



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOTECNOLOGIA**

**FERNANDA SCARPATTI PIMENTEL**

**INTERAÇÃO DO ALENDRONATO E DA VITAMINA K NO  
METABOLISMO OSTEOMINERAL DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

VITÓRIA  
2010

FERNANDA SCARPATTI PIMENTEL

**INTERAÇÃO DO ALENDRONATO E DA VITAMINA K NO  
METABOLISMO OSTEOMINERAL DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Victor Silva.

VITÓRIA

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

P644i Pimentel, Fernanda Scarpatti, 1985-  
Interação do alendronato e da vitamina K no metabolismo  
osteomineral de ratas ovariectomizadas / Fernanda Scarpatti  
Pimentel. – 2010.  
90 f. : il.

Orientador: Ian Victor Silva.

Co-Orientadora: Leticia Batista Azevedo Rangel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito  
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Ossos. 2. Osteoporose. 3. Vitamina K. 4. Pós-menopausa.  
5. Alendronato. I. Silva, Ian Victor. II. Rangel, Leticia Batista  
Azevedo. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de  
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

**FERNANDA SCARPATTI PIMENTEL**

**EFEITOS DO ALENDRONATO, DO ESTROGÊNIO E DA VITAMINA K  
NO METABOLISMO ÓSSEO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 29 de julho de 2010.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Ian Victor Silva**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Batista Azevedo Rangel**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Co-orientadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Membro interno**

---

**Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda**  
**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Membro externo**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me acompanhou em todos os momentos.

A minha família: pai, mãe, irmãos, avó, enfim, a todos que sempre me apoiaram e permitiram que essa conquista fosse possível.

Ao meu marido Gilmar que foi maravilhoso e me incentivou em todos os momentos.

Aos meus orientadores Prof. Dr<sup>o</sup> Ian Victor Silva e Prof. Dr<sup>a</sup> Letícia Batista Azevedo Rangel que me iniciaram na carreira científica e contribuíram intensamente para a minha formação.

Ao Dr<sup>o</sup> Sérgio Ragi Eis que permitiu a realização das densitometrias em sua clínica, sendo sempre muito presente.

A Letícia Rocon que nos auxiliou na realização das densitometrias.

A minha amiga Olívia que foi essencial, durante pesquisas e discussões, para que esse trabalho fosse realizado.

Aos alunos do Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer que sempre deixam meus dias mais alegres.

A todos que fizeram parte dessa conquista.

"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

Dalai Lama

## RESUMO

O osso é uma forma especializada de tecido conjuntivo que fornece suporte biomecânico e metabólico para todo o corpo. Para tanto, o tecido ósseo é muito dinâmico, apresentando-se em constante renovação. Sua integridade depende, portanto, do equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea. Ademais, desequilíbrios no processo de remodelamento ósseo podem resultar no desenvolvimento de doenças esqueléticas sistêmicas, como a osteoporose. A osteoporose é uma doença crônica e progressiva que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Somente no Brasil cerca de 10 milhões de pessoas sofrem de osteoporose. A deficiência hormonal estrogênica, induzida pela ovariectomia (OVX) em ratos, comprovadamente estimula o aumento da reabsorção óssea, principalmente em ossos longos e coluna vertebral, mimetizando o que acontece na osteoporose pós-menopausa. No presente trabalho foram utilizadas ratas OVX para se investigar a interação do alendronato (fármaco extensamente utilizado no tratamento da osteoporose) e da vitamina K (VK) (recentes investigações apontam possuir ação anabólica do tecido ósseo de pacientes osteoporóticas) no metabolismo osteomineral. Este estudo revelou que a administração de alendronato (ALE) e de VK juntamente com ALE (VK+ALE) produziu significativa recuperação na densidade mineral óssea (DMO) de ratas OVX. No entanto, a utilização da VK isoladamente não pareceu exercer nenhum efeito significativo na DMO de ratas OVX. Observou-se uma maior excreção de deoxipiridinolinas urinárias (DPD), marcador de reabsorção óssea no grupo OVX, e redução estatisticamente significativa da DPD quando os animais foram tratados com VK, ALE ou ambas. Não houve diferença estatisticamente significativa do conteúdo mineral ósseo e da área corporal. Também não foi verificada diferença estatisticamente significativa na espessura do osso compacto nos diferentes grupos de estudo. Verificou-se ainda redução estatisticamente significativa do peso úmido e do endométrio de ratas OVX, comprovando a eficiência da ovariectomia. Portanto, o modelo animal utilizado neste estudo mimetizou eficientemente a deficiência estrogênica induzida pela ovariectomia, resultando em aumento da reabsorção óssea; o tratamento com ALE e VK+ALE aumenta a DMO de ratas OVX, embora a VK isoladamente não apresente esse efeito; o tratamento com ALE e VK reduz a reabsorção óssea de ratas OVX, verificada pela redução na excreção de DPD.

**Palavras-chave:** Osso, remodelamento, osteoporose, pós-menopausa, alendronato, vitamina K.

## ABSTRACT

The bone is a specialized form of connective tissue that provides support for metabolic and biomechanical throughout the body. Thus, the bone is very dynamic, with constantly renewing itself. Its integrity therefore depends on the balance between the processes of formation and resorption. The loss of this balance alters both the structure of organic matrix as bone mineralization. Moreover, imbalances in bone remodeling process may result in the development of systemic skeletal diseases such as osteoporosis. The osteoporosis is a chronic progressive disease that affects millions of people around the world. Only in Brazil some 10 million people suffer from osteoporosis. The hormone estrogen deficiency induced by ovariectomy (OVX) rats, demonstrably stimulates increased bone resorption, especially in long bones and spine, mimicking what happens in postmenopausal osteoporosis. In this work we used OVX rats to investigate the interaction of alendronate (a drug widely used to treat osteoporosis) and vitamin K (VK) (recent investigations have pointed anabolic bone tissue of osteoporotic patients) in the metabolism osteomineral. This study revealed that administration of alendronate (ALE) and VK with ALE (ALE+VK) produced significant recovery in bone mineral density (BMD) in OVX rats. However, the use of VK alone did not appear to make any significant effect on BMD in OVX rats. We observed an increased excretion of urinary deoxypyridinoline (DPD), a marker of bone resorption, in OVX group, and statistically significant reduction of DPD when the animals were treated with VK, ALE, or both. There was no statistically significant difference in bone mineral content and body surface area. Was verified statistically significant difference in the thickness of compact bone in the different study groups. There was also a statistically significant reduction in wet weight and endometrium of OVX rats, demonstrating the effectiveness of ovariectomy. Therefore, the animal model used in this study efficiently mimicked estrogen deficiency induced by ovariectomy, resulting in increased bone resorption; treatment with ALE and VK+ALE increases BMD in OVX rats, while the VK alone does not produce this effect; treatment with ALE and VK reduces bone resorption in OVX rats, verified by the reduction in the excretion of DPD.

**Keywords:** Bone, remodeling, osteoporosis, postmenopausal, alendronate, vitamin K.

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso cortical compacto e o osso esponjoso.</i>	20
<i>Figura 2. Esquema representativo dos componentes do osso.</i>	24
<i>Figura 3. Regulação da formação e atividade dos osteoclastos.</i>	26
<i>Figura 4. Estrutura química dos estrogênios.</i>	28
<i>Figura 5. Reação de carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico.</i>	33
<i>Figura 6. Osso normal e osso osteoporótico.</i>	34
<i>Figura 7. Distribuição da densidade mineral óssea de mulheres de diferentes idades, e a prevalência da osteoporose (azul).</i>	37
<i>Figura 8. Linha do tempo que apresenta as principais atividades realizadas, desde a ovariectomia (dia 0) até a eutanásia (dia 109).</i>	42
<i>Figura 9. Software AxioVision utilizado para a morfometria de útero.</i>	45
<i>Figura 10. Equipamento utilizado para análise da densidade mineral óssea por absorciometria por dupla emissão de raio X (DXA), pertencente ao CEDOES.</i>	46
<i>Figura 11. Útero de ratas logo após o sacrifício.</i>	51
<i>Figura 12. Histomorfometria do útero de ratas.</i>	51
<i>Figura 13. Resultado de exame DXA de um animal do grupo SHAM.</i>	53
<i>Figura 14. Imagens e resultados de DXA dos quatro grupos OVX..</i>	54
<i>Figura 15: Visão dos ossos (fêmures) processados para análise histomorfométrica.</i>	58
<i>Figura 16. Eletromicrografia de varredura mostrando a ausência de osteoclastos nos canais de Howship do osso femural de um animal SHAM tratado.</i>	60
<i>Figura 17. Eletromicrografia de varredura mostrando o intenso recrutamento (e provável ativação) dos osteoclastos através dos canais de Howship nos animais OVX.</i>	60

## LISTA DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1. Curva temporal do peso dos animais ao longo do tratamento.</i>	50
<i>Gráfico 2. Avaliação do peso úmido do útero das ratas.</i>	51
<i>Gráfico 3. Avaliação da ovariectomia em relação à involução do endométrio.</i>	52
<i>Gráfico 4. Densidade mineral Óssea (DMO) ao longo de um período de 82 dias.</i>	55
<i>Gráfico 5. Densidade mineral óssea (DMO) na terceira densitometria.</i>	56
<i>Gráfico 6. Densidade Mineral Óssea (DMO) ao final do tratamento.</i>	56
<i>Gráfico 7. Conteúdo mineral ósseo (CMO) ao longo do tempo (82 dias).</i>	57
<i>Gráfico 8. Avaliação da área corporal ao longo de 82 dias.</i>	57
<i>Gráfico 9. Avaliação da espessura do osso compacto.</i>	58
<i>Gráfico 10. Avaliação da excreção urinária da deoxipiridinolina (DPD)/ creatinina.</i>	61
<i>Gráfico 11. Avaliação da excreção urinária de fósforo.</i>	62

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Critérios Densitométricos da Organização Mundial da Saúde.</i>	36
<i>Tabela 2. Excreção urinária do cálcio e do fósforo.</i>	62
<i>Tabela 3. Perfil sérico do cálcio, do fósforo e da fosfatase alcalina.</i>	63

## LISTA DE SIGLAS

ALE – Alendronato

ATP – Adenosina trifosfato

BF – Bisfosfonatos

BMP – Proteínas morfogênicas ósseas

CMO – Conteúdo mineral ósseo

DMO – Densidade mineral óssea

DP – Desvio padrão

DPD – Deoxipiridinolina

DXA – Absorciometria por dupla emissão de raios X

FA – Fosfatase alcalina

HE – Hematoxilina e eosina

HSF – Hormônios sexuais femininos

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

IL – Interleucina

IOF – Fundação Internacional da Osteoporose

M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófago

OB – Osteoblastos

OC – Osteoclastos

PBS – Tampão fosfato salino

PDGF – Fatores de crescimento derivado da plaqueta

PNC – Proteínas não colágenas

PTHrP – Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide

RANK – Receptor para ativação do fator nuclear kappa B

RANKL – Ligante do receptor para ativação do fator nuclear kappa B

RE – Receptor de estrogênio

RH – Reposição hormonal

SERMs – Modulares seletivos dos receptores de estrogênio

TGF- $\alpha$  – Fator  $\alpha$  de necrose tumoral

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformante  $\beta$

TNF – Fator de necrose tumoral

VK – Vitamina K

VK1 – Filoquinona

VK2 – Menaquinona

VK3 – Menadiona

WHO – Organização mundial de saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Visão Geral do Metabolismo Osteomineral.....</b>	<b>18</b>
2.1.2 A Natureza do Tecido Ósseo .....	19
2.1.1. Remodelamento ósseo .....	23
<b>2.2. Agentes reguladores do Metabolismo Osteomineral .....</b>	<b>27</b>
2.2.1. Os hormônios estrogênicos.....	27
2.2.2. Farmacologia dos bisfosfonatos e mecanismo de ação do alendronato .....	30
2.2.3. Vitamina K e seu mecanismo de ação no tecido ósseo.....	32
<b>2.3. A Osteoporose .....</b>	<b>33</b>
2.3.1. Diagnóstico da Osteoporose .....	35
2.3.2. Fatores de risco para a osteoporose .....	36
2.3.3. Formas de Tratamento Utilizadas na Osteoporose Pós-Menopausa .....	38
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Objetivos Gerais.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>41</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. Aprovação do projeto .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Delineamento experimental .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3. Ovariectomia e distribuição dos grupos .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3. Validação da Ovariectomia.....</b>	<b>44</b>
4.3.1. Peso úmido dos úteros .....	44
4.3.2. Histomorfometria dos úteros .....	44
<b>4.4. Determinação da Integridade do Tecido Ósseo.....</b>	<b>46</b>
4.4.1. Análise por Absorciometria por Dupla de Emissão de Raios X (DXA).....	46
4.4.2. Histomorfometria de óssea .....	47
4.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura na Zona de Reabsorção Óssea .....	47
<b>4.5. Análises Sorológicas e Urinárias para Determinação do Perfil Osteomineral.....</b>	<b>48</b>
4.5.1. Perfil Mineral do Metabolismo de Cálcio e Fosfato .....	48

4.5.2. Análise de Marcadores de formação e Reabsorção Óssea: Fosfatase Alcalina Sérica e de Deoxipiridinolinas Urinárias (DPD) .....	48
<b>4.6. Análise estatística.....</b>	<b>49</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1. Avaliação do peso corporal dos animais .....	50
5.2. Validação da Ovariectomia.....	50
5.3. Integridade do Tecido Ósseo.....	52
5.3.1. Absorciometria por Dupla Emissão de Raios X (DXA) .....	52
5.3.2. Histomorfometria de fêmur .....	58
5.3.3. Análise do Efeito da Ovariectomia (OVX) na Ultraestrutura do Osso Compacto por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	59
5.4. Quantificação das DPDs urinárias: Marcador de Reabsorção Óssea.....	61
5.5. Quantificação de Cálcio e Fosfato na Urina e no Soro .....	61
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os ossos são uma forma especializada de tecido conjuntivo que fornece suporte biomecânico e metabólico para todo o corpo. O tecido ósseo, então, apresenta uma dinâmica intensa, verificada pela sua constante renovação. Acredita-se que um indivíduo adulto renove completamente seus ossos a cada 6 anos. Esta constante renovação depende do equilíbrio entre os processos de formação, realizado pelos osteoblastos, e reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos. A esse fenômeno dá-se o nome de remodelamento ósseo (ROSS; PAWLINA, 2008; DENG et al., 2005).

O remodelamento envolve, simultaneamente, a remoção do osso mineralizado, pelos osteoclastos, e formação da matriz óssea pelos osteoblastos, que tornam-se mineralizados. Esse processo é importante para ajustar a microarquitetura óssea às necessidades mecânicas do organismo e ajudar na reparação de microlesões na matriz óssea, possibilitando a renovação do tecido. Além disso, o remodelamento desempenha um papel imprescindível na manutenção da homeostase mineral. A perda desse equilíbrio altera a matriz e a mineralização óssea. (RAISZ, 1999; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS; 2006). Esse desequilíbrio entre os processos de remodelamento ósseo pode resultar no desenvolvimento de doenças esqueléticas sistêmicas, como a osteoporose (EISMAN et al., 2008).

Uma série de condições pode alterar o equilíbrio entre formação e reabsorção, como o avançar da idade, as doenças osteometabólicas, a redução da mobilidade corporal e a ação de alguns fármacos que levam ao predomínio da reabsorção sobre a formação, resultando em conseqüências metabólicas e/ou mecânicas como a osteoporose (MARIE et al., 2001; RAISZ, 2005).

A osteoporose é uma doença crônica degenerativa que atualmente afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Somente no Brasil, estimativas apontam que cerca de 10 milhões de pessoas sofrem com a osteoporose. A maior parcela desses doentes é representada por mulheres pós-menopausadas, sem acesso a qualquer diagnóstico e, conseqüentemente, tratamento adequado para esta mazela. Dentre a principal decorrência da osteoporose pós-menopausa estão às fraturas de punho, de fêmur e

de quadril, que muitas das vezes apresentam um mórbido prognóstico. Alguns estudos apontam que a cada três pacientes acometidas de fratura de quadril, um desses pacientes é diagnosticado com osteoporose (ZABAGLIA; COSTA-PAIVA; PINTO-NETO, 2001). Ademais, estimativas apontam para um cenário ainda pior nos próximos anos, decorrente, principalmente, do envelhecimento populacional. Estimativas da Fundação Internacional de Osteoporose (IOF, 2009) apontam para um aumento de 400% no número de fraturas de quadril em homens e mulheres (com idade entre 50 e 64 anos) na América Latina entre os anos de 1990 e 2050. Em adição, para os indivíduos com idade maior que 65 anos (idosos), o aumento poderá chegar a 700%. Em números absolutos, este aumento corresponderá à quase 700 mil fraturas de quadril em 2050. Associado as suas morbidades, pode-se dizer que a osteoporose causa também um altíssimo impacto econômico aos Sistemas de Saúde Público e Privado, atualmente estimados em seis (6) bilhões de dólares e que podem chegar a treze (13) bilhões de dólares em 2050 (ARAUJO; OLIVEIRA; BRACCO, 2005).

Em virtude do elevado ônus sócio-econômico, as pesquisas de novas formas de diagnóstico precoce e tratamento da osteoporose tem apresentado um intenso aumento na última década. Tanto a pesquisa clínica quanto a pesquisa básica têm alargado o conhecimento a cerca dos mecanismos moleculares desta doença multifatorial que é a osteoporose pós-menopausa. Por essa e outras razões, modelos animais têm sido desenvolvidos de forma a possibilitar o estudo de doenças humanas utilizando animais (BEDELL; JENKINS; COPELAND, 1997). Neste contexto, o modelo animal que mimetiza a menopausa – ratas ovariectomizadas – tem sido amplamente aceito no estudo de novas terapêuticas para essa forma de osteoporose. A deficiência hormonal estrogênica induzida pela ovariectomia (OVX) em ratos estimula a reabsorção óssea, principalmente em ossos longos e coluna vertebral, efeito similar ao o que acontece na osteoporose pós-menopausa em mulheres (KOBAYASH; HARA; AKIYAMA, 2002; TANAKA et al., 2001; BINKLEY et al., 2002; ONOE et al., 2000; ERBEN et al., 2002).

É sabido que a osteoporose, quando devidamente tratada, há uma diminuição da ocorrência de fraturas, levando a uma maior sobrevida das mulheres (SIRIS et al.,

2001; CAULEY, 2000; JOHNELL et al., 2004; JOHNELL et al., 2004). Os bisfosfonatos, dentre eles os alendronato, são considerados o padrão-ouro para o tratamento da osteoporose, produzem reduções clinicamente significantes no risco de novas fraturas vertebrais e não vertebrais, e atualmente constituem a base do tratamento da osteoporose (CHESNUT III et al., 2004; DELMAS et al., 2004; COSMAN; BORGES; CURIEL, 2007). É sabido, também, que a VK possui importante função fisiológica como cofator na gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico da proteína osteocalcina. A carboxilação confere a osteocalcina a capacidade de se ligar ao cálcio, um mineral que se encontra no osso sob a forma de cristais de hidroxiapatita. (BINKLEY et al., 2009; LAHAM-NEW, 2008). Existem evidências de que a ingestão de VK pode aumentar a densidade mineral óssea, reduzir o risco de fratura (HEISS et al., 2008), prevenir a perda óssea precoce através da inibição da reabsorção óssea, e proteger contra a perda e conectividade do osso trabecular (HARRIS et al., 2009; ADAMI, 2007). Assim, este trabalho objetivou analisar se a combinação do alendronato e da VK, de alguma forma, influencia no metabolismo osteomineral de ratas OVX (IWAMOTO; TAKEDA; ICHIMURA, 2003). Para tanto, foram realizados uma série de experimentos tais como, medidas de DMO, análises bioquímicas e histomorfométricas, além de estudos de microscopia eletrônica de varredura para testarmos esta hipótese. Segue agora, uma pequena revisão sobre o trabalho desenvolvido nesta dissertação de mestrado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Visão Geral do Metabolismo Osteomineral

Nos seres superiores, como é o caso dos mamíferos, vários parâmetros metabólicos devem ser mantidos constantes, ressaltando o pH dos fluidos, a osmolaridade e o volume do meio interno e as concentrações plasmáticas dos vários nutrientes (tais como glicose, cálcio, magnésio e fosfato). A rígida manutenção desses parâmetros homeostáticos dentro de uma estreita faixa de valores decorre da ação conjunta dos diferentes sistemas que compõem o organismo, reguladas principalmente pelos sistemas nervoso e endócrino, que integram as informações provenientes do meio externo e interno (GUYTON; HALL, 2006).

