

JULIA KHÉDE DOURADO VILLA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA K₂ (MENAQUINONA-7),
VITAMINA D₃ E CÁLCIO NA SAÚDE ÓSSEA E VASCULAR DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

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
2019

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

T

V712e
2019
Villa, Júlia Khéde Dourado, 1990-
Efeito da suplementação com vitamina K2
(menaquinona-7), vitamina D3 e cálcio na saúde óssea e vascular
de ratas ovariectomizadas / Júlia Khéde Dourado Villa. – Viçosa,
MG, 2019.
xiii, 79f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Osteoporose. 2. Menopausa. 3. Cálcio. 4. Vitamina K.
5. Vitamina D. 6. Calcificação. 7. Sistema cardiovascular.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Doutorado em Bioquímica Aplicada.
II. Título.


CDD 22 ed. 616.716

JULIA KHÉDE DOURADO VILLA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA K₂ (MENAQUINONA-7),
VITAMINA D₃ E CÁLCIO NA SAÚDE ÓSSEA E VASCULAR DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

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: 15 de fevereiro de 2019.



Renata Celi Lopes Toledo



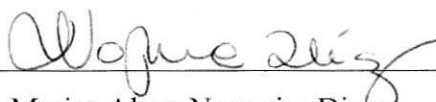
Maria Eliza de Castro Moreira



Hércia Stampini Duarte Martino
(Coorientadora)



Virgínia Ramos Pizzolo
(Coorientadora)



Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

“Compreendi que o amor englobava todas as vocações, que o amor era tudo”

Santa Teresinha do Menino Jesus

Com amor dedico esse trabalho ao meu filho Francisco, meu marido Jônio, meu avô Jorge†, aos meus pais José Carlos e Stella e aos meus irmãos Glauber, Aline, Daniel e Luisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por, a cada dia, me dar o dom da vida e por tantas graças concedidas durante o Doutorado;

Ao meu amado marido, Jônio Pizzol Caliman, doutorando do Departamento de Engenharia Florestal da UFV, que me auxiliou na realização de toda a manipulação dos animais, bem como deu suporte em todas as análises. Obrigada por ser minha fiel companhia, alegre, bondosa e amorosa;

Ao meu filho, amado e querido, Francisco, com o qual fui presenteada durante o Doutorado, que me acompanhou nas análises, ainda dentro da barriga, que trouxe luz a nossa vida, meu companheirinho querido e misericordioso desse doutorado. Obrigada por me olhar com amor em todas as situações;

Aos meus pais, Maria Stella Khéde e José Carlos Dourado Villa, por serem meus exemplos, meus conselheiros, minha força e meu descanso. Agradeço pela doação e pelo amor dedicados a mim por toda a vida;

Aos meus irmãos Daniel, Luisa, Glauber e Aline, às minhas sobrinhas, aos meus primos, tios, avós, sogros por constituírem a essa amada instituição, que tanto prezo, a mais importante para mim: Família;

À minha orientadora Marisa Alves Nogueira Diaz, por sua acolhida, dedicação, disponibilidade e esforço para que pensássemos nos meios para chegarmos aos nossos objetivos e para que superássemos todas as dificuldades ao longo do doutorado. Também agradeço à Marisa pela confiança em mim, demonstrada ao longo de todo esse período;

À minha coorientadora, Virgínia Ramos Pizziolo, sempre atenciosa e disponível para fazer com que nossos objetivos fossem alcançados. Obrigada por ser presença certa sempre que precisei;

À minha coorientadora Hércia Stampini Duarte Martino, pelos conhecimentos e experiências passados, por abrir as portas do Laboratório de Nutrição Experimental para

a experimentação animal, para as análises e para o que mais eu precisasse. Agradeço a todo seu apoio técnico, material e científico, doados com carinho, alegria e bondade;

Ao meu coorientador Fabrício Luciani Valente, primeiramente por deixar com que todas as suas ações sejam guiadas pela bondade do seu coração, o que transpareceu para mim desde nosso primeiro contato. Obrigada também por abrir as portas do Departamento de Medicina Veterinária para a realização de diversas etapas desse trabalho;

Ao estagiário Tauan Maini Barbosa, que me ajudou grandemente, principalmente no cuidado com os animais e no preparo das dietas. O agradeço pois foi importantíssimo na execução desse trabalho;

Aos colegas do Laboratório BioNat pelas ajudas e parcerias em diversas análises e procedimentos, bem como pelo companheirismo em todo esse período;

Aos colegas do Laboratório de Nutrição Experimental, pela importantíssima ajuda em diversas etapas do trabalho, especialmente na experimentação animal, e por me acolherem de forma tão especial, fazendo com que eu também fizesse parte dessa família;

Aos colegas do Departamento de Bioquímica Aplicada, em especial Vanessa Barros, Raoni, Leonardo, Pollyanna Ferreira e Ananda, por me auxiliarem em análises com reagentes químicos que eu não poderia manipular enquanto grávida;

À professora Lukiya Silva Campos Favarato e por toda a equipe do Departamento de Medicina Veterinária envolvida nas cirurgias de ovariectomia das 70 ratas desse trabalho. Agradeço a todos os envolvidos pelo impecável trabalho realizado;

Ao Sr. Adão e Sr. Cláudio do Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária, pela competente, experiente e alegre ajuda na confecção das lâminas histológicas;

À professora Luciana Navajas Rennó e ao técnico Mário, do Departamento de Zootecnia, por disponibilizar o laboratório, equipamentos e técnica para realização das análises bioquímicas;

Ao técnico Jefferson do Laboratório Biofármacos e também ao Laboratório de Embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela disponibilização do laboratório e pelo auxílio na realização das análises de resistência óssea;

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, onde foram realizadas as análises de microtomografia óssea com excelente qualidade;

Aos animais que participaram desse experimento, cedidos pelo Biotério Central da UFV, e a todos os animais utilizados em estudos experimentais;

À comunidade Pequena Via, que abriu as portas de um mundo novo para mim, aquelas por onde só o Amor passa e gera seus frutos. Aos amigos-família de comunidade; À Santa Teresinha do Menino Jesus, que, com seu jeito simples e doce, me ensina a amar;

Ao povo de Viçosa, que me encantou com seu jeitinho mineiro cativante;

Ao Departamento de Bioquímica Aplicada, pelo suporte e apoio em todas as etapas do trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (processo 001).

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que o presente trabalho se tornasse realidade.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Artigo de revisão publicado.....	4
2.2 Problematização: osteoporose e saúde vascular	5
2.2.1 Ossos.....	5
2.2.2 Osteoporose e calcificação vascular na menopausa	5
2.2.3 Terapias nutricionais convencionais.....	6
3. HIPÓTESES.....	8
4. OBJETIVOS	8
4.1 Objetivo geral	8
4.2 Objetivos específicos.....	8
5. REFERÊNCIAS.....	10
6. ARTIGO I.....	13
EFFECT OF VITAMIN K IN BONE METABOLISM AND VASCULAR CALCIFICATION: A REVIEW OF MECHANISMS OF ACTION AND EVIDENCES	13
ABSTRACT	13
6.1 INTRODUCTION.....	14
6.2 METHODOLOGY	15
6.3 RESULTS.....	15
6.3.1 Vitamin K	16
6.3.2 Vitamin K ₂ and osteoporosis	19
6.3.2.1 Mechanisms of action	19
6.3.2.2 Scientific evidences.....	20
6.3.2.3 Animal studies.....	21
6.3.3 Vitamin K ₂ and vascular calcification	22
6.3.3.1 Mechanisms of action	22
6.3.3.2 Scientific evidences.....	23
6.3.3.3 Animal studies.....	25
6.4 CONCLUSIONS	26
6.5 REFERENCES	30

7. ARTIGO II.....	39
SUPLEMENTO DE VITAMINA K2 REDUZ E O DE CÁLCIO AUMENTA A PERDA ÓSSEA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS.....	39
RESUMO	39
7.1 INTRODUÇÃO.....	40
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
7.2.1 Animais.....	41
7.2.2 Indução da osteoporose por ovariectomia	41
7.2.3 Composição da dieta padrão	42
7.2.4 Dosagens dos suplementos	42
7.2.5 Grupos experimentais e eutanásia.....	43
7.2.6 Peso e consumo alimentar.....	43
7.2.7 Dosagens sanguíneas	43
7.2.8 Determinação do conteúdo mineral ósseo	44
7.2.9 Histomorfometria óssea	44
7.2.10 Resistência óssea.....	45
7.2.11 Microtomografia	45
7.2.12 Radiografia.....	45
7.2.13 Análises estatísticas	46
7.2.14 Aspectos éticos	46
7.3 RESULTADOS	46
7.3.1 Massa corporal e consumo alimentar.....	46
7.3.2 Análises bioquímicas	46
7.3.3 Resistência óssea.....	48
7.3.4 Histomorfometria óssea	48
7.3.5 Radiografia.....	48
7.3.6 Microtomografia	49
7.3.7 Conteúdo mineral ósseo.....	50
7.4 DISCUSSÃO	51
7.5 REFERÊNCIAS	53
8. ARTIGO III.....	58
VITAMINA K2 DIMINUI O CONTEÚDO DE CÁLCIO NOS VASOS E MELHORA O ESTADO ANTIOXIDANTE DE RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA POR OVARIECTOMIA.....	58
RESUMO	58

8.1 INTRODUÇÃO.....	59
8.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
8.2.1 Animais.....	60
8.2.2 Indução da osteoporose por ovariectomia	60
8.2.3 Composição da dieta padrão	61
8.2.4 Dosagens dos suplementos	61
8.2.5 Grupos experimentais e eutanásia.....	62
8.2.6 Peso e consumo alimentar.....	62
8.2.7 Dosagens sanguíneas	62
8.2.8 Análises histológicas.....	63
8.2.9 Atividade antioxidante.....	63
8.2.10 Conteúdo de cálcio nos vasos	64
8.2.11 Análises estatísticas	64
8.2.12 Aspectos éticos	65
8.3 RESULTADOS	65
8.3.1 Massa corporal e consumo alimentar.....	65
8.3.2 Análises bioquímicas	65
7.3.3 Estresse oxidativo do fígado	66
8.3.4 Histomorfometria do fígado, coração, rins e vasos	68
8.3.5 Conteúdo de cálcio dos vasos	68
8.4 DISCUSSÃO.....	69
8.5 REFERÊNCIAS	72
9. CONCLUSÕES GERAIS	76
ANEXO 1. Cálculo amostral.....	78
ANEXO 2. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV	79

RESUMO

VILLA, Julia Khéde Dourado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Efeito da suplementação com vitamina K₂ (menaquinona-7), vitamina D₃ e cálcio na saúde óssea e vascular de ratas ovariectomizadas.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Virgínia Ramos Pizziolo, Hércia Stampini Duarte Martino e Gaspar Diaz Muñoz.

A osteoporose é um grave problema de saúde pública, associado ao risco aumentado de fraturas ósseas e mortalidade. A mobilização de cálcio dos ossos aumenta o risco de deposição extra esquelética do mineral e calcificação vascular, principalmente quando associada à suplementação de cálcio. Além do risco de calcificação de tecidos moles, efeitos fracos e inconsistentes têm sido associados aos suplementos de cálcio e vitamina D sobre a massa óssea, apesar de sua comum recomendação na prática clínica. Benefícios exclusivos da vitamina K₂ na saúde óssea e vascular têm sido verificados, mas sua recomendação ainda é baixa na prática clínica. A vitamina K₂ atua como cofator enzimático no processo de carboxilação de proteínas, como a osteocalcina e proteína Gla de matriz (MGP), inibidoras, respectivamente, da osteoporose e calcificação vascular. A vitamina K₂ também demonstrou induzir a apoptose de osteoclastos e reduzir a diferenciação de suas células progenitoras, aumentar o número e atividade dos osteoblastos e modular seus genes alvo. Reversão da calcificação vascular foi verificada após administração de altas ou baixas doses desta vitamina em animais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação, isolada e sinérgica, dos suplementos de vitaminas K₂ (menaquinona-7), vitamina D₃ e cálcio, na saúde óssea e vascular de ratas com perda óssea induzida por ovariectomia. O experimento foi conduzido com 70 ratas alimentadas com dieta padrão AIN-93M. Com 12 semanas de vida, a osteoporose foi induzida por retirada dos ovários (ovariectomia, ovx), que simula a deficiência de estrogênio após a menopausa. Após 6 semanas da ovx, os animais foram divididos nos grupos: (1) controle-sham (falsa ovariectomia, com incisão abdominal sem retirada dos ovários) não tratado; (2) controle-ovx não tratado; (3) ovx + cálcio; (4) ovx + K₂ (5) ovx + cálcio + K₂ (6) ovx + cálcio + D₃ (7) ovx + cálcio + K₂ + D₃. Na quarta semana, os animais do grupo 6, suplementados até então com cálcio e vitamina D₃, passaram a receber cálcio e vitamina K₂, afim de avaliar o efeito da troca de tratamento. Foi analisado o conteúdo mineral ósseo de cálcio, magnésio, fósforo e potássio. A quantificação de cálcio foi realizada nos vasos. No soro foram determinados teores de cálcio, magnésio, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, ácido úrico, uréia, proteína total e albumina. Atividade antioxidante foi verificada no fígado dos animais. Análises

histológicas foram realizada nos ossos, vasos, fígado, rim e coração. Nos fêmures também foi realizada análise de microtomografia, radiografia e resistência óssea. O nível de significância para análises estatísticas foi de 5%. Antes do início dos tratamentos, as ratas ovariectomizadas ganharam mais peso do que as sadias, porém essa diferença desapareceu duas semanas após a intervenção. A ovariectomia promoveu a osteoporose nos animais, confirmada nas análises de histologia, radiografia e microtomografia. Ratas ovariectomizadas também apresentaram redução do cálcio ósseo e sérico, que foi evitada com a suplementação de vitamina K2. O tratamento com vitamina K2, bem como a troca de tratamento, a partir da quarta semana, de Ca+D3 para Ca+K2, promoveram aumento do volume trabecular ósseo perdido, de forma que estes grupos ficaram semelhante ao grupo ctr-sham. Animais suplementados com cálcio, de forma isolada ou conjunta, demonstraram redução da massa óssea ao longo do período de estudo. Já os animais tratados apenas com vitamina K2 ou que sofreram a troca de tratamento tiveram a massa óssea mantida, de acordo com a microtomografia ou aumentada, de acordo com a radiografia. Não foi observada calcificação vascular nos animais, entretanto, apenas o suplemento de vitamina K2 promoveu redução da quantidade de cálcio nos vasos, mostrando um possível benefício da vitamina na calcificação vascular. De forma geral, a vitamina K2, de forma isolada ou associada aos outros suplementos, melhorou o perfil antioxidante dos animais, o que pode ser um fator protetor para a saúde vascular. Os tratamentos não causaram alterações na integridade hepática ou dano renal.

ABSTRACT

VILLA, Julia Khéde Dourado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Effect of supplementation with vitamin K2 (menaquinone-7), vitamin D3 and calcium on the bone and vascular health of ovariectomized rats.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Virgínia Ramos Pizzolo, Hércia Stampini Duarte Martino and Gaspar Diaz Muñoz.

Osteoporosis is a serious public health problem, associated with an increased risk of bone fractures and mortality. Bone calcium mobilization increases the risk of extraskeletal mineral deposition and vascular calcification, especially when associated with calcium supplementation. In addition to the risk of soft tissue calcification, inconsistent effects have been associated with calcium and vitamin D supplements on bone mass despite their common recommendation in clinical practice. Exclusive benefits of vitamin K2 in bone and vascular health have been verified, but it is not widely used in clinical practice. Vitamin K2 acts as an enzymatic cofactor in the carboxylation of proteins, such as osteocalcin and matrix Gla protein (MGP) which are inhibitors of osteoporosis and vascular calcification, respectively. Vitamin K2 also induced the apoptosis of osteoclasts and reduced the differentiation of their progenitor cells, increased the number and activity of osteoblasts and modulated their target genes. Vascular calcification reversal was verified after administration of high or low doses of this vitamin in animals. The objective of this work was to evaluate the isolated and synergistic action of vitamin K2 (menaquinone-7), vitamin D3 and calcium supplementation on the bone and vascular health of rats with bone loss induced by ovariectomy. The experiment was conducted with 70 rats fed standard diet AIN-93M. At 12 weeks, osteoporosis was induced by ovarian removal (ovariectomy, ovx), which mimics estrogen deficiency after menopause. After 6 weeks of ovx, the animals were divided into groups: (1) control-sham (false ovariectomy with abdominal incision without removal of the ovaries) untreated; (2) control-ovx untreated; (3) ovx + calcium; (4) ovx + K2 (5) ovx + calcium + K2 (6) ovx + calcium + D3 (7) ovx + calcium + K2 + D3. In the fourth week, the animals in group 6, supplemented until then with calcium + vitamin D3, started receiving calcium + vitamin K2, to evaluate the effect of the treatment change. The bone mineral content of calcium, magnesium, phosphorus and potassium was analyzed. Quantification of calcium was also performed in vessels. Calcium, magnesium, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, uric acid, urea, total protein and albumin were determined in serum. Antioxidant activity was verified in the liver of the animals.

Histological analyzes were performed on bones, vessels, liver, kidney and heart. In the femurs, microtomography, radiography and bone resistance analysis were also performed. The level of significance for statistical analysis was 5%. Before the treatments, ovariectomized rats gained more weight than healthy rats, but this difference disappeared two weeks after the intervention. Ovariectomy promoted osteoporosis in the animals, confirmed in the histology, radiography and microtomography analyzes. Ovariectomized rats also showed reduction of bone and serum calcium, which was avoided with vitamin K2 supplementation. Treatment with vitamin K2, as well as the exchange of treatment, from the fourth week of Ca + D3 to Ca + K2, promoted an increase in trabecular bone volume, so that these groups were similar to the ctr-sham group. Animals supplemented with calcium showed a reduction in bone mass throughout the study period. On the other hand, the animals treated with vitamin K2 alone or that changed treatment had the bone mass maintained according to the microtomography or increased according to the radiography. Vascular calcification was not observed in the animals, however, only the vitamin K2 supplement promoted reduction of the amount of calcium in the vessels, showing a possible benefit of the vitamin in vascular calcification. In general, vitamin K2, alone or in association with other supplements, has improved the antioxidant profile of the animals, which may be a protective factor for vascular health. Treatments did not cause changes in liver integrity or renal damage.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A osteoporose é um problema de saúde grave em todo o mundo, que está associado ao maior risco de fraturas ósseas e mortalidade. Pacientes com osteoporose possuem risco aumentado de desenvolver calcificação vascular (CV), principalmente quando usam suplementos de cálcio (BOLLAND et al., 2010; LI et al., 2012; XIAO et al., 2013). Depósitos de cálcio em artérias coronárias podem comprometer respostas vasomotoras e reduzir a elasticidade, aumentando os riscos de hipertensão arterial, estenose da aorta, hipertrofia cardíaca, infarto do miocárdio e isquemia de membros inferiores (LAMPROPOULOS; PAPAIOANNOU; D'CRUZ, 2012).

O tratamento da osteoporose geralmente envolve o uso de suplementos de cálcio e vitamina D, entretanto, a eficácia destes é controversa na literatura. A suplementação de cálcio e vitamina D, recomendada pelas Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose (BRASIL, 2014) para mulheres na pós-menopausa, tem sido muito usada na prática clínica. Entretanto, efeitos fracos e inconsistentes têm sido atribuídos a esses suplementos sobre a densidade mineral óssea (DMO) e o risco de fraturas (BOLLAND et al., 2015; TAI et al., 2015). Além disso, o risco de eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio, associado à suplementação de cálcio, devido ao depósito desse mineral em tecidos moles, como vasos, é um fator que deve ser considerado na escolha do tratamento a ser empregado (BOLLAND et al., 2010; LI et al., 2012; XIAO et al., 2013). Vale ressaltar que, ao contrário dos suplementos de cálcio, alimentos fontes de cálcio exercem efeito protetor sobre a massa óssea (REID et al., 2002; REID et al., 2005). Em relação aos suplementos de vitamina D, controvérsias quanto à eficácia têm sido verificadas. O aumento da absorção intestinal de cálcio promovido pela vitamina D e a ação dessa vitamina sobre osteoblastos e osteoclastos têm sido indicados como mecanismos de ação dessa vitamina para promover o ganho de massa óssea (BISCHOFF-FERRARI et al., 2005; BIKLE, 2012). Entretanto, poucas evidências de benefícios sobre a DMO e prevenção de foram verificados em diversos estudos incluídos em revisões sistemáticas de ensaios clínicos randomizados (CHAPUY et al., 1992; AVENELL et al., 2009).

Além dos suplementos de cálcio e vitamina D, medicamentos, como alendronato e risedronato de sódio, e a terapia hormonal para reposição dos níveis de estrogênio também são recomendados. Opções eficientes, não medicamentosas, acessíveis e de baixos custo e risco, que não apenas evitem a perda, mas promovam a reposição da massa óssea, são demandas importantes na prática clínica. Nesse contexto, benefícios exclusivos têm sido

atribuídos à vitamina K2 na prevenção e tratamento da osteoporose e CV. Também chamada menaquinona (MK), a vitamina K2 é encontrada, em baixa quantidade, em alguns alimentos como gema de ovo, carnes, fígado, e, em maior concentração em alimentos fermentados, como chucrute, queijos e, especialmente, o *natto*, um alimento tradicional japonês feito da soja fermentada. Além disso, a vitamina K2 pode ser produzida a partir da vitamina K1 pela bactéria *Escherichia coli* no intestino humano (MEGANATHAN, 2001).

Na estrutura química da vitamina K está presente a menadiona, uma estrutura em anel, cuja cadeia lateral pode conter um grupo fitilo, produzindo a vitamina K1, ou de 1 a 14 repetições de grupos isoprenóides, dando origem às diferentes formas de vitamina K2 (Figura 1).

Algumas proteínas, cuja atividade é dependente da vitamina K2, são consideradas inibidoras da calcificação vascular, como a proteína Gla de matriz (MGP), ou promotoras da mineralização óssea, como a osteocalcina (HAUSCHKA et al., 1989; SCHINKE; MCKEE; KARSENTY, 1999) e Gla-rich protein (GRP) (VIEGAS et al., 2008). A essencialidade da vitamina K para a atividade biológica dessas proteínas se deve ao seu papel como um cofator no processo pós-traducional de γ -glutamylcarboxilação. Além disso, a vitamina K2 promove aumento no número e da atividade dos osteoblastos (URAYAMA et al., 2000), modula de genes alvo em osteoblastos (ICHIKAWA et al., 2007), e promove a regeneração da fratura (KOITAYA et al., 2009).

Estudos que avaliem o efeito da vitamina K2 na saúde óssea e vascular são escassos no Brasil, porém crescentes na literatura internacional, e o uso dessa vitamina para o manejo dessas complicações na prática clínica é baixo. Vista a observada baixa eficácia dos suplementos de cálcio e vitamina D, bem como o risco cardiovascular associado aos suplementos de cálcio, esse estudo visa testar um tratamento pouco empregado na prática clínica, a suplementação com vitamina K2, de forma isolada ou conjunta com os suplementos de cálcio e vitamina D. Não foram encontrados estudos que apresentassem objetivo semelhante ao do presente trabalho: avaliar o efeito isolado e conjunto dos suplementos de vitamina K2, vitamina D3 e cálcio em animais com osteoporose induzida por ovariectomia. Este experimento foi elaborado para empregar as terapias nutricionais usualmente recomendadas para o tratamento osteoporose causada por depleção de estrogênio, incluindo nesse contexto a avaliação do papel da vitamina K2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Foram revisados os pontos-chave desse trabalho: os ossos e suas alterações metabólicas, fisiológicas e morfológicas associadas às mudanças hormonais da menopausa/ovariectomia experimental; a calcificação vascular associada à perda óssea e à suplementação de cálcio; a eficiência da terapia nutricional usualmente empregada: suplementação de cálcio associada ou não à vitamina D3; e o papel da vitamina K2 no contexto da perda óssea e da calcificação vascular.

Essa revisão está apresentada na forma de artigo de revisão, já publicado na revista *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (doi: 10.1080/10408398.2016.1211616; fator de impacto: 6.202), cuja capa está apresentada na página seguinte e a descrição da íntegra na seção Resultados. O artigo de revisão aborda principalmente o papel da vitamina K2 na saúde óssea e vascular e, por isso, nessa seção foi acrescentada uma revisão complementar, abordando a problematização da osteoporose e saúde vascular, metabolismo ósseo, suplementação de cálcio e suplementação de vitamina D.

2.1 Artigo de revisão publicado



Critical Reviews in Food Science and Nutrition



ISSN: 1040-8398 (Print) 1549-7852 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/bfsn20>

Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: a review of mechanisms of action and evidences

Julia Khéde Dourado Villa, Marisa Alves Nogueira Diaz, Virgínia Ramos Pizzolo & Hércia Stampini Duarte Martino

To cite this article: Julia Khéde Dourado Villa, Marisa Alves Nogueira Diaz, Virgínia Ramos Pizzolo & Hércia Stampini Duarte Martino (2016): Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: a review of mechanisms of action and evidences, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI: [10.1080/10408398.2016.1211616](https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1211616)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1211616>



Accepted author version posted online: 20 Jul 2016.
Published online: 20 Jul 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

2.2 Problematização: osteoporose e saúde vascular

2.2.1 Ossos

Os ossos constituem um tecido que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação, sendo osteoblastos, osteoclastos e osteócitos as células envolvidas em tais mecanismos. A remodelação óssea envolve a formação (por osteoblastos) e reabsorção óssea (por osteoclastos), dois processos antagônicos, mas que ocorrem de forma acoplada (VIEIRA, 1999). Osteoblastos e osteoclastos se movem sobre a superfície óssea e os osteócitos têm função de manutenção do tecido, recrutando osteoblastos ou osteoclastos conforme alterações físicas e químicas do osso (VIEIRA, 1999; ZERBINI; SOUZA, 2001).

