

FELIPE COUTO SANTOS

**EFEITO DO ESTEROIDE ANABÓLICO SOBRE OS
PARÂMETROS ÓSSEOS DE CAMUNDONGOS APOE-/-
ALIMENTADOS OU NÃO COM DIETA HIPERGLICÍDICA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

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

T

S237e Santos, Felipe Couto, 1985-
2016 Efeito do esteroide anabólico sobre os parâmetros ósseos de
camundongos Apo E-/- alimentados ou não com dieta hiperglicídica /
Felipe Couto Santos. - Viçosa, MG, 2016.
ix, 55f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ratos. 2. Esteroide anabólico. 3. Ossos - Morfologia.
4. Lipídios na nutrição animal. 5. Hiperlipidemia. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-
graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 599.352

FELIPE COUTO SANTOS

**EFEITO DO ESTEROIDE ANABÓLICO SOBRE OS
PARÂMETROS ÓSSEOS DE CAMUNDONGOS APOE-/-
ALIMENTADOS OU NÃO COM DIETA HIPERGLICÍDICA**

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

APROVADA: 25 de Maio de 2016

Solange Mara Bigonha

Mariana Machado Neves

Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado
(Orientadora)

Dedico esta dissertação aos meus amados
pais, José Ventura e Maria Perpétua e a
minha querida irmã Monalisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente em minha vida, iluminar e direcionar meus passos.

Aos meus queridos pais, José Ventura e Maria Perpétua, pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida, humildade e caráter. Amo vocês! Obrigado por tudo!

A minha irmã, pelo amor, apoio e por me encorajar a seguir em frente sempre.

A toda minha família pelo amor que nunca deixaram faltar e pela confiança.

A minha querida orientadora Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, pela orientação, acolhimento, confiança, pelos ensinamentos, por acreditar na minha capacidade de vencer e por todas as contribuições ao longo deste trabalho. Muito Obrigado!

Aos meus co-orientadores, Rômulo Dias Novaes e Eliziária Cardoso dos Santos, por todo empenho e tempo dispensado para que este trabalho se concretizasse.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela oportunidade de realização do curso, crescimento profissional e pessoal.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de pesquisa imprescindível na realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth, pela atenção e disposição em ajudar.

Aos professores Sérgio da Matta, Mariana Machado Neves, Adilson Azira Zacaro e Juliana Silva Rocha pelo auxílio durante toda a realização deste trabalho, pelo exemplo de profissionalismo e por todos os ensinamentos.

Ao amigo Daniel pela valiosa ajuda durante todas as fases deste trabalho e pela amizade.

Aos queridos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural, pela amizade, colaboração, carinho e por me proporcionarem momentos tão agradáveis de aprendizado e descontração.

A todos os amigos do mestrado, por compartilharmos esse momento tão importante de nossas vidas.

Aos amigos de república, Marcos, Tiago e Crislayne pela convivência constante e por serem a minha família em Viçosa!

Aos amigos de Ipatinga e da vida que sempre torceram por mim.

Agradeço ainda, a todos com que tive a oportunidade de conviver nestes últimos anos e que muito contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigado por tudo!

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Camundongos deficientes no gene da apoproteína E	4
2.2 Lipídeos, dislipidemia e o tecido ósseo	5
2.3 Tecido ósseo e a regulação do metabolismo energético	10
2.4 Esteroides anabólicos androgênicos	12
3. REFERÊNCIAS	16
ARTIGO	26
Abstract	27
1. Introdução	29
2. Material e métodos	31
2.1 Modelo animal e tratamentos	31
2.2 Peso corporal	32
2.3 Análise bioquímica	32
2.4 Morfometria femoral	32
2.4.1 Dimensões anatômicas do fêmur	32
2.4.2 Osso trabecular epifisário	32
2.4.3 Osso cortical diafisário	33
2.5 Teste mecânico	33
2.6 Cálcio e fósforo	34
2.7 Proteínas ósseas	35
2.8 Análise estatística	35
3. Resultados	35
4. Discussão	37
Conclusões	42
Agradecimentos	43
Conflitos de interesse	43
Referências	43

RESUMO

SANTOS, Felipe Couto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2016. **Efeito do esteroide anabólico sobre os parâmetros ósseos de camundongos ApoE^{-/-} alimentados ou não com dieta hiperglicídica.** Orientadora: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Coorientadores: Rômulo Dias Novaes e Eliziária Cardoso dos Santos.

Neste estudo foram investigados os efeitos do esteroide anabólico androgênico (EAA) e da dieta rica em sacarose no osso de camundongos ApoE^{-/-}. Quarenta e oito camundongos fêmeas (três meses de idade) foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos com oito animais cada: grupos W (wild type), A (ApoE^{-/-}) e A20 (ApoE^{-/-} e 20mg/kg EAA) receberam dieta comercial, e grupos AH (ApoE^{-/-}), AH10 (ApoE^{-/-} e 10mg/kg EAA) e grupo AH20 (ApoE^{-/-} e 20mg/kg EAA) receberam dieta rica em sacarose. A dieta rica em sacarose foi desenvolvida de acordo com o protocolo AIN-93G para dietas purificadas. O esteroide anabólico utilizado foi o undecilenato de boldenona administrado intraperitonealmente três vezes por semana durante oito semanas. Após 56 dias, amostras do sangue foram coletadas para análises de cálcio, fósforo, triglicérides e colesterol. Os fêmures foram utilizados para análises morfométricas, de minerais e teste mecânico, enquanto as tíbias foram usadas para analisar o teor de proteínas ósseas. Nossos resultados demonstraram que o EAA isoladamente aumentou as concentrações séricas de colesterol total, triglicérides, LDL e fósforo; a relação Ca/P e o conteúdo de cálcio no osso, porém, a droga induziu a redução do HDL, fósforo ósseo, do teor de proteínas colagenosas, da área cortical e volume trabecular, a rigidez e módulo elástico dos ossos. Os camundongos alimentados com a dieta rica em sacarose apesar de apresentarem aumento do colesterol total, LDL e HDL e fósforo, não denotaram alterações nos parâmetros morfométricos. Contudo, o consumo da sacarose aumentou a retenção de cálcio no osso, a carga máxima, rigidez e tensão máxima dos fêmures desses animais. A associação entre a menor dose do EAA e a dieta experimental aumentou as concentrações séricas do colesterol LDL, fósforo e reduziu o HDL. Além disso, esses animais apresentaram maior conteúdo de cálcio ósseo, proteínas colagenosas, carga máxima, rigidez, tensão máxima. A administração da maior dose do EAA associada a dieta rica em sacarose induziu a elevação do colesterol total e LDL e reduziu a concentração do HDL e fósforo no osso. Além disso, os animais desse grupo apresentaram aumento do cálcio ósseo, teor de proteínas

colagenosas, da área cortical e do volume trabecular, da carga máxima, deslocamento, rigidez, tensão máxima e deformação. Tomados em conjunto, os nossos resultados mostram que o uso de doses suprafisiológicas do EAA e o consumo de dieta rica em sacarose, isoladamente ou não, alteraram o perfil bioquímico dos lipídeos podendo agravar o quadro dislipidêmico dos camundongos ApoE^{-/-}. O uso isolado do EAA acometeu a microarquitetura óssea e propriedades mecânicas dos fêmures que foi relacionada à dislipidemia mais acentuada nesse grupo. Os ossos dos camundongos tratados com a dieta isolada ou combinada a menor dose do EAA apesar de apresentarem alterações benéficas nas propriedades mecânicas dos fêmures não denotaram alteração na estrutura óssea. Contudo, a maior dose do EAA combinada com a dieta rica em sacarose teve efeito positivo sobre a morfometria óssea bem como as propriedades mecânicas do osso possivelmente devido à participação do tecido ósseo no metabolismo energético.

ABSTRACT

SANTOS, Felipe Couto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2016. **Effects of anabolic steroids on bone parameters in ApoE - / - mice fed high-carbohydrate diet with or without.** Adviser: Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado. Co-advisers: Rômulo Dias Novaes e Eliziária Cardoso dos Santos.

The objective of this study was to evaluate the effect of interaction between the AAS and diet rich in sucrose on the biomechanical and morphological properties of bone tissue of ApoE gene knockout mice (ApoE^{-/-}). Eight wild-type (C57BL6) and forty ApoE^{-/-} mice generated on a C57BL6 background were used. Female 3-month-old were divided into four groups (n=8): group W (wild type), group A (ApoE^{-/-}) and group A20 (ApoE^{-/-} plus 20mg/kg AAS) receiving commercial ration, and group AH (ApoE^{-/-}), group AH10 (ApoE^{-/-} plus 10mg/kg AAS) and group AH20 (ApoE^{-/-} plus 20mg/kg AAS) receiving a sucrose-diet. After 56 days, blood samples were collected for laboratory analysis of calcium, triglycerides, cholesterol. The femur was excised for mechanical testing, morphometric and minerals analysis while the tibias were used to analyze the content of bone proteins. Our results showed that the EAA alone increased serum concentrations of total cholesterol, triglycerides, LDL and phosphorus; Ca/P and calcium content the bone, however, the drug induced low HDL, bone phosphorus, collagenous protein content, cortical area and trabecular volume, stiffness and elastic modulus of the bone. The mice fed the diet rich in sucrose despite having an increase in total cholesterol, LDL and HDL and phosphorus does not denote changes to the morphometric parameters. However, the consumption of sucrose increased calcium retention in the bone, the maximum load, stiffness and maximum stress of the femurs of the animals. The association between the lowest dose of EAA and experimental diet increased the serum concentrations of non-HDL cholesterol and phosphorus and reduced HDL. Moreover, these animals showed higher calcium content, collagenous proteins, maximum load, stiffness, maximum stress. The administration of the highest dose of the EAA associated with sucrose-rich diet induced increase in total cholesterol and LDL and reduced the HDL concentration and phosphorus in the bone. Additionally, the animals in this group had increased bone calcium, collagenous protein content, cortical area and trabecular volume, maximum load, displacement, stiffness, maximum stress and strain. Taken together, our results show that using higher doses of EAA and

consumption of sucrose-rich diet alone or not, the altered biochemical profile of lipids may aggravate the above dyslipidemic ApoE ^{-/-} mice. The isolated use of EAA affected the bone microarchitecture and mechanical properties of femurs that was related to more severe dyslipidemia in this group. The bones of mice treated with diet alone or combined the lowest dose of the EAA despite having beneficial changes in the mechanical properties do not denote changes in bone structure. However, the highest dose of EAA combined with diet had a positive effect on bone morphometry as well as the mechanical properties of bone that has been associated with the control of energy metabolism orchestrated by bone tissue.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Na atualidade, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental, sendo suas manifestações decorrentes dos eventos clínicos da aterosclerose, como infarto, embolias e acidentes vasculares cerebrais. Apesar da aterosclerose ser considerada uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, é importante para o seu desenvolvimento e de outras doenças cardiovasculares, o sedentarismo, o tabagismo, a elevada ingestão de gorduras (em especial gordura trans e saturada), a obesidade, o diabetes e também as dislipidemias (Ishigaki et al., 2008; Xavier et al., 2013).

A dislipidemia é considerada como um dos principais determinantes da ocorrência de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, dentre elas a aterosclerose, o infarto agudo do miocárdio e a doença isquêmica do coração. Na dislipidemia ocorrem alterações nas concentrações séricas dos lipídeos. As mudanças do perfil bioquímico lipídico podem incluir elevação do colesterol total, triglicérides, lipoproteína de baixa densidade (LDL), além da redução das concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL). De acordo com o tipo de alteração das concentrações plasmáticas de lipídeos, a dislipidemia pode ser classificada como: hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e colesterol HDL baixo (Sposito et al., 2007; Xavier et al., 2013).

Para o estudo das dislipidemias, têm ocorrido diversos avanços com o uso de camundongos geneticamente modificados, destacando-se o camundongo nocaute para a apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) e para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}), que desenvolvem espontaneamente lesões ateroscleróticas em vários locais nas artérias. Em ambos os casos, o desenvolvimento da lesão é acelerado quando os animais são alimentados com uma dieta com alto teor de gordura saturada (Jackson et al., 2007).

Diversos estudos tem sugerido a ligação entre dislipidemias e osteoporose em idosos, bem como incidentes de fraturas ósseas que independem da idade. Dessa maneira, fatores determinantes dessas patogenias poderiam contribuir para ambas as condições (Parhami et al, 2001; Sennerby et al., 2007; Pirih et al., 2012; Soares et al., 2012; Liu et al, 2016).

O papel e o mecanismo de ação das dislipidemias na aterogênese e sobre as propriedades do osso se deve a formação de formas de LDL e fosfolipídios

oxidativamente modificados, chamados de lipídeos bioativos. No espaço endotelial e/ou possivelmente em outros tecidos, na presença de células metabolicamente ativas que produzem radicais livres de oxigênio, os lipídeos sofrem vários graus de reações não enzimáticas resultando em formas modificadas de LDL, como é o caso do LDL altamente oxidado (ox-LDL). Essas moléculas de LDL modificadas induzem potentes respostas inflamatórias, que não são associadas ao LDL nativo. Os estudos emergentes sugerem que essas moléculas pró-inflamatórias também são prejudiciais para a saúde do osso (Smith & Murphy, 2008; Kadl et al., 2011; Tintut et al., 2014; Liu et al, 2016).

Evidências sugerem o papel dos lipídeos aterogênicos e lipoproteínas na patogênese óssea que inclui efeitos diretos desses lipídeos bioativos/lipoproteínas sobre as células ósseas através da inibição da diferenciação osteoblástica, e por outro lado, promovendo a diferenciação das células responsáveis pela reabsorção óssea, os osteoclastos. Além disso, recentes pesquisas indicam que lipídeos bioativos podem atenuar o efeito de agentes anabólicos do osso, como é o caso da proteína morfogenética óssea (BMP) (Tintut et al., 2014; Liu et al., 2016).

No passado, o osso era visto como um tecido inativo de função majoritariamente de sustentação. O fato de que tanto osteoblastos quanto adipócitos são originários de células-tronco mesenquimais e a consideração de que disfunções no metabolismo da glicose e dos lipídios alteram o tecido ósseo forneceram suporte para a investigação da existência de suas funções extra-estruturais e de sua relação com outros tecidos (Kawai et al., 2009).

Nos últimos anos, ocorreu um considerável aumento de pesquisas que avaliam o papel do tecido ósseo como um órgão endócrino e de sua interação com o tecido adiposo, sistema nervoso central e o pâncreas. Esses estudos começaram na década passada com a demonstração da relação entre o metabolismo energético, o cérebro e a massa óssea, e que na atualidade tem se movido em duas direções distintas, porém, complementares: uma linha de investigação continua que pesquisa como a leptina, serotonina, e outras moléculas orquestram o controle central da massa óssea, e a outra centralizada no osso como um órgão endócrino crítico para regulação sistêmica do metabolismo energético (Clemens, Karsenty, 2011).

Em países desenvolvidos as doenças osteo-metabólicas, como a osteoporose são consequências da idade avançada e do uso de medicamentos (tratamento de longa duração com corticosteroides). Já em países em desenvolvimento, como o Brasil, são

consequências principalmente de fatores hormonais e nutricionais (Raubenheimer, 2004).

A nutrição exerce papel fundamental para integridade da massa óssea. Os hábitos alimentares podem influenciar a manutenção da massa óssea (Hamrick et al., 2009). Uma alimentação rica em açúcares tem sido relacionada com a elevação da massa corporal em virtude da alta densidade energética, estando ainda associada com doenças que incluem obesidade, osteoporose, doença cardiovascular e alguns tipos de câncer (WHO, 2003; Van Dam, Seidell, 2007).

