela dexametasona, sendo que o tratamento com alendronato de sódio não ocasionou nenhuma alteração da glicemia e insulinemia. A atorvastatina cálcica ocasionou agravamento da hiperglicemia e hiperinsulinemia potencializando o quadro de resistência a insulina levando à instalação do diabetes melittus tipo 2.

Palavras-Chave: Hiperglicemia, Resistência a Insulina, Estatinas, Glicocorticoide.

Abstract

The aim of this study was to investigate the influence of atorvastatin calcium in osteoporosis induced with dexamethasone. The induction of osteoporosis was the administration of dexamethasone at the dose of 7.5mg / kg of body weight, intramuscularly, once a week for four weeks, except for control animals (G1). The animals subjected to induction of osteoporosis were then randomly assigned, receiving the following names and treatments: G2 (control with osteoporosis), G3 (with osteoporosis treated with alendronate sodium 0.2mg / kg) and G4 (with osteoporosis treated with 1.2 mg atorvastatin calcium / kg). Between 30 and 60 after the start of treatment blood samples were collected for measurements of serum levels of calcium, phosphorus, glucose, alkaline phosphatase (ALP), bone specific alkaline phosphatase (BAP), parathyroid hormone (PTH) and insulin. In addition, they collected the left femurs for biometric and histomorphometric measurement. The biological assay was performed according to a completely randomized design with 4 treatments and 6 repetitions. The principle was checked for normal distribution with the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). The groups were compared by Tukey test at 5% probability. Through histomorphometric and biometric evaluations it was possible to verify the structural bone loss induced by dexamethasone, as positive influence both in tissue maintenance of the animals treated with sodium alendronate as augers with atorvastatin calcium. The serum calcium, phosphorus and PTH demonstrated changes resulting from the use of dexamethasone, showing no significant change on the treatments. Serum levels of BAP showed positive changes in the groups treated with calcium atorvastatin with higher values, including the control group that was not subjected to induction of osteoporosis (G1). Serum ALP affected by gut, renal and hepatic variants showed no correspondence to BAP, it is not recommended, therefore, its use as a marker of bone remodeling. The results could demonstrate hyperglycemia resulting frame of increasing insulin resistance present in the process of induction by dexamethasone

osteoporosis, and treatment with sodium alendronate no change to glycemic and insulinemic. The atorvastatin calcium resulted in worsening of the hyperglycemic and hyperinsulinemic potentiating insulin resistance leading to installation of the above diabetes mellitus type 2.

Key-Words: Osteoporosis, Hyperglycemia, Insulin resistance, Statin, Glucocorticoid.

1- Introdução

A osteoporose induzida por glicocorticoides é uma complicação grave e comum nos tratamentos prolongados com esses fármacos. Normalmente são verificados nesses casos diminuição da formação óssea, assim como, incremento na sua reabsorção (Sasaki et al., 2011).

Esse quadro caracteriza uma doença progressiva que envolve deterioração estrutural do tecido ósseo levando a fragilidade e aumento da suscetibilidade a fraturas causadas pela redução da massa óssea e ao aumento do turnover ósseo (Amaral et al., 2014).

Além disso, no músculo esquelético, os glicocorticoides causam resistência à insulina, o que resulta em menor captação de glicose e redução da síntese do glicogênio muscular. Nesse tecido, também se verifica inibição da síntese proteica e aumento no catabolismo de proteínas que resultam em hipotrofia muscular. Os aminoácidos mobilizados, a partir do tecido muscular, são utilizados na gliconeogênese hepática. A resistência à insulina e o aumento na gliconeogênese, conjuntamente, resultam na hiperglicemia (Pinheiro et al., 2009).

O objetivo do tratamento da osteoporose induzida com glicocorticoides é evitar a ocorrência de futuras fraturas, o que acarreta diminuição da qualidade de vida. Atualmente utilizam-se, nas terapias farmacológicas contra a osteoporose, os bisfosfonatos, dentre eles o alendronato de sódio, que atuam preponderantemente inibindo a reabsorção do tecido ósseo (Amaral et al., 2014).

Segundo Drake et al.(2008), o alendronato de sódio é aprovado para uso clínico na prevenção e tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides demonstrando maior eficácia quando os níveis de vitamina D e cálcio são adequados.

Tem sido descrito que o alendronato de sódio reduz a perda óssea em pacientes tratados com moderada e altas doses de prednisona para doenças heterogêneas (Lems et al., 2006).

No entanto o alendronato de sódio apesar de reduzir a incidência de fraturas não apresenta ganho em formação óssea. Além disso, o seu uso prolongado demonstra vários efeitos colaterais como: fraturas

subtrocantéricas do fêmur, osteonecrose de mandíbula, irritação esofágica dentre outros, causando impacto negativo à adesão ao tratamento pelo paciente (Drake et al., 2008).

Lin et al.(2015), em modelo de estudos de dislipidemias com ratas ovariectomizadas, verificaram que a atorvastatina, clinicamente utilizada no tratamento de dislipidemias, não somente diminuiu os níveis séricos de lipídios, mas também promoveu melhora biomecânica óssea assim como aumento de colágeno no tecido ósseo.

Alguns estudos recentes relataram a ação das estatinas na formação óssea pela estimulação da expressão da proteína morfogenética óssea (BMP)-2, a qual conduz a diferenciação osteoblástica e consequente formação óssea. Ocorre aumento da transcrição do gene da BMP-2, sendo este o provável responsável pelos seus efeitos (Mundy, 2001).

Visto isso, passou-se a acreditar que as estatinas, se seletivamente direcionadas ao osso, poderiam apresentar efeitos benéficos no tratamento da osteoporose e de fraturas. Tais observações suscitaram grande interesse na comunidade científica e vários estudos foram realizados, demonstrando a ação das estatinas na melhoria da densidade óssea e na redução do número de fraturas (Anbinder et al., 2006).

Apesar de resultados positivos apresentados pela atorvastatina cálcica no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona Koh et al. (2010), verificaram, durante seu uso no tratamento da hipercolesterolemia, que a mesma ocasionou hiperglicemia.

Assim, por haver necessidade em buscar alternativas mais eficazes e menos dispendiosas no controle, e principalmente no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona, assim como no controle dos níveis séricos de glicose e insulina durante esse processo, o presente experimento foi idealizado no intuito de avaliar o tratamento com atorvastatina cálcica em ratas com osteoporose induzida com dexametasona.

2- Material e Métodos

Procedimento Experimental

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas 36 ratas (*Rattus norvegicus*) da raça Wistar, adultas, pesando em média 200 g, procedentes do Biotério do Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), alimentados com ração comercial e água *ad libitum* durante todo experimento.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 36/2016).

Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em gaiolas de polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável em forma de grade contendo em cada uma um animal. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado com período de luz de 12 horas e as gaiolas higienizadas a cada dois dias.

Após uma semana de adaptação teve início o processo de indução da osteoporose com a administração do glicocorticoide dexametasona, por via intramuscular, na dose semanal de 7,5 mg/kg de peso corporal, durante quatro semanas, nos animais de todos os grupos à exceção de 12 animais do grupo 1 (G1 - controle sem osteoporose).

Os animais submetidos à indução da osteoporose foram então distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais de 12 animais cada, recebendo os seguintes denominações e tratamentos: G2 (controle com osteoporose), G3 (com osteoporose tratado com alendronato de sódio 0,2 mg/kg) e G4 (com osteoporose tratado com atorvastatina cálcica 1,2 mg/kg). As medicações foram administradas diariamente por via oral (método de gavagem), sendo utilizadas cânulas apropriadas.

Avaliação dos Marcadores Bioquímicos

Aos 30 dias e 60 dias após o início dos tratamentos 6 animais de cada grupo foram anestesiados e através de laparotomia abdominal e posterior punção da veia cava caudal, foram coletados 5 ml de amostra de

sangue para a dosagem dos níveis séricos de cálcio, fósforo, hormônio da paratireoide (PTH), fosfatase alcalina (FAL), fosfatase alcalina isoenzima óssea (FAO), glicose e insulina.

Para o procedimento de laparotomia cada animal recebeu como medicação anestésica dissociativa a solução, via intramuscular, de 0,05 ml de cloridrato de ketamina (1 g/ml) com 0,05 ml de cloridrato de xilazina (23 mg/ml).

As dosagens sorológicas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina (FAL) e glicose, foram realizadas por espectrofotometria, utilizando o Aparelho Multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), bem como kits específicos de uso em automação da marca Bioclin®.

Para as dosagens sorológicas do hormônio da paratireoide (PTH), fosfatase alcalina isoenzima óssea (FAO) e insulina foi utilizado o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System II da Beckman Coulter®, assim como kits específico para dosagem, também da mesma indústria.

Exame Histomorfométrico

Após a coleta de sangue, aos 30 dias e 60 dias após o início dos tratamentos, 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 30 mg/kg).

Através de dissecação, os fêmures esquerdos foram coletados e colocados em formol 10% neutro tamponado, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, foram descalcificados e processados rotineiramente para estudo histológico.

Foram obtidos três cortes histológicos de cada fêmur, de quatro micrômetros de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer®, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Estes cortes foram obtidos de forma seriada, montados sobre lâmina de vidro e corados com coloração Tricrômico de Masson.

Para cálculo da densidade ocupada por osso trabecular e espessura cortical óssea, foi obtida uma imagem amostral de osso contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico Olympus BX

41® (Tóquio, Japão) equipado com câmara digital (TCL-984 P®) acoplada. As imagens foram obtidas com objetiva de 10X. Estas imagens foram analisadas em um software de análise de imagem (Imagem Pro-Plus®, versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) que obteve a área em micrometros quadrados.

Nas imagens obtidas foram realizadas as medidas em μm da espessura da cortical óssea. A área composta por osso trabecular foi calculada através da proporção entre área ocupada por matriz orgânica óssea e área total da imagem, sendo que o resultado final corresponde ao percentual ocupado por matriz óssea.

Análise Biométrica

Foram realizadas medidas do comprimento de cada fêmur com paquímetro digital 150 mm e resolução 0,01 mm/0,0005 Metrotools®. Além disso, foi realizada a pesagem de cada fêmur dissecado em balança analítica digital da marca A.Cientifica/Eduotec® EEQ9003F-B com capacidade de 220 g e precisão de leitura de 0,1 mg. Foi calculado o índice Seedor dividindo-se o peso de cada fêmur pelo seu respectivo comprimento e o resultado expresso em g/cm (Seedor et al., 1991).

Análise Estatística

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 6 repetições. A princípio foi verificada a normalidade com o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados, então, expressos em média e \pm desvio padrão.

3- Resultados e Discussão

Nas tabelas 1 e 2 são apresentados os valores da avaliação biométrica (comprimento, peso e índice Seedor) e histomorfométrica (espessura da cortical óssea e densidade trabecular óssea).

Tabela 1 - Valores da avaliação biométrica de fêmures de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Peso (g)		Comp. (cm)		Seedor (g/cm)	
		Valor	σ	Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	0,735 a	$\pm 0,039$	3,395	$\pm 0,108$	0,216 a	$\pm 0,002$
	G2	0,666 b	$\pm 0,038$	3,367	$\pm 0,052$	0,198 b	$\pm 0,004$
	G3	0,743 a	$\pm 0,061$	3,285	$\pm 0,051$	0,226 a	$\pm 0,005$
	G4	0,686 b	$\pm 0,062$	3,3	$\pm 0,064$	0,208	$\pm 0,005$
60 dias	G1	0,806 a	$\pm 0,036$	3,463	$\pm 0,042$	0,233 a	$\pm 0,005$
	G2	0,667 b	$\pm 0,038$	3,417	$\pm 0,026$	0,195 b	$\pm 0,005$
	G3	0,759 a	$\pm 0,029$	3,295	$\pm 0,051$	0,231 a	$\pm 0,005$
	G4	0,761 a	$\pm 0,038$	3,423	$\pm 0,058$	0,222 a	$\pm 0,004$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com atorvastatina cálcica.

Tabela 2 - Valores da avaliação histomorfométrica óssea de fêmures de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Densidade Trabecular (%)		Espessura Cortical (μm)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	68,167 a	+2,794	414,5 a	$\pm 22,61$
	G2	54,167 b	$\pm 2,544$	356,5 b	$\pm 13,68$
	G3	63,501 c	$\pm 3,201$	402,0 a	$\pm 22,72$
	G4	56,667 b	$\pm 4,784$	352,0 b	$\pm 18,87$
60 dias	G1	70,167 a	$\pm 2,639$	418,0 a	$\pm 13,89$
	G2	44,167 b	$\pm 2,639$	314,5 b	$\pm 17,94$
	G3	68,667 c	$\pm 3,881$	404,5 a	$\pm 22,64$
	G4	59,167 d	$\pm 2,401$	387,5 c	$\pm 8,57$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com atorvastatina cálcica.

Avaliação das medidas da densidade trabecular óssea, cortical óssea e do peso em relação ao tamanho do fêmur (índice Seedor) (Seedor et al., 1991) demonstraram que durante todo o período experimental ocorreu uma progressiva perda de estrutura óssea caracterizando o processo de indução da osteoporose nos grupos que receberam a dose de 7,5 mg/kg de dexametasona e não receberam tratamento (G2) (Tabela 1 e 2).

Os animais dos grupos tratados com o alendronato de sódio (G3) apresentaram valores de densidade trabecular óssea, espessura da cortical óssea e índice Seedor, tanto em 30 como 60 dias de tratamento, com diferenças significativas em relação ao grupo com osteoporose sem tratamento (G2) e com valores estatisticamente equiparáveis ao grupo normal (G1), demonstrando assim capacidade de prevenir a indução da osteoporose com a dexametasona atuando na fase rápida onde há predominância de aumento de atividade osteoblástica (Tabela 1 e 2).

Somente aos 60 dias de tratamento o grupo tratado com atorvastatina cálcica (G4) apresentou valores de densidade trabecular óssea, espessura da cortical óssea e índice Seedor com diferenças significativas em relação ao grupo com osteoporose sem tratamento (G2), além de valores mais próximos a grupo normal (G1), demonstrando melhor capacidade desse fármaco de atuação na fase tardia da indução da osteoporose com dexametasona (Tabela 1 e 2).

Segundo Pinto et al. (2006), a avaliação óssea histomorfométrica se caracteriza por ser um método de extrema valia para avaliação dinâmica do processo de remodelação óssea, precisando a extensão da perda óssea, das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo, sendo capaz de identificar alterações osteometabólicas como a osteoporose.

A osteoprose induzida pela dexametasona ocorre em duas fases: uma rápida, fase em que a densidade mineral óssea (DMO) é reduzida, presumivelmente devido à reabsorção óssea excessiva (osteoclastos), e uma tardia, fase progressiva, em que a DMO diminui devido à prejudicada formação óssea (osteoblastos e osteócitos) (Canali et al., 2007).

Os glicocorticoides diminuem o número e a função de osteoblastos. Estes efeitos conduzem a uma supressão da formação de osso, uma característica central na patogênese da osteoporose induzida por glicocorticoide. Os glicocorticoides diminuem a replicação das células da linhagem dos osteoblastos, reduzindo o conjunto de células que pode diferenciar-se em osteoblastos maduros. Além disso, os glicocorticoides prejudicam a diferenciação dos osteoblastos assim como sua maturação (Canali et al., 2007).

Estão apresentadas na tabela 3 os níveis séricos de cálcio, fósforo e do paratormônio (PTH) após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 3 - Valores) dos níveis séricos de cálcio, fósforo em mg/dl e paratormônio (PTH), em pg/ml, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo Tratamento	Cálcio (mg/dl)		Fósforo (mg/dl)		PTH (pg/ml)	
		Valor	σ	Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	10,838 a	$\pm 0,592$	10,391 a	$\pm 0,121$	4,667 a	$\pm 0,912$
	G2	9,901 b	$\pm 0,632$	9,117 b	$\pm 0,066$	5,847 b	$\pm 0,867$
	G3	9,487 b	$\pm 0,831$	9,901 b	$\pm 0,176$	5,883 b	$\pm 0,660$
	G4	9,868 b	$\pm 1,086$	9,381 b	$\pm 0,222$	5,403 b	$\pm 0,377$
60 dias	G1	10,951	$\pm 1,017$	10,371	$\pm 0,233$	4,353	$\pm 0,874$
	G2	10,511	$\pm 0,544$	10,133	$\pm 0,191$	4,753	$\pm 0,325$
	G3	10,953	$\pm 0,809$	10,582	$\pm 0,146$	4,317	$\pm 0,984$
	G4	10,857	$\pm 0,937$	10,286	$\pm 0,203$	4,243	$\pm 0,835$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com atorvastatina cálcica.