A matriz óssea formada por osteoblastos é posteriormente mineralizada, e dentre as substâncias que a compõem se destacam a proteína Gla de matriz (osteocalcina), colágeno tipo I e fosfatase alcalina. Os osteócitos, que são derivados dos osteoblastos embebidos na matriz óssea, permanecem conectados à superfície óssea por canalículos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os principais tecidos ósseos são o trabecular, mais esponjoso e metabolicamente ativo, preenchido por medula óssea, e o cortical, mais sólido, preenchido por lamelas de matriz calcificada (VIEIRA, 1999). Predominantemente, o osso é constituído pelos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, uma porção mineral que têm forma alongada e hexagonal. Esses cristais conferem resistência, força de compressão e rigidez. Outra porção, que constitui 20% da massa óssea, é formada principalmente por fibras de colágeno tipo I, além de substâncias de adesão e água que dão flexibilidade, elasticidade e resistência à tração ao osso (DURÁN, 2011).

2.2.2 Osteoporose e calcificação vascular na menopausa

A osteoporose é um problema de saúde grave caracterizado pela perda de massa e deterioração da microarquitetura óssea cortical e esponjosa, principalmente indivíduos de maior idade e mulheres na pós-menopausa. Ela predispõe ao risco aumentado de fraturas e mortalidade, devido à redução da densidade mineral óssea (DMO) e o consequente aumento da fragilidade do tecido (SOUZA, 2010). A osteoporose possui difícil diagnóstico, por ser em geral uma doença silenciosa, até que ocorra a primeira fratura. Entretanto, a doença também pode envolver dores em função da perda óssea, mas que costumam ser brandas (SOUZA, 2010).

O equilíbrio ósseo é alterado pelo predomínio da formação, por osteoblastos, ou da reabsorção, por osteoclastos, que pode ser determinado por condições como sexo, idade, alterações hormonais da menopausa, uso de glicocorticoides e anticonvulsivantes, hereditariedade, disponibilidade de nutrientes, inflamação sistêmica e nível de atividade física (VIEIRA, 1999; SOUZA, 2010). O estrogênio possui receptores em osteoblastos e osteoclastos, e a depleção de sua produção é um forte determinante para o desenvolvimento da osteoporose. Esse hormônio, cuja produção é mínima após a menopausa devido à insuficiência ovariana, exerce ação antirreabsortiva no osso, por reduzir o número e função de osteoclastos (de VILLIERS, 2015). A redução da DMO devido à deficiência de estrogênio é mediada por diversas vias, que envolvem várias citocinas, sendo as principais delas as que compõem a tríade ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa B (NFkB) (RANKL); o receptor do ativador do NFkB (RANK); e a osteoprotegerina (OPG). Avanços na compreensão dos genes envolvidos na remodelação óssea indicam que a osteoporose e CV compartilham mecanismos patogênicos comuns, como os mediados pela tríade RANK/RANKL/OPG, proteína Gla de matriz, hormônio da paratireoide (PTH) e vitaminas D e K2. (LAMPROPOULOS; PAPAIOANNOU; D'CRUZ, 2012, VASSALLE; MAZZONE, 2016). Esse fato sustenta os estudos que evidenciam a ocorrência simultânea de osteoporose e doenças cardiovasculares associadas à CV (LAMPROPOULOS; PAPAIOANNOU; D'CRUZ, 2012). Desse modo, terapias comuns podem ser aplicadas em ambas as doenças (ZHANG; FENG, 2016; VASSALLE; MAZZONE, 2016).

2.2.3 Terapias nutricionais convencionais

Suplementação de cálcio

Efeitos fracos e inconsistentes sobre o risco de fraturas foram atribuídos à suplementação de cálcio em cerca de 70.000 participantes estudados em uma meta-análise de 26 ensaios clínicos randomizados (BOLLAND et al., 2015). A suplementação de cálcio aumentou a DMO no período de 1 ano, porém foi observado que esses efeitos foram fracos e não progressivos, em uma meta-análise envolvendo 12.000 participantes de 51 ensaios clínicos randomizados (TAI et al., 2015).

A associação entre cálcio dietético e risco cardiovascular é controversa na literatura. Estudos sugerem o consumo de alimentos fontes de cálcio como fator protetor (BOSTICK et al., 1999; REID et al., 2002; REID et al., 2005). No entanto, outros trabalhos advertem

que suplementos de cálcio podem aumentar o risco de infarto do miocárdio. Em uma coorte de 23.980 membros, participantes da *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*, acompanhados por 11 anos, verificou-se que indivíduos que consumiam alimentos fontes de cálcio, como laticínios, apresentaram risco reduzido de infarto do miocárdio (HR= 0,69, IC 95%: 0,50-0,94). No entanto, os usuários de suplementos de cálcio tiveram risco significativamente aumentado de infarto (HR=1,86; IC 95% 1,17-2,96) (LI et al., 2012). Em estudo de revisão de literatura, que avaliou um subgrupo de cinco estudos randomizados, duplo cegos e controlados com placebo, verificou-se que o risco de infarto do miocárdio aumentou 31%, de acidente vascular cerebral de 20% dentre os pacientes que utilizavam suplemento de cálcio, comparados ao grupo placebo (BOLLAND et al., 2010). Em estudo com 388.229 participantes do *National Institutes of Health–AARP Diet and Health Study*, verificou-se que durante os 12 anos de acompanhamento, 51% de homens e 70% das mulheres utilizaram suplemento de cálcio. Neste estudo, houve, apenas entre os homens, maior risco de morte por doença cardiovascular (RR 1000 vs 0 mg de Ca/dia = 1,20; IC 95%, 1,05-1,36) (XIAO et al., 2013).

Suplementação de vitamina D

A vitamina D tem sido considerada na prática clínica, assim como o cálcio, parte importante do tratamento e prevenção da osteoporose. O aumento da vitamina D no soro, indicado por níveis séricos de 25-hidroxivitamina D₃, a partir da qual é formado o metabólito ativo 1,25-dihidroxivitamina D₃, aumenta a absorção intestinal de cálcio e está associada a melhorias na saúde óssea (BISCHOFF-FERRARI et al., 2005; BIKLE, 2012). Além disso, receptores de vitamina D, bem como a enzima responsável pela formação do metabólito ativo, são encontrados em osteoblastos e osteoclastos, o que indica a ação direta da vitamina D sobre essas células. Receptores de vitamina D também estão presentes nas células envolvidas na aterosclerose e parece regular uma vasta gama de processos como crescimento vascular, migração e a diferenciação celular; modulação da resposta imune; expressão de citocinas; e vias inflamatórias e fibróticas (KASSI et al., 2013). A produção local de 1,25-dihidroxivitamina D₃ em osteoblastos demonstrou desempenhar um papel na diferenciação e mineralização dos osteoblastos e na regulação da gênese e atividade dos osteoclastos (GARDINER et al., 2000).

Embora diversas evidências mostrem o importante papel da vitamina D na saúde óssea, ainda há controvérsias na literatura quanto sua função na osteoporose. Uma revisão sistemática de 23 ensaios clínicos randomizados mostrou poucas evidências do benefício da suplementação de vitamina D sobre a DMO. Foram observados pequenos, mas significativos aumentos na DMO no colo femoral, mas não na anca total. Os autores relatam que os efeitos da combinação de cálcio e vitamina D são indistinguíveis dos de cálcio isoladamente, o que sugere a pequena contribuição da vitamina D na maioria dos estudos (CHAPUY et al., 1992). Em estudo de revisão com 45 ensaios clínicos, foi verificado maior risco de hipercalcemia em pessoas que recebem vitamina D, com ou sem cálcio, e que parece improvável a suplementação de vitamina D ser eficaz na prevenção de fraturas (AVENELL et al., 2009). Ressalta-se que os resultados encontrados podem ser diferentes caso haja deficiência de vitamina D e cálcio, quando a suplementação mostrou ser eficiente no aumento da DMO (CHAPUY et al., 1992).

3. HIPÓTESES

A hipótese desse estudo é que a vitamina K2 tem efeito na melhoria do metabolismo ósseo e protege contra a calcificação vascular associada à mobilização de cálcio do osso para os tecidos moles e à suplementação de cálcio nas ratas. Outra hipótese a ser testada é a ação sinérgica da vitamina K2, vitamina D3 e cálcio na saúde óssea dos animais.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da vitamina K2, da vitamina D3 e do cálcio na saúde óssea e vascular de ratas *Wistar* ovariectomizadas.

4.2 Objetivos específicos

- Escrever artigo de revisão sobre o efeito da vitamina K2 no metabolismo ósseo e na saúde vascular;
- Avaliar a ação da suplementação de vitamina K2 isoladamente e em conjunto com a de vitamina D3 e cálcio, no volume trabecular ósseo, conteúdo mineral ósseo e resistência óssea;

- Avaliar a ação da suplementação de vitamina K2 isoladamente e em conjunto com a de vitamina D3 e cálcio no conteúdo de cálcio nos vasos;
- Avaliar o efeito dos suplementos em marcadores sanguíneos associados ao *turnover* ósseo;
- Avaliar o efeito da ovariectomia e dos suplementos no perfil antioxidante do fígado;
- Verificar existência de toxicidade hepática e renal dos tratamentos.
- Realizar todas as análises considerando o tempo de intervenção de 4 ou 8 semanas e comparar os resultados.

5. REFERÊNCIAS

AVENELL, A.; GILLESPIE, W. J.; GILLESPIE, L. D.; O'CONNELL, D. L. Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures associated with involutional and postmenopausal osteoporosis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 20, 2005.

BIKLE, D. D. Vitamin D and bone. **Curr Osteoporos Rep**, v. 10, n. 2, p; 151-159, 2012.

BISCHOFF-FERRARI, H. A.; WILLET, W. C.; WONG, J. B.; GIOVANNUCCI, E.; DIETRICH, T.; DAWSON-HUGHES, B. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. **JAMA**, v. 293, p. 2257–2264, 2005.

BOLLAND, M. J.; AVENELL, A.; BARON, J. A., et al. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. **BMJ**, v. 341, p. c3691, 2010.

BOLLAND, M. J.; LEUNG, W.; TAI, V., et al. Calcium intake and risk of fracture: systematic review. **BMJ**, 2015.

BOSTICK, R. M.; KUSHI, L. H.; WU, Y.; MEYER, K. A.; SELLERS, T. A.; FOLSOM, A. R. Relation of calcium, vitamin D, and dairy food intake to ischemic heart disease mortality among postmenopausal women. **Am J Epidemiol**, v. 149, p. 151-161, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. PORTARIA Nº 224, DE 26 DE MARÇO DE 2014. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose.

CHAPUY, M. C.; ARLOT, M. E.; DUBOEU, F., et al. Vitamin-D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women. **N Engl J Med**, v. 327, p. 1637-1642, 1992.

DE VILLIERS T. J. The role of menopausal hormone therapy in the management of osteoporosis. **Climacteric**, v. 18, p. 19-21, 2015.

DURÁN, J. H. R. Biofísica - Fundamentos e Aplicações - 2ª Ed. São Paulo: Pearson Education, 2011. 408p.

EL ASMAR, M. S., NAOUM, J. J., ARBID, E. J. Vitamin K dependent proteins and the role of vitamin K2 in the modulation of vascular calcification: a review. **Oman Medical Journal**, v. 29, p. 172-177, 2014.

GARDINER, E. M.; BALDOCK, P. A.; THOMAS, G. P., et al. Increased formation and decreased resorption of bone in mice with elevated vitamin D receptor in mature cells of the osteoblastic lineage. **FASEB J**, v. 14, n. 13, p. 1908-1916, 2000.

HAUSCHKA. P. V.; LIAN, J. B.; COLE, D. E.; GUNDBERG, C. M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. **Physiol Rev**, v. 69, p. 990–1047, 1989.

ICHIKAWA, T.; HORIE-INOUE, K.; IKEDA, K.; BLUMBERG, B.; INOUE, S. Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. **J Mol Endocrinol**, v. 39, p. 239–247, 2007.

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

KASSI, E.; ADAMOPOULOS, C.; BASDRA, E. K. PAPAVALASSILOU, A. G. Role of vitamin D in atherosclerosis. **Circulation**, v. 128, p. 2517-2531, 2013.

KOITAYA, N.; EZAKI, J.; NISHIMUTA, M. et al. Effect of low dose vitamin K2 (MK-4) supplementation on bio-indices in postmenopausal Japanese women. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 55, p. 15-21, 2009.

LAMPROPOULOS, C. E.; PAPAIOANNOU, I.; D'CRUZ, D. P. Osteoporosis—a risk factor for cardiovascular disease? **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, p. 587-598, 2012.

LI, K. KAAKS, R.; LINSEISEN, J.; ROHRMANN, S. Associations of dietary calcium intake and calcium supplementation with myocardial infarction and stroke risk and overall cardiovascular mortality in the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study (EPIC-Heidelberg). **Heart**, v. 98, p. 920-925, 2012.

MEGANATHAN, R. Biosynthesis of menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q): a perspective on enzymatic mechanisms. **Vitam Horm**, v. 61, p. 173–218, 2001.

REID, I. R.; HORNE, A.; MASON, B.; AMES, R.; BAVA, U.; GAMBLE, G. D. Effects of calcium supplementation on body weight and blood pressure in normal older women: a randomized controlled trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, p. 3824-3829, 2005.

REID, I. R.; MASON, B.; HORNE, A., et al. Effects of calcium supplementation on serum lipid concentrations in normal older women: a randomized controlled trial. **Am J Med**, v. 112, p. 343-347, 2002.

SCHINKE, T.; MCKEE, M. D.; KARSENTY, G. Extracellular matrix calcification: where is the action? **Nat Genet**, v. 21, p. 150–151, 1999.

SOUZA, M. P. G. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. **Rev Bras Ortop**, p. 45, n. 3, p. 220-229, 2010.

TAI, V.; LEUNG, W.; GREY, A.; REID, I. R.; BOLLAND, M. J. Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, 2015.

URAYAMA, S.; KAWAKAMI, A.; NAKASHIMA, T., et al. Effect of vitamin K2 on osteoblast apoptosis: vitamin K2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblasts

induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine. **J Lab Clin Med**, v. 136, p. 181–193, 2000.

VASSALLE, C.; MAZZONE, A. Bone loss and vascular calcification: A bi-directional interplay? **Vascul Pharmacol**, 2016.

VIEGAS, C. S. B. ; SIMES, D. G. ; LAIZE, V., et al. Gla-rich Protein (GRP), a new Vitamin K-dependent Protein identified from Sturgeon cartilage and highly conserved. **J Biol Chem**, v. 283, p. 36655-36664, 2008.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab** [online], v. 43, p. 415-422, 1999.

XIAO Q.; MURPHY, R. A.; HOUSTON, D. K.; HARRIS, T. B.; CHOW, W.; PARK, Y. Dietary and Supplemental Calcium Intake and Cardiovascular Disease Mortality The National Institutes of Health–AARP Diet and Health Study **Jama Intern Med**, v. 173, p. 639-646, 2013.

ZERBINI, C.; SOUZA, A. C. A. Histofisiologia Óssea. Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica. Curso Oficial de Habilitação em Densitometria, versão 2.2; 2001.

ZHANG, Y.; FENG, B. Systematic review and meta-analysis for the association of bone mineral density and osteoporosis/osteopenia with vascular calcification in women. **Int J Rheum Dis**, 2016.

6. ARTIGO I

EFFECT OF VITAMIN K IN BONE METABOLISM AND VASCULAR CALCIFICATION: A REVIEW OF MECHANISMS OF ACTION AND EVIDENCES



Critical Reviews in Food Science and Nutrition



ISSN: 1040-8398 (Print) 1549-7852 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/bfsn20>

Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: a review of mechanisms of action and evidences

Julia Khéde Dourado Villa, Marisa Alves Nogueira Diaz, Virgínia Ramos Pizziolo & Hércia Stampini Duarte Martino

To cite this article: Julia Khéde Dourado Villa, Marisa Alves Nogueira Diaz, Virgínia Ramos Pizziolo & Hércia Stampini Duarte Martino (2016): Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: a review of mechanisms of action and evidences, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI: [10.1080/10408398.2016.1211616](https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1211616)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1211616>



Accepted author version posted online: 20 Jul 2016.
Published online: 20 Jul 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

ABSTRACT

Osteoporosis is a public health concern associated with an increased risk of bone fractures and vascular calcification. Menaquinone (vitamin K₂) presents unique benefits on these issues, although largely unknown. Vitamin K₂ has shown to stimulate bone formation by promoting osteoblast differentiation and carboxylation of osteocalcin, and increasing alkaline phosphatase, insulin-like growth factor-1, growth differentiation factor-15, and stanniocalcin 2 levels. Furthermore, vitamin K₂ reduces the pro-apoptotic proteins Fas

and Bax in osteoblasts, and decreases osteoclast differentiation by increasing osteoprotegerin and reducing the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand. In blood vessels, vitamin K₂ reduces the formation of hydroxyapatite, through the carboxylation of matrix Gla protein and Gla rich protein, inhibits the apoptosis of vascular smooth muscle cells, by increasing Gas-6, and reduces the transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to osteoblasts. The commonly used dosage of vitamin K₂ in human studies is 45 mg/day and its application can be an interesting strategy in benefitting bone and vascular health, especially to osteoporotic post-menopausal women.

Keywords: Vitamin K₂; osteoporosis; vascular calcification; bone.

6.1 INTRODUCTION

Osteoporosis is a serious public health issue throughout the world, especially for postmenopausal women. It is associated with an increased risk of bone fractures and mortality. Scientific evidences indicate that osteoporotic patients have an increased risk of developing cardiovascular diseases, mainly due to vascular calcification (VC) [1–3]. Calcium deposits in coronary arteries can compromise vasomotor responses, by reducing elasticity, increasing the risk of high blood pressure, aortic stenosis, cardiac hypertrophy, heart attack, and ischemia of the lower limbs [3].

The optimal therapy for common physiological changes in postmenopausal women, with or without osteoporosis, has not been established. Some drugs, such as alendronate and risedronate, and supplements such as calcium and vitamin D, have been used in clinical practice. In this context, vitamin K has been studied. Originally only identified as essential for blood coagulation, vitamin K, especially vitamin K₂, has been associated with unique benefits in regulating bone metabolism and soft tissue calcification. However, the effect of vitamin K₂ is not well established and there are no specific dietary recommendations for this nutrient.

The menaquinone, or vitamin K₂, is essential for the activation of vitamin K-dependent proteins (VKDP), acting as a cofactor for γ -glutamyl carboxylase in the post-translational carboxylation of these proteins, transforming residues of glutamate (Glu) in γ -carboxyglutamate (Gla) [4]. Some VKDP may play a role in bone and vascular metabolism. The most studied are osteocalcin (OC) and matrix Gla protein (MGP). After carboxylation, OC is better secreted by osteoblastic cells and can be deposited in a

mineralized bone matrix to accomplish its physiological role [5]. On the other hand, a higher deposit of OC in calcified aorta was observed, indicating its osteogenic role in vessels [6, 7]. MGP is considered an inhibitor of soft tissue calcification, because it is able to strongly bind and inhibit the growth of calcium crystals [8, 9]. Additionally, vitamin K₂ promotes an increase in the number and activity of osteoblasts [10], modulates target genes of bone mineralization in osteoblasts [11] and decreases osteoclast differentiation [12].

Since vitamin K₂ is only present in low amounts in the diet [13, 14], oral supplementation can be considered an interesting option for improving the vitamin K₂ status, especially in postmenopausal women, a risk group for osteoporosis and vascular complications. The aim of this review was to investigate the effect of vitamin K₂ on bone metabolism and VC, considering the mechanisms involved in these processes.

6.2 METHODOLOGY

The search was conducted in Medline/Pubmed, Latin American and Caribbean Health Sciences Literature (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SciELO) and Science Direct for original articles or reviews to assess the effect of vitamin K₂ on bone and/or cardiovascular health, published in the last ten years (2005-2015). Combinations of the following keywords were used for the search: "vitamin K", "vitamin K₂", "menaquinone", "menatetrenone", "bone", "osteoporosis" and "vascular calcification". A manual search was also conducted in the reference lists of selected articles for relevant studies about the subject. Unpublished dissertations and theses or conference abstracts were not included. Intervention studies performed with humans or animals, *in vitro* studies, observational studies and literature reviews were included. Each article selected to compose this review was critically analyzed.

6.3 RESULTS

The search strategy resulted in the selection of 94 articles (Fig. 1). The inclusion of different types of study allows synthesizing a wide range of information about the mechanisms of action of vitamin K₂. These mechanisms may explain the effects on bone and cardiovascular metabolisms found with the intake of vitamin K₂, for which, despite the biological plausibility, there are no specific dietary recommendations.

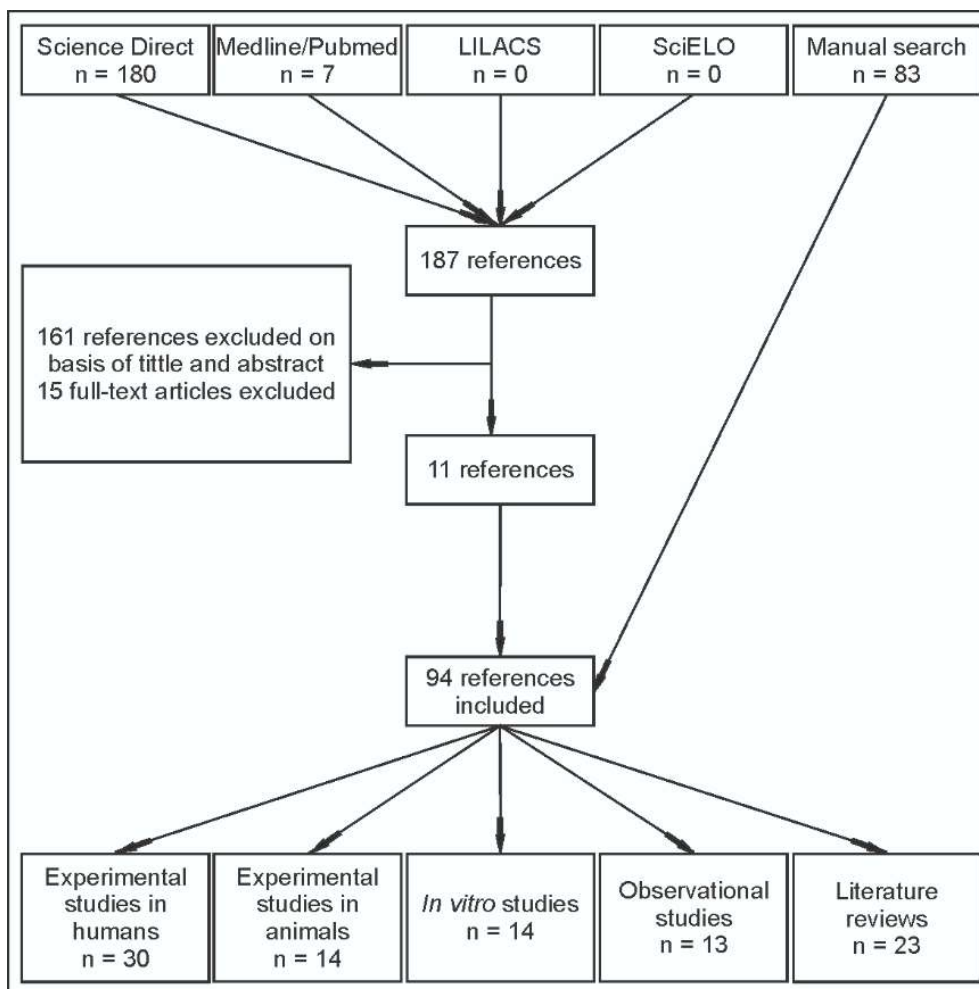


Fig. 1 Search and selection of articles

6.3.1 Vitamin K

Vitamin K is a term used to represent chemically similar liposoluble compounds, which differ in their origin and function [15]. The two main forms of vitamin K are phyloquinone (vitamin K₁) and menaquinone (vitamin K₂). Menadione, present in both forms, is a ring structure whose side chain may contain a phytyl group, producing vitamin K₁, or 1 to 14 repetitions of isoprenoid groups, giving rise to different forms of vitamin K₂ [16].

Vitamin K is recycled in the body in order to maintain sufficient levels for activating VKDP. In this process, vitamin K hydroquinone (KH₂) is oxidized to vitamin K epoxide (KO), which is in turn converted into vitamin K quinone by the enzyme vitamin K epoxiredutase. Vitamin K quinone, which is present in the diet, is then converted to KH₂ by the vitamin K quinone reductase enzyme, closing the cycle. The two enzymes involved in these reactions are dithiol-dependent. Another enzyme, NADPH-

dependent quinone reductase, is also capable of converting vitamin K quinone into KH_2 . Warfarin, a drug commonly used in dialysis patients, inhibits the activity of dithiol-dependent reductase, but not NADPH-dependent reductase [4] (Fig. 2a).

Vitamin K_1 is transported by triglyceride-rich lipoproteins, which are directed primarily from the intestine to the liver and act as a cofactor for carboxylation and activation of coagulation proteins II, VII, IX, X and proteins C, S and Z [17, 18]. Vitamin K_2 , conversely, is carried by both triglyceride-rich lipoproteins and by low-density lipoproteins (LDL) to extrahepatic tissues [18], including arterial walls, which prefer to accumulate and use vitamin K_2 compared to K_1 [16] (Fig. 2a). Thus, vitamin K_2 can exert more influence on the activation of VKDP in bone metabolism and in VC (Fig. 2b).

Menaquinone may be abbreviated as MK-n, where "n" is the number of isoprenoid groups present in the side chain. The most common and most studied dietary supplements of vitamin K_2 are MK-4 and MK-7. In a study with healthy women, MK-7 compared to MK-4 was found to have greater bioavailability, contribute more to the increase of vitamin K in serum, and therefore have greater importance to extrahepatic tissues [19]. In food, MK-4 is found mainly in animal products such as egg yolk, meat, liver, and butter. In fermented foods, particularly in fermented soybean ("natto"), typical in the Japanese diet, cheese, curd and sauerkraut, the long chain menaquinones are found (MK-7 to MK-10), which are synthesized by bacteria [16, 19]. In addition, higher menaquinones (notably MK-10) are also produced by intestinal bacteria [16, 20]. In relation to vitamin K_1 , its main sources are green leafy vegetables such as kale, spinach and lettuce, and brassicas such as brussel sprouts and broccoli.

The dosage commonly used in human studies is 45 mg/day, since it was associated with greater benefit to bone and vascular health in Japan, a pioneer in studies in this area [21–25]. This dose is 500 times higher than the Adequate Intake (AI) of vitamin K (90 $\mu\text{g}/\text{day}$). However the tolerable upper intake level (UL) was not determined and there is no specific recommendation for vitamins K_1 and K_2 [26]. None of the analyzed studies reported risks associated with the supplementation of vitamin K or concerns about coagulation or thromboembolic events. Furthermore, it is speculated that the AI of 90 $\mu\text{g}/\text{day}$ is too low to permit the adequate extrahepatic VKPD carboxylation, since the AI for vitamin K is solely based on the intake of vitamin K_1 and hepatic activation clotting factors [27].