O aumento acentuado da massa corporal além de representar um fator predisponente no surgimento de complicações cardiovasculares, também influencia na aparência corporal, o que leva a insatisfação das pessoas com sua própria aparência física, o que desencadeia a busca e adoção desenfreada de cuidados com o corpo, envolvendo a musculação, dietas e cirurgias plásticas. Esse culto ao corpo caracterizado pelo interesse na melhoria do desempenho físico, da força física e da aparência tem feito com que indivíduos, principalmente praticantes de musculação, passem a apostar no uso abusivo de esteroides anabolizantes androgênicos (EAAs). O uso indiscriminado de EAA tem se mostrado causador de alterações significativas sobre o sistema cardiovascular, como as complicações vasculares, cardiomiopatias, aterosclerose, hipertensão e aumento do colágeno tecidual caracterizando a hipertrofia cardíaca patológica. Entretanto, seus reais efeitos carecem de maiores esclarecimentos (Parssinen et al, 2000; Shahidi, 2001; Takahashi et al., 2004).

O desenvolvimento do tecido ósseo pode não acompanhar o aumento da massa muscular e massa corporal, provocados pelo uso de doses suprafisiológicas de EAA e desse modo isso induzir a fragilidade óssea. Conforme Bizeray et al (2002) é importante que a estrutura óssea aumente na mesma proporção que o aumento de massa muscular, para que possa haver uma qualidade na mobilidade e maior desempenho. Principalmente os ossos longos mostram-se bastantes sensíveis as manipulações nutricionais e farmacêuticas sendo que estas alterações poderiam afetar os processos de crescimento e desenvolvimento (Bain & Watkins, 1993; Bizeray et al., 2002).

Diante dos fatos expostos, o presente estudo tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos do EAA e da dieta rica em sacarose, combinados ou não, sobre as propriedades histomorfológicas, mecânicas e bioquímicas do tecido ósseo de camundongos ApoE-/-.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Camundongos deficientes no gene da apoproteína E

Desde a década de 60, as doenças cardiovasculares vêm apresentando aumento progressivo em todo mundo, sendo as dislipidemias consideradas como um dos fatores determinantes para o desenvolvimento dessas enfermidades, principalmente a aterosclerose (Grillo et al., 2005). Durante os últimos anos houve uma redução considerável na mortalidade por causas cardiovasculares em países desenvolvidos, enquanto um fenômeno contrário tem ocorrido em países em desenvolvimento, como no Brasil (Sposito et al., 2007; Xavier et al., 2013).

As investigações clínicas, os estudos populacionais bem como experimentos com culturas de células têm fornecido importantes indicadores na patogênese da aterosclerose. Contudo, devido às grandes dificuldades em estudar os mecanismos patogênicos da aterosclerose em humanos, tornou-se fundamental o desenvolvimento de um modelo experimental bem caracterizado para esta patologia (Hansson et al., 2005).

Os camundongos modificados geneticamente são gerados a partir da modulação gênica onde ocorre a deleção de um alelo específico responsável por codificar uma proteína com alto grau de especificidade. Esses animais são comumente referidos pelo termo coloquial de *knockout*, sendo simbolizados por -/- ou KO. Os camundongos amplamente utilizados para o estudo da aterosclerose são gerados através da modulação genética da Apo E (apolipoproteína E) e do LDLr (receptor para LDL), ambos essenciais para o metabolismo lipídico (Daugherty, 2002). A Apo E é uma glicoproteína rica em arginina com peso molecular de 34 kdaltons, sintetizada principalmente no fígado e cérebro. Por ser um constituinte da superfície de lipoproteínas, principalmente VLDL, HDL e quilomícrons, a Apo E desempenha um papel funcional na depuração (*clearance*) das lipoproteínas plasmáticas (Davignon et al., 1999).

Existem 3 alelos em seres humanos para Apo E: E2, E3 e E4. A elevação dos níveis séricos de colesterol e triglicérides é causada pela homozigose para o alelo E2 e está associada ao acúmulo de remanescentes de quilomícrons e VLDL no plasma, caracterizando a dislipidemia (Van Ree et al., 1994; Quintão & Nakandakare, 1997).

Os camundongos selvagens são resistentes ao desenvolvimento das dislipidemias em condições normais. Esses animais transportam a maior parte do colesterol via HDL e possuem baixos níveis de colesterol VLDL e LDL (Zhang et al., 1992; Breslow, 1996; Hoftker et al., 1998). Todavia, a deleção direcionada do gene para a apolipoproteína E (apoE^{-/-}) provoca um estado que leva a hipercolesterolemia grave e aterosclerose espontânea. A dislipidemia evolui, também, em camundongos deficientes para o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLr^{-/-}), principalmente quando alimentados com uma dieta com elevados níveis de gordura (Breslow, 1996).

Os camundongos, naturalmente, apresentam níveis elevados de HDL (lipoproteína de alta densidade). Por outro lado, os níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) são baixos em relação aos valores observados em humanos. Esses animais também apresentam a ausência da lipoproteína A, uma lipoproteína pró-aterogênica presente em humanos. Ainda que o transporte e no metabolismo de lipídios entre camundongos e humanos sejam diferentes, modificações pontuais nessas vias tornam essas espécies semelhantes (Smithies & Maeda, 1995).

Há assentimento de que camundongos nocaute para Apo E (apolipoproteína E) podem acentuar lesões que se associam a aspectos semelhantes às lesões vasculares humanas (Calara et al., 2001; Johnson & Jackson, 2001).

2.2 Lipídeos, dislipidemia e o tecido ósseo

A maioria dos lipídeos biológicos são encontrados na forma de ácidos graxos, triglicérides, colesterol, hormônios esteroides e fosfolipídeos. Devido à sua natureza hidrofóbica, os lipídeos são transportados da circulação sanguínea para os tecidos periféricos via lipoproteínas. Os triglicérides advindos da dieta são absorvidos no intestino e encaminhados para a circulação sistêmica via quilomícrons, enquanto aqueles sintetizados no fígado são transportados pela lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), e ambas contêm a apolipoproteína E em sua superfície (ApoE). O colesterol dietético bem como o de origem hepática são transportados pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que contêm a proteína ApoB-100 que é reconhecida pelo receptor de LDL. O retorno dos resíduos lipossolúveis dos tecidos periféricos para o fígado para posterior excreção, um processo conhecido com transporte reverso do colesterol, é mediado pela lipoproteína de alta densidade (HDL). Assim sendo, a concentração sérica de lipídeos na circulação depende da combinação de

fatores como ingestão, biossíntese celular e da taxa de eliminação por secreção biliar. Consequentemente, a deficiência de ApoE ou do receptor de LDL, que reduz a absorção dessas moléculas pelas células hepáticas e dos tecidos periféricos, conduz ao aumento das concentrações de lipoproteínas circulantes, conhecido como um fator de risco para aterosclerose (Annema, Tietge, 2012).

Estudos epidemiológicos mostraram que as concentrações séricas de HDL estão inversamente associadas com o risco de doença aterosclerótica (Di Angelantonio et al., 2009). As recentes pesquisas indicam que, além de facilitar o transporte reverso de colesterol, o colesterol HDL protege contra a doença cardiovascular através da redução do metabolismo de lipídios oxidados (Navab et al., 2012; Navab et al., 2012). As proteínas que transitoriamente associam-se com o HDL são as paraoxonases (PON) e a apolipoproteína a-I que apresentam propriedades antioxidantes e que se acredita conferir os efeitos protetores do HDL (Huang et al., 2013; Bhattacharyya et al., 2008; Borja et al., 2013).

Os lipídeos desempenham um papel importante no metabolismo ósseo e na saúde do osso. Essas moléculas limitam a permeabilidade hidráulica do compartimento poroso (canais de Havers, Volkmann, canalículos e lacunas) do osso compacto radial do osso cortical e essa limitação pode afetar o metabolismo de osteoblastos e osteócitos (Wen et al., 2010). Através de ressonância magnética nuclear, Reid et al (2012) recentemente identificaram a presença de ácidos graxos no tecido ósseo calcificado e, esses resultados sugerem, que os lipídeos encontrados são remanescentes das partículas das lipoproteínas e não dos fosfolipídeos das membranas celulares. Além disso, as lipoproteínas são veículos para o transporte de vitaminas lipossolúveis, tais como vitaminas D e K, que desempenham papéis importantes no metabolismo ósseo. A vitamina D regula as concentrações de cálcio e fósforo no soro, enquanto a vitamina K é fundamental para a ativação, por gama-carboxilação, da osteocalcina (proteína GLA óssea) e da proteína GLA da matriz, conhecidas como reguladoras da maturação mineral do tecido ósseo. Curiosamente, em uma meta-análise de estudos clínicos, a suplementação com vitamina K não teve efeito significativo sobre a densidade mineral óssea (DMO) na coluna lombar ou do colo do fêmur (Fang et al., 2012).

Estudos evidenciaram a existência da correlação entre a osteoporose e a aterosclerose (Hmamouchi et al., 2009; Tamaki et al., 2009). Além disso, a calcificação aórtica, um marcador da aterosclerose, é usualmente associada com a osteoporose e fraturas ósseas (Naves et al., 2008). A possível explicação para essa correlação,

sustentada pela relação entre a presença de doença arterial e osteoporose, pode ser devido ao efeito indireto de lipídeos no osso (Collin et al., 2009). Entretanto, os estudos da última década encontraram associações diretas entre osteoporose e a hiperlipidemia. Orozco et al. evidenciaram que mulheres na pós-menopausa com o perfil lipídico aterogênico (jejum) têm menor DMO nos ossos vertebrais, do quadril e do colo femoral do que aquelas com perfil lipídico normal (Kim et al., 2008).

A partir dos estudos realizados foi evidenciado que elevadas concentrações de colesterol sérico poderiam provocar redução da massa óssea, diminuição da remodelação óssea e abundante proliferação osteoclástica (Luegmayr et al., 2004; Tintut & Demer, 2014; Luisetto & Camozzi, 2009). Esta relação, conforme citado por esses autores, surge devido à inibição da diferenciação e proliferação das células osteoblásticas, decorrente da elevação do alto nível de colesterol. Em outro estudo, Nuzzo et al (2009), em que foram analisados ratos hiperlipidêmicos, foi relatado aumento no número de osteoclastos, inibição da atividade de osteoblastos e consequentemente, diminuição da remodelação óssea. De acordo com os resultados encontrados por Tintut et al (2004), os osteoclastos dos fêmures de ratos com dislipidemia eram maiores do que os de ratos pertencentes ao grupo controle, evidenciando uma maior atividade funcional dessas células.

Graham et al (2010) e Russell (2010) observaram que o impacto causado pela gordura corporal sobre a densidade óssea tem revelado que a gordura subcutânea é vantajosa para o pico de massa óssea; por outro lado nota-se que a gordura visceral tem efeito negativo sobre os ossos.

Em animais geneticamente modificados com hiperlipidemia induzida, a perda óssea é acelerada (aproximadamente três meses) pelo consumo da dieta aterogênica (Parhami et al., 2001; Pirih et al., 2012), sugerindo o papel patogênico dos lipídeos sobre a perda óssea. Os lipídeos também reduzem a força mecânica e a integridade estrutural do osso cortical e trabecular (Pirih et al., 2012; Soares et al., 2012). Além disso, a regeneração do osso, em modelo experimental com defeito craniano, também é atenuada em camundongos alimentados com dieta rica em gorduras (Pirih et al., 2012).

O mecanismo primário do papel da dislipidemia na aterogênese é a formação de formas modificadas oxidativamente de LDL e dos fosfolipídeos. No contexto de um perfil lipídico aterogênico, as partículas de LDL tendem a acumular-se na matriz subendotelial das artérias, e possivelmente em outros tecidos. Neste local, na presença de células metabolicamente ativas, que produzem radicais de oxigênio, elas sofrem

diferentes reações não-enzimáticas (oxidação dos fosfolipídeos contendo araquidonato induzida por radicais livres), resultando em formas modificadas de LDL, tais como LDL minimamente modificada (parcialmente oxidada; MM-LDL) e altamente LDL oxidada (ox-LDL) (Smith, Murphy, 2008). Estas partículas de LDL modificada induzem potentes respostas inflamatórias, que não são associadas a LDL nativa, tais como o recrutamento de monócitos para parede arterial, a indução de fatores quimiotáticos em células endoteliais, e adesão de monócitos as células endoteliais, iniciando dessa maneira a formação da lesão aterosclerótica (Gleissner et al., 2007). É importante ressaltar que os araquidonatos são precursores das prostaglandinas (Gutierrez et al., 2008) que medeiam as respostas inflamatórias (Aoki et al., 2012). Neste contexto, os lipídeos bioativos contendo araquidonato podem ampliar ainda mais perfil inflamatório tecidual. Estas lipoproteínas biologicamente ativas modificadas (MM-LDL, ox-LDL) também são conhecidas como "lipídeos bioativos inflamatórios". Evidências sugerem que estas moléculas pró-inflamatórias também são prejudiciais para a saúde do osso.

Durante a o processo de formação óssea, a vascularização desempenha um papel importante, fornecendo nutrientes, andaimes e células precursoras osteogênicas, que permanecem em estreita associação com os vasos sanguíneos. Uma vez que os lipídios bioativos também são sistematicamente entregues aos compartimentos do tecido ósseo, lipoproteínas e lipídios podem acumular-se na matriz subendotelial dos vasos dos ossos (Tintut et al., 2004; Watanabe et al., 1989) como fazem no endotélio vascular. Já que as células progenitoras de osteoblastos encontram-se principalmente próximas dos compartimentos subendoteliais, elas poderiam estar expostas a lipoproteínas e lipídeos inflamatórios.

No osso humano osteoporótico, o acúmulo de lipídeos nos espaços subendoteliais dos canais haversianos tem sido reportado por métodos histoquímicos (Tintut et al., 2004). Curiosamente, a acumulação de lipídeos nos osteócitos, e apoptose dessas células também têm sido associadas com a perda óssea induzida por álcool (Maurel et al., 2012). A acumulação de lipídeos nos tecidos pode resultar, em parte, da disfunção dos vasos linfáticos, causando redução da depuração dos lipídeos e lipoproteínas (Lim et al., 2009). O acúmulo prolongado nos espaços intersticiais expõe essas moléculas a modificações não enzimáticas, tais como oxidação e glicosilação, o que os torna biologicamente ativos na indução de respostas inflamatórias como ocorre em lesões ateroscleróticas (Gordon, 2007).

Notavelmente, os osteoblastos produzem e secretam várias formas de lipídeos incluindo triglicérides, colesterol e fosfolipídeos (Wuthier, 1976). Demonstrou-se que os osteoblastos, assim como células vasculares, participam dos eventos patológicos já que também causam a oxidação não enzimática de lipoproteínas (Brodeur et al., 2008) presumivelmente através liberação de fatores metabólicos. Dessa maneira, o osso pode produzir seus próprios lipídeos oxidados, o que levaria a um microambiente inflamatório, se esses lipídeos permanecessem acumulados por um período prolongado no ambiente extracelular. A combinação destes lipídeos oxidados produzidos localmente em conjunto com a injúria lipídica a partir da circulação sistêmica pode exacerbar a progressão da patologia.

As espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo ânions superóxido, radical hidroxila, tiol, e o óxido nítrico produzido como subprodutos do metabolismo celular, provavelmente contribuem para a produção de produtos de peroxidação lipídica (Smith, Murphy, 2008). Normalmente, as EROs dissipam-se ou são eliminadas pelas enzimas captadoras. No entanto, através da modificação oxidativa dos lipídeos adjacentes, a atividade biológica de EROs pode ser prolongada. A estagnação linfática do tecido aumenta o tempo de exposição das espécies reativas, e a hiperlipidemia aumenta o número de moléculas lipídicas expostas. Os produtos da oxidação lipídica no interstício, por sua vez, promove o estresse oxidativo intracelular nos osteoblastos (Almeida et al., 2009; Maziere et al., 2010; Li et al., 2013), agravando e ampliando uma resposta ao estresse oxidativo no osso. A dieta aterogênica foi relatada para aumentar a formação de EROs através da indução hepática dos complexos oxidase-NADPH, uma enzima produtora de espécies reativas de oxigênio (Matsuzawa et al., 2007). Em camundongos, essa dieta resulta no acúmulo de produtos de oxidação lipídica no soro, fígado e medula óssea (Pirih et al., 2012; Tintut et al., 2004; Matsuzawa et al., 2007).