Os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) são fundamentais para a manutenção de vários processos vitais aos seres vivos, tais como a comunicação celular, a geração e armazenamento de energia e a reprodução. O cálcio está envolvido em inúmeros processos biológicos, tais como a sinalização celular, a contração muscular, as cascatas de coagulação sangüínea e a fecundação. É bem conhecido também, que a função de várias proteínas é modulada pelo íon cálcio (HELOU, 1996). Recentemente foi mostrado que, além do seu papel como cofator em diversas reações bioquímicas, foi mostrado que o cálcio pode exercer funções semelhantes à dos hormônios, excitando ou dessensibilizando efeitos biológicos através de um receptor extracelular sensível ao cálcio (CaSR) (BROWN, 1999; BAI et al., 1996). Já os íons fosfato apresentam, dentre outras funções, um papel estrutural nos ácidos nucléicos, mantenedores da informação genética, e na estrutura das moléculas de nucleotídeos, como o trifosfato adenosina (ATP), principal fonte de energia celular (OLIVEIRA, 2007). Conseqüentemente, este íon tem importância crucial tanto na bioenergética celular quanto na própria manutenção da identidade dos seres vivos, visto seu papel estrutural nos ácidos nucléicos. Os íons  $\text{Mg}^{2+}$  constituem o principal cátion divalente do meio intracelular sendo importante na formação de complexos com as moléculas de ATP em processos de transdução de energia, além de controlar, como co-fator, a atividade de várias enzimas (SARIS et al., 2000). Devido à vasta gama de efeitos biológicos

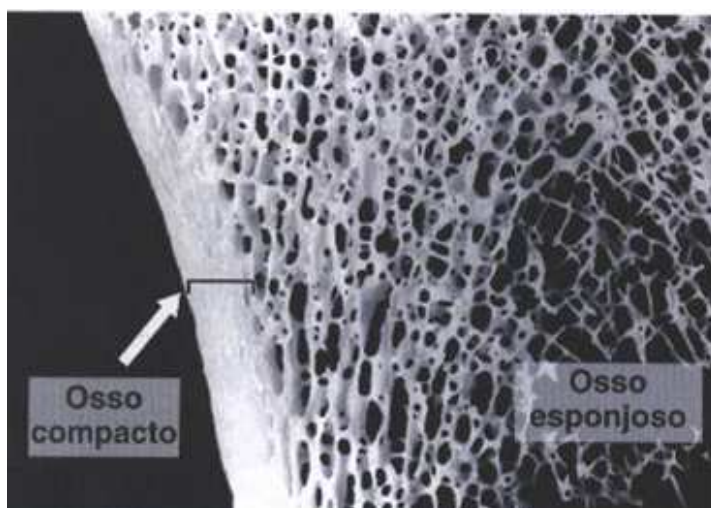
que envolvem os íons cálcio, fosfato e magnésio, os processos regulatórios envolvidos na manutenção da homeostase destes três íons foram agrupados em um tópico chamado de metabolismo mineral. Esta área do conhecimento está voltada ao estudo dos mecanismos regulatórios que atuam sobre os diferentes órgãos e sistemas envolvidos na manutenção das concentrações corpóreas destes três íons. Devido a tantos papéis cruciais exercidos por estes íons, nosso organismo mantém um vasto estoque dos mesmos na fração mineralizada do tecido ósseo, na forma de hidroxiapatita, que pode ser mobilizada quando necessária (BILAIR, 2002). Os mecanismos de formação e manutenção destes estoques são essenciais não apenas para a homeostase mineral, mas também para manter a rigidez óssea necessária tanto para a locomoção do indivíduo quanto para a proteção de alguns órgãos internos, como cérebro, coração e pulmões (GUYTON, HALL, 2006).

### 2.1.2 A Natureza do Tecido Ósseo

O osso é uma forma especializada de tecido conjuntivo, que fornece suporte biomecânico e metabólico para todo o corpo. Assim como os outros tecidos conjuntivos ele consiste de células especializadas e de uma matriz extracelular. Contudo, o fator que diferencia os ossos dos outros tecidos conjuntivos é a mineralização de sua matriz, que produz um tecido extremamente rígido e resistente, capaz de fornecer suporte e proteção. Devido à sua natureza peculiar, o tecido ósseo apresenta distintas classificações quanto ao arranjo de sua matriz, à natureza física tecidual e ao conteúdo intratecidual (ROSS; PAWLINA, 2008).

O tecido ósseo pode ser classificado macroscopicamente em: osso trabecular, que contém no seu interior uma estrutura de aspecto esponjoso; osso cortical (ou compacto), de aspecto denso e sólido (Figura 1). Essas classificações diferem, majoritariamente, quanto à distribuição espacial das células, densidade da matriz mineralizada, distribuição dos vasos sanguíneos e área ocupada pela medula óssea. (RIGGS & HARTMANN, 2003; RIGGS, 2003).

O osso trabecular possui uma estrutura semelhante a uma esponja. Esse ocupa a região interna da epífise e da metáfise, enquanto que o osso cortical apresenta-se como uma camada semi-sólida que cobre todo o osso. Essa camada cortical é fina nas regiões de epífise e metáfise, mas grossa na diáfise (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).



**Figura 1.** Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso cortical compacto e o osso esponjoso.

Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004.

O osso compacto, por sua vez, contribui com cerca de 85% da massa total do esqueleto de um adulto. Sua principal função é proporcionar suporte biomecânico e protetor de outros órgãos. Ele é constantemente renovado em resposta a alterações mecânicas e sinais ambientais não mecânicos, tão bem como microdanos, mas sua pequena superfície adjacente a medula óssea resulta numa baixa taxa de remodelamento. Em contraste, os ossos trabeculares contribuem com somente 15% do total da massa óssea. Entretanto, a área ocupada pelo osso trabecular é grande, contribuindo com 75% da superfície total do sistema esquelético. Uma importante função do tecido ósseo trabecular é manter as concentrações plasmáticas de íons (DENG et al., 2005).

A matriz óssea é formada por materiais orgânicos e inorgânicos, que garantem suas várias funções, tais como a rigidez mecânica e suporte metabólico. Em virtude de

seu conteúdo mineral, o osso serve como local de armazenamento dos íons cálcio e fosfato. Esses podem ser mobilizados a partir da matriz óssea e captados pelo sangue, quando necessário, para manter os níveis apropriados por todo o corpo. Dessa forma, o osso desempenha um importante papel na regulação homeostática dos níveis desses íons (MARENZANA et al., 2005).

A matriz orgânica óssea consiste, principalmente, de fibras colágenas tipo I e pequenas quantidades de proteínas não-colagênicas, tais como a osteocalcina, a osteopontina, a osteonectina e a sialoproteína óssea (ROACH, 1994; BLAND, 2000). Enquanto o componente inorgânico da matriz óssea, por sua vez, é representado por depósitos de fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006). Além dela, outros componentes inorgânicos estão presentes em pequenas quantidades, como o magnésio, fluoreto, estrôncio, zinco e rádio (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001).

O processo de mineralização óssea, todavia, é um fenômeno bioquimicamente ainda pouco entendido. Algumas evidências, no entanto, tornam possíveis poucas especulações sobre este crucial fenômeno biológico. Primeiramente, acredita-se que a hidroxiapatita se deposita sobre as proteínas não-colagênicas sintetizadas pelos osteoblastos. Essas proteínas sofrem modificações pós-transcricionais que resultam na gama-carboxilação dos ácidos glutâmicos de sua estrutura primária levando a um aumento da afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Esse aumento da afinidade protéica pelo cálcio faz com que tais moléculas funcionem como nucleadoras da precipitação mineral no matriz formada (IWAMOTO, TAKEDA, SATO, 2006).

Por estarem presentes nas periferias das regiões de matriz óssea neoformada, acredita-se que a osteopontina e a sialoproteína sejam importantes iniciadoras do processo de mineralização óssea sendo, portanto, marcadores precocemente encontrados durante a diferenciação osteogênica. Já osteocalcina e a osteonectina se encontram dispersas no osteóide sendo consideradas importantes no processo de progressão da mineralização (ROACH, 1994; BLAND, 2000).

O cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é o mais abundante cátion divalente no organismo (LAHAM-NEW, 2008). Estima-se que nos seres humanos, de um (1) a dois (2) Kg desse íon estejam

contidos no organismo, sendo que 99% compõem os ossos e os dentes. Contudo, o  $\text{Ca}^{2+}$  é um nutriente que precisa ser ingerido em quantidades ótimas para que o balanço corpóreo do mesmo seja mantido. Quando ingerido como parte dos alimentos que compõem a dieta, a absorção do cálcio que ocorre majoritariamente no intestino delgado em um evento mediado pela vitamina D ativa (também chamada de  $1\alpha,25$ -dihidroxicolecalciferol). Esta molécula induz nas células epiteliais intestinais a expressão de proteínas ligadoras de cálcio, chamadas de calbindina, e de transportadores e canais de cálcio que propiciam o transporte epitelial do íon no órgão (SIM et al., 2010). Em contrapartida, a perda desse mineral se dá por meio da excreção renal. Assim, em média, 97% do cálcio filtrado é reabsorvido pelos túbulos renais e os 3% restantes são excretados na urina (LAHAM-NEW, 2008).

O equilíbrio entre a ingestão e a excreção normal de  $\text{Ca}^{2+}$  mantém o nível plasmático de cálcio ótimo (LAHAM-NEW, 2008). Em algumas situações, todavia, o equilíbrio observado no balanço normal de cálcio é alterado. Podemos ressaltar o hiperparatiroidismo, a deficiência de vitamina D e a deficiência estrogênica observada na pós-menopausa, situações nas quais pode haver utilização dos estoques ósseos de  $\text{Ca}^{2+}$  e perda de massa óssea (ABRAMS, 2005).

O fósforo (Pi) constitui aproximadamente 1% do peso corpóreo do ser humano, e está presente principalmente na forma de  $\text{PO}_4^{-3}$ . Cerca de 90% do fósforo do organismo está presente nos ossos. O restante relaciona-se a uma série de funções metabólicas, sendo metade dessa quantidade encontrada nos músculos. Suas principais funções relacionam-se com a mineralização óssea e dos dentes, mas também participa do metabolismo energético. O fósforo é importante, ainda, na absorção e no transporte de nutrientes, na regulação da atividade protéica e no balanço ácido-básico (OLIVEIRA, 2007; GUYTON; HALL, 2006).

De forma similar ao cálcio, o balanço de Pi no organismo se dá pelo fino ajuste entre a absorção intestinal e a excreção renal do íon. É bem sabido que a Vitamina D ativa também estimula a absorção duodenal de Pi por mecanismos semelhantes àqueles encontrados para o cálcio. Contudo, a excreção urinária do Pi pelos túbulos renais é mediada, principalmente, pelo paratormônio (PTH). Por consequência, pode-se afirmar que os balanços de cálcio e fosfato são interdependentes, sendo ambos

regulados pelos hormônios responsáveis pelo controle do metabolismo mineral. Esta regulação fina pode, em algumas situações, utilizar os estoques ósseos destes íons para manter constante a calcemia e fosfatemia nos organismos (LOTSCHER et al., 1996).

### 2.1.1. Remodelamento ósseo

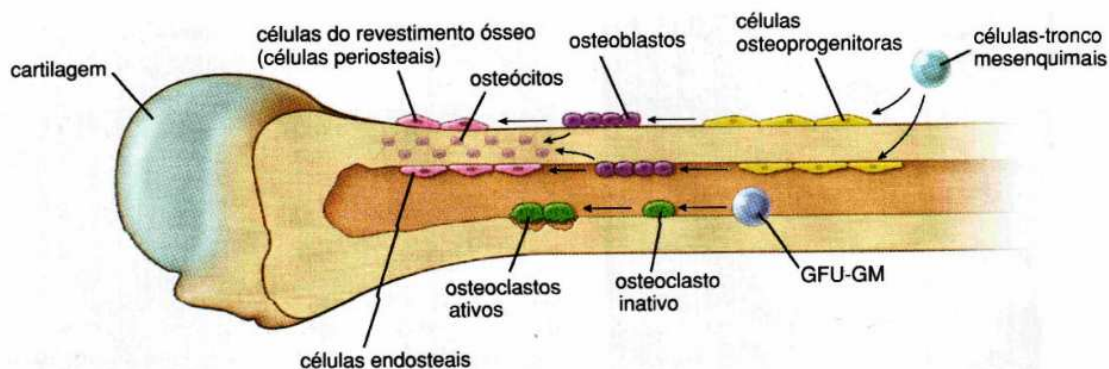
Os ossos, não obstante, a visão superficial observada pela maioria das pessoas é um tecido altamente dinâmico, que se regenera constantemente ao longo da vida. A esta constante renovação dá-se o nome de remodelamento ósseo. O remodelamento ósseo é um intrincado fenômeno que envolve não apenas as células e a matriz óssea, mas também um grande número de sinais endócrinos que regulam o processo. O ciclo de remodelamento ocorre continuamente e simultaneamente em múltiplos sítios do esqueleto em resposta a influências mecânicas e metabólicas (SEIBEL; ROBINS; BILEZIKIAN, 2006; SIMS; GOOI, 2008).

A seqüência de eventos dentro da unidade de remodelamento ocorre basicamente em três (3) eventos clássicos: ativação, reabsorção e formação (COURPRON; MEUNIER; VIGNON, 1975). Adiante, tentar-se-á explicar os mecanismos que medeiam o remodelamento ósseo nos seres humanos

Além da matriz óssea, os ossos apresentam alguns tipos peculiares de células na sua estrutura. Dentre elas, destacam-se dois tipos principais de células, os osteoblastos – células de origem mesenquimal e relacionadas à formação óssea - e os osteoclastos – células originadas da linhagem monocítica-macrofágica que migram para o tecido ósseo, sendo primariamente envolvidas na reabsorção óssea. Além dos osteoblastos e osteoclastos, outros tipos de células estão associados ao osso, como os osteócitos, as células osteoprogenitoras e as células de revestimento ósseo (Figura 2) (ROSEN, 2000).

As células osteoprogenitoras são derivadas das células-tronco mesenquimais na medula óssea, que possuem o potencial para se diferenciar em muitos tipos celulares distintos, inclusive fibroblastos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos e

células musculares. Morfologicamente, compreendem as células periosteais e as células endosteais (ADLER, 2000).



**Figura 2.** Esquema representativo dos componentes do osso.  
Fonte: ROSS; PAWLINA, 2008.

Os osteoblastos são células envolvidas no processo de formação óssea. Elas sintetizam e secretam colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas para formar a matriz óssea. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Dispõem-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado, num arranjo que lembra um epitélio simples. Dentre os produtos sintetizados pelos osteoblastos estão a osteocalcina e a sialoproteína óssea que são duas proteínas específicas do osso. Os osteoblastos ativos, em resposta a estímulos mecânicos e não-mecânicos, levam a liberação de fosfatase alcalina, a secreção de colágeno tipo I, e a síntese de proteínas não-colágênicas (ORIMO, 2010; PARKER et al., 2010; EASTELL et al., 2010).

Os osteoclastos são células derivadas das células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, que dão origem a células-tronco mielóides que podem se diferenciar ainda mais em megacariócitos, granulócitos, monócitos/macrófagos e osteoclastos. Citologicamente, os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, de citoplasma acidófilo, contendo inúmeras vesículas. São encontradas freqüentemente nas áreas de reabsorção do tecido ósseo, e em depressões da matriz escavadas pelos osteoclastos conhecidas como lacunas de Howship (TEITELBAUM, 2007). Elas são a principal, mas não única célula reabsortiva do osso, mostrando central

envolvimento na formação do esqueleto e regulação de sua massa (YAVROPOULOU; YOVOS, 2008).

É sabido que a função de reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos, pode ser estimulada por uma série de situações, como a deficiência estrogênica característica da pós-menopausa e a ovariectomia em murinos (KOBAYASHI; HARA; AKIYAMA, 2002; TANAKA et al., 2001; ONOE et al., 2000; ERBEN et al., 2002).

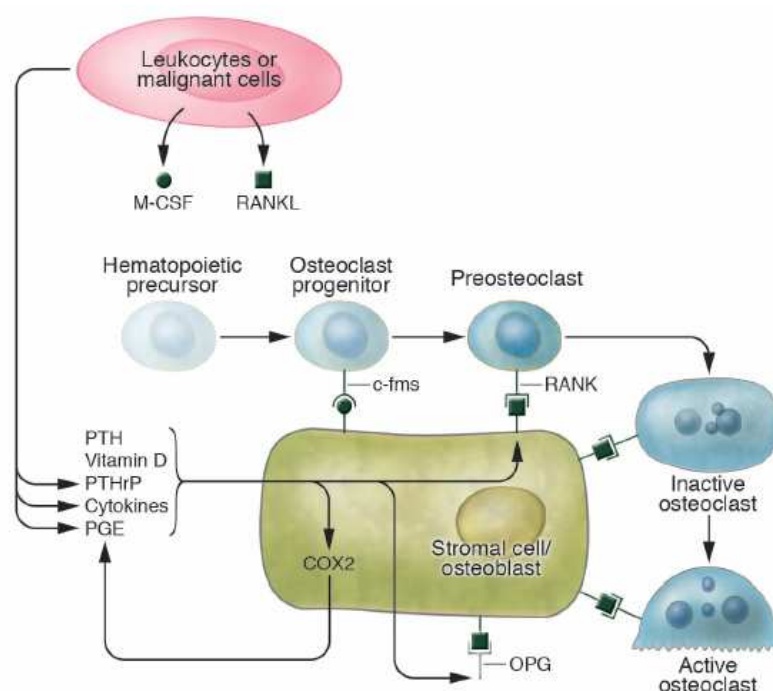
Os osteócitos são o mais abundante tipo celular do tecido ósseo. No osso maduro, mais de 95% do total de células ósseas são osteócitos. Elas são a única célula totalmente circundada por matriz óssea. Um dos seus papéis consiste na mecanotransdução, assim diferentes estímulos mecânicos alteram não somente a expressão genética, mas também o mecanismo apoptótico da célula. Baseada nessa função dentro da matriz óssea, os osteócitos são responsáveis por detectar microdanos e iniciar o processo de reparo. Os osteócitos podem eventualmente sofrer apoptose causada pelo envelhecimento, pelo tratamento com glicocorticóides e pela redução da taxa de estrogênio (LIAN; STEIN, 1996).

Em termos moleculares, é sabido que a ativação dos osteoclastos e concomitante reabsorção óssea requerem a expressão de duas moléculas essenciais: o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) e o receptor para ativação do fator nuclear kappa B (RANK) (LI et al., 2000).

Quando ativados os osteoclastos criam um microambiente fechado, local de adesão com a matriz óssea, onde secretam ácido ( $H^+$ ), colagenase e outras hidrolases, que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio. Esses podem ser encontrados em osso trabecular e cortical. No caso do osso trabecular, os osteoclastos podem ser encontrados na superfície das trabéculas, enquanto no osso cortical, nas pontas, formando os ósteons (VAANAMEN, 2005). Assim durante o contato osteoclasto-osteoblasto a expressão do ligante RANK (RANKL), membro da família do fator de necrose tumoral (TNF), por osteoblastos na presença do M-CSF, ativa a expressão de RANK pelos osteoclastos, resultando no recrutamento de precursores osteoclásticos da medula, promovendo sua

diferenciação e fusão em osteoclastos multinucleares (Figura 3). Essa etapa também é conhecida como osteoclastogênese (LI et al., 2000).

Em contrapartida, sabe-se que a osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel também da família do receptor do TNF, pode se ligar ao RANKL e prevenir a ativação do receptor RANK nos osteoclastos. Assim a OPG inibe a formação, ataque, ativação e sobrevivência dos osteoclastos, levando rapidamente a uma redução no número de osteoclastos por apoptose (LACEY et al., 2000; MORONY et al., 2005). Em adição a essas moléculas supra-citadas, várias evidências apontam para uma coordenação dessas interações por alguns hormônios primariamente não associados com o metabolismo ósseo, como os esteróides sexuais masculinos (testosterona) e femininos (principalmente o estrogênio).



**Figura 3.** Regulação da formação e atividade dos osteoclastos.  
Fonte: RAISZ, 2005.

Após a indução da reabsorção, componentes da matriz como fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I), tão bem como colágeno, osteocalcina, outras proteínas e componentes minerais são

perdidos no microambientes. Os fatores de crescimento perdidos pela reabsorção contribuem para o recrutamento de novos osteoblastos nas superfícies ósseas, que iniciam o processo de síntese de colágeno e mineralização (ROSEN, 2000).

## **2.2. Agentes reguladores do Metabolismo Osteomineral**

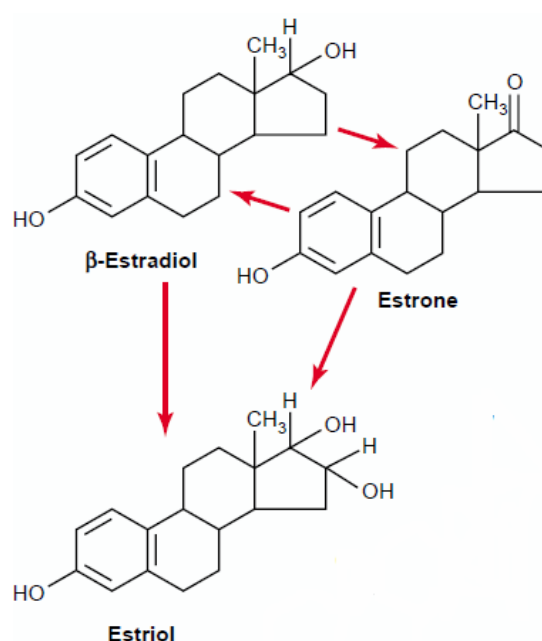
### **2.2.1. Os hormônios estrogênicos**

Os estrogênios são hormônios esteróides reconhecidos como reguladores chave do crescimento, diferenciação e metabolismo em humanos (JAKIMIUK et al., 2007). Sua importância na manutenção da homeostase do cálcio na osteoporose pós-menopausa foi estabelecida há mais de 60 anos por Fuller Albright (1941).

O termo “estrogênio” inclui um grupo de hormônios quimicamente similares. Dentre eles, três estão presentes em quantidades significativas no plasma de fêmeas: estradiol ( $\beta$ -estradiol), estrona e estriol (Figura 4). Esses são produzidos nos ovários, nas glândulas adrenais e nos tecidos adiposos. O  $\beta$ -estradiol é secretado pelos ovários; pequenas quantidades de estrona são também secretadas, mas a maior parte é formada nos tecidos periféricos a partir de andrógenos secretados pelo córtex adrenal e pelas células teca ovarianas; o estriol é um estrogênio fraco. O estriol é um produto oxidativo derivado do estradiol e da estrona, cuja conversão ocorre principalmente no fígado (SALTIKI; ALEVIZAKI, 2007). A potência estrogênica do  $\beta$ -estradiol é 12 vezes maior que da estrona e 80 vezes maior que do estriol. Por essa razão, o  $\beta$ -estradiol é considerado o estrogênio mais importante, embora os efeitos da estrona não sejam negligenciáveis. (GUYTON; HALL, 2006).