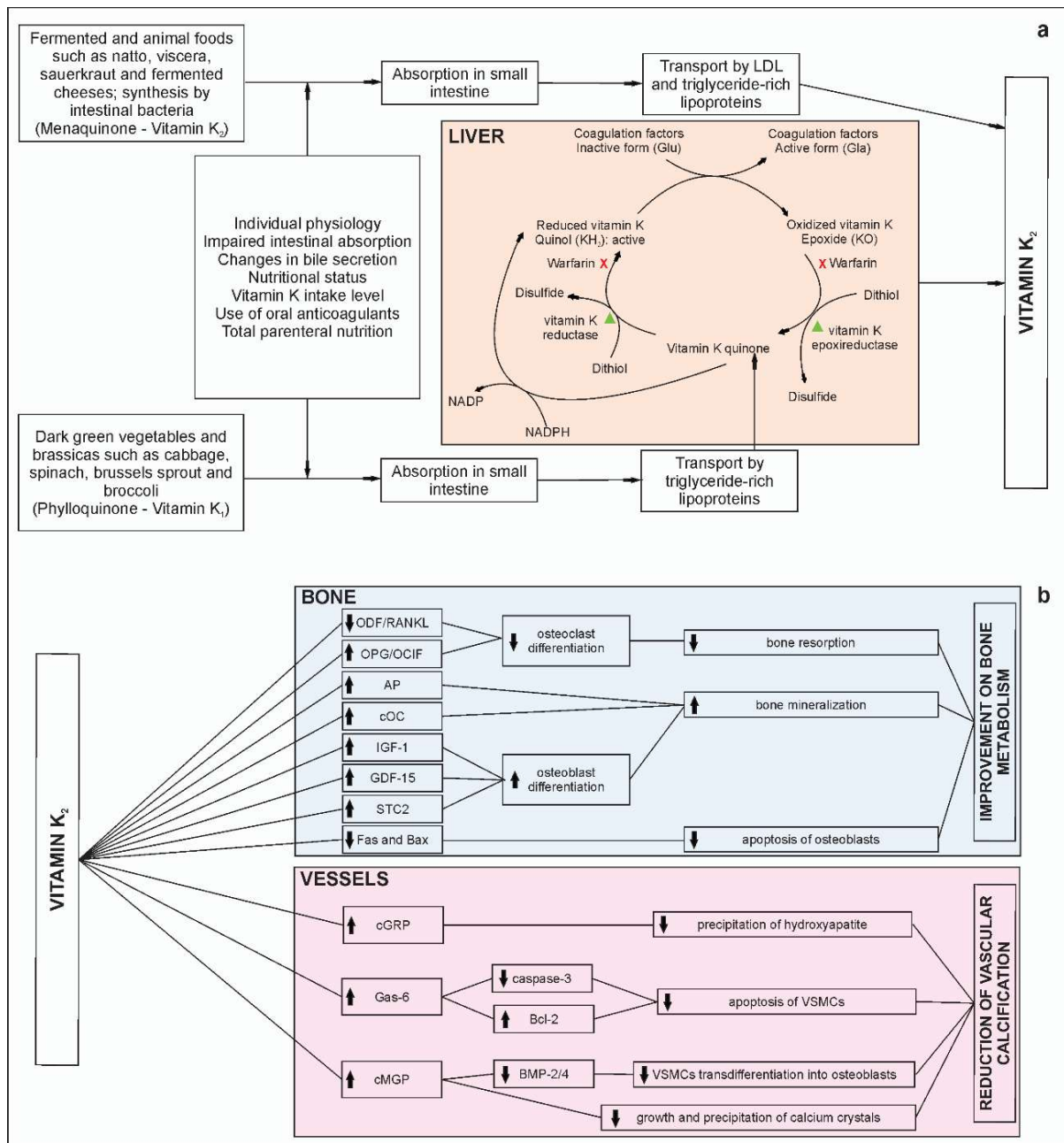


Fig. 2 (a) Vitamin K cycle and potential mechanisms of action in the activation of coagulation factors and in the modulation of bone metabolism and vascular calcification. Vitamin K hydroquinone (KH₂) is oxidized to vitamin K epoxide (KO), which is converted to vitamin K quinone. Then, vitamin K quinone is reconverted to KH₂, closing the cycle. The two enzymes involved in the aforementioned reactions are dependent of dithiol and inhibited by warfarin. The quinone reductase enzyme, NADPH-dependent, is also capable of converting vitamin K quinone in KH₂. Vitamin K₁ is carried by triglyceride-rich lipoproteins to the liver and acts as a cofactor in carboxylation reactions of coagulation factors. Vitamin K₂ is carried by both triglyceride-rich lipoproteins and by low-density lipoproteins (LDL) to extrahepatic tissues. **(b)** Vitamin K₂ actions to improve bone metabolism and prevent vascular calcification. ODF: osteoclast differentiation factor; RANKL: receptor activator of nuclear factor κ B ligand; OPG: osteoprotegerin;

OCIF: osteoclastogenesis inhibitory factor; AP: alkaline phosphatase; cOC: carboxylated osteocalcin; IGF-1: insulin-like growth factor 1; GDF-15: growth differentiation factor-15; STC2: stanniocalcin 2; cGRP: carboxylated Gla rich protein; Gas-6: growth arrest specific gene 6; VSMCs: vascular smooth muscle cells; cMGP: carboxylated matrix Gla protein; BMP: Bone morphogenetic protein.

The effect of a low dose (1.5 mg) of vitamin K₂ (MK-4) was tested in a randomized, double-blind, placebo-controlled study on the bone health of postmenopausal women. After 6 and 12 months, the concentrations of uncarboxylated OC (ucOC) and pentosidine (marker of glycation endproducts) were significantly lower in the group supplemented with K₂ than in the control group. Furthermore, the bone mineral density (BMD) was lower in the control group at 12 months compared to the sixth month, and there was no significant decrease in BMD in the group supplemented with K₂ throughout the study [28].

Metabolically, vitamin K₁ can be converted to K₂ to act on reducing the calcium content of soft tissue, such as the kidney where the higher content of vitamin K₂ compared to that of K₁ indicates that K₂ has specific actions in this function [29, 30]. Furthermore, it was observed that vitamin K₂ has greater efficacy, compared to K₁, in activating VKDP [4, 31], in increasing mineralization, and reducing bone resorption [32, 33]. In human intervention, vitamin K₂ has shown higher effect compared to controls or other compounds traditionally used for improving bone and/or vascular health, as calcium and/or vitamin D₃ supplements, residronate and alendronate [22–25, 28, 34–47] (Tables 1 and 2).

6.3.2 Vitamin K₂ and osteoporosis

6.3.2.1 Mechanisms of action

OC is one of the most abundant matrix proteins found in bones that could affect the growth or maturation of the mineral phase [48, 49]. Its retention in bone is dependent on γ -carboxylation promoted by vitamin K₂ [8, 48]. OC is secreted by mature osteoblasts, odontoblasts and hypertrophied chondrocytes, and its production is increased in response to administering vitamin K₂ [24]. Gla residues present on the carboxylated OC (cOC) may interact with hydroxyapatite crystals in the mineralization process [50]. Besides the importance of Gla residues in bone mineralization, glutamate (Glu) has receptors on all mature bone cells and can affect the bone remodeling. Glu also acts as a neuropeptide and

may be released in a specific site according to local needs, as cells of bone tissue, and may represent a regulator able to locally control the activity of bone cells [51].

Besides acting on the activation of OC, vitamin K₂ also promotes apoptosis of osteoclasts and reduction of their progenitor cells differentiation and bone remodeling [12]. Furthermore, it was found that vitamin K₂ promotes an increase in the number and activity of osteoblasts [10]. The addition of vitamin K₂ in osteoblast cell cultures resulted in dose-dependent reductions of the expression of apoptotic agents Fas and Bax, and reduction of the cytotoxic effects of Fas ligand (FasL), which mainly occurred after treatment with tumor necrosis factor (TNF)- α , a pro-apoptotic indicator [10]. In osteoblasts treated with MK-4, increased expressions of potential promoters of differentiation and proliferation of osteoblasts, growth differentiation factor-15 (GDF-15) and stanniocalcin 2 (STC2), were observed. In this study, these effects were not observed in response to MK-7 or vitamin K₁ [11]. Vitamin K₂ also promoted increase of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in osteoblasts [52], which is associated with increased differentiation of these cells and the bone formation in postmenopausal women [53]. These results indicate that vitamin K₂ has positive effects on osteoblasts and inhibitory effects on osteoclasts, which is beneficial in treating osteoporosis.

In a study with bone marrow cells, which contains both progenitor cells of osteoclasts and osteoblasts, the treatment with MK-4, but not with vitamin K₁, stimulated the activity of alkaline phosphatase (AP) and OC expression, which are markers of early and late osteoblast differentiation, respectively. In this study it was also found that MK-4 inhibited the expression of RANKL and promoted the reduction in the number of osteoclast-like cells in bone marrow [54]. Increased AP activity and reduced expressions of RANKL/ODF were also observed in another study of cells treated with MK-4 in the presence or absence of the glucocorticoid dexamethasone, a vitamin K antagonist (VKA). In this study, an increased expression of OPG in stromal cells was also observed [55].

6.3.2.2 Scientific evidences

Most studies that relate vitamin K₂ and bone metabolism were conducted with women in the postmenopausal period and the most significant results are observed in the presence of osteoporosis. Table 1 shows that supplementation with vitamin K₂ is effective mainly in VKDP activation, verified by the increase in the carboxylated form and reduction in the uncarboxylated form of OC. Inconsistent findings were observed

regarding the role of vitamin K₂ on BMD. However, a meta-analysis found that vitamin K was effective in increasing BMD at the lumbar spine, but not at the femoral neck [56].

A meta-analysis of 19 randomized clinical trials showed that vitamin K₂ was effective in maintaining BMD in postmenopausal women with osteoporosis and no effect was found for those without osteoporosis [57]. In this study, it was found that vitamin K₂ reduced the incidence of fractures and ucOC concentration, and increased cOC, suggesting a positive effect on bone metabolism. OC concentrations were also directly associated with a lower rate of calcification progression of the abdominal aorta and lower mortality in elderly men [58].

Regarding the action of vitamin K₂ on IGF-1, the effect of supplementation of dairy products fortified with calcium, vitamin D₃ and Vitamin K₁ or K₂ (MK-7) was tested for 12 months on bone metabolism variables in postmenopausal women. It was found that the group that received calcium and vitamins D₃ and K₂ had higher levels of IGF-1 in serum compared to the groups that received only calcium and vitamin D₃ or calcium and vitamins D₃ and K₁. In this study, BMD was increased in both groups supplemented with K₁ or K₂ [52].

6.3.2.3 Animal studies

Vitamin K₂ showed, in animal models, to have an effect on bone mass recovery, whose loss was induced by ovariectomy or by the administration of VKAs, such as glucocorticoids, warfarin and phenytoin [32, 59–61]. These drugs indirectly inhibit the VKDP carboxylation by interfering in the regeneration of vitamin K. Bone loss induced by drugs is a serious problem in clinical practice, and its prevention by the use of vitamin K₂ can be an important and safe strategy for health promotion.

The effect of vitamin K₂ in bone formation was demonstrated after administering prednisolone, a VKA glucocorticoid, in rats. At 4 weeks, BMD was significantly reduced with treatment of 100 mg/kg of prednisolone. At 8 weeks, the dosages of 10 or 30 mg/kg of prednisolone resulted in a reduction of BMD. Vitamin K₂ (15 mg/kg) was given for 8 weeks as a dietary supplement and inhibited the decrease of BMD and the decrease in mineralizing surface and bone formation rate, induced by 30 mg/kg of prednisolone [32]. The antiepileptic drug phenytoin also resulted in significant reduction in BMD, mainly when the serum and bone levels of vitamin K₂ decreased due to phenytoin administration. The bone loss was prevented by the combined administration of phenytoin and vitamin

K₂ [60]. In rats with adenine-induced chronic kidney disease (CKD), the treatment with warfarin resulted in significantly greater ucOC and significantly less cOC. In the study, a significant increase in cOC in the high dietary K group was found [61].

6.3.3 Vitamin K₂ and vascular calcification

6.3.3.1 Mechanisms of action

Some studies suggest that the mechanism for VC is similar to skeletal bone formation and involves the calcification of an extracellular matrix mediated by an osteoblast-like phenotype [6, 62]. Moreover, it is reported that the process of VC involves other mechanisms, such as the apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs), responsible for the synthesis of MGP, the most studied VKDP with role in VC [63]. Vitamin K₂ acts as a cofactor in the post-translational γ -carboxylation of MGP, which promotes its biological activity in the vasculature as an inhibitor of VC [64]. The carboxylated MGP (cMGP) is able to strongly bind and inhibit the growth of calcium crystals [58]. This effect was observed in human atherosclerotic plaques, where MGP avoided calcium precipitation [9]. The cMGP is also a potent bone morphogenetic inhibitor protein-2/4 (BMP-2/4), which promotes VSMCs transdifferentiation to osteoblasts in the vessel wall, which precedes VC and can lead to an accelerated progression of atherosclerosis [65, 66]. In an *in vitro* study, MGP containing Gla residue, but not the MGP containing Glu, inhibited the transdifferentiation of VSMCs, emphasizing the importance of vitamin K₂ in the activation of MGP [65].

In addition to cMGP, other forms such as uncarboxylated MGP (ucMGP), phosphorylated MGP (pMGP), and dephosphorylated MGP (dpMGP) can be quantified in serum and plasma, and their use may be dependent on the aim of the study. The total ucMGP may be a more useful VC marker because of its ability to bind to calcium. The dephosphorylated and uncarboxylated MGP (dp-ucMGP) is considered a marker of cardiovascular disease, such as aortic valve disease, aortic stenosis and heart failure, and mortality in patients with cardiovascular risk [67–70]. Vitamin K₂ supplementation has been also associated with the reduction of dp-ucMGP in patients with kidney disease [71] and healthy individuals [17].

The action of vitamin K₂ in VC is also associated with activation of other important VKDPs, such as the growth arrest specific gene 6 (Gas-6) and the Gla Rich Protein (GRP). Gas-6 needs γ -carboxylation to stimulate the anti-apoptotic activity of

Bcl-2 and to inhibit the pro-apoptotic protein caspase-3, protecting the VSMCs of apoptosis induced by the starvation of fibroblasts and calcification [72]. Furthermore, Gas-6 acts as a growth promoter of VSMCs in synergy with other growth factors in VSMCs. These data suggest that Gas-6 prevents atherosclerotic vascular degeneration. GRP is a low studied VKDP, expressed by chondrocytes, chondroblasts, osteoblasts and osteocytes, that has large amounts of Gla residues [73]. GRP has shown to be present in the cartilage and bone of rats, as well as in soft tissues of rats and humans [73]. Accumulation of GRP was observed in locations affected by pathological calcifications, and the affinity between Gla residues and calcium suggests the association between this protein and CV. GRP has the ability to bind to hydroxyapatite and to be highly accumulated at sites of calcifications in human samples derived from patients diagnosed with skin and vascular calcification pathologies [74].

6.3.3.2 Scientific evidences

VC is a major risk factor in the development of cardiovascular events such as atherosclerosis and myocardial infarction and its development is a strong negative indicator of cardiovascular morbidity and mortality [75–78]. Few human studies have investigated the action of vitamin K₂ in VC and mostly evaluated the circulating levels of MGP, which is a less invasive method. Morphological assessments are generally more applicable to animal studies. This fact shows the importance of assessing the different forms of MGP in human studies and the influence of vitamin K₂ on the activity of this protein [27]. Besides being measured in blood and bone, MGP can also be measured in various soft tissues, which was associated with sclerosis of the inner and middle layers in vessels, since their levels were increased in atherosclerosis [27]. Schurgers et al. indicated that ucMGP is a risk factor for VC and that the present RDA values are too low to ensure full carboxylation of MGP [27]. In a study of patients with type 2 diabetes, it was found that dp-ucMGP, but not total MGP and dpMGP, was associated with an increased risk of cardiovascular disease, high blood pressure and heart failure [79].

Postmenopausal women with calcified lesions in the aorta presented lower intakes of vitamin K [80]. In *Rotterdam Study*, the intake of vitamin K₂, but not of vitamin K₁, of 4807 seniors was inversely associated with aortic calcification and mortality from all causes [14]. In a cross-sectional study with 1689 women 49-70 years old, where the consumption of vitamins K₁ and K₂ was analyzed according to a validated food frequency

questionnaire, it was observed that calcification of breast arteries was less common (9% of calcification) in women allocated in the highest quartile of vitamin K₂ intake compared with those in the lowest quartile (13% of calcification). No differences in the prevalence of VC were observed over the K₁ consumption quartiles [13]. In a prospective cohort *European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition* (EPIC), composed of 16,057 women aged 49 to 70, the reduction in VC risk was associated with higher intakes of vitamin K₂, but not of vitamin K₁ [81]. Similar results were observed in a study of 564 women after menopause [34]. In the EPIC study, the strongest protective effect against coronary heart disease was attributed to MK-7, MK-8 and MK-9 [81].

Patients with CKD, especially those on dialysis, commonly present a low nutritional status of vitamin K [82]. This occurs because the occurrence of VC in these patients is high, and consequently, the demand for vitamin K to activate the MGP in the vasculature can be high [83]. Poor nutritional status of vitamin K may also occur due to dietary restrictions of potassium (green leafy vegetables, also rich in vitamin K₁) and phosphate (dairy products, also rich in vitamin K₂) recommended for these patients [84]. The supplementation of vitamin K₂ for CKD patients seems to be interesting, as shown by the reduction of ucOC after 6 weeks of treatment [47]. The effect of GRP, another VKDP, was also observed in a group of patients with CDK. GRP was highly accumulated at sites of medial calcification, either in mildly calcified arteries or in extensive and advanced lesions. In contrast, in normal situations the absence of GRP in the extracellular matrix was observed, which reveals that GRP is definitively associated with the processes of abnormal calcification in the vascular system [74].

Oral antiocoagulants are VKAs drugs commonly used in clinical practice for the management of thromboembolic disorders, which are able to reduce blood coagulation, but also causes bone and cardiovascular complications [84]. In low-risk fibrillation atrial patients, the use of VKAs resulted in higher coronary artery calcium scores, compared to patients without VKA treatment. In this study, the mean coronary calcium scores increased significantly with the duration of VKA use [85]. Warfarin is a VKA, commonly administered to patients on dialysis, which have a high prevalence of VC due to its use [86, 87]. Studies that evaluated the concomitant administration of vitamin K₂ and VKAs indicated the benefits of a high intake of vitamin K₂ in these conditions. In a randomized study was verified the positive effect of daily supplementation of vitamin K₂ in 53 hemodialysis patients with vitamin K deficiency, possibly associated to the use of

warfarin. The supplementation dose was 45, 135 or 360 µg/day for 6 weeks and the dose-dependent effect on γ -carboxylation of MGP was observed [47]. Benefits of vitamin K₂ consumption for hemodialysis patients were also found in an observational study of 387 individuals who had significant prevalence of deficiency (below the 5th percentile of the control group) of MK-7 (35.4%), MK-4 (14.5%) and vitamin K₁ (23.5%). In these individuals, MK-4 deficiency was a predictor of aortic calcification (OR = 2.82, 95% CI 1.14 to 7.01) and MK-7 deficiency was an iliac calcification predictor (OR = 1.64, 95% CI 1.03 to 2.60) [88]. Despite the use of VKAs being considered a causative factor for VC, overwhelming evidence in humans is still needed. One should also consider that the importance of therapy with anticoagulants may exceed its prejudicial effect on VC in some cases [89].

6.3.3.3 Animal studies

In a study with deficient MGP animals, a smaller stature at birth compared with the control group was observed, due to heavy calcification of chondrocytes in growth plates [66]. Death of MGP deficient animals was found 8 weeks after birth due to extensive calcification of large and medium-sized arteries [90]. The administration of warfarin to mice for 6 weeks induced inactivation of MGP and severe VC. However, the replacement of the drug by high doses of vitamin K (K₁ or K₂) induced significant regression of the arterial calcium content by approximately 50% [91]. Another study demonstrated that animals fed with a diet low in vitamin K showed only 2% of cMGP in the vessel wall [92]. Spronk et al. [93] observed the inhibition of warfarin-induced arterial calcification by the concomitant administration of a high dose of vitamin K₂ (30 mg/day of MK-4), which was not observed with administration of vitamin K₁.

In animals with adenine-induced renal disease, undergoing therapeutic doses of warfarin, attenuation of the VC development after treatment with high doses of vitamin K₁ (100mg/kg diet) was observed. Administration of vitamin K₁ resulted in increased renal MK-4 concentration, possibly due to a conversion process of vitamin K₁ to K₂, described previously by other authors [61].

In rats, GRP was found to be highly expressed in epidermis and dermis. In blood vessels, γ -carboxylated GRP was highly accumulated in the walls of blood vessels and capillaries, mainly in VSMC of the tunica intima [74]. The GRP gene is absent in

invertebrate and birds genomes, and was identified in most classes of vertebrates, including mammals, sauropsids, amphibians, bony fish, and jawless fish [94]

6.4 CONCLUSIONS

Convincing data of the biological plausibility of the importance of vitamin K₂ for bone and vascular health have been published, especially in recent years. This revision supports the hypothesis that vitamin K₂ stimulates the carboxylation of important VKDP for bone and vascular metabolism, such as OC, MGP and GRP. Whether carboxylated, these proteins are better secreted by the cells, accumulate more in the tissue, and can accomplish its physiological role. Vitamin K₂ is also associated with the reduction of arterial calcium deposits, by promoting the increase of VSMCs, and the inhibition of transdifferentiation of VSMCs to osteoblasts. Furthermore, vitamin K₂ promotes bone formation by increasing the differentiation and reducing the apoptosis of osteoblast, and by reducing bone resorption by inhibiting osteoclast differentiation. The effect of vitamin K₂ in BMD in humans is controversial and needs to be confirmed in more studies. Benefits of vitamin K₂ consumption were demonstrated especially in the occurrence of bone loss in human or animal studies.

Vitamin K₁ has not shown to have comparable beneficial effects in most studies, although it has been described as increasing the blood and tissue levels of vitamin K₂ due to a conversion process. Most studies were conducted in Japan, where the fermented soybeans *natto*, the most abundant food source of vitamin K₂ known, is part of the typical diet. In Japan, therapeutic doses of this vitamin K₂ are used as a supplement to treat osteoporosis and VC. Considering that most studies were conducted in Japan and have relatively small sample size, we highlight the need of results using larger population samples, mainly from other geographic areas. Faced with literature data, the consumption of natural sources of vitamin K₂ and the oral supplementation, especially in the presence of osteoporosis and/or VC, can be considered as an interesting option for maintaining good nutritional status in favor of bone and vascular health promotion.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Table 1 Effect of menaquinone (vitamin K₂) supplementation on bone metabolism in human studies.

Authors	No. patients (K ₂ ; control)	Study population; duration	Intervention	Difference in % BMD (K ₂ vs. control)	Difference in No. Fractures (K ₂ vs. control)	Difference in % change of biological measurements (K ₂ vs. control)
Iwamoto et al. [22]	n=19; n=17	Healthy postmenopausal women; 1 year	45 mg/day menaquinone	+ 3.1 (lumbar spine; p<0.05)	NA	NA
Ishida et al. [23]	n=66; n=66	Postmenopausal women, aged 50-75 years; 2 years	45 mg/day menaquinone	+ 1.4 (radius; p=0.03)	-8 (RR=0.44 (95% CI 0.20 to 0.99)	+ 20% in OC (p<0.05)
Shiraki et al. [24]	n=120; n=121	Osteoporotic women; 2 years	45 mg/day menaquinone	+ 3.2 (lumbar vertebrae; p=0.001)	-21 (RR= 0.43; p=0.0273)	+ 36.3% in OC (p=0.0081); - 46.6% ucOC (p<0.0001); no significant difference in urinary DPD
Dalmeijer et al. [37]	n=18; n=20	Healthy men and healthy postmenopausal women, aged 40-65 years; 12 weeks	360 µg/day menaquinone	NA	NA	- 74.5% in ucOC/cOC ratio (p<0.001)
Koitaya et al. [44]	n=24; n=24	Postmenopausal women, aged 50-65 years; 1 year	1.5 mg/day menaquinone	No significant differences were observed	NA	- 30.5% in ucOC (p<0.001), + 21% in cOC (p=0.004); - 17.3% in pentosidine (p=0.02); no significant differences in BAP and DPD/creatinine
Koitaya et al. [28]	n=20; n=20	Postmenopausal women, aged 53-65 years; 4 weeks	1.5 mg/day menaquinone	NA	NA	- 28,5% in ucOC (p<0.05); + 16.8% in cOC at 2 week (p<0.05)

Iwamoto et al. [41]	n=22; n=20	Postmenopausal women, aged 55-81 years; 2 years	45 mg/day menaquinone	+ 1.69 (lumbar spine; p<0.001)	NA	NA
Inoue et al. [40]	n=2,016; n=1,999	Postmenopausal women, aged 50 years or more; 3 years	45 mg/day menaquinone + 3 g/day calcium	NA	- 38.7% in incidence of new vertebral fractures (p=0.029)	NA
Westenfeld et al. [47]	n=50; n= 50	Long-term hemodialysis patients, men and women, aged 18 years or more; 6 weeks	360 µg/day menaquinone	NA	NA	- 34.4% in ucOC (p<0.05); no significant difference in AP
Kurnatowska et al. [45]	n=28; n=12	CKD patients, men and women, aged 18-70 years; 270 days	90 µg/day menaquinone + 10 µg vitamin day D ₃	NA	NA	No significant differences were observed
Binkley et al. [35]	n=126; n=129	Postmenopausal women without osteoporosis; 1 year	45 mg/day menaquinone	No significant differences were observed	NA	- 60.7% in ucOC (p<0.0001); - 5.65% in OC (p=0.005); no significant differences in BAP and NTX levels.
Emaus et al. [38]	n=167; n=167	Women, 1-5 years after menopause, aged 50-60 years; 1 year	360 µg/day menaquinone (<i>natto</i> capsules)	No significant differences were observed	NA	+ 7.69% in BAP (p=0.05); + 28.4% in cOC (p<0.001); - 40.6% in ucOC (p<0.001)
Kasukawa et al. [43]	n=26; n=29	Postmenopausal osteoporotic women, aged 60 years or more; 1 year	45 mg/day menaquinone + 17.5 mg/week residronate	No significant differences were observed	NA	+ 17.9% in OC (p<0.05); - 25.8% in ucOC/OC (p<0.001); no significant differences in NTx, BAP and ucOC.
Hirao et al. [39]	n= 21; n=23	Postmenopausal women; 1 year	45 mg/day menaquinone + 5 mg/day alendronate	+ 3.9 (femoral neck; p=0.03)	NA	- 22% in DPD (p=0.032); - 36% ucOC (p=0.014); - 43% in ucOC/OC (p=0.007)
Shiraki et al. [46]	n=56; n=53	Postmenopausal women; 6 months	45 mg/day menaquinone	NA	NA	+ 23.5% in OC (p=0.006); + 33% in cOC (p=0.001); + 26.5% in urinary NTx (p=0.019); - 57.1% in ucOC (p=0.002)

Je et al. [42]	n=18; n=27	Postmenopausal women, aged 60 years or more; 6 months	45 mg/day menaquinone + 400 UI/day vitamin D ₃ + 630 mg/day calcium	+ 2.4 (lumbar spine; p=0.049)	NA	- 49.5% in ucOC (p=0.008); no significant differences in OC and BAP
----------------	------------	---	--	-------------------------------	----	---

BMD: bone mineral density; OC: osteocalcin; ucOC: uncarboxylated OC; cOC: carboxylated OC; DPD: deoxypyridinoline; CKD: chronic kidney disease; OPG: osteoprotegerin; AP: alkaline phosphatase; BAP: bone specific alkaline phosphatase; NTx: N-telopeptide of type 1 collagen; NA: not applicable

Table 2 Effect of menaquinone (vitamin K₂) supplementation on vascular calcification in human studies

Authors	No. patients (K ₂ ; control)	Study population; duration	Intervention	Difference in % change of biological measurements (K ₂ vs. control)
Dalmeijer et al. [37]	n=18; n=20	Healthy men and healthy postmenopausal women, aged 40-65 years; 12 weeks	360 µg/day menaquinone	- 46.2% in dp-ucMGP (p<0.001); no significant differences in dp-cMGP and ucMGP
Westenfeld et al. [47]	n=50; n= 50	Long-term hemodialysis patients, men and women, aged 18 years or more; 6 weeks	360 µg/day menaquinone	- 41.7% in PIVKA-II (p<0.01); no significant difference in fetuin-A.
Caluwé et al. [36]	n=53; n=59	Long-term hemodialysis patients, men and women, aged 18 years or more; 8 weeks	1080 µg menaquinone, 3x/week	- 29% dp-ucMGP (p<0.001)
Kurnatowska et al. [45]	n=28; n=12	CKD patients, men and women, aged 18-70 years; 270 days	90 µg/day menaquinone + 10 µg vitamin D ₃ /day	- 57.1% in carotid intima-media thickness (p<0.003); - 14.1% in dp-ucMGP (p=0.05); no significant difference in coronary artery calcification score.