2.3 Tecido ósseo e a regulação do metabolismo energético

Embora o crescimento dimensional dos ossos seja interrompido na idade adulta, o tecido ósseo se encontra em frequente renovação a partir de um processo metabólico denominado como remodelamento ósseo, o qual consiste no equilíbrio entre as taxas de reabsorção e formação óssea (Matkovic et al., 1994; IOM, 1997). Esses processos são desempenhados por tipos celulares distintos, sendo a formação óssea realizada pelos osteoblastos, e a reabsorção exercida pelos osteoclastos (Teitelbaum, 2000). É estimado

que, a cada momento, aproximadamente 5% das superfícies ósseas estejam em processo de remodelação (IOM, 1997), e que, como resultado desta atividade, a maior parte do esqueleto de um adulto se renove a cada década (Usdhhs, 2004).

No passado, o esqueleto era visto como um tecido inativo de função majoritariamente de sustentação e o fato de que tanto osteoblastos quanto adipócitos são originários de células-tronco mesenquimais e a consideração de que disfunções no metabolismo da glicose e dos lipídios alteram o tecido ósseo forneceram suporte para a investigação da existência de suas funções extra-estruturais e de sua relação com outros tecidos (Kawai et al., 2009).

Nos últimos anos, ocorreu um considerável aumento de interesse nas pesquisas a respeito do papel do tecido ósseo como um órgão endócrino e de sua interação com o tecido adiposo, sistema nervoso central e o pâncreas. Esses estudos começaram na década passada com a demonstração da relação entre o metabolismo energético, o cérebro e o tecido ósseo, e que na atualidade tem se movido em duas direções distintas, porém, complementares: uma linha de investigação continua explorando como a leptina, serotonina, e outras moléculas orquestram o controle central do tecido ósseo, e a outra foca no osso como um órgão endócrino crítico para regulação sistêmica do metabolismo energético (Clemens e Karsenty, 2011).

A osteocalcina (OC) é uma proteína óssea abundante da matriz óssea sintetizada apenas por osteoblastos e sujeita a carboxilação pós-transducional. Essa proteína foi determinada pela primeira vez na década de 1970 (Hauschka et al., 1975; Price et al., 1976) e revelou-se essencial na interação do tecido ósseo com o tecido adiposo e a homeostase da glicose. A osteocalcina pode ser encontrada em frações carboxiladas (cOC) e não-carboxiladas (ucOC), sendo que sua carboxilação é dependente de vitamina K (Wolf, 2008). Enquanto a fração carboxilada demonstra maior afinidade aos cristais de hidroxiapatita encontrados na matriz óssea e possivelmente exerce atividade reguladora sobre osteoblastos e osteoclastos (Neve et al., 2013), a fração não-carboxilada apresenta afinidade reduzida pela hidroxiapatita e funciona como um hormônio que tem efeitos extra-ósseos. A osteocalcina ucOC é capaz de conduzir a expressão de adiponectina, uma adipocina capaz de estimular o uso da glicose e a oxidação de ácidos graxos em células musculares e de aumentar a sensibilidade à insulina no fígado e em outros tecidos (Díez & Iglesias, 2003), além de estimular a proliferação de células β -pancreáticas, aumentar a expressão e secreção de insulina (Lee et al., 2007; Ferron et al., 2008).

Lee et al. (2007) notaram que, mesmo na ausência de alterações ósseas, camundongos que não expressavam o gene para osteocalcina (OC^{-/-}) eram obesos, hiperglicêmicos, hipoinsulinêmicos, e mostraram reduzida sensibilidade à insulina e redução do gasto energético em relação aos animais do grupo controle. Da mesma maneira, osteoblastos isolados destes animais (OC^{-/-}) foram inábeis de exercer os efeitos referidos sobre os adipócitos e células β -pancreáticas (Lee et al., 2007). Mutuamente, a infusão da osteocalcina em camundongos selvagens induziu um aumento nas concentrações séricas dessa proteína (insulina) e melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (Ferron et al., 2008). Outras evidências demonstraram ainda que camundongos tratados com injeções intermitentes de osteocalcina apresentaram um aumento na quantidade de mitocôndrias no músculo esquelético, elevado gasto energético e proteção contra obesidade induzida por uma dieta rica em gordura. Além do mais, quadros de esteatose hepática induzida por dieta hiperlipídica foram completamente revertidos em camundongos recebendo osteocalcina diariamente (Ferron et al., 2012).

Além de regular a carboxilação da osteocalcina, a insulina também é necessária para a aquisição do osso normal após o nascimento. De fato, os camundongos InsR^{-/-} [osb] apresentaram redução do volume trabecular e formação óssea, além de frequência reduzida de osteoblastos. Além disso, a profundidade erosiva e as concentrações séricas de CTx (telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I) também foram reduzidas nos camundongos mutantes, indicando menor atividade osteoclástica. Em osteoblastos de animais selvagens, a insulina exerce efeito anabólico, estimulando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos a partir da supressão de Twist2, um inibidor de Runx2. Supreendentemente, a sinalização da insulina também regula positivamente a reabsorção óssea através da atenuação da expressão pelos osteoblastos da osteoprotegerina, o inibidor de RANKL, e através da ação sobre pelo menos dois genes específicos dos osteoclastos: catepsina K e Tcirg1 (Fulzele et al., 2010).

2.4 Esteroides anabólicos androgênicos

A testosterona é o principal hormônio androgênico do sexo masculino sintetizado e secretado principalmente pelas células intersticiais de Leydig, nos testículos, responsável por vários efeitos no organismo, alguns deles responsáveis pela determinação das características sexuais masculinas primárias e secundárias, o aumento

da massa muscular e do peso corpóreo, fechamento das epífises, o aumento da densidade óssea, entre outros efeitos (Frizon et al., 2005; Kicman, 2008).

A testosterona têm vários destinos metabólicos possíveis. Primeiramente, o andrógeno pode se ligar ao receptor do andrógeno (AR) nos tecidos alvo para exercer seus efeitos. Outra via de atuação implica a conversão da testosterona, via 5α -redutase, em di-hidrotestosterona (5DHT) que também atua sobre o receptor de andrógenos. Seguindo um caminho diferente, a testosterona pode sofrer ação da enzima aromatase e consequente formação do estradiol para exercer efeitos estrogênicos (Kicman, 2008).

Nas células-alvo, os hormônios esteroides atravessam facilmente a membrana plasmática por difusão passiva, para se ligarem as suas proteínas receptoras específicas no núcleo. Ao ligarem-se aos receptores proteicos formam um complexo esteroide-receptor o que desencadeia alterações na conformação das proteínas receptoras, de forma que estas se ligam a seqüências de DNA altamente específicas, denominadas elementos de resposta hormonal (do inglês – “hormone response element” - HRE). Com a ligação do dímero hormônio-receptor ao HRE, passa a ocorrer então à expressão gênica (mecanismo de transcrição de DNA a RNA-m no núcleo, e tradução do RNA-m, por ribossomos, a proteínas no citoplasma) dos genes específicos adjacentes ao HRE. De uma forma geral, a testosterona regula uma variedade de processos envolvidos no desenvolvimento, diferenciação, crescimento e adaptação a mudanças do meio interno e ambientais (Bahrke & Yesalis, 2004).

Desde o isolamento e caracterização da testosterona, na década de 30, diversos derivados foram sintetizados com a finalidade de prolongar a meia-vida metabólica da molécula original bem como sua eficácia. Esses derivados são usualmente chamados de esteroides anabólicos androgênicos (EAA). Inicialmente, estas substâncias foram utilizadas apenas por atletas profissionais e fisiculturistas, porém, nos dias atuais o uso desse fármaco por adolescentes e não-atletas torna-se cada vez mais evidente (Kuhn, 2002; El Osta et al., 2016).

Até a presente data, tem sido relatado que cerca de três milhões de usuários de EAA foram identificados nos Estados Unidos, e considerando sua prevalência crescente, o uso de EAA tornou-se uma questão de grande preocupação. Além disso, os estudos internacionais evidenciaram taxas elevadas de usuários de EAA na Escandinávia, Brasil, países da comunidade britânica e na Europa. Este aumento da prevalência no consumo de EAA tornou-se um grande problema de saúde pública nesses países (Maravelias et al, 2005; Pope et al., 2014; El Osta et al., 2016).

No Brasil, a preocupação não é tanta em relação a esportistas profissionais, mas ao adolescente, que no seu imediatismo, quer ganhar massa e músculos rapidamente, um corpo atlético em curto prazo, entregando-se aos anabolizantes, muitas vezes receitados por instrutores e professores de educação física, sem conhecimento na área dos efeitos colaterais (Santos et al., 2006).

Mudanças estruturais têm sido produzidas na molécula de testosterona a fim de maximizar os efeitos anabólicos e minimizar os androgênicos. Contudo, todos os EAA possuíram efeitos androgênicos se administrados durante longos períodos e em doses suficientemente elevadas (Shahidi, 2001).

Os EAAs possuem em sua estrutura variações químicas classificadas em 17-alfa-alquelados, 17-beta-ésteres e 1-metil esteróide, as quais exibem peculiaridades distintas, mas com propósitos semelhantes. Tradicionalmente, os EAA são classificados em duas categorias de acordo com a via de administração: os orais (17-alfa-alquelados) em forma de comprimidos que quando ingeridos, passam pelo estômago sendo absorvidos pelo intestino e metabolizados no fígado, onde provocam grande sobrecarga devido à alcalinização de sua molécula, causando grande hepatotoxicidade, e os injetáveis (17-beta-ésteres) que são menos nocivos que os orais e devem ser injetados por via intramuscular (Guimarães Neto, 1998; Pope et al, 2014; Nieschlag & Vorona, 2015; Rahnema et al., 2015).

Os efeitos fisiológicos diretos da testosterona e EAA, mediado pelo receptor androgênico, são bem determinados na literatura. Os efeitos incluem estímulo da eritropoiese, da síntese proteica, secreção sebácea, crescimento capilar, lipólise entre outros (Shahidi, 2001). No tratamento médico os EAAs vêm sendo utilizados em diversas condições patológicas relacionadas às deficiências androgênicas, balanço nitrogenado negativo, sarcopenia, osteoporose, paciente com HIV entre outros (Silva et al., 2002). De acordo com Silva et al (2002), os EAAs podem promover o aumento da massa muscular, aumento da concentração de hemoglobina e hematócrito, retenção de nitrogênio, além de aumentar a deposição de cálcio nos ossos, motivos esses que levam atletas a utilizar tais fármacos no intuito de melhorar o desempenho (Silva et al., 2002; Ribeiro 2001).

Os EAAs em doses terapêuticas provocam poucos efeitos colaterais. No entanto, as doses comumente administradas por usuários são cerca de 10 a 100 vezes maiores que as doses fisiológicas utilizadas em terapias de reposição hormonal em homens hipogonadais. Além disso, o uso de EAA quase sempre é realizado em combinação de

dois ou mais tipos de EAA, o que vem sendo denominado de “empilhamento”, aumentando os potenciais efeitos colaterais nocivos relacionados ao uso indiscriminado destas drogas (Hartgens & Kuipers, 2004; Chaves et al, 2007; Graham et al., 2008; Hoffman et al. 2009).

Alguns dos possíveis problemas relacionados ao uso indevido de EAAs incluem: hipercolesterolemia, agressividade, hipertrofia prostática, hipertensão arterial, limitação do crescimento, impotência, insônia, hepatotoxicidade, mudanças no sistema imunológico além de induzir a formação de neoplasias. Vale ressaltar que os EAAs, dependendo da dose administrada, podem levar até a morte (Fineschi et al 2001; Turillazzi et al., 2011).

O undecilenato de boldenona é um esteroide anabólico que se difere da testosterona pela presença de uma dupla ligação na posição 1-carbono (17-beta hidróxi-androsta-1,4dien-3-one 10-undecanoato) (Stolker et al., 2007) e é uma droga exclusivamente veterinária usada em eqüinos. No Brasil é encontrada com o nome comercial EQUIFORT (Laboratório Vetbrands) numa concentração de 50mg de undecilenato de boldenona por ml (mililitros). A aplicação deve ser por, exclusivamente, via intramuscular na dosagem de um ml para cada 50 kg de peso em intervalos de duas a três semanas. O Equifort é recomendado como tratamento complementar de patologias como: distrofia muscular, osteoporose, anemia aplástica, caqueixa, anorexia, e excesso de treinamento (EQUIFORT, 1996).

O undecilenato de boldenona é uma droga bem tolerada por apresentar efeitos colaterais discretos quando administrada de forma adequada apresentando resposta terapêutica imediata e duradoura, uma meia vida de 14 a 16 dias aproximadamente, propriedades anabólicas acentuadas, pouca atividade androgênica (por apresentar pouca afinidade com a enzima 5-alfa-reductase), hepatotoxicidade moderada e baixa aromatização (por ter pouca afinidade com a enzima aromatase) (EQUIFORT, 1996; Peres & Guimarães, 2005; Quel, 2015). Além disso, o undecilenato de boldenona possui algumas características únicas como, aumento de apetite (ótimo para ciclos de ganho de massa muscular), grande vascularização (por intermédio do aumento da produção de glóbulos vermelhos do sangue) (QUEL, 2008), aumento de força, densidade e volume muscular (Peres; Guimarães Neto, 2005). Contudo, se administrado de forma abusiva, a droga pode ocasionar efeitos androgênicos tais como: aumento da oleosidade cutânea (provocando acne), queda de cabelo (devido à conversão em DHT), aumento da pressão arterial (devido à retenção de sódio ocasionando uma retenção hídrica), média inibição

ao Eixo Testicular Pituitário Hipotalâmico (HTPA), hepatotoxicidade, agressividade e ginecomastia (QUEL, 2008).

Tal como outros esteroides androgênicos, o undecilenato de boldenona é enquadrado como Classe 2A (promotores de crescimento – esteróides) conforme a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer sendo um provável agente carcinogênico humano, com índices de cancinogenicidade maiores que de outros andrógenos como nandrolona e estanozolol e, portanto, é uma substância proibida (IARC, 1987). Apesar do seu uso exclusivo em equinos, o undecilenato de boldenona tem sido utilizado por fisiculturistas em ciclos de até 8 semanas envolvendo dosagens referentes a 150mg até 300mg por semana em homens e 50mg a 100mg por semana em mulheres (Peres; Guimarães Neto, 2005). Sendo o Undecilenato de Boldenona semelhante ao fármaco Nandrolona, pode-se fazer uma relação entre as duas drogas devido à escassez de estudos sobre a droga do presente estudo e ao grande número de trabalhos realizados com a Nandrolona.

3. REFERÊNCIAS

Almeida M, et al. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *J Biol Chem.* 284:27438–27448, 2009.

American College of Sports Medicine (ACSM). Position stand on the use of anabolic androgenic steroids in sports. *Science Sports and Exercise*, 19:534-539, 1987.

Annema W, Tietge UJ. Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. *Nutr Metab* 9:25, 2002.

Aoki T, Narumiya S. Prostaglandins and chronic inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33:304–311.

Bahrke MS, Yesalis CE. Abuse of anabolic-androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 4:614–620, 2004.

Bain SD, Watkins BA. Local modulation of skeletal growth and bone modeling in poultry. *J. Nutr.* 123:317-322, 1993.

- Bhattacharyya T, et al. Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *JAMA*. 299:1265–1276, 2008.
- Bizeray D, Estevez I, Leterrier C, Faure JM. Effects of increasing environmental complexity on the physical activity of broiler chickens. *Applied Animal Behaviour Science* 79:27-41, 2002.
- Borja MS, et al. HDL-apoA-I Exchange: Rapid Detection and Association with Atherosclerosis. *PLoS One*. 8:e71541, 2013.
- Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science*, 272:685-688, 1996.
- Brodeur MR, et al. Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic Biol Med*. 44:506–517, 2008.
- Brown MD, et al. Lipid retention in the arterial wall of two mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *J Lipid Res*. 45:1155–1161, 2004.
- Calara, F.; Silvestre, M.; Casanada, F. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J Pathol.*, 195:257-63, 2001.
- Chaves EA, Pererira-Junior PP, Fortunato RS, Carvalho DP, Nascimento JHM, Oliveira MF. Cardioproteção induzida pelo exercício é prejudicada pelo tratamento com o anabolizante decanoato de nandrolona. *Brazilian Journal of Biomotricity*, 1:46-55, 2007.
- Clemens L, Karsenty G. The osteoblast: An insulin target cell controlling glucose homeostasis. *Journal of bone and Mineral Research*, 26:677-680, 2011.
- Collins TC, et al. Peripheral arterial disease is associated with higher rates of hip bone loss and increased fracture risk in older men. *Circulation*. 119:2305–2312, 2009.
- Daugherty, A. Mouse models of atherosclerosis. *American Journal of the medical sciences*, 323:3-10, 2002.
- Davignon, J., Cohn, J.S., Mabile, L., Bernier, L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clinica Chimica Acta*, 286:115-143, 1999.

