

ALOISIO DA SILVA PINTO

**EFEITOS DE ALENDRONATO DE SÓDIO,  
ATORVASTATINA CÁLCICA E IPRIFLAVONA,  
ISOLADAMENTE E EM ASSOCIAÇÃO, NA  
OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P659e                   Pinto, Aloísio da Silva, 1948-  
2004                   Efeitos de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e  
                          ipriflavona, isoladamente e em associação, na osteoporose  
                          induzida com dexametasona / Aloísio da Silva Pinto.  
– Viçosa : UFV, 2004.  
                          v, 54f. : il. ; 29cm.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

1. Bioquímica. 2. Osteoporose. 3. Dexametasona. 4.  
Alendronato de sódio. 5. Atorvastatina cálcica. 6. Ipriflavona. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 574.192

ALOISIO DA SILVA PINTO

Efeitos de Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica e Ipriflavona, Isoladamente e em Associação, na Osteoporose Induzida com Dexametasona.

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

APROVADA: 14 de setembro de 2004.

---

Prof. Tanus Jorge Nagem  
(Conselheiro)

---

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo  
(Conselheiro)

---

Prof. George Henrique Kling de Moraes

---

Prof. Cláudio César Fonseca

---

Prof<sup>ª</sup> Tânia Toledo de Oliveira.  
(Orientadora)

À memória de **Osório da Silva Pinto**,  
meu pai e minha maior referência.

À **Isaura Maria da Conceição Pinto**,  
minha mãe.

À **Joselita**,  
minha esposa e meu incentivo.

À meus filhos,  
**Marcelo, Marla Carolina e Mayara.**

## Agradeço

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do CCB da UFV pela oportunidade e confiança.

Ao Departamento de Veterinária do CCB da UFV, especialmente ao Prof. EDUARDO PAULINO DA COSTA, pela possibilidade concedida.

À orientadora, Prof<sup>a</sup>. TÂNIA TOLEDO DE OLIVEIRA, por tudo.

Aos conselheiros, Prof. RICARDO JUNQUEIRA DEL CARLO e Prof. TANUS JORGE NAGEM, por acreditarem que seria possível.

Ao meu amigo, DAVILSON BRAGINE, pela inestimável colaboração no desenvolvimento deste trabalho e

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.  
Não vou, jamais, esquecer-lhes.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	3

### **Artigo 1 – EFEITOS DE ALENDRONATO DE SÓDIO, ATORVASTATINA CÁLCICA E IPRIFLAVONA NA OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA EM RATAS**

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUÇÃO.....	7
OBJETIVO .....	9
MATERIAL E MÉTODOS .....	9
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	12
CONCLUSÕES .....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21

### **Artigo 2 - EFEITO DE TRATAMENTO COMBINADO DE ALENDRONATO DE SÓDIO, ATORVASTATINA CÁLCICA E IPRIFLAVONA NA OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA EM RATAS**

RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	25
INTRODUÇÃO .....	26
OBJETIVO .....	31
MATERIAL E MÉTODOS .....	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
CONCLUSÕES .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
CONCLUSÕES GERAIS .....	52

## RESUMO

PINTO, Aloísio da Silva, D.S.; Universidade Federal de Viçosa; setembro de 2004;  
**Efeitos de Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica e Ipriflavona, Isoladamente e em Associação, na Osteoporose Induzida com Dexametasona.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Ricardo Junqueira Del Carlo e Tanus Jorge Nagem.

Este trabalho consistiu de dois ensaios biológicos com o objetivo de estudar as influências do bifosfonato alendronato de sódio, da estatina atorvastatina cálcica e do flavonóide ipriflavona, isoladamente e em associação, na osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona, em ratas da raça Wistar, adultas, pesando  $250 \pm 20$ g. O processo da indução da osteoporose consistiu na administração de dexametasona, na dose de 7 mg/kg de peso corporal, por via IM, uma vez por semana, durante cinco semanas, nos seis animais de todos os grupos, à exceção dos animais que constituiu o grupo controle (G1), que receberam, via IM, solução de NaCl à 0,9%. Os animais do grupo 2 (G2), chamado osteoporótico, receberam apenas dexametasona; Após a indução, iniciou-se os tratamentos. No primeiro ensaio, o grupo 3 (G3) que recebeu dexametasona mais alendronato de sódio na dose de 0,2 mg/kg; grupo 4 (G4) que recebeu dexametasona mais atorvastatina cálcica na dose de 1,2 mg/kg e grupo 5 (G5) que recebeu dexametasona mais ipriflavona na dose de 100 mg/kg. No segundo ensaio, procedeu as combinações das respectivas substâncias, sendo: (G3) que recebeu dexametasona mais alendronato de sódio a 0,1 mg/kg + atorvastatina cálcica a 0,6 mg/kg; (G4) que recebeu dexametasona mais alendronato de sódio a 0,1 mg/kg + ipriflavona a 50 mg/kg e (G5) que recebeu dexametasona mais atorvastatina cálcica a 0,6 mg/kg + ipriflavona a 50 mg/kg. Todas as substâncias foram administradas por via oral, diariamente. Nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias, após o início dos tratamentos, foram coletados amostras de sangue para dosagens de cálcio e fósforo no equipamento multiparamétrico de bioquímica Alizé com “kits” da marca BioMerieux, e fosfatase alcalina óssea no equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter com “kits” Ostase. Após o sacrifício, foi coletado fêmur direito de cada animal que, uma vez processado rotineiramente e



obtido as lâminas, cujos cortes foram corados com hematoxilina e eosina, foi estudado histologicamente em microscopia de luz. Procedeu-se o cálculo percentual da densidade trabecular óssea, à partir da imagem amostral de osso trabecular, contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico equipado com câmara digital (TCL-984 P), analisada em monitor de microcomputador de 14 polegadas, utilizando-se da técnica de histomorfometria de contagem de pontos. Os ensaios biológicos foram realizados segundo delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos em seis repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste F ( $p < 0,05$ ). Os grupos controles (G1 e G2) foram comparados entre si, por meio do teste F. Os grupos tratados (G3, G4 e G5) foram comparados entre si, através do teste de Tukey à 5% de probabilidade. As comparações também foram realizadas entre os grupos tratados e os controles G1 e G2, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnett à 5% de probabilidade. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre o grupo controle (G1) e o grupo osteoporótico (G2), bem como, entre eles e os grupos tratados (G3, G4 e G5) e, também, entre os grupos tratados entre si, em todos os períodos, quanto aos valores sérico de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea, tanto no primeiro, como no segundo ensaio biológico. Assim, estes marcadores bioquímicos não apresentaram indícios para condução de diagnóstico e acompanhamento da patologia óssea osteoporótica. Todavia, os valores percentuais de densidade trabecular óssea foram significativos em todos os períodos, quando se compara o G1, ( $\pm 60\%$ ), com G2, ( $\pm 40\%$ ), mostrando que a indução osteoporótica com o glicocorticóide dexametasona foi um sucesso. Quanto aos grupos tratados, comparados com o G2, constata-se que os tratamentos com alendronato de sódio (G3) e atorvastatina cálcica (G4), isoladamente, alcançaram valores percentuais de densidade trabecular óssea significativos, já no período de 14 dias, repetindo-se nos períodos de 21 e 28 dias e o tratamento com ipriflavona obteve valores significativos nos períodos de 21 e 28 dias. O grupo tratado com alendronato de sódio obteve valores semelhantes ao do grupo controle (G1), nos períodos de 21 e 28 dias. Demonstra-se, assim, a capacidade destas substâncias de restaurar o tecido trabecular ósseo nos animais osteoporóticos induzidos com

glicocorticóide. As associações, por sua vez, apresentaram resultados superiores. Todos os grupos tratados (G3, G4 e G5) apresentaram resultados significativos em relação ao grupo (G2) nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Ademais, o grupo G4 (alendronato + ipriflavona) mostrou valores significativos, acima dos apresentados pelo grupo controle (G1), que é constituído de animais normais, nos períodos de 14, 21 e 28 dias e o grupo G3 (alendronato + atorvastatina), nos períodos de 21 e 28 dias. Tornou-se evidente, que as associações resultaram em maior eficácia, particularmente, aquelas com alendronato, com capacidade de restaurar o tecido trabecular ósseo. Considerando que as doses individuais das substâncias associadas foram reduzidas à metade daquelas, quando administradas isoladamente, e os resultados foram superiores, caracteriza-se, assim, efeito sinérgico de supradiação ou potenciação farmacológica. Muito embora os marcadores bioquímicos utilizados neste trabalho não demonstraram diferenças que evidenciasse alteração metabólica óssea, a histomorfometria e a histopatologia permitiu análise estática e dinâmica, bem como a avaliação das alterações tissulares na unidade metabólica óssea, especialmente, no osso trabecular. Deste modo, as substâncias usadas isoladamente ou as suas associações, podem ser promissoras no tratamento prolongado com glicocorticóide ou no tratamento da osteoporose estabelecida. Ressalva-se, no entanto, que estudos posteriores das dosagens, interações, biodisponibilidades, além dos efeitos toxicológicos dessas substâncias farmacológicas, fazem-se necessários.

## ABSTRACT

PINTO, Aloísio da Silva, D.S.; Universidade Federal de Viçosa; September, 2004;  
**Effects of the Alendronate of Sodium, Atorvastatin Calcic and Ipriflavone, Isolated and Associated, in the Osteoporosis Induced with Dexamethasone.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee Members: Ricardo Junqueira Del Carlo and Tanus Jorge Nagem.

This work consisted of two biological assays with objective of studying the influences of the bisphosphonate alendronate of sodium, statin atorvastatin calcic and flavonoid ipriflavone, separately and in association, in osteoporotic female Wistar rats, adults, weighing  $250 \pm 20\text{g}$ , induced with glucocorticoid dexamethasone. Induction of osteoporosis consisted of the dexamethasone administration, in the dose of 7 mg/kg, IM, once for week, for five weeks, in six animals of all groups, except those constituted the control group (G1), which received solution of NaCl to 0.9%, IM. The animals of the group 2 (G2), named osteoporotic, just received dexamethasone; After the induction, began the treatments. In the first rehearsal, the group 3 (G3) that received dexamethasone more alendronate of sodium in the dose of 0.2 mg/kg; group 4 (G4) that received dexamethasone more atorvastatin calcic in the dose of 1.2 mg/kg and group 5 (G5) that received dexamethasone more ipriflavone in the dose of 100 mg/kg. In the second rehearsal, proceeded the combinations of substances: (G3) that received dexamethasone more alendronate of sodium for 0.1 mg/kg + atorvastatin calcic for 0.6 mg/kg; (G4) that received dexamethasone more alendronate of sodium for 0.1 mg/kg + ipriflavone for 50 mg/kg and (G5) that received dexamethasone more atorvastatin calcic for 0.6 mg/kg + ipriflavone for 50 mg/kg. The substances were administered orally, daily. To the periods of 7, 14, 21 and 28 days of treatments, were collected sample blood for dosages of calcium and phosphorus in the biochemical multiparametric Alizé equipment with "kits" BioMerieux, and bone alkaline phosphatase in the quimioluminescence Access Immunoassay System equipment of Beckman Coulter with "kits" Ostase. After the sacrifice, was collected right femur of each animal that, once processed and obtained microscopic slides,

whose cuts were colored with hematoxylin and eosin, was histological studied in light microscopy. The percentile calculation of bone trabecular density from sample image of bone trabecular was proceeded, contained in the area subcondral of each histological cut, in optical microscope equipped with digital camera (TCL-984 P), analyzed in monitor of microcomputer of 14 inches, for histomorphometric technique of point scores. The biological assays were accomplished entirely according to casual delineation with five treatments in six repetitions. The results obtained were submitted to the variance analysis and the test F ( $p < 0,05$ ). The control groups (G1 and G2) were compared to each other by means of the test F. The treated groups (G3, G4 and G5) were compared to each other through the test of Tukey to 5% of probability. The comparisons were also accomplished between the treated groups and the control G1 and G2, and was applied of Dunnet test to 5% of probability. The results didn't show difference significant among group control (G1) and the osteoporotic group (G2), as well as between them and the treated groups (G3, G4 and G5) and also among the treated groups to each other, in all the periods, with relationship to the levels of calcium, phosphorus and bone alkaline phosphatase serum, so much in the first as in the second biological assays. Thus, these biochemical markers didn't present indications for diagnosis conduction and accompaniment of the bone osteoporotic pathology. Though, the percentile values of bone trabecular density were significant in all the periods, when it is compared G1, ( $\pm 60\%$ ), with G2, ( $\pm 40\%$ ), showing that osteoporotic induction with glucocorticoid dexamethasone was a success. With relationship to the treated groups, compared with the G2, it is verified that the treatments with alendronate of sodium (G3) and atorvastatin calcic (G4), separately, reached percentile values significant of bone trabecular density, already in the period of 14 days, repeating in the periods of 21 and 28 days and the treatment with ipriflavone obtained values significant in the periods of 21 and 28 days. The treated group with alendronate of sodium obtained values similar to controls group (G1), in periods of 21 e 28 days. It is demonstrated, like this, the capacity of these substances to restore bone trabecular tissue in the osteoporotic animals induced with glucocorticoid. The associations, for its time, presented results better. All treated

groups (G3, G4 and G5) presented significant results in relation to the group (G2) in the periods of 14, 21 and 28 days. Furthermore, group G4 (alendronate + ipriflavone) showed significant values, above presented them for the group controls (G1), that is constituted of normal animals, in the periods of 14, 21 and 28 days and group G3 (alendronate + atorvastatin), in the periods of 21 and 28 days. Became evident, that associations resulted in larger effectiveness, particularly, those with alendronate, with capacity of restore bone trabecular tissue. Considering that individual doses of the associated substances were in half reduced of those, when administered separately, and the results were superiors, it is characterized, like this, supradition synergistic effect or pharmacological potentiation. The biochemical markers used in this work didn't demonstrate differences that evidenced bone metabolic alteration. However, histomorphometric and histopatology allowed static and dynamic analysis, as well as the evaluation of tissue alterations in the bone metabolic unit, particularly, in the bone trabecular. This way, the substances used separately or its associations, can be promising in the treatment prolonged with glucocorticoid or in the treatment of the established osteoporosis. It is excepted, however, that further studies of dosages, interactions, bioavailability, besides the toxicological effects those pharmacological substances, are necessities.

## INTRODUÇÃO GERAL

Nos recentes anos, tem ocorrido uma mudança da importância relativa sobre a prevalência e severidade das desordens músculo-esqueléticas, que tem acometido milhões de pessoas à incapacidade e sofrimento em todo mundo. Dentre estas desordens, destaca-se a osteoporose, a mais comum das doenças ósseas em adultos, sobretudo na velhice. De uma maneira geral, com o relativo aumento do desenvolvimento sócio-econômico e, em conseqüência, aumento da expectativa de vida, o número de pessoas mais idosas tem aumentado. Desta forma, o número de pacientes osteoporóticos cresce na mesma proporção na população mundial, o que tem emergido como um problema de saúde pública, visto os elevados custos para a sociedade (MARCUS, 2001).