MGP: matrix Gla protein; cMGP: carboxylated MGP; ucMGP: uncarboxylated MGP; dp-ucMGP: desphosphorylated uncarboxylated MGP; PIVKA-II: protein induced by vitamin K absence; CKD: chronic kidney disease

6.5 REFERENCES

1. Tankó LB, Christiansen C, Cox DA, et al. (2005) Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Min Res* 20:1912–1920. doi: 10.1359/JBMR.050711
2. Wong SYS, Kwok T, Woo J et al. (2005) Bone mineral density and the risk of peripheral arterial disease in men and women : results from Mr. and Ms Os , Hong Kong. *Osteoporos Int* 16:1933–1938. doi: 10.1007/s00198-005-1968-3
3. Lampropoulos CE, Papaioannou I, D’Cruz DP (2012) Osteoporosis--a risk factor for cardiovascular disease? *Nat Rev Rheumatol* 8:587–598. doi: 10.1038/nrrheum.2012.120
4. Gallieni M, Fusaro M (2014) Vitamin K and cardiovascular calcification in CKD: is patient supplementation on the horizon? *Kidney Int* 86:232–234. doi: 10.1038/ki.2014.24
5. Razzaque MS (2011) Osteocalcin: a pivotal mediator or an innocent bystander in energy metabolism? *Nephrol Dial Transpl* 26:42–45. doi: 10.1093/ndt/gfq721
6. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, et al. (2003) Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation* 107:2181–2185. doi: 10.1161/01.CIR.0000070591.21548.69
7. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, et al. (2001) Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification. Upregulation of *Cbfa1* and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89:1147–1154. doi: 10.1161/hh2401.101070
8. Hauschka P V, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69:990–1047.
9. Spronk HM, Soute B a, Schurgers LJ, et al. (2001) Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochem Biophys Res Commun* 289:485–490. doi: 10.1006/bbrc.2001.5996
10. Urayama S, Kawakami A, Nakashima T, et al. (2000) Effect of vitamin K2 on osteoblast apoptosis: vitamin K2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblasts induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine. *J Lab Clin Med* 136:181–193. doi: 10.1067/mlc.2000.108754
11. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, et al. (2007) Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 39:239–247. doi: 10.1677/JME-07-0048

12. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y (2006) Menatetrenone (vitamin K2) and bone quality in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nutr Rev* 64:509–517. doi: 10.1301/nr.2006.dec.509
13. Maas AHEM, van der Schouw YT, Beijerinck D, et al. (2007) Vitamin K intake and calcifications in breast arteries. *Maturitas* 56:273–279. doi: 10.1016/j.maturitas.2006.09.001
14. Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, et al. (2004) Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease : The Rotterdam Study 1. *J Nutr* 134:3100–3105.
15. Hamidi MS, Gajic-Veljanoski O, Cheung AM (2013) Vitamin K and bone health. *J Clin Densitom* 16:409–413. doi: 10.1016/j.jocd.2013.08.017
16. Schurgers LJ, Vermeer C (2000) Determination of phylloquinone and menaquinones in food. Effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations. *Haemostasis* 30:298–307. doi: 10.1159/000054147
17. Cranenburg ECM, Schurgers LJ, Vermeer C (2007) Vitamin K: The coagulation vitamin that became omnipotent. *Thromb Haemost* 98:120–125. doi: 10.1160/TH07-04-0266
18. Schurgers LJ, Vermeer C (2002) Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* 1570:27–32. doi: 10.1016/S0304-4165(02)00147-2
19. Sato T, Schurgers LJ, Uenishi K (2012) Comparison of menaquinone-4 and menaquinone-7 bioavailability in healthy women. *Nutr J* 11:93. doi: 10.1186/1475-2891-11-93
20. Shearer MJ (1996) Chemistry , Nutritional Sources, Tissue Distribution and Metabolism of Vitamin K with Special Reference to Bone Health. *J Nutr* 126 (4 Sup):1181–1186.
21. Cockayne S, Adamson J, Lanham-New S, et al. (2006) Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 166:1256–1261. doi: 10.1001/archinte.166.12.1256
22. Iwamoto I, Kosha S, Noguchi S, et al. (1999) A longitudinal study of the effect of vitamin K2 on bone mineral density in postmenopausal women a comparative study with vitamin D3 and estrogen–progestin therapy. *Maturitas* 31:161–164. doi: 10.1016/S0378-5122(98)00114-5

23. Ishida Y, Kawai S (2004) Comparative efficacy of hormone replacement therapy, etidronate, calcitonin, alfacalcidol, and vitamin K in postmenopausal women with osteoporosis: The Yamaguchi Osteoporosis Prevention Study. *Am J Med* 117:549–555. doi: 10.1016/j.amjmed.2004.05.019
24. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M (2000) Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 15:515–521. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.3.515
25. Ozuru R, Sugimoto T, Yamaguchi T, et al. (2002) Time dependent effects of vitamin K2 (menatetrenone) on bone metabolism in postmenopausal women. *Endocr J* 49:363–370. doi: 10.1507/endocrj.49.363
26. Trumbo P, Yates A a., Schlicker S, Poos M (2001) Dietary reference intakes: Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. *J Am Diet Assoc* 101:294–301. doi: 10.1016/S0002-8223(01)00078-5
27. Schurgers LJ, Dissel PE, Spronk HM, et al. (2001) Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. *Z Kardiol* 90 Suppl 3:57–63.
28. Koitaya N, Ezaki J, Nishimuta M, et al. (2009) Effect of low dose vitamin K2 (MK-4) supplementation on bio-indices in postmenopausal Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 55:15–21. doi: 10.3177/jnsv.55.15
29. Rajabi A Al, Booth SL, Peterson JW, et al. (2012) Deuterium-Labeled phylloquinone has tissue-specific conversion to menaquinone-4 among Fischer 344 male rats. *J Nutr* 142:841–845. doi: 10.3945/jn.111.155804
30. Kaesler N, Magdeleyns E, Herfs M, et al. (2014) Impaired vitamin K recycling in uremia is rescued by vitamin K supplementation. *Kidney Int* 86:286–293. doi: 10.1038/ki.2013.530
31. Shea MK, Holden RM (2012) Vitamin K status and vascular calcification: evidence from observational and clinical studies. *Adv Nutr* 3:158–165. doi: 10.3945/an.111.001644
32. Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y (2002) Vitamin K2 (menatetrenone) inhibits bone loss induced by prednisolone partly through enhancement of bone formation in rats. *Bone* 31:575–581. doi: 10.1016/S8756-3282(02)00874-8
33. Kameda T, Miyazawa K, Mori Y, et al. (1996) Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 220:515–519. doi: 10.1006/bbrc.1996.0436
34. Beulens JWJ, Bots ML, Atsma F, et al. (2009) High dietary menaquinone intake

is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis* 203:489–493. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.010

35. Binkley N, Harke J, Krueger D, et al. (2009) Vitamin K treatment reduces undercarboxylated osteocalcin but does not alter bone turnover, density, or geometry in healthy postmenopausal North American women. *J Bone Miner Res* 24:983–991. doi: 10.1359/JBMR.081254
36. Caluwé R, Vandecasteele S, Van Vlem B, et al. (2014) Vitamin K2 supplementation in haemodialysis patients: a randomized dose-finding study. *Nephrol Dial Transplant* 29:1385–1390. doi: 10.1093/ndt/gft464
37. Dalmeijer GW, van der Schouw YT, Magdeleyns E, et al. (2012) The effect of menaquinone-7 supplementation on circulating species of matrix Gla protein. *Atherosclerosis* 225:397–402. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.019
38. Emaus N, Gjesdal CG, Almås B, et al. (2010) Vitamin K2 supplementation does not influence bone loss in early menopausal women: a randomised double-blind placebo-controlled trial. *Osteoporos Int* 21:1731–1740. doi: 10.1007/s00198-009-1126-4
39. Hirao M, Hashimoto J, Ando W, et al. (2008) Response of serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to alendronate monotherapy and combined therapy with vitamin K2 in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 26:260–264. doi: 10.1007/s00774-007-0823-3
40. Inoue T, Fujita T, Kishimoto H, et al. (2009) Randomized controlled study on the prevention of osteoporotic fractures (OF study): a phase IV clinical study of 15-mg menatetrenone capsules. *J Bone Miner Metab* 27:66–75. doi: 10.1007/s00774-008-0008-8
41. Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S (2000) Effect of combined administration of vitamin D 3 and vitamin K 2 on bone mineral density of the lumbar spine in postmenopausal women with osteoporosis. *J Orthop Sci* 5:546–551. doi: 10.1007/s007760070003
42. Je SH, Joo N-S, Choi B, et al. (2011) Vitamin K supplement along with vitamin D and calcium reduced serum concentration of undercarboxylated osteocalcin while increasing bone mineral density in Korean postmenopausal women over sixty-years-old. *J Korean Med Sci* 26:1093–1098. doi: 10.3346/jkms.2011.26.8.1093
43. Kasukawa Y, Miyakoshi N, Ebina T, et al. (2014) Effects of risedronate alone or combined with vitamin K2 on serum undercarboxylated osteocalcin and osteocalcin levels in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 32:290–297. doi: 10.1007/s00774-013-0490-5

44. Koitaya N, Sekiguchi M, Tousen Y, et al. (2014) Low-dose vitamin K2 (MK-4) supplementation for 12 months improves bone metabolism and prevents forearm bone loss in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Metab* 32:142–150. doi: 10.1007/s00774-013-0472-7
45. Kurnatowska I, Grzelak P, Masajtis-Zagajewska A, et al. (2015) Effect of vitamin K2 on progression of atherosclerosis and vascular calcification in non-dialyzed patients with chronic kidney disease stage 3-5. *Pol Arch Med Wewn* 125:631–640.
46. Shiraki M, Itabashi A (2009) Short-term menatetrenone therapy increases gamma-carboxylation of osteocalcin with a moderate increase of bone turnover in postmenopausal osteoporosis: A randomized prospective study. *J Bone Miner Metab* 27:333–340. doi: 10.1007/s00774-008-0034-6
47. Westenfeld R, Krueger T, Schlieper G, et al. (2012) Effect of vitamin K2 supplementation on functional vitamin K deficiency in hemodialysis patients: a randomized trial. *Am J Kidney Dis* 59:186–195. doi: 10.1053/j.ajkd.2011.10.041
48. Gundberg CM, Lian JB, Booth SL (2012) Vitamin K-Dependent Carboxylation of Osteocalcin : Friend or Foe ? 1 , 2. *Adv Nutr* 3:149–157. doi: 10.3945/an.112.001834
49. Glowacki J, Lian JB (1987) Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell Differ* 21:247–254.
50. Owen T a, Aronow M, Shalhoub V, et al. (1990) Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143:420–430. doi: 10.1002/jcp.1041430304
51. Chenu C, Serre CM, Raynal C, Delmas PD (1998) Glutamate Receptors Are Expressed by Bone Cells and Are Involved in Bone Resorption. *Bone* 22:295–299.
52. Kanellakis S, Moschonis G, Tenta R, et al. (2012) Changes in Parameters of Bone Metabolism in Postmenopausal Women Following a 12-Month Intervention Period Using Dairy Products Enriched with Calcium, Vitamin D, and Phylloquinone (Vitamin K1) or Menaquinone-7 (Vitamin K2): The Postmenopausal Health Study . *Calcif Tissue Int* 90:251–262. doi: 10.1007/s00223-012-9571-z
53. Ghiron LJ, Thompson JL, Holloway L, et al. (1995) Effects of recombinant insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone turnover in elderly women. *J Bone Min Res* 10:1844–1852.

54. Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, Fujita T (2000) Vitamin K(2) inhibits adipogenesis, osteoclastogenesis, and ODF/RANK ligand expression in murine bone marrow cell cultures. *Bone* 27:769–776. doi: 10.1016/S8756-3282(00)00396-3
55. Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, et al. (2003) Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J Endocrinol* 176:339–348. doi: 10.1677/joe.0.1760339
56. Fang Y, Hu C, Tao X, et al. (2012) Effect of vitamin K on bone mineral density: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Miner Metab* 30:60–68. doi: 10.1007/s00774-011-0287-3
57. Huang Z-B, Wan S-L, Lu Y-J, et al. (2014) Does vitamin K2 play a role in the prevention and treatment of osteoporosis for postmenopausal women: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoporos Int* 26:1175–1186. doi: 10.1007/s00198-014-2989-6
58. Confavreux CB, Szulc P, Casey R, et al. (2013) Higher serum osteocalcin is associated with lower abdominal aortic calcification progression and longer 10-year survival in elderly men of the MINOS cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 98:1084–1092. doi: 10.1210/jc.2012-3426
59. Iwamoto J, Matsumoto H, Takeda T, et al. (2008) Effects of vitamin K(2) and risedronate on bone formation and resorption, osteocyte lacunar system, and porosity in the cortical bone of glucocorticoid-treated rats. *Calcif Tissue Int* 83:121–128. doi: 10.1007/s00223-008-9146-1
60. Onodera K, Takahashi A, Wakabayashi H, et al. (2003) Effects of menatetrenone on the bone and serum levels of vitamin K2 (menaquinone derivatives) in osteopenia induced by phenytoin in growing rats. *Nutrition* 19:446–450. doi: 10.1016/S0899-9007(02)00962-0
61. McCabe KM, Booth SL, Fu X, et al. (2013) Dietary vitamin K and therapeutic warfarin alter the susceptibility to vascular calcification in experimental chronic kidney disease. *Kidney Int* 83:835–844. doi: 10.1038/ki.2012.477
62. Duer MJ, Friscic T, Proudfoot D, et al. (2008) Mineral Surface in Calcified Plaque Is Like That of Bone Further Evidence for Regulated Mineralization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2030–2034. doi: 10.1161/atvbaha.108.172387
63. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, et al. (2000) Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro: Evidence for Initiation of Vascular Calcification by Apoptotic Bodies. *Circ Res* 87:1055–1062. doi: 10.1161/01.RES.87.11.1055
64. Schinke T, Mckee MD, Karsenty G (1999) Extracellular matrix calcification : where is the action ? *Nat Genet* 21:150–151. doi: 10.1038/5928

65. Wallin R, Schurgers L, Wajih N (2008) Effects of the blood coagulation vitamin K as an inhibitor of arterial calcification. *Thromb Res* 122:411–417. doi: 10.1016/j.thromres.2007.12.005
66. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, et al. (2010) Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 107:485–494. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.219071
67. Mayer O, Seidlerová J, Bruthans J, et al. (2014) Desphospho-uncarboxylated matrix Gla-protein is associated with mortality risk in patients with chronic stable vascular disease. *Atherosclerosis* 235:162–168. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.027
68. Schurgers LJ, Cranenburg ECM, Vermeer C (2008) Matrix Gla-protein: The calcification inhibitor in need of vitamin K. *Thromb Haemost* 100:593–603. doi: 10.1160/TH08-02-0087
69. Theuwissen E, Smit E, Vermeer C (2012) The Role of Vitamin K in Soft-Tissue Calcification. *Adv Nutr* 3:166–173. doi: 10.3945/an.111.001628.166
70. Heuvel EGHM van den, van Schoor NM, Lips P, et al. (2014) Circulating uncarboxylated matrix Gla protein, a marker of vitamin K status, as a risk factor of cardiovascular disease. *Maturitas* 77:137–141. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.10.008
71. Schlieper G, Westenfeld R, Kruger T, et al. (2011) Circulating Nonphosphorylated Carboxylated Matrix Gla Protein Predicts Survival in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 22:387–395. doi: 10.1681/ASN.2010040339
72. Son B-K (2006) Statins Protect Human Aortic Smooth Muscle Cells From Inorganic Phosphate-Induced Calcification by Restoring Gas6-Axl Survival Pathway. *Circ Res* 98:1024–1031. doi: 10.1161/01.RES.0000218859.90970.8d
73. Viegas CSB, Simes DC, Laize V, et al. (2008) Gla-rich Protein (GRP), a new Vitamin K-dependent Protein identified from Sturgeon cartilage and highly conserved. *J Biol Chem* 283:36655–36664. doi: 10.1074/jbc.M802761200
74. Viegas CSB, Cavaco S, Neves PL, et al. (2009) Gla-Rich Protein Is a Novel Vitamin K-Dependent Protein Present in Serum That Accumulates at Sites of Pathological Calcifications. *Am J Pathol* 175:2288–2298. doi: 10.2353/ajpath.2009.090474
75. Iribarren C, Sidney S, Sternfeld B, Browner WS (2000) Calcification of the aortic arch: risk factors and association with coronary heart disease, stroke, and peripheral vascular disease. *JAMA* 283:2810–2815.

76. Roijers RB, Debernardi N, Cleutjens JPM, et al. (2011) Microcalcifications in Early Intimal Lesions of Atherosclerotic Human Coronary Arteries. *Am J Pathol* 178:2879–2887. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.004>
77. Abedin M, Tintut Y, Demer LL (2004) Vascular Calcifications: Mechanisms and Clinical Ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1161–1170. doi: 10.1161/01.ATV.0000133194.94939.42
78. Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick L a, et al. (2003) Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11201–1126. doi: 10.1073/pnas.1932554100
79. Dalmeijer GW, Van Der Schouw YT, Magdeleyns EJ, et al. (2013) Matrix gla protein species and risk of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 36:3766–3771. doi: 10.2337/dc13-0065
80. Jie KS, Bots ML, Vermeer C, et al. (1995) Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Atherosclerosis* 116:117–123.
81. Gast GCM, de Roos NM, Sluijs I, et al. (2009) A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19:504–510. doi: 10.1016/j.numecd.2008.10.004
82. Holden RM, Morton a R, Garland JS, et al. (2010) Vitamins K and D status in stages 3-5 chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:590–597. doi: 10.2215/CJN.06420909
83. Schurgers LJ, Barreto D V., Barreto FC, et al. (2010) The Circulating Inactive Form of Matrix Gla Protein Is a Surrogate Marker for Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: A Preliminary Report. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:568–575. doi: 10.2215/CJN.07081009
84. Chatrou MLL, Winckers K, Hackeng TM, et al. (2012) Vascular calcification: The price to pay for anticoagulation therapy with vitamin K-antagonists. *Blood Rev* 26:155–166. doi: 10.1016/j.blre.2012.03.002
85. Weijts B, Blaauw Y, Rennenberg RJMW, et al. (2011) Patients using vitamin K antagonists show increased levels of coronary calcification: an observational study in low-risk atrial fibrillation patients. *Eur Hear J* 32:2555–2562. doi: 10.1093/eurheartj/ehr226
86. Schurgers LJ, Shearer MJ, Hamulyák K, et al. (2004) Effect of vitamin K intake on the stability of oral anticoagulant treatment: dose-response relationships in healthy subjects. *Blood* 104:2682–2689. doi: 10.1182/blood-2004-04-1525
87. Koos R, Krueger T, Westenfeld R, et al. (2009) Relation of circulating Matrix

Gla-Protein and anticoagulation status in patients with aortic valve calcification. *Thromb Haemost* 101:706–713. doi: 10.1160/TH08-09-0611

88. Fusaro M, Noale M, Viola V, et al. (2012) Vitamin K, vertebral fractures, vascular calcifications, and mortality: Vitamin K Italian (VIKI) dialysis study. *J Bone Miner Res* 27:2271–2278. doi: 10.1002/jbmr.1677
89. Brandenburg VM, Schurgers LJ, Kaesler N, et al. (2015) Prevention of vasculopathy by vitamin K supplementation: Can we turn fiction into fact? *Atherosclerosis* 240:10–16. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.040
90. Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 78–81.
91. Schurgers LJ, Spronk HMH, Soute BAM, et al. (2007) Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood* 109:2823–2831. doi: 10.1182/blood-2006-07-035345
92. Price P, Faus S, Williamson M (1998) Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1400–1407. doi: 10.1161/01.ATV.18.9.1400
93. Spronk HMH, Soute BAM, Schurgers LJ, et al. (2003) Tissue-Specific Utilization of Menaquinone-4 Results in the Prevention of Arterial Calcification in Warfarin-Treated Rats. *J Vasc Res* 40:531–537. doi: 10.1159/000075344
94. Cancela ML, Conceição N, Laizé V (2012) Gla-Rich Protein , a new player in tissue calcification? *Adv Nutr* 3:174–181. doi: 10.3945/an.111.001685

7. ARTIGO II

SUPLEMENTO DE VITAMINA K2 REDUZ E O DE CÁLCIO AUMENTA A PERDA ÓSSEA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

RESUMO

Na osteoporose, a composição mineral do osso e a microarquitetura óssea estão comprometidas. Vista a limitação dos tratamentos da osteoporose em repor a massa óssea perdida, a prevenção é uma importante demanda na prática clínica. Nesse estudo, investigamos o papel da vitamina K2, administrada isolada ou concomitantemente aos suplementos de cálcio e vitamina D3, na osteoporose induzida por ovariectomia (ovx) em ratas. Após 6 semanas da ovx, os animais foram divididos em grupos: (1) controle-sham (falsa ovariectomia, com incisão abdominal sem retirada dos ovários) não tratado; (2) controle-ovx não tratado; (3) ovx + cálcio; (4) ovx + K2 (5) ovx + cálcio + K2 (6) ovx + cálcio + D3 (7) ovx + cálcio + K2 + D3. Na quarta semana de tratamento, os animais do grupo 6, suplementados até então com cálcio e vitamina D3, passaram a receber, até a oitava semana, cálcio e vitamina K2, afim de avaliar o efeito da troca de tratamento. Os demais grupos permaneceram com o mesmo tratamento. Metade dos animais de cada grupo foram eutanasiados com quatro semanas e a outra metade com oito semanas, para avaliar o efeito do tempo de intervenção nos resultados analisados. Foi analisado o conteúdo mineral ósseo de cálcio, magnésio, fósforo e potássio. No soro foram determinados teores de cálcio, magnésio e fosfatase alcalina. O volume trabecular e a microarquitetura óssea foram avaliadas por análises de histologia, microtomografia e radiografia. O teste de resistência óssea foi realizado para avaliar a força necessária para causar fratura. Animais suplementados com vitamina K2 apresentaram cálcio sérico semelhante ao dos animais do grupo sham e ovx + cálcio. A vitamina K2 protegeu da perda de volume ósseo trabecular nas ratas com perda óssea induzida por ovx e os suplementos de cálcio e/ou vitamina D3 apresentaram efeitos inconsistentes sobre a massa óssea. Não houve diferença quanto a fosfatase alcalina sérica e a resistência óssea entre os tratamentos. Os resultados da histologia, microtomografia e radiografia tiveram pontos em comum, sendo a microtomografia capaz de detectar diferenças entre os grupos de forma mais minuciosa. A massa óssea dos animais osteoporóticos suplementados com vitamina K2 foi semelhante à dos animais não-osteoporóticos e superior à dos grupos que receberam cálcio. Além disso, de forma inédita observamos que a mudança de tratamento de cálcio+D3 para cálcio+K2 reverteu, ao final da oitava semana, a perda óssea observada na quarta semana. Diferente dos animais suplementados apenas com cálcio, o tratamento

com vitamina K2, combinada ou não com cálcio e/ou vitamina D3, promoveu conteúdo de cálcio ósseo semelhante ao grupo não-osteoporótico. Concluímos que a vitamina K2 promove benefícios na massa óssea de ratas com osteoporose induzida e o cálcio e a vitamina D3 têm efeitos inconsistentes.