Di Angelantonio E, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. JAMA. 302:1993–2000, 2009. Fang Y, et al. Effect of vitamin K on bone mineral density: a meta-analysis of randomized controlled trials. J Bone Miner Metab. 2012;30:60–68.

Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. Eur J Endocrinol., 148: 293-300, 2003.

El Osta R, Almont T, Diligent C, et al. Anabolic steroids abuse and male infertility. Basic and Clinical Andrology. 26:2, 2016.

Equifort: injetável. Responsável Técnico Dr. Maurício Del Bigio. Jacaré: Divisão Vertbrands Saúde Animal, Bula de remédio, 1996.

Fang Y, et al. Effect of vitamin K on bone mineral density: a meta-analysis of randomized controlled trials. J Bone Miner Metab. 30:60–68, 2012.

Ferron M, Hinoi E, Karsenty G et al. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. Proc Natl Acad Sci., 105:5266-5270, 2008.

Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. Cell., 142:296–308, 2010.

Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. Bone, 50: 568-575, 2012.

Fineschi V, et al. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 125:253-255, 2001.

Frizon F, Macedo SMD, Yonamine M. Uso de Esteróides Andrógenos Anabólicos por Praticantes de Atividades Físicas das Principais Academias de Erechim e Passo Fundo / RS. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. RS, v.26, n. 3, p. 227-232, 2005.

Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. Cell., 142:309–319, 2010.

- Gleissner CA, et al. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension*. 50:276–283, 2007.
- Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. *J Clin Invest*. 117:89–93, 2007.
- Graham MR, Davies B, Grace FM, Kicman A, Baker JS. Anabolic steroid use: patterns of use and detection of doping. *Sports Med.*, 38:505–25, 2008.
- Graham, L.S., Tintut, Y., Parhami, F., Kitchen, C.M., Ivanov, Y., Effros, R.B. Bone density and hyperlipidemia: the T-lymphocyte connection. *J Bone Miner. Res.*, 25:2460-9, 2010.
- Grillo, L. P., Crispim, S. P., Siebert, A. N., Andrade, A. T., Rossi, A., Campos, I. C. Perfil lipídico e obesidade em escolares de baixa renda. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 8:75-81, 2005.
- Guimarães Neto WM. Musculação – Anabolismo Total: Treinamento, nutrição, Esteróides Anabólicos Outros Ergogênicos. 2. ed. Guarulhos, SP: Phorte, 1998.
- Gutierrez LL, et al. Atherosclerosis: a redox-sensitive lipid imbalance suppressible by cyclopentenone prostaglandins. *Biochem Pharmacol*. 75:2245–2262, 2008
- Hamrick MW, Della-Fera MA, Baile CA, Pollock NK, Lewis RD. Body fat as a regulator of bone mass: experimental evidence from animal models. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.*, 7:224-229, 2009.
- Hansson, Göran K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 352, 16, 1685-1695, 2005.
- Hartgens F, Kuipers H. Effects of Androgenic-anabolic Steroids in Athletes. *Sports Med*, 34:513-554, 2004.
- Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci*, 72:3925–9, 1975.
- Hmamouchi I, et al. Low bone mineral density is related to atherosclerosis in postmenopausal Moroccan women. *BMCPublic Health*. 9:388, 2009.

Hoffman R, Kraemer WJ, Bhasin S, Storer T, Ratamess NA, Haff GG, Willoughby S, Rogol AD. Position stand on androgen and human growth hormone use. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 23:1-59, 2009.

Hofker MH, Van Vlijmen BJM, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of apo E in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 137:1-11, 1998.

Huang Y, et al. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin invest*. 123:3815–3828, 2013.

IOM (Institute of Medicine). Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board, National Academy of Sciences. National Academy Press, 1997.

Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J.; Yamada, T., Imai, J., et al. Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation*, 118:75-83, 2008.

Jackson, CL, Bennett MR, Biessen EAL, Johnson JL, Rob Krams R. Assessment of Unstable Atherosclerosis in Mice. *American Heart Association*, 27:714-720, 2007.

Jiang G, et al. Coronary heart disease mortality in China: age, gender, and urban-rural gaps during epidemiological transition. *Rev Panam Salud Publico*. 31:317–324, 2012

Johnson, J.L. & Jackson, C.L. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis*, 154:399-406, 2001.

Kadl A, et al. Oxidized phospholipid-induced inflammation is mediated by Tolllike receptor 2. *Free Radic Biol Med.*, 51:1903–1909, 2011.

Kawai M, Devlin MJ, Rosen CJ. Fat targets for skeletal health. *Nat Rev Reumatol.*, 5: 365-72, 2009.

Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *Brit J Pharmacol.*, 154:502–21, 2008.

Kim YH, et al. Low bone mineral density is associated with dyslipidemia in South Korean men: The 2008–2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Endocr J*. 2013.

Kuhn CM. Anabolic steroids. *Recent Prog. Horm. Res.*, 57:411–434, 2002.

- Lee NK, Sowa H, Hinoi E et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.*, 130:456-469, 2007.
- Li X, et al. Mechanism of hyperlipidemia-induced parathyroid hormone (PTH) resistance: A role of PTH receptor and reactive oxygen species in preosteoblasts. *J Cell Biochem.* 2013
- Lim HY, et al. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol.* 175:1328–1337, 2009
- Liu Y, Almeida M, Weinstein RS, et al. Skeletal Inflammation and Attenuation of Wnt Signaling, Wnt Ligand Expression and Bone Formation in Atherosclerotic ApoE Null Mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Março, 2016. doi: 10.1152/ajpendo.00501.2015
- Luegmayr E, Glantschnig H, Wesolowski GA, Gentile MA, Fisher JE, et al. Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ.*, 11:108–118, 2004.
- Luisetto, G., Camozzi, V.J. Statins, fracture risk, and bone remodeling. *Endocrinol Invest.*, 32:32-7, 2009.
- Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol Lett.*, 158:167-75, 2005.
- Matkovic V, Tomislav J, Wardlaw GM, Ilich JZ, Goel PK, et al. Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. *J Clin Inve.*, 93:799-808, 1994.
- Matsuzawa N, et al. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology.* 46:1392–1403, 2007.
- Maurel DB, et al. Osteocyte apoptosis and lipid infiltration as mechanisms of alcohol-induced bone loss. *Alcohol Alcohol.* 47:413–422, 2012.
- Maziere C, et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits phosphate signaling and phosphate-induced mineralization in osteoblasts. Involvement of oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 1802:1013–1019, 2010.

Navab M, et al. D-4F-mediated reduction in metabolites of arachidonic and linoleic acids in the small intestine is associated with decreased inflammation in low-density lipoprotein receptor-null mice. *J Lipid Res.* 53:437–445, 2012.

Navab M, et al. High-density lipoprotein and 4F peptide reduce systemic inflammation by modulating intestinal oxidized lipid metabolism: novel hypotheses and review of literature. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 32:2553–2560, 2012.

Naves M, et al. Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int.* 19:1161–1166, 2008.

Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol.*, 228:1149-1153, 2013.

Niemeier A, et al. The role of apolipoprotein E in bone metabolism. *Bone* 50:518–524, 2012.

Nieschlag E, Vorona E. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions. *Eur J Endocrinol.*, 173:R47–58, 2015.

Nuzzo, V. et al. Analysis of skeletal status by quantitative ultrasonometry in a cohort of postmenopausal women with high blood cholesterol without documented osteoporosis. *Ultrasound Med. Biol.*, 35:717–722, 2009.

Parhami F, et al. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res.*, 16:182–188, 2001.

Parssinen M, Karila T, Kovanen V, Seppala T. The effect of supraphysiological doses of anabolic androgenic steroids on collagen metabolism. *International Journal of Sports Medicine*, 21:406-411, 2000.

Peres, R. A. N., Guimarães Neto, W. M. Guerra Metabólica: Manual de Sobrevivência. Londrina: Midiograf, 2005.

Pirih F, et al. Adverse effects of hyperlipidemia on bone regeneration and strength. *J Bone Miner Res.*, 27:309–318, 2012.

Pope HG, Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.* 35:341–75, 2014

Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gammacarboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 1447–51, 1976.

Quel. Boldenona (Undecilenato de Boldenona). Disponível em: <http://www.mundoanabolico.com/showthread.php?t=14335>. Acesso em: 09 janeiro 2015.

Quintão E, Nakandakare, E. R. Manual de referência em dislipidemias. Novartis, 1997.

Rahnema CD, Crosnoe LE, Kim ED. Designer steroids - over-the-counter supplements and their androgenic component: review of an increasing problem. *Andrology.* 3:150–155, 2015.

Raubenheimer EJ. Histopathologic changes in metabolic bone disease. *Adv. Anat. Pathol.*, 11:38-48, 2004.

Reid DG, et al. Lipids in biocalcification: contrasts and similarities between intimal and medial vascular calcification and bone by NMR. *J Lipid Res.* 53:1569–1575, 2012.

Ribeiro PCP. O uso indevido de substâncias: esteróides anabolizantes e energéticos. *Adolescência Latinoamericana*, 2:2, 2001.

Russell M, Mendes N, Miller KK, Rosen CJ, Lee H, Klibanski A, et al. Visceral fat is a negative predictor of bone density measures in obese adolescent girls. *J Clin. Endocrinol. Metab.*, 95:1247-55, 2010.

Santos AF, et al. Anabolizantes: conceitos segundo praticantes de musculação em Aracaju (Se). *Psicologia em Estudo*, 11:371-380, 2006.

Shahidi, NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin. Ther.*, 23:1355–1390, 2001.

Sennerby U, Farahmand B, Ahlbom A, Ljunghall S and Michaelsson K. Cardiovascular diseases and future risk of hip fracture in women. *Osteoporos Int.*, 18:1355-1362, 2007.

Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, et al. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy Young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 283:154–164, 2002.

Smith WL, Murphy RC. Oxidized lipids formed non-enzymatically by reactive oxygen species. *J Biol Chem.*, 283:15513–15514, 2008.

Soares EA, Nakagaki WR, Garcia JAD, Camilli JA. Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in low-density lipoprotein receptor gene knockout mice. *J. Bone Miner. Metab.*, 30:419–425, 2012.

Sposito AC, et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.*, 88:2-19, 2007.

Stolker, A.A., Zuidema, T., Nielen, M.W. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends Anal. Chem.*;26:967–979, 2007.

Takahashi, M. et al. Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocrine Journal*, 51:425-434, 2004.

Tamaki J, et al. Low bone mass is associated with carotid atherosclerosis in postmenopausal women: the Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study. *Osteoporos int.* 20:53–60, 2009.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289:1504-8, 2000.

Tintut Y, et al. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:e6–e10, 2004

Tintut, Y.; Morony, S.; Demer, L.L. Hyperlipidemia Promotes Osteoclastic Potential of Bone Marrow Cells Ex Vivo. *Arterioscler. Tromb. Vasc.* 24:6-10, 2004.

Tintut Y., Demer L.L. Effects of bioactive lipids and lipoproteins on bone *Trends Endocrinol Metab.*, 25:53–59, 2014.

Turillazzi E, Perilli G, Di Paolo M, Neri M, Riezzo I, Fineschi V. Side effects of AAS abuse: na overview. *Mini. Ver. Med. Chem.*, 11:374:389, 2011.

USDHHS (United States Department of Health and Human Services). Bone Health and

Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General, 2004.

Van Dam RM, Seidell JC. Carbohydrate intake and obesity. *European J. Clin. Nutr.*, 61:575-599, 2007.

Van Ree JH, Van Den Broek WJ, Dahlmans VEH, Groot PHE, Vidgeon-Hart M, et al. Diet induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 111:25-37, 1994.

Watanabe Y, et al. Histopathology of femoral head osteonecrosis in rheumatoid arthritis: the relationship between steroid therapy and lipid degeneration in the osteocyte. *Rheumatol Int.* 9:25–31, 1989.

Wen D, et al. Lipids and collagen matrix restrict the hydraulic permeability within the porous compartment of adult cortical bone. *Ann Biomed Eng.* 38:558–569, 2010.

WHO . Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Technical Report Series 916, 2003.

Wolf G. Energy regulation by the skeleton. *Nutr. Rev.*, 66: 229-33, 2008.

Wuthier RE. Lipids of matrix vesicles. *Fed Proc.* 1976;35:117–121.

Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiol.*, 101:1-20, 2013.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258:468-471, 1992.

Efeito do esteroide anabólico e dieta rica em sacarose sobre o perfil bioquímico dos lipídeos e parâmetros ósseos em camundongos ApoE-/-

Felipe Couto Santos^a, Rômulo Dias Novaes^b, Daniel Silva Sena Bastos^a, Eliziária Cardoso dos Santos^c, Izabel Regina Santos Costa Maldonado^{a*}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, UFV – Viçosa, MG, Brasil

^b Departamento de Biologia Estrutural, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL – Alfenas, MG, Brasil

^c Departamento de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM – Teófilo Otoni, MG, Brasil

*Autor correspondente: Laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Tel.: + 55 31 3899 3359; Fax: + 55 31 3899 2549. E-mail: irscosta@ufv.br

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of AAS and diet rich in sucrose on the biomechanical and morphological properties of bone tissue of ApoE gene knockout mice (ApoE^{-/-}). Eight wild-type (C57BL6) and forty ApoE^{-/-} mice generated on a C57BL6 background were used. Female 3-month-old were divided into four groups (n=8): group W (wild type), group A (ApoE^{-/-}) and group A20 (ApoE^{-/-} plus 20mg/kg AAS) receiving commercial ration, and group AH (ApoE^{-/-}), group AH10 (ApoE^{-/-} plus 10mg/kg AAS) and group AH20 (ApoE^{-/-} plus 20mg/kg AAS) receiving a sucrose-diet. After 56 days, blood samples were collected for laboratory of calcium, triglycerides, cholesterol. The femur was excised for mechanical testing, morphometric and minerals analysis, while the tibias were used to analyze the content of bone proteins. Our results showed that the EAA alone increased serum concentrations of total cholesterol, triglycerides, LDL and phosphorus; Ca/P and calcium content the bone, however, the drug induced low HDL, bone phosphorus, collagenous protein content, cortical area and trabecular volume, stiffness and elastic modulus of the bone. The mice fed the diet rich in sucrose despite having an increase in total cholesterol, LDL and HDL and phosphorus does not denote changes to the morphometric parameters. However, the consumption of sucrose increased calcium retention in the bone, the maximum load, stiffness and maximum stress of the femurs of the animals. The association between the lowest dose of EAA and experimental diet increased the serum concentrations of non-HDL cholesterol and phosphorus and reduced HDL. Moreover, these animals showed higher calcium content, collagenous proteins, maximum load, stiffness, maximum stress. The administration of the highest dose of the EAA associated with sucrose-rich diet induced increase in total cholesterol and LDL and reduced the HDL concentration and phosphorus in the bone. Additionally, the animals in this group had increased bone calcium, collagenous protein content, cortical area and trabecular volume, maximum load, displacement, stiffness, maximum stress and strain. The isolated use of EAA affected the bone microarchitecture and mechanical properties of femurs that was related to more severe dyslipidemia in this group. The bones of mice treated with diet alone or combined the lowest dose of the EAA despite having beneficial changes in the mechanical properties do not denote changes in bone structure. However, the highest dose of EAA combined with diet had a positive effect on bone

morphometry as well as the mechanical properties of bone that has been associated with the control of energy metabolism orchestrated by bone.