O estrogênio age através da ligação e ativação de dois diferentes receptores de estrogênio (RE), RE $\alpha$  e RE $\beta$ , os quais foram identificados nos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e nas células do estroma da medula óssea (RIGGS; KOSLA; MELTON, 2002). Efeitos positivos do estrogênio no osso incluem o decréscimo na produção e tempo de vida dos osteoclastos, estimulação da atividade dos osteoblastos e efeitos adicionais na homeostase do cálcio (SYED; KHOSLA,

2005). A ação anti-reabsortiva do estrogênio é mediada via ativação do sistema RANKL/RANK/osteoprotegerina (o maior regulador da atividade dos osteoclastos), assim como pela redução da produção do número de citocinas pró-reabsortivas, as quais possuem efeitos diretos sobre os osteoclastos. A formação óssea também é afetada pela deficiência estrogênica, com redução do tempo de vida dos osteoclastos. Essa combinação do aumento da reabsorção óssea e redução da formação óssea aceleram a perda óssea e o enfraquecimento da estrutura do esqueleto, sendo considerado um forte fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose (SEEMAN; DELMAS, 2006; MARTIN; SEEMAN, 2008).



**Figura 4.** Estrutura química dos estrogênios.  
Fonte: GUYTON; HALL, 2006.

O estrogênio age através da ligação e ativação de dois diferentes receptores de estrogênio (RE), RE $\alpha$  e RE $\beta$ , os quais foram identificados nos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e nas células do estroma da medula óssea (RIGGS; KHOSLA; MELTON, 2002). Efeitos positivos do estrogênio no osso incluem o decréscimo na produção e tempo de vida dos osteoclastos, estimulação da atividade dos osteoblastos e efeitos adicionais na homeostase do cálcio (SYED; KHOSLA, 2005). A ação anti-reabsortiva do estrogênio é mediada via ativação do sistema

RANKL/RANK/osteoprotegerina (o maior regulador da atividade dos osteoclastos), assim como pela redução da produção do número de citocinas pró-reabsorptivas, as quais possuem efeitos diretos sobre os osteoclastos. A formação óssea também é afetada pela deficiência estrogênica, com redução do tempo de vida dos osteoclastos. Essa combinação do aumento da reabsorção óssea e redução da formação óssea aceleram a perda óssea e o enfraquecimento da estrutura do esqueleto, sendo considerado um forte fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose (SEEMAN; DELMAS, 2006; MARTIN; SEEMAN, 2008).

REs têm sido encontrados no intestino e no rim, e algumas observações sugerem que o estrogênio pode afetar positivamente a absorção de cálcio, independentemente de outros hormônios calciotrópicos. Dessa forma, a deficiência estrogênica além de aumentar a reabsorção óssea pode resultar num balanço negativo de cálcio, pois prejudica sua absorção no intestino e aumenta a excreção renal (RIGGS; KOSLA; MELTON, 2002).

Durante a menopausa, período durante o qual o ciclo menstrual cessa e os hormônios sexuais femininos diminuem, a principal fonte dos estrogênios é extra-gonadal, sendo o tecido adiposo, que expressa as enzimas aromatase e 17 beta-hidroxiesteróide, o principal responsável pela produção desse hormônio. Nesse período, a perda da função ovariana resulta em aumento da atividade osteoclástica, redução da matriz óssea e decréscimo na deposição de cálcio e fosfato (SALTIKI; ALEVIZAKI, 2007).

A terapia de reposição hormonal é efetiva na prevenção e tratamento da osteoporose pós-menopausa. Longos períodos de uso de estrogênio, porém, têm sido relacionados a aumentos do risco de cânceres de mama, de útero e de pulmão, além de doenças cardiovasculares (CHAKRABORTY et al., 2010; KUHL, 2004; PINES; STURDEE, 2010). Portanto, o desenvolvimento de alternativas seguras e bem toleradas deve ser uma prioridade de saúde pública, dado o envelhecimento da população (OSAKO et al., 2010).

### 2.2.2. Farmacologia dos bisfosfonatos e mecanismo de ação do alendronato

Os bisfosfonatos (BF) são as drogas anti-reabsortivas mais potentes disponíveis para o tratamento da osteoporose pós-menopausa (TÖYRÄS et al., 2003). São potentes inibidores da reabsorção óssea e produzem efeito por reduzir o recrutamento e a atividade dos osteoclastos (OC), além de aumentar a apoptose (KANIS et al., 2008).

Os bisfosfonatos modificam o metabolismo do cálcio por redução da reabsorção do cálcio do osso e aumento da absorção intestinal. Esses fármacos reduzem a diferenciação e recrutamento dos precursores dos osteoclastos formados a partir das células-tronco hematopoiéticas. Ao mesmo tempo eles aumentam a apoptose, parcialmente por ativação de caspases. O resultado é uma redução acentuada no número de osteoclastos. Eles agem também nos osteócitos, evitando uma apoptose prematura (PÉREZ-LÓPEZ, 2004). É importante salientar, ainda, que os bisfosfonatos não atravessam a membrana de outras células que não sejam células ósseas, assim não possuem nenhum efeito extra-esquelético (JEAL; BARRADELL; MCTAVISH, 1997). Estudos têm sugerido que os BF agem diretamente na redução do recrutamento de osteoclastos por precursores inativos e através da inibição de citocinas pro-osteoclastogênicas (D'AMELIO et al., 2008). Outros estudos sugerem que os BF induzem a perda de um fator que inibe a atividade e formação dos osteoclastos (SAHNI et al., 1993; VITTE; FLEISCH; GUENTHER, 1996).

Uma característica fundamental de todos os bisfosfonatos é sua afinidade extremamente alta, e conseqüente deposição no tecido ósseo em detrimento dos outros tecidos. Essa alta afinidade com o mineral ósseo permite que os bisfosfonatos alcancem uma elevada concentração local em todo o esqueleto (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008). Assim, os BFs orais estão sendo considerados, atualmente, como o padrão-ouro no tratamento de doenças esqueléticas caracterizadas por remodelação excessiva ou desequilibrada. Sua utilização deve-se graças a sua excelente eficácia e boa tolerabilidade (SAMBROOK et al., 2004; BONE et al., 2004). Podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação bioquímico em: bisfosfonatos nitrogenados ou aminobisfosfonatos, que agem através da via do mevalonato, e bisfosfonatos não nitrogenados, que agem através

das ATPases. Os bisfosfonatos mais largamente utilizados são o alendronato e o risedronato (BROWN, 1999).

O mecanismo pelo qual os BFs que contêm nitrogênio promovem a apoptose dos OC é distinto dos BF não-nitrogenados. Os nitrogenados se ligam ao osso e são endocitados pelos OC. No seu interior, os BFs inibem seletivamente a atividade da farnesil pirofosfato sintase, uma enzima envolvida na via do mevalonato (produção do colesterol e outros esteróis), que parece ser crítica para a sobrevivência dos osteoclastos (DUNFORD et al., 2001; KAVANAGH et al., 2006). Já os BFs não-nitrogenados, devido a sua semelhança estrutural com o pirofosfato inorgânico são incorporados em moléculas recém-formadas de trifosfato de adenosina (ATP). Esses análogos de ATP não hidrolizáveis se acumulam no interior dos OC e causam inibição de vários processos celulares dependentes de ATP, levando a apoptose do OC (RÄIKKÖNEN et al., 2009).

O alendronato de sódio (4-amino-1-hidroxi-butano bisfosfonato de sódio) após absorvido é rapidamente assimilado pelas unidades de remodelação óssea ou é excretado na urina como molécula inalterada (MCCLUNG, 2001). Como todos os bisfosfonatos nitrogenados, o alendronato liga-se firmemente aos minerais ósseos, prevenindo a reabsorção por inibição da via mevalonato (PLOTKIN, 2005). Esse medicamento atua como análogo lipídico do difosfato isoprenóide, e inibe a pirofosfato farnesil sintase. Inibidores dessa via previnem a síntese de lipídeos isoprenóides essenciais para a farnesilação e geranilação de pequenas proteínas sinalizadoras GTPase e inibem a ação do osteoclasto (BENFORD et al., 2001).

Apesar de não estar bem definida em qual etapa da formação e atividade dos osteoclastos são mais sensíveis os BF, tem-se sugerido que 3 meses de terapia oral com um bisfosfonato nitrogenado reduz consideravelmente o recrutamento de precursores osteoclastogênicos, a reabsorção óssea e a produção de TNF alfa e RANKL (D'AMELIO et al., 2008; D'AMELIO et al., 2009; HSU et al., 1999).

A terapia com o alendronato induz reduções drásticas na remodelação óssea e aumento da densidade óssea, principalmente durante o primeiro ano de terapia. Esses efeitos contribuem para o aumento da força óssea e redução na incidência de

fraturas vertebrais e de quadril em pacientes com osteoporose (MUNOZ-TORRES, 2009; IWAMOTO, TAKEDA, ICHIMURA, 2003).

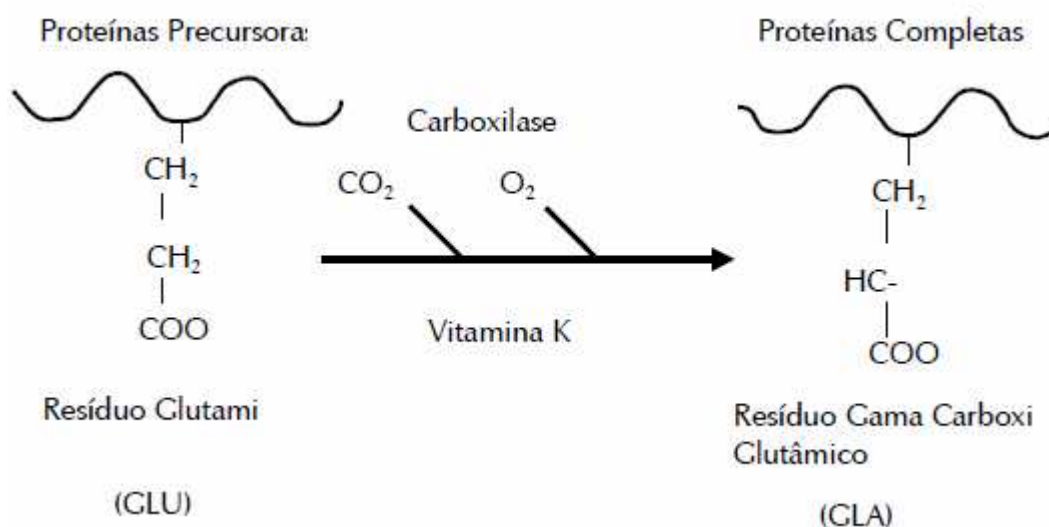
### 2.2.3. Vitamina K e seu mecanismo de ação no tecido ósseo

A vitamina K (VK) é mais bem conhecida pela sua função na via da coagulação, porém evidências têm sugerido que a VK age como modulador do metabolismo ósseo, influenciando na redução da perda óssea. (BOOTH et al., 2008; KOITAYA et al., 2009; KOBAYASHI; HARA; AKIYAMA, 2002).

A VK ocorre sob três formas: a filoquinona (VK1), as menaquinonas (VK2), e a menadiona (VK3). VK1 e VK2 são vitaminas lipossolúveis encontradas naturalmente na natureza, enquanto a VK3 é um composto sintético normalmente utilizado como fonte da vitamina para a alimentação de animais. A VK1 é encontrada em plantas, como os vegetais folhosos, e em óleos vegetais enquanto a VK2 é sintetizada por bactérias do trato intestinal. A família das menaquinonas constitui-se numa série de vitaminas designadas MK-n, onde o n representa o número de resíduos isoprenóides na cadeia lateral. A menadiona é convertida em VK2 no intestino (DORES, PAIVA, CAMPANA, 2001).

A VK atua como cofator essencial na reação de gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico (Glu) nas moléculas de osteocalcina, levando a formação do ácido gama-carboxiglutâmico (Gla) (Figura 5). Dessa forma, a VK é imprescindível na formação óssea uma vez que a osteocalcina descarboxilada não consegue se ligar a hidroxiapatita e auxiliar na mineralização do tecido ósseo. É importante ressaltar que a osteocalcina é uma das proteínas não colagênicas mais abundantes na matriz extracelular do osso. E ainda, é uma proteína de baixo peso molecular produzida por osteoblastos durante a formação óssea (IWAMOTO, TAKEDA, SATO, 2006).

Independentemente da dose de VK consumida, 20% é excretada pela urina em três dias, enquanto que entre 40 e 50% é excretado pelas fezes. Esse catabolismo mostra a rápida depleção das reservas hepáticas em pessoas com dieta pobre em VK (MELCHIOR, 2006).

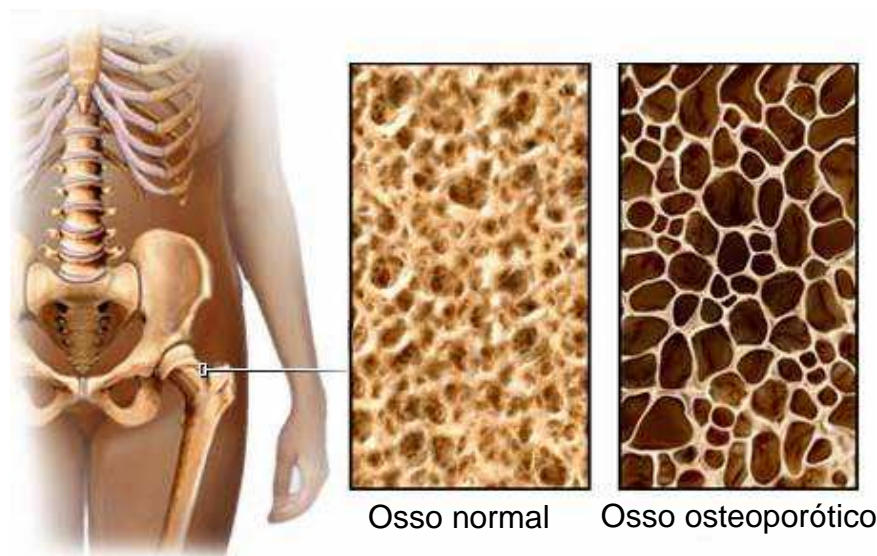


**Figura 5.** Reação de carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico.  
Fonte: DORES; PAIVA; CAMPANA, 2001.

### 2.3. A Osteoporose

A queda da mortalidade, seguida da redução da fecundidade e aumento da expectativa de vida, resultam no envelhecimento da população e no aumento das taxas de doenças crônico-degenerativas, dentre elas a osteoporose (FERRARI, 2005). As fraturas por osteoporose e as suas complicações são a principal causa de morbidade e mortalidade entre os idosos (CUMMINGS, MELTON, 2002; JOHNELL, KANIS, 2005; COOPER et al., 1993).

A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração da microarquitetura, com conseqüente aumento da fragilidade e maior susceptibilidade às fraturas. O processo de perda óssea (Figura 6) ocorre silenciosa e progressivamente, freqüentemente sem sintomas até que ocorra a primeira fratura (WHO, 1998; Consensus Development Conference, 1993; EISMAN et al., 2008).



**Figura 6.** Osso normal e osso osteoporótico.  
Fonte: Health, 2008.

Segundo a Fundação Internacional de Osteoporose (2009) entre os anos de 1990 e 2050 o número de fraturas de quadril em homens e mulheres da América latina com idade entre 50 e 64 anos irá aumentar 400%. Enquanto para outro grupo de idade, maior que 65 anos, o aumento será próximo a 700%. Esse valor corresponde a cerca de 665.648 fraturas de quadril em 2050, o que gerará um custo direto de \$13 bilhões.

Um estudo realizado em cinco países (Brasil, Argentina, Colômbia, México e Porto Rico), indicou uma prevalência de fraturas vertebrais em mulheres acima de 50 anos em torno de 15%, sendo que 7% das fraturas ocorrem em mulheres com idade entre 50 e 60 anos (IOF, 2009).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Osteoporose (2004) há no Brasil, cerca de 10 milhões de pessoas com osteoporose, dos quais, apenas 20% recebem alguma forma de tratamento. Cerca de 2,4 milhões de indivíduos apresentam algum tipo de fratura anualmente, desses 200.000 morrerão por fatores que são resultados diretos de fraturas. Do total de fraturas quase 100.000 são de fêmur e a mortalidade após um ano do ocorrido, está em torno de 20 a 24%.

As fraturas mais comuns associadas à osteoporose ocorrem no quadril, coluna e punho. A incidência dessas fraturas, particularmente de quadril e coluna aumenta com a idade, tanto em homens como em mulheres. As fraturas vertebrais podem resultar em sérias conseqüências, incluindo redução da altura, intensa dor e deformidade. Já as fraturas de quadril freqüentemente causam dor intensa e requerem cirurgia, cuja recuperação é lenta e reabilitação normalmente incompleta, o que resulta em perda da capacidade de viver com independência (KANIS et al., 2008).

No caso da osteoporose secundária, causada por doenças ou medicação, a avaliação e o controle da condição de base são imprescindíveis para a prevenção e o tratamento da alteração óssea (RAISZ, 2005; BISKOBING, 2002).

### 2.3.1. Diagnóstico da Osteoporose

Uma larga variedade de técnicas encontra-se disponível para avaliar a quantidade de osso mineral (BLAKE; FOGELMAN, 2007; ENGELKE; GLUER, 2006; GLUER; LU; ENGELKE, 2006). A técnica mais largamente utilizada é baseada na absorbância de raios X, particularmente a Absorciometria por dupla emissão de raios X (DXA), técnica muito sensível para tecidos constituídos de cálcio como o osso. Esse exame é considerado a melhor forma de se determinar a saúde óssea segundo os critérios definidos pela *The International Society for Clinical Densitometry*, podendo determinar fatores de risco para fraturas, e medir a resposta ao tratamento. Além disso, configura-se num teste simples, não-invasivo, indolor e com baixa emissão de radiação (HANS et al., 2006; HAMMOUDEH; AL-KHAYARIN; ZIRIE, 2005; SUGIGUCHI et al., 2009; MUNOZ-TORRES et al., 2009). Assim, o diagnóstico da osteoporose se dá com a determinação do T-score (comparação em relação à média esperada para uma população de adultos jovens) na coluna lombar, fêmur total e colo femoral. (Consensus Development Conference, 1993).

Existem várias classificações (Tabela 1) para a quantidade de massa óssea com o objetivo de se verificar se o valor obtido pelo método diagnóstico está abaixo do normal.

**Tabela 1.** Critérios Densitométricos da Organização Mundial da Saúde\*:

<b><i>Categoria</i></b>	<b><i>Escore T (DP)</i></b>
Normal	$\geq -1$
Osteopenia	Entre -1 e -2,5
Osteoporose	$\leq -2,5$
Osteoporose severa	< -2,5 associada à fratura de fragilidade

\*Critérios estabelecidos para: coluna lombar, colo do fêmur e 1/3 médio do rádio.  
Fonte: WHO, 1998.

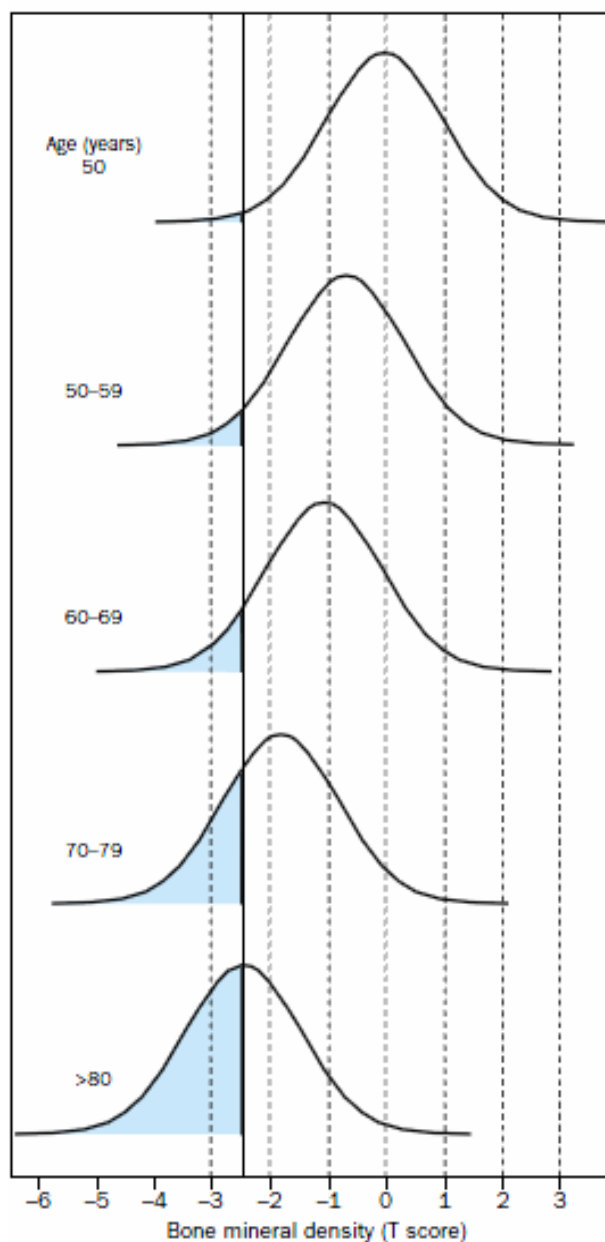
Em mulheres, a perda de massa óssea ocorre predominantemente após a menopausa. Na população jovem e saudável cerca de 15% das mulheres tem um escore T menor que -1, possuindo, portanto, baixa massa óssea ou osteopenia. Devido à distribuição normal de DMO, aproximadamente 0,5% das mulheres caem no grupo de osteoporóticas, com o escore T menor ou igual a -2,5. Além disso, a proporção de mulheres afetadas pela osteoporose em qualquer sítio anatômico aumenta grandemente com a idade, da mesma maneira que aumenta o risco de fratura com a idade (WHO, 1998).