A osteoporose é uma desordem que afeta milhões de pessoas no mundo todo. Nos Estados Unidos mais de 25 milhões de pessoas são freqüentemente afetadas (CUMMINGS et al., 1985). Mulheres asiáticas e caucasianas são mais acometidas do que africanas e americanas. Diversos tipos de fraturas ocorrem, sendo relatados, em estudos epidemiológicos, mais de 250.000 fraturas nos Estados Unidos (CUMMINGS et al., 1990). Fraturas ocorrem em maior proporção em pessoas com mais de 50 anos.

A forma mais comum de osteoporose ocorre em mulheres pós-menopausa (DEMPSTER e LINDSAY, 1993). O evento primário que ocorre é a precipitação e perda de precipitados do tecido ósseo por falha da função ovariana, usualmente na menopausa. Sempre que isto ocorre, há um aumento do remodelamento do tecido ósseo e perda de massa óssea. Ocorre uma hiperprolactinemia e anorexia, quando acompanhadas por disfunção ovariana (KLIBANSKI et al., 1980; BILLER et al., 1989; WARREN, 1992). Elevadas taxas de perda óssea tem sido associada com baixos níveis circulantes de estrogênios e progesterona (PRIOR et al., 1990). Tratamentos à longo prazo com agonistas de GnRH também causam perda óssea (RICO et al., 1993). Diversos fatores têm sido sugeridos aumentar o risco de osteoporose, entre eles a baixa absorção de cálcio, baixa atividade física, nicotina, álcool, maior ou menor consumo de cafeína, proteína animal e fosfato (LLOYD et

al., 1993; HARRIS e DAWSON-HUGHES, 1994; PRINCE et al., 1995; KARLKAINEN e LAMBERG-ALLARDT, 1996; LLOYD et al., 1997; VOGEL et al., 1997; ROSS, 1998). A osteoporose está então associada com baixa qualidade de vida, além dos indivíduos que também têm predisposição genética (KHOURY, 1998).

Perda de massa óssea inicia entre as idades de 35 e 50 anos nos homens e mulheres e continua com a idade em ambos os sexos. Homens perdem cerca de 15-45% de osso trabecular e 5-15% de osso cortical com o avanço da idade, comparado com 35-50% e 25-30%, respectivamente, nas mulheres (SCANE e FRANCIS, 1993).

A diminuição de testosterona, andrógenos adrenais, hormônio do crescimento e fator-1 do crescimento semelhante à insulina (IGF-1) na circulação, com o avanço da idade, pode contribuir para a redução na formação óssea e contínua perda óssea no homem (PANDE e FRANCIS, 2001).

Certas desordens metabólicas também podem aumentar o risco de osteoporose, incluindo artrite reumatóide e outras condições associadas com imobilidade crônica, esclerose múltipla, deficiência de vitamina D (COSMAN et al., 1993). Também vários medicamentos usados por longo período podem aumentar o problema. O uso de glicocorticóides, causa perda de massa óssea, sendo os efeitos potentes e rápidos em indivíduos susceptíveis (DEMPSTER, 1989; LUKERT e RAISZ, 1990). Altas doses de hormônio da tireóide podem estar associadas com perda de massa óssea (ETTINGER e WINGER, 1982). Outros agentes, incluindo diuréticos, anticonvulsivantes, antimitóticos e altas doses de heparina e cumarínicos, por longos períodos, podem levar também à perda da massa óssea (DEMPSTER e LINDSAY, 1993).

Diversas evidências têm dado suporte ao conceito de que atividade física regular, adequada ingestão de cálcio, através da dieta ou de suplemento, uso da terapia de reposição hormonal diminui o remodelamento ósseo, reprime a perda de osso e reduz os riscos de fraturas (ERVITI, 2003). Todavia, o tratamento da osteoporose estabelecida permanece ainda como um formidável desafio. As terapias aprovadas, como cálcio, estrógenos e análogos, atuam por retardar a

reabsorção óssea e não por estimular a formação de novo osso e, portanto, não resolvem o problema de restaurar a massa normal de osso. Deste modo, o desafio futuro é buscar agentes que seguramente aumente a massa óssea.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BILLER, B.M.K.; SAKE, V.; HERZOG, D.B.; ROSENTHAL, D.I.; HOLZMAN, S.; KLIBANSKI, A. Mechanisms of osteoporosis in adult and adolescent women with anorexia nervosa. **J Clin Endocrinol Metab**, 68:548-554, 1989.

COSMAN, F.; NIEVES, J.; GORDON, S.; SHEN, V.; HERBERT, J.; LINDASAY, R. High dose IV steroids acutely depress serum phosphorus and elevate 1,25 (OH) 2D prior to an increase in PTH. **J Bone Miner Res**, (Supl 1):S168, 1993.

CUMMINGS, S.R.; KELSEY, J.L.; NEVITT, M.C.; O'DOWD, K.J. Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. **Epidemiol Rev**, 7:178-208, 1985.

CUMMINGS, S.R.; RUBIN, S.M.; BLACK, D. The future of hip fractures in the United States. **Clin Orthop Rel Res**, 252:163-166, 1990.

DEMPSTER, D.W. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. **J Bone Miner Res**, 4:137-141, 1989.

DEMPSTER, D.W.; LINDSAY, R. Pathogenesis of osteoporosis. **Lancet**, 341:797-801, 1993.

ERVITI, J. Utilización de fármacos para la osteoporosis. **An Sist Sanit Navar**, 26(3):107-121, 2003.

ETTINGER, B.; WINGER, J. Thyroid supplements: Effect on bone mass. **West J Med**, 136:472-476, 1982.

HARRIS, S.S.; DAWSON-HUGHES, B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**, 60:573-578, 1994.

KARLKAINEN, M.; LAMBERG-ALLARDT, C. An acute intake of phosphate increases parathyroid hormone secretion and inhibits bone formation in young women. **J Bone Miner Res**, 11:1905-1912, 1996.

KLIBANSKI, A.; NEER, R.M.; BEITINS, I.Z.; RIDGWAY, E.C.; ZERVAS, N.T.; McARTHUR, J.W. Decreased bone density in amenorrheic hyperprolactinemic women. **N Engl J Med**, 303:1511-1514, 1980.



KHOURY, M.J. Genetic and epidemiological approaches to the search for gene-environment interaction: the case of osteoporosis. **Am J Epidemiol**, 147:1-2, 1998.

LLOYD, T.; ANDON, M.B.; ROLLINGS, N.; MARTEL, J.K.; LANDIS, J.R.; DEMERS, L.M.; EGGLI, D.F.; KIESELHORST, K.; KULIN, H.E. Calcium supplementation and bone mineral density in adolescent girls. **JAMA**, 270:841-844, 1993.

LLOYD, T.; ROLLINGS, N.; EGGLI, D.F.; KIESELHORST, K.; CHINCHILLI, V.M. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. **Am J Clin Nutr**, 65:1826-1830, 1997

LUKERT, B.P.; RAISZ, L.G. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. **Ann Intern Med**, 112(5):352-364, 1990.

MARCUS, R. Agents affecting calcification and bone turnover. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 10.ed., New York: McGraw-Hill, 2001. p.1715-1743.

PANDE, I.; FRANCIS, R.M. Osteoporosis in men. **Best Pract & Res Clin Rheum**, 15:415-427, 2001.

PRINCE, R.; DEVINE, A.; DICK, I.; CRIDDLE, A.; KERR, D.; KENT, N.; PRICE, R.; RANDELL, A. The effects of calcium supplementation (milk powder or tablets) and exercise on bone density in postmenopausal women. **J Bone Miner Res**, 10:1068-1075, 1995.

PRIOR, J.C.; VIGNA, I.M.; SCHECHTER, M.T.; BURGESS, A.E. Spinal bone loss and ovulatory disturbances. **N Engl J Med** 323:1221-1227, 1990.

RICO, H.; ARNANZ, F.; REVILLA, M.; PERERA, S.; IRÍTIA, M.; VILLA, L.F.; ARRÍBAS, I. Total and regional bone mineral content in women treated with GnRH agonists. **Calcif Tissue Int**, 52:354-357, 1993.

ROSS, P.D. Risk factors for osteoporotic fracture. **Endocrinol Metab Clin North Am**, 27:289-301, 1998.

SCANE, A.C.; FRANCIS, R.M. Risk factors for osteoporosis in men. **Clin Endocrinol**, 38:15-16, 1993.

VOGEL, J.M.; DAVIS, J.W.; NOMURA, A. The effects of smoking on bone mass and the rates of bone loss among elderly Japanese-American men. **J Bone Miner Res**, 12:1495-1501, 1997.

WARREN, M.P. Amenorrhea in endurance runners. **J Clin Endocrinol Metab**, 75:1393-1397, 1992.

**Artigo 1 – EFEITOS DE ALENDRONATO DE SÓDIO, ATORVASTATINA  
CÁLCICA E IPRIFLAVONA NA OSTEOPOROSE INDUZIDA COM  
DEXAMETASONA EM RATAS**

**RESUMO**

PINTO, Aloísio da Silva, D.S.; Universidade Federal de Viçosa; setembro de 2004; **Efeitos de Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica e Ipriflavona, Isoladamente e em Associação, na Osteoporose Induzida com Dexametasona.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Ricardo Junqueira Del Carlo e Tanus Jorge Nagem.

Nos últimos anos, o crescente aumento na prevalência da osteoporose tem sido considerado um grave problema de saúde pública no mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que 200 milhões de mulheres e homens sofram de osteoporose em todo planeta. A osteoporose é uma doença caracterizada por diminuição da massa óssea, com conseqüente aumento do risco de fraturas, necessitando, portanto, de métodos preventivos e de tratamentos eficazes.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do bifosfonato alendronato de sódio, da estatina atorvastatina cálcica e do flavonóide ipriflavona na osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona em ratas. A influência desses fármacos foi avaliada pelos marcadores bioquímicos de remodelação óssea, tais como, teores de cálcio e fósforo sérico e de fosfatase alcalina óssea e exame histomorfométrico, visualizando-se a densidade trabecular óssea.

Os resultados obtidos a partir da análise dos marcadores bioquímicos não foram estatisticamente significativos, não fornecendo subsídios para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento da osteoporose. No entanto, a avaliação histomorfométrica nos permitiu a análise estática e dinâmica, bem como detecção de alterações tissulares na unidade metabólica óssea, particularmente, no osso trabecular. Pode-se verificar que todos os tratamentos testados determinaram resultados significativos no aumento da densidade trabecular óssea, destacando-se que o bifosfonato apresentou o melhor resultado, sendo alcançados níveis de densidade trabecular óssea semelhantes aos dos animais normais.

## ABSTRACT

PINTO, Aloísio da Silva, D.S.; Universidade Federal de Viçosa; September, 2004;  
**Effects of the Alendronate of Sodium, Atorvastatin Calcic and Ipriflavone, Isolated and Associated, in the Osteoporosis Induced with Dexamethasone.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee Members: Ricardo Junqueira Del Carlo and Tanus Jorge Nagem.

In the last years, osteoporosis increased so much that has been considered a serious problem of public health in the world. The World Organization of Health evaluated that 200 million women and men suffers of osteoporosis worldwide. Osteoporosis is a disease characterized by decrease of the bony mass, with consequent increase of the risk of fractures. Therefore, search of preventive methods and effective treatments become necessary continuously.

The present work studied the influence of the bisphosphonate alendronate of sodium, statin atorvastatin calcic and flavonoid ipriflavone in osteoporotic female rats induced for glucocorticoid dexamethasone. The influence of those drugs was evaluated by biochemical markers of bony remodeling, such as, levels of calcium and phosphorus serum and activities of bone alkaline phosphatase and through histomorphometric exam, being visualized the bone trabecular density.

The results obtained with biochemical marker were not statistic significant and did not allow subsidies for the diagnosis and accompaniment of the osteoporosis. However, histomorphometric evaluation allowed us analysis of the static and dynamic as well as detection of tissue alterations in the bone metabolic unit, particularly, in the bone trabecular. It can be verified that all the tested treatments obtained significant results in the increase of the bone trabecular density. Bisphosphonate showed the best results for osteoporotic animals. These reached levels of bone trabecular density similar to those classified normals.

## 1 - INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada por diminuição da quantidade de osso mineralizado, juntamente com alteração da microarquitetura óssea, induzindo aumento da fragilidade e maior risco de fraturas (MUNDY, 2001a).

Dentre as causas mais comuns de osteoporose, está o hipercortisolismo crônico, que possui, como mecanismo básico, ação direta dos glicocorticóides nas paratireóides e nas células ósseas, alterações na produção de prostaglandinas, citocinas, interleucinas, alterações na secreção do hormônio do crescimento (GH), do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e esteróides gonadais (LANNA et al., 2003).

Segundo BRANDLI et al. (1991), a indução da osteoporose pelos glicocorticóides resulta da supressão da atividade de formação óssea dos osteoblastos, combinado com o aumento da atividade de reabsorção óssea pelos osteoclastos. Enquanto o efeito na atividade osteoblástica parece ser direto (DIETRICH et al., 1979), seus efeitos na atividade osteoclástica são resultantes da diminuição da absorção de cálcio intestinal, concomitantes com aumento da excreção urinária de cálcio, ambos como causas secundárias do hiperparatireoidismo (HAHN et al., 1979; SUZUKI et al., 1983).

O estudo do tratamento da osteoporose ocasionada por terapia com glicocorticóides tem sido especialmente motivado, pois os mesmos, não raramente, são insubstituíveis para o tratamento médico de muitas e variadas enfermidades devido a seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (POLO, 2003).

Os agentes biomedicinais, que podem ser utilizados no tratamento da osteoporose, de acordo com suas propriedades farmacológicas, podem ser divididos em antireabsortivos e agentes formadores de osso (KIM et al., 2003).

Dentre os agentes antireabsortivos, pode-se citar os bifosfonatos, que atuam ligando-se aos cristais de hidroxapatita e acumulando-se no tecido ósseo (JUNG et al., 1973; FOGELMAN et al., 1981). Podem, também, inibir diretamente

múltiplas etapas na via do mevalonato para colesterol e lípidos isoprenóides, tais como geranylgeranyl difosfato, que são requeridos para a prenilação de várias proteínas que são importantes para a função do osteoclasto (LUCKMAN et al., 1998). Além disso, os bifosfonatos contendo nitrogênio como risedronato, alendronato, pamidronato e ácido zoledrônico e os não nitrogenados como clodronato e etidronato causam apoptose de osteoclastos de coelhos. A apoptose dos osteoclastos estaria envolvida em trocas morfológicas, perda da membrana mitocondrial e a ativação de proteases caspase-3, capazes de clivar substratos peptídicos (BENFORD et al., 2001).