Keywords: anabolic androgenic steroid, sucrose dietary, dyslipidemia, femur

1. Introdução

Entre as doenças crônicas degenerativas não transmissíveis as dislipidemias merecem atenção visto que, tanto de forma isolada quanto associada a outros fatores de risco, estão fortemente associadas com a ocorrência de doenças cardiovasculares e acarretam enormes prejuízos aos serviços de saúde pública (Koba, Hirano, 2011; Sidney et al., 2013). Embora a etiologia das dislipidemias seja complexa e multifatorial, a patogênese dessas condições pode ser influenciada por fatores ambientais e hábitos de vida, especialmente o perfil de ingestão alimentar e o consumo de drogas (Schulz, 2006; Schwenk et al., 2013). As dislipidemias estão relacionadas com o aumento das concentrações de lipoproteínas no sangue (Yamada, 2011). Animais knockout para a apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) e para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR^{-/-}) têm sido descritos como interessantes modelos para o desenvolvimento das dislipidemias, possuindo extensa aplicabilidade em estudos pré-clínicos (Fazio, Linton, 2001; Schilling et al., 2005; Pirih et al., 2012; Soares et al., 2012).

Estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos, reunidos ao longo de décadas, evidenciaram que os níveis elevados de lipídeos têm sido relacionados com o aumento na incidência de doenças cardiovasculares e osteoporose (Lee, et al., 2005; Farhat et al, 2006; Sennerby et al., 2007; Pirih, et al., 2012). Soares et al. (2012) demonstraram que a hiperlipidemia causou diminuição da área e espessura cortical e trabecular além de reduzir a resistência óssea do fêmur de camundongos rLDL^{-/-}. De acordo com Liu et al. (2016), camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta aterogênica exibiram redução da massa óssea femoral associada com a diminuição acentuada do número e atividade osteoblástica. Elevadas concentrações de LDL podem provocar o desequilíbrio do processo de remodelação óssea, reduzindo a massa óssea através do aumento da diferenciação e atividade dos osteoclastos (Luegmary et al., 2004). Tem sido sugerido que as dislipidemias afetam o tecido ósseo *in vivo* devido à inibição da diferenciação dos osteoblastos por intermédio de lipídeos bioativos (Parhami et al., 2001; Tintut, Demer, 2014; Liu et al., 2016).

Durante várias décadas, os derivados sintéticos da testosterona têm sido utilizados em razão do potencial anabólico dessas substâncias. A princípio, o uso dessas substâncias era restrito a fisiculturistas profissionais e fins terapêuticos, contudo, gradualmente o uso abusivo dessas substâncias tem se tornado mais popular entre atletas e adolescentes (Kuhn, 2002; El Osta et al., 2016), e considerando sua prevalência crescente, o uso de esteroide anabólico androgênico (EAA) tornou-se uma questão de

saúde pública preocupante (Maravelias et al, 2005; Pope et al., 2014; El Osta et al., 2016). Além disso, os estudos internacionais evidenciaram taxas elevadas de usuários de EAA na Escandinávia, países da comunidade britânica, Europa e o Brasil. O aumento da prevalência do consumo indiscriminado de EAA tornou-se um grande problema de saúde pública nesses países (Pope et al., 2014). Diversos estudos vêm demonstrando uma forte associação do uso de EAA com alterações e/ou adaptações patológicas no sistema cardiovascular e no tecido ósseo (Hartgens & Kuipers, 2004; Maravelias et al., 2005; Turillazzi et al., 2011).

Além dos fármacos, regimes dietéticos são capazes de interferir no metabolismo lipídico e energético, podendo aumentar ou diminuir o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas (Glazer, 1991).

A nutrição exerce papel fundamental para integridade da massa óssea. Os hábitos alimentares podem influenciar a manutenção da massa óssea (Hamrick et al., 2009). Uma alimentação rica em açúcares tem sido relacionada com a elevação da massa corporal em virtude da alta densidade energética, estando ainda associada com doenças que incluem obesidade, osteoporose, doença cardiovascular e alguns tipos de câncer (WHO, 2003; Van Dam, Seidell, 2007).

Em países desenvolvidos as doenças osteo-metabólicas, como a osteoporose são consequências da idade avançada e do uso de medicamentos. Já em países em desenvolvimento, como o Brasil, são consequências principalmente de fatores nutricionais (Raubenheimer, 2004). As recentes descobertas sobre a biologia óssea pressupõem a partir de uma visão generalizada, que o esqueleto possa participar, diretamente ou não, na regulação do metabolismo energético e homeostase da glicose. Nos últimos anos, ocorreu um considerável aumento de interesse nas pesquisas a respeito do papel do tecido ósseo como um órgão endócrino e de sua interação com o tecido adiposo, sistema nervoso central e o pâncreas (Clemens, Karsenty, 2011).

As evidências de que as disfunções no metabolismo da glicose e dos lipídios possam alterar a estrutura do tecido ósseo (Kawai et al., 2009) fundamentam o presente estudo que teve como objetivo avaliar o possível efeito de doses suprafisiológicas de EAA e da dieta rica em sacarose através de investigações no perfil bioquímico lipídico e alterações nas propriedades histomorfológicas, mecânicas e bioquímicas do tecido ósseo de camundongos ApoE-/-.

2. Material e métodos

2.1 Modelo animal e tratamentos

Oito camundongos selvagens (C57BL6) e quarenta camundongos fêmeas homozigotos ApoE^{-/-} com 10 semanas de idade foram utilizados (Jackson Laboratory, EUA). Os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas com condições de temperatura $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade 60 a 70 % controlada, com ciclo de luminosidade de 12 horas. Os camundongos foram divididos em seis grupos experimentais (n=8): grupo W (camundongo selvagem), grupo A (camundongo ApoE^{-/-}) e grupo A20 (camundongo ApoE^{-/-} tratado com anabolizante – 20mg/kg) que receberam dieta comercial (Nuvital[®]; PR, Brasil) por 8 semanas; grupo AH (camundongo ApoE^{-/-}), grupo AH10 (camundongo ApoE^{-/-} tratado com anabolizante – 10mg/kg) e AH20 (camundongo ApoE^{-/-} tratado com anabolizante – 20mg/kg) que receberam dieta rica em sacarose por 8 semanas. Os animais foram alimentados com as respectivas dietas e receberam água *ad libitum*.

A dieta purificada, rica em sacarose, seguiu a proposta do *American Institute of Nutrition* (AIN-93M) conforme Reeves (1997) (Tabela 1). O esteroide anabólico, undecilenato de boldenona (Ceva[®]; SP, Brasil), foi dissolvido em óleo vegetal e administrado via intraperitoneal (i.p.) três vezes por semana com duração de 8 semanas.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV, protocolo 36/2015) e realizadas de acordo com as orientações emitidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Tabela 1. Composição da dieta comercial e rica em sacarose

Composição	Comercial	Rica em sacarose
Caseína	20	14
Sacarose	10	60
Maltodextrina	13.2	0
Fibra	5	5
Amido	42.87	12.07
Mix Mineral	3,5	3.5
Mix Vitamínico	1	1
L-cistina	0.18	0.18
Bitartarato de colina	0.25	0.25
Óleo de soja	4	4

Dados são expressos como percentagem (%)

2.2 Peso corporal

No momento que antecedeu a eutanásia, os camundongos foram pesados com auxílio de uma balança digital analítica (precisão 0,0001g – BEL Mark 210A; Brasil) para determinação do peso corporal.

2.3 Análise bioquímica

Os animais foram anestesiados no 57º dia com injeção intraperitoneal de xilazina (5 mg/kg) e quetamina (45 mg/kg) seguida da retirada do sangue por punção cardíaca, e posteriormente aprofundada a anestesia até a eutanásia. Nesse momento o sangue foi coletado e centrifugado a 3.000 xg a frio (5°C) para obtenção do soro a fim de determinar os seguintes parâmetros bioquímicos séricos: cálcio, fósforo, triglicérides, colesterol total e frações (LDL e HDL) (Bioclin[®]; MG, Brasil).

2.4 Morfometria femoral

2.4.1 Dimensões anatômicas do fêmur

Para análise das dimensões anatômicas, utilizou-se o fêmur esquerdo de cada animal, tomando-se o cuidado de remover todos os tecidos moles associados ao osso. Com base em Lammers et al. (1998) e com auxílio de um paquímetro universal analógico (Vonder, 150mm, graduação 0,05mm, Brasil) e lupa, foram feitas as seguintes medidas: Comprimento do fêmur (CF): do ponto mais proximal da cabeça do fêmur até o ponto mais distal na outra extremidade do osso; Largura da diáfise do fêmur (LDiaf): largura através da porção mais estreita na metade do fêmur; Largura do fêmur proximal (LP): do ponto mais anterior na cabeça do fêmur até a ponta do trocanter maior; Largura do fêmur distal (LD): largura através dos côndilos (sentido ântero-posterior), perpendicular ao comprimento do fêmur.

2.4.2 Osso trabecular epifisário

As epífises distal do fêmur (n=6) foram fixadas em solução de formalina a 10% em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7, por um período de 48 horas à temperatura ambiente, e, em seguida, foram imersas em solução descalcificadora de ácido fórmico (12,5%) e citrato de sódio (20%) por 30 dias. As amostras foram desidratadas em

gradiente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina líquida a 60° na orientação vertical em relação ao eixo longitudinal do fêmur (Yoshik et al., 1983). Secções de 5µm de espessura foram obtidas utilizando micrótomo rotativo (Spencer, modelo 19459, USA), e corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) (Junqueira, Junqueira, 1983). Para evitar a repetição das análises na mesma área histológica, os cortes foram feitos de modo semi-seriado usando 1 a cada 20 secções. Seis cortes histológicos foram preparados para cada fêmur e dois campos de cada corte foram capturados usando a objetiva de 40x. As imagens foram digitalizadas por meio de um fotomicroscópio (Olympus AX70[®]; Tóquio, Japão) conectado a câmera digital (Olympus QColor-3[®]; Tóquio, Japão).

Para a quantificação da proporção volumétrica, foi utilizado o software *ImageJ*. Em cada imagem foram contadas cento intersecções distribuídas sobre o tecido ósseo e tecido mielóide. Foi mensurada toda a região que continha tecido ósseo, utilizando a média simples como resultado. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem (%).

2.4.3 Osso cortical diafisário

Foi utilizado o terço médio da diáfise femoral (n=6), no qual cortes transversais de 5µm de espessura foram obtidos e corados com H&E. Foram feitas doze secções histológicas, um campo por secção, para cada amostra. As imagens foram capturadas usando objetiva 4x para determinação da área cortical óssea, que foi obtida através da subtração entre a área total da secção e área medular. A histomorfometria foi realizada utilizando o software para análises de imagem Image Pro Plus 4.5[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

2.5 Teste mecânico

Os fêmures direitos foram removidos dos animais e armazenados a -20°C até o dia anterior ao teste mecânico. Para esse teste, o terço médio da diáfise dos fêmures foram submetidos ao teste de flexão de três pontos até fratura completa a uma velocidade de 3mm/min no equipamento mecânico com célula de carga 100 Kgf (3367 Dual Column Tabletop Model testing system, Instron, Grove City, PA, USA). O ponto superior e os dois suportes inferiores possuíam 0,5 mm de raio sem suas extremidades (Robertson et al., 2006). A distância entre os dois suportes inferiores foi de 7 mm (Akhter et al., 2001). Cada fêmur foi testado no plano ântero-posterior (concavidade

voltada para cima), com o lado anterior do osso voltado para cima. Os dados de força e deslocamento foram obtidos diretamente do sistema MTS e gravados num computador acoplado à máquina de ensaio. Esses dados foram utilizados para a aquisição e cálculo das propriedades estruturais: carga máxima, deslocamento e rigidez. A rigidez extrínseca foi calculada como a inclinação da porção mais linear da região elástica da curva de carga-deslocamento (Akhter et al., 2001; Huang et al., 2003). Após o teste de três pontos de cada espécime, as extremidades do local da ruptura do osso foram fotografadas, em conjunto com um padrão de medição, por uma câmara digital de alta resolução a uma distância padronizada (Huang et al., 2003). Os parâmetros da área de secção transversal da diáfise foram medidos nas imagens usando o software Image-Pro Plus 4. O momento de inércia de área da diáfise no ponto de ruptura foram calculados pelo método de Turner et al. (1992):

$$I = \frac{\pi}{64} [ab^3 - (a - 2t)(b - 2t)^3]$$

Onde I é o momento de inércia da área; a é a largura da área de secção transversal na direção médio-lateral; b é a largura da área da secção transversal na direção anteroposterior; e t é a média da espessura do osso cortical (Lammers et al., 1998). As propriedades materiais foram obtidas a partir desses parâmetros (Akhter et al., 2001). As seguintes propriedades do material foram avaliadas: tensão máxima, deformação e módulo elástico. Esses parâmetros foram calculados a partir das seguintes equações:

$$\sigma = \frac{\text{força} \times L \times c}{4I} \quad \varepsilon = \frac{12 \times c \times d}{L^2} \quad E = \frac{\text{rigidez} \times L^3}{48I}$$

Onde: σ é a tensão; L é a distância entre os dois suportes inferiores; c é igual à metade de b (descrito anteriormente); ε é a deformação; d é o deslocamento; E é o módulo elástico. O ensaio foi realizado no Laboratório de Embalagens da Universidade Federal de Viçosa.

2.6 Cálcio e fósforo

Após o teste mecânico, fragmentos da diáfise foram pesados em balança analítica e incubados a 70°C até atingirem peso seco constante. As amostras secas foram digeridas em solução 0.75 mL de HNO₃ concentrado e 0.25 mL de HClO₄ (70%). A temperatura de digestão da solução foi gradativamente aumentada na placa de aquecimento a partir de 70°C até 90°C, de modo que a digestão do material fosse completa. O tempo médio gasto para a digestão foi de 30 minutos. Após a digestão, as

concentrações de cálcio foram determinadas através de espectrofotometria de absorção atômica e o fósforo pelo método colorimétrico (SpectrAA 220FS Varian) (dos Santos et al., 2012).

2.7 Proteínas ósseas

Nas determinações de proteínas colagenosas e não colagenosas, as tíbias foram cortadas longitudinalmente, a medula óssea removida com jatos de água destilada e deionizada, e desengorduradas com éter de petróleo, em aparelho de Soxhlet, por 3 h.

A seguir, para a extração de proteínas não colagenosas, os fragmentos foram pesados e desmineralizados em solução de sal dissódico de EDTA (ácido etilenodiamina tetracético), com 0,5 M e pH 8,2, de acordo com a técnica descrita por Hauschka & Gallop (1977). Por fim, os extratos de EDTA obtidos foram utilizados para determinação dos teores de proteínas não colagenosas, conforme técnica descrita por Bradford (1976).

Os fragmentos dos ossos, após a desmineralização, foram lavados exaustivamente com água destilada e deionizada para eliminação de EDTA e usados para estimar o teor de proteínas colagenosas, utilizando-se o método de Berthelot, modificado por Pezemk e Nielsen (Guimarães, 1988). O teor de proteína colagenosa foi obtido multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator 6.25.

2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software Graph-Pad Prism[®]. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média±DP). A normalidade na distribuição de dados foi avaliada por meio do teste D'Agostino-Pearson. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por meio da análise de variância one-way (ANOVA) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls de comparações múltiplas com um nível de significância de 5%.

3. Resultados

Não houve diferença no peso corporal entre os animais dos grupos controle, AH, AH10 e AH20. Entretanto, os camundongos ApoE^{-/-} tratados apenas com o EA (A20) apresentaram maior peso corporal quando comparados com os animais dos demais grupos (Tabela 2).

As análises do perfil bioquímico dos lipídeos demonstraram que todos os tratamentos utilizados induziram o aumento das concentrações de colesterol total dos camundongos ApoE^{-/-}. As concentrações de triglicérides não diferiram significativamente entre os grupos A, AH e AH20. Entretanto, os animais dos grupos A20 e AH10 exibiram maior trigliceridemia quando comparados com os demais grupos (Tabela 2). As concentrações do HDL dos animais grupos A20, AH10 e AH20 foram reduzidas nesses animais comparadas com o grupo controle. Além disso, os camundongos ApoE^{-/-} alimentados apenas com a dieta rica em sacarose exibiram maior concentração de HDL comparado aos animais dos outros grupos. Todos os animais tratados exibiram aumento nas concentrações de LDL quando comparados com os camundongos ApoE^{-/-} não tratados, sendo o aumento nestas concentrações mais evidente nos animais tratados apenas com o EA (Tabela 2).