### 2.3.2. Fatores de risco para a osteoporose

Independente da etiologia, há fatores de risco bem determinados que podem contribuir para o desenvolvimento da osteoporose. Entre eles, destacam-se genética, história familiar, idade (Figura 7), baixo peso, menarca tardia, sedentarismo, deficiência de vitamina K e baixa ingestão de cálcio (RAISZ, 2005).

A osteoporose está mais relacionada ao sexo feminino pelo fato de que as mulheres apresentam menor quantidade de tecido ósseo e a perda ocorre mais rapidamente que em homens, devido à menopausa. Além disso, quanto maior a idade, maior o

risco de osteoporose, pois os ossos tornam-se mais finos e fracos com o envelhecimento (MELTON, 2003).



**Figura 7.** Distribuição da densidade mineral óssea de mulheres de diferentes idades, e a prevalência da osteoporose (azul). A DMO é normalmente distribuída para todas as idades, mas decresce progressivamente com a idade. A proporção de pacientes com osteoporose cujo escore T é menor ou igual a -2,5 DP aumenta exponencialmente com a idade. Fonte: KANIS, 2002.

### 2.3.3. Formas de Tratamento Utilizadas na Osteoporose Pós-Menopausa

Dois são os principais hormônios sexuais femininos (HSF) nos seres humanos, os estrogênios e a progesterona. A progesterona, por sua vez, também participa do metabolismo ósseo, sobretudo da síntese de matriz óssea (BILEZIKIAN; RAISZ; RODAN, 1996; BLAND 2000). Sabe-se que a progesterona estimula a proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras (ISHIDA; TERTINEGG; HEERSCHKE, 1996; ISHIDA; HEERSCHKE, 1997) também regulando a secreção de fatores de crescimento em mineralização óssea pelos osteoblastos. Todavia, os principais efeitos metabólicos no tecido ósseo são provenientes de um outro tipo de HSF, os estrogênios (MAC NAMARA; LOUGHREY, 1998; GAUMET et al., 1996; GAUMET-MEUNIER et al., 2000).

Tem sido extensamente demonstrado que a deficiência estrogênica na pós-menopausa leva, entre outras coisas, a osteoporose em mulheres. Este efeito na redução da densidade mineral óssea (DMO) é também observado em modelos animais que mimetizam a menopausa, como a castração (ou ovariectomia em ratas, ditas doravante OVX). A OVX em ratas produz um fenótipo osteoporótico definitivo nestes animais, tornando-os excelentes modelos para o estudo da osteoporose pós-menopausa. Ademais, é sabido que a perda de massa óssea induzida pela deficiência estrogênica decorre da perda óssea do intenso remodelamento no qual a reabsorção supera deposição óssea (RODAN; MARTIN, 2000; TEITELBAUM, 2007).

Para contornar-se a perda de massa óssea (e conseqüente instauração do padrão osteoporótico em mulheres pós-menopausadas) a principal estratégia terapêutica ainda utilizada em muitos países é a reposição hormonal (RH) ou administração de análogos de estrogênio, denominados de Modulares Seletivos dos Receptores de Estrogênio (do inglês *Selective Estrogen Receptors Modulators*, ou SERMs) (RIGGS; HARTMANN, 2003). Essas estratégias terapêuticas para o tratamento da osteoporose pós-menopausa apresentam excelentes resultados, tanto em pacientes quanto em modelos animais. Contudo, estudos realizados ao longo das últimas três décadas demonstraram que a RH em mulheres pós-menopausadas aumenta significativamente a incidência nesta população dos cânceres de mama, de endométrio e de ovário (Consensus Development Conference, 1993). Esta sinistra

observação levou a *Food and Drug Administration* (FDA, agência reguladora de medicamentos dos Estados Unidos da América) a banir a terapia hormonal da prática clínica nos EUA. Esta resolução tem sido também adotada em vários outros países pelo importante ônus sócio-econômico associado a este efeito adverso da RH. O advento de tão importantes efeitos deletérios da RH levou, desde então, a uma busca incessante de novos agentes terapêuticos que possam ser usados no tratamento da osteoporose pós-menopausa. Neste ínterim, o uso do modelo OVX - em adição às novas tecnologias de imagem e de biologia celular e molecular - tem propiciado um grande avanço no entendimento dos mecanismos de ação do estrogênio no tecido ósseo.

Contudo, por se tratarem de espécies distintas (ratos e humanos) os efeitos da diminuição do estrogênio circulante apresentam algumas peculiaridades que devem ser consideradas. Por exemplo, foi observado que em ratas OVX, a administração de estrogênio ou raloxifeno (um tipo de SERM) promovem um significativo aumento do volume do canal medular da tíbia após a ovariectomia, devido ao aumento líquido da reabsorção óssea, fato esse que difere dos resultados observados em mulheres (DAHINTEN; PUCCIARELLI, 1986; KALU et al., 1989). Em adição, observa-se também em ratas OVX um aumento da formação óssea periosteal (TURNER; VANDERSTEENHOVEN; BELL, 1987). Conjuntamente, estes dados indicam que o volume ósseo cortical diminui muito lentamente em ratas OVX, diferente da elevada taxa de reabsorção óssea em mulheres pós-menopausadas, que pode chegar à redução de quase um por cento (1%) da massa óssea por ano (KALU et al., 1989).

Aparentemente, o volume ósseo cortical pode aumentar rapidamente em ratos em crescimento, pois o crescimento ósseo periosteal pode exceder a reabsorção do osso, resultando em pequena redução da massa óssea (TURNER; WAKLEY; HANNON, 1990). Em ratas velhas (mais de 8 meses de idade), a ovariectomia, contudo, resulta numa severa perda de osso trabecular e aumento do tamanho dos osteoclastos em ossos longos e vértebras de ratas. Simultaneamente, ocorre aumento na aposição mineral e de formação óssea, que sugere que a ovariectomia resulta em crônica e alto remodelamento ósseo por pelo menos 1 ano após a ovariectomia (COWIN; WEINBAUM; ZENG, 1995). Portanto, conclui-se que, não

obstante o importante papel dos modelos animais para o estudo da osteoporose pós-menopausa, os mesmos devem ser analisados com cautela para que os resultados obtidos por tais experimentos possam ser extrapolados para os seres humanos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

Esta dissertação de mestrado objetivou estudar os efeitos osteometabólicos da interação do alendronato e da vitamina K sobre uma gama de parâmetros relacionados à integridade do tecido ósseo em um modelo animal que mimetiza a menopausa, rata OVX. Para alcançar este objetivo foi realizada uma série de análises que envolvem desde o perfil bioquímico até os estudos de imagens, que propiciaram os resultados e as conclusões descritas a seguir.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Realizar medida de peso úmido e morfometria de útero para validação da ovariectomia.
- Realizar análises por DXA para obtenção da DMO, CMO e área nos diferentes grupos.
- Realizar análises de DPD na urina dos animais.
- Realizar análises sorológicas e urinárias de cálcio e fósforo.
- Realizar análises sorológicas de fosfatase alcalina.
- Realizar morfometria de fêmur.

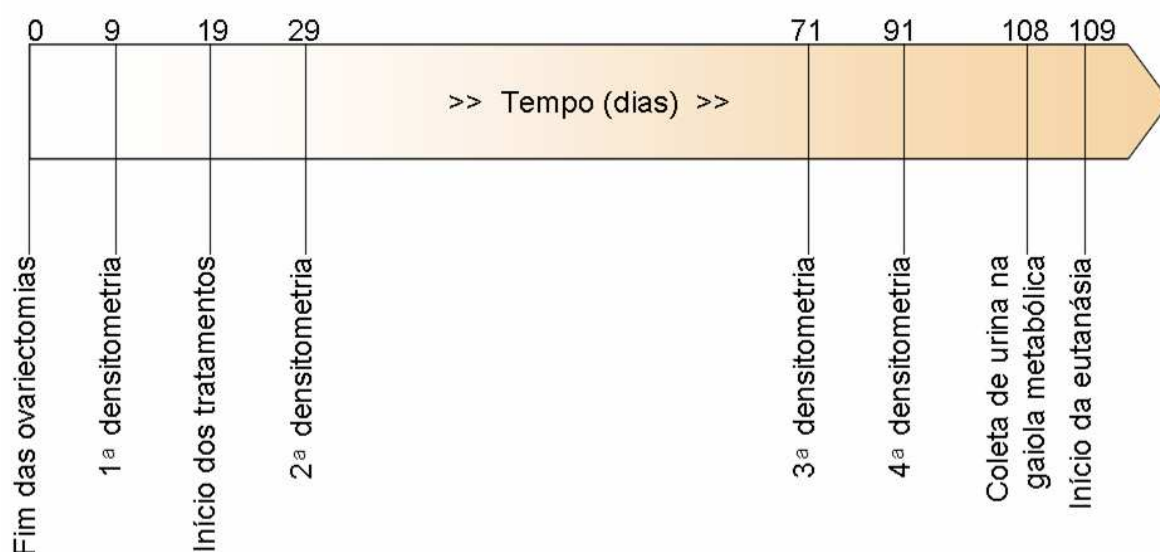
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Aprovação do projeto

O Comitê de Ética em Pesquisa com Animais, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, avaliou, aprovou e acompanhou o referido estudo (Anexo 1).

### 4.2. Delineamento experimental

Com o intuito de evitar resultados discrepantes da literatura, optou-se por utilizar o modelo de rata OVX, amplamente utilizado na bibliografia disponível. Foram utilizadas 20 ratas com peso corporal médio de 200, obtidas do Biotério do CCS/UFES. Estas ratas tiveram seus ciclos estrais sincronizados através da alocação das mesmas em salas exclusivas para fêmeas e equilibradas por quatro (4) semanas de confinamento, com água e comida *ad libitum*. Passado este período, os diferentes procedimentos e tratamentos foram realizados segundo o esquema abaixo (Figura 8)



**Figura 8.** Linha do tempo que apresenta as principais atividades realizadas, desde a ovariectomia (dia 0) até a eutanásia (dia 109).

O esquema inicia-se com o fim das ovariectomias (dia 0), seguido da realização da primeira densitometria (dia 9), início dos tratamentos com alendronato e/ou vitamina K (dia 19), segunda densitometria (dia 29), terceira densitometria (dia 71), quarta densitometria (dia 91), coleta de urina de 24 h utilizando gaiola metabólica (dia 108) e início da eutanásia (dia 109).

### 4.3. Ovariectomia e distribuição dos grupos

Para a realização dos experimentos foram utilizadas 40 ratas (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 200g, oriundas do Biotério do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos, com 8 animais cada. Desses grupos, 4 destinavam-se a cirurgia de ovariectomia e 1 a cirurgia SHAM ou falsa ovariectomia. Em seguida, realizou-se a ovariectomia. Os animais foram anestesiados com xilazina (5-10 mg/Kg) e quetamina (50-75 mg/Kg). Procedeu-se, então, a tricotomia da região abdominal lateral, incisão da pele e musculatura, na região abaixo da última costela e próximo ao rim. O ovário foi identificado e exposto, sendo realizada a ligação da parte superior da trompa com fio de sutura para evitar hemorragia. O ovário e a gordura circundante foram excisados, e a musculatura e a pele foram suturadas. Esse procedimento cirúrgico foi realizado bilateralmente em cada animal. Os 8 animais restantes foram submetidos à falsa ovariectomia (grupo SHAM), isto é, seus ovários foram apenas identificados e expostos cirurgicamente, sendo a seguir reposicionados. Seguiu-se com a sutura da musculatura e pele previamente excisadas.

Assim, os grupos foram determinados de acordo com a distribuição abaixo:

**Grupo 1:** SHAM - este grupo de animais foi submetido a falsa ovariectomia e recebeu água e ração *ad libitum* até o sacrifício;

**Grupo 2:** OVX - este grupo de animais foi submetido a cirurgia de ovariectomia bilateral e recebeu água e ração *ad libitum* até o sacrifício;

**Grupo 3:** OVX VK - este grupo de animais foi submetido a cirurgia de ovariectomia bilateral e recebeu solução de VK3 (4,3 g/L) e ração *ad libitum* até o sacrifício;

**Grupo 4:** OVX ALE - este grupo de animais foi submetido a cirurgia de ovariectomia bilateral e recebeu solução de alendronato (0,32g/L) e ração *ad libitum* até o sacrifício.

**Grupo 5:** OVX VK+AL – este grupo de animais foi submetido a cirúrgica de ovariectomia bilateral, e ainda, recebeu solução de VK3 (4,3g/L) + alendronato (0,32g/L) e reação *ad libitum* até o sacrifício.

É importante ressaltar que a fim de acompanhar o ganho de peso corporal dos animais durante o experimento, todos foram devidamente pesados. O experimento foi conduzido em gaiolas, com 4 animais em cada, forrada com cama de maravalha. As gaiolas foram lavadas 2 vezes por semana e a cama substituída. Ao final do tratamento, as ratas foram colocadas em gaiola metabólica individual para a coleta de urina de 24h. Ao fim de todos os experimentos foi realizada a eutanásia sob sedação com overdose de pentobarbital sódico (Thiopentax, Crisália, Brasil). O sangue foi retirado por punção cardíaca (exsanguinação) e, em seguida foram retirados os fêmures e o útero que foram processados conforme a devida finalidade.

### **4.3. Validação da Ovariectomia**

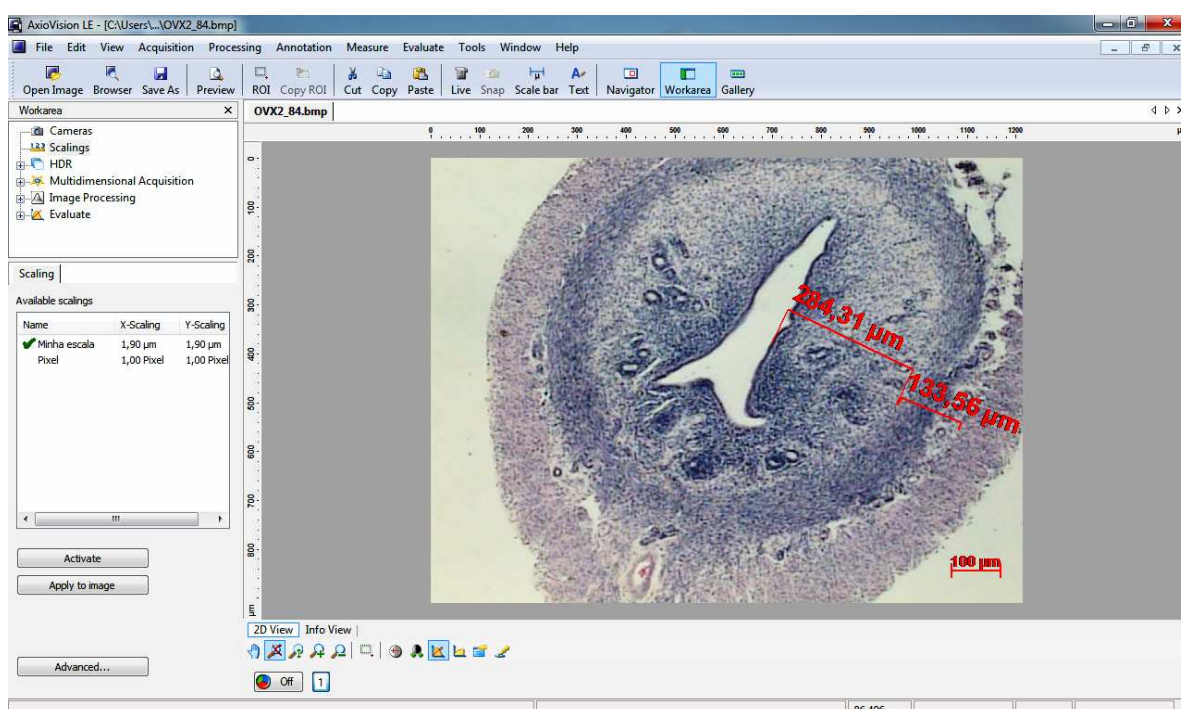
#### **4.3.1. Peso úmido dos úteros**

A medida do peso úmido foi realizada logo após a eutanásia de cada animal. Ela foi utilizada como método complementar a histomorfometria de útero para comprovar a eficiência da ovariectomia.

#### **4.3.2. Histomorfometria dos úteros**

Após o sacrifício dos animais, os úteros foram limpos e pesados para a determinação do peso úmido, e em seguida colocados no formol 4% diluído em

tampão fosfato salino (PBS) pH 7,40 a 4°C para fixação. Após a fixação, os úteros foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Em seguida, utilizando um micrótomo foram realizados cortes de 10 µm de espessura. Os cortes foram capturados em lâminas de vidro, corados com Hematoxilina Férrica de Weigert (Sigma Aldrich, EUA) e Eosina (Sigma Aldrich, EUA). Para a captura das imagens, foi utilizado um microscópio óptico (*BEL Photonics*) acoplado a uma videocâmera. As imagens foram digitalizadas utilizando o software de captura de imagem Honestech TVR 2.5, e analisadas com o software AxioVision 4.8 (Figura 9).



**Figura 9.** Software AxioVision utilizado para a morfometria de útero.

Para a análise histomorfométrica de útero utilizaram-se três cortes transversais e sequenciais dos cornos uterinos, que foram divididos em quatro quadrantes, de maneira que obtivemos doze medições. Realizou-se a média dos valores obtidos do endométrio e do miométrio em micrômetros.

#### 4.4. Determinação da Integridade do Tecido Ósseo

##### 4.4.1. Análise por Absorciometria por Dupla de Emissão de Raios X (DXA)

Quatro animais dos diferentes grupos experimentais (SHAM; OVX; OVX VK; OVX ALE; OVX VK+ALE), após sedação com quetamina e xilazina, foram analisados por DXA para a obtenção da Densidade Mineral Óssea (DMO) e do Conteúdo Mineral Ósseo (CMO). Foram realizadas quatro análises: a primeira 9 dias após a ovariectomia, a segunda 20 dias após a primeira (e 10 dias após o início dos tratamentos), a terceira 42 dias após a segunda e a quarta 20 dias após terceira. Os esqueletos foram visualizados tridimensionalmente utilizando o equipamento Discovery 4500A (Hologic) (Figura 10) e o *software* APEX 13.0 (versão Discovery 12.4). Após análise dos dados, obtiveram-se os resultados de densidade mineral óssea (DMO), conteúdo mineral ósseo (CMO) e área corporal.



**Figura 10.** Equipamento utilizado para análise da densidade mineral óssea por absorciometria por dupla emissão de raio X (DXA), pertencente ao CEDOES.

Essa etapa foi realizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES) e os resultados foram analisados pelo Dr. Sérgio Ragi Eis, médico ortopedista e diretor do CEDOES.

#### 4.4.2. Histomorfometria de óssea

Após o sacrifício dos animais, os fêmures dos diferentes grupos experimentais foram desarticulados, limpos e fixados em formaldeído 4% tamponado a 4°C. Realizou-se a descalcificação com solução de ácido fórmico e citrato de sódio, também conhecida como solução Morse, até a completa descalcificação. Os tecidos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Procedeu-se, então, os cortes histológicos longitudinais (10µm) do fêmur utilizando um micrótomo, a montagem em lâmina e a coloração com Hematoxilina Férrica de Weigrt (Sigma Aldrich, EUA) e Safranina O (Sigma Aldrich, EUA). Para tanto, foram utilizados três campos de cada lâmina.

Para cada animal foi preparada uma lâmina com vários cortes, e foi realizada a medida a espessura do osso compacto (distância entre a superfície periosteal e endosteal), também de três cortes seqüenciais. Para a medida do osso compacto foram realizadas duas medidas eqüidistantes da cada lado do osso. O resultado final para cada animal foi determinado através da medida dos valores obtidos, expresso em micrômetros. Os cortes histológicos foram capturados em microscópio óptico da marca *BEL Photonics* (Brasil) acoplado a uma videocâmera, digitalizadas utilizando o software de captura de imagem *Honestech TVR 2.5* e analisados utilizando o software *AxioVision 4.8* para a obtenção da espessura do osso compacto.

#### 4.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura na Zona de Reabsorção Óssea

Com o objetivo de visualizar a iminência de alguma alteração ultra-estrutural no tecido ósseo dos diferentes grupos experimentais utilizados no presente estudo, realizamos análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) nos fêmures destes animais. Primeiramente, os ossos foram fixados, à temperatura ambiente, em uma solução aquosa contendo glutaraldeído 2,5 %, formaldeído 4,0 % e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2 por 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas, por 45 minutos, em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, e pós-fixadas, por duas horas, em uma solução contendo tetróxido de ósmio 1 % e tampão cacodilato

de sódio 0,05 M em pH 7,2, à temperatura ambiente. Após três lavagens de 45 minutos no mesmo tampão, as amostras foram submetidas a uma série de desidratação em acetona. Para a microscopia eletrônica de varredura, o material foi fixado e desidratado, como descrito anteriormente, em seguida secas pelo método do ponto crítico (Bal-Tec CPD030). Em seguida os fragmentos foram montados em suportes adequados e metalizadas com ouro (Bal-Tec – SCD050). A observação e imagens foram feitas no microscópio eletrônico de varredura (EVO 040 e DSEM962 – ZEISS), a uma aceleração de voltagem variando até 25 kV.