Aos 30 e 60 dias de tratamento foi possível verificar que o uso da dexametasona ocasionou a diminuição dos níveis séricos de cálcio e fósforo além do aumento dos níveis séricos de PTH em todos os grupos submetidos à indução da osteoporose não ocorrendo influencia dos tratamentos (Tabela 3).

Segundo Souza et al. (2010), isso se deve aos efeitos fisiológicos indiretos (fase rápida) da dexametasona sobre o metabolismo ósseo onde atuam diminuindo a absorção intestinal de cálcio, aumentando a excreção renal de cálcio e fósforo, antagonizando os efeitos da vitamina D e ocasionando o hiperparatireoidismo secundário, sendo que, o efeito final dessa série de eventos é um pronunciado aumento da reabsorção óssea com consequente perda de massa estrutural óssea caracterizando a instalação da osteoporose.

Estão apresentadas na tabela 4 as médias e desvio padrão dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase alcalina óssea (FAO) após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 4 - Valores dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL), em U/L e fosfatase alcalina óssea (FAO), em µg/L, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	FAL (U/L)		FAO (µg/L)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	63,267 a	$\pm 2,259$	3,206 a	$\pm 0,211$
	G2	131,333 b	$\pm 13,545$	3,053 b	$\pm 0,054$
	G3	106,667 c	$\pm 3,629$	3,085 b	$\pm 0,079$
	G4	121,667 d	$\pm 12,556$	7,451 c	$\pm 0,173$
60 dias	G1	67,001 a	$\pm 2,828$	3,318 a	$\pm 0,506$
	G2	68,503 a	$\pm 2,345$	3,008 b	$\pm 0,055$
	G3	98,546 b	$\pm 3,829$	3,184 a	$\pm 0,131$
	G4	84,121 b	$\pm 2,944$	7,473 c	$\pm 0,529$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com atorvastatina cálcica.

Aos 30 dias de tratamento pode-se verificar um aumento de níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) em todos os grupos que foram submetidos ao processo de indução da osteoporose (G2, G3 e G4) em relação ao grupo sem osteoporose (G1) (Tabela 4).

Aos 60 dias de tratamento verifica-se uma queda significativa dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) em todos os grupos osteoporóticos, apesar dos grupos tratados com alendronato de sódio (G3) e atorvastatina cálcica (G4) permanecerem com valores acima do parâmetro de normalidade (G1) (Tabela 4).

Verifica-se também aos 30 e 60 dias de tratamento a não correspondência dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase alcalina óssea (FAO) (Tabela 4).

Segundo Amaral et al. 2014, a aferição dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) inclui os teores da isoforma da fosfatase alcalina específica do tecido ósseo denominada fosfatase alcalina óssea (FAO), que é secretada pelos osteoblastos podendo apresentar aumento nos casos de remodelação óssea, devendo, portanto, acompanhar esse perfil.

Entretanto segundo Allen (2003), a interpretação da fosfatase alcalina total (FAL) é complicada por poder ser afetada pelas variantes óssea, intestinal, renal e hepática, dificultando sua utilização com o marcador da remodelação óssea.

Avaliando o grupo com osteoporose sem tratamento (G2) foi possível verificar aos 30 e 60 dias de tratamento a redução progressiva dos níveis séricos da fosfatase alcalina óssea (FAO) (Tabela 4), que se deve a ação direta dos glicocorticoides (fase tardia), causando redução na quantidade e atividade de osteoblastos que além de resultar no impacto na redução de reposição de matriz óssea perdida, acarreta a supressão da produção de osteoprotegerina (OPG), que, em níveis normais, limita a liberação de enzimas pró-osteoclastogênicas (Jilka, 2003).

Durante todo o período experimental o grupo que recebeu tratamento com alendronato de sódio (G3) apresentou níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO), (Tabela 4), abaixo do parâmetro de normalidade (G1), demonstrando assim, o baixo potencial de atividade indutora da atividade de osteoblastos desse fármaco.

Os resultados positivos de preservação da estrutura óssea apresentados pelo grupo tratado com alendronato de sódio (G3) (Tabelas 1 e 2), apesar de baixa atividade osteoblástica, vista pelos níveis séricos de FAO (Tabela 4), demonstra preponderância de atividade inibidora de reabsorção se contrapondo à fase rápida (aumento de reabsorção óssea) de ação da dexametasona.

O principal mecanismo de ação dos bisfosfonatos se deve a uma afinidade muito elevada pelo componente mineral do tecido ósseo ligando-se de maneira estável aos cristais de hidroxiapatita inibindo sua quebra, assim, suprimindo eficazmente a reabsorção óssea (Russell, 2006).

Além disso, os bisfosfonatos nitrogenados (alendronato, risedronato, ibandronato, pamidronato e ácido zoledrônico) além de apresentarem a capacidade antirreabsortiva através da ligação com a hidroxiapatita atuam predominantemente inibindo a ativação da farnesil difosfato sintase na via do mevalonato, ocasionando apoptose de osteoclastos, com consequente diminuição da reabsorção óssea (Lin et al., 2015).

Por outro lado, segundo Im et al. (2004), os bisfosfonatos alendronato de sódio e risedronato de sódio, tanto em cultura de células trabeculares óssea humanas, como em cultura de células de linhagem osteoblástica MG-63, demonstraram através de testes de fosfatase alcalina e cadeias de polimerase transcriptase reversa promoção de significativo aumento no número de células, assim como diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos.

Tanto em 30 como em 60 dias de tratamento o grupo tratado com atorvastatina cálcica, apresentou valores significativamente superiores de fosfatase alcalina óssea (FAO) (Tabela 4), sendo que esses valores foram superiores inclusive ao grupo normal (G1).

Segundo Mardegan Issa et al. (2015), as estatinas têm demonstrado capacidade de diminuição da reabsorção óssea, aumento da densidade mineral óssea (DMO) e aumento da formação óssea.

A capacidade de atuação das estatinas na reabsorção óssea pode ser explicada pelo mecanismo de ação semelhante aos bisfosfonatos nitrogenados, atuando na via do mevalonato inibindo a ação da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, resultando na redução da atividade osteoclástica modulando assim a reabsorção óssea.

Estudos de Woo et al. (2000), verificaram nas estatinas a capacidade de suprimir a reabsorção óssea através da inibição da fusão

de pré osteoclastos ao tecido ósseo além de interromperem a formação do anel de actina nos osteoclastos.

Apesar desses mecanismos de atuação, a comparação das estatinas com os bisfosfonatos deve levar em consideração que, segundo Russel (2006), a principal propriedade de atuação na reabsorção óssea dos bisfosfonatos se deve a alta afinidade e estabilização dos cristais de hidroxiapatita, justificando maior capacidade de atuação do alendronato de sódio na fase rápida de indução da osteoporose pela dexametasona.

O aumento dos níveis séricos de FAO, ocasionados pela atorvastatina cálcica, correspondem à capacidade das estatinas de estimulação da atividade osteoblástica, demonstrando seu maior potencial de atuação na fase tardia da indução da osteoporose pela dexametasona (Mardegan Issa et al., 2015).

Segundo Mundy (2011), as estatinas atuam estimulando o aumento da transcrição do gene da proteína morfogenética óssea BMP-2, com consequente aumento da expressão da BMP-2, o qual conduz a diferenciação osteoblástica e consequente aumento da formação óssea.

Estudos de Leem et al. 2002, com a lovastatina também verificaram aumento da atividade de fosfatase alcalina óssea, mineralização de matriz óssea e osteogênese de células ósseas *in vitro*.

Além disso, as estatinas atuam no tecido ósseo aumentando a expressão do fator de crescimento endotelial (VEGF), sendo que, várias variantes de VEGF, bem como os seus receptores, estão expressos em osteoblastos onde a presença desta citocina tem demonstrado induzir aumento dos níveis de atividade da fosfatase alcalina óssea assim como melhorar a resposta ao PTH (Maeda et al., 2003).

Recentemente estudos de Kaji et al.(2008), reportaram que a Smad3, uma molécula fundamental na transdução da sinalização do TGF- β para o núcleo, promove aumento na produção do colágeno tipo I (Col1), aumento da atividade da fosfatase alcalina óssea e capacidade de mineralização de células osteoblasticas de ratos. Além disso, foi verificado que tanto o PTH como os glicorticoides modulam a via Smad3 nas células osteoblasticas independentemente do TGF- β .

As estatinas foram capazes de aumentar, em cultura de células osteoblásticas, o nível da Smad3 independentemente da indução do receptor TGF- β . Além disso, foi suprimida a apoptose de osteoblastos através da via TGF- β -Smad3 (Kaji et al., 2008).

Na tabela 5 são apresentados as médias e desvio padrão dos valores dos níveis séricos de Glicose em mg/dL e Insulina em pg/mL, após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 5 - Valores dos níveis séricos de Glicose, em mg/dL e Insulina, em pg/ml, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Glicose (mg/dl)		Insulina (pg/ml)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	202,378 a	$\pm 4,649$	0,738 a	$\pm 0,325$
	G2	292,937 b	$\pm 7,985$	2,208 b	$\pm 0,518$
	G3	293,733 b	$\pm 12,853$	2,385 b	$\pm 0,261$
	G4	292,215 b	$\pm 10,858$	5,945 c	$\pm 0,897$
60 dias	G1	209,117 a	$\pm 3,237$	0,792 a	$\pm 0,351$
	G2	292,598 b	$\pm 4,921$	2,101 b	$\pm 0,635$
	G3	290,783 b	$\pm 12,531$	2,478 b	$\pm 0,631$
	G4	302,027 b	$\pm 9,826$	0,567 c	$\pm 0,747$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com atorvastatina cálcica.

Aos 30 e 60 dias de tratamento pode-se verificar um aumento, estatisticamente significativo, de níveis séricos de glicose e insulina no grupo que foi submetido à indução da osteoporose com dexametasona sem tratamento (G2) em relação ao grupo normal (G1), caracterizando uma hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina.

A glicose é a principal fonte de carboidrato do organismo e sua concentração sérica está intimamente ligada à insulina. Após uma refeição rica em carboidratos, a glicose que é absorvida para o sangue

causa uma rápida secreção de insulina. Esta por sua vez, provoca captação, armazenamento e uso rápido da glicose por quase todos os tecidos corporais especialmente músculos, tecido adiposo e fígado (Gross et al., 2002).

A resistência à insulina ocorre quando os tecidos corporais responsáveis pela captação e uso da glicose não respondem adequadamente a insulina produzida pelo organismo (Ferreira et al., 2007).

Os glicocorticoides podem interferir no metabolismo de glicose, pois inibem a captação periférica de glicose pelo músculo e tecido adiposo. Além disso, aumentam a gliconeogênese hepática e promovem um efeito permissivo às ações do glucagon e catecolaminas, contribuindo para o estado de hiperglicemia (Romanholi & Salgado, 2007).

Estudos de Santos et al. 2007 também verificaram o aumento da insulinemia ao longo do tratamento com dexametasona concomitantemente ao aumento das concentrações de glicose sanguínea.

A elevação dos níveis de insulina pode ser explicada parcialmente como resposta adaptativa das células B pancreáticas a eventos periféricos como a resistência à insulina desenvolvida na presença de concentrações elevadas de glicocorticoides. Diversos autores demonstraram o efeito direto dos glicocorticoides sobre tecidos periféricos insulino-dependentes como o tecido muscular, adiposo e hepático (Santos et al., 2007).

Além disso, outros fatores podem contribuir para o agravamento da resistência periférica à insulina, como por exemplo, aumento dos níveis circulantes de lipídios decorrentes da dislipidemia ocasionada pelo uso crônico dos glicocorticoides (Geloneze & Tambascia, 2006).

Durante todo o período experimental os animais do grupo tratado com alendronato de sódio (G3) apresentaram valores de glicemia e insulinemia equiparáveis ao grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2).

Estudos de Silva 2006, também verificaram a ausência de influência na hiperglicemia em animais tratados com alendronato de sódio.

Apesar desses resultados, segundo Lin et al.(2015), os bifosfonatos nitrogenados, dentre eles o alendronato de sódio, possuem mecanismo de ação semelhante às estatinas, agindo predominantemente inibindo a ativação da farnesil difosfato sintase na via do mevalonato resultando na diminuição da síntese do colesterol, atuando assim no controle das dislipidemias, ocasionando assim, diminuição do quadro de resistência à insulina resultando no melhor controle dos níveis glicêmicos.

Aos 30 dias de tratamento o grupo tratado com atorvastatina cálcica (G4) apresenta níveis séricos de glicose equiparáveis ao grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2) e níveis séricos de insulina significativamente superiores tanto em relação ao grupo normal (G1) como em relação ao grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2), caracterizando hiperglicemia decorrente de um aumento significativo da resistência à insulina. Aos 60 dias de tratamento o grupo tratado atorvastatina cálcica (G4) apresentou hiperglicemia equiparável ao grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2) e queda dos níveis séricos de insulina, abaixo, inclusive, dos níveis do grupo normal (G1).

Mecanismos de ação presentes nas estatinas como: inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (Anbinder et al., 2006), aumentam a expressão de receptores celulares de LDL determinando a diminuição do LDL circulante (Vargas & Limberger, 2013) e inibição da síntese hepática da apolipoproteína B (Apo B) determinando a redução na síntese e secreção de triglicerídeos (Stancu & Sima, 2001) atuariam no controle das dislipidemias o que ocasionaria diminuição da resistência à insulina com consequente controle da hiperglicemia (Pereira, 2011).

Contudo, segundo Neves & Ferreira (2013), avaliando ensaios clínicos aleatorizados e controlados, revelaram que algumas estatinas parecem estar associadas a maior risco de desenvolvimento de diabetes

mellitus (DM), sendo esse efeito, segundo outra meta-análise, dose-dependente.

Têm surgido algumas hipóteses sobre possíveis mecanismos para esta associação, tais como: a indução direta das estatinas a um aumento da resistência periférica à insulina; a interação com as células β pancreáticas prejudicando a produção de insulina; e alterações na sinalização da insulina no tecido periférico (Neves & Ferreira, 2013).

Segundo Shah & Goldfine (2012), em uma revisão cuidadosa dos resultados de vários ensaios combinados em pacientes com diabetes mellitus, mostrou que as estatinas podem elevar os níveis de glicose no sangue em comparação com pacientes que não fazem uso de estatinas.

Em um estudo de Lorenzatti et al. (2008), o diabetes mellitus tipo 2 foi diagnosticada em mais de 27% pacientes que receberam uma estatina (rosuvastatina) em comparação com pacientes que receberam placebo.

4- Conclusões

A biometria e histomorfometria permitiram a avaliação estática e dinâmica bem como a detecção de alterações teciduais na unidade estrutural óssea durante o período experimental. Através dessas análises, foi possível constatar o processo de indução da osteoporose pela dexametasona, bem como avaliar a evolução positiva tanto do grupo tratado com alendronato de sódio como do grupo tratado com atorvastatina cálcica.

Os níveis séricos de cálcio, fósforo e paratormônio (PTH) apresentaram alterações significativas relativas às alterações fisiológicas decorrentes do processo de indução da osteoporose com o uso da dexametasona, sendo que nenhum tratamento demonstrou alterações significativas desses marcadores.

O tratamento com atorvastatina cálcica promoveu alterações positivas significativas nos níveis séricos da fosfatase alcalina óssea (FAO) demonstrando a capacidade desses fármacos de aumentar a atividade reparadora óssea.