Já entre os agentes formadores de osso, podemos citar as estatinas, atuando devido a seus efeitos promotores sobre o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), o qual conduz a diferenciação osteoblástica e a formação óssea. Ocorre aumento da transcrição do gene do BMP-2, sendo este o provável mecanismo responsável pelos seus efeitos (MUNDY, 2001b).

Ainda, foi verificado que flavonóides previnem a perda de massa óssea em pacientes osteoporóticos e provoca decréscimo no turnover ósseo provocado por hipogonadismo (GAMBACCIANY et al., 1994). Efeitos favoráveis à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos foi demonstrado por KATAI et al., (1992) e CHENG et al., (1994) e inibição da reabsorção óssea também foi observado (NOTOYA et al., 1993, ALBANESE et al., 1994). O mecanismo envolvido na ação modulatória em células do tecido ósseo parece ter atividade antirreabsortiva (AZRIA et al., 1993; PASSERI et al., 1995).

Ademais, foi mostrado que o flavonóide induziu aumento de 4,4% de massa óssea após tratamento de 12 meses em mulheres osteoporóticas e foi efetivo na prevenção da perda óssea (CECCHETTIN et al., 1995).

## 2 - OBJETIVO

O presente estudo teve como finalidade estudar a influência do alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona, usado isoladamente, em ratas com osteoporose induzida com glicocorticóide, por meio da avaliação das concentrações séricas de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina óssea e da análise microscópica da densidade trabecular óssea.

## 3 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento consistiu de um ensaio biológico onde se verificou os efeitos das substâncias alendronato de sódio<sup>1</sup>, atorvastatina cálcica<sup>2</sup> e ipriflavona<sup>3</sup>.

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas 120 ratas da raça Wistar, adultas, pesando aproximadamente  $250 \pm 20$ g de peso, procedentes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Após a chegada no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV – MG, os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo cada uma seis animais, em um ambiente climatizado, com ciclo de claro-escuro de 12 horas, recebendo água e ração comercial Labcil<sup>4</sup>, *ad libitum*.

---

<sup>1</sup> Alendronato Monossódico Trihidratado em solução oral a 0,2mg/ml – Galena.

<sup>2</sup> Citalor® manipulado para a forma de suspensão oral a 1mg/ml – Pfizer

<sup>3</sup> Ipriflavona em suspensão oral a 25mg/0,3 ml - Galena

<sup>4</sup> Labcil®

Nestas condições, após período de adaptação de sete dias, teve início o processo de indução da osteoporose, que consistiu na administração do glicocorticóide dexametasona<sup>5</sup>, por via intramuscular, na dose de 7 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas, nos animais de todos os grupos, à exceção dos animais que constituíram o grupo controle, denominado G1, que receberam solução de NaCl à 0,9%, via intramuscular.

Após o período de indução, os animais foram distribuídos, de forma aleatória, em cinco grupos de vinte e quatro, sendo: grupo controle (G1), composto dos que não foram submetidos à aplicação do corticosteróide dexametasona; grupo 2 (G2), que receberam apenas dexametasona; grupo 3 (G3), que receberam a dexametasona e iniciaram o tratamento diário com alendronato de sódio na dose de 0,2mg/kg; grupo 4 (G4), que receberam a dexametasona e iniciaram o tratamento diário com atorvastatina cálcica na dose de 1,2mg/kg e, grupo 5 (G5), com animais que receberam a dexametasona e tratamento diário com ipriflavona na dose de 100mg/Kg. Todas as substâncias foram administradas por via oral.

À partir da data de início do tratamento, aos 7, 14, 21 e 28 dias, seis animais de cada grupo foram anestesiados por administração, via intramuscular, de 0,1 ml da solução anestésica de cloridrato de tiletamina (25mg/mL) e cloridrato de zolazepam<sup>6</sup> (25mg/mL). Foram coletados, então, de cada animal, 5ml de amostra de sangue, por punção na veia cava caudal, com o objetivo de dosar os níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea. Para a realização das dosagens de cálcio e fósforo, foi utilizado o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica Alizé, bem como “kits” da marca BioMerieux. Já na dosagem da fosfatase alcalina óssea (FAO), utilizou-se do equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter, assim como “kits” Ostase, específico para dosagem desta enzima, também da mesma indústria.

---

<sup>5</sup> Azium Solução® - Schering-Plough S/A.

<sup>6</sup> Zoletil 50® - Virbac

Logo após o sacrifício dos animais, procedeu-se a dissecação do fêmur direito de cada animal, que foi coletado, tomando-se o cuidado de se manter a região epifisária, colocado em formol tamponado à 10%, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, descalcificado em solução de ácido fórmico/citrato de sódio, incluído em parafina e processado rotineiramente para estudo histológico em microscopia de luz.

Foram obtidos três cortes, de cada fêmur, de quatro micrômetros (4  $\mu$ m) de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Estes cortes foram obtidos de forma seriada, montados sobre lâmina de vidro e corados com hematoxilina e eosina no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV.

Para cálculo da densidade ocupada por osso trabecular, foi obtida uma imagem amostral de osso trabecular, contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico equipado com câmara digital (TCL-984 P). Estas imagens foram analisadas em monitor de microcomputador de 14 polegadas, com aumento final de 50 vezes. Uma graticula composta por 494 interseções, distando 1cm cada uma, foi aplicada sobre a imagem, sendo uma área de 100 interseções isolada para a mensuração. Estas interseções foram computadas como pontos coincidentes à trabecula óssea ou ao espaço intertrabecular. Realizou-se 3 repetições, sendo, assim, para cada animal, computados um total de 300 pontos, perfazendo, portanto, 1800 pontos por grupo de 6 animais de cada tratamento. Desta forma, obteve-se o percentual da densidade trabecular óssea dos animais experimentais.

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos em 6 repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste F ( $p < 0,05$ ). Os grupos controle (G1 e G2) foram comparados entre si por meio do teste F. Os grupos tratados (G3, G4 e G5) foram comparados entre si através do teste de Tukey à 5% de probabilidade. As comparações dos grupos tratados com o controle G1 e o osteoporótico G2, também foram realizados, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnet à 5% de probabilidade.



#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos (tabela 1), não houve diferença significativa entre os grupos controle (G1) e o grupo osteoporótico (G2), quanto aos valores médios de cálcio sérico, expressos em mg/dL, em todos os períodos avaliados e também entre eles e os grupos tratados (G3, G4 e G5), respectivamente. Em relação aos tratamentos efetuados, observa-se, também, que não ocorreu, *per si*, diferença estatisticamente significativa dos valores nos diversos períodos testados.

**Tabela 1** - Valores médios de cálcio sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Cálcio mg/dL			Variação % em relação G1	Variação % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	13,65 A	±	0,42	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,80 A	±	0,65	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	14,08 a	±	0,44	3,17	2,05
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	13,47 a	±	1,30	-1,34	-2,42
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	13,45 a	±	0,55	-1,47	-2,54
14 Dias	G1 Controle	13,37 A	±	0,37	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,05 A	±	0,19	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	12,98 a	±	0,57	-2,87	-0,51
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	13,30 a	±	0,54	-0,50	1,92
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	13,18 a	±	0,35	-1,37	1,02
21 Dias	G1 Controle	13,00 A	±	0,42	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,22 A	±	0,82	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	12,93 a	±	0,67	-0,51	-2,14
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	13,05 a	±	0,58	0,38	-1,26
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	13,39 a	±	0,29	3,00	1,31
28 Dias	G1 Controle	13,65 A	±	0,44	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,60 A	±	0,43	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	13,27 a	±	0,67	-2,78	-2,45
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	13,70 a	±	0,61	0,36	0,73
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	13,68 a	±	0,54	0,22	0,58

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).  
Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Na tentativa de desenvolver um modelo experimental, SANTOS (2004) conseguiu induzir osteoporose com a administração de dexametasona, uma vez por semana, durante 4 semanas, em ratos, machos inteiros e castrados e fêmeas inteiras e ovariectomizadas, da raça Wistar, com a mesma dose empregada neste trabalho. Como prevenção e garantia da efetiva indução da osteoporose e prosseguimento do protocolo experimental, a aplicação do glicocorticóide, no presente estudo, se estendeu por mais uma semana.

Sabe-se que o cálcio é o principal cátion divalente encontrado no tecido ósseo, principalmente na forma de cristais de hidroxapatita, sendo estes cristais um dos responsáveis pela resistência e dureza do tecido ósseo. O tratamento com glicocorticóide, nas condições experimentais deste trabalho, levaria a um estado característico de osteoporose, quando se observa fragilidade da microarquitetura óssea, (HAHN et al., 1979, SUZUKI et al., 1983, MUNDY, 2001a,). Neste caso, poder-se-ia esperar uma diminuição dos níveis totais do íon cálcio no tecido ósseo. Portanto, pode-se explicar os níveis não significativos deste cátion na corrente sanguínea, devido, possivelmente, ao elevado metabolismo e controle homeostático bastante rigoroso do sistema endócrino nestes animais, que afeta sua absorção pelo intestino e sua excreção pelo rim e que regula o grande reservatório esquelético de onde o elemento é retirado nos momentos de necessidade (GUYTON e HALL, 2002).

Na tabela 2, são apresentados os resultados de fósforo sérico, expressos em mg/dL, onde se observa que os tratamentos não modificaram os valores médios de maneira estatisticamente significativa em relação aos grupos controles (G1) e (G2) e também entre si.

Como a osteoporose se caracteriza por uma redução da massa óssea, particularmente a osteoporose secundária, devendo-se ocorrer reabsorção numa velocidade que ultrapassa a da formação óssea, tanto o cálcio como o fósforo são perdidos, possivelmente com desenvolvimento de hipercalciúria e hiperfosfatúria, devido menor taxa de reabsorção renal destes íons. Assim, se explicaria os níveis de fósforo não diferenciados entre os diversos tratamentos, considerando a velocidade da regulação homeostática destes animais (SMITH et al., 1988). Ainda,

ressalve-se que, em humanos, os níveis séricos de cálcio e fósforo são, geralmente, esperados normais na osteoporose, sem qualquer alteração na relação entre mineral e matriz (SMITH et al., 1988; BORELLI, 1998).

**Tabela 2** -Valores médios de fósforo sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Fósforo mg/dL		Varição % em relação G1	Varição % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	7,93 A	± 0,748	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	8,12 A	± 0,461	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	8,30 a	± 0,784	4,64	2,22
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,84 a	± 0,583	-1,13	-3,43
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,92 a	± 0,359	-0,13	-2,46
14 Dias	G1 Controle	7,22 A	± 0,606	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,58 A	± 0,272	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,31 a	± 0,853	1,25	-3,63
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,20 a	± 0,738	-0,18	-4,99
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,37 a	± 0,815	2,08	-2,84
21 Dias	G1 Controle	7,49 A	± 0,481	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,69 A	± 0,682	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,57 a	± 0,795	1,07	-1,56
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,78 a	± 1,015	3,87	-1,17
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,57 a	± 0,666	1,06	-1,56
28 Dias	G1 Controle	7,70 A	± 0,582	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,37 A	± 0,645	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	7,57 a	± 0,596	-1,69	2,71
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	7,49 a	± 0,563	-2,73	1,63
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	7,41 a	± 0,54	-3,77	0,54

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Os valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO), mostrados na tabela 3, não apresentaram variações significativas estatisticamente entre os grupos controle (G1) e osteoporótico (G2) e também entre os grupos tratados entre si e entre os tratados e os grupos G1 e G2, respectivamente.

**Tabela 3** - Valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO) em pg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	FAO pg/dL		Variação % em relação G1	Variação % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	0,04 A	± 0,018	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	0,05 A	± 0,026	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	0,04 a	± 0,011	-5,40	-26,18
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	0,06 a	± 0,03	34,41	4,89
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	0,06 a	± 0,039	52,70	19,16
14 Dias	G1 Controle	0,04 A	± 0,018	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	0,04 A	± 0,02	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	0,04 a	± 0,016	-12,76	-11,12
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	0,04 a	± 0,016	4,90	6,87
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	0,05 a	± 0,031	16,13	18,31
21 Dias	G1 Controle	0,05 A	± 0,022	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	0,06 A	± 0,024	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	0,06 a	± 0,016	15,39	-1,57
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	0,04 a	± 0,025	-15,49	-27,91
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	0,04 a	± 0,023	-18,66	-30,61
28 Dias	G1 Controle	0,06 A	± 0,02	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	0,06 A	± 0,019	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato	0,06 a	± 0,027	-5,55	1,78
	G4 Glicocorticoide + Atorvastatina	0,06 a	± 0,024	-7,99	-0,85
	G5 Glicocorticoide + Ipriflavona	0,05 a	± 0,025	-23,02	-17,04

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).  
Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

A fosfatase alcalina óssea é o marcador de formação óssea mais freqüentemente utilizado (BIKLE, 1997; VIEIRA, 1999). A FAO é uma isoforma da fosfatase alcalina total (FA), que apesar da semelhança estrutural com essa, pode ser detectada através de imunoenaios específicos, apresentando baixa reação cruzada. A medida da isoforma ósseo-específica tem vantagens sobre a FA, uma vez que além de não sofrer influências hepáticas, é mais sensível a pequenas variações no *pool* circulante.(SARAIVA e CASTRO 2002).

Além da não significância estatística, os valores médios de FAO, em todos os grupos, no presente estudo, estiveram abaixo da curva de calibração, sugerindo que ocorreu reação de identidade parcial entre antígeno e anticorpo (HOLME e PECK, 1998). Apesar da não significância, obtida neste ensaio, KIM et. al. (2003) encontrou diferenças significativas de valores médios de FAO entre ratas normais, osteoporóticas e osteoporóticas tratadas.

A tabela 4 apresenta a quantificação dos resultados histológicos, que nos permite determinar a osteoporose através da visualização da morfologia trabecular óssea, assim como da extensão da perda óssea e das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo (JUNQUEIRA et al., 1986).

Em relação aos valores médios de densidade trabecular óssea, expressos em pontos percentuais, mostrados na tabela 4, verificou-se que o grupo controle (G1) diferencia significativamente do grupo osteoporótico (G2) em todos os períodos, ficando caracterizado, por estes resultados, que o tratamento com o glicocorticóide dexametazona, nas condições deste experimento, foi capaz de induzir a desordem ósteo-metabólica, denominada osteoporose, nos animais. Observa-se que, no período de 7 dias, os resultados dos grupos dos animais tratados, apresentaram diminuição da variação percentual significativas em relação ao grupo controle (G1), sem mudança, no entanto, de variação significativa em relação ao grupo osteoporótico (G2), o que denota que os animais sofreram, de fato, indução osteoporótica e que, os diversos tratamentos, ainda não tinham afetado o seu metabolismo ósseo.