Palavras-chave: menaquinona; osteoporose; tratamento; colecalciferol; ovariectomia.

7.1 INTRODUÇÃO

Na osteoporose a microarquitetura óssea e a composição mineral do osso, predominantemente dada pelo cálcio incorporado na forma de cristais de hidroxiapatita, estão comprometidas. Devido à saída de cálcio dos ossos marcar a patogênese da osteoporose, a suplementação desse mineral de forma isolada ou combinada com a vitamina D, se tornou uma recomendação comum para mulheres na pós-menopausa, com a finalidade de reintroduzir cálcio no osso. Entretanto, os baixos níveis de estrogênio, característicos deste período, inibem a fixação de minerais no esqueleto, mesmo com o aumento do consumo de cálcio por meio de suplementos alimentares (DURÁN, 2011; de VILLIERS, 2015).

Devido às alterações hormonais promoverem a perda e evitarem a deposição de massa óssea, a prevenção e a interrupção da perda óssea são os focos essenciais para o tratamento da osteoporose. A eficácia dos suplementos de cálcio e vitamina D em melhorar a saúde óssea é controversa e, além disso, a suplementação de cálcio está associada ao maior risco de calcificação dos vasos e infarto do miocárdio (MICHAËLSSON et al., 2013; BOLLAND et al., 2010; BOLLAND et al., 2008). Assim, opções simples e de baixos risco e custo para evitar a osteoporose são demandas importantes na prática clínica.

Benefícios exclusivos têm sido atribuídos à vitamina K2 na prevenção e tratamento da osteoporose. Também chamada menaquinona (MK), a vitamina K2 é encontrada, porém em baixa quantidade, em alguns alimentos como gema de ovo, vísceras e em produtos como queijos, repolho e soja fermentados, além de ser produzida a partir da vitamina K1 pela bactéria *Escherichia coli* no intestino humano (MEGANATHAN, 2001).

A vitamina K2 ativa algumas proteínas promotoras da mineralização óssea, como a osteocalcina (HAUSCHKA et al., 1989; SCHINKE; MCKEE; KARSENTY, 1999) e gla rich protein (CANCELA; CONCEIÇÃO; LAIZÉ, 2012). A essencialidade da vitamina K2 para a atividade biológica dessas proteínas se deve ao seu papel como cofator no processo pós-traducional de γ -glutamylcarboxilação. Além disso, a vitamina K2

promove aumento no número e da atividade dos osteoblastos (URAYAMA et al., 2000), modula de genes alvo em osteoblastos (ICHIKAWA et al., 2007) e promove a cicatrização da fratura (KOITAYA et al., 2009).

Estudos que avaliem o efeito da vitamina K2 na saúde óssea são escassos no Brasil, porém crescentes na literatura internacional, e o uso dessa vitamina para a prevenção e tratamento da osteoporose na prática clínica é baixo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da vitamina K2, administrada de forma isolada ou associada à vitamina D3 e ao cálcio, na massa óssea em modelo experimental de osteoporose.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Animais

As 70 ratas (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação *albinus*) usadas nesse estudo foram adquiridas, com 30 dias de vida, no Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa. Os animais receberam ração comercial, até a data do início dos tratamentos, e água deionizada *ad libitum* e foram alojados em gaiolas individuais de aço inox, em ambiente com temperatura controlada a 22° C e ciclo claro e escuro de 12 horas.

7.2.2 Indução da osteoporose por ovariectomia

Ao atingir 12 semanas, quando os animais estavam em fase avançada da idade adulta, eles foram submetidos à cirurgia de ovariectomia (ovx), com incisão abdominal e retirada dos ovários, ou à laparotomia (sham), com incisão abdominal sem retirada dos ovários, para induzir o estresse cirúrgico e seus efeitos. A ovx promove redução da formação óssea e aumento da reabsorção, semelhante ao observado em mulheres após a menopausa devido a deficiência de estrogênio (THOMPSON et al., 1995).

Trinta minutos antes do início das cirurgias ovx ou sham, os animais receberam, via subcutânea, o anti-inflamatório flunixinameglumina (0,68 mg/kg) e o antibiótico enrofloxocina (10 mg/kg). Os animais foram anestesiados com isoflurano diluído em 100% de oxigênio, por via inalatória, por meio de vaporizador calibrado. A concentração do isoflurano foi ajustada de forma a manter o plano anestésico adequado. Após a indução e estabilização anestésicas, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre colchão com aquecimento ativo e o campo operatório foi preparado com iodopovidona a 10%. Foi administrado, via subcutânea, o analgésico morfina na dose de 5 mg/kg.

Após as cirurgias, os animais permaneceram em câmara aquecida, a fim de manter a temperatura corporal, e em seguida retornaram às gaiolas individuais. Os procedimentos anestésico-cirúrgicos e pós-cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário do

Departamento de Veterinária da UFV sob a responsabilidade da Médica Veterinária Lukiya Silva Campos Favarato.

O período de indução da osteoporose após a ovx foi de 6 semanas, prévias ao início da intervenção, em que as ratas permaneceram em gaiolas individuais e receberam dieta comercial peletizada e água *ad libitum*.

7.2.3 Composição da dieta padrão

A dieta administrada aos animais, concomitantemente aos tratamentos, foi elaborada de acordo com as recomendações descritas na AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1939). Dentre os conteúdos de micronutrientes recomendados, destacam-se os que foram suplementados no período de intervenção: vitamina K (750 UI/kg de dieta), vitamina D₃ (1000 UI/kg de dieta), cálcio (5000 mg/kg de dieta). Vale ressaltar que o conteúdo de vitamina K corresponde à vitamina K1. A dieta AIN-93 é isenta de vitamina K2.

7.2.4 Dosagens dos suplementos

As dosagens usadas dos suplementos de cálcio e vitamina D₃ foram proporcionais às recomendações das *Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose* (DTO) (BRASIL, 2014) para humanos. Foi verificada a porcentagem recomendada dos suplementos em relação às *Dietary References Intakes* (DRIs) para mulheres de 51-70 anos (IOM, 2011), período que engloba a menopausa, e adicionada a mesma porcentagem na dieta padrão para ratos, AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1939). A DTO recomenda suplementar, em média, 1x e 1,67x as *DRIs* de cálcio e vitamina D₃, respectivamente. Seguindo essa proporção, adicionamos à dieta dos animais 5000 mg/kg de dieta de carbonato de cálcio e 1670 UI/kg de dieta de vitamina D₃.

Quanto à vitamina K₂, não há recomendação nutricional para humanos ou animais e para a determinação da dosagem foram considerados estudos anteriores e de toxicidade. A dose usada nesse estudo foi de 12,5 mg/kg de dieta ou 718 µg/kg de peso corporal por dia. Trabalhos já publicados apresentaram o uso de doses que variaram de 141 µg/kg de dieta (YAMAGUCHI et al., 2000) a 201 mg/kg de dieta (FU et al., 2012). Não foi observada toxicidade aguda, com dose diária de 2000 mg/kg de peso corporal, ou subcrônica, com administração de 2,5, 5 ou 10 mg/kg de peso corporal em ratos (PUCAJ et al., 2011). A dose utilizada nesse estudo foi mediana em relação aos estudos que usaram a menor e a maior dose, de forma que a dose usada se encontra bem acima da dose mínima em que foi observado efeito e abaixo da máxima.

7.2.5 Grupos experimentais e eutanásia

Ao atingirem 18 semanas, após 6 semanas das cirurgias, os animais, até então alimentados com ração comercial, passaram a receber a dieta padrão AIN-93M e foram distribuídos, pelo método de estratificação por peso corporal, em 7 grupos de 10 animais, sendo eles: (1) controle-sham (falsa ovariectomia, com incisão abdominal sem retirada dos ovários) não tratado; (2) controle-ovx não tratado; (3) ovx + cálcio; (4) ovx + K2 (5) ovx + cálcio + K2 (6) ovx + cálcio + D3 (7) ovx + cálcio + K2 + D3.

Após a 4ª semana de tratamento, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados. Os outros cinco animais de cada grupo foram eutanasiados ao final da 8ª semana de tratamento, a fim de verificar o efeito do tempo de suplementação na saúde óssea. Da 4ª até a 8ª semana as dietas experimentais permaneceram idênticas, exceto para o grupo 6, em que a dieta contendo cálcio + vitamina D3 foi substituída por uma contendo cálcio + vitamina K2. Essa alteração foi realizada para verificar o efeito da alteração do tratamento nos desfechos analisados.

As eutanásias ocorreram após jejum de 12 horas, por exsanguinação/punção cardíaca nos animais anestesiados com Isoflurano (Isoforine, Cristália®). Cerca de 6 mL de sangue foram coletados usando agulha inserida no ventrículo esquerdo. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos à 4°. Os fêmures direito e esquerdo, e tíbias direita e esquerda foram retirados e lavados em tampão PBS. Parte de cada tecido foi armazenado em formalina 10%, para análises histológicas, ou congelados a -70°C para outras análises.

7.2.6 Peso e consumo alimentar

Os pesos dos animais e a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente. O ganho de peso corporal foi determinado pela diferença entre os pesos no dia da eutanásia e o do primeiro dia da intervenção. Foi calculado o ganho de peso e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), de acordo com a fórmula: $CEA = \text{ganho de peso (g)} / \text{consumo alimentar (g)}$.

7.2.7 Dosagens sanguíneas

Foram feitas as dosagens séricas de fosfatase alcalina, cálcio, magnésio, por colorimetria, usando o equipamento BS200 e kits específicos, fornecidos pela Bioclin®.

7.2.8 Determinação do conteúdo mineral ósseo

O fêmur direito foi submetido à secagem em estufa de circulação forçada por 72 horas a 68-72°C. Em seguida, as amostras foram pesadas e moídas. As vidrarias utilizadas foram lavadas e descontaminadas em solução de HCl 2% por 5 minutos e levadas com água deionizada.

Para a digestão ácida foi adicionada ao material a solução de ácido nítrico e perclórico, na proporção 4:1, em tubos de digestão, que foram colocados em chapa pré-aquecida, com temperatura inicial de 80°C elevada gradativamente até 200°C até que o material ficasse cristalino (SARRUGE; HAAG, 1974). A determinação de cálcio e magnésio foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica, a de potássio por fotometria de chama e a quantificação de fósforo por colorimetria pelo método do ácido ascórbico (BRAGA; DEFELIPO, 1974).

7.2.9 Histomorfometria óssea

Os fêmures direitos dos animais foram fixados em formalina 10% por 72 horas e, em seguida, armazenadas em álcool 70%. O fêmur foi descalcificado em solução de citrato de sódio e ácido fórmico, que foi substituída a cada quatro dias durante 12 dias, quando os ossos já estavam suficientemente descalcificados. Em seguida, realizou-se lavagem em água corrente por 24 horas, seguida de imersão em solução de sulfato de sódio 5%, por 24 horas, e cortes longitudinais das epífises. As amostras foram submetidas a imersões em álcoois 70, 80, 90 e 100%, xilol e parafina, utilizando-se o aparelho histotécnico para tecidos (Leica TP1020). Foram montados blocos de parafina e realizados seis cortes de cada amostra, com espessura de 5 µm, em micrótomo de rotação (Leica RM2245). Em seguida, após permanecerem em estufa por 2 horas, as lâminas com os cortes histológicos foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em água e em concentrações decrescentes de álcool, e coradas com hematoxilina e eosina. As imagens histológicas foram obtidas com aumento de 40x, em fotomicroscópio (Zeiss – Scope A1) com sistema de captura de imagens (AxioCam 105 color Zeiss), em diferentes campos de forma aleatória. As imagens das lâminas foram analisadas no programa Image J, pelo método de contagem a partir da sobreposição de uma grade de 266 pontos. Nas imagens dos ossos foi analisado o volume trabecular, na região localizada logo abaixo da linha de crescimento.

7.2.10 Resistência óssea

A resistência óssea foi medida a partir do ensaio de flexão com uso da máquina universal para ensaios mecânicos Instron. Os ossos dos animais foram posicionados no equipamento com extremidades apoiadas em suporte adaptado ao tamanho dos ossos. A carga foi aplicada no centro da diáfise óssea com velocidade de deslocamento de 2mm/minuto. A compressão máxima, em Newtons (N), no momento da ruptura, foi registrada pelo sistema computacional acoplado à máquina universal, com uso do software Bluehill.

7.2.11 Microtomografia

A quantificação microestrutural foi realizada com uso de microtomógrafo de raio-X de alta resolução SkyScan (modelo 1174v2) e os softwares fornecidos pelo fabricante do scanner NRecon, DataViewer e CT-Analyzer. As imagens foram obtidas com a voltagem de 50 kV, corrente de 670 μ A, filtro de alumínio de 0.5 mm, rotação de 360° e resolução de 18.11 μ m. Foram analisados 50 slices de osso trabecular, localizados 10 slices abaixo da placa de crescimento. Foram medidos o volume trabecular (BV/TV), espessura de trabécula (Tb/Th), número de trabéculas (Tb.N) e espessamento entre trabéculas (Tb.Sp).

7.2.12 Radiografia

Os fêmures esquerdos dos animais foram radiografados e o tamanho da área analisada, localizada na cabeça do fêmur, foi semelhante entre os animais. Para obtenção das imagens foi padronizada voltagem de 44 kV, corrente de 100 mA, tempo de exposição de 0,07 segundo e distância de um metro entre a fonte de emissão dos raios-X e o filme radiográfico. Um penetrômetro de alumínio, com dimensões de 25 mm de largura e 60 mm de comprimento e 5 graus com 3 mm de altura cada foi posicionado próximo aos fêmures a serem radiografados para a determinação da densidade radiográfica.

As radiografias foram digitalizadas e analisadas com auxílio do software ImageJ. As imagens foram convertidas para escala de cinza e os níveis de cinza de cada degrau do penetrômetro foram quantificados e, em seguida, utilizados para a realização de uma curva, em análise de regressão linear. Valores de densidade em milímetros de alumínio (mmAl) em função dos níveis de cinza do penetrômetro, foram gerados para as radiografias dos fêmures de cada animal.

7.2.13 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. ANOVA one-way e o teste post-Hoc Duncan foram utilizados para verificar a diferença entre as médias dos diferentes grupos. A diferença nas médias da semana 4 e da semana 8, do mesmo grupo foi verificada pelo teste t de Student. O nível de significância estabelecido foi de menos de 5%.

7.2.14 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, após a apreciação deste estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisas com animais da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo número 068/2016).

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Massa corporal e consumo alimentar

O peso médio dos animais não diferiu no dia anterior às ovariectomias ($203,6 \pm 0,4$ g). Seis semanas após as cirurgias, antes do início dos tratamentos, ratas ovariectomizadas apresentaram maior peso corporal ($272,3 \pm 22,06$ g) em relação às do grupo ctr-sham ($240,8 \pm 22,1$), no entanto, essa diferença desapareceu duas semanas após o início dos tratamentos. Após 4 ou 8 semanas de tratamento, não houve diferença entre os grupos quanto ao peso corporal. Na análise ao longo do tempo, apenas o grupo Ca+K2 apresentou aumento de peso corporal. O consumo alimentar foi reduzido, na semana 4, nos grupos suplementados com Ca+D3 antes da troca de tratamento, em relação aos demais grupos, com exceção do grupo Ca+K2. Ao final da oitava semana, não houve diferença entre os grupos quanto ao consumo alimentar (Tabela 1). De acordo com o consumo médio dos animais, a dose de vitamina K2 administrada foi de $209,5 \mu\text{g}/\text{dia}$. Não foram observadas diferenças no peso e comprimento total do fêmur dos animais entre os grupos nem ao longo do tempo (dados não apresentados).

7.3.2 Análises bioquímicas

A ovariectomia promoveu uma redução do conteúdo de cálcio no sangue dos animais, vista pela diferença entre os grupos controle na quarta semana. Apenas os grupos suplementados com cálcio ou vitamina K2 impediram essa redução e permaneceram com níveis de cálcio sérico foi semelhantes ao grupo ctr-sham.

Em relação à fosfatase alcalina (FA), houve redução em todos os animais ovariectomizados, suplementados ou não, exceto para o grupo Ca+D3 na 4ª semana, antes da troca de tratamento. Na oitava semana, todos os grupos apresentaram FA superior à do grupo ctr-sham. Não foi observada diferença estatística quanto aos níveis de magnésio (Tabela 2).

Tabela 1: Peso corporal e consumo alimentar dos animais dos diferentes grupos experimentais, nas semanas 4 e 8. Dados expressos em média (desvio padrão).

Tratamento	Peso corporal (g)*		Consumo alimentar (g)	
	Semana 4	Semana 8	Semana 4	Semana 8
Ctr-sham	261,3 (29,9) ¹	272,8 (14,3) ¹	15,6 (1,7) ^{a,1}	13,7 (1,4) ^{a,1}
Ctr-ovx	280,8 (26,2) ¹	307,1 (13,2) ¹	14,4 (1,2) ^{a,1}	13,9 (0,9) ^{a,1}
Ca	280,3 (25,3) ¹	304,4 (18,0) ¹	15,2 (2,6) ^{a,1}	14,0 (1,6) ^{a,1}
K2	273,6 (22,1) ¹	301,0 (22,7) ¹	15,4 (1,1) ^{a,1}	13,1 (2,1) ^{a,1}
Ca+K2	269,2 (28,6) ¹	306,8 (7,2) ²	13,8 (2,4) ^{b,1}	16,0 (4,8) ^{a,1}
Ca+D3/Ca+K2	252,8 (30,5) ¹	308,4 (45,2) ¹	11,3 (2,4) ^{b,1}	15,4 (1,4) ^{a,2}
Ca+K2+D3	283,4 (25,7) ¹	299,7 (15,7) ¹	14,2 (1,6) ^{a,1}	13,9 (1,2) ^{a,1}

Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio; K2: vitamina K2; D3: vitamina D3. ANOVA post-Hoc Duncan para diferença entre grupos; teste t para diferença no mesmo grupo, na semana 4 e na semana 8. Letras indicam diferenças entre grupos. Números indicam diferença no mesmo grupo, na semana 4 e na semana 8. * indica ausência de diferença entre grupos.

Tabela 2: Marcadores bioquímicos plasmáticos dos animais dos diferentes grupos experimentais, nas semanas 4 e 8. Dados expressos em média (desvio padrão).

Tratamento	Cálcio (mg.dL ⁻¹)		Magnésio* (mg.dL ⁻¹)		Fosfatase alcalina (U.L ⁻¹)	
	Semana 4	Semana 8	Semana 4*	Semana 8*	Semana 4	Semana 8
Ctr-sham	10.7 (0.5) ^{a,1}	10.4 (0.3) ^{a,1}	13.6 (0.4) ¹	11.1 (5.5) ¹	33.6 (7.0) ^{b,1}	29.2 (7.2) ^{b,1}
Ctr-ovx	10.0 (0.1) ^{b,1}	9.9 (0.3) ^{b,1}	10.5 (3.6) ¹	10.9 (4.3) ¹	57.0 (6.4) ^{a,2}	67.0 (17.1) ^{a,1}
Ca	10.2 (0.3) ^{a,b,c,1}	10.5 (0.2) ^{a,1}	9.7 (3.1) ¹	11.4 (2.1) ¹	53.4 (14.7) ^{a,1}	64.2 (14.8) ^{a,1}
K2	10.4 (0.4) ^{a,b,1}	10.4 (0.6) ^{a,1}	11.3 (5.0) ¹	12.4 (3.5) ¹	62.8 (10.1) ^{a,1}	60.5 (20.6) ^{a,1}
Ca+K2	9.8 (0.5) ^{c,1}	9.6 (0.2) ^{b,1}	13.1 (6.0) ¹	13.9 (3.3) ¹	53.8 (22.1) ^{a,1}	60.2 (18.5) ^{a,1}
Ca+D3/Ca+K2	9.8 (0.5) ^{c,1}	9.7 (0.2) ^{b,1}	16.1 (6.8) ¹	9.6 (3.0) ¹	46.0 (10.7) ^{b,2}	71.6 (7.6) ^{a,1}
Ca+K2+D3	9.6 (0.3) ^{c,1}	9.7 (0.2) ^{b,1}	12.1 (7.4) ¹	10.9 (2.5) ¹	66.6 (16.2) ^{a,1}	55.2 (8.8) ^{a,1}

Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio; K2: vitamina K2; D3: vitamina D3. ANOVA post-Hoc Duncan para diferença entre grupos; teste t para diferença no mesmo grupo, na semana 4 e na semana 8. Letras indicam diferenças entre grupos. Números indicam diferença no mesmo grupo, na semana 4 e na semana 8. * indica ausência de diferença entre grupos.

7.3.3 Resistência óssea

Não houve diferença entre os animais dos diferentes grupos quanto à resistência óssea, avaliada pela compressão máxima, dada em Newtons (Tabela 3).

Tabela 3: Resistência óssea, em Newtons, dos animais dos diferentes grupos experimentais, nas semanas 4 e 8.

Tratamento	Compressão máxima (Newtons)		
	Média geral (DP)*	Média (DP) semana 4*	Média (DP) semana 8*
Ctr-sham	114.20 (5.31)	113.08 (4.85)	115.31 (6.07)
Ctr-ovx	115.37 (12.48)	111.41 (15.32)	119.32 (8.76)
Ca	115.32 (16.05)	111.57 (15.41)	119.07 (17.51)
K2	107.18 (22.73)	106.05 (30.55)	114.64 (12.41)
Ca+K2	118.49 (21.29)	122.50 (16.19)	126.32 (4.93)
Ca+D3/Ca+K2	119.36 (18.64)	112.31 (27.63)	123.59 (12.91)
Ca+K2+D3	118.01 (15.18)	119.06 (18.24)	116.97 (13.50)

Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio; K2: vitamina K2; D3: vitamina D3. ANOVA para verificar diferença entre grupos; teste t para verificar diferença no mesmo grupo, na semana 4 e na semana 8. * indica ausência de diferença entre grupos e quanto ao tempo de intervenção

7.3.4 Histomorfometria óssea

A ovariectomia promoveu a redução do volume trabecular, vista pela diferença entre o grupo ctr-sham e ctr-ovx, tanto na quarta quanto na oitava semana. Ao final da quarta semana, os animais do grupo ctr-sham possuíam volume trabecular superior a todos os demais animais ovariectomizados, tratados ou não. Na oitava semana, o grupo ctr-sham permaneceu com volume trabecular superior ao ctr-ovx, entretanto houve diferenças entre os tratamentos. A conservação da massa óssea nos grupos que receberam apenas vitamina K2, Ca+K2 (após a troca de tratamento) e Ca+K2+D3 fizeram com que estes, ao final da oitava semana, apresentassem volume trabecular semelhante ao do grupo ctr-sham.

Em relação à diferença quanto ao tempo de intervenção, houve redução do volume trabecular nos grupos que receberam Ca ou Ca+K2 (sem troca de tratamento) (Tabela 4; Figura 1A).

7.3.5 Radiografia

A indução da osteoporose pela ovariectomia também foi constatada na análise das radiografias dos fêmures dos animais, ao final da semana 4. Na quarta semana de tratamento, o suplemento com Ca+K2 e com Ca+K2+D3 promoveu aumento da massa óssea e o tratamento com Ca+D3, reduziu a densidade óssea, em relação ao grupo ctr-ovx. Ao final da oitava semana, as análises radiológicas não detectaram diferença entre

os grupos. Houve aumento da massa óssea, da quarta para a oitava semana, apenas no grupo que foi realizada a troca de tratamento, de Ca+D3 para Ca+K2.

Tabela 4: Análise histológica da porcentagem de osso trabecular e densidade óssea, em milímetros de alumínio, com base nas radiografias dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais. Dados expressos em média (desvio padrão)

	Histologia - Osso trabecular (%)		Radiografia - Densidade óssea (mmAl)	
	Semana 4*	Semana 8	Semana 4	Semana 8
Ctr-sham	56.63 (7.89) ¹	55.68 (4.35) ^{a,1}	1.64 (0.20) ^{a,1}	1.22 (0.37) ^{a,1}
Ctr-ovx	50.23 (7.21) ¹	46.13 (4.98) ^{b,1}	1.38 (0.09) ^{b,1}	1.18 (0.23) ^{a,1}
Ca	55.15 (6.68) ¹	43.01 (7.35) ^{b,2}	1.14 (0.13) ^{b,c,1}	1.18 (0.20) ^{a,1}
K2	57.93 (10.96) ¹	54.45 (4.51) ^{a,1}	1.32 (0.07) ^{b,1}	1.36 (0.2) ^{a,1}
Ca+K2	54.40 (4.96) ¹	42.34 (5.28) ^{b,2}	1.49 (0.16) ^{a,1}	1.25 (0.29) ^{a,1}
Ca+D3/Ca+K2	50.87 (6.05) ¹	47.27 (7.59) ^{a,1}	1.00 (0.32) ^{c,1}	1.34 (0.15) ^{a,1}
Ca+K2+D3	55.36 (7.60) ¹	50.15 (10.69) ^{a,1}	1.49 (0.16) ^{a,1}	1.34 (0.33) ^{a,1}

Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio. K2: vitamina K2; D3: vitamina D3. ANOVA e post-Hoc Duncan. Letras indicam diferença entre os grupos. Números indicam diferença no mesmo grupo, na semana 4 e na semana 8. *indica ausência de diferença entre grupos

7.3.6 Microtomografia

Assim como nas análises de histologia e radiografia, foi confirmada na microtomografia a perda de massa óssea devido à ovariectomia. Na quarta semana, o grupo ctr-sham apresentou volume trabecular superior a todos os demais grupos ovariectomizados, tratados ou não, e não houve diferença entre os tratamentos. Na oitava semana, a diferença entre o grupo ctr-ovx e ctr-sham desapareceu, uma vez que houve uma queda mais acentuada do volume trabecular no grupo ctr-sham.

Na oitava semana, os grupos K2, Ca+K2 (que sofreu mudança de intervenção) e o ctr-ovx foram semelhantes ao grupo ctr-sham. Uma queda ainda mais acentuada da massa óssea foi verificada no grupo que recebeu apenas Ca, Ca+K2 (sem troca de tratamento) ou Ca+K2+D3, o que fez com que esses grupos apresentasse volume trabecular menor do que o grupo ctr-sham.