Esta etapa foi realizada em no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

#### **4.5. Análises Sorológicas e Urinárias para Determinação do Perfil Osteomineral**

##### **4.5.1. Perfil Mineral do Metabolismo de Cálcio e Fosfato**

As concentrações de creatinina, cálcio e fósforo da urina de 24 horas foram medidas utilizando conjuntos bioquímicos da BIOCLIN (Quibasa Química Básica). Para normalização dos dados, as concentrações de cálcio e fósforo foram corrigidas pela concentração da creatinina, medida pelo método do ácido pícrico. Também foram dosadas as concentrações de creatinina, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina (marcador de formação óssea) no soro, utilizando-se kits bioquímicos da BIOCLIN. Ambos os métodos colorimétricos e do ácido pícrico foram realizados de acordo com o manual do fabricante, utilizando-se um espectrofotômetro (Biospectro SP-220).

##### **4.5.2. Análise de Marcadores de formação e Reabsorção Óssea: Fosfatase Alcalina Sérica e de Deoxipiridinolinas Urinárias (DPD)**

A quantificação da Fosfatase Alcalina sérica (marcador de formação óssea) foi realizada por método espectrofotométrico utilizando kit comercial comprado pela

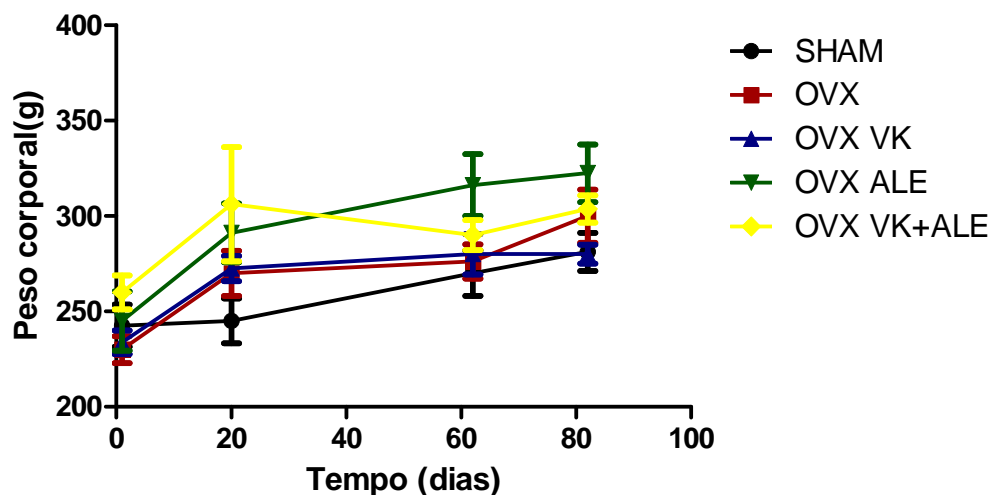
Bioclin, Brasil, e expressa em U/L de soro. A medida quantitativa da excreção urinária de ligações cruzadas de deoxipiridinolina (DPD), um indicador específico da reabsorção óssea, foi avaliada utilizando-se o método de imunoenensaio enzimático competitivo chamado METRA® DPD e um leitor multiplacas (BIOCLIN MR-96). Os resultados obtidos com o ensaio METRA DPD foram corrigidos para as variações na concentração urinária dividindo o valor de DPD (nmol/L) pelo valor da creatinina (mmol/L) de cada amostra. Os resultados finais do ensaio foram expressos como nmol DPD/mmol creatinina.

#### **4.6. Análise estatística**

O programa *GraphPad Prism*®, versão 5.0 para *Windows 2007*, foi empregado para a realização dos testes estatísticos e apresentação gráfica. Para avaliação dos resultados entre os diferentes grupos foi utilizado o teste de Análise de Variância Simples (ANOVA *one-way*) seguido do pós-teste de *Tukey* para comparação múltipla, enquanto para comparação de apenas dois grupos foi realizado o teste t. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5%. Os resultados foram expressos como média e erro-padrão ( $X \pm EP$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação do peso corporal dos animais

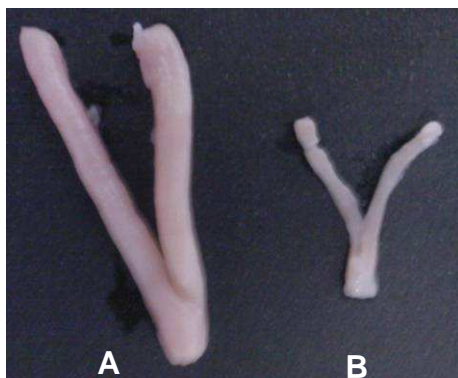


**Gráfico 1.** Curva temporal do peso dos animais ao longo do tratamento. Não houve diferença estatisticamente significativa do peso dos animais em nenhum período.

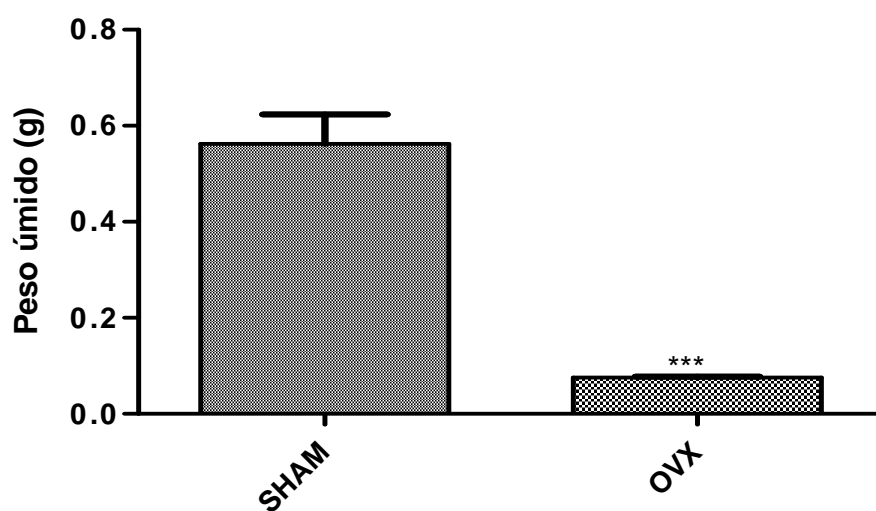
O peso corporal das ratas não diferiu significativamente entre os cinco grupos durante o período de estudo. Pode-se observar, somente, que o grupo OVX teve leve aumento do peso corporal, assim como o grupo tratado com VK e/ou ALE tiveram seu peso aumentado induzido pela ovariectomia (Gráfico 1).

### 5.2. Validação da Ovariectomia

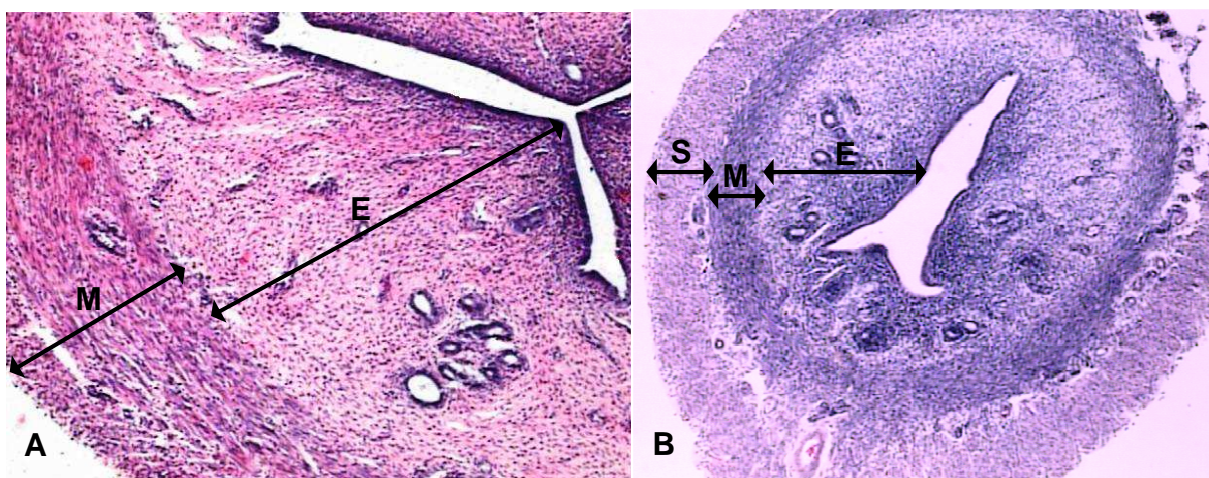
No modelo experimental utilizado, a ovariectomia foi realizada a fim de induzir a deficiência de estrogênio semelhante à que ocorre em mulheres após a menopausa. A eficiência do procedimento de ovariectomia pode ser comprovada pela observação da atrofia do útero, verificada no momento do sacrifício das ratas através da verificação visual (Figura 11) e após medida do peso úmido (Gráfico 2). Foi também realizada a histomorfometria dos úteros visando a avaliar os efeitos sistêmicos da falta do estrogênio através da atrofia do endométrio (Figura 12 e Gráfico 3).



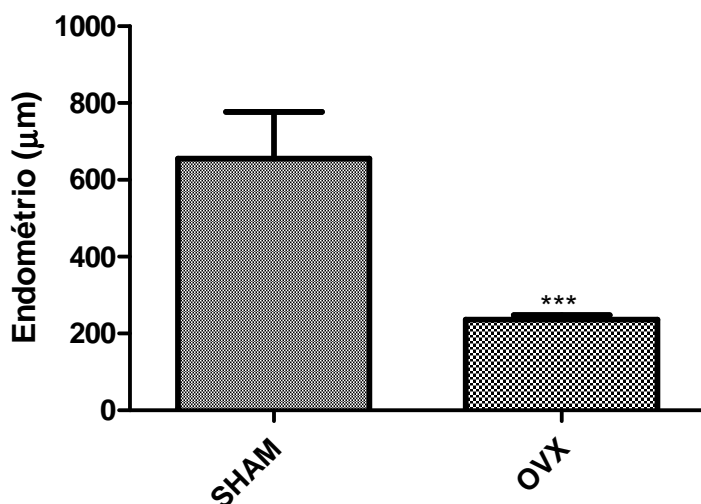
**Figura 11.** Útero de ratas logo após o sacrifício. Em (A) SHAM e em (B) OVX.



**Gráfico 2.** Avaliação do peso úmido do útero das ratas. Observa-se uma diminuição estatisticamente significativa do peso úmido dos animais OVX em relação ao SHAM, utilizando o teste t não pareado. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. SHAM.



**Figura 12.** Histomorfometria do útero de ratas. Em (A) rata SHAM e em (B) rata ovariectomizada (OVX) em 40X. M- músculo liso; E- endométrio; S- camada serosa.



**Gráfico 3.** Avaliação da ovariectomia em relação à involução do endométrio. Este gráfico comprova a eficiência da ovariectomia devido à involução do endométrio com valores estatisticamente diferentes. \*\*\*  $p < 0,001$  vs. SHAM.

### 5.3. Integridade do Tecido Ósseo

#### 5.3.1. Absorciometria por Dupla Emissão de Raios X (DXA)

Para melhor se determinar a saúde óssea dos animais foi realizada a DXA. Esta técnica é muito utilizada para se determinar fatores de risco para fraturas, e medir a resposta ao tratamento. Na Figura 13 encontra-se o resultado de DXA de uma animal do grupo SHAM (da forma em que foi emitida pelo CEDOES), e na Figura 14, imagens e resultados de DMO, CMO e área de animais dos grupos OVX, OVX VK, OVX ALE e OVX VK+ALE.

**CEDOES - Diagnóstico e Pesquisa**  
 Rua João da Silva Abreu 78 - Vitória (ES) CEP 29055.450  
 www.cedoes.com.br

Telephone: (27) 21252083

E-Mail: cedoes@cedoes.com.br

Fax: (27) 21250227

Name: teste de small animals  
 Patient ID: 67  
 DOB:

Sex: Female  
 Ethnicity: Pediatric

Height:  
 Weight:  
 Age:

Referring Physician:



279 x 195

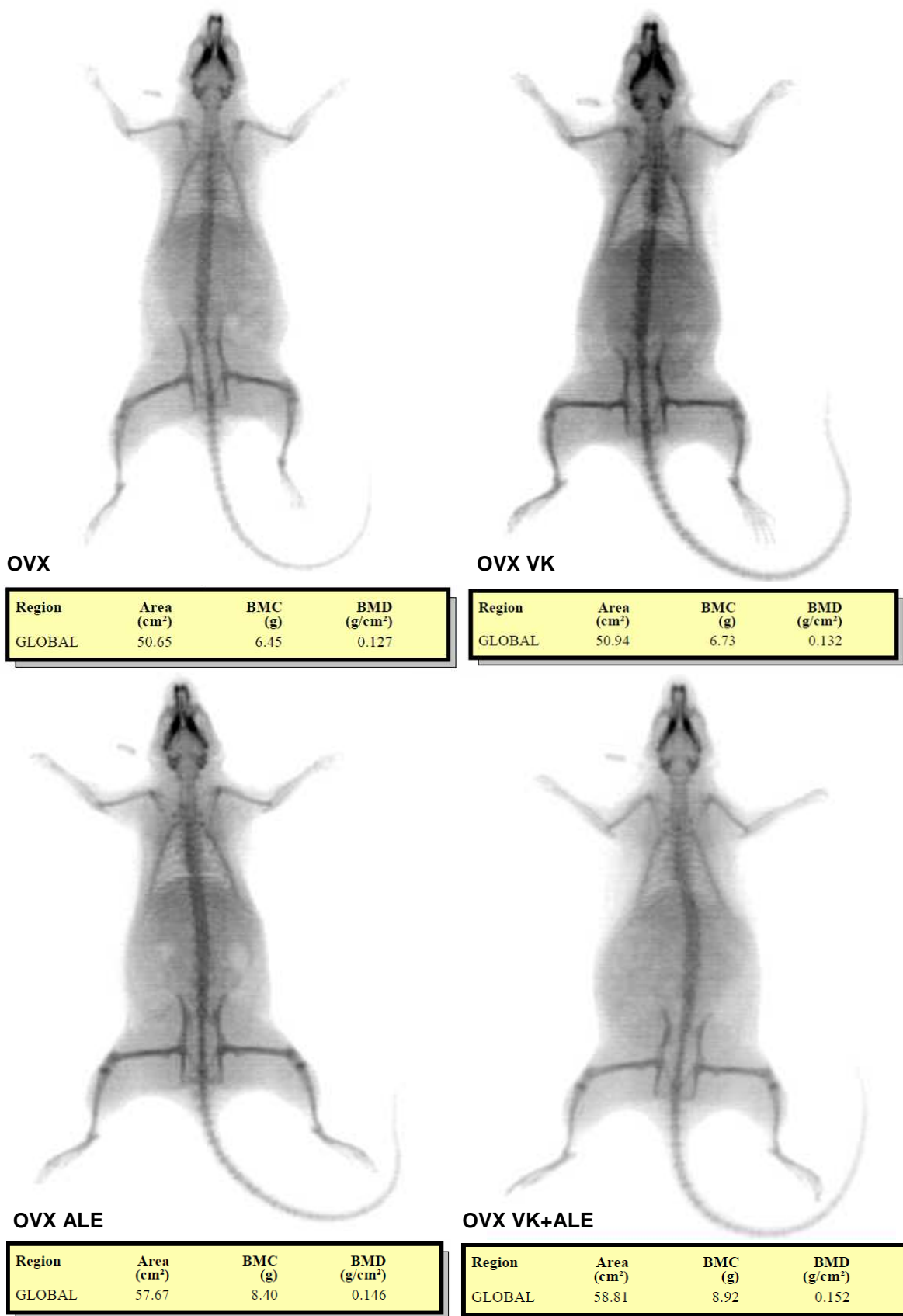
**Scan Information:**

Scan Date: 26 June 2008 ID: H06260803  
 Scan Type: a Rat WB  
 Analysis: 13 December 2009 14:31 Version 13.0  
 Rat Whole Body  
 Operator:  
 Model: Discovery A (S/N 45320)  
 Comment:

**DXA Results Summary:**

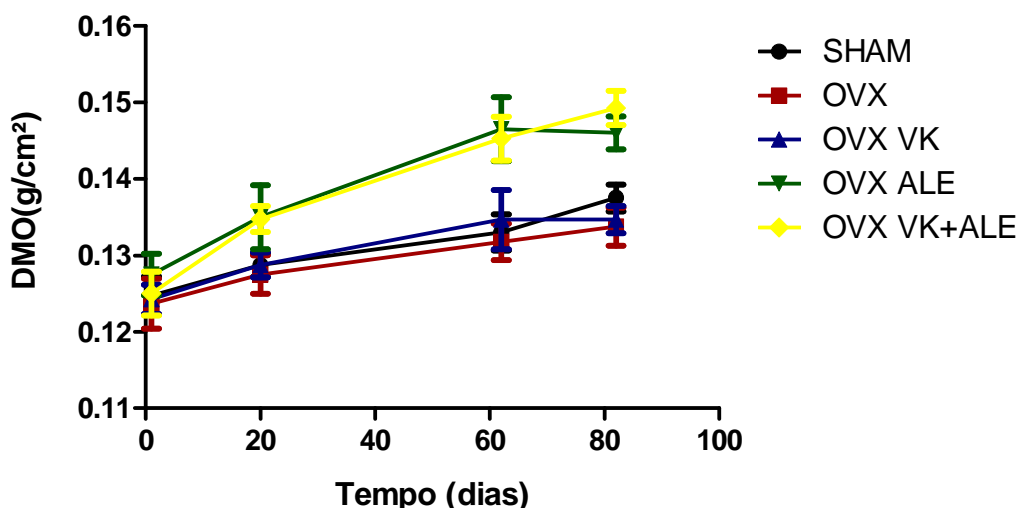
Region	Area (cm <sup>2</sup> )	BMC (g)	BMD (g/cm <sup>3</sup> )
GLOBAL	52.94	7.06	0.133

**Figura 13.** Resultado de exame DXA de um animal do grupo SHAM.



**Figura 14.** Imagens e resultados de DXA dos quatro grupos OVX. Na parte superior estão os grupos OVX e OVX VK, e na inferior estão os grupos OVX ALE e OVX VK+ALE.

Durante o tratamento, que teve duração de 82 dias, foram obtidos os seguintes resultados de acordo com a DXA (Gráfico 4):

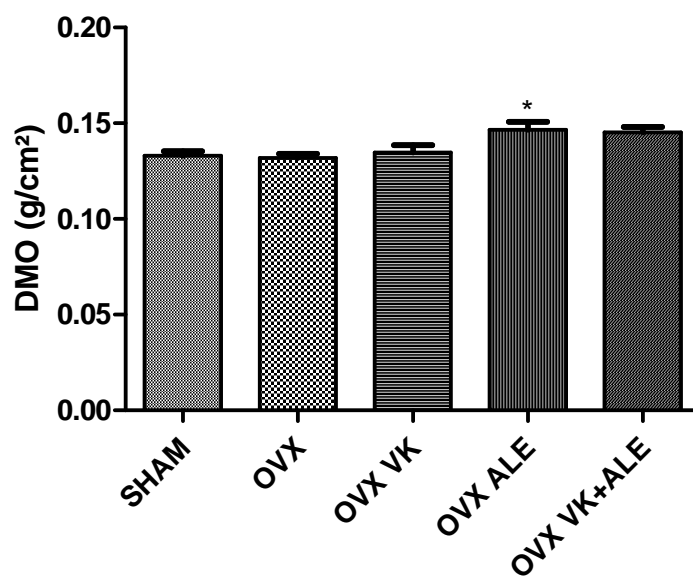


**Gráfico 4.** Densidade mineral Óssea (DMO) ao longo de um período de 82 dias, no qual foram realizadas quatro densitometrias (dias 1, 20, 62 e 82). Houve diferença estatisticamente significativa na terceira e quarta densitometrias, como mostrado nos gráficos 5 e 6.

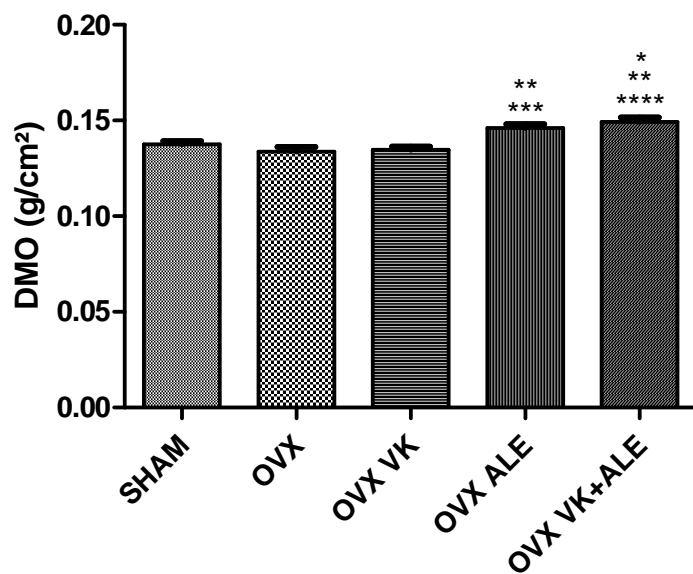
Na primeira densitometria (realizada 9 dias após a ovariectomia e antes do início do tratamento) e na segunda (realizada 29 dias após a ovariectomia e 10 dias após o início do tratamento) não havia diferença significativa de DMO entre os diferentes grupos experimentais.

Na terceira densitometria (Gráfico 5), que foi realizada 71 dias após a ovariectomia e 52 dias após o início do tratamento observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo OVX vs. OVX ALE ( $p < 0,05$ ).