Não houve diferença significativa nas concentrações de cálcio total entre os grupos experimentais. Entretanto, para o fósforo, os tratamentos usados nos grupos A20, AH e AH10 aumentaram as concentrações do fósforo no soro. (Tabela 2).

Nesse estudo, as análises referentes aos parâmetros avaliados no tecido ósseo de camundongos ApoE^{-/-} tratados com EA e/ou regime dietético rico em sacarose (A20, AH, AH10 e AH20) foram comparadas aos de animais ApoE^{-/-} não-tratados (A) sendo evidenciadas alterações em parâmetros distintos que influenciaram o comportamento ósseo.

As análises das dimensões do fêmur demonstraram que o comprimento do osso entre o grupo tratado com EA isoladamente e o grupo A não exibiram diferença significativa. Contudo, o comprimento longitudinal do fêmur diminuiu nos animais dos grupos AH, AH10 e AH20 comparados com o grupo A (Tabela 3). A largura da diáfise e epífises proximal e distal não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (Tabela 3). A área cortical da diáfise e o volume trabecular da epífise distal femoral não denotaram alterações significativas nos animais dos grupos AH e AH10 quando comparados com o grupo A. Entretanto, os fêmures dos animais do grupo A20 exibiram redução na área cortical da diáfise (~13%) e no volume trabecular da epífise (~7%), enquanto os ossos dos camundongos ApoE^{-/-} do grupo AH20 apresentaram aumento (~10% e 11%), respectivamente, da área cortical e volume trabecular femoral (Tabela 3; Figura 1, 2).

Os resultados do teste de flexão no terço médio da diáfise femoral mostraram que a carga máxima necessária para causar a fratura completa dos ossos foi maior nos

fêmures dos animais dos grupos AH e AH10, e mais evidente no grupo que recebeu a maior dose do EA associada à dieta rica em sacarose (AH20). Não houve efeito negativo significativo na carga máxima entre o grupo tratado apenas com EA comparado com o grupo A (Tabela 4). Para as propriedades estrutural (deslocamento) e material (deformação), os animais do grupo AH20 apresentaram maiores valores para esses parâmetros comparados com os demais grupos. A rigidez do osso durante a aplicação da carga foi maior nos animais dos grupos AH, AH10 e AH20, enquanto nos animais do grupo A20 foi reduzida. A tensão máxima suportada pelo osso foi superior nos tratamentos AH, AH10 e AH20 comparados com o grupo A. Os valores médios do módulo elástico do fêmur foram menores nos grupos A20 e AH20 comparados com os demais grupos. (Tabela 4).

Todos os tratamentos aumentaram a retenção de cálcio no osso, e a relação Ca/P quando comparados com o grupo A (Tabela 5). Contrariamente, os animais dos grupos A20, AH10 e AH20 exibiram menor conteúdo de fósforo ósseo comparados com o grupo não-tratado. O conteúdo de fósforo não diferiu significativamente entre os grupos alimentados com dieta comercial (A) e a dieta experimental (AH) (Tabela 5).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos das tíbias dos animais tratados apenas com EA (A20) apresentaram redução no teor de proteínas colagenosas, enquanto, foi observado aumento do teor proteico nos ossos dos animais tratados com EA alimentados com dieta experimental (Tabela 6). Não houve alterações significativas no teor de proteínas não colagenosas entre os grupos A, A20, AH e AH20 (Tabela 6).

4. Discussão

Tem sido discutido que fatores extrínsecos, como drogas e dietas, podem interferir no metabolismo lipídico, e o perfil elevado de lipídeos e lipoproteínas poderia ser capaz de provocar alterações ósseas (Xiao et al., 2009, Soares et al., 2012; Tintut, Demer, 2014; Liu et al., 2016). Entretanto, estudos avaliando os efeitos da interação entre altas doses do EAA, undecilenato de boldenona, e dieta rica em sacarose sobre o perfil lipídico e as propriedades estrutural, bioquímica e mecânica dos ossos de camundongos ApoE^{-/-} são inexistente.

O tratamento isolado com EAA durante 8 semanas induziu o aumento do peso corporal dos animais do grupo A20 comparados com aqueles dos outros grupos experimentais. Entre as características dos EAAs, é importante destacar que essas drogas além da estimulação da síntese proteica, também aumentam os volumes

sanguíneos e do líquido extracelular resultando no maior peso corporal desses animais (Shahidi, 2001; Carson et al., 2002; Du Toit et al., 2005).

Diversos estudos elucidam que o uso de hormônios esteroides estimula a atividade da lipase triglicerídica hepática (HTGL), e o aumento funcional desta enzima parece estar relacionada com a distribuição e redução das concentrações do HDL, ou ainda, com o aumento do LDL resultante do maior catabolismo das VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade), podendo acentuar as dislipidemias (Baldo-Enzi et al, 1990; Glazer, 1991; Palatini et al., 1996; Shahidi, 2001; Hartgens et al., 2004). Nossos resultados demonstraram que o uso do EAA isolado ou combinado com o regime dietético rico em sacarose provocou mudanças no perfil bioquímico dos lipídios caracterizado pelas maiores concentrações séricas do colesterol não-HDL e redução do colesterol HDL.

Tem sido sugerido que dietas ricas em carboidratos contribuam para o aumento das concentrações de triglicérides através da indução da síntese de ácidos graxos pelo fígado além de inibir a atividade da lipase lipoprotéica (LPL). O consumo da dieta rica em sacarose aumentou as concentrações do colesterol total e LDL, mas, curiosamente, a dieta não teve efeito significativo sobre as concentrações dos triglicérides possivelmente devido ao genótipo (ApoE^{-/-}) dos animais (Merkel et al., 2001) e/ou duração do tratamento que poderia ser o fator influenciador desse efeito. Além disso, o regime dietético teve efeito positivo sobre as concentrações do HDL que foram maiores nos animais do grupo AH. Conforme o *National Cholesterol Education Program* (NCEP, 2002), a ingestão de dietas pobres em gorduras induz o aumento das concentrações do HDL. O aumento considerável nas concentrações plasmáticas do HDL nos animais AH poderia operar como fator de proteção contra doenças cardiovasculares através do transporte reverso do LDL-colesterol além de desempenhar efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (Duffy et al, 2009; Annema et al., 2012).

Quando comparados os resultados das análises morfométricas, não foram encontradas alterações significativas em relação à medida da largura da diáfise e epífises proximal e distal; e área cortical diafisária e volume trabecular epifisário dos fêmures de camundongos ApoE^{-/-} alimentados com dieta rica em sacarose. Resultados semelhantes foram relatados por Tsanzi et al. (2008) e Lorincz et al. (2010).

A administração do EAA isoladamente não teve efeito significativo sobre os parâmetros macroscópicos do osso. Contudo, o uso de doses suprafisiológicas do EAA afetou negativamente a microestrutura óssea visto que os camundongos ApoE^{-/-} do

grupo A20 apresentaram redução da área cortical e volume trabecular femoral que poderia ser em parte associado pela ação direta da oxidação lipídica nas células da linhagem osteoblástica (Jilka et al., 2010; Sage et al., 2011; Pirih et al., 2012; Liu et al., 2016).

Tem sido sugerido que devido ao aumento das concentrações séricas de LDL ocorra o acúmulo dessa lipoproteína na matriz extracelular subendotelial que sofre modificações oxidativas por intermédio de espécies reativas de oxigênio (peroxidases e lipoxigenases) induzindo o aumento de lipídeos oxidados (oxLDL) (George et al., 2001; Huo et al., 2004). A oxidação dos lipídeos/lipoproteínas reduz a massa óssea pela elevação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IFN- γ) e moléculas osteoclastogênicas (RANK-L), e redução da via de sinalização Wnt em células pro-osteoblastogênicas denotando um desequilíbrio no processo de remodelação óssea (Graham et al., 2010; Jilka et al., 2010; Tintut, Demer, 2014; Liu et al., 2016).

No presente estudo, a dieta experimental associado às doses do EAA comprometeu o comprimento do fêmur que foi menor nos animais do grupo AH10 e AH20, mas, essa diferença foi atenuada nos animais tratados com a maior dose do EAA comparados com a menor dose. O uso de EAA faz com que as epífises dos ossos longos se fundam à parte longa dos ossos em um estágio precoce. O acelerado crescimento e a união das epífises induzidas pelo uso de EAA impede o crescimento longitudinal do osso até o seu comprimento final (Shahibi, 2001; Calfee & Fadale, 2006).

Quando comparada as diferentes doses do EAA, apenas os animais que receberam a maior dose do EA combinado com a dieta rica em sacarose apresentaram efeitos positivos sobre a microestrutura óssea evidenciada pelo aumento da área cortical da diáfise e no volume trabecular do fêmur. Esses resultados demonstraram que o osso cortical e trabecular dos fêmures são afetados positivamente pelo uso de doses suprafisiológicas do EAA combinado com dieta rica em sacarose e esse efeito foi dose dependente.

A osteocalcina é uma proteína da matriz óssea secretada pelos osteoblastos que recentemente tem sido implicada com diversas funções hormonais relacionadas à homeostase da glicose e ao metabolismo energético. Tem sido demonstrado que a osteocalcina descarboxilada é liberada a partir do osso para a circulação sanguínea podendo ter efeito sobre as células β -pancreáticas. Esse efeito hormonal da osteocalcina ativa e estimula a expressão e secreção da insulina, sensibilidade à insulina nos tecidos alvos e o gasto energético. A insulina por sua vez atua sobre o receptor para insulina

(InsR) nos osteoblastos modulando a secreção da osteocalcina, formando uma alça de retroalimentação tradicional em que o esqueleto torna-se um órgão endócrino associado com o metabolismo energético. Além de regular a carboxilação da osteocalcina no osso, a insulina também é necessária para aquisição do osso normal após o nascimento (Lee et al., 2007; Ferron et al., 2008; Clemens, Karsenty, 2011).

Em osteoblastos de animais selvagens, a insulina exerce efeito anabólico estimulando a proliferação e diferenciação dos osteoblastos a partir da supressão de Twist2 (Twist-related protein 2), um inibidor de Runx2 (Runt-related transcription factor 2). Supreendentemente, a sinalização da insulina nas células osteoblásticas regula positivamente a reabsorção óssea através da atenuação da expressão da osteoprotegerina (OPG), o inibidor de RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), e pela ação sobre genes específicos dos osteoclastos: catepsina K e Tc1r1. De fato, os camundongos knockout para o receptor de insulina nos osteoblastos (InsR-/-[osb]) apresentaram redução do volume trabecular e formação óssea que foi associado ao número de osteoblastos que foi reduzido nesses animais. Além disso, a profundidade erosiva e as concentrações séricas de CTx (telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I) também foram reduzidas nesses camundongos indicando menor atividade osteoclástica (Fulzele et al., 2010; Clemens, Karsenty, 2011).

Adicionalmente, é postulado que os EAA podem desempenhar função independente, mas semelhante ao da insulina na via de captação de glicose pelos tecidos alvos (Ramamani et al., 1999, Clemens et al., 2011). Além disso, Morimoto (2001) e Frankenfeld (2014) demonstraram através de experimentos *in vitro/vivo* que o tratamento com altas doses de EAA provoca o aumento das concentrações plasmáticas de insulina. A secreção de insulina pelas células β -pancreáticas é primeiramente estimulada pela glicose; entretanto, esses resultados evidenciam a ação direta dos esteroides anabólicos androgênicos sobre as células β -pancreáticas, estimulando a secreção de insulina. Embora no presente estudo não realizou-se a determinação de insulina e osteocalcina sérica, as maiores concentrações de insulina e de osteocalcina poderiam justificar o aumento da área cortical da diáfise e do volume trabecular epifisário nos ossos de camundongos ApoE-/- tratados com dose elevada do EAA e alimentados com dieta rica sacarose.

O comportamento mecânico femoral frente ao carregamento foi acometido pelo uso isolado do EAA evidenciado pela redução dos valores da rigidez e do módulo elástico nos fêmures dos animais do grupo A20, provavelmente devido hiperlipidemia

apresentada por esses animais (Soares et al., 2012). Contrariamente, foi revelado que animais tratados apenas com a dieta rica em sacarose ou associada à menor dose do EAA exibiram ossos mais resistentes à fratura devido, em partes, ao efeito positivo desses tratamentos sobre as propriedades estruturais (carga máxima, deslocamento e rigidez) (Carvalho et al., 2012). Entretanto, os ossos dos camundongos ApoE^{-/-} tratados com a maior dose do EA combinado a dieta experimental apresentaram melhorias sobre as propriedades estruturais (carga máxima, deslocamento e rigidez) e materiais (tensão máxima e deformação) comparados com os demais grupos. Os nossos resultados sugerem que a interação entre o EAA e a dieta rica em sacarose teve efeito benéfico sobre o periósteo e endósteo dos camundongos, possivelmente devido a organização da matriz óssea, maior síntese de colágeno e retenção de minerais no osso cortical dos camundongos AH20 (Carvalho et al., 2012). Esses dados demonstram que as mudanças encontradas na microestrutura sustentam as diferenças encontradas na resistência mecânica do osso.

A qualidade óssea depende da geometria, microarquitetura e das propriedades intrínsecas do tecido ósseo tais como o grau de mineralização da matriz óssea. O cálcio e fósforo são marcadores bioquímicos que podem ser utilizados como indicadores diretos ou indiretos do comportamento ósseo, uma vez que esses são os principais minerais constituintes da matriz óssea (Doblaré et al., 2004).

Os animais tratados não apresentaram efeitos significativos nas concentrações de cálcio plasmático possivelmente devido ao fato que a manutenção da concentração ideal de cálcio no sangue é prioritária sobre a manutenção da integridade estrutural do osso (Johnson, 2000). No osso, todos os tratamentos induziram a retenção de cálcio comparado com os animais não-tratados. Dentre os diversos efeitos dos EAA e do consumo de carboidratos destacam-se a deposição de cálcio nos ossos (Notelovitz, 2001; Hartgens & Kuipers, 2004; Zafar et al., 2004; Maravelias et al., 2005; Ariefdjohan et al., 2008). Thorp & Waddington (1997) observaram que ossos com valores superiores de cálcio fraturavam com maior dificuldade durante a aplicação de uma carga.

Em relação ao fósforo, todos os tratamentos, exceto AH, reduziram o teor deste mineral no osso e aumentaram no soro. A redução do teor de fósforo nos ossos dos animais tratados apenas com o EAA hipoteticamente seria devido a vias não-canônicas da osteoclastogênese, tal como por meio do TNF- α e IGF-1 (Liu et al., 2016). Em relação aos animais dos grupos AH10 e AH20, a possível hipótese para explicar os

nossos resultados seriam que os cristais de hidroxiapatita sendo estruturas dinâmicas e apresentarem na sua composição maior teor de cálcio do que fósforo (2:1) (Kierszenbaum, 2012), o fato dos ossos desses animais exibirem maior retenção de cálcio e até maior teor de proteínas colagenosas nos ossos, poderiam, em conjunto, ter causado a redução do fósforo no osso.

O tratamento isolado com o EAA afetou negativamente a síntese de proteínas colagenosas nas tíbias dos camundongos do grupo A20 hipoteticamente devido a disfunção da sinalização da via Wnt nas células osteoblásticas induzida por lipídeos bioativos e citocinas inflamatórias. Contudo, a interação entre o EAA e dieta rica em sacarose teve efeito benéfico na síntese proteica no osso dos animais do grupo AH10 e AH20. As diferentes doses do EA não apresentaram efeito dose-dependente sobre o teor de proteínas colagenosas quando comparados entre si. Dessa maneira, é possível mencionar o efeito vantajoso dos tratamentos sobre o tecido ósseo já que o colágeno é o principal componente da matriz orgânica, também susceptível de afetar a resistência mecânica do osso (Sroga & Vashishth, 2012).