**Tabela 4** - Valores médios de densidade trabecular óssea em pontos percentuais e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Dens %		Varição % em relação G1	Varição % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	60,00 A	± 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	43,78 B	± 0,509	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	45,78 a	± 3,595	-23,70*	4,57
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	40,89 a	± 1,388	-31,85*	-6,60
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	41,00 a	± 3,283	-31,67*	-6,35
14 Dias	G1 Controle	59,80 A	± 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	40,78 B	± 1,895	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	54,11 a	± 4,018	-9,51*	32,70**
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	45,56 b	± 1,018	-23,81*	11,72**
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	43,78 b	± 1,711	-26,79*	7,36
21 Dias	G1 Controle	61,02 A	± 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	37,00 B	± 1,155	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	60,67 a	± 4,041	-0,57	63,96**
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	51,00 b	± 4,163	-16,42*	37,84**
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	51,00 b	± 1,528	-16,42*	37,84**
28 Dias	G1 Controle	61,58 A	± 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	41,56 B	± 2,269	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato	64,56 a	± 3,289	4,84	55,35**
	G4 Glicocorticóide + Atorvastatina	55,44 b	± 2,835	-9,97*	33,42**
	G5 Glicocorticóide + Ipriflavona	49,56 b	± 1,072	-19,52*	19,25**

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05).

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnet (P< 0,05) em cada período.

\*\*Estatisticamente diferente do grupo G2 pelo teste de Dunnet (P< 0,05) em cada período.

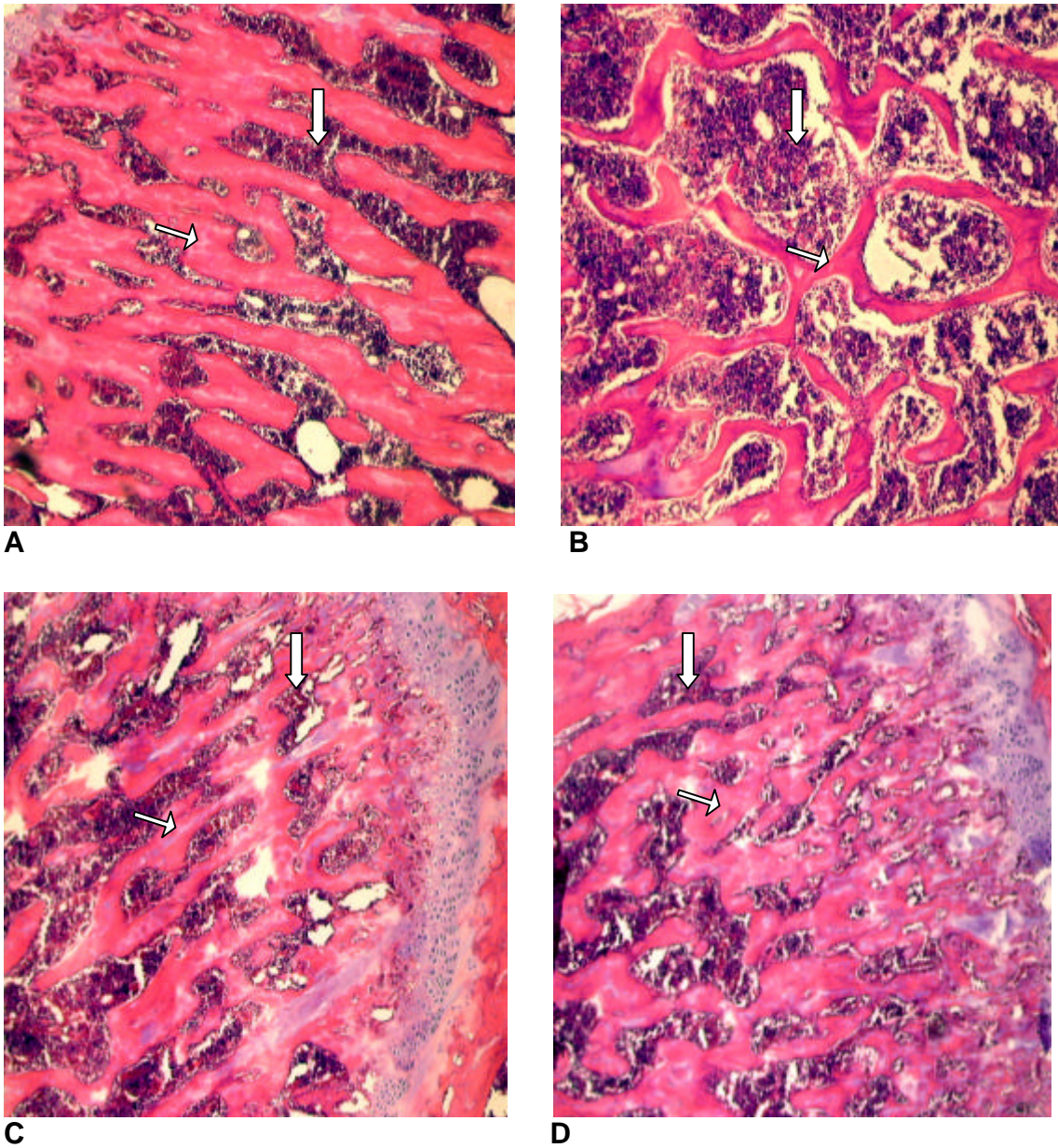
Aos 14 dias de tratamento, se observou variação percentual de densidade trabecular óssea significativa em relação ao grupo osteoporótico (G2), o grupo G3, tratado com alendronato de sódio e o grupo G4, tratado com atorvastatina. cálcica. Embora o grupo G5, tratado com ipriflavona, não tenha alcançado valores percentuais significativos, mostrou tendência de aumento.

Quando se observaram os resultados do período de 21 dias, verificou-se que todos os tratamentos já causaram mudanças no metabolismo ósseo dos animais de maneira estatisticamente significativa, quando comparado com o grupo

osteoporótico G2, demonstrando a eficácia das substâncias experimentais. Ressalte-se que, em relação ao grupo controle G1, não mais ocorreu diferença significativa com o grupo G3, tratado com alendronato de sódio, demonstrando, assim, a potência desta substância e sua capacidade de restaurar os níveis de trabéculas ósseas.

Ademais, os resultados obtidos no período de 28 dias, corroboram aqueles alcançados no período anterior, em que o alendronato de sódio consegue ser o mais efetivo, seguido do tratamento efetuado com a atorvastatina cálcica. Embora o tratamento com ipriflavona tenha apresentado o menor efeito, vê-se que o mesmo apresentou resultado positivamente significativo em relação ao grupo osteoporótico G2.

A Figura 1 apresenta cortes histológicos da região do terço proximal do fêmur direito dos animais, onde se observa diminuição trabecular óssea, identificada principalmente pela menor espessura das trabéculas ósseas no grupo osteoporótico (Fig.1B) e, em contraste, uma maior área de medula óssea neste grupo, em relação ao grupo controle (Fig. 1A). Quanto aos grupos tratados, foi observado que aos 14 dias (Fig. 1C), no grupo que recebeu alendronato de sódio, a espessura das trabéculas ósseas foi significativamente maior, ainda sendo permitido a observação de espaços intertrabeculares, preenchidos pela medula óssea. Aos 28 dias de tratamento (Fig. 1D), observou-se que a densidade trabecular óssea foi maior que aos 14 dias, em contraste com menores espaços intertrabeculares, preenchidos por medula óssea, cuja evolução tornou-se semelhante àquela observada nos animais do grupo controle (Figs. 1D e 1A), ratificada pelos valores médios de densidade trabecular óssea indicados na Tabela 4.



**Figura 1** – Osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de fêmur de ratas. HE. 100X. **A**, Grupo Controle (G1). **B**, Grupo Osteoporótico (G2), (Glicocorticóide). **C**, Grupo Tratado 14 Dias (G3), (Glicocorticóide + Alendronato). **D**, Grupo Tratado 28 Dias (G3), (Glicocorticóide + Alendronato).  
 Seta Larga – região medular óssea.  
 Seta Estreita – trabécula óssea.



## 5 - CONCLUSÕES

Os marcadores bioquímicos utilizados não permitiram o diagnóstico da osteoporose, bem como a avaliação das alterações de remodelação óssea.

A histomorfometria, ao contrário, permitiu análise estática e dinâmica, bem como detecção de alterações tissulares na unidade metabólica óssea, particularmente, no osso trabecular.

Através da análise da densidade trabecular óssea, foi possível constatar o sucesso da indução da osteoporose pelo glicocorticóide, bem como acompanhar o processo de restauração tecidual óssea provocado pelos fármacos.

As substâncias alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona apresentaram efeitos positivos nos animais osteoporóticos, ratificando, portanto, a sua aplicabilidade na prevenção durante tratamento com glicocorticóide ou no tratamento da osteoporose estabelecida.

Devemos destacar, no entanto, a maior eficácia do bifosfonato alendronato de sódio, que apresentou restauração do tecido trabecular ósseo dos animais osteoporóticos, comparável aos dos animais normais.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANESE, C.B.; CUDD, A.; ARGENTINO, L.; ZAMBONIN-ZALLONE, A.; MACINTYRE, I. Ipriflavone directly inhibits osteoclasts activity. **Biochem Biophys Res Commun**, 199:930-936, 1994.

AZRIA, M.; BEHHAR, C.; COOPER, S.; LAC, K. Effect of ipriflavone on osteoclasts motility and resorption in vitro in vivo studies. **Calcif Tissue Int**, 52:16-20, 1993.

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

BIKLE, D.D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. **Am J Med**, 103:427-436, 1997.

BORELLI, A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: CARVALHO FILHO, E.T.; PAPALÉO NETO, M. **Geriatría: Fundamentos, Clínica e Terapêutica**, 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1998. p.297-307.

BRANDLI, D.W.; GOLDE, G.; GREENWALD, M.; SILVERMAN, S.T. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a cross-sectional study. **Steroids**, 56:518-523, 1991.

CECCHETTIN, M.; BELLOMETTI, S.; CREMONESI, G.; SOLIMENO, L. P.; TORRI, G. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. **Biomed & Pharmacother**, 49:465-468, 1995.

CHENG, S.L.; ZHANG, S.F.; NELSON, T.L.; WARLOW, P.M.; CIVITELLI, R. Stimulatory of human osteoblasts differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. **Calcif Tissue Int**, 55:356-362, 1994.

DIETRICH, J.W.; CANALIS, E.M.; MAINA, D.M.; RAISZ, L.G. Effects of glucocorticoids on fetal rat bone collagen synthesis in vitro. **Endocrinology**, 104:715-721, 1979.

FOGELMAN, I.; PEARSON, D. W.; BESSENT, R. G.; TOFE, A. J.; FRANCIS, M. D. A comparison of skeletal uptake of three diphosphonates by whole body retention. **J Nucl Med**, 22:880-883, 1981.

GAMBACCIANY, M.; SPINETTI, A.; PIAGGESI, L.; CAPPAGLI, B.; TAPONECO, F.; MANETTI, P.; WEISS, C.; TETEI, G. C.; LA COMMARE, P.; FACCHINI, V. Ipriflavone prevents the bone loss mass reduction in premenopausal women treated with gonadotropin hormone-releasing hormone agonists. **Bone Liner**, 26:19-26, 1994.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973p.

HAHN, T.J.; HALSTEAD, L.R.; TEITELBAUN S.L.; HAHN, B.H. Altered mineral metabolism in glucocorticoid induced osteopenia. Effect of 25 hidroxyvitamin D administration. **J Clin Invest**, 64:655-665, 1979.

HOLME, D. J.; PECK, H. **Analytical Biochemistry**. Singapore, Longman Singapore Publishers, 1998. 488p.

JUNG, A.; BISAZ, S.; FLEISCH, H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates on hydroxyapatite crystals. **Calcif Tissue Res**, 11:269-280, 1973.

KATAI, Y.; KAWASE, T.; NAKANO, T.; MIKUNI-TABAGAKI, Y.; SAITO, S. Effects of iprivaflone and estrogen on the differentiation and proliferation of osteogenic cells. **Calcif Tissue Int**, 51:11-15, 1992.

KIM,S.; LEE, M.; RHEE, M. Studies on the Effects of Biomedicinal Agents on Serum Concentration of  $Ca^{2+}$  , P and ALP Activity in Osteoporosis-Induced Rats. **J Vet Sci**, 4(2):151-154, 2003.

LANNA, C. M. M.; MONTENEGRO, R. M.; PAULA, F.J.A. Fisiopatologia da Osteoporose Induzida por Glicocorticóide. **Arq Bras Endocrinol Met**, 47(1):9-18, 2003.

LUCKMAN, S. P.; HUGHES, D. E.; COXON, F. P.; GRAHAM, R.; RUSSELL, G.; ROGERS, M. J. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including *Ras*. **J Bone Miner Res**, 13:581-589, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.;KELLEY, R.O. **Basic Histology**. 5.ed. Philadelphia: Prentice-Hall International Inc., 1986. 518 p.

MUNDY, G.R. Osteoporosis: pathophysiology and non-pharmacological management. **Best Pract & Res Clin Rheumatol**, 15(5):72-745, 2001a.

MUNDY, G.R. Statins and their potential for osteoporosis. **Bone**, 29(6):495-497, 2001b.

NOTOYA, K.; YOSHIDA, K.; TAKETOMI, S.; YAMAZAKI, I.; KUMEGAWA, M. Inhibitory effects of ipriflavone on osteoclast-mediated bone resorption and new osteoclast-mediated formation in long-term cultures of mouse unfractionated bone cells. **Calcif Tissue Int**, 53:206-209, 1993.

PASSERI, M.; BIONDI, D.; DALL'AGLIO, E.; PEDRAZONI, M.; BUFALINO, L.; CASTIGLIONE, G.N.; DI PEPPE, C.; ABATE, G. Effects of 2-year therapy with

ipriflavone in elderly women with established osteoporosis. **Ital J Min Electrolyte Metab**, 9:137-144, 1995.

POLO, R.G. Osteoporosis inducida por glicocorticóides. **An Sist Sanit Navar**, 3:63-80, 2003.

SANTOS, P.S. **Desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da osteoporose**. Viçosa: Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, 50p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária), 2004.

SARAIVA, G.L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 46(1):72-78, 2002.

SMITH, E. L.; HILL, R. L.; LEHMAN, I. R.; LEFKOWITZ, R. J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Bioquímica Mamíferos**, 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 620 p.