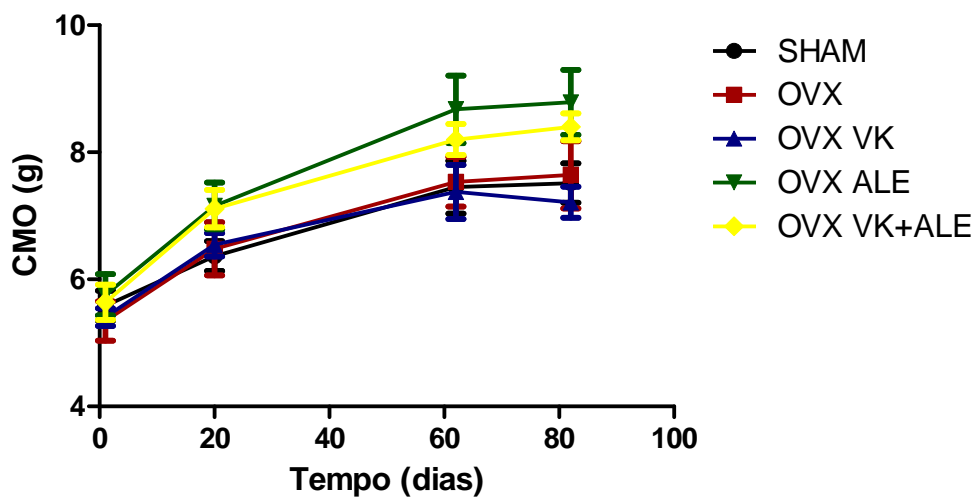
Na última densitometria (Gráfico 6), realizada 91 dias após a ovariectomia e 72 dias após o início do tratamento observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos: SHAM vs. OVX VK+ALE ( $p < 0,05$ ); OVX vs. OVX ALE e OVX vs. OVX VK+ALE ( $p < 0,01$ ); OVX VK vs. OVX ALE e OVX VK vs. OVX VK+ALE ( $p < 0,01$ ). Juntamente com as análises de DMO obtivemos os resultados do conteúdo mineral ósseo (Gráfico 7) e área corporal (Gráfico 8). Quanto a essas análises, não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos.



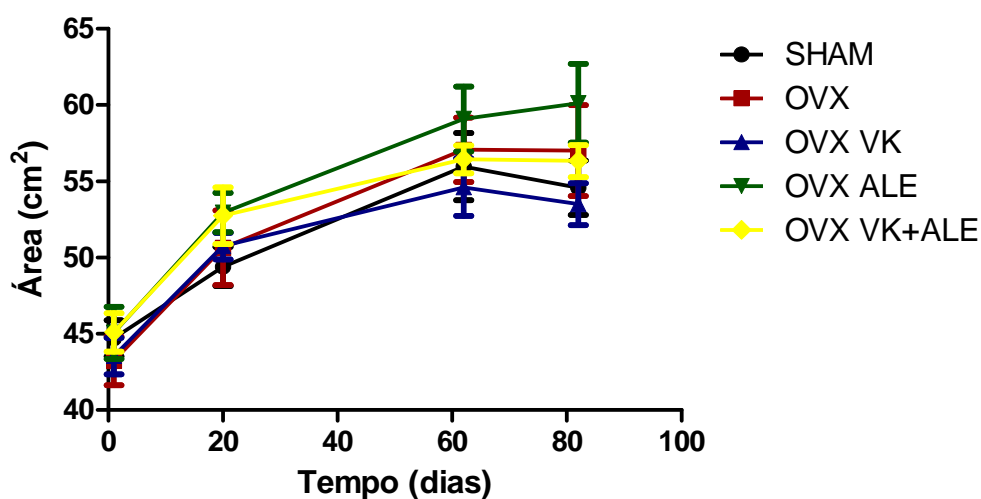
**Gráfico 5.** Densidade mineral óssea (DMO) na terceira densitometria. Houve diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos OVX e OVX ALE. \*  $p < 0,05$  vs. OVX.



**Gráfico 6.** Densidade Mineral Óssea (DMO) ao final do tratamento. \*  $p < 0,05$  vs. SHAM; \*\*  $p < 0,01$  vs. OVX; \*\*\*  $p < 0,05$  vs. OVX VK; \*\*\*\*  $p < 0,01$  vs. OVX VK.



**Gráfico 7.** Conteúdo mineral ósseo (CMO) ao longo do tempo (82 dias), nos quais foram realizadas 4 densitometrias (dias 1, 20, 62, 82). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos durante o período em que foram realizadas as densitometrias.



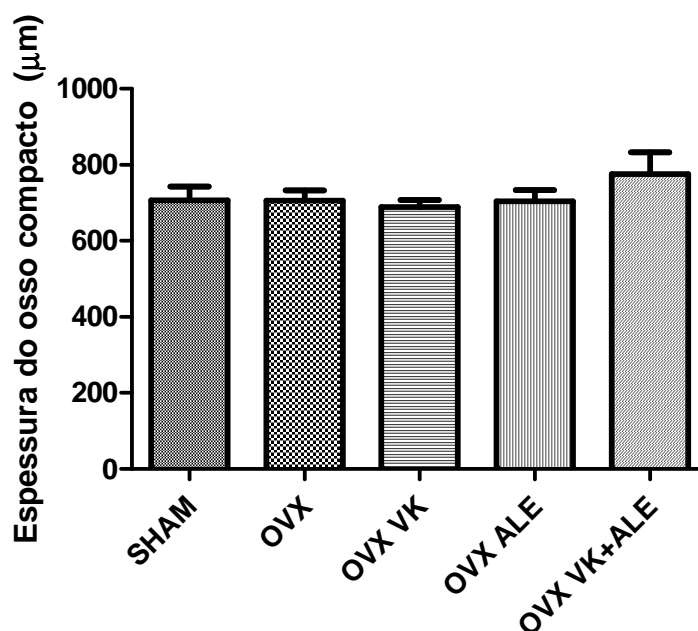
**Gráfico 8.** Avaliação da área corporal ao longo de 82 dias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

### 5.3.2. Histomorfometria de fêmur

A histomorfometria de fêmur foi realizada a fim de detectar alguma alteração na espessura do osso compacto. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (Figura 15 e Gráfico 9).



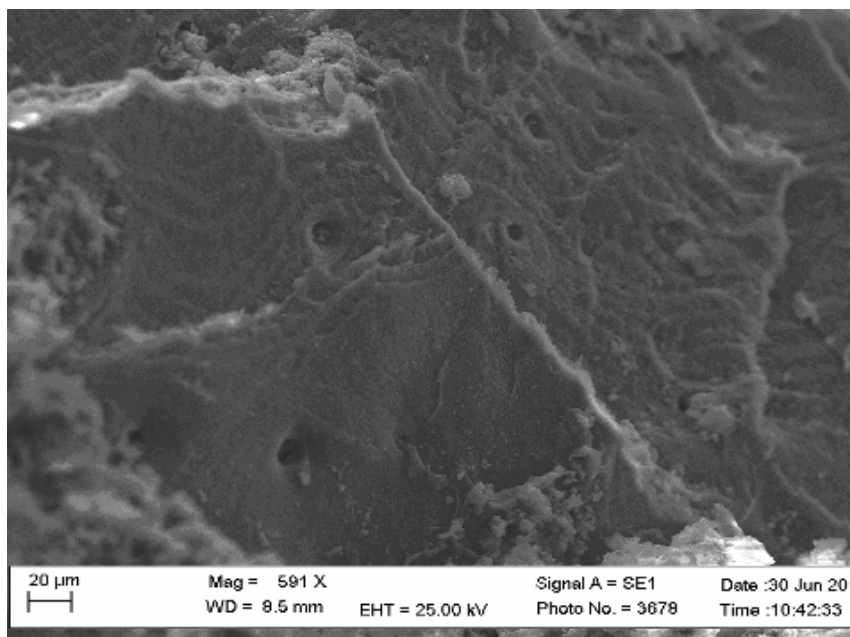
**Figura 15:** Visão dos ossos (fêmures) processados para análise histomorfométrica.



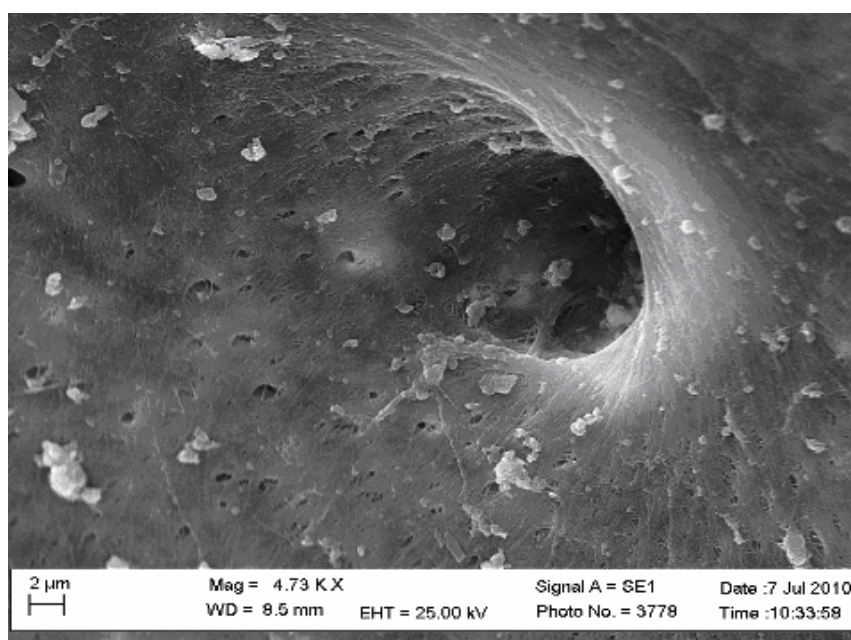
**Gráfico 9.** Avaliação da espessura do osso compacto. Não se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao parâmetro espessura do osso compacto.

### 5.3.3. Análise do Efeito da Ovariectomia (OVX) na Ultraestrutura do Osso Compacto por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Objetivando verificar algum efeito nanoscópico na ultra-estrutura do osso compacto, utilizamos de análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para observar alguma possível alteração nos fêmures dos diferentes grupos experimentais. As Figura 16 e Figura 17 mostram eletromicrografias de varredura representativas (n = 3) dos ossos compactos dos fêmures de animais SHAM (Figura 16) e OVX (Figura 17). Nota-se um aumento considerável no número de osteoclastos aderidos ao tecido nos animais OVX, caracterizando ultra-estruturalmente a zona de reabsorção óssea.



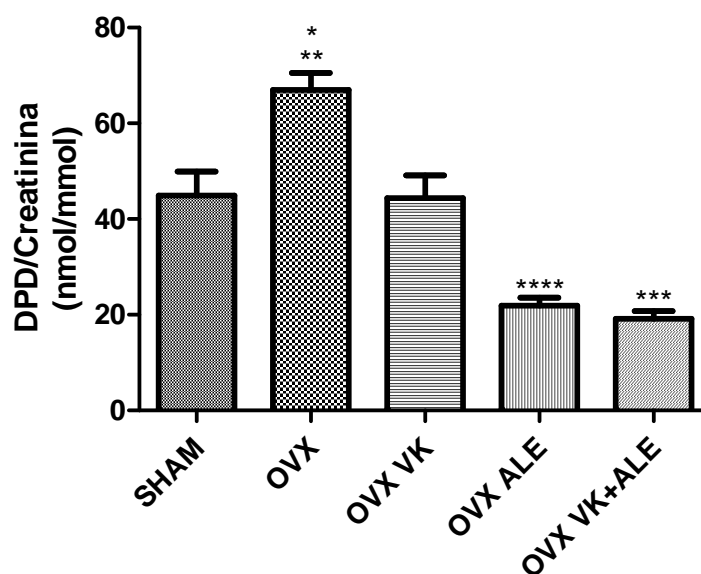
**Figura 16.** Eletromicrografia de varredura mostrando a ausência de osteoclastos nos canais de Howship do osso femoral de um animal SHAM tratado.



**Figura 17.** Eletromicrografia de varredura mostrando o intenso recrutamento (e provável ativação) dos osteoclastos através dos canais de Howship nos animais OVX.

#### 5.4. Quantificação das DPDs urinárias: Marcador de Reabsorção Óssea

Para a medida específica da degradação da matriz óssea foi realizada o marcador reabsorção óssea DPD. Em nossos estudos, verificou-se uma redução estatisticamente significativa da DPD nos grupos OVX vs. SHAM e OVX VK ( $p < 0,01$ ); OVX vs. OVX VK+ALE e OVX ALE ( $p < 0,001$ ); OVX VK+ALE vs. SHAM e OVX VK ( $p < 0,01$ ); OVX ALE vs. OVX vs. SHAM e OVX VK ( $p < 0,01$ ), de acordo com o Gráfico 10.

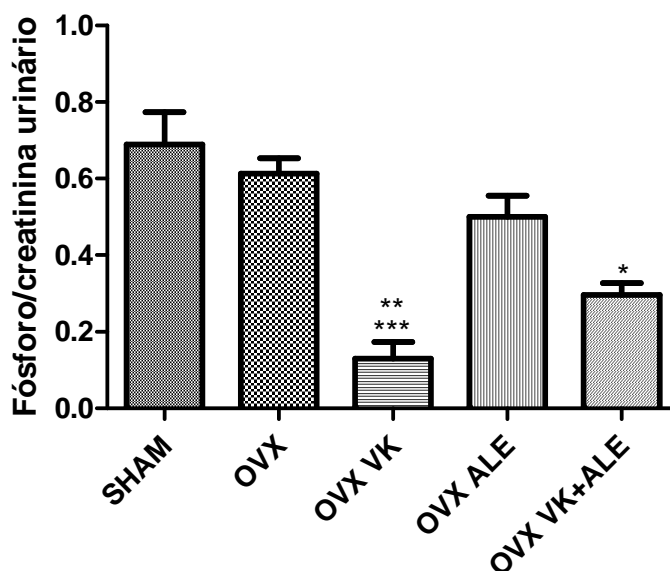


**Gráfico 10.** Avaliação da excreção urinária da deoxipiridinolina (DPD)/ creatinina. \* $p < 0,01$  vs. SHAM e OVX VK; \*\*  $p < 0,001$  vs. OVX VK+ALE e OVX ALE; \*\*\* $p < 0,01$  vs. SHAM e OVX VK; \*\*\*\* $p < 0,01$  vs. SHAM e OVX VK.

#### 5.5. Quantificação de Cálcio e Fosfato na Urina e no Soro

Com o intuito de avaliar o efeito dos diferentes tratamentos no metabolismo mineral nos grupos experimentais, foram realizadas análises de cálcio, fósforo e creatinina urinários. Quanto à análise da excreção urinária de fósforo (Gráfico 11), observou-se uma diferença estatisticamente significativa nos grupos OVX VK vs. OVX ALE ( $p < 0,01$ ); OVX VK+ALE vs. SHAM e OVX ( $p < 0,05$ ) e OVX VK vs. SHAM e OVX ( $p < 0,001$ ). Na Tabela 2 pode ser visualizada a concentração de cálcio e fósforo em relação a creatinina. De acordo com a análise, não houve diferença estatisticamente significativa do cálcio entre os grupos de estudo, mas verificou-se diferença nas

análises de fósforo para os grupos OVX VK+ALE ( $p < 0,05$  vs. SHAM e OVX), OVX VK ( $p < 0,01$  vs. OVX ALE) e OVX VK ( $p < 0,001$  vs. SHAM e OVX).



**Gráfico 11.** Avaliação da excreção urinária de fósforo. \* $p < 0,05$  vs. SHAM e vs. OVX; \*\* $p < 0,01$  vs. OVX ALE; \*\*\* $p < 0,001$  vs. SHAM e OVX.

**Tabela 2.** Excreção urinária do cálcio e do fósforo.

Grupos	Cálcio/ Creatinina	Fósforo/ Creatinina
SHAM	0,256 ± 0,034 (n = 3)	0,690 ± 0,084 (n = 3)
OVX	0,187 ± 0,013 (n = 3)	0,613 ± 0,040 (n = 3)
OVX VK	0,212 ± 0,024 (n = 3)	0,129 ± 0,440 <sup>§€</sup> (n = 3)
OVX ALE	0,168 ± 0,026 (n = 3)	0,501 ± 0,055 (n = 3)
OVX VK+ALE	0,204 ± 0,032 (n = 3)	0,296 ± 0,031* (n = 3)

\* $p < 0,05$  vs. SHAM e OVX; § $p < 0,01$  vs. OVX ALE; € $p < 0,001$  vs. SHAM e OVX.

Para avaliação da disponibilidade plasmática dos íons cálcio, as concentrações séricas do cálcio e fósforo foram também medidas (Tabela 3). Realizou-se ainda a

medida da fosfatase alcalina (FA) total, um sabido marcador da formação óssea. De acordo com análise estatística realizada não houve diferença estatística dos valores de cálcio, fósforo e FA entre os grupos. Pode-se observar, no entanto, que a atividade da FA sérica aumenta nos grupos OVX e OVX VK, diminuindo pelo tratamento com ALE e VK+ALE nas ratas OVX.

**Tabela 3.** Perfil sérico do cálcio, do fósforo e da fosfatase alcalina.

<b>Grupos</b>	<b>Cálcio (mg/dL)</b>	<b>Fósforo (mg/dL)</b>	<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>
SHAM	15,0 ± 0,6 (n = 7)	49,1 ± 0,4 (n = 7)	50,9 ± 6,5 (n = 7)
OVX	13,8 ± 0,4 (n = 7)	49,4 ± 0,5 (n = 7)	52,6 ± 5,1 (n = 7)
OVX VK	14,8 ± 0,6 (n = 7)	48,4 ± 0,6 (n = 7)	53,1 ± 6,9 (n = 7)
OVX ALE	16,3 ± 1,1** (n = 7, p<0,05)	48,3 ± 2,2 (n = 7)	43,0 ± 5,5 (n = 7)
OVX VK+ALE	16,1 ± 0,6** (n = 7, p<0,05)	48,3 ± 0,6 (n = 7)	38,7 ± 7,7 (n = 7)

## 6. DISCUSSÃO

De acordo com a IOF (2010) entre os anos de 1990 e 2050 o número de fraturas de quadril em homens e mulheres da América latina com idade entre 50 e 64 anos irá aumentar 400%. No Brasil embora não existam dados epidemiológicos consolidados acerca da osteoporose sabe-se que há uma alta prevalência de fraturas, que são debilitantes e podem resultar em sérias conseqüências.

A deficiência estrogênica induzida pela OVX, comprovadamente estimula a reabsorção óssea (TANAKA et al., 2001; BINKLEY et al., 2002; ONOE et al., 2000; ERBEN et al., 2002). *In vitro* e *in vivo* verificou-se que a deficiência do  $17\beta$ -estradiol promoveu apoptose de osteoclastos murinos (HUGHES, et al., 1996). Embasados nesses fatos decidimos estudar os efeitos do ALE e da VK sobre metabolismo osteomineral utilizando de ratas ovariectomizadas, já que esse representa um modelo animal de osteoporose pós-menopausa similar a mulheres.

Em nosso estudo, a ovariectomia não resultou em redução significativa da DMO corporal de ratas OVX em relação ao grupo SHAM, somente uma leve tendência de redução. Isso deve-se, provalvemente, ao fato de que o volume ósseo cortical diminui muito lentamente em ratas OVX, enquanto ocorre uma severa perda de osso trabecular. Ademais, além do osso trabecular estar presente em sua maior parte em ossos longos e vértebras, este corresponde a apenas 15% da densidade do osso (TURNER; WAKLEY; HANNON, 1990; COWIN; WEINBAUM; ZENG, 1995).

A osteoporose pós-menopausa é caracterizada por um desequilíbrio entre a reabsorção mediada pelos osteoclastos e formação mediada pelos osteoblastos, no qual a reabsorção está aumentada. Esse relativo desequilíbrio resulta na diminuição da massa óssea, deterioração da microarquitetura e aumento do risco de fratura (BOIVIN et al., 2000). Certamente para que a osteoporose pós-menopausa seja efetivamente tratada, os fármacos utilizados devem reduzir a renovação óssea de modo a eliminar a remodelação óssea excessiva decorrente da necessidade mecânica, aumentar DMO e preservar a arquitetura óssea. É sabido, porém, que uma correta escolha clínica dos bisfosfonatos (BF) depende da pesquisa de diversos

fatores, dentre eles a avaliação histomorfométrica do osso e de um marcador estabelecido para as propriedades materiais e estruturais (CHAVASSIEUX; ARLOT; MEUNIER, 2001; RECKER, 1994).

Colón-Emeric et al. (2006) encontraram que a dose diária de 10mg de alendronato, aumenta notavelmente e rapidamente a DMO da coluna lombar e de outros sítios do esqueleto. Bone et al. (2004) descobriram que os efeitos terapêuticos do alendronato se sustentaram por um período de 5 anos de tratamento de mulheres com osteoporose na pós-menopausa. Im et al. (2010) observaram que altas doses de alendronato foi significativamente eficaz em relação a DMO e resistência óssea, tanto na administração precoce como tardia. O alendronato suprimiu com sucesso a renovação óssea e aumentou a DMO da coluna lombar comparado a valores basais durante um período de sete anos de tratamento sem causar nenhum efeito adverso severo em mulheres japonesas na pós-menopausa com osteoporose (IWAMOTO et al., 2010).

Muitos estudos têm sugerido que a administração oral de ALE está associada a um aumento da DMO e redução da incidência de fratura (BELL et al., 2009; STEVENSON et al., 2005). Esse efeito resultante da inibição da reabsorção óssea é produzido por redução da atividade dos osteoclastos na ordem de 60% a 80%, e aumento de sua apoptose (CHAVASSIEUX et al.; 1997). Interessantemente, nossos resultados estão de acordo com pesquisas anteriores (WRONSKI; YEN; SCOTT, 1991; IWAMOTO et al., 2010), nos quais verificou-se um aumento estatisticamente significativo da DMO nos animais tratados com ALE, mostrando que a administração de ALE pode prevenir a perda óssea induzida pela redução na taxa de estrogênio.