Não está claro se o consumo de sacarose teve ação anabólica ou, revelou os efeitos do EAA no crescimento celular. Estudos futuros são necessários para analisar moléculas envolvidas no metabolismo ósseo (osteocalcina, insulina, leptina, serotonina, GH/IGF-1 entre outras moléculas que participam na regulação central da massa óssea) e determinar vias moleculares relacionadas às alterações do tecido ósseo em resposta ao uso do EAA e o consumo da sacarose.

Conclusões

Os principais resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento isolado com o esteroide anabólico influenciou os parâmetros ósseos (área cortical, volume trabecular, retenção de minerais, teor de proteínas colagenosas) além de promover alterações acentuadas no metabolismo lipídico.

Apesar de alterar o perfil lipídico, a dieta rica em sacarose, associada ou não a dose de 10mg/kg, não teve efeito sobre a microestrutura do tecido ósseo. Contudo, esses tratamentos afetaram as propriedades mecânicas (carga máxima, rigidez, tensão máxima) e o conteúdo mineral do osso.

Os animais tratados com a dose de 20mg/kg combinado com a dieta rica em sacarose alterou o perfil bioquímico dos lipídeos, porém, os ossos desses animais exibiram melhorias nas propriedades mecânicas (estruturais e materiais) e sobre os

parâmetros morfométricos (área cortical e volume trabecular). Além disso, o tratamento afetou a mobilização de cálcio e a síntese proteica no osso.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do trabalho.

Conflitos de interesse Nenhum

Referências

Akhter MP, Cullen DM, Gong G, Recker RR (2001) Bone biomechanical properties in prostaglandin EP1 and EP2 knockout mice. *Bone* 29:121–125

Annema W, Tietge UJ (2012) Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies. *Nutr Metab* 9:25

Ariefdjohan MW, Martin BR, Lachcik PJ, Weaver CM (2008) Acute and chronic effects of honey and its carbohydrate constituents on calcium absorption in rats. *J Agric Food Chem.* 56:2649-54

Baldo-Enzi G, Giada F, Zuliani G, Baroni L, Vitale E, Enzi G et al. (1990) Lipid and apoprotein modifications in body builders during and after self administration of anabolic steroids. *Metabol.*30:203-8

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binbing. *Analytical Biochemistry* 72:248-54

Calfee R, Fadale P (2006) Popular ergogenic drugs and supplements in Young athletes. *Pediatrics Springfield* 117:577-589

Carson JA, Lee WJ, Mcclung J, Hand GA (2002) Steroid receptor concentration in aged rat hindlimb muscle: effect of anabolic steroid administration. *J Appl Physiol*;93:242-50

Carvalho AAF, Nakamune ACS, Biffe BG, Louzada MJQ (2012) *J. Morphol. Sci.* 29:32-37

- Clemens TL, Karsenty G (2011) The osteoblast: An insulin target cell controlling glucose homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research* 26:677-680
- Doblaré M, Garcia JM, Gómez MJ (2004) Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Eng Fract Mech.* 71:1809-40
- dos Santos DC, da Matta SL, de Oliveira JA, dos Santos JA (2012) Histological alterations in gills of *Astyanax aff. bimaculatus* caused by acute exposition to zinc. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64:861-866
- Duffy D, Rader DJ (2009) Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol* 6:455–463
- Du Toit EF, Rossouw E, Van Rooyen, Lochner A. (2005) Proposed mechanisms for the anabolic steroid androgenic increase in myocardial susceptibility to ischaemia/reperfusion injury. *Cardio Journal of Southern Africa*, 16:21-28
- Eklof AC, Thurelius AM, Garle M, Rane A, Sjoqvist F (2003) The anti-doping hotline, a means to capture the abuse of doping agents in the Swedish society and a new service function in clinical pharmacology. *European Journal of Clinical Pharmacology* 59:571-577
- El Osta R, Almont T, Diligent C, et al. (2016) Anabolic steroids abuse and male infertility. *Basic and Clinical Andrology*. 26:2
- Farhat GN, Cauley JA, Matthews KA, Newman AB, Johnston J, Mackey R, Edmundowicz D and Sutton-Tyrrell K. (2006) Volumetric BMD and vascular calcification in middle-aged women: the Study of Women's Health Across the Nation. *J Bone Miner Res* 21:1839-1846
- Fazio S, Linton MF (2001) Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front. Biosci.* 6:D515-525
- Ferron M, Hinoi E, Karsenty G et al. (2008) Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci.*, 105:5266-5270
- Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, et al. (2010) Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell.*, 142:296–308

- Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. (2012) Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice. *Bone*, 50: 568-575
- Fineschi V, et al. (2001) Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 125:253-255
- Fontana K, Oliveira HCF, Leonardo MB, Mandarim-de-Lacerda CA, da Cruz-Höfling MA (2008) Adverse effect of the anabolic-androgenic steroid mesterolone on cardiac remodelling and lipoprotein profile is attenuated by aerobic exercise training. *International Journal of Experimental Pathology*. 89:358-366
- Frankenfeld SP, Oliveira LP, Ignacio DL (2014) Nandrolone decanoate inhibits gluconeogenesis and decreases fasting glucose in Wistar male rats. *Journal of Endocrinology* 220:143–153
- Fulzele K, Riddle RC, DiGirolamo DJ, et al. (2010) Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell*.142:309–319
- George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, Zhao L, Funk CD, Sigal E, Harats D (2001) 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 104:1646-1650
- Glazer G. (1991) Atherogenic effects of anabolic steroids on serum lipid levels. *Arch Internal Med*.151:1925-33
- Graham LS, Tintut Y, Parhami F, Kitchen CM, Ivanov Y, Effros RB (2010) Bone density and hyperlipidemia: the T-lymphocyte connection. *J Bone Miner. Res.*, 25:2460-9
- Guimarães VM (1988) Efeitos de aminoácidos dispensáveis e indispensáveis no desempenho e anomalias das pernas de pintos de corte. 1988. 54f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa
- Hamrick MW, Della-Fera MA, Baile CA, Pollock NK, Lewis RD. (2009) Body fat as a regulator of bone mass: experimental evidence from animal models. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.*, 7:224-229

- Hartgens F, Kuipers H. (2004) Effects of Androgenic-anabolic Steroids in Athletes. *Sports Med*, 34:513-554
- Hauschka PV, Gallop PM (1977) Purification and calcium binding properties of osteocalcin, the gamma-carboxyglutamic acidcontaning proteins of bone, In: Weissierman, R.H. (Ed.). *Calcium binding proteins and calcium function*. Amsterdam: Elsevier 338-347
- Hemingway F, Taylor R, Knowles HJ, Athanasou NA (2010) RANKL-independent human osteoclast formation with APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF II. *Bone*. 48:938–944
- Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS (2003) Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol* 95:300–307
- Huo Y, Zhao L, Hyman MC, Shashkin P, Harry BL, Burcin T, Forlow SB, Stark MA, Smith DF, Clarke S, Srinivasan S, Hedrick CC, Pratico D, Witztum JL, Nadler JL, Funk CD, Ley K. (2004) Critical role of macrophage 12/15-lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 110: 2024-2031
- Jilka R, Almeida M, Ambrogini E, Climer L and Manolagas S (2010) Lipoxygenase Alox15 is a cell autonomous amplifier of oxidative stress in osteoblasts and the skeleton of estrogen deficient and aged mice. *J Bone Miner Res* 25: S62, 2010
- Junqueira ULC, Junqueira SMML (1983) *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia* – São Paulo Editora Santos
- Kawai M, Devlin MJ, Rosen CJ (2009) Fat targets for skeletal health. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 365-72
- Koba S. & Hirano T. (2011) Risk factors for hypertension among rural Thais. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 42:208–217
- Kuhn CM (2002) Anabolic steroids. *Recent Prog. Horm. Res.* 57:411–434
- Lammers AR, German RZ, Lightfoot PS (1998) The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anat* 162:199–208

- Lee TM, Lin SM, Chou TF, Chang NC (2005) Effect of simvastatin on left ventricular mass in hypercholesterolemic rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:1352–1358
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E et al. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.*, 130:456-469
- Liu Y, Almeida M, Weinstein R et al. (2016) Skeletal Inflammation and Attenuation of Wnt Signaling, Wnt Ligand Expression and Bone Formation in Atherosclerotic ApoE Null Mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* DOI: 10.1152/ajpendo.00501.2015
- Lorincz C, Reimer C, Boyd S, Zernicke R (2009) High-fat, sucrose diet impairs geometrical and mechanical properties of cortical bone in mice. *British Journal of Nutrition*. 103:1302–1308
- Luegmayer E, Glantschnig H, Wesolowski GA, Gentile MA, Fisher JE, Rodan GA, Reszka AA (2004) Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ* 11:S108–S118
- Maravelias, C., Dona, A., Stefanidou, M., Spiliopoulou, C (2005) Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat *Toxicol Lett*. 158:167-75
- Merkel M, Velez-Carrasco W, Hudgins LC, Breslow JL (2001) Compared with saturated fatty acids, dietary monounsaturated fatty acids and carbohydrates increase atherosclerosis and VLDL cholesterol levels in LDL receptor-deficient, but not apolipoprotein E-deficient, mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:13294-13299
- Morimoto S, Fernandez-Mejia C, Romero-Navarro G, Morales-Peza N & Di´az-Sa´nchez V 2001 Testosterone effect on insulin content. Messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat. *Endocrinology* 142:1442–1447
- National Cholesterol Education Program (NCEP) (2002) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Third report of the national cholesterol education program (NCEP) final report. *Circulation* 106, 3143–3421
- Notelovitz M.(2001) Androgen effects on bone and muscle. *Fertil Steril*. 77:34-41

- Palatini P, Giada F, Garavelli G et al. (1996) Cardiovascular effects of anabolic steroids in weight-trained subjects. *J Clin Pharmacol*, 36:1132–1140
- Parhami F, et al. (2001) Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res*. 16:182–188
- Pellegrino ED, Biltz RM (1968) Bone carbonate and the Ca to P molar ratio. *Nature*, 219:1261–1262
- Pirih F, et al. (2012) Adverse effects of hyperlipidemia on bone regeneration and strength. *J Bone Miner Res*. 27:309–318
- Pope HG, Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S. (2014) Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev*. 35:341–75
- Ramamani A, Aruldas MM, Govindarajulu P. (1999) Differential response of rat skeletal muscle glycogen metabolism to testosterone and estradiol. *Can J Physiol Pharmacol* 77:300-4
- Raubenheimer EJ (2004) Histopathologic changes in metabolic bone disease. *Adv. Anat. Pathol.*, 11:38-48
- Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127:838-41
- Robertson G, Xie C, Chen D, Awad H, Schwarz EM, O’Keefe RJ, Guldborg RE, Zhang X (2006) Alteration of femoral bone morphology and density in COX-2–/– mice. *Bone* 39:767–772
- Sage AP, Lu J, Atti E, Tetradis S, Ascenzi MG, Adams DJ, Demer LL, Tintut Y (2011) Hyperlipidemia induces resistance to PTH bone anabolism in mice via oxidized lipids. *J Bone Miner Res* 26: 1197-1206
- Schilling AF, et al. (2005) Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J Bone Miner Res*. 20:274–282
- Schulz I. (2006) Treatment of dyslipidemia: how and when to combine lipid lowering drugs. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 50, 344–359.

- Schwenk RW, Vogel H, Schurmann A (2013) Genetic and epigenetic control of metabolic health. *Mol Metab.* 2:337–347
- Sennerby U, Farahmand B, Ahlbom A, Ljunghall S and Michaelsson K. (2007) Cardiovascular diseases and future risk of hip fracture in women. *Osteoporos Int* 18:1355-1362
- Shahidi, NT (2001) A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin. Ther.*;23:1355–1390
- Sidney S, Rosamond WD, Howard VJ, Luepker RV (2013) The "heart disease and stroke statistics--2013 update" and the need for a national cardiovascular surveillance system. *Circulation.* 127:21-3
- Soares EA, Nakagaki WR, Garcia JAD, Camilli JA (2012) Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in low-density lipoprotein receptor gene knockout mice. *J. Bone Miner Metab.* 30:419-425
- Sroga GE, Vashishth D (2012) Effects of Bone Matrix Proteins on Fracture and Fragility in Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 10:141–150
- Thorp BH, Waddington D (1997) Relationships between the bone pathologies, ash and mineral content of long bones in 35-day-old broiler chickens. *Research in Veterinary Science* 62:67-73
- Tintut Y, Demer LL (2014) Effects of bioactive lipids and lipoproteins on bone. *Trends Endocrinol Met.* 25:53-9
- Tsanzi E, Light HR, Tou JC (2008) The effects of feeding sugar-sweetened beverages to growing female Sprague-Dawley rats on bone mass and strength. *Bone* 42:960–968
- Turillazzi E, Perilli G, Di Paolo M, Neri M, Riezzo I, Fineschi V. (2011) Side effects of AAS abuse: na overview. *Mini. Ver. Med. Chem.* 11:374:389
- Van Dam RM, Seidell JC (2007) Carbohydrate intake and obesity. *European J. Clin. Nutr.*, 61:575-599
- WHO (2003) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Technical Report Series 916

Xiao Y, Cui J, Li YX, Shi YH, Wang B, Le GW, Wang ZP (2009) Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition* 27:214–220

Yoshiki S, Ueno T, Akita T, Yamanouchi M (1983) Improved procedure for histological identification of osteoid matrix in decalcified bone. *Biotech Histochem* 58:85-89

Zafar TA, Weaver CM, Zhao Y, Martin BR, Wastney ME (2004) Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *J Nutr.* 134:399–402

Tabela 2

Peso final e concentrações séricas de triglicérides, colesterol total e frações, cálcio e fósforo total de camundongos ApoE^{-/-} tratados com EAA alimentados com dieta rica em sacarose

	W	A	A20	AH	AH10	AH20
Peso final (g)	17.33 ± 1.12 ^a	25.98 ± 2.14 ^b	30.11 ± 1.61 ^c	23.26 ± 1.25 ^b	24.67 ± 2.00 ^{bd}	24.56 ± 1.03 ^{bd}
Triglicérides (mg/dL)	62.00 ± 7.48 ^a	92.67 ± 9.97 ^b	125.30 ± 17.15 ^c	81.33 ± 6.79 ^b	117.30 ± 24.78 ^c	92.67 ± 4.92 ^b
Colesterol total (mg/dL)	114.00 ± 13.95 ^a	202.00 ± 22.85 ^b	328.50 ± 15.61 ^c	335.70 ± 32.31 ^c	332.70 ± 12.68 ^c	324.30 ± 4.02 ^c
HDL (mg/dL)	42.67 ± 4.11 ^a	27.33 ± 4.71 ^b	20.67 ± 1.88 ^c	31.67 ± 1.24 ^d	23.33 ± 0.94 ^{ce}	24.33 ± 3.09 ^e
LDL (mg/dL)	58.93 ± 9.32 ^a	155.50 ± 18.53 ^b	285.50 ± 8.99 ^c	246.00 ± 29.71 ^c	268.00 ± 7.26 ^c	248.10 ± 18.49 ^c
Cálcio total (mEq/L)	9.58 ± 0.30 ^a	11.45 ± 1.48 ^b	11.26 ± 0.86 ^b	11.01 ± 0.40 ^b	11.99 ± 0.95 ^b	10.81 ± 1.43 ^b
Fósforo total (mEq/L)	10.20 ± 0.96 ^a	11.85 ± 2.63 ^a	15.04 ± 1.52 ^b	13.96 ± 2.32 ^b	14.11 ± 1.77 ^b	11.35 ± 1.01 ^a

W (C57BL/6 e dieta comercial); A (ApoE^{-/-} e dieta comercial); A20 (ApoE^{-/-}, dieta comercial e anabolizante 20mg/kg); AH (ApoE^{-/-} e dieta rica em sacarose); AH10 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 10mg/kg); AH20 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 20mg/kg). Dados expressos como média ± desvio padrão. ^{a,b,c,d,e} Letras diferentes na mesma linha denotam diferença entre grupos (p < 0,05) pelo teste Student Newman Keuls.