Os níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) que não apresentaram correspondência à fosfatase alcalina óssea FAO, podem ser afetados pelas variantes óssea, intestinal, renal e hepática.

Os valores de glicemia e insulinemia demonstraram um quadro de hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina, presentes no processo de indução da osteoporose pela dexametasona, característicos do conjunto de alterações metabólicas presentes na Síndrome de Cushing.

O tratamento com alendronato de sódio não ocasionou nenhuma alteração de glicemia e insulinemia em relação ao grupo que sofreu a indução da osteoporose e não recebeu tratamento.

A atorvastatina cálcica inicialmente ocasionou agravamento da hiperglicemia e hiperinsulinemia caracterizando potencialização do quadro de resistência a insulina, posteriormente levando a uma queda abaixo da normalidade da produção de insulina caracterizando a instalação do diabetes tipo 2.

5- Referências Bibliográficas

- ALLEN, M.J. Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. **Veterinary Clinical Phatology**, v.32, n.3, p.101-103, 2003.
- AMARAL, G.G.; DELCARLO, R.J.; OLIVEIRA, T.T.; LOUZADA, M.J.Q.; VALADARES, R.F.D.; RIBEIRO, M.D.; PINTO, A.S. Uso isolado e combinado de bisfosfonatos, estatina e flavonóide em ratas osteoporóticas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v36, p.105-110, 2014.
- ANBINDER, A.L.; QUIRINO, M.R.S.; ROCHA, R.F. Statins and bone tissue: a literature review. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.35, n.4, p.239-246, 2006.
- CANALIS, E.; DELANY, A. M. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.966, p.73-81, 2002.
- CANALI, E.; MAZZIOTTI, A.; GIUSTINA, J.; BILEZIKIAN, P. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. **Osteoporosis International Journal**, v. 18, p.1319–1328, 2007.
- DRAKE MATTHEW, T.; CLARKE BART, L.; KHOSLA SUNDEEP (2008) Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings** v.83, p.1032–1045, 2008.
- FERREIRA, A.P.; OLIVEIRA, C.E.R.; FRANCA, N.M. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina. **Journal of Pediatrics**, v.83, n.1, p.21-26, 2007.
- GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 208-215, 2006.
- GROSS, J.L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHEL, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.1, p.16-26, 2002.
- IM, G.; QURESHI, S. A.; KENNEY, J.; RUBASH, H. E.; SHANBHAG, A. S. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials**, v.25, p.4105–4115, 2004.
- JILKA, R.L. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. **Medical and Pediatric Oncology**, v.41, n.3, p.182-185, 2003.

- KAJI,H.;NAITO,J.; INOUE,Y.;SOWA,H.;SUGIMOTO,T.;CHICHARA,K. Statin Suppresses Apoptosis in Osteoblastic Cells: Role of Transforming Growth Factor- β -Smad3 Pathway. **Hormone and Metabolic Research**, v.40, p.746 – 751, 2008.
- KOH,K.K.;QUON,M.J.;HAN,S.H.H.;LEE,Y.;KIM,S.J.;SHIN,E.K. Atorvastatin Causes Insulin Resistance and Increases Ambient Glycemia in Hypercholesterolemic Patients. **Journal of the American College of Cardiology**, v.55, n.12, p.1209-1216, 2010.
- LEEM,K.;PARK,S.Y.;LEE,D.H.;KIM,H. Lovastatin increases longitudinal bone growth and bone morphogenetic protein-2 levels in the growth plate of Sprague–Dawley rats. **European Journal of Pediatrics**, v.161, p.406–407, 2002.
- LEMS,W.F.;LODDER,M.C.;LIPS,P.;BIJLSMA ,J.W.;GEUSENS,P.;SCHRAMMEIJER ,N.C. M.;VAN DE VEM,C.N.;DIJKMANS,B.A.C. Positive effect of alendronate on bone mineral density and markers of bone turnover in patients with rheumatoid arthritis on chronic treatment with low-dose prednisone: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Osteoporosis International** , v.17, p.716–23, 2006.
- LIN,S.;HUANG,J.;FU,Z.;LIANG,Y.;WU,H.;XU,L.;SUN,Y.;LEE,W.Y.W.;WU,T.;QIN,L.;CUI,L.;LI,G. The Effects of Atorvastatin on the Prevention of Osteoporosis and Dyslipidemia in the High-Fat-Fed Ovariectomized Rats. **Calcified Tissue International**, v.96, n.6, p.541-51, 2015.
- LORENZATTI,A.;MACFADYEN,J.;NORDESTGAARD,B.;SHEPHERD,J.;WILLERSON,J.;GLYNN,R. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. **The New England Journal of Medicine**, v.359, p.2195–2207, 2008.
- MAEDA,T.;KAWANE,T.;HORIUCHI,N .Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v.144, p.681 – 692, 2003.
- MARDEGAN ISSA,J.P.;DE LUCIA,C.I.; DOS SANTOS KOTAKE,B.G.;GONZAGA,M.G.;TOCCHINI DE FIGUEIREDO,F.A.; IYOMASA,D.M.;MACEDO, A.P.;ERVOLINO,E. The effect of simvastatin treatment on bone repair of femoral fracture in animal model. **Growth Factors**, v. 33, n. 2, p. 139-148, 2015.
- MUNDY,G.R. Statins and their potential for osteoporosis. **Bone**, v.29, n.6, p.495-497, 2001.
- NEVES,M.N.;FERREIRA,M.C. Estatinas: de herói a vilão na diabetes? **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v.29, n.3, p.205-207, 2013.

PINHEIRO,C.H.J.;FILHO,W.M.S.;NETO,J.O.;MARINHO,M.J.F.;NETO,R.M ;SMITH,M.M.R.L.;SILVA,C.A.B. Exercício Físico Previne Alterações Cardiometabólicas induzidas pelo Uso Crônico de glicocorticoides. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.93, n.3, p.400-408, 2009.

PINTO,A.S.;OLIVEIRA,T.T.;DELCARLO,R.J.,NAGEM,T.J.;FONSECA,C.C ;MORAES,G.H.K.;BRAGINE,D.F.J.,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.91-98, 2006.

REIS,A.F.;VELHO,G. Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, p.426-432, 2002.

ROMANHOLI,D.J.C.;SALGADO,L.R. Síndrome de Cushing Exógena e Retirada de Glicocorticóides. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.58, n.8, p.1280-1292, 2007.

RUSSELL,R.G. Bisphosphonates: from bench to bedside. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1068, p.367-401, 2006.

SANTOS,C.L.;RAFACHO,BOSQUEIRO,J.P. Efeitos da administração de dexametasona *in vivo* sobre Glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p.101-110, 2007.

SASAKI,N.;KUSANO,E.; ANDO,Y.;YANO,K.;TSUDA,E.;ASANO,Y. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.6, p.479-482, 2001.

SHAH,R.V.;GOLDFINE,A.B. Statins and Risk of New-Onset Diabetes Mellitus. **American Heart Association Cardiology Patient Page**, v.126, p.282-284, 2012.

SILVA,R.R. **Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica e Flavonóides na Osteoporose Induzida por Glicocorticoide**. 2006. 139f. Tese-(Doutorado em Bioquímica Agrícola)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

SEEDOR, JG; QUARRACCIO,HH;THOMPSON,DD The biophosphonate alendronate (MK 217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Bone and Mineral Research**,v.6,p.339-346,1991.

SOUTHARD,T.E.;SOUTHARD,K.A.;KRIZAN,K.E.;HILLS,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**, v.89, p.244-249, 2000.

SOUZA,M.C.; ASSEMANY,F.S.;LIMA, A.T.C.;SOUZA,R.F. Glicocorticoides e osteoporose – artigo de revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, n.1, p.57-64, 2010.

STANCU,C.; SIMA,A. Statins: mechanism of action and effects. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.5, n.4, p.378-387, 2001.

VARGAS,T.C.; LIMBERGER,J.B. Tratamento Farmacológico com Estatinas: Uma Revisão Sistemática. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria**, v. 14, n. 2, p.175-187, 2013.

WOO,J.T.;KASAI, S.;STERN,P.H.;NAGAI,K Compactin suppresses bone resorption by inhibiting the fusion of pre-fusion osteoclasts and disruption the actin ring in osteoclasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.15, p.650-662, 2000.

Capítulo 2 - Avaliação Biométrica, Histomorfométrica e de Marcadores Bioquímicos no Uso de Ipriflavona no Tratamento da Osteoporose Induzida com Dexametasona.

Resumo

A osteoporose induzida por glicocorticoides é uma complicação comum e grave nos tratamentos prolongados com esses fármacos. Normalmente são verificados nesses casos diminuição da formação óssea, assim como, incremento na sua reabsorção. O objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos da ipriflavona no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona. Os animais submetidos à indução da osteoporose, à exceção do Grupo Controle (G1), foram distribuídos aleatoriamente, nos seguintes grupos: G2 (controle com osteoporose), G3 (com osteoporose tratado com alendronato de sódio 0,2 mg/kg), e G4 (com osteoporose tratado com ipriflavona 100 mg/kg). Após o período de 30 e 60 dias do início do tratamento os animais foram eutanasiados sendo coletadas amostras de sangue para as dosagens dos níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina (FAL), glicose, fosfatase alcalina óssea (FAO), paratormônio (PTH) e insulina. Além disso, foram coletados os fêmures esquerdos para avaliação biométrica e histomorfométrica. O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 6 repetições. A princípio foi verificada a existência de distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Através das avaliações biométrica e histomorfométrica foi possível verificar a perda estrutural óssea induzida pela dexametasona, assim como a influencia positiva na manutenção tecidual de todos os tratamentos, apesar de somente os grupo tratado com alendronato de sódio obter valores equiparáveis ao grupo normal. Os valores séricos de cálcio, fósforo e PTH demonstraram alterações decorrentes somente do uso da dexametasona. Os níveis séricos de FAO apresentaram alterações positivas nos grupos tratados com ipriflavona. Os níveis séricos de FAL, afetados pelas variantes intestinal, renal e hepática, não

apresentaram correspondência à FAO. Os resultados também puderam demonstrar o quadro de hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina, presentes no processo de indução da osteoporose pela dexametasona, sendo que o tratamento com alendronato de sódio não ocasionou nenhuma alteração da glicemia e insulinemia. A ipriflavona foi capaz de ocasionar queda significativa da hiperglicemia com resultados bioquímicos que caracterizam, principalmente, diminuição do quadro de resistência à insulina.

Palavras-Chave: Hiperglicemia, Resistência a Insulina, Flavonoides, Glicocorticoides.

Abstract

The glucocorticoid-induced osteoporosis is a common and serious complication in prolonged treatment with these drugs. Usually in these cases checked decreased bone formation as well as increase in its reabsorption. The aim of this study was to evaluate comparatively the influence of ipriflavone in osteoporosis induced with dexamethasone. The animals subjected to induction of osteoporosis, except for the control group (G1), were randomized into the following groups: G2 (control with osteoporosis), G3 (with osteoporosis treated with alendronate sodium 0.2mg / kg) and G4 (with osteoporosis treated with ipriflavone 100 mg / kg). Between 30 and 60 after the start of treatment blood samples were collected for measurements of serum levels of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase (ALP), glucose, bone specific alkaline phosphatase (FAO), parathyroid hormone (PTH) and insulin. In addition, they collected the left femurs for biometric and histomorphometric measurement. The biological assay was performed according to a completely randomized design with 4 treatments and 6 repetitions. The principle was checked for normal distribution with the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). The groups were compared by Tukey test at 5% probability. Through histomorphometric and biometric evaluations it was possible to verify the structural bone loss induced by dexamethasone, as positive influence on tissue maintenance of all treatments, although only group treated with alendronate sodium obtains values comparable to the control group. The serum calcium, phosphorus and PTH demonstrated changes resulting only from the use of dexamethasone. Serum FAO had positive changes in the groups treated with ipriflavone. Serum FAL affected by gut, renal and hepatic variants showed no correlation FAO. The results could demonstrate hyperglycemia resulting frame of increasing insulin resistance present in the process of induction by dexamethasone osteoporosis, and treatment with sodium alendronate no change to glycemic and insulinemic. The ipriflavone was able to cause a significant drop in hyperglycemia biochemical results mainly characterized decreased insulin resistance above.

Key-Words: Hyperglycemia, Insulin resistance, Flavonoids, Dexamethasone, Glucocorticoids.

1. Introdução

Os glicocorticoides são utilizados por praticamente todas as especialidades médicas. Cerca de 0,5% da população geral do Reino Unido utiliza esses medicamentos, chegando a uma frequência de 1,75% das mulheres acima de 55 anos. A incidência de fraturas vertebral e não vertebral é elevada, variando de 30%-50% em pessoas que usam glicocorticoides por mais de três meses (Rodrigues et al., 2012).

A osteoporose induzida por glicocorticoides é uma complicação grave e comum nos tratamentos prolongados com esses fármacos. Normalmente são verificados nesses casos diminuição da formação óssea, assim como, incremento na sua reabsorção (Sasaki et al., 2011).

A osteoporose secundária, causada por glicocorticoides, está associada à redução direta que o fármaco causa na quantidade de osteoblastos (aumento da apoptose de osteoblastos), resultando em rápida perda de tecido ósseo. Além disso, o uso de glicocorticoides acarreta a supressão da produção de osteoprotegerina (OPG), que, em níveis normais, limita a liberação de enzimas pró-osteoclastogênicas ocasionando, conseqüentemente, aumento da reabsorção óssea (Jilka, 2003).

No tecido muscular esquelético, os glicocorticoides atuam inibindo tanto a captação de glicose, como também de aminoácidos. No tecido adiposo, estimula a lipólise e diminui a captação de glicose. Os hormônios glicocorticoides, particularmente o cortisol, opõem-se à ação anabólica da insulina, através do aumento do glucagon e a glicólise hepática induzida por catecolaminas (Melo et al., 2005).

A resistência à insulina e o aumento na gliconeogênese, conjuntamente, resultam na hiperglicemia (Pinheiro et al., 2009).

O alendronato de sódio tem demonstrado ser um dos mais potentes fármacos, pertencentes ao grupo dos bisfosfonatos que atua primordialmente como agente antirreabsortivo e é largamente utilizado na prevenção da reabsorção óssea sistêmica na osteoporose (Altunda & Gursoy, 2005).

Atualmente os bisfosfonatos são os agentes mais largamente utilizados no controle e tratamento da osteoporose devido sua eficiência e baixo custo. No entanto apesar de reduzirem a incidência de fraturas não apresentam ganho em formação óssea. Além disso, o seu uso prolongado demonstra vários efeitos colaterais como: fraturas subtrocantéricas do fêmur, osteonecrose de mandíbula, irritação esofágica entre outros, causando impacto negativo à adesão ao tratamento pelo paciente (Drake et al., 2008).

Evidências científicas através de estudos em humanos, animais e sistemas de culturas de células sugerem que as isoflavonas, que são compostos presentes na soja, especificamente a genisteína e a daidzeína desempenham um papel importante na prevenção de doenças crônicas, apresentando um efeito anticancerígeno e atividade antioxidante, com isso, este componente pode trazer benefícios no controle e prevenção de doenças como câncer, diabetes mellitus, osteoporose e doenças cardiovasculares (Zafra-Gómez et al., 2010).

Segundo Fernandes et al.(2011), as isoflavonas exercem sua ação biológica através de diversos mecanismos: mimetizam a ação dos estrogênios endógenos; agem como antagonistas do estrogênio; alteram o padrão de síntese e metabolismo dos estrogênios endógenos e modificam os receptores hormonais.

Além disso, as isoflavonas, dentre elas a ipriflavona, são capazes de induzir tanto um aumento da secreção como queda da resistência à insulina ocasionando diminuição dos níveis de glicose sanguínea, sendo assim, apontadas como uma alternativa no tratamento do diabetes tipo 2 (Perin & Zanardo, 2015).

A ipriflavona (7-isopropoxi-3-fenil-4H-benzopiranona) é uma isoflavona sintética, derivada da daidzeína, encontrada em grãos de soja e derivados, sendo comercializada com a finalidade de prevenir e/ou tratar a osteoporose (Bellei et al., 2012).