A vitamina K é conhecida por possuir uma ação anabólica nos ossos (TABB et al., 2003). Sua utilização parece reduzir a incidência de fratura em mulheres pós-menopausadas e os níveis de osteocalcina descarboxilada (COCKAYNE et al., 2006). Akiyama et al. (1994) reportaram que vitamina K, especificamente a menatrenona, inibe a formação dos osteoclastos induzido pela  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (forma ativa da vitamina D) em cultura de células da medula óssea. Em nosso estudo não foi observado nenhum efeito de aumento significativo da densidade mineral óssea e da medida da espessura de osso compacto no grupo de animais tratados com a VK

quando comparado ao grupo OVX. Em concordância com nossos achados, outros grupos mostraram que a vitamina K não conseguiu aumentar significativamente a DMO, no entanto, pareceu influenciar na melhoria da resistência óssea do fêmur, nos índices de compressão, flexão e resistência ao impacto (INOUE et al., 2009; BINKLEY, 2009). Ademais, em análises de DMO realizados em mulheres norte americanas saudáveis pós-menopausadas, nenhum efeito da VK1 e da MK4 na DMO da espinha lombar ou no fêmur foi observado (BINKLEY et al., 2009). E ainda, existe uma significativa diferença no volume de osso trabecular entre o grupo OVX e OVX tratado com VK2, e entre os grupos OVX e SHAM. No entanto, o volume de osso cortical não apresentou nenhuma diferença significativa entre os grupos (MAWATARI et al., 2000).

Neste contexto, verifica-se que os determinantes da força de resistência óssea que estão comprometidos na osteoporose são a massa óssea, a geometria óssea e a qualidade óssea. Essa depende do estado de remodelação óssea, da microarquitetura, do grau de mineralização, dos componentes da matriz, da quantidade de colágeno e de microdanos estruturais. Todos esses elementos são interdependentes. Assim, a fragilidade óssea pode ser provocada por alterações na estrutura óssea, geralmente associadas entre si, que promovem não só a diminuição da massa óssea, mas também da qualidade óssea. Isso explica porque o risco de fraturas não depende tão somente da diminuição da massa óssea, mas também da ação integrada de vários outros fatores responsáveis pela qualidade óssea, principalmente o determinismo genético (CHUMLAE; GUO, 1999; MANN et al., 2001).

Nossos dados sugerem que a associação da vitamina K com o alendronato pode apresentar efeitos aditivos no aumento da DMO, pois se verificou que a combinação apresenta valores de DMO estatisticamente significantes quando comparados ao grupo OVX, e levemente superior ao grupo OVX ALE. Esses resultados podem ser atribuídos aos efeitos da VK de estimular o recrutamento de osteoblastos, que se diferenciam em osteócitos, resultando em aumento da ocupância lacunar (densidade de osteócitos) e mineralização dos osteóides (ITO, 2002; KOSHIHARA; HOSHI, 1997).

O osso está constantemente sujeito a um processo metabólico de renovação óssea, que inclui reabsorção e formação óssea. Esta renovação é necessária para a manutenção da saúde geral do osso e está bem interligada. No entanto, nos estados anormais do metabolismo ósseo este processo deixa de estar interligado e, quando a reabsorção supera a formação, o resultado é uma perda líquida de osso. A medição de produtos de degradação específicos da matriz óssea proporciona dados analíticos da velocidade do metabolismo ósseo. Um desses produtos é a deoxipiridinolina (DPD), que é liberada durante o processo de reabsorção óssea, não é afetada pela dieta e é excretada não metabolizada na urina (YANG et al., 1999; ALTUNDAL et al., 2007). Além da DPD, a eficácia dos medicamentos antireabsortivos também pode ser visualizada por reduções de outros marcadores da reabsorção óssea como o N-telopeptídeo urinário (NTX); da fosfatase alcalina específica do osso e aumentos na DMO da coluna vertebral lombar, quadril total, colo femoral e trocânter (COSMAN; BORGES; CURIEL, 2007).

Apoiados por essas últimas observações, realizamos a medida quantitativa de DPD e observamos diferença estatisticamente significativa entre vários grupos: aumento no grupo OVX em relação aos grupos SHAM, OVX VK, OVX ALE e OVX VK+ALE; redução no grupo OVX VK+ALE em relação aos grupos SHAM e OVX VK; redução no grupo OVX ALE em relação aos grupos SHAM e OVX VK. Segundo Canpolat et al. (2010) a retirada dos ovários aumentou significativamente os níveis de DPD urinário comparado com o grupo intacto. De acordo com Sato et al. (1998) a VK2 efetivamente reduz a excreção urinária de NTX e DPD. Evidências sugerem que apesar da baixa DMO produzida pela VK, este agente tão bem como os bisfosfonatos, pode ter um potencial redutor nas fraturas vertebrais osteoporóticas em mulheres na pós-menopausa (IWAMOTO; TAKEDA; ICHIMURA, 2001). Qin et al. (2007) mostrou que o alendronato preveniu a perda óssea e/ou aumentou a BMD em mulheres chinesas com osteoporose estabelecida, e suprimiu significativamente o marcador DPD.

Segundo Akiyama et al. (1993) e Kalu et al. (1989), a atividade da fosfatase alcalina no soro de ratas OVX é maior que no grupo SHAM. Esses resultados indicam que ocorre uma ativa formação e reabsorção óssea em ratas OVX. Em humanos, a

atividade da fosfatase alcalina aumenta após a menopausa, refletindo um aumento no remodelamento. Quando a VK2 é administrada em mulheres pós-menopausadas, os níveis de fosfatase alcalina são relatados como inalterados, enquanto os níveis séricos de osteocalcina aumentam significativamente (MAWATARI et al., 2000). Além desses estudos, outros relatam que a administração de bisfosfonatos inibe a atividade da fosfatase alcalina óssea (BROULIK et al., 2005; VAISMAN, MCCARTHY, CORTIZO, 2005). Nosso grupo, porém, não observou diferença significativa da atividade da fosfatase alcalina total (sérica) nos grupos de animais.

A manutenção do fosfato sérico é mantido dentro de um certo limite devido a reabsorção de intestinal de fosfato e excreção renal, e ainda um equilíbrio com o fosfato intracelular e o ósseo. Assim, a hipofosfatemia e hiperfosfatemia são usualmente causadas pela excreção renal de fosfato (FUKUMOTO, 2010). Ademais, segundo Lotscher et al. (1996) a excreção do fósforo e do cálcio por via renal é mediada, principalmente, pelo paratormônio (PTH). Assim, a redução do fósforo urinário no grupo tratado com VK parece ser efeito do PTH para manter a fosfatemia em níveis normais.

Sob condições normais, o aumento da excreção de cálcio por mulheres na pós-menopausa reflete um aumento da reabsorção óssea devido à deficiência de estrogênio (ABRAMS, 2005). Os resultados obtidos ao longo deste trabalho mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa tanto nos níveis séricos de cálcio quanto na excreção urinária desse íon entre os grupos estudados.

Por todos esses motivos cresce a tendência em se considerar boa conduta a prescrição de tratamento anti-reabsortivo. A maior ou menor intensidade de ação antiosteoclástica deve estar necessariamente ligada a condições mórbidas mais agressivas. Caso contrário, a terapia anti-reabsortiva, principalmente no caso de um enfermidade de instalação e evolução lenta, como a osteoporose, deve procurar a redução do risco de fraturas com necessidade de reduções menos drásticas nos níveis de remodelação óssea (ROUX et al., 2004).

Segundo Ito (2002), os bisfosfonatos previnem a deterioração da conectividade trabecular em ratas ovariectomizadas, enquanto que a VK aumenta a espessura

trabecular. Essa combinação parece atuar na prevenção da deterioração da arquitetura trabecular óssea induzida pela deficiência estrogênica. Conforme descrito anteriormente, o tratamento de um bisfosfonato com a vitamina K parece ser mais efetivo que o bisfosfonato sozinho na prevenção de novas fraturas osteoporóticas (NIJENHUIS, 2008).

## 7. CONCLUSÃO

A utilização concomitante do alendronato e da vitamina K parece atuar no metabolismo osteomineral, pela redução da reabsorção óssea e aumento da DMO. Este estudo concluiu que houve diferença estatisticamente significativa na DMO corporal, ao final do tratamento, nos grupos OVX ALE e OVX VK+ALE em relação ao OVX ( $p < 0,01$ ), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVX e OVX VK ( $p > 0,05$ ). Assim, esses dados sugerem diminuição da reabsorção óssea nos animais tratados com ALE. Verificou-se também uma redução estatisticamente significativa da DPD nos grupos OVX vs. SHAM ( $p < 0,01$ ), fato que corrobora com outros estudos. Os resultados de DPD também mostraram reduções estatisticamente significantes nos grupos OVX ALE e OVX VK+ALE ( $p < 0,001$ ) e OVX VK ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo OVX sem tratamento. Dados estes que sugerem uma reversão da reabsorção óssea promovida pela ovariectomia. Portanto, nossos dados sugerem que tanto o alendronato como a vitamina K, juntos ou isoladamente, atuam na redução da reabsorção óssea, mas a VK isoladamente não parece influenciar na DMO corporal.

## 8. REFERÊNCIAS

ABRAMS, S. A. Calcium supplementation during childhood: long-term effects on bone mineralization. **Nutrition Reviews**, v. 63, p. 251-55, 2005.

ADAMI, S. Bisphosphonate antifracture efficacy. **Bone**, v. 41, p. 8-15, 2007.

ADLER, C.P. Bones and bone tissue: normal anatomy and histology. **Bone Diseases**. New York: Springer-Verlag, p. 1-30, 2000.

AKIYAMA, Y.; HARA, K.; OHKAWA, I.; TAJIMA, T. Effects of menatetrenone on bone loss induced by ovariectomy in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 62, n.2, p. 145-53, 1993.

AKIYAMA, Y.; HARA, K.; TAJIMA, T.; MUROTA, S.; MORITA, I. Effect of vitamin K2 (menatetrenone) on osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cultures. **European Journal of Pharmacology**, v. 263, p. 181-5, 1994.

ALBRIGHT, F. Postmenopausal osteoporosis. **Journal of the American Medical Association**, v. 116, p. 2465-2474, 1941.

ALTUNDAL, H.; SAYRAK, H.; YURTSEVER, E.; GÖKER, K. Inhibitory effect of alendronate on bone resorption of autogenous free bone grafts in rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 3, p. 508-16, 2007.

ARAUJO, D.V.; OLIVEIRA, J.H.; BRACCO, O.L. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no Sistema Suplementar de Saúde Brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 897-901, 2005.

BAI, M.; Quinn, S.; TRIVEDI, S.; KIFOR, O.; PEARCE, S.H.; POLLAK, M.R.; KRAPCHO, K.; HEBERT, S.C.; BROWN, E.M. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human  $Ca^{2+}$ -sensing receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19537-45, 1996.

BEDELL, M.A.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G. Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. **Genes Development**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 1997.

BELL, K.J.; HAYEN, A.; MACASKILL, P.; IRWIG, L.; CRAIG, J.C.; ENSRUD, K.; BAUER, D.C. Value of routine monitoring of bone mineral density after starting bisphosphonate treatment: secondary analysis of trial data. **British Medical Journal**, v. 338, p.1-5, 2009.

BENFORD, H.L.; MCGOWAN, N.W.; HELFRICH, M.H.; NUTTALL, M.E.; ROGERS, M.J. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone**, v. 28, n. 5, p. 465-73, 2001.

BILEZIKIAN, J.P.; RAIZS, L.G.; RODAN, G.A. Principles of bone biology. San Diego: **Academic Press**, v. 2, p.1-1398, 1996.

BINKLEY, N.; HARKE, J.; KRUEGER, D.; ENGELKE, J.; VALLARTA-AST, N.; GEMAR, D.; CHECOVICH, M.; CHAPPELL, R.; SUTTIE J. Vitamin K treatment reduces undercarboxylated osteocalcin but does not alter bone turnover, density, or geometry in healthy postmenopausal North American women. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 24, n. 6, p. 983-91, 2009.

BINKLEY, N.; KRUEGER, D.; ENGELKE, J.; CRENSHAW, T.; SUTTIE, J. Vitamin K supplementation does not affect ovariectomy-induced bone loss in rats. **Bone**, v. 30, n. 6, p. 897-900, 2002.

BISKOBING, D.M. COPD and osteoporosis. **Chest**, v.121, n. 2, p. 609-620, 2002.

BLAKE, G.M.; FOGELMAN, I. Role of dual-energy X-ray absorptiometry in diagnosis and treatment of osteoporosis. **Journal of Clinical Densitometry**, v.10, p. 102-110, 2007.

BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clinical Science**, v. 98, p. 217-240, 2000.

BOIVIN, G.Y.; CHAVASSIEUX, P.M.; SANTORA, A.C.; YATES, J.; MEUNIER, P.J. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. **Bone**, v. 27, p. 687–94, 2000.

BONE, H.G.; HOSKING, D.; DEVOGELAER, J.P.; TUCCI, J.R.; EMKEY, R.D.; TONINO, R.P.; RODRIGUEZ-PORTALES, J.A.; DOWNS, R.W.; GUPTA, J.; SANTORA, A.C.; LIBERMAN, U.A. Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. **The New England Journal of Medical**, v. 350, n. 12, p. 1189-99, 2004.

BOOTH, S.L.; DALLAL, G.; SHEA, M.K.; GUNDBERG, C.; PETERSON, J.W.; DAWSON-HUGHES, B. Effect of vitamin K supplementation on bone loss in elderly men and women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 4, p. 1217-23, 2008.

BROULIK, P.D.; ROSENKRANCOVÁ, J.; RUZICKA, P.; SEDLÁČEK, R. Effect of alendronate administration on bone mineral density and bone strength in castrated rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, n. 7, p. 414-8, 2005.

BROWN, D.L. Developments in therapeutic applications of biphosphonates. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 651–60, 1999.

CANPOLAT, S.; TUG, N.; SEYRAN, A.D.; KUMRU, S.; YILMAZ, B. Effects of raloxifene and estradiol on bone turnover parameters in intact and ovariectomized rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 23-8, 2010.

CAULEY, J.A.; THOMPSON, D.E.; ENSRUD, K.C; SCOTT, J.D.; BLACK, D. Risk of mortality following clinical fractures. **Osteoporosis International**, v. 11, p. 556-61, 2000.

CHAKRABORTY, S.; GANTI, A.K.; MARR, A.; BATRA, S.K. Lung cancer in women: role of estrogens. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 4, p. 4, p. 509-18, 2010.

CHAVASSIEUX, P. M.; ARLOT M.; MEUNIER, P.J. Clinical use of bone biopsy. **Academic Press**, p.501-9, 2001.

CHAVASSIEUX, P. M.; ARLOT, M. E.; REDA, C.; WEI, L.; YATES, A.J.; MEUNIER, P. J. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. **The Journal do Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p.1475-80, 1997.

CHESNUT III, C.H.; SKAG, A.; CHRISTIANSEN, C.; RECKER, R.; STAKKESTAD, J.A.; HOISETH, A.; FELSEMBERG, D.; HUSS, H.; GILBRIDE, J.; SCHIMMER, R.C.; DELMAS, P.D. Oral Ibandronate Osteoporosis Vertebral Fracture Trial in North America and Europe (BONE). Effects of oral ibandronate administered daily or intermittently on fracture risk in postmenopausal osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 8, p. 1241-9, 2004.

CHUMLAE, W.C.; GUO, S.S. Body mass and bone mineral quality. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 11, p. 307-311, 1999.

COCKAYNE, S.; ADAMSON, J.; LANHAM-NEW, S.; SHEARER, M.J.; GILBODY, S.; TORGERSON, D.J. Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Archives of Internal Medicine** v. 166, p. 1256-61, 2006.

COLÓN-EMERIC, C.S. Ten vs five years of bisphosphonate treatment for postmenopausal osteoporosis: enough of a good thing. **The Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 24, p. 2968-9, 2006.

Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. **American Journal of Medicine**, v.94, p. 646-650, 1993.

COOPER, C.; ATKINSON, E.J.; JACOBSEN, S.J.; O'FALLON, W.M.; MELTON III, L.J. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. **American Journal of Epidemiology**, v. 137, n. 9, p. 1001-5, 1993.

COSMAN, F.; BORGES, J.L.; CURIEL, M.D. Clinical evaluation of novel bisphosphonate dosing regimens in osteoporosis: the role of comparative studies

and implications for future studies. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 6, p. 1116-27, 2007.

COURPRON, P.; MEUNIER, P.; VIGNON, G. Dynamics of bone remodeling explained by Harold Frost. Theory of the B. M.U. (basic multicellular unit). **La Nouvelle Presse Medicale**, v. 4, n. 6, p. 421-4, 1975.

COWIN, S.C.; WEINBAUM, S.; ZENG, Y. A case for bone canaliculi as the anatomical site of strain generated potentials. **Journal of Biomechanics**, v. 28, n. 11, p. 1281-97, 1995.

CUMMINGS, S.R.; MELTON, L.J. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. **Lancet**, v. 359, n. 9319, p. 1761-7, 2002.

D'AMELIO, P.; GRIMALDI, A.; DI BELLA, S.; BRIANZA, S.Z.; CRISTOFARO, M.A.; TAMONE, C.; GIRIBALDI, G.; ULLIERS, D.; PESCARMONA, G. P., ISAIA, G. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulation T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. **Bone**, v. 43, p. 92-100, 2008.

DAHINTEN, S.L.; PUCCIARELLI, H.M. Variations in sexual dimorphism in the skulls of rats subjected to malnutrition, castration, and treatment with gonadal hormones. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 71, n. 1, p. 63-7, 1986.

D'AMELIO, P.; GRIMALDI, A.; CRISTOFARO, M.A.; RAVAZZOLI, M.; MOLINATTI, P.A.; PESCARMONA, G.P.; ISAIA, G.C. Alendronate reduces osteoclast precursors in osteoporosis. **Osteoporosis International**, 2009.

D'AMELIO, P.; GRIMALDI, A.; DI BELLA, S.; TAMONE, C.; BRIANZA, S.Z.; RAVAZZOLI, M.G.; BERNABEI, P.; CRISTOFARO, M.A.; PESCARMONA, G.P.; ISAIA, G. Risedronate reduces osteoclast precursors and cytokine production in postmenopausal osteoporotic women. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 3, p. 373-9, 2008.

DELMAS P.D.; RECKER, R.R.; CHESNUT III, C.H., SKAG, A.; STAKKESTAD, J.A.; EMKEY, R.; GILBRIDE, J.; SCHIMMER, R.C.; CHRISTIANSEN C. Daily and intermittent oral ibandronate normalize bone turnover and provide significant

reduction in vertebral fracture risk: results from the BONE study. **Osteoporosis International**, v. 15, n. 10, p. 792-8, 2004.

DENG, H.; LIU, Y.; GUO, C.; CHEN, D. **Current topics in bone biology**. Singapura: World Scientific Publishing, 2005.

DORES, S.M.C.; PAIVA, S.A.R.; CAMPANA, A.O. Vitamin K: metabolism and nutrition. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 3, p. 207-218, 2001.

DRAKE, M.T.; CLARKE, B.L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 9, p.1032-45, 2008.

DUNFORD, J.E., THOMPSON, K.; COXON, F.P.; LUCKMAN, S.P.; HAHN, F.M.; POULTER, C.D.; EBETINO, F.H.; ROGERS, M.J. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 296, n. 2, p. 235-42, 2001.

EASTELL, R.; CHEN, P.; SAAG, K.G.; BURSHELL, A.L.; WONG, M.; WARNER, M.R.; KREGG, J.H. Bone formation markers in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with teriparatide or alendronate. **Bone**, v. 46, n. 4, p.929-34, 2010.

EISMAN, J.A.; CIVITELLI, R.; ADAMI, S.; CZERWINSKI, E.; RECKNOR, C.; PRINCE, R.; REGINSTER, J.-Y.; ZAIDI, M.; FELSENBURG, D.; HUFHES, C.; MAIRON, N.; MASANAUSKAITE, D.; REID, D.M.; DELMAS, P.D.; RECKER, R. Efficacy and tolerability of intravenous ibandronate injections in postmenopausal osteoporosis: 2-year results from the DIVA study. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, p. 488-497, 2008.

ENGELKE, K.; GLUER, C.C. Quality and performance measures in bone densitometry. I. Errors and diagnosis. **Osteoporosis International**, v. 17, p. 1283-1292, 2006.

ERBEN, R.G.; MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J.S.; WEBER, K.; STAHR, K.; LEYSHON, A.; SMITH, S.Y.; PHIPPS, R. Prevention of bone loss in ovariectomized

rats by combined treatment with risedronate and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. **The Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 8, p. 1498-511, 2002.

FERRARI, S.L. Osteoporosis: a complex disorder of aging with multiple genetic and environmental determinants. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 95, p. 35-51, 2005.

FUKUMOTO, S. Disorders of phosphate metabolism. **The Japanese Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 3, p. 225-31, 2010.

GAUMET, N.; SEIBEL, M.J.; BRAILLON, P.; GIRY, J.; LEBECQUE, P.; DAVICCO, M.J.; COXAM, V.; ROUFFET, J.; DELMAS, P.D.; BARLET, J.P. Influence of ovariectomy on bone metabolism in very old rats. **Calcified Tissue International**, v. 58, n. 4, p. 256-62, 1996.

GAUMET-MEUNIER, N.; COXAM, V.; ROBINS, S.; PASTOUREAU, P.; POINTILLART, A.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; BARLET, J.P. Gonadal steroids and bone metabolism in young castrated male rats. **Calcified Tissue International**, v. 66, n. 6, p. 470-5, 2000.