SUZUKI, Y.; ICHIKAWA, Y.; SAITO, E.; HOMMA, M.. Importance of increased urinary calcium excretion in the development of secondary hyperparathyroidism of patients under glucocorticoid therapy. **Metabolism**, 32:151-156, 1983.

VIEIRA, J.G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 43:415-422, 1999.

## **Artigo 2 - EFEITO DE TRATAMENTO COMBINADO DE ALENDRONATO DE SÓDIO, ATORVASTATINA CÁLCICA E IPRIFLAVONA NA OSTEOPOROSE INDUZIDA COM DEXAMETASONA EM RATAS**

### **RESUMO**

PINTO, Aloísio da Silva, D.S.; Universidade Federal de Viçosa; setembro de 2004; **Efeitos de Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica e Ipriflavona, Isoladamente e em Associação, na Osteoporose Induzida com Dexametasona.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Ricardo Junqueira Del Carlo e Tanus Jorge Nagem.

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência das combinações: bifosfonato (alendronato de sódio) + estatina (atorvastatina cálcica), bifosfonato (alendronato de sódio) + flavonóide (ipriflavona) e estatina (atorvastatina cálcica) + flavonóide (ipriflavona) em ratas com osteoporose induzida pelo glicocorticóide dexametasona.

As influências das associações dessas substâncias foram pesquisadas pela análise de testes dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea, tais como, cálcio e fósforo sérico, fosfatase alcalina óssea e por exames histomorfométricos, caracterizando a densidade trabecular óssea.

Os marcadores bioquímicos não apresentaram resultados estatisticamente significativos, não fornecendo subsídios para o diagnóstico e acompanhamento da osteoporose. No entanto, a avaliação histomorfométrica nos permite a análise estática e dinâmica, bem como detecção de alterações tissulares na unidade metabólica óssea, particularmente, no osso trabecular.

Através da avaliação da densidade trabecular óssea foi possível verificar o aumento da mesma em todos os tratamentos efetuados. Ressaltando-se, ainda, que as associações contendo alendronato de sódio apresentaram elevadas taxas de restauração tecidual óssea, alcançando valores superiores aos do grupo dos animais normais.

## ABSTRACT

PINTO, Aloísio da Silva, D.S.; Universidade Federal de Viçosa; September, 2004; **Effects of the Alendronate of Sodium, Atorvastatin Calcic and Ipriflavone, Isolated and Associated, in the Osteoporosis Induced with Dexamethasone.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee Members: Ricardo Junqueira Del Carlo and Tanus Jorge Nagem.

The objective of this work was study the influence of the combinations: biphosphonate (alendronate of sodium) + statin (calcic atorvastatin), biphosphonate (alendronate of sodium) + flavonoid (ipriflavone) and statin (calcic atorvastatin) + flavonoid (ipriflavone) in female rats with osteoporosis induced by the glucocorticoid dexamethasone.

The influence of the associations of those drugs was researched through tests of the biochemical markers of bony remodeling, such as, levels of calcium and phosphorus serum and bone alkaline phosphatase and through histomorphometric exam, being visualized the bone trabecular density.

The results obtained with biochemical markers were not statistic significant and did not allow subsidies for the diagnosis and accompaniment of the osteoporosis. However, the histomorphometric evaluation allowed us analysis of the static and dynamic as well as detection of tissue alterations in the bone metabolic unit, particularly in the trabecular bone.

Through the evaluation of the bone trabecular density it was possible to verify the clear increase in any group of treated animals. The associations with biphosphonate presented high rates of restoration tissue bone, reaching superior values than group of normals animal.

## 1 - INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma desordem metabólica do tecido ósseo, com perda de massa e redução da densidade, acompanhada por danos na microarquitetura, aumentando os riscos de fratura (LINDSAY, 1993), atingindo milhões de pessoas no mundo todo.

A forma mais comum de osteoporose ocorre em mulheres pós-menopausa (DEMPSTER e LINDSAY, 1993) com perda de precipitados do tecido ósseo por falha da função ovariana. Ocorre uma hiperprolactinemia e anorexia, quando acompanhados por disfunção ovariana (KLIBANSKI et al., 1980; BILLER et al., 1989; WARREN, 1992; SLEMENDA e JOHNSTON, 1993). Tratamentos à longo prazo com agonistas de GnRH, também causam perda óssea (RICO et al., 1993). Outros fatores de risco são: baixa absorção de cálcio, baixa atividade física, nicotina, álcool, maior ou menor consumo de cafeína, proteína animal e fosfato. A osteoporose está associada com baixa qualidade de vida, além de predisposição genética (BAYNES e DOMINICZAK, 2000).

Certas desordens metabólicas também podem aumentar o risco de osteoporose, incluindo artrite reumatóide e outras condições associadas com imobilidade crônica, esclerose múltipla, deficiência de vitamina D (COSMAN et al., 1993). O excesso de consumo de glicocorticóides determina perda de massa óssea, de forma potente e rápida em indivíduos susceptíveis (DEMPSTER, 1989; LUKERT e RAISZ, 1990). Altas doses de hormônio da tireóide podem estar associadas com diminuição de massa óssea (ETTINGER e WINGER, 1982). Outros agentes, incluindo diuréticos, anticonvulsivantes, antimetabólicos e altas doses de heparina por longos períodos podem determinar perda da massa óssea (DEMPSTER e LINDSAY, 1993).

Muitos estudos têm confirmado que o uso de estrógenos pós-menopausa reduz a remodelação óssea (LINDSAY, 1993). Pesquisas têm indicado que o tamoxifeno, um estrogênio não esteroide usado na terapia do câncer, se liga a receptores de estrogênio e pode ser usado em doses terapêuticas (TURKEN et

al., 1989; LOVE et al., 1992). No entanto, podem aumentar os riscos de câncer do endométrio (LINDSAY, 1993).

O uso de metabólitos de vitamina D na osteoporose é limitado, uma vez que pode ocorrer a hipercalciúria e hipercalcemia (GUYTON e HALL, 2002). Os receptores de vitamina D ativados, subseqüentemente translocados para o núcleo, ligam-se a elementos de resposta de receptores de vitamina D e agem como reguladores no fator de transcrição de osteocalcina e inibidores do ciclo celular.

A suplementação de cálcio no tratamento e prevenção da osteoporose pode ser mais efetiva no início da perda de massa óssea (DAVIS et al., 1995). Tem sido pesquisado também o uso de medroxiprogesterona, que tem alto efeito protetor sobre o sistema cardiovascular, mais do que estrógenos conjugados (LAFFERTY e FISKE, 1994). Há expectativas favoráveis quanto ao uso de compostos antagonistas – agonistas tecido específicos para proteger os efeitos dos estrógenos no tecido ósseo, como parece ser o raloxifeno ou droloxifeno (DRAPER et al., 1993; KE et al., 1995; SATO et al., 1995).

Os fluoretos, que podem ser incorporados como fluorapatitas, estimulam a formação óssea e aumentam a massa do tecido ósseo, mas há polêmicas quanto ao seu uso. Fluoreto produz osteomalácia, levando à formação da matriz, e subseqüente mineralização. Fluoreto de sódio aumenta o volume ósseo, um efeito devido especificamente à aumentada atividade osteoblástica (BAYLINK et al., 1970; BRIANCOM e MEUNIER, 1981).

As estatinas são os agentes mais efetivos e bem tolerados na terapia das dislipidemias. Estas drogas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que catalisa a etapa limitante na via da biossíntese de colesterol. A primeira estatina estudada em seres humanos foi a compactina, posteriormente renomeada mevastatina, (YAMAMOTO et al., 1984). Outras têm sido aprovadas, como a pravastatina e sinvastatina, que são derivadas quimicamente da lovastatina e, mais recentemente, atorvastatina, fluvastatina e cerivastatina, que são compostos sintéticos (MAHLEY e BERSOT, 2001).



As estatinas são bem toleradas, disponíveis para uso oral e estimulam a formação de quantidades substanciais de osso, aumentando as chances destas substâncias serem utilizadas no tratamento de pacientes com osteoporose.

As estatinas aumentam significativamente a taxa de formação óssea em animais, devido a seus efeitos promotores sobre o fator de crescimento BMP-2 (proteína morfogenética óssea-2), que conduz a diferenciação osteoblástica e a formação óssea. Ocorre aumento da transcrição do gene do BMP-2, sendo este o provável mecanismo responsável pelos seus efeitos (MUNDY, 2001).

Bifosfonatos são análogos sintéticos de pirofosfato caracterizados por ligações de P-C-P e são mais resistentes à hidrólise química e enzimática (HAMDY, 1993). Muitos compostos são criados e avaliados por alterar a cadeia lateral do átomo de carbono. Bifosfonatos ligam-se a cristais hidroxapatitas e acumulam-se no tecido ósseo (JUNG et al., 1973; FOGELMAN et al., 1981). Os bifosfonatos exercem efeitos de inibição da reabsorção osteoclástica e inibição da mineralização óssea (FLEICH et al., 1970; MEYER e NANCOLLAS, 1973). Os bifosfonatos preservam a massa óssea, agindo em diversos passos no processo de reabsorção óssea, com a inibição de crescimento de cristais de hidroxapatita que é responsável pelos efeitos não desejados na mineralização óssea. A ligação de bifosfonatos aos minerais do tecido ósseo leva à supressão da reabsorção óssea induzida por osteoclastos, tendo uma ação direta mediada por osteoblastos com atividade antiabsortiva (SAHNI et al., 1993; VITTE et al., 1996). Podem inibir diretamente múltiplas etapas na via do mevalonato para colesterol e lípidos isoprenóides tais como geranylgeranyl difosfato, que são requeridos para a prenilação de várias proteínas que são importantes para a função do osteoclasto (LUCKMAN et al., 1998).

Os bifosfonatos contendo nitrogênio como risedronato, alendronato, pamidronato e ácido zoledrônico e os não nitrogenados como clodronato e etidronato causam apoptose de osteoclastos de coelhos. A apoptose dos osteoclastos está envolvida em trocas morfológicas, perda da membrana

mitocondrial e na ativação de proteases caspase-3, capazes de clivar substratos peptídicos (BENFORD et al., 2001).

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os sistemas biológicos (PETERSON e DWYER, 1998).

Diversos ensaios vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonoídicos. Destacam-se as seguintes ações sobre os sistemas biológicos: atividade antioxidativa, antiinflamatória, antialérgica, antitumoral, hepatoprotetora, antiulcerogênica, antiplaquetária, vasodilatadora, bem como antimicrobiana e antiviral (MIDDLETON e KANDASWAMI, 1994; CHAN et al., 1998; PELZER et al., 1998; RATTY e DAS, 1998; NG et al., 2000). Pesquisas recentes demonstraram que alguns flavonóides atuam na inibição da replicação viral do agente causador da Síndrome da Imunodeficiência Humana – HIV (LIN et al., 1998). Atividades hipolipidêmicas e hipoglicemiantes dos flavonóides também têm sido avaliadas (PINTO et al., 1999; SANTOS et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2000; LIMA et al., 2001; NAGEM et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

Foi verificado que flavonóides previnem a perda de massa óssea em pacientes osteoporóticos e provoca decréscimo no turnover ósseo provocado por hipogonadismo (GAMBACCIANY et al., 1994). Efeitos favoráveis à remodelação óssea com diferenciação dos osteoblastos foram demonstrados por KATAI et al., (1992) e CHENG et al., (1994) e inibição da reabsorção óssea também foi observada (NOTOYA et al., 1993; ALBANESE et al., 1994). O mecanismo envolvido na ação modulatória em células do tecido ósseo parece ter atividade antiabsortiva (AZRIA et al., 1993; PASSERI et al., 1995).

Recentemente foi mostrado que flavonóide foi capaz de induzir aumento de massa óssea após tratamento de 12 meses em mulheres osteoporóticas e efetivo em prevenir perda óssea (CECCHETTIN et al., 1995).

Os glicocorticóides estão associados com perda óssea e subsequente aumento de fraturas em humanos. Um balanço negativo de cálcio devido a mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal é responsável pelo hiperparatireoidismo secundário em pacientes tratados com glicocorticóide (KLEIN et al., 1977; LUKERT e RAISZ, 1990; BIKLE et al., 1993; REID, 1997). Embora os mecanismos precisos permaneçam obscuros, a eliminação urinária aumentada de cálcio que ocorre em resposta ao glicocorticóide, provavelmente é uma conseqüência da reabsorção tubular diminuída (REID e IBBERTSON, 1987; REID, 1997).

Efeito estimulatório direto de glicocorticóides sobre a síntese e secreção de paratormônio tem sido observado in vitro: administração de dexametasona aumenta a secreção de hormônio de células bovinas em cultura de glândulas de paratireóide de rato (AU, 1976; SUGIMOTO et al., 1989).

Os estrógenos, bem como os andrógenos, têm mostrado inibir os osteoblastos de liberar fatores de estimulação local da osteoclastogênese. Todavia, diminuição na concentração desses hormônios na circulação aumenta a formação de precursores de osteoclastos no osso e, assim, o número de osteoclastos maduros (JILKA et al., 1992; WEINSTEIN et al., 2000). Concentrações baixas de esteróides sexuais na circulação em mulheres após a menopausa ou ovariectomizadas levam ao aumento da perda óssea. Entretanto, reposição hormonal pode prevenir essas mudanças. Na ausência de reposição hormonal, a osteoporose pode se desenvolver como um resultado de uma redução na formação óssea e estimulação na reabsorção óssea (SCHOT e SCHUURS, 1990; DUCY et al., 2000; WEINSTEIN et al., 2000). O efeito inibitório dos glicocorticóides sobre a síntese e secreção de hormônios sexuais contribui para a osteoporose induzida por glicocorticóides.

Os glicocorticóides modificam a atividade metabólica e proliferativa das células ósseas. Eles inibem a osteoblastogênese e osteoclastogênese e reduzem a meia vida dos osteoclastos. Eles também são potentes repressores da função osteoblástica e provavelmente estimuladores da maturação dos

osteoclastos. Em conjunto, estas mudanças conduzem à osteoporose, principalmente devido à formação óssea reduzida, já que o aumento na reabsorção óssea parece estar menos envolvido (PATTSCHAN et al., 2001).

Ratos têm sido recentemente usados como um modelo animal para estudos de osteoporose devido ao seu pequeno tamanho, facilidade de manipulação e por possuírem muitas características semelhantes a de humanos no que se refere ao tecido ósseo. Entretanto, estudos relativo a efeitos de glicocorticóides sobre os ossos de rato tem sido controversos. Estudos têm mostrado que, após tratamento com glicocorticóides, ratos apresentaram aumento na massa óssea, outros, de outro modo, observaram diminuição na massa óssea e outros mantiveram inalterada a massa óssea (THORNDIKE e TURNER, 1998).