Tabela 3

Parâmetros morfométricos obtidos a partir do fêmur de camundongos ApoE^{-/-} tratados com EAA alimentados com dieta rica em sacarose

	W	A	A20	AH	AH10	AH20
Comprimento (mm)	15.60 ± 0.25 ^{bc}	16.26 ± 0.13 ^a	16.14 ± 0.26 ^a	15.90 ± 0.27 ^b	15.48 ± 0.33 ^c	15.80 ± 0.22 ^b
Largura epifisária proximal (mm)	3.28 ± 0.09 ^b	3.57 ± 0.08 ^a	3.50 ± 0.10 ^a	3.52 ± 0.21 ^a	3.27 ± 0.04 ^b	3.38 ± 0.21 ^{ab}
Largura diafisária (mm)	1.58 ± 0.04 ^b	1.74 ± 0.05 ^a	1.72 ± 0.70 ^a	1.74 ± 0.05 ^a	1.70 ± 0.00 ^a	1.72 ± 0.07 ^a
Largura epifisária distal (mm)	2.40 ± 0.10 ^b	2.48 ± 0.10 ^a	2.46 ± 0.05 ^a	2.46 ± 0.08 ^a	2.44 ± 0.11 ^a	2.54 ± 0.05 ^a
Proporção volumétrica trabecular (%)	32.00 ± 3.07 ^{ac}	31.11 ± 2.23 ^a	29.17 ± 1.76 ^b	32.99 ± 3.37 ^{ac}	33.15 ± 2.72 ^{ac}	34.74 ± 1.71 ^c
Área Cortical (µm ²)	5738 ± 442.2 ^e	7080 ± 61.90 ^{ac}	6196 ± 494.40 ^b	7374 ± 229.80 ^a	6711 ± 986.80 ^c	7829 ± 250.40 ^d

W (C57BL/6 e dieta comercial); A (ApoE^{-/-} e dieta comercial); A20 (ApoE^{-/-}, dieta comercial e anabolizante 20mg/kg); AH (ApoE^{-/-} e dieta rica em sacarose); AH10 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 10mg/kg); AH20 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 20mg/kg). Dados expressos como média ± desvio padrão. ^{a,b,c,d,e} Letras diferentes na mesma linha denotam diferença entre grupos (p < 0,05) pelo teste Student Newman Keuls.

Tabela 4

Propriedades estruturais e materiais do fêmur de camundongos ApoE^{-/-} tratados com EAA alimentados com dieta rica em sacarose

	W	A	A20	AH	AH10	AH20
Propriedades estruturais						
Carga máxima (N)	15.07 ± 0.87 ^d	16.94 ± 1.26 ^a	16.01 ± 1.83 ^a	18.48 ± 0.65 ^b	19.24 ± 0.92 ^b	20.27 ± 0.64 ^c
Deslocamento (mm)	0.37 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.03 ^{ac}	0.36 ± 0.01 ^{ab}	0.35 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.03 ^c	0.42 ± 0.02 ^d
Rigidez (N/mm)	41.14 ± 1.80 ^a	43.28 ± 2.08 ^a	40.69 ± 2.45 ^b	51.98 ± 3.27 ^c	47.18 ± 2.35 ^d	45.60 ± 2.32 ^d
Propriedades materiais						
Tensão máxima (Mpa)	2.59 ± 0.29 ^d	3.27 ± 0.71 ^a	3.63 ± 0.29 ^{ab}	3.75 ± 0.56 ^b	4.66 ± 0.21 ^c	4.77 ± 0.12 ^c
Deformação (mm/mm)	0.0506 ± 0.004 ^a	0.054 ± 0.005 ^{ab}	0.054 ± 0.001 ^{ab}	0.050 ± 0.001 ^a	0.057 ± 0.003 ^{bc}	0.059 ± 0.002 ^c
Módulo elástico (Mpa)	49.13 ± 3.98 ^c	72.25 ± 11.14 ^a	59.85 ± 8.76 ^b	80.58 ± 11.64 ^a	73.66 ± 4.47 ^a	63.38 ± 4.63 ^b

W (C57BL/6 e dieta comercial); A (ApoE^{-/-} e dieta comercial); A20 (ApoE^{-/-}, dieta comercial e anabolizante 20mg/kg); AH (ApoE^{-/-} e dieta rica em sacarose); AH10 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 10mg/kg); AH20 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 20mg/kg). Dados expressos como média ± desvio padrão. ^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma linha denotam diferença entre grupos (p < 0,05) pelo teste Student Newman Keuls.

Tabela 5

Teor de cálcio e fósforo inorgânico, razão entre os minerais (Ca:P) do fêmur de camundongos ApoE^{-/-} tratados EAA alimentados com dieta rica em sacarose

	W	A	A20	AH	AH10	AH20
Cálcio (mg/g)	311 ± 14.98 ^d	282.20 ± 11.23 ^a	337.90 ± 12.79 ^b	378.60 ± 19.87 ^c	317.40 ± 16.94 ^d	337.70 ± 17.76 ^b
Fósforo (mg /g)	124 ± 1.16 ^{bc}	131.60 ± 4.48 ^a	125.90 ± 3.00 ^b	132.40 ± 4.50 ^a	120.40 ± 7.17 ^c	122.00 ± 5.26 ^{bc}
Ca/P	2.55 ± 0.17 ^b	2.27 ± 0.20 ^a	2.75 ± 0.22 ^b	2.91 ± 0.12 ^c	2.63 ± 0.08 ^b	2.65 ± 0.07 ^b

W (C57BL/6 e dieta comercial); A (ApoE^{-/-} e dieta comercial); A20 (ApoE^{-/-}, dieta comercial e anabolizante 20mg/kg); AH (ApoE^{-/-} e dieta rica em sacarose); AH10 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 10mg/kg); AH20 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 20mg/kg). Dados expressos como média ± desvio padrão. ^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma linha denotam diferença entre grupos (p < 0,05) pelo teste Student Newman Keuls.

Tabela 6

Teor de proteínas colagenosas e proteínas não colagenosas das tíbias de camundongos ApoE^{-/-} tratados com EEAA alimentados com dieta rica em sacarose

	W	A	A20	AH	AH10	AH20
Proteínas colagenosas (%)	11.06 ± 3.54 ^a	13.42 ± 0.48 ^b	10.80 ± 0.94 ^a	14.20 ± 1.18 ^b	15.72 ± 0.84 ^c	15.90 ± 1.70 ^c
Proteínas não colagenosas (%)	0.22 ± 0.05 ^c	0.15 ± 0.06 ^a	0.17 ± 0.05 ^a	0.16 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.02 ^b	0.15 ± 0.04 ^a

W (C57BL/6 e dieta comercial); A (ApoE^{-/-} e dieta comercial); A20 (ApoE^{-/-}, dieta comercial e anabolizante 20mg/kg); AH (ApoE^{-/-} e dieta rica em sacarose); AH10 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 10mg/kg); AH20 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 20mg/kg). Dados expressos como média ± desvio padrão. ^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma linha denotam diferença entre grupos (p < 0,05) pelo teste Student Newman Keuls.

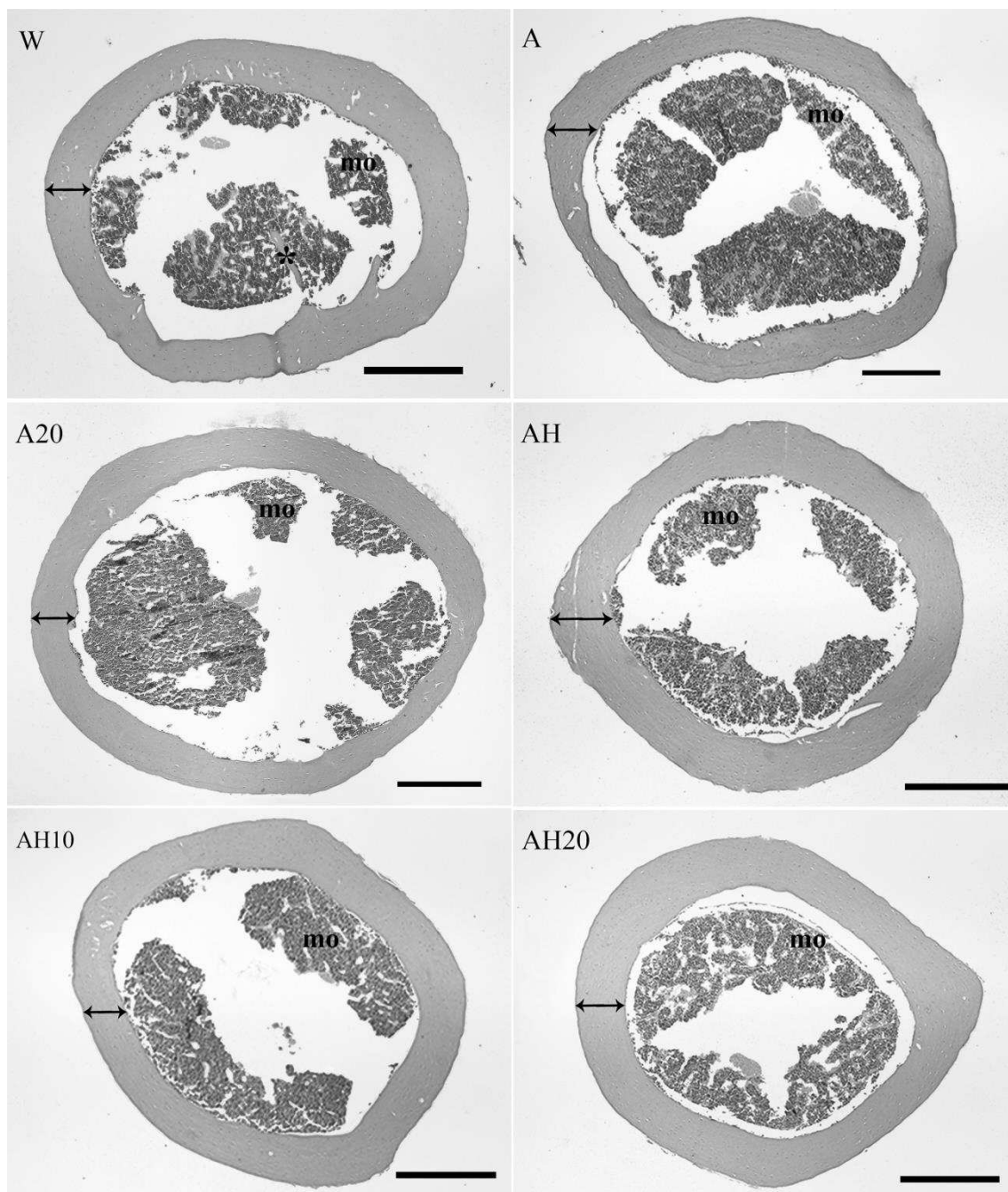


Figura 1. Fotomicrografias representativas da secção transversal da diáfise femoral dos camundongos dos grupos W (C57BL/6 e dieta comercial); A (ApoE^{-/-} e dieta comercial); A20 (ApoE^{-/-}, dieta comercial e anabolizante 20mg/kg); AH (ApoE^{-/-} e dieta rica em sacarose); AH10 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 10mg/kg); AH20 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 20mg/kg). A redução da área cortical no fêmur dos animais do grupo A20 e o respectivo aumento dessa área nos ossos dos animais do grupo AH20 é claramente visível. Hematoxilina-Eosina (HE). (mo) medula óssea; (↔) região cortical. Barra = 200µm.

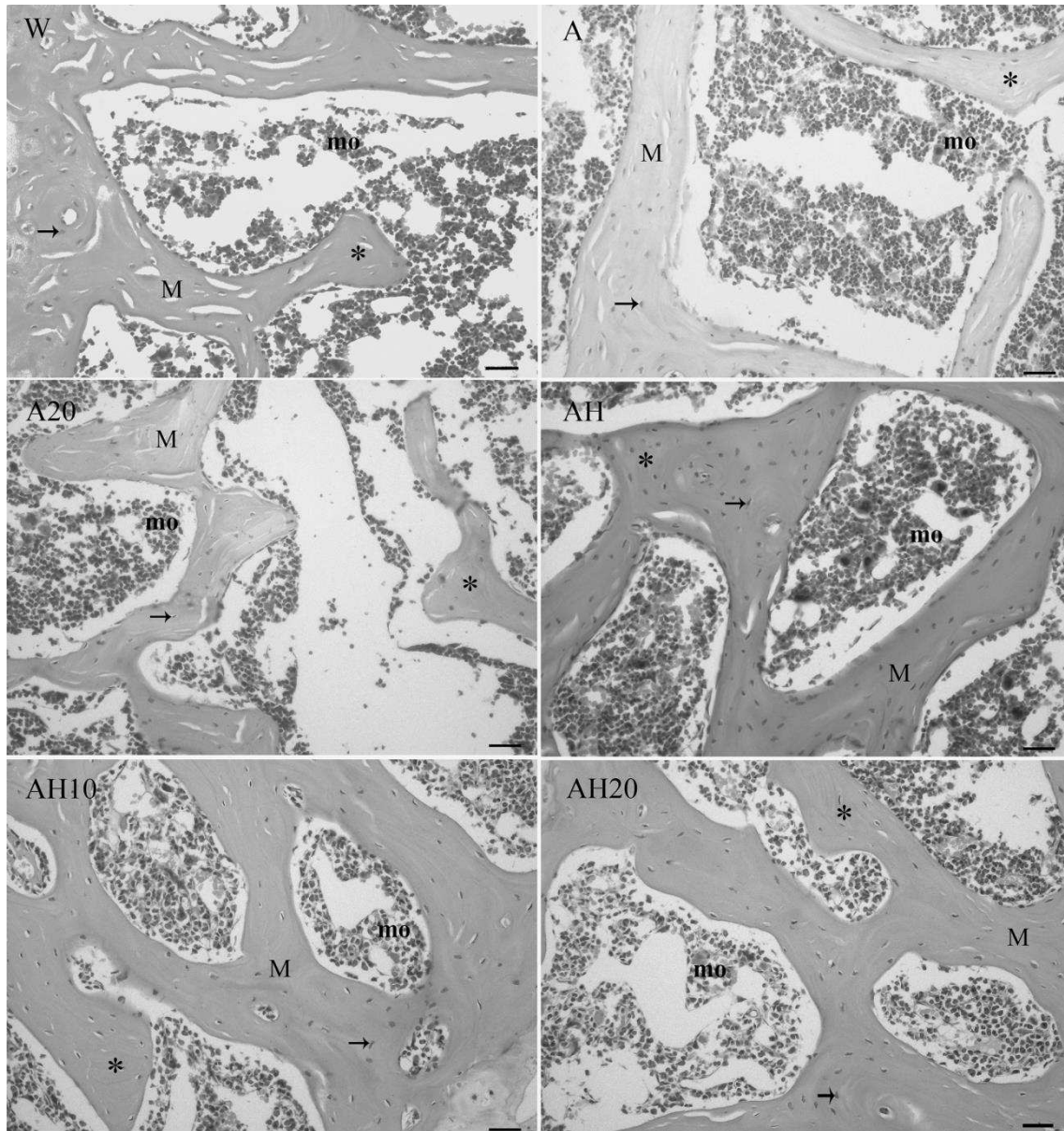


Figura 2. Fotomicrografias representativas dos cortes longitudinais mostrando o osso trabecular da epífise distal do fêmur dos camundongos dos grupos W (C57BL/6 e dieta comercial); A (ApoE^{-/-} e dieta comercial); A20 (ApoE^{-/-}, dieta comercial e anabolizante 20mg/kg); AH (ApoE^{-/-} e dieta rica em sacarose); AH10 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 10mg/kg); AH20 (ApoE^{-/-}, dieta rica em sacarose e anabolizante 20mg/kg). A reduzida espessura das trabéculas ósseas certamente influenciou nomenor volume trabecular dos animais do grupo A20, enquanto o aumento da espessura trabecular possivelmente induziu maior volume de trabéculas ósseas nos animais do grupo AH20. Hematoxilina-Eosina (HE). (mo) medula óssea; (m) matriz óssea; (*) trabécula óssea; (→) osteócito. Barra = 20μm.