GLUER, C.C.; LU, Y.; ENGELKE, K. Quality and performance measures in bone densitometry. II. Fracture risk. **Osteoporosis International**, v. 17, p. 1449-1458, 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of medical physiology**. 11. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385-96, 2006.

HAMMOUDEH, M.; AL-KHAYARIN, M.; ZIRIE, M. Bone density measure by dual energy X-ray absorptiometry in Qatari women. **Maturitas**, v. 52, p. 319-327, 2005.

HANS, D.; DOWNS, R.W. Jr.; DUBOEUF, F.; GREENSPAN, S.; JANKOWSKI, L.G.; KIEBZAK, G.M.; PETAK, M. International Society for Clinical Densitometry. Skeletal

sites for osteoporosis diagnosis: the 2005 ISCD Official Positions. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 9, n. 1, p. 15-21, 2006.

HARRIS, S.T.; REGINSTER, J.-Y.; HARLEY, C.; BLUMENTALS, W.A.; POSTON, S.A.; BARR, C.E.; SILVERMAN, S.L. Risk of fracture in women treated with monthly oral ibandronate or weekly bisphosphonates: The evaluation of ibandronate efficacy (VIBE) database fracture study. **Bone**, v. 44, p. 758-765, 2009.

Health. Osteoporosis. 2008. Disponível em: <http://www.health.com/health/static/hw/media/medical/hw/nr55551842.jpg>. Acesso em: 30 jun. 2010.

HEISS, C.; HOESEL, L.M.; WEHR, U.; WENISCH, S.; DROSSE, I.; ALT, V.; MEYER, C.; HORAS, U.; SCHIEKER, M.; SCHNETTLER, R. Diagnosis of osteoporosis with vitamin k as a new biochemical marker. **Vitamins and Hormones**, v. 78, p. 417-34, 2008.

HELOU, C.M.B. Atualização em fisiologia e fisiopatologia renal: papel do cálcio na sinalização celular. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, n. 18, v. 2, p. 155-158, 1996.

HSU, H.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; SOLOVYEV, I.; COLOMBERO, A.; TIMMS, E.; TAN, H.L.; ELLIOTT, G.; KELLEY, M.J.; SAROSI, I.; WANG, L.; XIA, X.Z.; ELLIOTT, R.; CHIU, L.; BLACK, T.; SCULLY, S.; CAPPARELLI, C.; MORONY, S.; SHIMAMOTO, G.; BASS, M.B.; BOYLE, W.J. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 3540-5, 1999.

HUGHES, D.E.; DAI, A.; TIFTEE, J.C.; LI, H.H.; MUNDY, G.R.; BOYCE, B.F. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. **Nature Medicine**, v. 2, n. 10, p. 1132-6, 1996.

IM, S.; LIM, S.H.; LEE, J.I.; KO, Y.J.; PARK, J.H.; HONG, B.Y.; PARK, G.Y. Effective dosage and administration schedule of oral alendronate for non-nociceptive symptoms in rats with chronic constriction injury. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, n. 6, p. 938-44, 2010.

INOUE, T.; FUJITA, T.; KISHIMOTO, H.; MAKINO, T.; NAKAMURA, T.; NAKAMURA T.; SATO, T.; YAMAZAKI, K. Randomized controlled study on the prevention of osteoporotic fractures (OF Study): a phase IV clinical study of 15-mg menatetrenone capsules. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, p. 66-75, 2009.

International Osteoporosis Foundation. Facts and statistics about osteoporosis and its impact: Key statistics for Latin America. Disponível em: <http://www.iofbonehealth.org/facts-and-statistics.html#factsheet-category-24>. Acesso em: 30 jun. 2010.

International Osteoporosis Foundation. What is osteoporosis? 2009. Disponível em: <http://www.iofbonehealth.org/patients-public/about-osteoporosis/what-is-osteoporosis.html>. Acesso em: 15 jun. 2010.

ISHIDA, Y.; HEERSCHE, J.N.M. Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitors cells in bone cell populations derived from adult female but not from adult male rats. **Bone**, v.20, p.17-25, 1997.

ISHIDA, Y.; TERTINEGG, I.; HEERSCHE, J.N.M. Progesterone and dexamethasone stimulate proliferation and differentiation of osteoprogenitors and progenitors for adipocytes and macrophages in cell populations derived from adult rat vertebrae. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.11, n.7, p.921-930, 1996.

ITO, M. Bone mass, microstructure, and quality with bone strength: the effects of antiresorptive agents. **Journal of Japanese Society for Bone Morphometry**, v. 12, p. 51-4, 2002.

IWAMOTO, J.; SATO, Y.; UZAWA, M.; TAKEDA, T.; MATSUMOTO, H. Seven years' experience with alendronate in postmenopausal Japanese women with osteoporosis. **Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 6, p. 201-6, 2010.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; ICHIMURA, S. Combined treatment with vitamin K2 and bisphosphonate in postmenopausal women with osteoporosis. **Yonsei Medical Journal**, v. 44, n. 5, p. 731-756, 2003.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; ICHIMURA, S. Effect of menatetrenone on bone mineral density and incidence of vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: a comparison with the effect of etidronate. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 6, n. 6, p. 487-92, 2001.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; SATO, Y. Effects of vitamin K2 on the development of osteopenia in rats as the models of osteoporosis. **Yonsei Medical Journal**, v. 47, n. 2, p. 157-66, 2006.

JAKIMIUK, A.; NOWICKA, M.; BOGUSIEWICZ, M.; ADAMIAK, A.; SKORUPSKI, P.; MIOTLA, P.; RECHBERGER, T.; HACZYNSKI, J. Prevalence of estrogen receptor alpha PvuII and XbaI polymorphism in population of Polish postmenopausal women. **Folia Histochemical et Cytobiologica**, v. 45, n. 4, p. 331-8, 2007.

JEAL, W.; BARRADELL, L.B.; MCTAVISH, D. Alendronate: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in postmenopausal osteoporosis. **Drugs**, v. 53, p. 415-34, 1997.

JOHNELL, O.; KANIS, J. Epidemiology of osteoporosis fractures. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 2, p. 3-7, 2005.

JOHNELL, O.; KANIS, J.A.; ODEN, A.; SERNBO, I.; REDLUND-JOHNELL, I.; PETTERSON, C. et al. Fracture risk following an osteoporotic fracture. **Osteoporosis International**, v. 15, p.175-9, 2004.

JOHNELL, O.; KANIS, J.A.; SERNBO, I.; REDLUND-JOHNELL, I.; PETTERSON, C et al. Mortality after osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, v. 15, p. 38-42, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.. **Histologia básica: texto e atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

KALU, D.N.; LIU, C.C.; HARDIN, R.R.; HOLLIS, B.W. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, v. 124, n. 1, p. 7-16, 1989.

KANIS, J.A. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. **Lancet**, v. 359, n. 9321, p. 1929-36, 2002.

KANIS, J.A.; BURLET, N.; DELMAS, P.D.; REGINSTER, J.-Y.; BORGSTROM, F.; RIZZOLI, R. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis international**, v. 19, p. 399-428, 2008.

KAVANAGH, K.L.; GUO, K.; DUNFORD, J.E.; Wu, X.; Knapp, S.; Ebetino, F.H.; ROGERS, M.J.; RUSSELL, R.G.; OPPERMANN, U. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 20, p. 7829-34, 2006.

KOBAYASHI, M.; HARA, K.; AKIYAMA, Y. Effects of vitamin K2 (menatetrenone) on calcium balance in ovariectomized rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 88, n.1, p. 55-61, 2002.

KOITAYA, N.; EZAKI, J.; NISHIMUTA, M.; YAMAUCHI, J.; HASHIZUME, E.; MORISHITA, K.; MIYACHI, M.; SASAKI, S.; ISHIMI, Y. Effect of low dose vitamin K2 (MK-4) supplementation on bio-indices in postmenopausal Japanese women. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 55, n. 1, p. 15-21, 2009.

KOSHIHARA, Y.; HOSHI, K. Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 3, p. 431-8, 1997.

KUHL, H. Mechanisms of sex steroids: Future developments. **Maturitas**, v. 47, n. 4, p. 285-91, 2004.

LACEY, D.L.; TAN, H.L.; LU, J.; KAUFMAN, S.; VAN, G.; QIU, W.; RATTAN, A.; SCULLY, S.; FLETCHER, F.; JUAN, T.; KELLEY, M.; BURGESS, T.L.; BOYLE, W.J.; POLVERINO, A.J. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 2, p. 435-48, 2000.

LANHAM-NEW, S.A. Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, n. 2, p. 163-76, 2008.

LI, J.; SAROSI, I.; YAN, X.Q.; MORONY, S.; CAPPARELLI, C.; TAN, H.L.; MCCABE, S.; ELLIOTT, R.; SCULLY, S.; VAN, G.; KAUFMAN, S.; JUAN, S.C.; SUN, Y.; TARPLEY, J.; MARTIN, L.; CHRISTENSEN, K.; MCCABE, J.; KOSTENUIK, P.; HSU, H.; FLETCHER, F.; DUNSTAN, C.R.; LACEY, D.L.; BOYLE, W.J. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1566-71, 2000.

LIAN, J.B.; STEIN, G.S. Osteoblast Biology. In: MARCUS R; FELDMAN D; KELSEY **Journal of Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, p. 23-59, 1996.

LOTSCHER, M.; WILSON, P.; NGUYEN, S.; KAISLING, B.; BIBER, J.; MURER, H.; LEVI, M. New aspects of adaptation of rat renal Na/Pi cotransporter to alterations in dietary phosphate. **Kidney International**, v. 49, p. 1012-1018, 1996.

MAC NAMARA, P.; LOUGHREY, H.C. Progesterone receptor A and B isoform expression in human osteoblasts. **Calcified Tissue International**, v. 63, p. 39-46, 1998.

MANN, V.; HOBSON, E.; LI, B.; STEWART, T.L.; GRANT, S.F.A.; ROBINS, S.P.; ASPDEN, R.M.; RALSTON, S.H.. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 899-907, 2001.

MARENZANA, M.; SHIPLEY, A.M.; SQUITIERO, P.; KUNKEL, J.G.; RUBINACCI, A. Bone as an ion exchange organ: evidence for instantaneous cell-dependent calcium efflux from bone not due to resorption. **Bone**, v. 37, n. 4, p. 545-54, 2005.

MARIE, P.J.; AMMANN, P.; BOIVIN, G.; REY, C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. **Calcified Tissue International**, v. 69, n. 3, p. 121-9, 2001.

MARTIN, T.J.; SEEMAN, E. Bone remodeling: its local regulation and the emergence of bone fragility. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 22, p. 701-722, 2008.

MAWATARI, T.; MIURA, H.; HIGAKI, H.; MORO-OKA, T.; KURATA, K.; MURAKAMI, T.; IWAMOTO, Y. Effect of vitamin K2 on three-dimensional trabecular microarchitecture in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 9, p.1810-7, 2000.

MCCLUNG, M.R. Bisphosphonates in osteoporosis: recent clinical experience. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 1, p. 225–38, 2001.

MELCHIOR, C. Nutrição e anticoagulantes orais: implicações clínicas. **Instituto de Metabolismo e Nutrição**, 2006.

MELTON, L.J. III. Adverse outcomes of osteoporotic fractures in general population. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 6, p.1139-41, 2003.

MOORE W. R., GRAVES S. E., BAIN G. I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ Journal of Surgery**, v. 71, p.354–361, 2001.

MORONY, S.; WARMINGTON, K.; ADAMU, S.; ASUNCION, F.; GENG, Z.; GRISANTI, M.; TAN, H.L.; CAPPARELLI, C.; STARNES, C.; WEIMANN, B.; DUNSTAN, C.R.; KOSTENUIK, P.J. The inhibition of RANKL causes greater suppression of bone resorption and hypercalcemia compared with bisphosphonates in two models of humoral hypercalcemia of malignancy. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3235-43, 2005.

MUNOZ-TORRES, M.; REYES-GARCÍA, R.; MEZQUITA-RAYA, P.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; ALONSO, G.; LUNA, J.D.; RUIZ-REQUENA, M.E.; ESCOBAR-JIMÉNEZ, F. Serum cathepsin K as a marker of bone metabolism in postmenopausal women treated with alendronate. **Maturitas**, v. 64, p. 188–192, 2009.

NIJENHUIS, T.; VAN DER EERDEN, B.C.; HOENDEROP, J.G.; WEINANS, H.; VAN LEEUWEN, J.P.; BINDELS, R.J. Bone resorption inhibitor alendronate normalizes the reduced bone thickness of TRPV5(-/-) mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n.11, p. 1815-24, 2008.

OLIVEIRA, T.C. Fósforo: função, metabolismo e recomendação. **Revista digital de nutrição**, v. 1, n. 1, 2007.

ONOE, Y.; MIYAURA, C.; ITO, M.; OHTA, H.; NOZAWA, S.; SUDA, T. Comparative effects of estrogen and raloxifene on B lymphopoiesis and bone loss induced by sex steroid deficiency in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.15, n. 3, p. 54-9, 2000.

ORIMO, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. **Journal of Nippon Medical School**, v. 77, n. 1, p. 4-12, 2010.

OSAKO, M.K.; NAKAGAMI, H.; KOIBUCHI, N.; SHIMIZU, H.; NAKAGAMI, F.; KORIYAMA, H.; SHIMAMURA, M.; MIYAKE, T.; RAKUGI, H.; MORISHITA, R. Estrogen Inhibits Vascular Calcification via Vascular RANKL System. Common Mechanism of Osteoporosis and Vascular Calcification. **Circulation Research**, 2010.

PARKER, B.D.; BAUER, D.C.; ENSRUD, K.E.; IX, J.H. Association of osteocalcin and abdominal aortic calcification in older women: the study of osteoporotic fractures. **Calcified Tissue International**, v. 86, n. 3, p. 185-91, 2010.

PÉREZ-LÓPEZ, F.R. Postmenopausal osteoporosis and alendronate. **Maturitas**, v. 48, n. 3, p. 179-92, 2004.

PINES, A.; STURDEE, D. Menopausal hormone therapy and risk for cardiovascular disease in the WHI trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 153, n. 1, p. 61-2, 2010.

PLOTKIN, L.I.; AGUIRRE, J.I.; KOUSTENI, S.; MANOLAGAS, S.C.; BELLIDO, T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n.8, p. 7317-25, 2005.

QIN, L.; CHOY, W.; AU, S.; FAN, M.; LEUNG, P. Alendronate increases BMD at appendicular and axial skeletons in patients with established osteoporosis. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 21, p. 2-9, 2007.

RÄIKKÖNEN, J.; CROCKETT, J.C.; ROGERS, M.J.; MÖNKKÖNEN, H.; AURIOLA, S.; MÖNKKÖNEN, J. Zoledronic acid induces formation of a pro-apoptotic ATP analogue and isopentenyl pyrophosphate in osteoclasts in vivo and in MCF-7 cells in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v.157, n. 3, p. 427-35, 2009.

RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **Journal Clinical Investigation**, v.115, p. 3318-3325, 2005.

RAISZ, L.G. Screening for Osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 2, p. 164-71, 2005.

RECKER, R. R. Bone biopsy and histomorphometry in clinical practice. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 609-27, 1994.

RIGGS, B.L.; HARTMANN, L.C. Selective estrogen-receptor modulators-mechanisms of action and application to clinical practice. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 7, p. 618-629, 2003.

RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON, L.J.III. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 279–302, 2002.

RIGGS, B.L. Role of the vitamin D-endocrine system in the pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 209-215, 2003.

ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collegenous protein? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and reabsorption. **Cell Biology International**, v.18, n.6, p.617-628, 1994.

RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**, v. 289, p. 1508–14, 2000.

ROSEN, C.J. Pathogenesis of osteoporosis. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 2, p.181-93, 2000.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. Histologia: texto e atlas em correlação com biologia molecular e celular. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROUX, C.; SEEMAN, E.; EASTELL, R.; ADACHI, J.; JACKSON, R.D.; FELSEBERG, D.; SONGCHAROEN, S.; RIZZOLI, R.; DI MUNNO, O.; HORLAIT, S.; VALENT, D.; WATTS, N.B. Efficacy of risedronate on clinical vertebral fractures

within six months. **Current Medical Research and Opinion**, v. 20, n. 4, p.433-9, 2004.

SAHNI, M.; GUENTHER, H.L.; FLEISCH, H.; COLLIN, P.; MARTIN, T.J. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 5, p. 2004-11, 1993.

SALTIKI, K.; ALEVIZAKI, M. Coronary heart disease in postmenopausal women; the role of endogenous estrogens and their receptors. **Hormones**, v. 6, n. 1, p. 9-24, 2007.

SAMBROOK, P.N.; RODRIGUEZ, J.P.; WASNICH, R.D.; LUCKEY, M.M.; KAUR, A.; MENG, L.; LOMBARDI, A. Alendronate in the prevention of osteoporosis: 7-year follow-up. **Osteoporosis International**, v.15, n. 6, p. 483-8, 2004 .

SARIS, N.E.; MERVAALA, E.; KARPPANEN, H.; KHAWAJA, J.A.; LEWENSTAM, A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clinica Chimica Acta**, v. 294, n. 2, p. 1-26, 2000.

SATO, Y.; HONDA, Y.; KUNO, H.; OIZUMI, K. Menatetrenone ameliorates osteopenia in disuse-affected limbs of vitamin D- and K-deficient stroke patients. **Bone**, v. 23, n. 3, p. 291-6, 1998.

SEEMAN, E.; DELMAS, P.D. Bone quality-the material and structural basis of bone strength and fragility. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 2250–2261, 2006.

SEIBEL, M.; ROBINS, S.; BILEZIKIAN, J. Dynamics of bone and cartilage metabolism. 2.ed. **Academic Press San Diego**, 2006.

SIM, J.Y.; JUNG, E.M.; YOO, Y.M.; CHOI, K.C.; JEUNG, E.B. Transcriptional and translational expression of calbindin-D9k in the duodenum, kidney and uterus of a female canine model. **Journal of Veterinary Science**, v. 1, n. 1, p. 15-9, 2010.

SIMS, N.A., GOOI, J.H. Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.19, p. 444-451, 2008.

SIRIS, E.S.; MILLER, P.D.; BARRETT-CONNOR, E.; FAULKNER, K.G.; WEHREN, L.E.; ABBOTT, T.A.; BERGER, M.L.; SANTORA, A.C.; SHERWOOD, L.M. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. **The Journal of American Medical Association**, v. 286, n. 22, p. 2815-22, 2001.

Sociedade Brasileira de Osteoporose. América Latina enfrenta a osteoporose. v. 15, p. 2-7, 2004.

STEVENSON, M.; LLOYD JONES, M; DE NIGRIS, E.; BREWER, N.; DAVIS, S.; OAKLEY, J. A systematic review and economic evaluation of alendronate, etidronate, risedronate, raloxifene and teriparatide for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **Health Technology Assessment**, v. 9, n. 22, p. 1–160, 2005.

SUGIGUCHI, S.; GOTO, H.; INABA, M.; NISHIZAWA, Y. Preferential reduction of bone mineral density at the fêmur reflects impairment of physical activity in patients with low-activity rheumatoid arthritis. **Modern Rheumatology**, v. 20, p.69-73, 2009.

SYED, F.; KHOSLA, S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, p. 688–696, 2005.

TABB, M.M.; SUN, A.; ZHOU, C.; GRÜN, F.; ERRANDI, J.; ROMERO, K.; PHAM, H.; INOUE, S.; MALLICK, S.; LIN, M.; FORMAN, B.M.; BLUMBERG, B. Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 45, p. 43919-27, 2003.

TANAKA, S.; SHIMIZU, M.; DEBARI, K.; FURUYA, R.; KAWAWA, T.; SASAKI, T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. **The Anatomical Record**, v. 262, n. 2, p.203-12, 2001.

TEITELBAUM, S.L. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 427-35, 2007.

TÖYRÄS, A.; OLLIKAINEN, J.; TASKINEN, M.; MÖNKKÖNEN, J. Inhibition of mevalonate pathway is involved in alendronate-induced cell growth inhibition, but not in cytokine secretion from macrophages in vitro. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 4, p.223-30, 2003.

TURNER RT, WAKLEY GK, HANNON KS. Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 8, n. 4, p. 612-7, 1990.

TURNER, R.T.; VANDERSTEENHOVEN, J.J.; BELL, N.H. The effects of ovariectomy and 17 beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 2, p.115-22, 1987.

VAANAMEN, K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption- rationale for the design of new therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, p. 959-971, 2005.

VAISMAN, D.N.; MCCARTHY, A.D.; CORTIZO, A.M. Bone-specific alkaline phosphatase activity is inhibited by bisphosphonates: role of divalent cations. **Biological Trace Element Research**, v. 104, n. 2, p. 131-40, 2005.

VITTE, C.; FLEISCH, H.; GUENTHER, H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, v. 7, n. 6, p. 2324-33, 1996.

World Health Organization. Guidelines for preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis. **Technical Report Series**. Geneva, 1998.

WRONSKI, T.J.; YEN, C.F.; SCOTT, K.S. Estrogen and diphosphonate treatment provide long-term protection against osteopenia in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 6, p. 387–394, 1991.

YANG, T.S.; TSAN, S.H.; CHEN, C.R.; CHANG, S.P.; YUAN, C.C. Effects of alendronate on bone turnover markers in early postmenopausal women. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 61, n. 10, p. 568-76, 1998.

YAVROPOULOU, M.P.; YOVOS, J.G. Osteoclastogenesis – Current knowledge and future perspectives. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 8, n. 3, p. 204-216, 2008.

ZABAGLIA, S.F.; COSTA-PAIVA, L.H.; PINTO-NETO, A.M. Is tubal ligation a risk factor for a reduction of bone mineral density in postmenopausal women? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 23, p.621-626, 2001.

## 9. ANEXO