## **2 - OBJETIVO**

Tendo em vista a busca de alternativas mais eficazes no controle e principalmente no tratamento da osteoporose estabelecida, o presente experimento foi idealizado na tentativa de tratar a osteoporose induzida por glicocorticóide através da combinação de bifosfonato + estatina, bifosfonato + flavonóide e estatina + flavonóide.

## **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento consistiu de um ensaio biológico onde se verificaram os efeitos das associações das substâncias bifosfonato (alendronato de sódio<sup>1</sup>), estatina (atorvastatina cálcica<sup>2</sup>) e flavonóide (ipriflavona<sup>3</sup>).

---

<sup>1</sup> Alendronato Monossódico Trihidratado em solução oral a 0,2mg/ml – Galena.

<sup>2</sup> Citalor® manipulado para a forma de suspensão oral a 1mg/ml – Pfizer

<sup>3</sup> Ipriflavona em suspensão oral a 25mg/0,3 ml – Galena

No desenvolvimento deste trabalho, foram utilizadas 120 ratas da raça Wistar, adultas, pesando aproximadamente  $250 \pm 20$ g de peso, procedentes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Após a chegada ao Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV – MG, os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas, contendo cada uma seis animais, em ambiente climatizado, com ciclo de claro-escuro de 12 horas, recebendo água e ração comercial Labcil<sup>4</sup>, *ad libitum*.

Nestas condições, após período de adaptação de sete dias, teve início o processo de indução da osteoporose, que consistiu na administração do glicocorticóide dexametasona<sup>5</sup>, por via intramuscular, na dose de 7 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas, nos animais de todos os grupos, à exceção dos animais que constituíram o grupo controle, denominado G1, que receberam solução de NaCl à 0,9%, via intramuscular.

Após o período de indução, os animais foram distribuídos, de forma aleatória, em cinco grupos de vinte e quatro, sendo: grupo controle (G1), que não foram submetidos à aplicação do corticosteróide dexametasona; grupo osteoporótico (G2), que receberam apenas dexametasona; grupo 3 (G3), que receberam a dexametasona e tratamento diário com alendronato de sódio na dose de 0,1mg/kg + atorvastatina cálcica na dose de 0,6 mg/kg ; grupo 4 (G4), que receberam a dexametasona e tratamento diário com alendronato de sódio na dose de 0,1mg/kg + ipriflavona na dose de 50mg/kg e, grupo 5 (G5), que receberam a dexametasona e tratamento diário com atorvastatina cálcica na dose de 0,6 mg/kg + ipriflavona na dose de 50mg/kg. Todas as substâncias foram administradas por via oral.

À partir da data de início do tratamento, aos 7, 14, 21 e 28 dias, seis animais de cada grupo foram anestesiados por administração, via intramuscular, de 0,1 ml da solução anestésica de cloridrato de tiletamina (25mg/mL) e cloridrato de zolazepam<sup>6</sup>(25mg/mL).

---

<sup>4</sup> Labcil®

<sup>5</sup> Azium Solução® - Schering-Plough S/A.

<sup>6</sup> Zoletil 50® - Virbac

Foram coletados, então, de cada animal, 5ml de amostra de sangue, por punção na veia cava caudal, com o objetivo de dosar os níveis séricos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea. Para a realização das dosagens de cálcio e fósforo, foi utilizado o equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica Alizé, bem como “kits” da marca BioMerieux. Já na dosagem da fosfatase alcalina óssea, utilizou-se do equipamento de quimioluminescência Access Immunoassay System da Beckman Coulter, assim como “kits” Ostase, específico para dosagem desta enzima, também da mesma indústria.

Logo após o sacrifício dos animais, procedeu-se a dissecação e foi coletado fêmur direito de cada animal, mantendo-se a região epifisária, sendo posteriormente colocado em formol tamponado à 10%, durante 72 horas para fixação e, posteriormente, descalcificado em solução de ácido fórmico/citrato de sódio, incluído em parafina e processado rotineiramente para estudo histológico em microscopia de luz.

Foram obtidos três cortes, de cada fêmur, de quatro micrômetros (4  $\mu$ m) de espessura em micrótomo histológico rotativo (Spencer, Modelo 820) dotado de navalha descartável. Estes cortes foram obtidos de forma seriada, montados sobre lâmina de vidro e corados com hematoxilina e eosina no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV.

Para cálculo da densidade ocupada por osso trabecular, foi obtida uma imagem amostral de osso trabecular, contida na região subcondral, de cada corte histológico, em microscópio óptico equipado com câmara digital (TCL-984 P). Estas imagens foram analisadas em monitor de microcomputador de 14 polegadas, com aumento final de 50 vezes. Uma graticula composta por 494 interseções, distando 1cm cada uma, foi aplicada sobre a imagem, sendo uma área de 100 interseções isolada para a mensuração. Estas interseções foram computadas como pontos coincidentes à trabecula óssea ou ao espaço intertrabecular. Realizou-se 3 repetições, sendo, assim, para cada animal, computados um total de 300 pontos, perfazendo, portanto, 1800 pontos por grupo de 6 animais de cada tratamento. Desta forma, obteve-se o percentual da densidade trabecular óssea dos animais experimentais.

O ensaio biológico foi realizado segundo delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos em 6 repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste F ( $p < 0,05$ ). Os grupos controle (G1 e G2) foram comparados entre si por meio do teste F. Os grupos tratados (G3, G4 e G5) foram comparados entre si através do teste de Tukey à 5% de probabilidade. As comparações também foram realizadas entre os grupos tratados e os controles G1 e G2, sendo que, para o mesmo, foi aplicado o teste de Dunnet à 5% de probabilidade.

#### **4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na tabelas 1 e 2 encontram-se, respectivamente, os valores médios dos níveis de cálcio e fósforo séricos, ambos expressos em mg/dL, e suas variações em relação ao grupo controle (G1) e ao grupo osteoporótico (G2). A análise dos resultados mostra que, durante todo o experimento, tanto nos níveis de cálcio como nos de fósforo sérico, não ocorreram variações estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, assim como em relação ao grupo osteoporótico. Podemos verificar ainda que os grupos tratados (G3, G4 e G5) não obtiveram variações significativas quando comparados entre si.

Conforme citado por GUYTON e HALL (2002), os níveis séricos de cálcio e fósforo devem ser avaliados conjuntamente, visto que as concentrações de um influenciam diretamente as do outro. O cálcio possui um mecanismo de regulação fisiológica, que estreita os limites do seu nível plasmático, não permitindo variações além de 2,4 mmol/L, onde qualquer tentativa de alterações da concentração plasmática deste íon é corrigida dentro de minutos à horas, o que é feito em grande parte pelo hormônio paratireóide.

**Tabela 1** - Valores médios de cálcio sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Cálcio mg/dL		Varição % em relação G1	Varição % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	13,65 A	± 0,42	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,80 A	± 0,65	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato + Atorvastatina	13,67 a	± 0,58	0,12	-0,97
	G4 Glicocorticoide + Alendronato + Ipriflavona	13,98 a	± 0,43	2,42	1,30
	G5 Glicocorticoide + Atorvastatina + Ipriflavona	13,78 a	± 0,66	0,95	-0,14
14 Dias	G1 Controle	13,37 A	± 0,37	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,05 A	± 0,19	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato + Atorvastatina	13,17 a	± 0,26	-1,50	0,89
	G4 Glicocorticoide + Alendronato + Ipriflavona	13,45 a	± 0,55	0,60	3,06
	G5 Glicocorticoide + Atorvastatina + Ipriflavona	13,40 a	± 0,58	0,22	2,68
21 Dias	G1 Controle	13,00 A	± 0,42	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,22 A	± 0,82	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato + Atorvastatina	13,37 a	± 0,66	2,84	1,13
	G4 Glicocorticoide + Alendronato + Ipriflavona	13,62 a	± 0,47	4,74	3,03
	G5 Glicocorticoide + Atorvastatina + Ipriflavona	12,93 a	± 0,67	-0,51	-2,14
28 Dias	G1 Controle	13,65 A	± 0,44	-----	-----
	G2 Glicocorticoide	13,60 A	± 0,43	-----	-----
	G3 Glicocorticoide + Alendronato + Atorvastatina	13,02 a	± 0,65	-4,62	-4,29
	G4 Glicocorticoide + Alendronato + Ipriflavona	13,20 a	± 0,38	-3,27	-2,94
	G5 Glicocorticoide + Atorvastatina + Ipriflavona	13,25 a	± 0,57	-2,93	-2,57

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05)  
 Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)



**Tabela 2** - Valores médios de fósforo sérico em mg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Fósforo mg/dL			Variação % em relação G1	Variação % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	7,93 A	±	0,748	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	8,12 A	±	0,461	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	7,88 a	±	0,825	-0,63	-2,95
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	7,96 a	±	0,887	0,38	-1,95
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	8,00 a	±	0,651	0,82	-1,52
14 Dias	G1 Controle	7,22 A	±	0,606	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,58 A	±	0,272	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	7,48 a	±	0,625	3,67	-1,32
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	7,49 a	±	0,665	3,74	-1,19
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	7,31 a	±	1,041	1,25	-3,56
21 Dias	G1 Controle	7,49 A	±	0,481	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,69 A	±	0,682	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	7,45 a	±	0,475	-0,53	-3,12
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	7,47 a	±	0,74	-0,24	-2,90
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	7,38 a	±	0,384	-1,47	-4,03
28 Dias	G1 Controle	7,70 A	±	0,582	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	7,37 A	±	0,645	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	7,65 a	±	0,423	-0,65	-3,80
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	7,35 a	±	0,346	-4,54	-0,27
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	7,61 a	±	0,356	-1,17	3,25

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05)  
 Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

Segundo MOTTA (2003), na osteoporose não são encontradas alterações dos níveis séricos de cálcio e fósforo. Estudos realizados por CECCHETTIN et al. (1995), também não encontraram diferenças significantes nos níveis séricos de cálcio ou fósforo durante o tratamento da osteoporose de mulheres na pós-menopausa.

Os valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO), mostrados na tabela 3, não apresentaram variações significativas estatisticamente entre os grupos

controle (G1) e osteoporótico (G2) e também entre os grupos tratados entre si e entre os tratados e os grupos G1 e G2, respectivamente.

**Tabela 3** - Valores médios de fosfatase alcalina óssea (FAO) em pg/dL e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	FAO pg/dL		Varição % em relação G1	Varição % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	0,04 A	± 0,018	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,05 A	± 0,026	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	0,06 a	± 0,009	48,18	15,63
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	0,06 a	± 0,025	52,19	18,75
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	0,06 a	± 0,017	48,78	16,10
14 Dias	G1 Controle	0,04 A	± 0,018	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,04 A	± 0,02	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	0,06 a	± 0,021	48,53	51,32
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	0,06 a	± 0,013	48,66	51,45
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	0,05 a	± 0,012	23,33	25,64
21 Dias	G1 Controle	0,05 A	± 0,022	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,06 A	± 0,024	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	0,05 a	± 0,031	-8,07	-21,58
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	0,04 a	± 0,026	-27,66	-38,29
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	0,04 a	± 0,014	-20,67	-32,33
28 Dias	G1 Controle	0,06 A	± 0,02	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	0,06 A	± 0,019	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	0,05 a	± 0,021	-17,01	-10,58
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	0,06 a	± 0,029	-5,32	2,02
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	0,05 a	± 0,025	-25,57	-19,79

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05)

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

A fosfatase alcalina óssea é o marcador de formação óssea mais freqüentemente utilizado (BIKLE, 1997; VIEIRA, 1999,). A FAO é uma isoforma da fosfatase alcalina total (FA), que apesar da semelhança estrutural com essa, pode ser detectada através de imunoenaios específicos, apresentando baixa reação cruzada. A medida da isoforma ósseo-específica tem vantagens sobre a FA, uma

vez que além de não sofrer influências hepáticas, é mais sensível a pequenas variações no *pool* circulante.(SARAIVA e CASTRO, 2002).

Além da não significância estatística, os valores médios de FAO, em todos os grupos, no presente estudo, estiveram abaixo da curva de calibração, sugerindo que ocorreu reação de identidade parcial entre antígeno e anticorpo (HOLME e PECK, 1998). Apesar da não significância no presente ensaio, KIM et al. (2003) encontraram diferenças significativas de valores médios de FAO entre ratas normais, osteoporóticas e osteoporóticas tratadas.

Os resultados da densidade trabecular óssea, que caracteriza o estado metabólico que se encontra o tecido ósseo dos animais experimentais, são apresentados na tabela 4. Segundo JUNQUEIRA et al. (1986), o estudo histomorfométrico determina com elevado grau de acuidade, o remodelamento ósseo, precisando a extensão da perda óssea e das taxas de calcificação e de formação do tecido ósseo e, assim, capacita para identificar o estado osteoporótico do osso.

Segundo os valores percentuais de densidade trabecular óssea mostrados, o grupo G2 (osteoporótico), tratado apenas com o glicocorticóide dexametasona, apresenta diminuição de valores médios que foram estatisticamente significativos, quando comparados com aqueles do grupo controle G1, em todos os períodos avaliados, demonstrando, assim, indução osteoporótica com o tratamento instituído.

Aos sete dias de tratamento, os valores percentuais dos grupos tratados, G3 com bifosfonato + estatina, G4 com bifosfonato e flavonóide e G5 com estatina e flavonóide, encontravam-se diminuídos, apresentando significação estatística em relação ao grupo controle G1, demonstrando que o tratamento prévio com o glicocorticóide tinha induzido a baixa densidade óssea e, neste período, os tratamentos não a tinham modificado.

Observa-se aos 14 dias que todos os tratamentos efetuados mostram valores positivos de densidade, que os diferenciam significativamente do grupo G2, sendo que, neste período, já se percebe uma destacada eficácia das associações bifosfonato + estatina (G3) com 35,15% de variação e,

principalmente, de bifosfonato + flavonóide (G4) que apresentou 57,77% em relação ao grupo osteoporótico. Este último grupo, o G4, já apresenta, neste período, valor de densidade trabecular óssea superior àquele do grupo controle (G1), estatisticamente significativo.

**Tabela 4** - Valores médios de densidade trabecular óssea em pontos percentuais e percentual de variação em relação ao grupo controle G1 e ao grupo osteoporótico G2 de ratas submetidas a diferentes tratamentos e avaliadas nos respectivos períodos.