Em relação ao tempo de intervenção, houve redução do volume trabecular, da quarta para a oitava semana, no grupo ctr-sham e em todos os grupos que receberam suplemento de cálcio, de forma isolada ou conjunta (grupos Ca; Ca+K2 sem troca de tratamento; e Ca+K2+D3). O grupo que recebeu apenas vitamina K2 e o que sofreu troca de tratamento de Ca+D3 para Ca+K2 apresentou manutenção da massa óssea ao longo do tempo.

Não houve diferença entre os grupos e quanto ao tempo de intervenção em relação ao número de trabéculas, a espessura trabecular e ao espessamento ente trabéculas (Tabela 5; Figura 1B).

Tabela 5: Parâmetros analisados na microtomografia dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais. Dados apresentados em média (desvio padrão).

	Volume trabecular (%)		Espessura trabecular (mm)*		Número de trabéculas (1/mm)*		Espessamento entre trabéculas (mm)*	
	Semana 4	Semana 8	Semana 4	Semana 8	Semana 4	Semana 8	Semana 4	Semana 8
	ctr-sham	88.5 (3.8) ^{a,1}	79.3 (3.8) ^{a,2}	0.25 (0.05)	0.26 (0.03)	3.63 (0.54)	3.13 (0.25)	0.09 (0.01)
ctr-ovx	75.4 (3.5) ^{b,1}	74.4 (4.1) ^{a,1}	0.20 (0.02)	0.21 (0.02)	3.77 (0.53)	3.62 (0.52)	0.12 (0.02)	0.14 (0.02)
Ca	79.6 (6.1) ^{b,1}	68.1 (8.4) ^{b,2}	0.21 (0.04)	0.22 (0.03)	3.88 (0.48)	3.11 (0.24)	0.11 (0.02)	0.16 (0.01)
K2	77.4 (5.2) ^{b,1}	72.5 (3.9) ^{a,1}	0.19 (0.02)	0.22 (0.04)	4.03 (0.53)	3.41 (0.58)	0.11 (0.02)	0.14 (0.02)
Ca+K2	79.3 (2.6) ^{b,1}	65.1 (5.7) ^{b,2}	0.21 (0.03)	0.20 (0.02)	3.81 (0.46)	3.17 (0.27)	0.11 (0.01)	0.16 (0.01)
Ca+D3/Ca+	76.3 (4.8) ^{b,1}	73.7 (5.5) ^{a,1}	0.19 7(0.02)	0.21 (0.01)	4.01 (0.37)	3.56 (0.17)	0.12 (0.02)	0.14 (0.02)
Ca+K2+D3	80.6 (2.5) ^{b,1}	68.3 (5.9) ^{b,2}	0.22 (0.02)	0.21 (0.02)	3.69 (0.28)	3.20 (0.14)	0.11 (0.01)	0.15 (0.01)

Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio.

ANOVA 2-fatores e post-Hoc Duncan. Letras indicam diferença entre os grupos. Números indicam diferença no mesmo grupo, ao longo do tempo

*indica ausência de diferença entre os grupos e quanto ao tempo de intervenção.

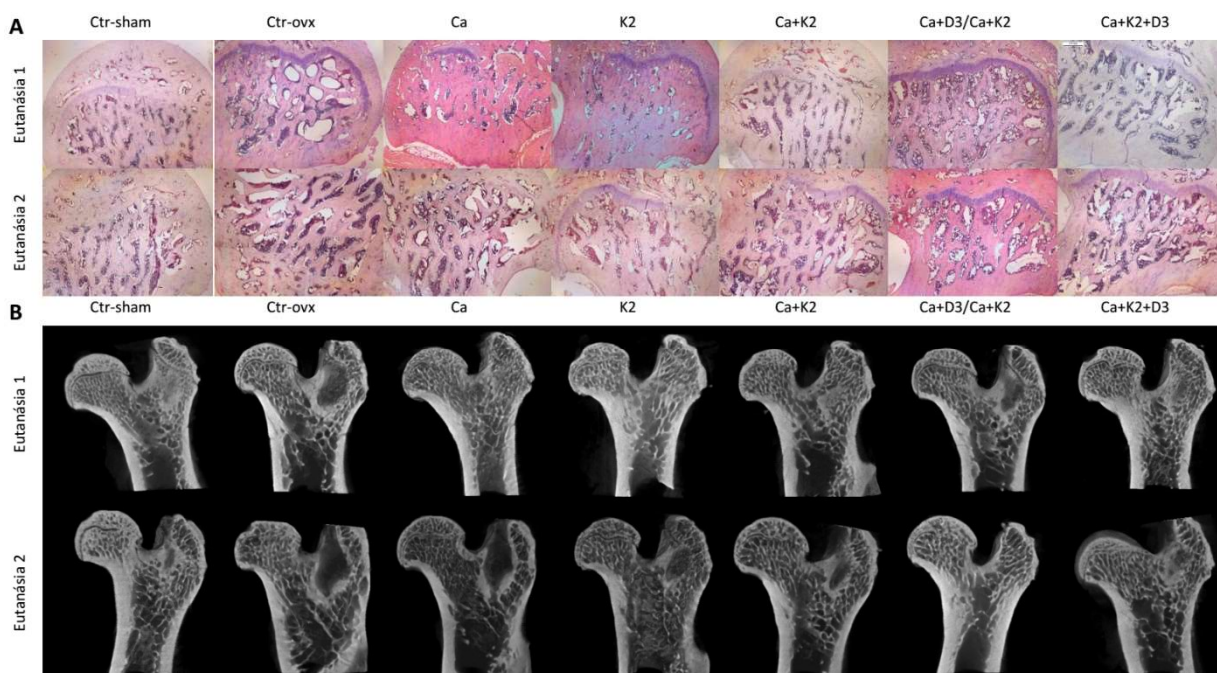


Figura 1 A) Lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina, dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais; B) Slices em porção padronizada dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais. Ca: cálcio; K2: vitamina K2; D3: vitamina D3.

7.3.7 Conteúdo mineral ósseo

Houve diminuição no conteúdo de cálcio nos ossos dos animais do grupo ctr-ovx em relação ao grupo ctr-sham, indicando a ocorrência de descalcificação óssea associada à ovariectomia nas ratas. A suplementação com cálcio não promoveu o aumento do

conteúdo de cálcio nos ossos das ratas. Já nos grupos tratados com vitamina K2, de forma isolada ou combinada com cálcio e/ou vitamina D3, a perda de cálcio ósseo associada a ovariectomia foi evitada, de forma que, ao final da oitava semana, estes grupos foram semelhantes ao grupo ctr-sham. Não houve diferenças nos conteúdos ósseos de fósforo, magnésio e potássio entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6: Conteúdo de minerais nos fêmures dos animais ao final de 8 semanas de tratamento dos animais dos diferentes grupos experimentais. Dados apresentados em média (desvio padrão).

Variável	Ossos			
	Cálcio (dag/kg)	Fósforo (dag/kg)*	Magnésio (dag/kg)*	Potássio (dag/kg)*
Ctr-sham	25.43 (0.91) ^a	4.41 (0.38)	0.31 (0.01)	0.19 (0.04)
Ctr-ovx	20.39 (1.66) ^b	5.12 (1.07)	0.35 (0.02)	0.17 (0.01)
Ca	20.62 (2.43) ^b	4.46 (0.31)	0.32 (0.03)	0.19 (0.03)
K2	21.22 (1.43) ^{a,b}	4.29 (0.23)	0.31 (0.02)	0.20 (0.02)
Ca+K2	22.87 (1.68) ^{a,b}	4.43 (0.20)	0.31 (0.01)	0.19 (0.02)
Ca+D3/Ca+K2	24.21 (1.88) ^{a,b}	4.57 (0.18)	0.30 (0.01)	0.19 (0.05)
Ca+K2+D3	23.23 (2.78) ^{a,b}	4.21 (0.44)	0.29 (0.02)	0.18 (0.05)

Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio. ANOVA e post-Hoc Duncan. Letras indicam diferença entre os grupos.

*indica ausência de diferença entre grupos

7.4 DISCUSSÃO

Os principais achados desse estudo foram a redução do conteúdo de cálcio sérico e no fêmur dos animais ovariectomizados e prevenção dessa perda pela vitamina K2. O suplemento de cálcio preveniu o decréscimo de cálcio no sangue, mas não no osso. Além disso, encontramos, nas análises de histologia, radiografia e microtomografia, a redução da massa óssea em decorrência da ovariectomia dos animais, vista a diferença entre grupos ctr-sham e ctr-ovx, semelhante ao observado anteriormente (Otomo et al., 2004; Wu et al., 2014). Um importante diferencial desse estudo foi a redução, ao longo do tempo, da massa óssea nos animais tratados apenas com cálcio e a manutenção da massa óssea após a troca de tratamento, de Ca+D3 para Ca+K2, indicando benefício da substituição do tratamento com vitamina D3 para vitamina K2. Ressaltamos que, de forma geral, os grupos suplementados com vitamina K2, de forma isolada ou conjunta, preveniram a perda de massa óssea devido à ovx, de forma que esses grupos apresentassem volume trabecular semelhante ao do grupo não osteoporótico sham.

A perda de massa óssea em todos os grupos que receberam cálcio pode estar associada a absorção competitiva a nível intestinal do cálcio magnésio e fósforo, também importantes no processo de mineralização óssea (COZZOLINO, 1997). O cálcio em excesso pode agir como antagonista na digestibilidade de fósforo e magnésio, formando

quelatos insolúveis e dificultando a absorção, causando deficiência secundária (ANDERSON; HARVENSTEIN; BRAKE, 1995; VELLASCO; GOMES; DONZELE et al., 2016). Ressaltamos que a piora da osteoporose associada à suplementação de cálcio ou a ausência de efeito dessa suplementação vem sendo observada em estudos anteriores (BOLLAND; LEUNG; TAI, 2015; BOLLAND; GREY; REID, 2015), entretanto sua recomendação na prática clínica para tratamento da osteoporose ainda é bastante observada.

A ausência de diferença entre o grupo ctr-sham e ctr-ovx, quanto ao volume trabecular na oitava semana, detectada pela análise de microtomografia e radiografia pode estar relacionada a importante perda de massa óssea observada nos animais não osteoporóticos da quarta para a oitava semana, possivelmente decorrente da idade avançada dos animais. No presente estudo, a ovariectomia fez com que as ratas ficassem não apenas osteoporóticas, mas também com peso aumentado. Este fenômeno foi observado em estudos anteriores com ratas (MAWATARI et al, 2000; OTOMO et al., 2004) e também é constatado em mulheres (LINS, SICHIERI, 2001).

A maioria dos estudos usa a vitamina K2 MK-4 e a dose usualmente utilizada é de 30 a 45 mg/dia. Os resultados encontrados nos estudos com MK-4 se assemelham aos observados com o uso da MK-7, que, porém, é usualmente administrada em doses muito menores. Utilizamos a dose de 12.5 mg de MK-7/kg de dieta, que foi semelhante entre os grupos. Wu e et al (2014) trataram ratas ovx com 2, 4 ou 8 µg/dia de MK-7 ou com *cheonggukjang*, uma pasta de soja fermentada presente na culinária coreana, contendo as mesmas quantidades de MK-7. Eles observaram redução da fosfatase alcalina promovida pelo consumo de MK-7 e o *cheonggukjang*. No presente estudo, a vitamina K2 não promoveu redução da fosfatase alcalina aumentada devido à ovariectomia. Assim como observamos, os suplementos MK-7 ou *cheonggukjang* preveniram a do volume trabecular e do conteúdo de cálcio ósseo (WU et al., 2014).

O aumento da fosfatase alcalina nos animais ovariectomizados em comparação com os operados por simulação, observado nesse estudo, indica a ocorrência dos processos de formação e reabsorção óssea em ratas após a retirada dos ovários. Em mulheres também é observado o aumento da fosfatase alcalina em decorrência da menopausa (MAWATARI 2000, WU et al 2014).

A análise estrutural do osso indicou ausência de diferença no comprimento do fêmur entre os grupos, semelhante ao observado em análise de tíbia (MAWATARI et al, 2000; HARA 2002) e do fêmur (OTOMO et al., 2004) de ratas ovariectomizadas não tratadas e tratadas com vitamina K2.

Nesse estudo a análise de resistência óssea não foi capaz de detectar diferenças entre os grupos na força necessária para a quebra do osso. Otomo et al. (2004) também não verificaram diferença entre ovx e sham na resistência do fêmur, apenas na da vértebra. Os autores não observaram efeito da administração de vitamina K2 nesse parâmetro, ao contrário do risedronato, que promoveu aumento da resistência femoral e vertebral. Outro estudo com ratas ovariectomizadas demonstrou efeito semelhante da vitamina K2 e raloxifeno, medicamento usado para tratamento da osteoporose (TASCI et al., 2011)

Nossos resultados não indicaram evidências que apoiassem o uso de suplementos de cálcio para tratamento da osteoporose, sendo observada, inclusive, aumento da perda óssea relacionado ao consumo desse suplemento. Dados do *Auckland Calcium Study* indicaram que não há relação entre a ingestão dietética de cálcio e a taxa de perda óssea ao longo de 5 anos em mulheres idosas saudáveis, com consumo variando de 400 a 1500 mg dia. Assim, dentro dessa ampla faixa de ingestão, os autores consideram que os suplementos não são necessários para compensar uma possível deficiência dietética. No citado estudo, de forma semelhante ao observado no presente trabalho, não houve eficácia antifratura dos suplementos de cálcio (exceto em uma coorte com deficiência severa de vitamina D). Além disso, os autores observaram um aumento de 17% nos cálculos renais e de 20-40% no risco de infarto do miocárdio, o que, para eles, neutraliza qualquer possível benefício na prevenção de fraturas (REID; BRISTOW, BOLLAND, 2015). Outros pesquisadores indicaram que o efeito dos suplementos de cálcio na massa óssea pode existir apenas quando a ingestão alimentar de cálcio é deficiente e afirmam que a ingestão de cerca de 1000-1200 mg/dia de cálcio dietético parece ser suficiente para a prevenção geral de fraturas (STRÖHLE; HADJI; HAHN, 2015).

Em conclusão, este estudo sugere que a administração de vitamina K2 (MK-7) por 8 semanas protege contra a perda de volume ósseo trabecular e do conteúdo de cálcio no osso em ratas com perda óssea induzida por ovariectomia e que os suplementos de cálcio pioram a perda óssea. A vitamina D3 possui efeitos inconsistentes sobre a massa óssea.

Financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

7.5 REFERÊNCIAS

ANDERSON, K. E.; HARVENSTEIN, G. B.; BRAKE, J. Effects of strain and rearing dietary regimens on brown-egg pullet growth and strain, rearing dietary regimens,

density, and feed space effects on subsequent laying performance. **Poultry Science**, v. 74, p. 1079-1092, 1995.

BANFI, G.; IORIO, E. L. CORSI, M. M. Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, p. 1550-1555, 2008.

BISCHOFF-FERRARI, H. A.; SHAO, A.; DAWSON-HUGHES, B. et al. Benefit-risk assessment of vitamin D supplementation. **Osteoporos Int**, v, 21, p. 1121-1132, 2010.

BOLLAND, M. J.; AVENELL, A.; BARON, J. A., et al. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. **BMJ**, v. 341, p. 3691, 2010.

BOLLAND, M. J.; BARBER, P. A.; DOUGHTY, R. N., et al. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomised controlled trial. **BMJ**, v. 336, p. 262–266, 2008.

BOLLAND, M. J.; GREY, A.; REID, I. R. Should we prescribe calcium or vitamin D supplements to treat or prevent osteoporosis? **Climacteric**, v. 18, p. 22-31, 2015.

BOLLAND, M. J.; LEUNG, W.; TAI, V., et al. Calcium intake and risk of fracture: systematic review. **BMJ**, 2015.

BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, Viçosa, v.21, p.73-85, 1974.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. PORTARIA Nº 224, DE 26 DE MARÇO DE 2014. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose.

CANCELA, M.L.; CONCEIÇÃO, N.; LAIZÉ, V. Gla-Rich Protein, a New Player in Tissue Calcification? **Adv. Nutr**, v. 3, p. 174–181, 2012.

COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de minerais. **Rev Nutr**, v. 10, p. 87-98, 1997

de VILLIERS T. J. The role of menopausal hormone therapy in the management of osteoporosis. **Climacteric**, v. 18, p. 19-21, 2015.

DREHER, I.; SCHÜTZE, N.; BAUR A.; HESSE, K.; SCHNEIDER, D.; KÖHRLE, J.; JAKOB, F. Selenoproteins are expressed in fetal human osteoblast-like cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 245, n. 1, p. 101-107, 1998.

DURÁN, J. H. R. Biofísica - Fundamentos e Aplicações - 2ª Ed. São Paulo: Pearson Education, 2011. 408p.

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; CASTRO, M. A., et al. Ingestão inadequada de nutrientes na população de idosos do Brasil: Inquérito Nacional de Alimentação 2008-2009. **Rev Saúde Pública [online]**, v. 47, p. 222-230, 2013.

FU, X.; MOREINES, J.; BOOTH, S. L. Vitamin K supplementation does not prevent bone loss in ovariectomized Norway rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 12, 2012.

HARA, K.; KOBAYASHI, M.; AKIYAMA, Y. Vitamin K2 (menatetrenone) inhibits bone loss induced by prednisolone partly through enhancement of bone formation in rats. **Bone**, v. 31, p. 575-581, 2002.

HAUSCHKA, P. V.; LIAN, J. B.; COLE, D. E.; GUNDBERG, C. M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. **Physiol Rev**, v. 69, p. 990–1047, 1989.

ICHIKAWA, T.; HORIE-INOUE, K.; IKEDA, K.; BLUMBERG, B.; INOUE, S. Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. **J Mol Endocrinol**, v. 39, p. 239–247, 2007.

IOM (Institute of Medicine), Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, The National Academies Press, Washington, D.C, 2011, pp. 362–384.

IWAMOTO, J.; MATSUMOTO, H.; TAKEDA, T.; SATO, Y.; LIU, X.; YEH, J. K. Effects of vitamin K2 and risedronate on bone formation and resorption, osteocyte lacunar system, and porosity in the cortical bone of glucocorticoid-treated rats. **Calcif Tissue Int**, v. 83, p. 121-128, 2008.

KATSUYAMA, H.; FUSHIMI, S.; YAMANE, K. et al. Effect of vitamin K2 on the development of stress-induced osteopenia in a growing senescence-accelerated mouse prone 6 strain. **Exp Ther Med**, v. 10, p. 843-850, 2015.

KOBAYASHI, M.; HARA, K.; AKIYAMA, Y. Effects of vitamin K2 (menatetrenone) on calcium balance in ovariectomized rats. **Jpn J Pharmacol**, v. 88, p. 55-61, 2002.

KOITAYA, N.; EZAKI, J.; NISHIMUTA, M. et al. Effect of Low Dose Vitamin K2 (MK-4) Supplementation on Bio-Indices in Postmenopausal Japanese Women. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 55, p. 15-21, 2009.

KUCHUK, N. O.; PLUIJM, S. M.; VAN SCHOOR, N. M. et al. Relationships of serum 25-hydroxyvitamin D to bone mineral density and serum parathyroid hormone and markers of bone turnover in older persons. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, p. 1244–1250, 2009.

LINS, A. P. M.; SICHIERI, R. Influência da menopausa no índice de massa corporal. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, p. 265-270, 2001.

MAWATARI, T.; MIURA, H.; HIGAKI, H. Effect of vitamin K2 on three-dimensional trabecular microarchitecture in ovariectomized rats. **J Bone Min Res**, v. 15, p. 1810-1817, 2000.

MEGANATHAN, R. Biosynthesis of menaquinone (Vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q): a perspective on enzymatic mechanisms. **Vitam Horm**, v. 61, p. 173–218, 2001.

MICHAËLSSON, K.; MELHUS, H.; WARENSJÖ LEMMING, E., et al. Long term calcium intake and rates of all cause and cardiovascular mortality: community based prospective longitudinal cohort study. **BMJ**, v. 346, p. 228, 2013

- ONODERA, K.; TAKAHASHI, A.; WAKABAYASHI, H., et al. Effects of menatetrenone on the bone and serum levels of vitamin K2 (menaquinone derivatives) in osteopenia induced by phenytoin in growing rats. **Nutrition**, v. 19, p. 446-450, 2003.
- OTOMO, H.; SAKAI, A.; IKEDA, S., et al. Regulation of mineral-to-matrix ratio of lumbar trabecular bone in ovariectomized rats treated with risedronate in combination with or without vitamin K2. **J Bone Miner Metab**, v. 22, p. 404-414, 2004.
- PUCAJ, K.; RASMUSSEN, H.; MØLLER, M.; PRESTON, T. Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K2, menaquinone-7. **Toxicol Mech Method**, v. 21, n. 7, p. 520–532, 2011.
- RAO, L. G.; MACKINNON, E. S.; JOSSE, R. G.; MURRAY, T. M.; STRAUSS, A.; RAO, A. V. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women. **Osteoporos Int**, v. 18, p. 109-115, 2007.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- REID, I. R.; BRISTOW, S. M.; BOLLAND, M. J. Calcium supplements: benefits and risks. **J Intern Med**, v. 278, p. 354-368, 2015.
- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M. A.; RUIZ-RAMOS, M.; CORREA-MUÑOZ, E.; MENDOZA-NÚÑEZ, V. M. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. **BMC Musculoskel Dis**, v. 8, 124, 2007.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. Análises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ, 1974. 56p.
- SCHINKE, T.; MCKEE, M. D.; KARSENTY, G. Extracellular matrix calcification: where is the action? **Nat Genet**, v. 21, p. 150–151, 1999.
- SONTAKKE, A. N.; TARE, R. S. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. **Clin Chim Acta**, v. 318, p. 145-148, 2002.
- STRÖHLE, A.; HADJI, P.; HAHN, A. Calcium and bone health--goodbye, calcium supplements? **Climacteric**, v. 18, p. 702-714, 2015.
- TASCI, A. G.; BILGILI, H.; ALTUNAY, H.; GECIT, M. R.; KESKIN, D. Prospective evaluation of Vitamin K2, Raloxifene and their co-administration in osteoporotic rats. **Eur J Pharm Sci**, v. 43, p. 270–277, 2011.
- THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; KE, H. Z. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, p. 125-133, 1995.
- URAYAMA, S.; KAWAKAMI, A.; NAKASHIMA, T., et al. Effect of vitamin K2 on osteoblast apoptosis: vitamin K2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblasts

induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine. **J Lab Clin Med**, v. 136, p. 181–193, 2000.

VELLASCO, C. R.; GOMES, P. C.; DONZELE, J. L. et al. Níveis de cálcio e relação cálcio:fósforo em rações para poedeiras leves de 24 a 40 semanas de idade. **Cienc anim bras**, v.17, p. 206-216, 2016.

WU, W.; LEE, H.; LEE, G.; CHAE, H.; AHN, B. The antiosteoporotic effects of cheonggukjang containing vitamin K2 (menaquinone-7) in ovariectomized rats. **J Med Food**, v. 17, p. 1298-1305, 2014.

YAMAGUCHI, M.; KAKUDA, H.; GAO, Y. H.; TSUKAMOTO, Y. Prolonged intake of fermented soybean (natto) diets containing vitamina K2 (menaquinone-7) prevents bone loss in ovariectomized rats. **J Bone Miner Metab**, v. 18, n. 2, p. 71-76, 2000.

ZHANG, Y.; FENG, B. Systematic review and meta-analysis for the association of bone mineral density and osteoporosis/osteopenia with vascular calcification in women. **Int J Rheum Dis**, 2016.

8. ARTIGO III

VITAMINA K2 DIMINUI O CONTEÚDO DE CÁLCIO NOS VASOS E MELHORA O ESTADO ANTIOXIDANTE DE RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA POR OVARIECTOMIA

RESUMO

Na osteoporose, a saída de cálcio (Ca) do osso pode aumentar a deposição desse mineral em tecidos moles, como os vasos. Em humanos com perda de massa óssea, suplementos de cálcio têm sido associados à piora da função vasomotora e ao maior risco de infarto do miocárdio. Nesse estudo, avaliamos ação da vitamina K2, de forma isolada ou combinada aos suplementos de cálcio e vitamina D3, no conteúdo de cálcio nos vasos, no estresse oxidativo, bem como avaliamos a toxicidade hepática e renal associada às suplementações em ratas com perda óssea induzida por ovariectomia (ovx). Após 6 semanas das cirurgias, os animais foram divididos em grupos: (1) controle-sham (incisão abdominal sem retirada dos ovários) não tratado; (2) controle-ovx não tratado; (3) ovx + Ca; (4) ovx + K2 (5) ovx + Ca + K2 (6) ovx + Ca + D3 (7) ovx + Ca + K2 + D3. Após quatro semanas de tratamento, os animais suplementados até então com cálcio e vitamina D3, passaram a receber cálcio e vitamina K2, afim de avaliar o efeito da troca de tratamento. Foram realizadas dosagens séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteína total, albumina, cálcio, ácido úrico e uréia. Análises histológicas foram realizadas na aorta abdominal, coração, fígado e rim. No fígado também foi verificada função antioxidante, com análise da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa-S-transferase (GST), malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (ON). O conteúdo de cálcio nos vasos foi determinado por espectrometria de absorção atômica. Dentre os principais achados, estão a ausência de diferença da AST e ALT entre os grupos, indicando a não toxicidade dos tratamentos. A ovariectomia promoveu diminuição da CAT e SOD nos animais tratados ou não. Todos os grupos tratados com K2, de forma isolada ou associada aos outros suplementos, apresentaram melhora da função antioxidante, com aumento da GST e diminuição do MDA da quarta para a oitava semana, diferente dos grupos que não receberam vitamina K2. Ressaltamos que o grupo antes tratado com Ca+D3, que passou a receber Ca+K2 a partir da quarta semana teve os níveis de GST aumentados. Não houve diferença na histomorfometria do rim, fígado, coração e vasos. Apenas a suplementação isolada de vitamina K2 promoveu a diminuição do conteúdo de cálcio nos vasos em relação ao grupo sham. A osteoporose,

associada ou não ao suplemento de cálcio não induziu a calcificação vascular nesse modelo animal.

Palavras-chave: calcificação vascular; estresse oxidativo; menaquinona, suplemento de cálcio.