O presente trabalho tem como objetivo verificar através de biometria, histomorfometria e marcadores bioquímicos os efeitos da ipriflavona em ratas com osteoporose induzida com dexametasona.

2. Material e Métodos

Procedimento Experimental

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas 36 ratas (*Rattus norvegicus*) da raça Wistar, adultas, pesando em média 200 g, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), alimentados com ração comercial e água *ad libitum* durante todo experimento.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 36/2016).

Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em gaiolas de polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável em forma de grade, contendo, em cada uma um animal. Os animais foram mantidos em um ambiente climatizado, com período de luz de 12 horas e as gaiolas higienizadas a cada dois dias.

Após uma semana, período de adaptação, teve início o processo de indução da osteoporose com a administração do glicocorticoide dexametasona, por via intramuscular, na dose semanal de 7,5 mg/Kg de peso corporal, durante quatro semanas, nos animais de todos os grupos, à exceção de 12 animais do grupo 1 (G1) (controle sem osteoporose).

Os animais submetidos à indução da osteoporose foram então distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais de 12 animais cada, recebendo os seguintes denominações e tratamentos: G2 (controle com osteoporose), G3 (com osteoporose tratado com alendronato de sódio 0,2mg/kg) e G4 (com osteoporose tratado com ipriflavona 100mg/kg). As medicações foram administradas diariamente por via oral (método de gavagem), sendo utilizadas cânulas apropriadas.

Avaliação dos Marcadores Bioquímicos.

Aos 30 dias e 60 dias após o início dos tratamentos com as medicações, 6 animais de cada grupo foram anestesiados e através de laparotomia abdominal e posterior punção da veia cava caudal, foram coletados 5ml de amostra de sangue para a dosagem dos níveis séricos de cálcio, fósforo, hormônio da paratireoide (PTH), fosfatase alcalina (FAL), fosfatase alcalina isoenzima óssea (FAO), glicose e insulina.

Para o procedimento de laparotomia cada animal recebeu como medicação anestésica dissociativa a solução, via intramuscular, de 0,05ml de cloridrato de ketamina (1 g/ml) com 0,05ml de cloridrato de xilazina (23 mg/ml).

As dosagens sorológicas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina (FAL) e glicose, foram realizadas por espectrofotometria, utilizando o Aparelho Multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), bem como kits específicos de uso em automação da marca Bioclin®.

Para as dosagens sorológicas do hormônio da paratireoide (PTH), fosfatase alcalina isoenzima óssea (FAO) e insulina foi utilizado o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System II da Beckman Coulter®, assim como kits específico para dosagem, também da mesma indústria.

Exame Histomorfométrico.

Após a coleta de sangue, aos 30 dias e 60 dias após o início dos tratamentos com as medicações, 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 30 mg/kg).

Através de dissecação, os fêmures esquerdos foram coletados e colocados em formol 10% neutro tamponado, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, foram descalcificados e processados rotineiramente para estudo histológico.

Foram obtidos três cortes histológicos de cada fêmur, de quatro micrômetros de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer®, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Estes cortes foram obtidos de

forma seriada, montados sobre lâmina de vidro e corados com coloração Tricrômico de Masson.

Para cálculo da densidade ocupada por osso trabecular e espessura cortical óssea, foi obtida uma imagem amostral de osso contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico Olympus BX 41® (Tóquio, Japão) equipado com câmara digital (TCL-984 P®) acoplada. As imagens foram obtidas com objetiva de 10X. Estas imagens foram analisadas em um software de análise de imagem (Imagem Pro-Plus®, versão 4.5, Media Cybernética, Silver Spring, MD) que obteve a área em micrometros quadrados.

Nas imagens obtidas foram realizadas as medidas em μm da espessura da cortical óssea. A área composta por osso trabecular foi calculada através da proporção entre área ocupada por matriz orgânica óssea e área total da imagem, sendo que o resultado final corresponde ao percentual ocupado por matriz óssea.

Análise Biométrica

Foram realizadas medidas do comprimento de cada fêmur com paquímetro digital 150mm e resolução 0,01 mm/0,0005 Metrotools®. Além disso, foi realizada a pesagem de cada fêmur dissecado em balança analítica digital da marca A.Científica/EduTec® EEQ9003F-B com capacidade de 220 g e precisão de leitura de 0,1 mg. Foi calculado o índice Seedor dividindo-se o peso de cada fêmur pelo seu respectivo comprimento e o resultado expresso em g/cm (Seedor et al., 1991).

Análise Estatística

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 6 repetições. A princípio foi verificada a normalidade com o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados, então, expressos em média e \pm desvio padrão.

3. Resultados e Discussão

Nas tabelas 1 e 2 são apresentados as médias e desvio padrão dos valores da avaliação morfométrica (comprimento, peso e a relação do peso/comprimento) e histomorfométrica (espessura da cortical óssea e densidade trabecular óssea).

Tabela 1 - Valores da avaliação biométrica de fêmures de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Peso (g)		Comp. (cm)		Seedor (g/cm)	
		Valor	σ	Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	0,735 a	$\pm 0,039$	3,395	$\pm 0,108$	0,216 a	$\pm 0,002$
	G2	0,666 b	$\pm 0,038$	3,367	$\pm 0,052$	0,198 b	$\pm 0,004$
	G3	0,743 a	$\pm 0,061$	3,285	$\pm 0,051$	0,226 a	$\pm 0,005$
	G4	0,664 b	$\pm 0,041$	3,221	$\pm 0,047$	0,206	$\pm 0,004$
60 dias	G1	0,806 a	$\pm 0,036$	3,463	$\pm 0,042$	0,233 a	$\pm 0,005$
	G2	0,667 b	$\pm 0,038$	3,417	$\pm 0,026$	0,195 b	$\pm 0,005$
	G3	0,759 a	$\pm 0,029$	3,295	$\pm 0,051$	0,231 a	$\pm 0,005$
	G4	0,706 b	$\pm 0,056$	3,327	$\pm 0,071$	0,212 c	$\pm 0,007$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com ipriflavona.

Tabela 2 - Valores da avaliação histomorfométrica óssea de fêmures de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Densidade Trabecular (%)		Espessura Cortical (μm)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	68,167 a	+2,794	414,5 a	$\pm 22,61$
	G2	54,167 b	$\pm 2,544$	356,5 b	$\pm 13,68$
	G3	63,501 c	$\pm 3,201$	402,0 a	$\pm 22,72$
	G4	*53,501 b	$\pm 3,452$	353,1 b	$\pm 9,75$
60 dias	G1	70,167 a	$\pm 2,639$	418,0 a	$\pm 13,89$
	G2	44,167 b	$\pm 2,639$	314,5 b	$\pm 17,94$
	G3	68,667 c	$\pm 3,881$	404,5 a	$\pm 22,64$
	G4	58 d	$\pm 3,346$	370,5 c	$\pm 17,26$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com ipriflavona.

A avaliação da densidade trabecular, cortical óssea e do peso em relação ao tamanho do fêmur (índice Seedor (Seedor et al., 1991)) permitiu verificar durante todo o período experimental a progressiva perda de estrutura óssea caracterizando o processo de instalação da osteoporose nos grupos que receberam a dose de 7,5m/kg de dexametasona e não receberam tratamento (G2) (Tabela 1 e 2).

Segundo Pinto et al. (2006), a avaliação óssea histomorfométrica se caracteriza por ser um método de extrema valia para avaliação dinâmica do processo de remodelação óssea, precisando a extensão da perda óssea, das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo, sendo capaz de identificar alterações osteometabólicas como a osteoporose.

A osteoporose induzida pela dexametasona ocorre em duas fases: uma rápida, fase em que a densidade mineral óssea (DMO) é reduzida,

presumivelmente devido à reabsorção óssea excessiva (osteoclastos), e uma tardia, fase progressiva, em que a DMO diminui devido à prejudicada formação óssea (osteoblastos e osteócitos) resultando na diminuição progressiva da estrutura cortical e da densidade trabecular óssea (Canali et al., 2007, Souza et al., 2010).

Os animais do grupo tratado com o bisfosfonato alendronato de sódio (G3) apresentaram valores de densidade trabecular óssea, espessura da cortical óssea e índice Seedor, tanto em 30 como 60 dias de tratamento, com diferenças significativas em relação ao grupo com osteoporose sem tratamento (G2).

Aos 60 dias tanto o grupo tratado com a ipriflavona (G4) apresentou valores de densidade trabecular óssea, espessura da cortical óssea e índice Seedor com diferenças significativas em relação ao grupo com osteoporose sem tratamento (G2), apesar de não atingirem valores equiparáveis ao grupo normal (G1) (Tabela 1 e 2).

Estão apresentadas na tabela 3 as médias e desvio padrão dos níveis séricos de cálcio, fósforo e do paratormônio (PTH), após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 3 - Valores dos níveis séricos de cálcio, fósforo em mg/dl e paratormônio (PTH), em pg/ml, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo Tratamento	Cálcio (mg/dl)		Fósforo (mg/dl)		PTH (pg/ml)	
		Valor	σ	Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	10,838 a	$\pm 0,592$	10,391 a	$\pm 0,121$	4,667 a	$\pm 0,912$
	G2	9,901 b	$\pm 0,632$	9,117 b	$\pm 0,066$	5,847 b	$\pm 0,867$
	G3	9,487 b	$\pm 0,831$	9,901 b	$\pm 0,176$	5,883 b	$\pm 0,660$
	G4	9,043 b	$\pm 0,876$	9,558 b	$\pm 0,349$	5,678 b	$\pm 0,369$
60 dias	G1	10,951	$\pm 1,017$	10,371	$\pm 0,233$	4,353	$\pm 0,874$
	G2	10,511	$\pm 0,544$	10,133	$\pm 0,191$	4,753	$\pm 0,325$
	G3	10,953	$\pm 0,809$	10,582	$\pm 0,146$	4,317	$\pm 0,984$
	G4	11,084	$\pm 0,795$	10,104	$\pm 0,115$	4,221	$\pm 0,421$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com ipriflavona.

Aos 30 dias de tratamento foi possível verificar que o uso da dexametasona ocasionou a diminuição dos níveis séricos de cálcio e fósforo além do aumento dos níveis séricos de PTH em todos os grupos submetidos à indução da osteoporose (Tabela 3).

Segundo Souza et al. (2010), isso se deve aos efeitos fisiológicos indiretos (fase rápida) da dexametasona sobre o metabolismo ósseo onde atuam diminuindo a absorção intestinal de cálcio, aumentando a excreção renal de cálcio e fósforo, antagonizando os efeitos da vitamina D e ocasionando o hiperparatireoidismo secundário, sendo que, o efeito final dessa série de eventos é um pronunciado aumento da reabsorção óssea com consequente perda de massa estrutural óssea caracterizando a instalação da osteoporose.

Altos níveis de PTH, como vistos no hiperparatiroidismo secundário, aumentam a reabsorção óssea mediada pelo aumento da atividade osteoclástica. Os efeitos no tecido ósseo do PTH são mediados através dos osteoblastos sendo estes os maiores expressores de receptores celulares de PTH. Entretanto os osteoblastos se comunicam com os osteoclastos através da via de comunicação celular RANK-OPG (Osteoprotegerina) (Usha, 2012).

O sistema Receptor Ativador do Fator Nuclear- κ B (RANK) seu Ligando (RANKL) e a Osteoprotegerina (OPG) atuam como os principais mecanismos celulares com papel na regulação da reabsorção óssea. A sinalização RANKL / RANK regula a formação de osteoclastos a partir dos seus precursores, bem como a sua ativação e sobrevivência em remodelação óssea normal e numa variedade de condições patológicas. A OPG protege o esqueleto ósseo da excessiva reabsorção pela ligação ao RANKL impedindo-a de se ligar a seu receptor, RANK (Brendan & Lianping, 2007).

Estão apresentadas na tabela 4 as médias e desvio padrão dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase alcalina óssea (FAO) após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 4 - Valores dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL), em U/L e fosfatase alcalina óssea (FAO), em µg/L, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	FAL (U/L)		FAO (µg/L)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	63,267 a	$\pm 2,259$	3,206 a	$\pm 0,211$
	G2	131,333 b	$\pm 13,545$	3,053 b	$\pm 0,054$
	G3	106,667 c	$\pm 3,629$	3,085 b	$\pm 0,079$
	G4	108,671 c	$\pm 7,257$	3,167 a	$\pm 0,096$
60 dias	G1	67,011 a	$\pm 2,828$	3,318 a	$\pm 0,506$
	G2	68,501 a	$\pm 2,345$	3,008 b	$\pm 0,055$
	G3	98,546 b	$\pm 3,829$	3,184 a	$\pm 0,131$
	G4	74,428 b	$\pm 5,912$	3,341 a	$\pm 0,202$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com ipriflavona.

Aos 30 dias de tratamento pode-se verificar um aumento de níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) em todos os grupos que foram submetidos ao processo de indução da osteoporose (G2, G3 e G4) em relação ao grupo sem osteoporose (G1) (Tabela 4).

Aos 60 dias de tratamento verifica-se uma queda significativa dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) em todos os grupos osteoporóticos, apesar dos grupos tratados com alendronato de sódio (G3) e ipriflavona (G4) permanecerem com valores acima do parâmetro de normalidade (G1) (Tabela 4).

Segundo Amaral et al. (2014), a aferição dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) inclui os teores da isoforma da fosfatase alcalina específica do tecido ósseo denominada fosfatase alcalina óssea (FAO),

que é secretada pelos osteoblastos podendo apresentar aumento nos casos de remodelação óssea, devendo, portanto, acompanhar esse perfil.

Entretanto segundo Allen (2003), a interpretação da fosfatase alcalina total (FAL) é complicada por poder ser afetada pelas variantes óssea, intestinal, renal e hepática, interferindo assim, na sua utilização como marcador da remodelação óssea.

Avaliando o grupo com osteoporose sem tratamento (G2) foi possível verificar aos 30 e 60 dias de tratamento a progressão na redução dos níveis séricos da fosfatase alcalina óssea (FAO) (Tabela 4), que se deve a ação direta dos glicocorticoides (fase tardia), causando redução na quantidade e atividade de osteoblastos que além de resultar no impacto na redução de reposição de matriz óssea perdida, acarreta a supressão da produção de osteoprotegerina (OPG), que, em níveis normais, limita a liberação de enzimas pró-osteoclastogênicas (Jilka, 2003).

Durante todo o período experimental o grupo que recebeu tratamento com alendronato de sódio (G3) apresentou níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO), (Tabela 4), abaixo do parâmetro de normalidade (G1), demonstrando assim, o baixo potencial de atividade indutora da atividade de osteoblastos desse fármaco.

Os resultados positivos de preservação da estrutura óssea apresentados pelo grupo tratado com alendronato de sódio (G3), (Tabelas 1 e 2), apesar de baixa atividade osteoblástica, vista pelos níveis séricos de FAO, (Tabela 4), demonstra preponderância de atividade inibidora de reabsorção se contrapondo à fase rápida (aumento de reabsorção óssea) de ação da dexametasona.

A principal propriedade de atuação na reabsorção óssea dos bisfosfonatos se deve a alta afinidade e estabilização dos cristais de hidroxiapatita, justificando maior capacidade de atuação do alendronato de sódio na fase rápida de indução da osteoporose pela dexametasona (Russel, 2006).

Aos 30 e 60 dias de tratamento, o grupo tratado com a ipriflavona (G4), apresentou níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO)

significativamente superiores ao grupo osteoporótico sem tratamento (G2) e equiparáveis ao grupo normal (G1) (Tabela 4).

Segundo Canalis & Delany (2002), os glicocorticoides são capazes de atuar inibindo a secreção hipofisária das gonadotrofinas com a consequente diminuição da secreção ovariana e testicular de estrógenos e testosterona e da secreção adrenal de androstenediona e dehidroepiandrosterona.

Em nível molecular, os estrogênios favorecem a apoptose de osteoclastos, diminuindo a produção de citocinas, tais como Interleucina 1 (IL1), a Interleucina 6 (IL6), o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e Fator de Estimulação de Colônias de Macrófagos (M-CSF). Além disso, os estrogênios aumentam a expressão do Fator de Transformação do Crescimento β (TGF- β) e Osteoprotegerina (OPG) (inibidores da atividade de osteoclastos), enquanto diminuem a expressão do RANKL (ativador da atividade de osteoclastos) (Karsenty, 2012).

A ipriflavona é uma isoflavona sintética derivada da daidzeína, e se caracteriza como um composto químico fenólico que pertencem à classe dos fitoestrógenos e apresenta estrutura química bastante semelhante ao estrógeno natural.

Segundo Atmaca et al. (2008), as isoflavonas, através de sua semelhança estrutural e funcional ao 17-beta-estradiol, ocasionam aumento da expressão da proteína morfogenética óssea BMP-2 com consequente aumento da atividade e diferenciação osteoblástica. A síntese de interleucinas (IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF α)), prostaglandina e do fator estimulador de macrófagos, importantes agentes reabsortivos, é inibida pela isoflavona.

O aumento dos níveis séricos de FAO presentes no grupo tratado com ipriflavona corresponde à capacidade de atuação direta das isoflavonas sobre a atividade dos osteoblastos através da ligação nos receptores de estrogênio presentes na superfície dessas células, exercendo seus efeitos pelo mesmo mecanismo que este hormônio (Esteves & Monteiro, 2001).

Essa atuação direta sobre a atividade osteoblástica justifica seu maior potencial de tratamento na fase tardia da indução da osteoporose com dexametasona.

Apesar dos resultados positivos apresentados pelo grupo tratado com ipriflavona, em relação ao aumento dos níveis séricos de FAO com recuperação parcial da estrutura óssea demonstrada pela histomorfometria, deve-se levar em consideração que segundo Bourton & Wells (2002), na ausência de estrogênio as isoflavonas possuem um fraco efeito estrogênico, mas na presença deste exibem um efeito antiestrogênico.

Assim as propriedades estrogênica e antiestrogênica das isoflavonas dependem da concentração dos mesmos, da concentração dos esteroides sexuais endógenos e do órgão alvo específico envolvido na interação com os receptores de estrogênios. Esse efeito pode ser explicado pela existência de dois tipos de Receptores de Estrogênio: alfa e beta. Os alfa-receptores (RE- α) são os principais receptores encontrados na mama e no útero, e os beta-receptores (RE- β) no osso, no sistema cardiovascular, no trato urinário, sistema nervoso central e sistema imune (Fernandes et al., 2011).

Kuiper et al. (1998) relataram que tanto a genisteína quanto a daidzeína possuem uma ligação mais forte com os RE- β e esta relação pode ser benéfica na prevenção de osteoporose porque a formação óssea é estimulada pela ligação estrogênica com o RE- β .

Na tabela 5 são apresentados as médias e desvio padrão dos valores dos níveis séricos de Glicose e Insulina em, após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 5 - Valores dos níveis séricos de Glicose, em mg/dL e Insulina, em pg/ml, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Glicose (mg/dl)		Insulina (pg/ml)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	202,378 a	$\pm 4,649$	0,738 a	$\pm 0,325$
	G2	292,937 b	$\pm 7,985$	2,208 b	$\pm 0,518$
	G3	293,733 b	$\pm 12,853$	2,385 b	$\pm 0,261$
	G4	245,333 c	$\pm 37,237$	2,101 b	$\pm 0,871$
60 dias	G1	209,117 a	$\pm 3,237$	0,792 a	$\pm 0,351$
	G2	292,598 b	$\pm 4,921$	2,102 b	$\pm 0,635$
	G3	290,783 b	$\pm 12,531$	2,478 b	$\pm 0,631$
	G4	258,136 c	$\pm 25,931$	3,118 c	$\pm 0,747$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com ipriflavona.

Aos 30 e 60 dias de tratamento pode-se verificar um aumento, estatisticamente significativo, de níveis séricos de glicose e insulina no grupo que foi submetido à indução da osteoporose com dexametasona sem tratamento (G2) em relação ao grupo normal (G1), caracterizando uma hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina (Tabela 5).

Os glicocorticoides podem interferir no metabolismo de glicose, pois inibem a captação periférica de glicose pelo músculo e tecido adiposo. Além disso, aumentam a gliconeogênese hepática e promovem um efeito permissivo às ações do glucagon e catecolaminas, contribuindo para o estado de hiperglicemia. (Romanholi & Salgado, 2007).

Os glicocorticoides também atuam aumentando a resistência à insulina, sendo que a mesma ocorre quando os tecidos corporais responsáveis pela captação e uso da glicose não respondem adequadamente a insulina produzida pelo organismo (Ferreira et al., 2007).

Estudos de Santos et al. (2007) também verificaram o aumento da insulinemia ao longo do tratamento com dexametasona concomitantemente ao aumento das concentrações de glicose sanguínea.

A elevação dos níveis de insulina pode ser explicada parcialmente como resposta adaptativa das células B pancreáticas a eventos periféricos como a resistência à insulina desenvolvida na presença de concentrações elevadas de glicocorticoides. Diversos autores demonstraram o efeito direto dos glicocorticoides sobre tecidos periféricos insulino-dependentes como o tecido muscular, adiposo e hepático (Santos et al., 2007).

Além disso, outros fatores podem contribuir para o agravamento da resistência periférica à insulina, como por exemplo, aumento dos níveis circulantes de lipídios decorrentes da dislipidemia ocasionada pelo uso crônico dos glicocorticoides (Geloneze & Tambascia, 2006)

Durante todo o período experimental os animais do grupo tratado com alendronato de sódio (G3) apresentaram valores de glicemia e insulinemia equiparáveis ao grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2) (Tabela 5).

De acordo com estudo de Silva (2006), também foi verificada a ausência de influência na glicemia em animais tratados com alendronato de sódio.

Apesar desses resultados, segundo Lin et al.(2015), os bifosfonatos nitrogenados, dentre eles o alendronato de sódio, possuem mecanismo de ação semelhante às estatinas, agindo predominantemente inibindo a ativação da farnesil difosfato sintase na via do mevalonato resultando na diminuição da síntese do colesterol, atuando assim no controle das dislipidemias, ocasionando assim diminuição do quadro de resistência à insulina resultando no melhor controle dos níveis glicêmicos.

Guney et al. (2008), trabalhando com mulheres na pós - menopausa com diagnóstico de osteoporose e hiperlipidemia verificaram que o alendronato de sódio foi capaz de reduzir significativamente os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e colesterol LDL , apesar de alterações pouco significativas da Apo A1, Apo B e colesterol HDL.

O grupo tratado com a ipriflavona (G4) apresentou tanto em 30 como em 60 dias de tratamento queda significativa das taxas de glicose sanguínea em relação ao grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2), apesar de não atingir valores equiparáveis, estatisticamente significativos, ao grupo normal (G1). As taxas de insulinemia apresentaram valores equiparáveis aos do grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2) com aumento significativo aos 60 dias de tratamento (Tabela 5).

Estudos de Silva (2006), em ratas osteoporóticas induzidas com dexametasona, também verificaram a redução nos níveis séricos de glicose durante o tratamento com flavonoides, relatando no grupo tratado com ipriflavona valores de glicemia equiparáveis ao grupo normal.

Além disso, estudos epidemiológicos indicam que mulheres com hábito de alta ingestão de soja possuem menor risco de desenvolverem distúrbios relacionados ao metabolismo de glicose em comparação com as mulheres que possuem hábito relativamente baixo de consumo de soja (Fang et al, 2016).

De acordo com algumas pesquisas, a implementação acima de 40 mg/dia de isoflavona de soja tem sido demonstrado melhorar o glicometabolismo (Llaneza et al.,2010).

Segundo Kleijn et al. (2002), a suplementação alimentar com isoflavonas da soja têm sido associada a uma diminuição do risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2.

Yang et al. (2007), relatam como mecanismo de ação das isoflavonas a inibição da proteína quinase envolvida na transdução do sinal inflamatório causador da resistência à insulina em células do músculo esquelético e tecido adiposo.

Além disso, Esteves & Monteiro (2001), relatam o papel estimulatório da isoflavona genisteína no aumento da secreção da insulina e proliferação em culturas de células de ilhotas de Langerhans descrevendo como principal mecanismo o efeito inibitório da tirosina quinase. Os autores ainda citam os efeitos agudos da genisteína no

estímulo à secreção de insulina em células β do pâncreas de camundongos, sendo que a genisteína provocou um aumento na liberação de insulina, reversível e dependente da concentração (10 a 100 μmol).

4. Conclusões

A avaliação das análises biométrica e histomorfométrica demonstraram o processo de indução da osteoporose pela dexametasona, bem como possibilitaram a avaliação da evolução positiva dos tratamentos, apesar de somente o grupo tratado com alendronato de sódio, através da predominância de sua atividade antirreabsortiva, apresentar manutenção tecidual óssea equiparável ao grupo normal durante o período experimental.

O tratamento com ipriflavona ocasionou alterações positivas significativas nos níveis séricos da fosfatase alcalina óssea (FAO) demonstrando a capacidade desses fármacos de aumento da atividade reparadora óssea através de estímulo da atividade e número de osteoblastos.

Os níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) que não apresentaram correspondência à FAO.

O tratamento com a ipriflavona foi capaz de ocasionar queda significativa da hiperglicemia com resultados bioquímicos que caracterizam, principalmente, diminuição do quadro de resistência à insulina.

5. Referências Bibliográficas

- ALLEN, M.J. Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. **Veterinary Clinical Phatology**, v.32,n.3,p.101-103,2003.
- 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.
- AMARAL, G.G.; DELCARLO, R.J.; OLIVEIRA, T.T.; LOUZADA, M.J.Q.; VALADARES, R.F.D.; RIBEIRO, M.D.; PINTO, A.S. Uso isolado e combinado de bisfosfonatos, estatina e flavonóide em ratas osteoporóticas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v36, p.105-110, 2014.
- ATMACA, A.; KLEEREKOPER, M.; BAYRAKTAR, M.; KUCUK, O. Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis. **Menopause**, v.15,p.748-57, 2008.
- BARONE, B.; WARZAWASKI, L.; CALDAS, D. Síndrome de Cushing: um eterno desafio diagnóstico. **Revista Brasileira de Medicina**, v.68,n.4, 2007.
- BELLEI, P.M.; TERRA, M.M.; PETERS, V.M.; GUERRA, M.O.; ANDRADE, A.T. L. Efeito da ipriflavona sobre ratas Wistar e suas ninhadas. **Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia**, v. 34, n. 1, p.22-27, 2012 .
- BRENDAN, F.B.; LIANPING, X. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Research & Therapy**, v.9, 29, p.1-7, 2007.
- BURTON, J.L.; WELLS, M. The effect of phytoestrogens on the female genital tract. **Journal of Clinical Pathology**, v.55, n. 6, p. 401-407, 2002.
- CANALIS, E.; DELANY, A. M. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.966, p.73-81, 2002.
- CANALI, E.; MAZZIOTTI, A.; GIUSTINA, J.; BILEZIKIAN, P. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. **Osteoporosis International Journal**, v. 18, p.1319-1328, 2007.
- CHRISTENSON, E.S.; JIANG, X.; KAZAN, R.; SCHNATZ, P. Osteoporosis management in post-menopausal women. **Minerva ginecologica**, v.54, p. 181-194, 2012.
- DRAKE MATTHEW, T.; CLARKE BART, L.; KHOSLA SUNDEEP (2008) Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings** v.83,p.1032-1045, 2008.
- DUARTE, L.; NUNES, J.S.; LOPES, A.F.; MALHEIRO, F. Síndrome de Cushing Subclínica. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v.1, p.89-98, 2009.

ESTEVEES, E.A.;MONTEIRO,J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.14, p.43-52, 2001.

FANG,K.;DONG,H.;WANG,D.;GONG,J.;HUANG,W.;LU,F. Soy isoflavones and glucose metabolism in menopausal women: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Molecular Nutrition Food Research**, v.1, p.1-13, 2016.

FERNANDES,E.S.;SANTOS,T.R.;OLIVEIRA,T.T.,GUERRA, M.O.; PETERS,V.M.;ANDRADE, A.T. Avaliação do potencial interceptivo da ipriflavona em ratas wistar. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais**, v.2, n.1, p.7-12, 2011.

FERREIRA, A.P.;OLIVEIRA,C.E.R.;FRANCA,N.M. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina. **Journal of Pediatrics**, v.83, n.1, p.21-26, 2007.

GELONEZE,B.;TAMBASCIA,M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 208-215, 2006.

GUNEY,E.;KISAKOL,G.;OZGEN,A.G.;YILMAZ,C.;KABALAK,T. Effects of bisphosphonates on lipid metabolism. **Neuroendocrinology Letters**, v.29, n.2, p.252-255, 2008.

LLANEZA,P.;GONZALEZ,C.;FERNANDEZ-INARREA,J.;ALONSO,A. DIAZ-FERNADEZ,M.J.;ARNOTT,I.;FERRER-BARRIENDOS,J. Soy isoflavones, Mediterranean diet, and physical exercise in postmenopausal women with insulin resistance. **Menopause:The Journal of The North American Menopause Society**, v.17, p.372-378, 2010.

LIN,S.;HUANG,J.;FU,Z.;LIANG,Y.;WU,H.;XU,L.;SUN,Y.;LEE,W.Y.W.;WU, T.;QIN,L.;CUI,L.;LI,G. The Effects of Atorvastatin on the Prevention of Osteoporosis and Dyslipidemia in the High-Fat-Fed Ovariectomized Rats. **Calcified Tissue International**, v.96, n.6, p.541-51, 2015.

JILKA,R.L. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. **Medical and Pediatric Oncology**, v.41, n.3, p.182-185, 2003.

KARSENTY, G. The mutual dependence between bone and gonads. **Journal of Endocrinology**, v.213, p.107-114, 2012.

KLEIJN, M.J.; VAN DER SCHOUW, Y.T.; WILSON, P.W.; GROBBEE, D.E.; JACQUES, P.F. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S. women: the Framingham Study. **The Journal of Nutrition**, v.132, p.276-282, 2002.

KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, Springfield, v.139, n. 0, p.4252-4263, 1998.

MELO, R.E.V.A.; VITOR, C.M.A.; SILVA, M.B.L.; LUNA, L.A.; FIRMO, A.C.B.; MELO, M.M.V.A. Resposta hormonal no paciente politraumatizado. **International Journal of Dentistry**, v.4, n.1, p.31-36, 2005.

PERIN, L.; ZANARDO, V.P.S. Benefícios dos alimentos funcionais na prevenção do diabetes melito tipo 2. **Nutrição Brasil**, v.14, n.3, p.156-160, 2015.

PINHEIRO, C.H.J.; FILHO, W.M.S.; NETO, J.O.; MARINHO, M.J.F.; NETO, R.M.; SMITH, M.M.R.L.; SILVA, C.A.B. Exercício Físico Previne Alterações Cardiometabólicas induzidas pelo Uso Crônico de glicocorticoides. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.93, n.3, p.400-408, 2009.

PINTO, A.S.; OLIVEIRA, T.T.; DELCARLO, R.J.; NAGEM, T.J.; FONSECA, C.C.; MORAES, G.H.K.; BRAGINE, D.F.J.; 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.91-98, 2006.

RODRIGUES, R.M.P. et al. Guidelines for the prevention and treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.52, p.569-593, 2012.

ROMANHOLI, D.J.C.; SALGADO, L.R. Síndrome de Cushing Exógena e Retirada de Glicocorticóides. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.58, n.8, p.1280-1292, 2007.

ROSA MARIA RODRIGUES, P. et al. Guidelines for the prevention and treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.52, p.569-593, 2012.

RUSSELL, R.G. Bisphosphonates: from bench to bedside. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1068, p.367-401, 2006.

SANTOS, C.L.; RAFACHO, BOSQUEIRO, J.P. Efeitos da administração de dexametasona *in vivo* sobre Glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p.101-110, 2007.

SASAKI,N.;KUSANO,E.; ANDO,Y.;YANO,K.;TSUDA,E.;ASANO,Y.
Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.6, p.479-482, 2001.

SEEDOR, JG; QUARRACCIO,HH;THOMPSON,DD The biophosphonate alendronate (MK 217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Bone and Mineral Research**,v.6,p.339-346,1991.

SOUTHARD,T.E.;SOUTHARD,K.A.;KRIZAN,K.E.;HILLS,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**, v.89, p.244-249, 2000.

SOUZA,M.C.; ASSEMANY,F.S.;LIMA, A.T.C.;SOUZA,R.F.Glicocorticoides e osteoporose – artigo de revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, n.1, p.57-64, 2010.

SILVA,R.R. **Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica e Flavonóides na Osteoporose Induzida por Glicocorticoide**. 2006. 139f. Tese-(Doutorado em Bioquímica Agrícola)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

USHA,K.; B,N. Physiology of Bone Formation, and Metabolism. **Radionuclide and Hybrid Bone Imaging**, v.2, p.29-57, 2012.

YANG,J.Y.;DELLA-FERA,M.A.;RAYALAM,S.;AMBATI,S.;BAILE,C.A. Enhanced pro-apoptotic and anti-adipogenic effects of genistein plus guggulsterone in 3T3-L1 adipocytes. **Biofactors**, v.30, p.159-169, 2007.

ZAFRA-GÓMEZ, A.;GARBALLO, A.;GARCÍA-AYUSO,L.E.; MORALES, J.C. Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods. **Food Chemistry**, v.123, p.872-877, 2010.

ZAKIR,M.M.;FREITAS,I.R. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas presentes em produtos derivados da soja. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.02, n.3, p.107-116, 2015.

Capítulo 3 - Avaliação Biométrica, Histomorfométrica e de Marcadores Bioquímicos no Uso do Óleo de Linhaça no Tratamento da Osteoporose Induzida com Dexametasona.

Resumo

Este trabalho consistiu em um ensaio biológico com objetivo de avaliar o efeito do óleo de linhaça no tratamento da osteoporose induzida com dexametasona. A indução da osteoporose consistiu na administração de dexametasona na dose de 7,5 mg/kg de peso corporal, por via IM, uma vez por semana durante quatro semanas, à exceção dos animais do grupo controle (G1). Os animais submetidos à indução da osteoporose foram então distribuídos aleatoriamente, recebendo os seguintes denominações: G2 (controle com osteoporose), G3 (com osteoporose tratado com alendronato de sódio 0,2mg/kg) e G4 (com osteoporose tratado com óleo de linhaça 2,0ml). Após o período de 30 e 60 dias do início do tratamento os animais foram eutanasiados e então coletadas amostras de sangue para as dosagens dos níveis séricos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina (FAL), fosfatase alcalina óssea (FAO), paratormônio (PTH), glicose e insulina. Foram coletados também, os fêmures esquerdos para avaliação biométrica e histomorfométrica. O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 6 repetições. A princípio foi verificada a existência de distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As avaliações biométrica e histomorfométrica possibilitaram verificar a perda estrutural óssea induzida pela dexametasona, assim como a influencia positiva na manutenção tecidual de ambos os tratamentos, apesar de somente o grupo tratado com alendronato de sódio obter valores equiparáveis ao grupo normal (G1). Os valores séricos de cálcio, fósforo e PTH demonstraram alterações decorrentes do uso da dexametasona, não apresentando nenhuma alteração significativa relativa aos tratamentos. Os níveis séricos de FAO apresentaram alterações positivas no grupo tratado com óleo de linhaça. Os níveis séricos de FAL,

afetados pelas variantes intestinal, renal e hepática, não apresentaram correspondência à FAO. Os resultados puderam demonstrar também, o quadro de hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina, presentes no processo de indução da osteoporose pela dexametasona, sendo que tratamento com alendronato de sódio não ocasionou nenhuma alteração da glicemia e insulinemia. O tratamento com o óleo de linhaça foi capaz de ocasionar queda significativa da hiperglicemia com resultados bioquímicos que caracterizam, principalmente, diminuição do quadro de resistência à insulina.

Palavras-Chave: Hiperglicemia, Resistência à Insulina, Ômega - 3, Fitoestrógenos e Glicorticoides.

Abstract

This study consisted of a biological assay in order to study the effects of linseed oil in the dexamethasone-induced osteoporosis. The induction of osteoporosis was the administration of dexamethasone at the dose of 7.5mg/kg of body weight, intramuscularly, once a week for four weeks, except for control animals (G1). The animals subjected to induction of osteoporosis were then randomly assigned, receiving the following names and treatments: G2 (control with osteoporosis), G3 (with osteoporosis treated with alendronate sodium 0.2mg/kg) and G4 (with osteoporosis treated with flaxseed oil 2.0ml). Between 30 and 60 after the start of treatment blood samples were collected for measurements of serum levels of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase (ALP), bone specific alkaline phosphatase (BAP), parathyroid hormone (PTH), glucose and insulin resistance. In addition, they collected the left femurs for biometric and histomorphometric measurement. The biological assay was performed according to a completely randomized design with 4 treatments and 6 repetitions. The principle was checked for normal distribution with the Shapiro-Wilk test ($p < 0.05$). The groups were compared by Tukey test at 5% probability. Through histomorphometric and biometric evaluations it was possible to verify the structural bone loss induced by dexamethasone, as positive influence on tissue maintenance of both treatments, although only group treated with alendronate sodium obtains values comparable to the normal group (G1). The serum calcium, phosphorus and PTH demonstrated changes resulting from the use of dexamethasone, showing no significant change on the treatments. Serum levels of BAP showed positive changes in the group treated with linseed oil. Serum ALP affected by gut, renal and hepatic variants showed no correspondence to BAP not recommended its use as a marker of bone remodeling. The results could demonstrate hyperglycemia resulting frame of increasing insulin resistance present in the process of induction by dexamethasone osteoporosis, and treatment with sodium alendronate no change to glycemic and insulinemic. The treatment with linseed oil was capable of

causing a significant drop in hyperglycemia biochemical results mainly characterized decreased insulin resistance above.

Key-Words: Hyperglycemia, Insulin Resistance, Omega-3, Phytoestrogens, Lignans and Glucocorticoids.

1- Introdução

Os glicocorticoides são hormônios sintetizados e secretados pelo córtex adrenal. Esta classe de hormônios exerce inúmeras ações fisiológicas no organismo quando disponíveis em concentrações normais. Os glicocorticoides atuam normalmente sobre o metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras e são secretados em maiores quantidades em situações traumáticas e estressantes. Entretanto, quando as concentrações plasmáticas dos glicocorticoides excedem o normal, podem induzir distúrbios metabólicos (Santos et al., 2007).

O termo glicocorticoide deve-se à ação dessas substâncias no metabolismo de carboidratos. No músculo esquelético, os glicocorticoides causam aumento da resistência à insulina, o que resulta em menor captação de glicose e redução da síntese do glicogênio muscular. Nesse tecido, também se verifica inibição da síntese proteica e aumento no catabolismo de proteínas que resultam em hipotrofia muscular. Os aminoácidos mobilizados, a partir do tecido muscular, são utilizados na gliconeogênese hepática. A resistência à insulina e o aumento na gliconeogênese, conjuntamente, resultam na hiperglicemia (Pinheiro et al., 2009).

Além dessas alterações a osteoporose induzida por glicocorticoides é uma complicação grave e comum nos tratamentos prolongados com glicocorticoides (Sasaki et al., 2001). Resalta-se que os glicocorticoides são utilizados por praticamente todas as especialidades médicas. Cerca de 0,5% da população do Reino Unido utiliza esses medicamentos, chegando a uma frequência de 1,75% das mulheres acima de 55 anos (Rodrigues et al., 2012).

Na linha de frente do tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides se encontram os medicamentos do grupo dos bisfosfonatos e, dentre eles, o alendronato de sódio tem demonstrado ser um dos mais potentes desse grupo atuando primordialmente como agente antirreabsortivo (Altunda & Gursoy, 2005).

Atualmente os bisfosfonatos são os agentes mais largamente utilizados no controle e tratamento da osteoporose devido sua eficiência e baixo custo. No entanto apesar de reduzirem a incidência de fraturas não apresentam ganho em formação óssea. Além disso, o seu uso prolongado demonstra vários efeitos colaterais como: fraturas subtrocantéricas do fêmur, osteonecrose de mandíbula, irritação esofágica entre outros, causando impacto negativo à adesão ao tratamento pelo paciente (Drake et al., 2008).

Outra linha de tratamento da osteoporose se pauta no uso dos fitoestrógenos que são compostos químicos fenólicos de origem vegetal com estrutura química e comportamento muito semelhante ao estrógeno humano (Zakir & Freitas, 2015).

Um tipo de fitoestrógeno que têm demonstrado relevante valor terapêutico são precursores da lignana que são convertidos, pela ação de bactérias no trato gastrointestinal, em enterodiol e enterolactona que possuem estruturas químicas similares tanto aos estrogênios sintéticos como aos de ocorrência natural (Santos, 2008).

A linhaça (*L. usitatissimum*) é uma das 6 plantas atualmente reconhecidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US National Cancer Institute - NCI) por suas propriedades específicas no combate ao câncer. Parte desse reconhecimento deve-se a notável característica de ser a fonte mais rica de precursores lignana na dieta humana (Bombo, 2006; Marques, 2008).

O óleo de linhaça também têm demonstrado resultados positivos em relação ao controle glicêmico pela presença de lignanas e ácido α -linolênico (ômega-3) (Elias et al., 2012).

Além disso, o óleo de linhaça possui mais dois componentes que apresentam ações farmacológicas importantes, os ácidos graxos polinsaturados α -linolênico (ALA, 18:3n-3 (Ômega-3)) e em menor quantidade, α -linoleico (AL, 18:2n-6 (Ômega-6)), os quais vêm sendo avaliados em pesquisas clínicas e estudos relacionados à osteoporose (Carrara et al., 2009).

O presente trabalho visa verificar, através da avaliação biométrica e histomorfométrica óssea, além de marcadores bioquímicos, os efeitos do óleo de linhaça em ratas Wistar com osteoporose induzida com dexametasona.

2- Material e métodos

Procedimento Experimental

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas 36 ratas (*Rattus norvegicus*) da raça Wistar, adultas, pesando em média 200 g, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV), alimentados com ração comercial e água *ad libitum* durante todo experimento.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa (protocolo 36/2016).

Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em gaiolas de polietileno opaco e fechadas com tampa de aço inoxidável em forma de grade, contendo, em cada uma um animal. Os animais foram mantidos em um ambiente climatizado, com período de luz de 12 horas e as gaiolas higienizadas a cada dois dias.

Após uma semana, período de adaptação, teve início o processo de indução da osteoporose com a administração do glicocorticoide dexametasona, por via intramuscular, na dose semanal de 7,5 mg/Kg de peso corporal, durante quatro semanas, nos animais de todos os grupos, à exceção de 12 animais do grupo 1 (G1) (controle sem osteoporose).

Os animais submetidos à indução da osteoporose foram então distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais de 12 animais cada, recebendo os seguintes denominações e tratamentos: G2 (controle com osteoporose), G3 (com osteoporose tratado com alendronato de sódio 0,2 mg/kg) e G4 (com osteoporose tratado com óleo de linhaça 2,0 ml). As medicações foram administradas diariamente por via oral (método de gavagem), sendo utilizadas cânulas apropriadas, não ultrapassando 2 ml por administração.

Avaliação dos Marcadores Bioquímicos

Aos 30 dias e 60 dias após o início dos tratamentos com as medicações, 6 animais de cada grupo foram anestesiados e através de laparotomia abdominal e posterior punção da veia cava caudal, foram coletados 5ml de amostra de sangue para a dosagem dos níveis séricos de cálcio, fósforo, hormônio da paratireoide (PTH), fosfatase alcalina (FAL), fosfatase alcalina isoenzima óssea (FAO), glicose e insulina.

Para o procedimento de laparotomia cada animal recebeu como medicação anestésica dissociativa a solução, via intramuscular, de 0,05ml de cloridrato de ketamina (1 g/ml) com 0,05 ml de cloridrato de xilazina (23 mg/ml).

As dosagens sorológicas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina (FAL) e glicose foram realizadas por espectrofotometria, utilizando o Aparelho Multiparamétrico de Bioquímica (Alizé), bem como kits específicos de uso em automação da marca Bioclin®.

Para as dosagens sorológicas do hormônio da paratireoide (PTH), fosfatase alcalina isoenzima óssea (FAO) e insulina, foi utilizado o equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System II da Beckman Coulter®, assim como kits específico para dosagem, também da mesma indústria.

Exame Histomorfométrico.

Após a coleta de sangue, aos 30 dias e 60 dias após o início dos tratamentos com as medicações, 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 30 mg/kg).

Através de dissecação, os fêmures esquerdos foram coletados e colocados em formol 10% neutro tamponado, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, foram descalcificados e processados rotineiramente para estudo histológico.

Foram obtidos três cortes histológicos de cada fêmur, de quatro micrômetros de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer®, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Estes cortes foram obtidos

de forma seriada, montados sobre lâmina de vidro e corados com coloração Tricrômico de Masson.

Para cálculo da densidade ocupada por osso trabecular e espessura cortical óssea, foi obtida uma imagem amostral de osso contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico Olympus BX 41® (Tóquio, Japão) equipado com câmara digital (TCL-984 P®) acoplada. As imagens foram obtidas com objetiva de 10X. Estas imagens foram analisadas em um software de análise de imagem (Imagem Pro-Plus®, versão 4.5, Media Cybernética, Silver Spring, MD) que obteve a área em micrometros quadrados.

Nas imagens obtidas foram realizadas as medidas em μm da espessura da cortical óssea. A área composta por osso trabecular foi calculada através da proporção entre área ocupada por matriz orgânica óssea e área total da imagem, sendo que o resultado final corresponde ao percentual ocupado por matriz óssea.

Análise Biométrica

Foram realizadas medidas do comprimento de cada fêmur com paquímetro digital 150mm e resolução 0,01mm/0,0005 Metrotools®. Além disso, foram realizadas a pesagem de cada fêmur dissecado em balança analítica digital da marca A.Científica/Edutec® EEQ9003F-B com capacidade de 220 g e precisão de leitura de 0,1 mg. Foi calculado o índice Seedor dividindo-se o peso de cada fêmur pelo seu respectivo comprimento e o resultado expresso em g/cm (Seedor et al., 1991).

Análise Estatística

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 6 repetições. A princípio foi verificada a normalidade com o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados, então, expressos em média e \pm desvio padrão.

3- Resultados e Discussão

Nas tabelas 1 e 2 são apresentados as médias e desvio padrão dos valores das medidas morfométrica (comprimento, peso e a relação do peso/comprimento) e histomorfométrica (espessura da cortical óssea e densidade trabecular óssea).

Tabela 1 - Valores da avaliação morfométrica de fêmures de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Peso (g)		Comp. (cm)		Seedor (g/cm)	
		Valor	σ	Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	0,735 a	$\pm 0,039$	3,395	$\pm 0,108$	0,216 a	$\pm 0,002$
	G2	0,666 b	$\pm 0,038$	3,367	$\pm 0,052$	0,198 b	$\pm 0,004$
	G3	0,743 a	$\pm 0,061$	3,285	$\pm 0,051$	0,226 a	$\pm 0,005$
	G4	0,641 b	$\pm 0,074$	3,272	$\pm 0,065$	0,199 b	$\pm 0,007$
60 dias	G1	0,806 a	$\pm 0,036$	3,463	$\pm 0,042$	0,233 a	$\pm 0,005$
	G2	0,667 b	$\pm 0,038$	3,417	$\pm 0,026$	0,195 b	$\pm 0,005$
	G3	0,759 a	$\pm 0,029$	3,295	$\pm 0,051$	0,231 a	$\pm 0,005$
	G4	0,723 c	$\pm 0,038$	3,358	$\pm 0,061$	0,215 c	$\pm 0,005$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com óleo de linhaça.

Tabela 2 - Valores da avaliação histomorfométrica óssea de fêmures de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Densidade Trabecular (%)		Espessura Cortical (μm)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	68,167 a	+2,794	414,5 a	\pm 22,61
	G2	54,167 b	\pm 2,544	356,5 b	\pm 13,68
	G3	63,501 c	\pm 3,201	402,0 a	\pm 22,72
	G4	56,502 a	\pm 2,929	357,5 b	\pm 7,018
60 dias	G1	70,167 a	\pm 2,639	418,1 a	\pm 13,89
	G2	44,167 b	\pm 2,639	314,5 b	\pm 17,94
	G3	68,667 c	\pm 3,881	404,5 a	\pm 22,64
	G4	58,333 d	\pm 2,160	365,5 c	\pm 22,48

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com óleo de linhaça.

A avaliação da densidade trabecular, cortical óssea e do peso em relação ao tamanho do fêmur (índice Seedor (Seedor et al., 1991)) permitiu verificar durante todo o período experimental a progressiva perda de estrutura óssea caracterizando o processo de instalação da osteoporose nos grupos que receberam a dose de 7,5m/kg de dexametasona e não receberam tratamento (G2) (Tabela 1 e 2).

Segundo Pinto et al. 2006, a avaliação óssea histomorfométrica se caracteriza por ser um método de extrema valia para avaliação dinâmica do processo de remodelação óssea, precisando a extensão da perda óssea, das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo, sendo capaz de identificar alterações osteometabólicas como a osteoporose.

A osteoprose induzida pela dexametasona ocorre em duas fases: uma rápida, fase em que a densidade mineral óssea (DMO) é reduzida, presumivelmente devido à reabsorção óssea excessiva (osteoclastos), e

uma tardia, fase progressiva, em que a DMO diminui devido à prejudicada formação óssea (osteoblastos e osteócitos) (Canali et al., 2007).

O grupo tratado com o bisfosfonato alendronato de sódio (G3) apresentou valores de densidade trabecular óssea, espessura da cortical óssea e índice Seedor, tanto em 30 como 60 dias de tratamento, com diferenças significativas em relação ao grupo com osteoporose sem tratamento (G2) e com valores compatíveis com o grupo normal (G1), demonstrando assim capacidade de prevenir a indução da osteoporose com a dexametasona (Tabelas 1 e 2).

Somente aos 60 dias tanto o grupo tratado com óleo de linhaça (G4) apresentou valores de densidade trabecular óssea, espessura da cortical óssea e índice Seedor com diferenças significativas em relação ao grupo com osteoporose sem tratamento (G2), apesar de não atingirem valores equiparáveis ao grupo normal (G1) (Tabelas 1 e 2).

Estão apresentadas na tabela 3 as médias e desvio padrão dos níveis séricos de cálcio, fósforo e do paratormônio (PTH), após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 3 - Valores dos níveis séricos de cálcio, fósforo em mg/dl e paratormônio (PTH), em pg/ml, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo Tratamento	Cálcio (mg/dl)		Fósforo (mg/dl)		PTH (pg/ml)	
		Valor	σ	Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	10,838 a	$\pm 0,592$	10,391 a	$\pm 0,121$	4,667 a	$\pm 0,912$
	G2	9,901 b	$\pm 0,632$	9,117 b	$\pm 0,066$	5,847 b	$\pm 0,867$
	G3	9,487 b	$\pm 0,831$	9,901 b	$\pm 0,176$	5,883 b	$\pm 0,660$
	G4	9,593 b	$\pm 1,062$	9,292 b	$\pm 0,112$	5,583 b	$\pm 0,571$
60 dias	G1	10,951	$\pm 1,017$	10,371	$\pm 0,233$	4,353	$\pm 0,874$
	G2	10,511	$\pm 0,544$	10,133	$\pm 0,191$	4,753	$\pm 0,325$
	G3	10,953	$\pm 0,809$	10,582	$\pm 0,146$	4,317	$\pm 0,984$
	G4	11,108	$\pm 0,425$	10,338	$\pm 0,235$	4,143	$\pm 0,292$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com óleo de linhaça.

Aos 30 dias de tratamento foi possível verificar que o uso da dexametasona ocasionou a diminuição dos níveis séricos de cálcio e fósforo além do aumento dos níveis séricos de PTH em todos os grupos submetidos à indução da osteoporose (Tabela 3).

Segundo Souza et al. 2010, isso se deve aos efeitos fisiológicos indiretos (fase rápida) da dexametasona sobre o metabolismo ósseo onde atuam diminuindo a absorção intestinal de cálcio, aumentando a excreção renal de cálcio e fósforo, antagonizando os efeitos da vitamina D e ocasionando o hiperparatireoidismo secundário, sendo que, o efeito final dessa série de eventos é um pronunciado aumento da reabsorção óssea com consequente perda de massa estrutural óssea caracterizando a instalação da osteoporose.

Estão apresentadas na tabela 4 as médias e desvio padrão dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase alcalina óssea (FAO) após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 4 - Valores dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL), em U/L e fosfatase alcalina óssea (FAO), em µg/L, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	FAL (U/L)		FAO (µg/L)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	63,267 a	$\pm 2,259$	3,206 a	$\pm 0,211$
	G2	131,333 b	$\pm 13,545$	3,053 b	$\pm 0,054$
	G3	106,667 c	$\pm 3,629$	3,085 b	$\pm 0,079$
	G4	119,161 d	$\pm 1,855$	3,634 a	$\pm 0,579$
60 dias	G1	67,001 a	$\pm 2,828$	3,318 a	$\pm 0,506$
	G2	68,501 a	$\pm 2,345$	3,008 b	$\pm 0,055$
	G3	98,546 b	$\pm 3,829$	3,184 a	$\pm 0,131$
	G4	66,714 a	$\pm 6,676$	3,418 a	$\pm 0,197$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com óleo de linhaça.

Aos 30 dias de tratamento pode-se verificar um aumento de níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) em todos os grupos que foram submetidos ao processo de indução da osteoporose (G2, G3 e G4) em relação ao grupo sem osteoporose (G1) (Tabela 4).

Aos 60 dias de tratamento verifica-se uma queda significativa dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) em todos os grupos osteoporóticos, apesar dos grupos tratados com alendronato de sódio (G3) permanecerem com valores acima do parâmetro de normalidade (G1) (Tabela 4).

Verifica-se também aos 30 e 60 dias de tratamento a não correspondência dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase alcalina óssea (FAO), onde o grupo tratado com linhaça (G4) apresentou diferença positiva significativa em relação ao grupo com osteoporose (G2) e equiparáveis a normalidade (G1).

Segundo Amaral et al. (2014), a aferição dos níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) inclui os teores da isoforma da fosfatase alcalina específica do tecido ósseo denominada fosfatase alcalina óssea (FAO), que é secretada pelos osteoblastos podendo apresentar aumento nos casos de remodelação óssea, devendo, portanto, acompanhar esse perfil.

Entretanto segundo Allen (2003), a interpretação da fosfatase alcalina total (FAL) é complicada por poder ser afetada pelas variantes óssea, intestinal, renal e hepática, dificultando sua utilização como marcador da remodelação óssea.

Avaliando o grupo com osteoporose sem tratamento (G2) foi possível verificar aos 30 e 60 dias de tratamento a progressão na redução dos níveis séricos da fosfatase alcalina óssea (FAO) (Tabela 4) que se deve a ação direta dos glicocorticoides (fase tardia), causando redução na quantidade e atividade de osteoblastos que além de resultar no impacto na redução de reposição de matriz óssea perdida, acarreta a supressão da produção de osteoprotegerina (OPG), que, em níveis normais, limita a liberação de enzimas pró-osteoclastogênicas (Jilka, 2003).

Durante todo o período experimental o grupo que recebeu tratamento com alendronato de sódio (G3) apresentou níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO), (Tabela 4) abaixo do parâmetro de normalidade (G1), demonstrando assim, o baixo potencial de atividade indutora da atividade de osteoblastos desse fármaco.

Os resultados positivos de preservação da estrutura óssea apresentados pelo grupo tratado com alendronato de sódio (G3), apesar de baixa atividade osteoblástica, vista pelos níveis séricos de FAO, demonstra preponderância de atividade inibidora de reabsorção se contrapondo à fase rápida (aumento de reabsorção óssea) de ação da dexametasona (Russell, 2006).

Aos 30 e 60 dias de tratamento o grupo tratado com óleo de linhaça (G4) apresentou níveis séricos de fosfatase alcalina óssea (FAO) significativamente superiores se comparado ao grupo osteoporótico sem tratamento (G2) e equiparáveis ao grupo normal (G1) (Tabela 4).

Segundo Canalis & Delany (2002), os glicorticoides são capazes de atuar inibindo a secreção hipofisária das gonadotrofinas com a consequente diminuição da secreção ovariana e testicular de estrógenos e testosterona e da secreção adrenal de androstenediona e dehidroepiandrosterona.

Além disso, os estrogênios favorecem a apoptose de osteoclastos, diminuindo a produção de citocinas, tais como Interleucina 1 (IL1), a Interleucina 6 (IL6), o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α) e Fator de Estimulação de Colônias de Macrófagos (M-CSF). Além disso, os estrogênios aumentam a expressão do Fator de Transformação do Crescimento β (TGF- β) e Osteoprotegerina (OPG) (inibidores da atividade de osteoclastos), enquanto diminuem a expressão do RANKL (ativador da atividade de osteoclastos) (Karsenty & Ferron, 2012).

Tanto a semente de linhaça como o óleo de linhaça têm sido investigados devido ao possível efeito protetor contra o câncer, osteoporose, e seu papel no alívio de sintomas da menopausa (Cordeiro et al, 2009).

Parte desse reconhecimento deve-se a notável característica de ser a fonte mais rica de precursores lignana (esteroide vegetal de ação análoga ao estrógeno de mamíferos) na dieta humana (Bombo, 2006; Marques, 2008).

Nos mamíferos, os precursores da lignana vegetal como o seicoisolariciresinol diglicosídeo são convertidos primeiramente em enterodiol pela ação das bactérias no trato gastrointestinal e posteriormente oxidadas a enterolactona. Devido ao fato que o enterodiol e a enterolactona serem estruturalmente similares tanto aos estrogênios sintéticos como aos de ocorrência natural, ambos apresentam atividades estrogênica (Santos, 2008).

Além de fonte de lignana o óleo de linhaça é composto por 57% de ácidos graxos poli-insaturados α -linolênico (ALA, 18:3n-3 (Ômega-3)), 16% de α -linoleico (AL, 18:2n-6 (Ômega-6)), 18% de ácidos graxos monoinsaturados e somente 9% de ácidos graxos saturados. A

predominância de Omega-3 (ALA) é três vezes superior ao Omega-6(AL), fazendo com que seja a maior fonte vegetal deste ácido linolênico, cinco vezes mais abundante que em nozes ou óleo de canola (Cupersmid, Fraga, et al., 2012).

Tanto o ômega-3 como o ômega-6 têm sido alvos de inúmeros estudos nas últimas décadas, os quais esclareceram muitas das suas funções no organismo humano destacando a importância do seu uso na fase gestacional, nos primeiros meses após o nascimento, na terceira idade e em diversas doenças, principalmente degenerativas (Martin et al., 2006).

Há pelo menos três principais vias de ação pelo qual o ácido graxo ômega-3 pode afetar a remodelação óssea. O ômega-3 pode modular a absorção de cálcio, as citocinas inflamatórias e receptores ativados por proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ) (Maggio et al., 2009).

Durante todo o período experimental não houve alteração positiva dos níveis séricos de cálcio nos grupos tratados com óleo de linhaça, apesar de estudos de Haag et al.(2003), sugerirem que os ALA são capazes de promover melhora da absorção intestinal de cálcio através do aumento da Ca^{2+} ATPase (enzima responsável pela absorção ativa do cálcio no intestino).

Além disso, segundo Valentine (2004), tanto ALA como AL são capazes de alterar a estrutura, fluidez, polaridade e permeabilidade das membranas celulares do intestino, facilitando a permeabilidade de vários nutrientes dentre eles o cálcio.

As citocinas inflamatórias possuem papel primordial na patogênese da osteoporose através da estimulação da reabsorção óssea e inibição da formação óssea.

Segundo Vincent et al. (2009), muito progresso tem sido feito na compreensão dos fatores que estimulam a osteoclastogênese, que inclui o Fator Estimulante de Colônias 1 / Fator de Estimulação de Colônias de Macrófagos (CSF-1) (M-CSF), Ligando do Receptor Ativador do NF-kB (RANKL), Osteoprotegerina (OPG) e várias citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α).

Os ácidos graxos do tipo ômega-3 inibem a produção de IL-1 e TNF α , sendo que os de cadeia longa (EPA, DHA) substituem parcialmente os ácidos graxos ômega-6, nas membranas celulares. O aumento da relação ômega-3 / ômega-6 resulta em alterações da função da membrana, com subsequente diminuição de IL-1, IL-6 e TNF α ocasionando diminuição da osteoclastogênese resultando na diminuição de atividade de reabsorção óssea contrapondo-se ao estímulo dessa pela dexametasona. (Ferrucci et al., 2006).

O aumento dos níveis de FAO, apresentados durante todo o período experimental pelo grupo tratado com óleo de linhaça corresponde a um aumento do número e expressão da atividade de osteoblastos, corroborado por estudos de Vanek & Connor (2004). Estes autores verificaram que o aumento na proporção da dieta de ácidos graxos ômega-3 em relação aos ácidos graxos ômega-6 pode diminuir a ativação de PPAR γ e promover a osteoblastogênese.

Segundo Akune et al. (2004), os osteoblastos derivam a partir de células tronco mesenquimais pluripotentes, que podem se diferenciar em osteoblastos maduros ou adipócitos. O mecanismo de regulação da diferenciação de células tronco em osteoblastos é realizado pelo fator de transcrição nuclear PPAR γ que é expresso no tecido adiposo e medula óssea.

Na tabela 5 são apresentados as médias e desvio padrão dos valores dos níveis séricos de Glicose e Insulina após 30 e 60 dias de tratamento.

Tabela 5 - Valores dos níveis séricos de Glicose, em mg/dL e Insulina, em pg/ml, de ratas Wistar após 30 e 60 dias de tratamento.

Período	Grupo/ Tratamento	Glicose (mg/dl)		Insulina (pg/ml)	
		Valor	σ	Valor	σ
30 dias	G1	202,378 a	$\pm 4,649$	0,738 a	$\pm 0,325$
	G2	292,937 b	$\pm 7,985$	2,208 b	$\pm 0,518$
	G3	293,733 b	$\pm 12,853$	2,385 b	$\pm 0,261$
	G4	225,677 c	$\pm 17,769$	1,622 c	$\pm 0,958$
60 dias	G1	209,117 a	$\pm 3,237$	0,792 a	$\pm 0,351$
	G2	292,598 b	$\pm 4,921$	2,101 b	$\pm 0,635$
	G3	290,783 b	$\pm 12,531$	2,478 b	$\pm 0,631$
	G4	219,519 c	$\pm 18,114$	1,267 c	$\pm 0,702$

Em cada período, médias seguidas de letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 grupo controle sem indução da osteoporose, G2 grupo controle com osteoporose sem tratamento, G3 grupo com osteoporose tratado com alendronato de sódio e G4 grupo com osteoporose tratado com óleo de linhaça.

Aos 30 e 60 dias de tratamento pode-se verificar um aumento, estatisticamente significativo, de níveis séricos de glicose e insulina no grupo que foi submetido à indução da osteoporose com dexametasona sem tratamento (G2) em relação ao grupo normal (G1), caracterizando uma hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina.

A resistência à insulina ocorre quando os tecidos corporais responsáveis pela captação e uso da glicose não respondem adequadamente a insulina produzida pelo organismo (Ferreira et al., 2007).

Os glicocorticoides podem interferir no metabolismo de glicose, pois inibem a captação periférica de glicose pelo músculo e tecido adiposo. Além disso, aumentam a gliconeogênese hepática e promovem um efeito permissivo às ações do glucagon e catecolaminas, contribuindo para o estado de hiperglicemia (Romanholi & Salgado, 2007).

Além disso, outros fatores podem contribuir para o agravamento da resistência periférica à insulina, como por exemplo, aumento dos níveis circulantes de lipídios decorrentes da dislipidemia ocasionada pelo uso crônico dos glicocorticoides (Geloneze & Tambascia, 2006).

Durante todo o período experimental os animais do grupo tratado com alendronato de sódio (G3) apresentaram valores de glicemia e insulinemia estatisticamente iguais ao grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2) (Tabela 5).

Estudos de Santos et al. (2007), também verificaram o aumento da insulinemia ao longo do tratamento com dexametasona concomitantemente ao aumento das concentrações de glicose sanguínea, assim como a ausência de influência na hiperglicemia em animais tratados com alendronato de sódio.

Apesar desses resultados, segundo Lin et al. (2015), os bisfosfonatos nitrogenados, dentre eles o alendronato de sódio, possuem mecanismo de ação semelhante às estatinas, agindo predominantemente inibindo a ativação da farnesil difosfato sintase na via do mevalonato resultando na diminuição da síntese do colesterol.

Além disso, Burnett & Vasikaran (2002), relataram que os bifosfonatos são capazes de ocasionar diminuição dos níveis séricos de colesterol LDL (Lipoproteínas de Baixa Densidade) e apolipoproteína B (Apo B) além do aumento do colesterol HDL (Lipoproteínas de Alta Densidade) e apolipoproteína A1 (Apo A1), sendo que esse conjunto de reações seria capaz de diminuir a resistência à insulina com consequente diminuição da glicemia.

Durante todo o período experimental o grupo tratado com óleo de linhaça (G4) apresentou melhora significativa da hiperglicemia, com valores próximos ao grupo normal (G1). Além disso, apresentou níveis de insulina inferiores ao grupo controle submetido ao uso da dexametasona (G2), demonstrando diminuição significativa da resistência à insulina (Tabela 5).

Estudos de Kalupahana et al. (2011), citam que, em roedores, o consumo de ácidos graxos polinsaturados pertencentes ao grupo do ômega 3 (PUFAs n-3) (ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido

docosahexaenoico (DHA) preveniram a indução da resistência à insulina relacionando os resultados com a redução na lipogênese induzida e o aumento da oxidação de ácidos graxos no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo.

Além disso, segundo Neschen et al. (2006), o consumo de óleo de peixe (rico em EPA e DHA) foi capaz de aumentar os níveis de adiponectina, em estudos com camundongos, apontando como esse um dos potenciais mecanismos na melhora da resistência à insulina.

Entretanto, Perez-Echarri et al. (2009), relatam que EPA e DHA são capazes de melhorar a resistência à insulina induzindo a produção de leptina e visfatina tendo como consequência redução severa da produção de citocinas pró-inflamatórias originárias do tecido adiposo incluindo: o Fator de Necrose Tumoral α (TNF α); Interleucina 6 (IL-6); Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1) e o Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1 (PAI-1).

Segundo Oh et al. (2010), a inflamação crônica mediada por macrófagos é um mecanismo fundamental para a ocorrência de resistência à insulina em camundongos obesos. O autor, ainda relata, a existência do receptor acoplado a proteína G 120 (GPR120), situada em macrófagos, que quando ativada por ácidos graxos ômega-3 causam amplo efeito anti-inflamatório promovendo aumento sistêmico da sensibilidade à insulina.

Apesar disso, Marques et al. (2011), em um estudo experimental com o uso de diferentes formas de preparo de linhaça (grão cru, grão assado ou óleo) na alimentação de ratos Wistar, verificaram uma diminuição da glicemia em jejum em todos os grupos. No entanto, somente o grupo que recebeu o grão cru apresentou glicemia estatisticamente inferior ao grupo controle (sem linhaça).

Infere-se que essa redução na glicemia se deva principalmente à fibra solúvel da linhaça crua, pois se sabe que a mucilagem (fibra solúvel) da linhaça retarda o esvaziamento gástrico, promove o controle glicêmico e reduz o colesterol (Marques et al., 2011).

Estudos de Lemay et al. (2002), concluíram que, em mulheres na menopausa, o consumo diário de 40 gramas de semente de linhaça foi tão eficaz quanto a terapia de reposição hormonal para melhorar sintomas suaves da menopausa assim como diminuir os níveis de glicose e insulina.

4- Conclusões

As análises biométrica e histomorfométrica possibilitaram constatar a indução da osteoporose pela dexametasona, bem como avaliar a evolução positiva dos tratamentos, apesar de somente o grupo tratado com alendronato de sódio demonstrar manutenção tecidual óssea equiparável ao grupo normal durante o período experimental.

Os níveis séricos de cálcio, fosforo e paratormônio (PTH) apresentaram alterações significativas relativas às alterações fisiológicas decorrentes do processo de indução da osteoporose através do uso da dexametasona, sendo que nenhum tratamento ocasionou alterações significativas desses marcadores.

O tratamento com óleo de linhaça ocasionou alterações positivas significativas nos níveis séricos da fosfatase alcalina óssea (FAO) demonstrando a capacidade desses fármacos de aumento da atividade reparadora óssea através de estímulo da atividade e número de osteoblastos.

Os níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) que não apresentaram correspondência à FAO.

Os valores de glicemia e insulinemia demonstraram o quadro de hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina, presentes no processo de indução da osteoporose pela dexametasona.

O óleo de linhaça foi capaz de ocasionar queda significativa da hiperglicemia com resultados bioquímicos que caracterizam, principalmente, diminuição do quadro de resistência à insulina.

5- Referências Bibliográficas

- AKUNE T;O.S.;KAMEKURA,S.;YAMAGUCHI,M.; CHUNG,U.I.;KUBOTA, N. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. **Journal of Clinical Investigation**, v.113,p. 846-55, 2004.
- ALLEN,M.J. Biochemical Markers of Bone Metabolism in Animals: Uses and Limitations. **Veterinary Clinical Phatology**, v.32,n.3,p.101-103,2003.
- 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.
- AMARAL,G.G.;DELCARLO,R.J.;OLIVEIRA,T.T.;LOUZADA,M.J.Q.;VALADARES,R.F.D.;RIBEIRO,M.D.;PINTO,A.S. Uso isolado e combinado de bisfosfonatos, estatina e flavonóide em ratas osteoporóticas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v36, p.105-110, 2014.
- BOMBO,A.J. **Obtenção e caracterização nutricional de snacks de milho (Zea mays L.) e linhaça (Linum usitatissimum L.)**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- BURNETT,J.R.;VASIKARAN,S.D. Cardiovascular disease and osteoporosis: is there a link between lipids and bone? **Annals of Clinical Biochemistry**, v.39, p.203-210, 2002.
- CANALIS,E.;DELANY,A. M. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.966, p.73-81, 2002.
- CANALI,E.;MAZZIOTTI,A.;GIUSTINA,J.;BILEZIKIAN,P. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. **Osteoporosis International Journal**, v. 18, p.1319–1328, 2007.
- CARRARA,C.L.;ESTEVES, A.P.;GOMES,R.T.;GUERRA,L.L.. Uso da semente de linhaça como nutracêutico para prevenção e tratamento da arterosclerose. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, p.1- 9, 2009.
- CORDEIRO,R.;FERNANDES,P.L.;BARBOSA,L.A.Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p.3, 2009.
- CUPERSMID,L.;FRAGA,A.P.R.;ABREU,E.S.;PEREIRA,I.R.O. Linhaça: Composição química e efeitos biológicos. **e-Scientia**, v.5, p.33-40, 2012.
- DRAKE MATTHEW, T.; CLARKE BART ,L.; KHOSLA SUNDEEP (2008) Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings** v.83,p.1032–1045, 2008.

ELIAS,R.G.M.;FERNANDES,C.A.M.;MORAES,A.C.F.;GONÇALVES,E.C.A., CUMAN,R.K.N. Efeito de diferentes doses de óleo de linhaça no tratamento da dislipidemia em ratos. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 6, n.35, p.336-342, 2012.

FERREIRA, A.P.;OLIVEIRA,C.E.R.;FRANCA,N.M. Síndrome metabólica em crianças obesas e fatores de risco para doenças cardiovasculares de acordo com a resistência à insulina. **Journal of Pediatrics**, v.83, n.1, p.21-26, 2007.

FERRUCCI, L.;CHERUBINI, A.;BANDINELLI,S.;BARTALI,B.; CORSI,A.; LAURETANI,F. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , v.91, p.439-46, 2006.

GELONEZE,B.;TAMBASCIA,M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 208-215, 2006.

HAAG,M.;MAGADA,O.N.;CLAASSEN,N.;BOHMER,L.H.;KRUGER,M.C. Omega-3 fatty acids modulate ATPases involved in duodenal Ca absorption. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v.68, p.423-9, 2003.

JILKA,R.L. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. **Medical and Pediatric Oncology**, v.41, n.3, p.182-185, 2003.

KALUPHANA,N.S.;CLAYCOMBE,K.J.MOUSTAID-MOUSSA,M. (n-3)Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance:mechanistic insights. **Advances in Nutrition**, v.2, p.304-316, 2011.

KARSENTY,G.; FERRON,M. The contribution of bone to whole-organism physiology. **Nature**, v.481, p. 314-320, 2012.

LEMAY,A.;DODIN,S.;KADRI,N.;JACQUES,H.;FOREST,J.C. Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. **Obstetrics & Gynecology**, v.100, n.3, p.495-504, 2002.

LIN,S.;HUANG,J.;FU,Z.;LIANG,Y.;WU,H.;XU,L.;SUN,Y.;LEE,W.Y.W.;WU, T.;QIN,L.;CUI,L.;LI,G. The Effects of Atorvastatin on the Prevention of Osteoporosis and Dyslipidemia in the High-Fat-Fed Ovariectomized Rats. **Calcified Tissue International**, v.96, n.6, p.541-51, 2015.

MAGGIO, M.; ARTONI, A.; LAURETANI, F.; BORGHI, L.; NOUVENNE, A.; VALENTI, G.; CEDA, G.P. The Impact of Omega-3 Fatty Acids on Osteoporosis. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, p.4157-4154, 2009.

MARQUES, A. C. **Propriedades funcionais da linhaça (Linum usitatissimum L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos**. 2008. 115 f. Dissertação-(Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade de Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2008.

NESCHEN, S.; MORINO, K.; ROSSBACHER, J.C.; PONGRATZ, R.L.; CLINE, G.W.; SONO, S.; GILLUM, M.; SHULMAN, G.I. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. **Diabetes**, v.55, p.924–928, 2006.

OH, D.Y.; TALUKDBAR, S.; BAE, E.J.; IMAMURA, T.; MORINAGA, H.; FAN, W. Q.; LIP,.; LU, W.J.; WATIKINS, S.M.; OLEFSKY, J.M. GPR120 is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-Inflammatory and Insulin Sensitizing Effects. **Cell**, v.142, n.5, p.687-698, 2010.

PEREZECHARRI, N.; PEREZMATUTE, P.; MARCOSGOMEZ, B.; MARTINEZ, J.A.; MORENO-ALIAGA, M.J. Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats. **British Journal of Nutrition**, v.101, p.1059–1067, 2009.

PINHEIRO, C.H.J.; FILHO, W.M.S.; NETO, J.O.; MARINHO, M.J.F.; NETO, R.M.; SMITH, M.M.R.L.; SILVA, C.A.B. Exercício Físico Previne Alterações Cardiometabólicas induzidas pelo Uso Crônico de glicocorticoides. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.93, n.3, p.400-408, 2009.

PINTO, A.S.; OLIVEIRA, T.T.; DELCARLO, R.J.; NAGEM, T.J.; FONSECA, C.C.; MORAES, G.H.K.; BRAGINE, D.F.J., 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.91-98, 2006.

RODRIGUES, R.M.P. et al. Guidelines for the prevention and treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.52, p.569-593, 2012.

ROMANHOLI, D.J.C.; SALGADO, L.R. Síndrome de Cushing Exógena e Retirada de Glicocorticóides. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.58, n.8, p.1280-1292, 2007.

RUSSELL,R.G. Bisphosphonates: from bench to bedside. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1068, p.367-401, 2006.

SANTOS,C.L.;RAFACHO,BOSQUEIRO,J.P. Efeitos da administração de dexametasona *in vivo* sobre Glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p.101-110, 2007.

SANTOS,F.G. Linhaça (*Linum usitatissimum* L.), fonte de lignanas, utilizadas no controle de câncer de mamas. In: Anais do 12º Congresso de Iniciação Científica e 10º Encontro de Pós-Graduação, Pelotas, 2008. Disponível em:<http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CS/CS_00708 >. Acesso em 15 de out. 2012.

SASAKI,N.;KUSANO,E.; ANDO,Y.;YANO,K.;TSUDA,E.;ASANO,Y. Glucocorticoid decreases circulating osteoprotegerin (OPG): possible mechanism for glucocorticoid induced osteoporosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.6, p.479-482, 2001.

SEEDOR, JG; QUARRACCIO,HH;THOMPSON,DD The biophosphonate alendronate (MK 217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. **Bone and Mineral Research**,v.6,p.339-346,1991.

SOUZA,M.C.; ASSEMANY,F.S.;LIMA, A.T.C.;SOUZA,R.F. Glicocorticoides e osteoporose – artigo de revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, n.1, p.57-64, 2010.

SOUTHARD,T.E.;SOUTHARD,K.A.;KRIZAN,K.E.;HILLS,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**, v.89, p.244-249, 2000.

VALENTINE R, VALENTINE D. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept. **Progress in Lipid Research** v43,p. 383-402 2004.

VANEK,C.;CONNOR,W.E. Do n-3 fatty acids prevent osteoporosis? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.85: 647-658, 2007.

VICENT,C.;KOGAWA,M.; FINDLAY,D.N.;ATKINS,G.J. The generation of osteoclasts from RAW 264.7 precursors. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v.27, p.114-119, 2009.

ZAKIR,M.M.;FREITAS,I.R. Benefícios à saúde humana do consumo de isoflavonas presentes em produtos derivados da soja. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v.02, n.3, p.107-116, 2015.

7. Conclusões Gerais

As análises biométricas e histomorfométricas possibilitaram constatar o processo de indução da osteoporose pela dexametasona, bem como avaliar a evolução positiva dos tratamentos.

Os níveis séricos de cálcio, fósforo e paratormônio (PTH) apresentaram alterações significativas decorrentes do uso da dexametasona, sendo que nenhum tratamento demonstrou alterações significativas desses marcadores.

Os tratamentos com atorvastatina cálcica, ipriflavona e óleo de linhaça provocaram alterações positivas significativas nos níveis séricos da fosfatase alcalina óssea (FAO) demonstrando a capacidade desses fármacos no aumento da atividade reparadora óssea.

Os níveis séricos de fosfatase alcalina (FAL) que não apresentaram correspondência à FAO, dificultando sua utilização como marcador da remodelação óssea.

Os valores de glicemia e insulinemia possibilitaram verificar o quadro de hiperglicemia consequente do aumento da resistência à insulina, presentes no processo de indução da osteoporose pela dexametasona, característicos do conjunto de alterações metabólicas presentes na Síndrome de Cushing.

O tratamento com alendronato de sódio não ocasionou qualquer alteração de glicemia e insulinemia em relação ao grupo que sofreu a indução da osteoporose e não recebeu tratamento.

A atorvastatina cálcica inicialmente ocasionou agravamento da hiperglicemia e hiperinsulinemia caracterizando potencialização do quadro de resistência à insulina, posteriormente levando à uma queda da produção de insulina abaixo da normalidade, caracterizando a instalação do diabetes tipo 2.

Tanto a ipriflavona como o óleo de linhaça foram capazes de ocasionar queda significativa da hiperglicemia com resultados bioquímicos que caracterizaram, principalmente, diminuição do quadro de resistência à insulina, embora o grupo tratado com óleo de linhaça tenha apresentado níveis séricos de glicose e insulina melhores que o grupo tratado com ipriflavona.