Período	Grupo/Tratamento	Dens %	Varição % em relação G1	Varição % em relação G2
7 Dias	G1 Controle	60,00 A ± 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	43,78 B ± 0,509	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	33,11 b ± 4,671	-44,81*	-24,37**
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	44,78 a ± 5,419	-25,37*	2,28
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	40,89 ab ± 1,262	-31,85*	-6,60
14 Dias	G1 Controle	59,80 A ± 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	40,78 B ± 1,895	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	55,11 b ± 2,009	-7,84*	35,15**
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	64,33 a ± 1	7,57*	57,77**
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	44,67 c ± 3,215	-25,30*	9,54**
21 Dias	G1 Controle	61,02 A ± 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	37,00 B ± 1,155	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	64,33 b ± 2	5,42*	73,87**
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	70,00 a ± 0,333	14,72*	89,19**
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	46,44 c ± 2,715	-23,89*	25,53**
28 Dias	G1 Controle	61,58 A ± 2,603	-----	-----
	G2 Glicocorticóide	41,56 B ± 2,269	-----	-----
	G3 Glicocorticóide + Alendronato + Atorvastatina	77,11 a ± 2,795	25,22*	85,56**
	G4 Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona	81,44 a ± 3,835	32,25*	95,99**
	G5 Glicocorticóide + Atorvastatina + Ipriflavona	52,56 b ± 1,018	-14,65*	26,47**

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra maiúscula diferente, diferem entre si pelo teste F (P<0,05)

Em cada período, médias seguidas de pelo menos uma letra minúscula diferente, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

\*Estatisticamente diferente do controle pelo teste de Dunnet (P< 0,05) em cada período.

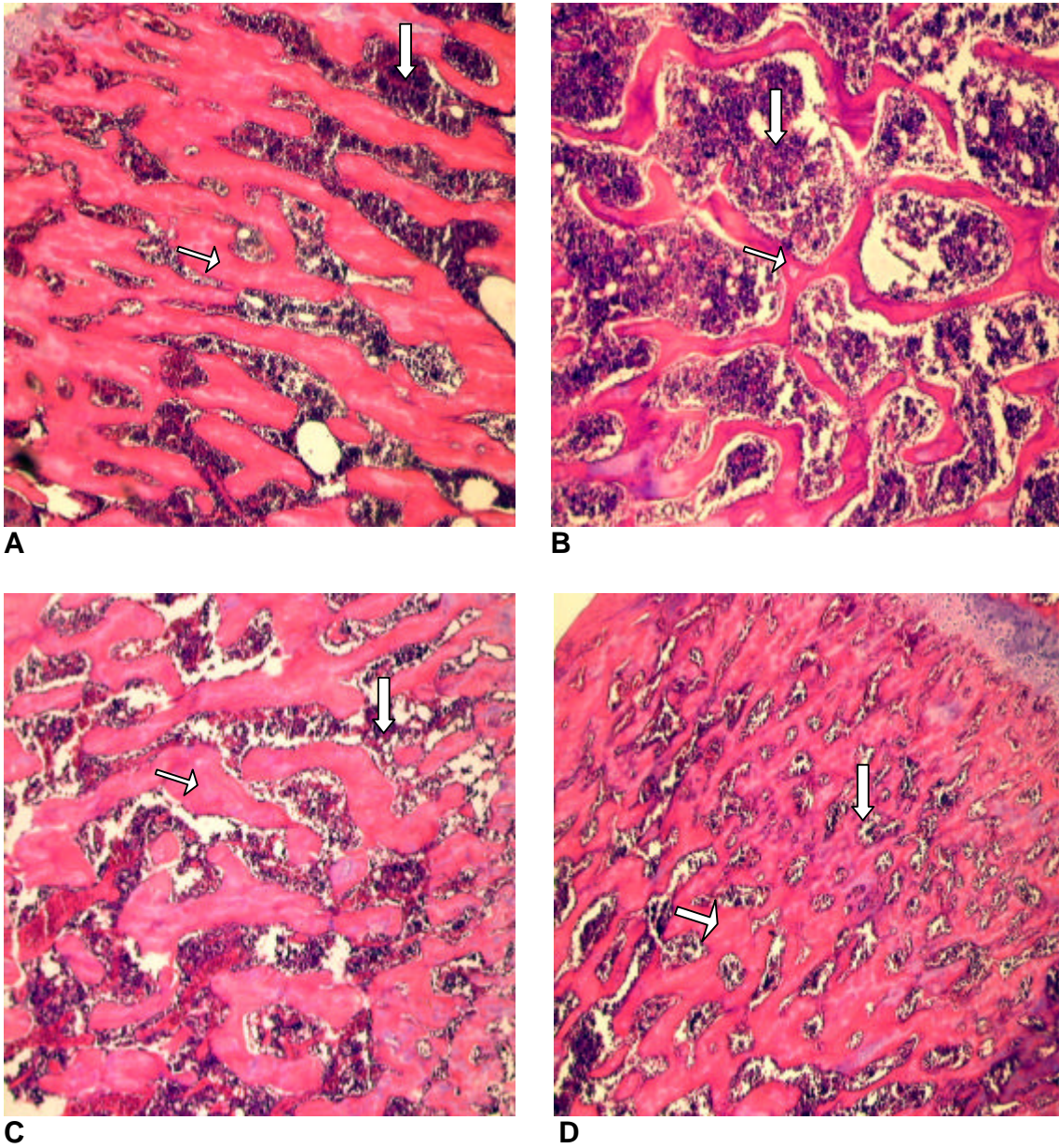
\*\*Estatisticamente diferente do grupo G2 pelo teste de Dunnet (P< 0,05) em cada período.

Os resultados mostrados no período de 21 dias revelam que, além do grupo G4, também o grupo G3 apresenta valor acima daquele mostrado para o

grupo controle G1. Em relação ao grupo G2, as variações percentuais positivas são da ordem de 73,87% do grupo G3 e de 89,19% do grupo G4. O grupo G5, tratado com estatina + flavonóide, neste período, apresenta diferença significativa de 25,53% em relação ao grupo G2, mas o valor (-23,89%), ainda é inferior ao do grupo controle G1.

Quando se observam os resultados obtidos no período de 28 dias, o grupo G5, praticamente, mantém o valor alcançado no período anterior (26,47%) em relação ao grupo G2, mas inferior, ainda, ao do grupo G1 (-14,65%). Porém, os valores de densidade trabecular óssea obtidos com os tratamentos efetuados nos grupos G4 e G5 são altamente positivos. Em relação ao G1, grupo de animais normais, a diferença percentual positiva foi de 25,22% para o grupo G3 e de 32,25% para o grupo G4. Outrossim, quando se compara com o grupo G2, osteoporótico, a diferença percentual do grupo G3 é de 85,56% e do grupo G4 é de 95,99%.

A Figura 1 apresenta cortes histológicos da região do terço proximal do fêmur direito dos animais, onde se observa diminuição trabecular óssea, identificada principalmente pela menor espessura das trabéculas ósseas no grupo osteoporótico (Fig.1B) e, em contraste, uma maior área de medula óssea neste grupo, em relação ao grupo controle (Fig. 1A). Quanto aos grupos tratados, foi observado que aos 14 dias (Fig. 1C), no grupo que recebeu alendronato de sódio + ipriflavona, a espessura das trabéculas ósseas foi significativamente maior, ainda sendo permitido a observação de espaços intertrabeculares, preenchidos pela medula óssea. Aos 28 dias de tratamento (Fig. 1D), observou-se que a densidade trabecular óssea foi maior que aos 14 dias, em contraste com menores espaços intertrabeculares, preenchidos por medula óssea, cuja evolução a tornou significativamente superior àquela observada nos animais do grupo controle (Figs. 1D e 1A), ratificada pelos valores médios de densidade trabecular óssea indicados na Tabela 4.



**Figura 1** – Osso esponjoso (trabecular) do terço proximal de fêmur de ratas. HE.100X. **A**, Grupo Controle (G1). **B**, Grupo Osteoporótico (G2), (Glicocorticóide). **C**, Grupo Tratado 14 Dias (G4), (Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona). **D**, Grupo Tratado 28 Dias (G4), (Glicocorticóide + Alendronato + Ipriflavona). Seta Larga – região medular óssea. Seta Estreita – trabécula óssea.

A terapia de combinação possui considerável aceitação como um meio de aumentar os benefícios do tratamento em pacientes com doenças crônicas. Assim, combinações de drogas são freqüentemente usadas para tratar hipertensão arterial, diabetes mellitus não dependente de insulina ou artrite reumatóide. Em osteoporose, poucos dados estão disponíveis para regimes de combinações e avaliações seguras têm sido confiadas em densidade mineral óssea (DMO) usada como um marcador, ao contrário do que em resultados clínicos. Prudência, por conseguinte, é a postura que deve ser adotada, quando tiver de interpretar dados sobre este procedimento terapêutico (COSMAN et al., 2001).

À exceção de suplementos de cálcio e vitamina D, os quais são usualmente dados para pacientes de grupo-placebo em experimentos terapêuticos de larga escala, existe uma forte razão teórica para combinar um inibidor de reabsorção óssea e um que aumente a formação óssea. Todavia, dados sobre este propósito são débeis e os resultados de recentes estudos são desapontadores (BLACK et al., 2003). A maioria dos estudos tem focalizado sobre combinações de inibidores de reabsorção óssea (CORTET, 2004).

A combinação de um bifosfonato com a terapia de substituição hormonal pode parecer sem importância, visto que estes dois tratamentos têm similares mecanismos de ação sobre o osso. Contudo, o sítio de ação, provavelmente, não é o mesmo (CORTET, 2004).

Os primeiros estudos de WIMALAWANSA (1995) investigaram etidronato com estrógeno. Quando usados para prevenir perda óssea pós-menopausa, este bifosfonato dado em combinação com o estrógeno por 4 anos aumentou a massa óssea na espinha lombar em 10,9%, enquanto cada tratamento isolado aumentou 6,8%. O mesmo pesquisador obteve resultados similares em um estudo de etidronato e estrógeno em mulheres com osteoporose. Além disso, o número de fraturas vertebrais foi mais baixo com tratamento associado do que com as drogas usadas isoladamente. Em outro estudo com 51 mulheres osteoporóticas, foi achado que o etidronato combinado com a terapia de reposição hormonal por 18

meses produziu 3,8% de aumento na massa óssea, quando comparado com somente 1,2% após 18 meses de etidronato sozinho. No entanto, a diferença não foi significativa estatisticamente (CORTET et al., 2001).

Um estudo de alendronato em combinação com o estrógeno, em mulheres por um período de um ano, constatou um ganho ósseo significativo (LINDSAY et al., 1999). BONE et al. (2000) verificaram que o tratamento simultâneo de alendronato com estrogênio foi mais efetivo do que as substâncias isoladas, após 2 anos de terapia, sendo o ganho em densidade mineral óssea de 8,3% versus 6% e 6%, respectivamente.

No presente trabalho, por sua vez, as associações utilizadas alendronato + atorvastatina, alendronato + ipriflavona e atorvastatina + ipriflavona causaram ganho em densidade mineral óssea estatisticamente significativo, porém, com valores da ordem de até 95,99%.

## **5 - CONCLUSÕES**

Os marcadores bioquímicos cálcio e fósforo sérico e a fosfatase alcalina óssea não apresentaram resultados que determinasse o diagnóstico da osteoporose, bem como a avaliação das alterações de remodelação óssea.

A histomorfometria e a histopatologia, no entanto, permitiu análise estática e dinâmica, bem como detecção de alterações tissulares na unidade metabólica óssea, particularmente, no osso trabecular.

Através da análise da densidade trabecular óssea, foi possível constatar o sucesso da indução da osteoporose pelo glicocorticóide, bem como acompanhar o processo de evolução do tecido ósseo provocado pelas associações dos fármacos.

Todas as combinações testadas apresentaram efeitos positivos nos animais osteoporóticos. Outrossim, devemos destacar a maior eficácia das associações realizadas com o bifosfonato alendronato de sódio, que apresentaram



restauração da densidade do tecido trabecular ósseo, cujos valores foram superiores, inclusive, aos dos animais normais.

Os resultados demonstraram, portanto, a capacidade desses tratamentos, não só, na preservação, mas também, na restauração do tecido ósseo. Assim, a possível utilização dessas combinações de drogas durante o tratamento prolongado com glicocorticóide ou no tratamento da osteoporose estabelecida, parece bastante promissora. Entretanto, estudos das dosagens, interações, biodisponibilidades, além dos efeitos toxicológicos dessas substâncias farmacológicas, à longo prazo, fazem-se necessários.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANESE, C.B.; CUDD, A.; ARGENTINO, L.; ZAMBONIN-ZALLONE, A.; MACINTYRE, I. Ipriflavone directly inhibits osteoclasts activity. **Biochem Biophys Res Commun**, 199:930-936, 1994.

AU, W.Y. Cortisol stimulation of parathyroid hormone secretion by rat parathyroid glands in organ culture. **Science**, 193(4257):1015 -1017, 1976.

AZRIA, M.; BEHHAR, C.; COOPER, S.; LAC, K. Effect of ipriflavone on osteoclasts motility and resorption in vitro in vivo studies. **Calcif Tissue Int**, 52:16-20, 1993.

BAYLINK, D.J.; WERGEDAL, J.E.; STAUFFER, M.; RICH, C. Effect of fluoride on bone formation, mineralization, and resorption in the rat. In: VISCHER, T.L., (Ed.) **Fluoride and Medicine**, Hans Huber, Bern, 1970, p.37-69.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica Médica**, São Paulo, Editora Manole 2000. 565 p.

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

BIKLE, D.D. Biochemical markers in the assessment of bone disease. **Am J Med**, 103:427-436, 1997.

BIKLE, D.D.; HALLORAN, B.; FONG, L.; STEINBACH, L.; SHELLITO, J. Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone. **J Clin Endocrinol Metab**, 76(2):456-461, 1993.

BILLER, B.M.K.; SAKE, V.; HERZOG, D.B.; ROSENTHAL, D.I.; HOLZMAN, S.; KLIBANSKI, A. Mechanisms of osteoporosis in adult and adolescent women with anorexia nervosa. **J Clin Endocrinol Metab**, 68:548-554, 1989.

BLACK, D.M.; GREESPAN, S.L.; ENSRUD, K.E.; PALERMO, L.; MCGOWAN, J.A. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. **N Engl J Med**, 349:1207-1215, 2003.

BONE, H.G.; GREESPAN, S.L.; MCKEEVER, C.; BELL, N.; DAVIDSON, M.; DOWNS, R.W. Alendronate and estrogen effects in postmenopausal women with low bone mineral density. **J Clin Endocrinol Metab**, 85:720-726, 2000.

BRIANCON, D.; MEUNIER, P.J. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium, and vitamin D. **Orthop Clin North Am**, 12:629-648, 1981.

CECCHETTIN, M.; BELLOMETTI, S.; CREMONESI, G.; SOLIMENO, L.P.; TORRI, G. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. **Biomed & Pharmacother**, 49:465-468, 1995.

CHAN, S.C.; CHANG, Y.S.; WANG, J.P.; CHEN, S.C.; KUO, S.C. Three new flavonoids and antialergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. **Planta Medica**, 64:153-158, 1998.