8.1 INTRODUÇÃO

A saúde óssea e de diversos tecidos moles é interligada por mecanismos metabólicos, endócrinos e celulares, suscetíveis de modulação por aspectos nutricionais. A osteoporose e a calcificação de tecidos moles compartilham mecanismos fisiopatológicos comuns, que explica a progressão simultânea desses eventos e sugere a existência de terapias comuns. A saída de cálcio do osso pode aumentar a concentração desse mineral na corrente sanguínea e, conseqüentemente, sua deposição em tecidos moles, principalmente quando associada ao uso de suplementos de cálcio (MCFARLANE et al., 2004). Depósitos de cálcio em artérias coronárias podem comprometer respostas vasomotoras e reduzir a elasticidade, aumentando os riscos de hipertensão arterial, estenose da aorta, hipertrofia cardíaca, infarto do miocárdio, isquemia de membros inferiores e pedras nos rins (LAMPROPOULOS; PAPAIOANNOU; D'CRUZ, 2012; JACKSON et al., 2006; BOLLAND; GREY; REID, 2013). Assim, a ampla recomendação do uso de suplementos de cálcio demonstra a distância ainda existente entre as evidências científicas e a prática clínica. Além disso, a função vascular também é comprometida pelo estresse oxidativo, marcado pelo desequilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio, que contribui marcadamente para a disfunção endotelial.

No contexto de fisiopatologia e terapias comuns para osteoporose e calcificação vascular, surge a vitamina K₂, ainda pouco usada na prática clínica, mas que possui funções positivas no metabolismo ósseo (HARA; KOBAYASHI; AKIYAMA, 2002; IWAMOTO et al., 2008; ONODERA et al., 2003; IWAMOTO; TAKEDA; SATO, 2006; HUANG; WAN; LU, 2014) e na redução do dano e calcificação de tecidos moles (LUO et al., 1997; MCCABE et al., 2013; PRICE; FAUS; WILLIAMSON, 1998; ABEDIN; TINTUT; DEMER, 2004; BRANDENBURG et al., 2015; SHEA; HOLDEN, 2012). A vitamina K₂ é cofator de proteínas promotoras da formação óssea, como a osteocalcina e Gla rich protein, e de proteínas inibidoras da calcificação de tecidos moles, como a proteína Gla da matriz (MGP) (DALMEIJER et al., 2012; SCHINKE; MCKEE; KARSENTY, 1999). A vitamina K₂, ou menaquinona (MK), está presente, de forma não muito abundante, em certos alimentos, como ovos, vísceras e alimentos fermentados,

como queijos, coalhada e chucrute. O alimento mais rico nessa vitamina, a soja fermentada (“*natto*”), é alimento típico da culinária japonesa (SATO; SCHURGERS; UENISHI, 2012). A vitamina K2 também pode ser produzida a partir da vitamina K1, presente principalmente em vegetais de folhas verdes, pela bactéria *Escherichia coli* no intestino humano (MEGANATHAN, 2001; SCHURGERS; VERMEER, 2000).

O objetivo desse estudo foi verificar a ocorrência de calcificação vascular associada a suplementação de cálcio, bem como a ação da vitamina K2, de forma isolada ou combinada ao suplemento de vitamina D3 sobre a calcificação vascular. Também analisamos o efeito dos tratamentos no estresse oxidativo e na integridade hepática e renal de ratas com perda óssea induzida por ovariectomia.

8.2. MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Animais

Setenta ratas (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação *albinus*) foram adquiridas, com 30 dias de vida, no Biotério Central da UFV. Os animais receberam ração comercial, até a data do início dos tratamentos, e água deionizada *ad libitum* e foram alojados em gaiolas individuais de aço inox, em ambiente com temperatura controlada a 22° C e ciclo claro e escuro de 12 horas.

8.2.2 Indução da osteoporose por ovariectomia

Ao atingir 12 semanas, os animais foram submetidos à ovariectomia (ovx), com incisão abdominal e retirada dos ovários, ou à laparotomia (ctr-sham), com incisão abdominal sem retirada dos ovários, para induzir o estresse cirúrgico e seus efeitos (cirurgia controle). Ovx promove redução da formação óssea e aumento da reabsorção, semelhante ao observado em mulheres após a menopausa devido a deficiência de estrogênio (THOMPSON et al., 1995).

Trinta minutos antes do início das cirurgias de ovariectomia e laparotomia, os animais receberam, via subcutânea, o anti-inflamatório flunixinameglumina (0,68 mg/kg) e o antibiótico enrofloxocina (10 mg/kg). Os animais foram anestesiados com isoflurano 100% diluído em oxigênio, por via inalatória, por meio de vaporizador calibrado. A concentração do isoflurano foi ajustada de forma a manter o plano anestésico adequado. Após a indução e estabilização anestésicas, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre colchão com aquecimento ativo e o campo operatório foi preparado com iodopovidona a 10%. Foi administrado, via subcutânea, o analgésico morfina na dose de 5 mg/kg.

Após as cirurgias, os animais permaneceram em câmara aquecida, a fim de manter a temperatura corporal, e em seguida retornaram às gaiolas individuais. Os procedimentos anestésico-cirúrgicos e pós-cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da UFV sob a responsabilidade da Médica Veterinária Lukiya Silva Campos Favarato.

O período de indução da osteoporose após a OVX foi de 6 semanas prévias ao início da intervenção, em que as ratas permaneceram em gaiolas individuais e receberam dieta comercial em pellets e água *ad libitum*.

8.2.3 Composição da dieta padrão

A dieta padrão foi elaborada de acordo com o recomendado na AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1939). Dentre os conteúdos de micronutrientes dessa dieta, destacam-se os que foram suplementados no período de intervenção: vitamina K (750 UI/kg de dieta), vitamina D₃ (1000 UI/kg de dieta), cálcio (5000 mg/kg de dieta). Vale ressaltar que o conteúdo de vitamina K corresponde à vitamina K1. A dieta AIN-93M é isenta de vitamina K2.

8.2.4 Dosagens dos suplementos

A dosagem usada dos suplementos de cálcio e vitamina D3 foi proporcional às recomendações das *Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose* (BRASIL, 2014) para humanos. Nós verificamos a porcentagem recomendada de suplementação de em relação às *Dietary References Intakes* (DRIs) para mulheres de 51-70 anos (IOM, 2011) e adicionamos a mesma porcentagem na dieta padrão para ratos, AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1939). A DTO recomenda suplementar, em média, 1x e 1,67x as DRIs de cálcio e vitamina D3, respectivamente (FISBERG et al., 2013). Seguindo essa proporção, adicionamos à dieta dos animais 5000 mg/kg de dieta de carbonato de cálcio e 1670 UI/kg de dieta de vitamina D3.

Não há recomendações oficiais de vitamina K2 para humanos e animais. Dessa forma, determinamos a suplementação a partir de estudos anteriores de toxicidade e para o tratamento da osteoporose em animais. Em estudos experimentais, é grande a amplitude de variação das dosagens usadas, de 141 µg/kg de dieta (YAMAGUCHI et al., 2000) a 201 mg/kg de dieta (FU et al., 2012) de MK-7. Doses muito elevadas de MK-7 não demonstraram toxicidade aguda em ratos, com administração diária de 2000 mg/kg de peso corporal, ou subcrônica, com administração de 2,5, 5 ou 10 mg/kg de peso corporal (PUCAJ et al., 2011). No presente estudo, o conteúdo de MK-7 adicionado à dieta foi de

12,5 mg/kg de dieta, que resultou em 718 µg/kg de peso do animal/dia ou, considerando o peso médio dos animais ao longo do experimento, 180 µg/dia, próximo a dosagens já utilizadas anteriormente (KNAPEN et al., 2015; DALMEIJER et al., 2012).

8.2.5 Grupos experimentais e eutanásia

Após 6 semanas da cirurgia, os animais foram distribuídos, pelo método de estratificação por peso corporal, em 7 grupos de 10 animais, sendo eles: (1) controle-sham (incisão abdominal sem retirada dos ovários) não tratado; (2) controle-ovx não tratado; (3) ovx + Ca; (4) ovx + K2 (5) ovx + Ca + K2 (6) ovx + Ca + D3 (7) ovx + Ca + K2 + D3.

Após a 4ª semana de tratamento, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados. Os outros cinco animais de cada grupo foram eutanasiados ao final da 8ª semana de tratamento, a fim de verificar o efeito do tempo de suplementação. A partir da 4ª semana, as dietas experimentais permaneceram idênticas, exceto para o grupo que recebia Ca+D3 (grupo 6), que passou a receber Ca+K2. Esse procedimento foi realizado para verificar o efeito da alteração do tratamento convencional para o tratamento com vitamina K2.

As eutanásias ocorreram após jejum de 12 horas, por exsanguinação/punção cardíaca nos animais anestesiados com Isoflurano (Isoforine, Cristália®). Cerca de 6 mL de sangue foram coletados usando agulha inserida no ventrículo esquerdo. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos à 4° C. Foram retirados e lavados em tampão PBS o coração, fígado, rins, aorta abdominal, aorta torácica, artéria renal e artéria carótida. O armazenamento foi feito em formalina 10% para histologia ou congelados a -80°C para outras análises.

8.2.6 Peso e consumo alimentar

Os pesos dos animais e a ingestão alimentar foram monitorados semanalmente. O ganho de peso corporal total foi determinado pela diferença entre os pesos no dia da eutanásia e o do primeiro dia de experimento. Foi calculado o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), de acordo com a fórmula: $CEA = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{consumo alimentar (g)}}$.

8.2.7 Dosagens sanguíneas

Foram feitas as dosagens séricas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteínas totais, albumina, cálcio, ácido úrico e uréia. As

análises foram feitas por colorimetria, usando o equipamento BS200 e kits específicos, fornecidos pela Bioclin®.

8.2.8 Análises histológicas

Após coleta e lavagem em tampão PBS, a aorta abdominal, fragmentos do coração (ventrículos), fígado (lobo quadrado) e rim esquerdo foram fixados em formalina 10% por 24 horas e em seguida, armazenados em álcool 70%.

Para cada amostra, seis seções de 5 µm de cada foram cortadas com micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. As análises microscópicas das lâminas foram realizadas com aumento de 40x. As lâminas de aorta, coração, fígado e rim foram analisadas por médico veterinário com experiência em patologia. Na aorta abdominal foram analisados degeneração, infiltrado celular, necrose, deposição de gordura (aterosclerose) e calcificação. No coração foi observada a presença de infiltrado inflamatório, congestão e hemorragia. No fígado foram analisados vacuolização de gordura, infiltrado inflamatório, congestão, as porcentagens de núcleo, citoplasma, gordura, hepatócito e de macrófagos e os volumes nuclear, citoplasmático e celular. Nas lâminas dos rins foram analisados dilatação glomerular, congestão glomerular, necrose tubular, dilatação tubular, congestão tubular e infiltrado inflamatório. A avaliação dos parâmetros foi realizada por sistema de classificação em 0, 1 ou 2, identificando em ordem crescente o grau de comprometimento do tecido.

8.2.9 Atividade antioxidante

Amostras de 150 mg do fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato pH 7,4 e a suspensão centrifugada a 12000 g a 4° C por 10 minutos. A concentração de proteína total foi determinada segundo Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade da catalase (CAT) foi determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mmol.L⁻¹) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60 segundos (AEBI, 1984). A atividade da CAT foi expressa em U CAT/mg proteína. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa com leitura da absorbância em 570 nm, baseada na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O₂. em peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (DIETERICH et al., 2000). A atividade da SOD foi expressa em U SOD/mg proteína. A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi mensurada por meio da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340 nm por 60 segundos. A formação do conjugado ocorre

espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não-enzimática, sendo acelerada pela atividade da enzima GST. Uma unidade de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1 mol do conjugado glutationa-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDNB $340 = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos (HABIG et al., 1974). A atividade da GST foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ proteína.

Para determinação dos metabólitos da ação de espécies oxidantes (indicativo da peroxidação lipídica) foi feita a mensuração da concentração de malondialdeído (MDA). Ao sobrenadante foi adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15% e 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCL 0,25 N) em banho-maria por 15 minutos, resfriado, centrifugado a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante mensurado em espectrofotômetro com leitura da absorbância em 535 nm (BUEGE; AUST, 1978). Os cálculos foram feitos utilizando-se o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^{-5} \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$. A concentração do MDA foi expressa em nmol/mg proteína.

Para avaliar a concentração de óxido nítrico (NO), o nitrito foi usado como indicador da síntese de óxido nítrico. O nitrito é detectado pelo Reativo de Griess, composto por 1 % de sulfanilamida e 0.1 % naftil-etileno-diamina em 2.5 % H₃PO₄. Desta forma, 50 μL do sobrenadante das amostras foi adicionado em microplacas com igual volume do Reativo de Griess e incubado a temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida foi feita a leitura da absorbância em 540nm. A concentração do óxido nítrico das amostras foi determinada utilizando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio e expressas em μM .

8.2.10 Conteúdo de cálcio nos vasos

A amostra utilizada para a quantificação de cálcio consistiu em um *pool* formado pela aorta torácica, aorta abdominal e artéria carótida. As amostras foram secas em estufa de circulação forçada durante 72h a uma temperatura entre 68-72°C e, em seguida, foram pesadas em balança de precisão e moídas. Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas e descontaminadas com solução de HCl 2%. As amostras passaram por digestão com os ácidos nítrico e perclórico, na proporção 4:1. O conteúdo de cálcio foi determinado com a utilização de espectrofotômetro de absorção atômica.

8.2.11 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. ANOVA one-way e o teste post-Hoc Duncan foram utilizados para verificar a diferença entre as médias dos

diferentes grupos. A diferença nas médias da semana 4 e da semana 8, do mesmo grupo foi verificada pelo teste t de Student. O nível de significância estabelecido foi de menos de 5%.

8.2.12 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, após a apreciação deste estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisas com animais da UFV (Protocolo número 068/2016).

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Massa corporal e consumo alimentar

Não houve diferença entre os grupos e ao longo do tempo em relação ao ganho de peso dos animais. Os grupos também não diferiram em relação ao coeficiente de eficiência alimentar (CEA), entretanto diferença nesse parâmetro foi observada ao longo do tempo, com redução nos grupos tratados com Ca+K2 e após a mudança de tratamento de Ca+D3 para Ca+K2, da quarta para a oitava semana (Tabela 1).

Tabela 1: Ganho de peso e coeficiente de eficiência alimentar dos animais dos diferentes grupos experimentais, nas semanas 4 e 8. Dados expressos em média (desvio padrão).

Tratamento	Ganho de peso [#]		Coeficiente de eficiência Alimentar*	
	4	8	4	8
Semana				
Ctr-sham	18,8 (13,1)	33,6 (13,8)	1,6 (1,1) ¹	1,6 (0,9) ¹
Ctr-ovx	27,4 (9,4)	15,4 (15,6)	1,1 (1,2) ¹	1,3 (0,7) ¹
Ca	25,5 (12,8)	14,4 (11,4)	1,1 (0,7) ¹	1,2 (0,7) ¹
K2	18,1 (11,2)	11,0 (24,8)	1,3 (0,5) ¹	0,8 (1,1) ¹
Ca+K2	1,6 (51,1)	29,6 (16,8)	1,0 (2,1) ¹	0,9 (2,2) ²
Ca+D3/Ca+K2	-13,6 (21,2)	30,6 (41,9)	0,5 (2,1) ¹	0,4 (2,3) ²
Ca+K2+D3	27,3 (13,5)	12,2 (13,5)	1,2 (0,9) ¹	1,1 (0,9) ¹

Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio; K2: vitamina K2; D3: vitamina D3. ANOVA para verificar diferença entre grupos; teste t para diferença no grupo ao longo do tempo. Números indicam diferença no mesmo grupo, ao longo do tempo. * indica ausência de diferença entre grupos; [#]indica ausência de diferença entre grupos e ao longo do tempo.

8.3.2 Análises bioquímicas

Não houve diferença entre os grupos quanto aos níveis de uréia, ácido úrico, AST e ALT. Na quarta e oitava semanas, os valores de proteína total e albumina foram mais

altos no grupo ctr-sham em relação aos demais, que por sua vez não diferiram entre si, com exceção do grupo Ca+D3, que apresentou proteína total menor do que os grupos ctr-ovx, Ca e K2. Da quarta para a oitava semana de tratamento, os níveis de albumina ficaram constantes apenas nos grupos Ca+K2, após troca de tratamento, e Ca+K2+D3, apresentando redução nos demais grupos; níveis de ácido úrico aumentaram no ctr-sham, ctr-ovx, K2 e Ca+K2+D3. ALT aumentou nos grupos ctr-ovx, Ca e K2, e AST aumentou no grupo Ca+K2+D3, que também apresentou aumento de proteína total. Não observamos nenhuma diferença estatística quanto aos níveis de uréia (Tabela 2).

Tabela 2: Marcadores bioquímicos plasmáticos dos animais dos diferentes grupos experimentais, nas semanas 4 e 8. Dados expressos em média (desvio padrão).

Tratamento/ Semana	Ácido úrico (mg.dL ⁻¹)	Uréia (mg.dL ⁻¹)	AST (U.L ⁻¹)	ALT (U.L ⁻¹)	Proteína total (g.dL ⁻¹)	Albumina (g.dL ⁻¹)
Ctr-sham						
4	0.4 (0.2) ²	27.1 (4.3) ¹	141.4 (25.3) ¹	39.2 (9.7) ¹	6.9 (0.1) ^{a,1}	3.7 (0.1) ^{a,1}
8	1.2 (0.4) ¹	32.7 (7.9) ¹	189.8 (66.1) ¹	43.0 (11.8) ¹	6.8 (0.1) ^{a,1}	3.3 (0.2) ^{a,2}
Ctr-ovx						
4	0.5 (0.2) ²	27.9 (6.5) ¹	150.0 (45.6) ¹	36.8 (5.1) ²	6.3 (0.2) ^{b,1}	3.1 (0.2) ^{b,1}
8	0.9 (0.3) ¹	29.4 (3.3) ¹	169.7 (41.4) ¹	44.2 (7.1) ¹	6.2 (0.1) ^{b,1}	2.7 (0.1) ^{b,2}
Ca						
4	0.6 (0.2) ¹	29.7 (4.7) ¹	123.0 (28.9) ¹	30.4 (4.9) ²	6.3 (0.3) ^{b,1}	3.2 (0.1) ^{b,1}
8	0.8 (0.2) ¹	25.8 (6.0) ¹	168.4 (39.0) ¹	40.8 (5.0) ¹	6.1 (0.3) ^{b,1}	2.8 (0.1) ^{b,2}
K2						
4	0.5 (0.1) ²	28.7 (1.9) ¹	147.2 (48.5) ¹	34.0 (6.5) ²	6.1 (0.4) ^{b,1}	3.2 (0.2) ^{b,1}
8	1.0 (0.5) ¹	25.6 (3.7) ¹	208.4 (69.9) ¹	46.7 (7.4) ¹	6.2 (0.3) ^{b,1}	2.8 (0.1) ^{b,2}
Ca+K2						
4	0.7 (0.3) ¹	33.9 (6.7) ¹	150.2 (40.8) ¹	40.2 (9.1) ¹	5.9 (0.4) ^{b,c,1}	3.2 (0.3) ^{b,1}
8	0.9 (0.1) ¹	29.6 (5.9) ¹	156.2 (16.1) ¹	38.8 (4.8) ¹	6.2 (0.2) ^{b,1}	2.6 (0.2) ^{b,2}
Ca+D3/Ca+K2						
4	0.6 (0.2) ²	29.1 (5.8) ¹	125.6 (20.8) ²	33.2 (2.9) ²	5.6 (0.6) ^{b,c,1}	3.1 (0.3) ^{b,1}
8	0.8 (0.2) ¹	32.0 (6.5) ¹	169.0 (42.3) ¹	43.6 (11.0) ¹	6.2 (0.3) ^{b,1}	2.8 (0.1) ^{b,1}
Ca+K2+D3						
4	0.5 (0.1) ²	27.0 (6.1) ¹	124.2 (15.6) ²	35.0 (9.1) ¹	5.9(0.2) ^{b,c,2}	3.0 (0.3) ^{b,1}
8	1.1 (0.4) ¹	26.4 (3.5) ¹	163.0 (25.7) ¹	36.7 (7.5) ¹	6.3 (0.2) ^{b,1}	2.8 (0.1) ^{b,1}

Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio; K2: vitamina K2; D3: vitamina D3. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. ANOVA post-Hoc Newman-Keuls para diferença entre grupos; teste t para diferença no grupo ao longo do tempo. Números indicam diferença no mesmo grupo, ao longo do tempo. Letras indicam diferenças entre grupos. * indica ausência de diferença entre grupos; # indica ausência de diferença entre grupos e ao longo do tempo.

7.3.3 Estresse oxidativo do fígado

O grupo sham apresentou, na quarta semana, níveis reduzidos de catalase em relação aos demais grupos, entretanto, com o aumento desse marcador no grupo sham, essa diferença desapareceu na oitava semana. O grupo sham também apresentou, da quarta para a oitava semana, aumento de SOD, o que fez com os animais desse grupo apresentassem níveis aumentados desse marcador, assim como o grupo ctr-ovx, em relação aos demais grupos.

O grupo que recebia Ca+D3 até a quarta semana apresentou o menor valor de GST. Após a troca de tratamento (de Ca+D3 para Ca+K2), foi verificado aumento da GST. Aumento da GST também foi verificado da quarta para a oitava semana nos demais grupos, exceto os controles. Aumento de MDA foi verificado em todos os grupos que não foram tratados com vitamina K2, de forma isolada ou conjunta com vitamina D3 e cálcio, de forma que diferença entre os grupos K2 e Ca+K2 em relação ao grupo ctr-ovx foi verificada na oitava semana. Ausência de diferença entre os grupos foi verificada quanto aos níveis de óxido nítrico, sendo verificado aumento desse marcador apenas ao longo do tempo no grupo que recebeu Ca+K2 (Figura 1)

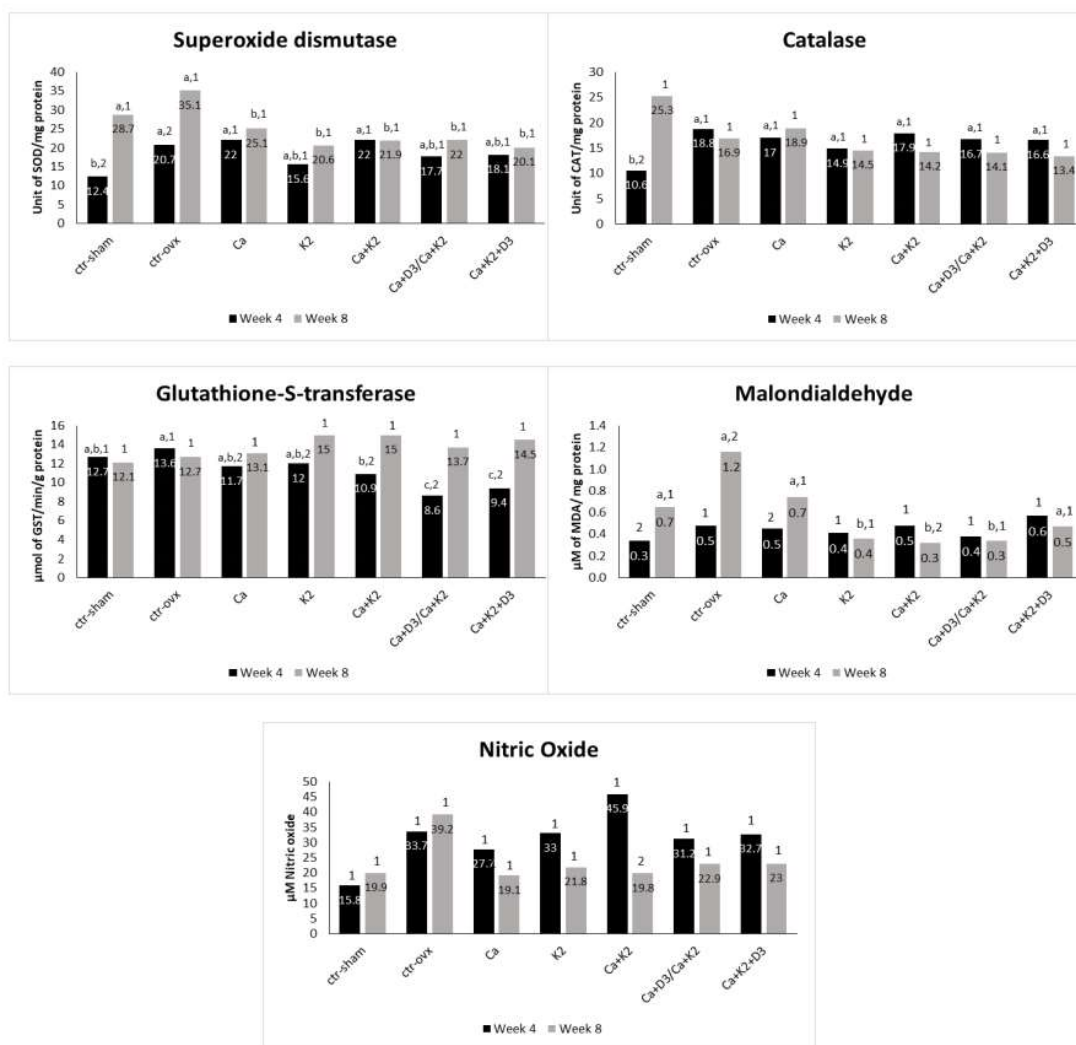


Figura 1 Marcadores de atividade antioxidante no fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais, nas semanas 4 e 8. SOD: Superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutathione-S-transferase; MDA: Malondialdeído; ON: óxido nítrico. Ca: cálcio; D3: vitamina D3; K2: vitamina K2. ANOVA e post-Hoc Duncan. Letras indicam diferença entre os grupos. Números indicam diferença no mesmo grupo, ao longo do tempo. MDA e ON na semana 4, e CAT, GST e ON na semana 8 não apresentaram diferença entre grupos.

8.3.4 Histomorfometria do fígado, coração, rins e vasos

Na análise histomorfométrica do fígado (Figura 2), assim como na do coração, rins e vasos, não foram observadas diferenças entre grupos e ao longo do tempo, em nenhum dos parâmetros analisados.