CHENG, S.L.; ZHANG, S.F.; NELSON, T.L.; WARLOW, P.M.; CIVITELLI, R. Stimulatory of human osteoblasts differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. **Calcif Tissue Int**, 55:356-362, 1994.

CORTET, B. Combination therapy for osteoporosis. **J B Spin**, 71:363-364, 2004.

CORTET, B.; BÉRA-LOUVILLE, A.; GAUTHIER, P.; GAUTHIER, A.; MARCHANDISE, X.; DELCAMBRE, B. Comparative efficacy and safety study of etidronate and alendronate in postmenopausal osteoporosis. Effect of adding hormone replacement therapy. **J B Spin**, 68:410-415, 2001.

COSMAN, F.; NIEVES, J.; GORDON, S.; SHEN, V.; HERBERT, J.; LINDSAY, R. High dose IV steroids acutely depress serum phosphorus and elevate 1,25 (OH) 2D prior to an increase in PTH. **J Bone Miner Res**, (Suppl 1):168, 1993.

COSMAN, F.; NIEVES, J.; WOELFERT, L.; FORMICA, C.; GORDON, S.; SHEN, V. Parathyroid hormone added to established hormone therapy: effects on vertebral fracture and maintenance of bone mass after parathyroid hormone withdrawal. **J Bone Miner Res**, 16:925-931, 2001.

DAVIS, J.W.; ROSS, P.D.; WASNICH, R.D. A longitudinal study of estrogen and calcium supplement use among Japanese women living in Hawaii. **Prev Med**, 24:159-165, 1995.

DEMPSTER, D.W. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. **J Bone Miner Res**, 4:137-141, 1989.

DEMPSTER, D.W.; LINDSAY, R. Pathogenesis of osteoporosis. **Lancet**, 341:797-801, 1993.

DRAPER, M.W.; FLOWERS, D.E.; HUSTER, W.J.; NEILD, J.S. Effects of raloxifene (ly 139481 HCl) on biochemical markers of bone and lipid metabolism in health postmenopausal women. **4th Inter Symposium on Osteoporosis**, Hong Kong, 119-121, 1993.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, 289(5484):1501-1504, 2000.

ETTINGER, B.; WINGER, J. Thyroid supplements: Effect on bone mass. **West J Med**, 136:472-476, 1982.

FLEISCH, H.; RUSSEL. R.G.G.; BISAZ, S.; MUHLBAUER, R.C.; WILLIAMS, D.A. The inhibitory effect of diphosphonates on the formation of calcium phosphate crystal in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. **Eur J Clin Invest**, 1:12-18, 1970.

FOGELMAN, I.; PEARSON, D.W.; BESSENT, R.G.; TOFE, A.J.; FRANCIS, M.D.A. comparison of skeletal uptake of three diphosphonates by whole body retention. **J Nucl Med**, 22:880-883, 1981.

GAMBACCIANY, M.; SPINETTI, A.; PIAGGESI, L.; CAPPAGLI, B.; TAPONCO, F.; MANETTI, P.; WEISS, C.; TETEI, G.C.; LA COMMARE, P.; FACCHINI, V. Ipriflavone prevents the bone loss mass reduction in premenopausal women treated with gonadotropin hormone-releasing hormone agonists. **Bone Liner**, 26:19-26, 1994.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973p.

HOLME, D.J.; PECK, H. **Analytical Biochemistry**. Singapore, Longman Singapore Publishers, 1998. 488p.

JILKA, R.L.; HANGOC, G.; GIRASOLE, G.; PASSERI, G.; WILLIAMS, D.C.; ABRAMS, J.S.; BOYCE, B.; BROXMEYER, H.; MANOLAGAS, S.C. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. **Science**, 257(5066):88-91, 1992.

JUNG, A.; BISAZ, S.; FLEISCH, H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates on hydroxyapatite crystals. **Calcif Tissue Res**, 11:269-280, 1973.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R.O. **Basic Histology**. 5.ed. Philadelphia: Prentice-Hall International Inc., 1986. 518 p.

KATAI, Y.; KAWASE, T.; NAKANO, T.; MIKUNI-TABAGAKI, Y.; SAITO, S. Effects of iprivaflone and estrogen on the differentiation and proliferation of osteogenic cells. **Calcif Tissue Int**, 51:11-15, 1992.

KE, H.Z.; SIMMONS, H.A.; PIRIE, C.M.; CRAWFORD, D.T.; TOMPSON, D.D. Droloxifene, a new estrogen antagonist/agonist, prevents bone loss in ovariectomized rats. **Endocrinology**, 136:2435-2441, 1995.

KIM, S.; LEE, M.; RHEE, M. Studies on the effects of biomedical agents on serum concentration of Ca<sup>2+</sup>, P and ALP activity in osteoporosis-induced rats. **J Vet Sci**, 4(2):151-154, 2003.

- KLEIN, R.G.; ARNAUD, S.B.; GALLAGHER, J.C.; DELUCA, H.F.; RIGGS, B.L. Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisonism. Role of 25-hydroxyvitamin D and corticosteroid dose. **J Clin Invest**, 60(1):253-259, 1977.
- KLIBANSKI, A.; NEER, R.M.; BEITINS, I.Z.; RIDGWAY, E.C.; ZERVAS, N.T.; McARTHUR, J.W. Decreased bone density in amenorrheic hyperprolactinemic women. **N Engl J Med**, 303:1511-1514, 1980.
- LAFFERTY, F.W.; FISKE, M.E. Postmenopausal estrogen replacement: a long-term cohort study. **Am J Med**, 97:66-77, 1994.
- LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J. F. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Braz J Vet Res An Sci**, 38(4):196-200, 2001.
- LIN, M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M.T.; PAI, Y.S. In vitro anti-HIV activity of bioflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garciana multiflora*. **J Nat Prod**, 60:884-888, 1998.
- LINDSAY R. Prevention and treatment of osteoporosis. **Lancet**, 341:801-805, 1993.
- LINDSAY, R.; COSMAN, F.; LOBO, R.A.; WALSH, B.W.; HARRIS, S.T.; REAGAN, J.E. Addition of alendronate to ongoing hormone replacement therapy in the treatment of osteoporosis: a randomized, controlled clinical trial. **J Clin Endocrinol Metab**, 84:3076-3081, 1999.
- LOVE, R.R.; MAZESS, R.B.; BARDEN, H.S.; ESPTEIN, S.; NEWCOMB, P.A.; JORDAN, V.C.; CARBONE, P.P.; DEMETS, D.L. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. **N Engl J Med**, 326:852-856, 1992.
- LUCKMAN, S.P.; HUGHES, D.E.; COXON, F.P.; GRAHAM, R.; RUSSELL, G.; ROGERS, M.J. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including *Ras*. **J Bone Miner Res**, 13:581-589, 1998.
- LUKERT, B.P.; RAISZ, L.G. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. **Ann Intern Med**, 112(5):352-364, 1990.
- MAHLEY, R.W.; BERSOT, T.P. Drug therapy for hypercholesterolemia and dyslipidemia. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Eds.) **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p.971-1002.

MEYER, J.L.; NANCOLLAS, G.H. The influence of multidentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxiapatite. **Calcif Tissue Res**, 13: 295-303, 1973.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBONE, J. B. (Ed.) **The flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1994. p619-645.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica para Laboratório: Princípios e interpretações**. 4.ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003. 419p.

MUNDY, G.R. Statins and their potential for osteoporosis. **Bone**, 29(6):495-497, 2001.

NAGEM, T.J.; PEREIRA, W.L.; OLIVEIRA, T.T.; PINTO, A.S.; PINTO, J.G. Kaempherol e antocianina: redutores de lipídeos em ratos. **Rev Port Farm**, 51(3):127-131, 2001.

NG, T.B.; LIU, F.; WANG, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sci**, 66(8):709-723, 2000.

NOTOYA, K.; YOSHIDA, K.; TAKETOMI, S.; YAMAZAKI, I.; KUMEGAWA, M. Inhibitory effects of ipriflavone on osteoclast-mediated bone resorption and new osteoclast-mediated formation in long-term cultures of mouse unfractionated bone cells. **Calcif Tissue Int**, 53:206-209, 1993.

OLIVEIRA, T.T.; PEREIRA, W.L.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; SANTOS, C.A. Efeito regulatório de flavonóides e de carmim nos níveis de lipídeos em ratos Wistar. **Arq Bras Med Vet Zoot** 54(1):24-28, 2002.

OLIVEIRA, T.T.; SANTOS, K.F.R.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; COSTA, N.M.B. Efecto de los flavonoides y compuestos colorantes naturales em la reduccion de los niveles de los lipidos sericos. **Soc Arg Sanid Fuerz Arm**, 2(1):48-55, 2000.

PASSERI, M.; BIONDI, D.; DALL'AGLIO, E.; PEDRAZONI, M.; BUFALINO, L.; CASTIGLIONE, G.N.; DI PEPPE, C.; ABATE, G. Effects of 2-year therapy with ipriflavone in elderly women with established osteoporosis. **Ital J Min Electrolyte Metab**, 9:137-144, 1995.

PATSCHAN, D.; LODDENKEMPER, K.; BUTTGEREIT, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Bone**, 29(6):498-505, 2001.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A.O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. **H Farmaco**, 53:421-424, 1998.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nut Res**, 18(12):1995-2018, 1998.

PINTO, A.S.; PEREIRA, W.L.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; COSTA, N.M.B.; STRINGHETA, P.C. Sinergismo de kaempherol e corantes naturais antocianina e carmim no controle do metabolismo lipídico. **Rev Port Farm**, 49(4):147-152, 1999.

RATTY, A.K.; DAS, P.N. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochem Med Metab Biol**, 39:69-79, 1998.

REID, I.R. Glucocorticoid osteoporosis-mechanisms and management. **Eur J Endocrinol**, 137(3):209-217, 1997.

REID, I.R.; IBBERTSON, H.K. Evidence for decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. **Horm Res**, 27(4):200-204, 1987.

RICO, H.; ARNANZ, F.; REVILLA, M.; PERERA, S.; IRÍTIA, M.; VILLA, L.F.; ARRÍBAS, I. Total and regional bone mineral content in women treated with GnRH agonists. **Calcif Tissue Int**, 52:354-357, 1993.

SAHNI, M.; GUENTHER, H.L.; FLEISCH, H.; MARTIN, T.J. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. **J Clin Invest**, 91:2004-2011, 1993.

SANTOS, K.F.R.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; OLIVEIRA, M.G.A. Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. **Pharmacol Res**, 40(6):493-496, 1999.

SARAIVA, G.L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 46(1):72-78, 2002.

SATO, M.; KIM, J.; SHORT, L.L.; SLEMENDA, C.W.; BRYANT, H.U. Longitudinal and cross-sectional analysis of raloxifene effects on tibiae from ovariectomized aged rats. **J Pharmacol Exp Ther**, 272:1252-1259, 1995.

SCHOT, L.P.; SCHUURS, A.H. Sex steroids and osteoporosis: effects of deficiencies and substitutive treatments. **J Ster Biochem Mol Biol**, 37(2):167-182, 1990.

SLEMENDA, C.W.; JOHNSTON, C.C. High intensity activities in young women: Site specific bone mass effects among female figure skaters. **Bone Miner**, 20:125-132, 1993.

SUGIMOTO, T.; BROWN, A.J.; RITTER, C.; MORRISSEY, J.; SLATOPOLSKY, E.; MARTIN, K.J. Combined effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3

on parathyroid hormone secretion in cultured bovine parathyroid cells. **Endocrinology**, 125(2):638-641, 1989.

THORNDIKE, E.A.; TURNER, A. In search of an animal model for postmenopausal diseases. In: **Frontiers in Bioscience**, 3.ed. Colorado. Ft. Collins, 1998. p.17-26.

TURKEN, S.; SIRIS, E.; SELDIN, D. Effects of tamoxifen on spinal bone density. **J Natl Cancer Inst**, 81:1086-1088, 1989.

VIEIRA, J.G. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 43:415-422, 1999.

VITTE, C.; FLEISH, H.; GUENTHER, H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**. 137:2324-2333, 1996.

WARREN, M.P. Amenorrhea in endurance runners. **J Clin Endocrinol Metab**, 75:1393 -1397, 1992.

WEINSTEIN, R.S.; JILKA, R.L.; PARFITT, A.M.; MANOLAGAS, S.C. inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. **J Clin Invest**, 102(2):274-282, 2000.

WIMALAWANSA, S.J. Combined therapy with estrogen and etidronate has an additive effect on bone mineral density in the hip and vertebrae: four-year randomized study. **Am J Med**, 99:36-42, 1995.

YAMAMOTO, A.; YAMAMURA, T.; YOKOYAMA, S.; SUDO, H.; MATSUZAWA, Y. Combined drug therapy – cholestyramine and compactine – for familial hypercholesterolemia. **J Clin Pharmacol Ther Toxicol**, 22:493-497, 1984.



## CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos comprovaram que o protocolo experimental utilizado neste estudo foi adequado para os objetivos delineados. Os ratos, de fato, podem ser usados como modelo animal para o estudo da osteoporose pelas suas diversas características.

Marcadores bioquímicos como cálcio e fósforo sérico e fosfatase alcalina óssea, não permitiram o diagnóstico da osteoporose, bem como a avaliação das alterações de remodelação óssea.

A histomorfometria e a histopatologia, no entanto, permitiram análise da evolução do tecido ósseo, como detecção de alterações tissulares na unidade metabólica óssea, particularmente, no osso trabecular.

Através da análise da densidade trabecular óssea, foi possível constatar o sucesso da indução da osteoporose pelo glicocorticóide dexametasona, bem como acompanhar o processo de restauração tecidual óssea provocado pelos fármacos.

As substâncias alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona apresentaram efeitos nos animais osteoporóticos, sendo o bifosfonato alendronato o que apresentou a maior eficácia, restaurando o tecido trabecular ósseo dos animais osteoporóticos à nível comparável aos dos animais normais.

As combinações testadas apresentaram efeitos positivos nos animais osteoporóticos. Devemos destacar, no entanto, a maior eficácia das associações realizadas com o bifosfonato alendronato de sódio, que apresentaram restauração da densidade do tecido trabecular ósseo, cujos valores foram superiores, inclusive, aos dos animais normais.

Os resultados demonstraram, portanto, a capacidade desses tratamentos, não só, na preservação, mas também, na restauração do tecido ósseo, sugerindo a possibilidade de sucesso na prevenção durante tratamento com glicocorticóide ou no tratamento da osteoporose estabelecida. Todavia, posteriores estudos fazem-se necessários para avaliar as dosagens, interações, biodisponibilidades, bem como os efeitos toxicológicos destas substâncias, isoladas e associadas, à longo prazo.