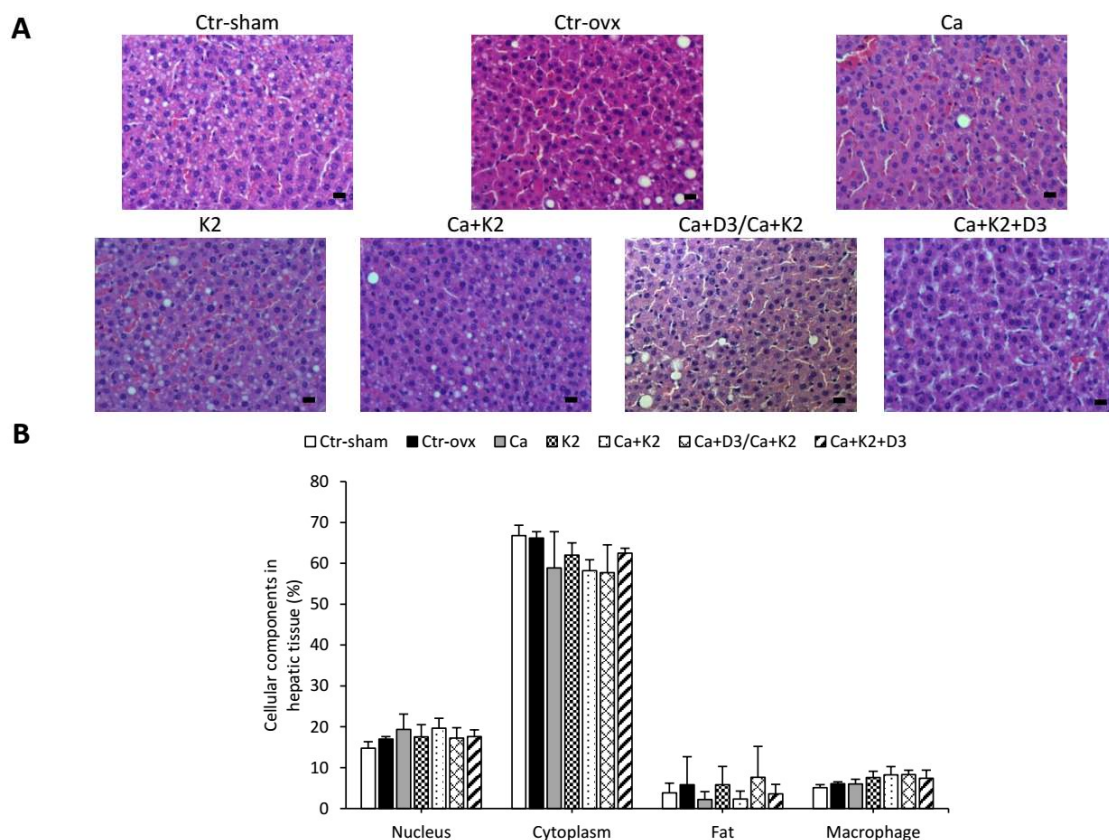


Figura 2 A) Exemplos de lâminas histológicas do fígado de animais dos diferentes grupos experimentais **B)** Análise da quantificação de componentes celulares do tecido hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais. Ctr-sham: Controle não osteoporótico; Ctr-ovx: controle osteoporótico; Ca: cálcio; K2: vitamina K2; D3: vitamina D3.

8.3.5 Conteúdo de cálcio dos vasos

Apenas a suplementação isolada de vitamina K2 promoveu a diminuição do conteúdo de cálcio em relação ao grupo sham e Ca+K2 (após troca de tratamento) (Figura 3).

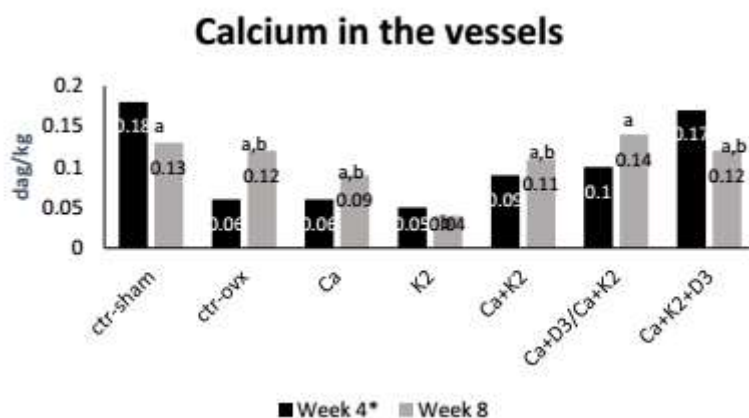


Figura 3. Quantificação de cálcio nos vasos por espectrofotometria de absorção atômica, dos animais dos diferentes grupos experimentais, nas semanas 4 e 8. Ca: cálcio; D3: vitamina D3; K2: vitamina K2; dag: decagrama. ANOVA e post-Hoc Duncan. Letras indicam diferença entre os grupos. Números indicam diferença no mesmo grupo, ao longo do tempo. *indica ausência de diferença entre grupos.

8.4 DISCUSSÃO

A presença de cristais de cálcio nas análises histológicas do vaso, esperada devido à mobilização de cálcio em animais ovariectomizados deficiência de estrogênio que o direciona para o osso, especialmente nos animais suplementados com cálcio, devido à maior presença desse mineral associada à, não foi observada nesse estudo. Ainda que não tenha sido observado aumento do conteúdo de cálcio nos vasos dos animais em relação ao grupo ctr-sham, verificamos que o menor conteúdo de cálcio nos vasos foi encontrado nos animais tratados com vitamina K2. O grupo tratado com vitamina K2 apresentou diferença apenas com o ctr-sham, entretanto, os animais do grupo K2 apresentam conteúdo de cálcio nos vasos em média 2,5 vezes inferior a todos os outros grupos. Tal diferença não foi observada nas análises histológicas, mas sim na quantificação de cálcio nos vasos. Além disso, a vitamina K2 melhorou, de forma geral, o estado antioxidante no fígado dos animais.

Estudos anteriores verificaram a ação da vitamina K2 em prevenir e tratar a calcificação vascular, em humanos e animais (LUO et al., 1997; PRICE; FAUS; WILLIAMSON, 1998; ABEDIN; TINTUT; DEMER, 2004; SCHURGERS et al., 2007; SHEA; HOLDEN, 2012; MCCABE et al., 2013; BRANDENBURG et al., 2015). Não encontramos estudos anteriores com animais que tentassem induzir a calcificação vascular com suplementos de cálcio. A maioria dos estudos comprova a ação da vitamina K2 em reverter a calcificação vascular induzida por medicamentos antagonistas da vitamina K, como a varfarina, um anticoagulante comumente utilizado em pacientes em diálise, que inibe a reciclagem da vitamina K. A vitamina K atua como substrato da γ -glutamil carboxilase, essencial na ativação de várias proteínas da matriz extracelular que

inibem a calcificação, como a proteína Gla de matriz (MGP). A vitamina K2 inibiu a deposição de cálcio nas artérias dos animais, que foi aumentada em até 20x devido ao tratamento com varfarina (MCCABE et al., 2013).

Não observamos o aumento da deposição de cálcio nos vasos associada à suplementação de cálcio nos animais. Entretanto, sabe-se que, em humanos, o envelhecimento e a osteoporose estão associados à deposição de cálcio nos vasos, devido à migração de cálcio dos ossos para os tecidos moles (ABEDIN; TINTUT; DEMER, 2004; SCHINKE; MCKEE; KARSENTY, 1999). Além disso, os efeitos potencialmente nocivos da suplementação excessiva de cálcio na saúde cardiovascular são recentemente sugeridos. Suplementos de cálcio estão associados ao maior risco de calcificação dos vasos e infarto do miocárdio (MICHAËLSSON et al., 2013; BOLLAND et al., 2010; BOLLAND et al., 2008), uma vez que mulheres após a menopausa possuem diminuição dos níveis de estrogênio e, portanto, comprometida sinalização para deposição de cálcio no osso, propiciando o acúmulo de cálcio nos tecidos moles, como os vasos. Além disso, dados do *Auckland Calcium Study* indicam um aumento de 17% nos cálculos renais e de 20-40% no risco de infarto do miocárdio em mulheres que utilizam suplementos de cálcio, o que neutraliza qualquer possível benefício na prevenção de fraturas (REID; BRISTOW, BOLLAND et al., 2015).

No presente estudo não foram verificadas alterações, como deposição de cristais de cálcio, nas análises histológicas dos rins e coração. Suplementos de cálcio estão associados à maior incidência de pedras no trato urinário em humanos (WALLACE et al., 2011). Entretanto, não encontramos estudos com animais que verificassem tal efeito devido à suplementação de cálcio. Estudos com maior tempo de intervenção ou que usem dosagens maiores são necessários para verificar a ocorrência de depósitos de cristais de cálcio em tecidos moles.

Verificamos que a suplementação de vitamina K2, bem como a ovariectomia não promoveram alteração no acúmulo de gordura hepática dos animais. Também não observamos alterações na integridade hepática nos ratos associada ao tratamento com vitamina K2, assim como com as demais suplementações. Ausência de alteração em parâmetros semelhantes aos do presente estudo, como ALT, AST e análises histológicas de vacuolização hepática, inflamação no fígado e no coração e vacuolização, cálculo e inflamação no rim, foi observada em estudo com animais submetidos à administração de dose oral única de 2000 mg/kg de peso corporal bem como dosagens de 2,5, 5 e 10 mg/kg de peso corporal/dia, administradas por gavagem, durante 90 dias (PUCAJ et al., 2011).

No citado estudo, a dose utilizada foi de 3,5 a 14 vezes maior do que a utilizada no presente estudo (PUCAJ et al., 2011).

Além de não afetar a integridade hepática, observamos que vitamina K2 demonstrou melhorar a função antioxidante dos animais. Todos os grupos que receberam vitamina K2, de forma isolada ou combinada com outros suplementos, apresentaram, da 4ª para a 8ª semana, redução do MDA, produto final da peroxidação lipídica gerada pelo estresse oxidativo, e aumento da enzima detoxificante GST. Além disso, o grupo que recebia Ca+D3 apresentou até a 4ª semana valores reduzidos de GST em comparação com a maioria dos grupos e, ao trocar o tratamento para Ca+K2, da 4ª até a 8ª semana, essa diferença foi anulada. Embora a vitamina K não seja um antioxidante clássico, outros estudos também relataram essa função. Em estudo em culturas de células primárias precursoras de oligodendrócitos, as vitaminas K1 e K2 (MK-4) inibiram potencialmente o acúmulo de radicais livres e a morte celular oxidativa mediada pela depleção de glutathione, por mecanismo independente de sua conhecida função biológica como cofator para a gama-glutamylcarboxilase.

Assim como no presente estudo, em outros trabalhos também não foi observada diferença entre os grupos quanto à ocorrência de cálculos nos rins (GRANT et al., 2005; PRINCE et al., 2006; REID et al., 2006). No *Women's Health Initiative CaD trial* (WHI CaD), realizado com 36.282 mulheres na pós-menopausa, seguidas por 7 anos, os cálculos renais ocorreram em 2,3% dos participantes e suplementos de Ca+D aumentaram o risco de cálculos em 17% (JACKSON et al., 2006).

Neste estudo, a ausência de deposição de cálcio nos vasos dos animais osteoporóticos suplementados ou não com cálcio pode estar associada ao curto período de intervenção, não suficiente para observar os efeitos também encontrados em humanos, e/ou a suplementação de cálcio e a saída de cálcio dos ossos não foram suficientes para induzir a calcificação vascular. Estudos de longo prazo devem ser realizados para responder esta questão, bem como para confirmar se o modelo animal é adequado para verificar a ação do cálcio e da vitamina K2 na vasculatura.

Concluímos que os animais suplementados com vitamina K2 apresentaram menor quantidade de cálcio nos vasos comparados ao grupo controle, mostrando um possível benefício da vitamina na calcificação vascular. A saída de cálcio dos ossos devido à ovariectomia, associada a suplementação de cálcio não foram suficientes para induzir a deposição de cálcio nas artérias dos animais. De forma geral, a vitamina K2 melhorou o perfil antioxidante dos animais. Nenhum tratamento causou alterações na integridade hepática e renal dos animais.

Financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

8.5 REFERÊNCIAS

ABEDIN, M.; TINTUT, Y.; DEMER, L. L. Vascular Calcifications: Mechanisms and Clinical Ramifications. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 1161-1170, 2004.

ABEDIN, M.; TINTUT, Y.; DEMER, L. L. Vascular Calcifications: Mechanisms and Clinical Ramifications. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 1161-1170, 2004.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126, 1984.

BOLLAND, M. J.; AVENELL, A.; BARON, J. A., et al. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. **BMJ**, v. 341, p. 3691, 2010.

BOLLAND, M. J.; BARBER, P. A.; DOUGHTY, R. N., et al. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomised controlled trial. **BMJ**, v. 336, p. 262–266, 2008.

BOLLAND, M. J.; GREY, A.; REID, I. R. Calcium supplements and cardiovascular risk: 5 years on. **Ther Adv Drug Saf**, v. 4, p. 199-210, 2013.

BOLLAND, M. J.; GREY, A.; REID, I. R. Should we prescribe calcium or vitamin D supplements to treat or prevent osteoporosis? **Climacteric**, v. 18, p. 22-31, 2015.

BRANDENBURG, V. M.; SCHURGERS, L. J.; KAESLER, N., et al. Prevention of vasculopathy by vitamin K supplementation: Can we turn fiction into fact? **Atherosclerosis**, v. 240, p. 10-16, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. PORTARIA Nº 224, DE 26 DE MARÇO DE 2014. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-310, 1978.

DALMEIJER, G. W.; VAN DER SCHOUW, Y. T.; MAGDELEYNS, E.; AHMED, N.; VERMEER, C.; BEULENS, J. W. J. The effect of menaquinone-7 supplementation on circulating species of matrix Gla protein. **Atherosclerosis**, v. 225, p. 397-402, 2012.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, p. 33-39, 2000.

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; CASTRO, M. A., et al. Ingestão inadequada de nutrientes na população de idosos do Brasil: Inquérito Nacional de Alimentação 2008-2009. **Rev Saúde Pública [online]**, v. 47, p. 222-230, 2013.

FU, X.; MOREINES, J.; BOOTH, S. L. Vitamin K supplementation does not prevent bone loss in ovariectomized Norway rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 12, 2012.

GRANT, A.; AVENELL, A.; CAMPBELL, M., et al. Oral vitamin D3 and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (Randomised Evaluation of Calcium Or vitamin D, RECORD): a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 365, p. 1621-1628, 2005.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HARA, K.; KOBAYASHI, M.; AKIYAMA, Y. Vitamin K2 (menatetrenone) inhibits bone loss induced by prednisolone partly through enhancement of bone formation in rats. **Bone**, v. 31, p. 575-581, 2002.

HUANG, Z-B.; WAN, S-L.; LU, Y-J., et al. Does vitamin K2 play a role in the prevention and treatment of osteoporosis for postmenopausal women: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Osteoporos Int**, v. 26, p. 1175-1186, 2014.

IOM (Institute of Medicine), Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, The National Academies Press, Washington, D.C, 2011, pp. 362-384.

IWAMOTO, J.; MATSUMOTO, H.; TAKEDA, T.; SATO, Y.; LIU, X.; YEH, J. K. Effects of vitamin K2 and risedronate on bone formation and resorption, osteocyte lacunar system, and porosity in the cortical bone of glucocorticoid-treated rats. **Calcif Tissue Int**, v. 83, p. 121-128, 2008.

IWAMOTO, J.; SEKI, A.; SATO, Y.; MATSUMOTO, H. Vitamin K2 improves renal function and increases femoral bone strength in rats with renal insufficiency. **Calcif Tissue Int**, v. 90, p. 50-59, 2012.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; SATO, Y. Menatetrenone (vitamin K2) and bone quality in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Nutr Rev**, v. 64, p. 509-517, 2006.

JACKSON, R.; LACROIX, A.; GASS, M.; WALLACE, R.; ROBBINS, J.; LEWIS, C. et al. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. **N Engl J Med**, v. 354, p. 669-683, 2006.

KNAPEN, M.; BRAAM, L.; DRUMMEN, N.; BEKERS, O.; HOEKS, A. P. G.; VERMEER, C. Menaquinone-7 supplementation improves arterial stiffness in healthy postmenopausal women. **Thromb Haemost**, v. 113, p. 1135-1144, 2015.

LAMPROPOULOS, C. E.; PAPAIOANNOU, I.; D'CRUZ, D. P. Osteoporosis—a risk factor for cardiovascular disease? **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, p. 587-598, 2012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

- LUO, G.; DUCY, P.; MCKEE, M. D., et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. **Nature**, v. 386, p. 78-81, 1997.
- MCCABE, K. M.; BOOTH, S. L.; FU, X., et al. Dietary vitamin K and therapeutic warfarin alter the susceptibility to vascular calcification in experimental chronic kidney disease. **Kidney Int**, v. 83, p. 835-844, 2013.
- MCFARLANE, S. I.; MUNIYAPPA, R.; SHIN, J. J.; BAHTIYAR, G.; SOWERS, J. R.; Osteoporosis and cardiovascular disease. **Endocrine**, v. 23, p. 1-10, 2004.
- MEGANATHAN, R. Biosynthesis of menaquinone (Vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q): a perspective on enzymatic mechanisms. **Vitam Horm**, v. 61, p. 173–218, 2001.
- MICHAËLSSON, K.; MELHUS, H.; WARENSJÖ LEMMING, E., et al. Long term calcium intake and rates of all cause and cardiovascular mortality: community based prospective longitudinal cohort study. **BMJ**, v. 346, p. 228, 2013
- ONODERA, K.; TAKAHASHI, A.; WAKABAYASHI, H., et al. Effects of menatetrenone on the bone and serum levels of vitamin K2 (menaquinone derivatives) in osteopenia induced by phenytoin in growing rats. **Nutrition**, v. 19, p. 446-450, 2003.
- PRICE, P.; FAUS, S.; WILLIAMSON, M. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, p. 1400-1407, 1998.
- PRINCE, R.; DEVINE, A.; DHALIWAL, S.; DICK, I. Effects of calcium supplementation on clinical fracture and bone structure: results of a 5-year, double-blind, placebo-controlled trial in elderly women. **Arch Intern Med**, v. 166, p. 869-875, 2006.
- PUCAJ, K.; RASMUSSEN, H.; MØLLER, M.; PRESTON, T. Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K2, menaquinone-7. **Toxicol Mech Method**, v. 21, n. 7, p. 520–532, 2011.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.
- REID, I., MASON, B., HORNE, A., et al Randomized controlled trial of calcium in healthy older women. **Am J Med**, v. 119, p. 777-785, 2006.
- SATO, T.; SCHURGERS, L. J.; UENISHI, K. Comparison of menaquinone-4 and menaquinone-7 bioavailability in healthy women. **Nutr J**, v. 11:, p. 93, 2012.
- SCHEIBER, D.; VEULEMANS, V.; HORN, P., et al. High-dose menaquinone-7 supplementation reduces cardiovascular calcification in a murine model of extrasosseous calcification. **Nutrients**, v, 7, p. 6991-7011, 2015.
- SCHINKE, T.; MCKEE, M. D.; KARSENTY, G. Extracellular matrix calcification: where is the action? **Nat Genet**, v. 21, p. 150–151, 1999.

SCHINKE, T.; MCKEE, M. D.; KARSENTY, G. Extracellular matrix calcification: where is the action? **Nat Genet**, v. 21, p. 150–151, 1999.

SCHURGERS, L. J.; SPRONK, H. M. H.; SOUTE, B. A. M., et al. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. **Blood**, v. 109, p. 2823-2831, 2007.

SHEA, M. K.; HOLDEN, R. M. Vitamin K status and vascular calcification: evidence from observational and clinical studies. **Adv Nutr**, v. 3, p. 158-165, 2012.

SPRONK, H. M. H.; SOUTE, B. A. M.; SCHURGERS, L. J., et al. Tissue-specific utilization of menaquinone-4 results in the prevention of arterial calcification in warfarin-treated rats. **J Vasc Res**, v. 40, p. 531-537, 2003.

THOMPSON, D. D.; SIMMONS, H. A.; PIRIE, C. M.; KE, H. Z. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, p. 125-133, 1995.

WALLACE, R. B.; WACTAWSKI-WENDE, J.; O'SULLIVAN, M. J., et al. Urinary tract stone occurrence in the Women's Health Initiative (WHI) randomized clinical trial of calcium and vitamin D supplements. **Am J Clin Nutr**, v. 94, p. 270-277, 2011.

WU, W.; LEE, H.; LEE, G.; CHAE, H.; AHN, B. The antiosteoporotic effects of cheonggukjang containing vitamin K2 (menaquinone-7) in ovariectomized rats. **J Med Food**, v. 17, p. 1298-1305, 2014.

YAMAGUCHI, M.; KAKUDA, H.; GAO, Y. H.; TSUKAMOTO, Y. Prolonged intake of fermented soybean (natto) diets containing vitamin K2 (menaquinone-7) prevents bone loss in ovariectomized rats. **J Bone Miner Metab**, v. 18, n. 2, p. 71-76, 2000.

9. CONCLUSÕES GERAIS

Esse trabalho colabora para o entendimento da função da vitamina K2 na saúde óssea, bem como para elucidação do efeito de suplementos de cálcio e vitamina D3, comumente usados no tratamento da perda óssea, em modelo experimental de osteoporose.

A retirada dos ovários promoveu aumento do peso das ratas, comparado ao grupo não ovariectomizado (sham), bem como a perda de massa óssea e a diminuição do conteúdo de cálcio no sangue e nos ossos. Os animais suplementados apenas com vitamina K2 apresentaram nível de cálcio sérico semelhante aos suplementados com cálcio e aos do grupo sham e superior ao dos demais grupos. Nas análises histológicas e de microtomografia do osso, a administração isolada de K2 evitou a perda óssea promovida pela ovx, de forma com que o volume trabecular desses animais se assemelhou ao das ratas não osteoporóticas. Um importante resultado encontrado nesse estudo foi que a substituição do tratamento convencional com Ca+ vitamina D3 para Ca + vitamina K2, na quarta semana, promoveu o aumento do volume trabecular, confirmado nas análises de histologia, radiografia e microtomografia do fêmur. Também observamos que todos os grupos que receberam cálcio apresentaram redução do volume trabecular. Esse resultado pode estar relacionado à competição pela absorção intestinal do cálcio com o magnésio, mineral que também é importante no processo de mineralização óssea.

A ação da vitamina K2 na saúde vascular também foi observada. Não houve diferença nas análises histológicas dos vasos no que diz respeito à deposição de cristais cálcio, entretanto a administração isolada de vitamina K2 promoveu redução do conteúdo de cálcio dos vasos em relação ao grupo controle não osteoporótico. Vale ressaltar que o grupo que recebeu K2 apresentou conteúdo de cálcio nos vasos pelo menos 50% inferior a todos os grupos. A saúde dos vasos também está associada à função antioxidante, importante para a prevenção de doenças cardiovasculares. A vitamina K2, administrada de forma isolada ou conjunta com cálcio e vitamina D3, promoveu, no fígado, aumento da atividade da enzima antioxidante GST e diminuição do MDA, produto da peroxidação lipídica. A troca do tratamento Ca+D3 para Ca+K2 também aumentou os níveis de GST, que estavam reduzidos antes da troca.

Assim, a vitamina K2 promoveu melhorias na saúde óssea e vascular em modelo experimental de osteoporose, de forma superior aos tratamentos com cálcio e vitamina D3, comumente utilizados na prática clínica. Esses resultados se somam aos recentemente encontrados na literatura e corroboram com a afirmação de que a vitamina K2 pode ser

uma importante e segura opção de tratamento no abrangente problema de saúde pública:
a osteoporose e suas complicações.

ANEXO 1. Cálculo amostral

Estudo: Efeito da vitamina K2 (menaquinona) e seu sinergismo com a vitamina D3 na saúde óssea e vascular de ratas Wistar com perda óssea induzida e suplementadas com cálcio

Para o cálculo do número de animais por grupo foi utilizada a fórmula apresentada abaixo, seguida do cálculo para inclusão da margem de perda

$$n = 1 + [2C * (s/d)^2], \text{ onde}$$

C é dependente dos valores escolhidos e apresentados abaixo para a força ou poder do teste e nível de significância; s é o desvio padrão aceitável; d é a diferença esperada entre os grupos. Para calcular o C, aplicou-se a fórmula:

$C = (z\alpha + z\beta)^2$, onde z corresponde a valores encontrados em livros de estatística. Para determinar o valor de $z\alpha$ dividiu-se o valor do intervalo de confiança por 2 (IC=0,95/2), sendo portanto 0,475 o valor a ser procurado na tabela, obtendo-se $z=1,96$. Em experimentos na área de saúde, o poder do teste é comumente 90% para o qual o valor de $z\beta$ é 1,282.

$$C = (1,96 + 1,282)^2 = 10,51$$

Considerando ainda um desvio máximo (s) de 0,2 (20%) e uma diferença esperada entre os grupos (d) de 0,35 (35%), ao aplicarmos a fórmula

$$n = 1 + [2 * 10,51 * (0,2/0,35)^2]$$

$$n = 7,86 \text{ animais, arredondando: 8 animais por grupo.}$$

Considerando os 7 grupos experimentais, sem considerar o cálculo da margem de perda apresentado abaixo, seriam necessários 56 animais.

Cálculo do número de animais, incluindo a margem de perda

O cálculo considerando a margem de perda estimada (20%) foi realizado com base no material em anexo, obtido com o professor Laércio dos Anjos Benjamim do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

$N = n + N \times f$, sendo n o número de animais calculado e f a perda estimada

$$N = 56 + N \times 0,2$$

$$N - N \times 0,2 = 56$$

$$N (1 - 0,2) = 56$$

$$N = 56/0,8 = 70 \text{ animais.}$$

Dessa forma, para a realização deste estudo serão necessários 70 animais, que distribuídos nos seis grupos (tratamentos), irão compor dez animais por grupo.

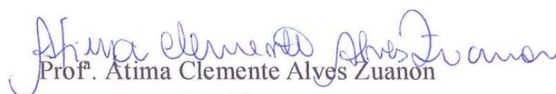
ANEXO 2. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 68/2015, intitulado “Efeito da vitamina K₂ (menaquinona) e seu sinergismo com a vitamina D₃ na saúde óssea e vascular de ratas wistar com perda óssea induzida e suplementadas com cálcio”, coordenado pela professora Marisa Alves Nogueira Diaz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 17/02/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 68/2015, named “Effect of vitamin K₂ (menaquinone) and its synergy with vitamin D₃ in bone and vascular health in wistar rats with induced bone loss and supplemented with calcium”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 17, 2016 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV