



**Aláide Alves Agripino**

Mestre em Tecnologia e Qualidade Alimentar

**Efeito do suplemento "Cálcio da Concha da ostra e fibra alimentar solúvel" na prevenção da osteoporose num modelo animal.**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Qualidade Alimentar

Orientadora: Maria Cristina Crespo Ferreira da Silva  
Marques, Professora Auxiliar - Faculdade de Farmácia  
da Universidade de Lisboa.

Co-orientador: Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,  
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade Nova de Lisboa.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) [Ana Isabel Nobre M. A. de Oliveira Ricardo]  
Arguente (s): Prof. Doutor(a) [Olívia Maria de Castro Pinho]

Vogais: Prof. Doutor(a) [Helena Cristina de Matos Canhão]  
Prof. Doutor(a) [Maria Eduardo Costa Morgado Figueira]  
Prof. Doutor(a) [Cristina Luzia Dias Mello Sampaio]  
Prof. Doutor(a) [Agostinho Franklim Pinto Marques]



**Abril, 2016**





**Aláide Alves Agripino**

Mestre em Tecnologia e Qualidade Alimentar

**Efeito do suplemento "Cálcio da concha de ostra e fibra alimentar solúvel" na prevenção da osteoporose num modelo animal.**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Qualidade Alimentar

Orientadora: Maria Cristina Crespo Ferreira da Silva Marques,  
Professora Auxiliar - Faculdade de Farmácia da Universidade  
de Lisboa.

Co-orientador: Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,  
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) [Ana Isabel Nobre M. A. de Oliveira Ricardo]  
Arguente (s): Prof. Doutor(a) [Olívia Maria de Castro Pinho]

Vogais: Prof. Doutor(a) [Helena Cristina de Matos Canhão]  
Prof. Doutor(a) [Maria Eduardo Costa Morgado Figueira]  
Prof. Doutor(a) [Cristina Luzia Dias Mello Sampaio]  
Prof. Doutor(a) [Agostinho Franklim Pinto Marques]



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Abril, 2016**

**Efeito do suplemento "Cálcio da Concha de ostra e fibra alimentar solúvel" na prevenção da osteoporose num modelo animal.**

Copyright © Alaíde Alves Agripino, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“O rio atinge os seus objetivos porque aprendeu a contornar os obstáculos”

Lao Tse.

É sempre assim...

“Coisas boas nos acontecem quando a gente acredita, quando a gente tem fé, quando a gente coloca Deus a frente da nossa vida. Dificuldades todos nós temos, a diferença é que uns assumem, outros disfarçam, uns desistem de lutar e outros lutam por ainda acreditar.”

Cecília Sfalsin.

“Dedico esta dissertação a meu filho Frederico Enzo e a todos aqueles que me incentivaram nas horas difíceis que passei, acreditaram e vibraram por mim. A vocês dedico mais uma etapa vencida da minha vida”.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

À minha orientadora professora Doutora Cristina Marques, que encarou esse desafio comigo. Obrigada pela orientação, segurança, objetividade em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis.

À professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora do programa doutoral do departamento de ciências e tecnologia da Biomassa.

À professora Doutora Cristina Sampayo por toda a ajuda e disponibilidade nos trabalhos laboratoriais, por ter-me acompanhado nos congressos e no tratamento dos resultados.

À professora Doutora Ana Luísa Fernando, pela coorientação da tese e por ter ajudado na leitura dos metais na espectrofotometria de Absorção Atómica.

Ao Professor Doutor João Pais “*in memória*”, Presidente do Departamento de Ciências da Terra, da FCT/ UNL, por ter autorizado, a utilização do material e equipamento e o espaço laboratorial, sem a qual este trabalho não teria sido possível se realizar.

À professora Doutora Fátima Vaz, por ter disponibilizado o seu tempo e o seu laboratório para fazer os ensaios biomecânicos e ultraestruturais do osso.

À professora Doutora Helena Canhão, membro da comissão de acompanhamento da tese, por ter disponibilizado a sua ajuda em todas as fases do projeto, sem a qual este trabalho não poderia ter sido concretizado.

Ao Dr. Bruno Vidal, pela sua disponibilidade para proceder aos ensaios histomorfométricos das vértebras e à interpretação das imagens da ultraestrutura do osso.

Ao Dr. Duarte Stilwell, por se ter disponibilizado para efetuar as ovariectomias aos animais.

À Dr<sup>a</sup> Helga Santos pela sua colaboração, enquanto técnica de anatomia patológica, na preparação dos cortes histológicos dos órgãos.

À técnica do Departamento de Ciências da Terra, Maria Eduarda Gomes Ferreira, por se ter disponibilizado, sempre com agrado, na trituração das conchas.

À dona Teresa Costa, assistente operacional, por toda a sua amizade e dedicação aos trabalhos diários para as confeções das pellets e no trato dos animais.

À dona Rosário Borges por toda a sua dedicação no trato dos animais e na ajuda das confeções da pellets.

À Paula Nobre, por sua disponibilidade e profissionalismo.

À Ana Cordeiro, pela sua dedicação e disponibilidade em todas as vezes que precisei.

Não quero deixar de agradecer ainda à Rita Braga e Rosa Pinto pelo apoio dado aos trabalhos práticos do laboratório de análises químicas, quando recorri a este laboratório para concretizar as análises necessárias.

Ao Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal,

À Cintramédica, Laboratório de Análises Clínicas, Sintra, Portugal pela assistência nas análises histológicas e de biomarcadores.

À Clínica Veterinária de Colares, Sintra, Portugal

Ao Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Portugal,

E não poderia deixar de citar a minha querida mãe Severina Agripino “*in memória*” que sempre acreditou e me incentivou ao longo da minha vida.

A Deus por todos os dias me ter dado forças para ultrapassar todas as dificuldades que enfrentei.

## Resumo:

A Osteoporose é uma doença caracterizada pela perda da massa e resistência ósseas com consequente aumento da suscetibilidade às fracturas, que afeta sobretudo a mulher na pós-menopausa e o idoso.

Alguns estudos indicam que as mulheres pós-menopáusicas com DM2 sofrem muitas fraturas ósseas por fragilidade apesar de apresentarem densidade mineral óssea (DMO) normal ou aumentada. Contudo os mecanismos fisiopatológicos que estão na base das alterações ósseas na diabetes, não estão completamente esclarecidos.

A suplementação com cálcio (1 a 1.2 g/dia), apesar de recomendada na prevenção da fratura óssea em adultos saudáveis e na pós-menopausa na mulher é também um assunto controverso, por motivos de segurança.

O presente estudo teve como objetivos: Avaliar o efeito da hiperglicemia crônica no metabolismo, ultraestrutura e propriedades biomecânicas do osso, bem como avaliar a eficácia e a segurança de um suplemento de pó de concha de ostra (carbonato cálcio) e de goma guar (fibra hidrossolúvel) numa dose baixa (dose equivalente humana de 420 mg/dia de cálcio e 414 mg/dia de goma guar) em ratos Wistar fêmeas, normo e hiperglicémicos, na prevenção das alterações ósseas e metabólicas associadas à deficiência em estrogénios induzida por ovariectomia e pela hiperglicemia. A criação de valor num resíduo da produção e indústria alimentar (concha de ostra), é também um dos objetivos deste trabalho.

Os animais (n=42), foram divididos em 6 grupos: controlo (C); ovariectomizados (OVX); hiperglicémicos (STZ), hiperglicémicos ovariectomizados (STZ+OVX); Ovariectomizados suplementados (OVX+S) e hiperglicémicos ovariectomizados suplementados (STZ+OVX+S). A glicemia, triglicéridos, colesterol, cálcio, estrogénios (E2), o Telopectido C-terminal do colagénio tipo I (CTX) e Propeptido N-terminal do procologénio tipo I (P1NP) foram quantificados no soro, 60 dias após a ovariectomia e 53 dias após o início da suplementação. O peso corporal, a microarquitatura do osso vertebral (histomorfometria-L4), as propriedades biomecânicas do fémur (testes de flexão), a espessura cortical, a ultraestrutura das diáfises da tibia (microscopia eletrónica de varrimento), e o cálcio urinário e femoral (espectroscopia de absorção atómica) foram também avaliados em todos os animais. Foram ainda efetuados exames histológicos para pesquisa de depósitos tecidulares renais, hepáticos e vasculares de cálcio (colorações de hematoxilina-eosina e Von-Kossa) no grupo dos animais OVX+S.

Os resultados permitiram concluir que:

O suplemento de cálcio de concha de ostra e goma guar, mesmo se em doses baixas, atenuou a calciúria, a hipocalcemia, a diminuição da espessura do osso cortical da tíbia e a desmineralização do fêmur, tornando-o mais rígido e resistente sem risco aparente de lesão ou formação de depósitos vasculares, hepáticos ou renais.

A hiperglicemia crônica aumenta a formação de colagénio, e altera a ultraestrutura do osso cortical tornando-o mais resistente à fratura apesar de diminuir o seu teor em cálcio, na presença ou ausência de estrogénios.

A suplementação com cálcio e goma guar preserva a ultraestrutura do osso cortical e atenua a diminuição da espessura do osso trabecular nos animais ovariectomizados com hiperglicemia crônica. Contudo, não foi possível comprovar o efeito da goma guar, nas doses usadas, nos níveis de glicemia e triglicéridos, nestes animais.

**Palavras-chave:** Osteoporose, osso cortical/trabecular, goma guar, cálcio da concha de ostra, diabetes tipo 2, hiperglicemia crônica

## **Abstract:**

Osteoporosis is a metabolic disorder characterized by loss of bone mass and strength with subsequent increase in susceptibility to fractures that affects mainly post-menopausal women and the elderly people.

Several studies indicate that post-menopause women with type 2 Diabetes suffer many bone fractures due to fragility despite having normal or increased BMD. However the pathophysiology of diabetes-induced bone fragility is still not completely understood. Calcium supplementation (1-1.2 g/day) although recommended in prevention of bone fracture in healthy adults and in postmenopausal women still generates controversy for safety reasons.

This study aimed: To evaluate the effect of chronic hyperglycemia on the bone metabolism, ultrastructure and biomechanical properties as well as to evaluate the efficacy and safety of an oyster shell powder (calcium carbonate) supplement and of guar gum (hydrosoluble fiber), in a low dose (human equivalent dose of 420 mg/day of calcium and 414 mg/day of guar gum) in normoglycemic and hyperglycemic female Wistar rats in the prevention of bone and metabolic changes associated to ovariectomy-induced estrogen deficiency and hyperglycemia. Adding value to a residue generated from the food production and industry (oyster shell) is also an aim of this work.

Animals (n=42), were divided into 6 groups: healthy control (sham); ovariectomized (OVX); hyperglycemic (STZ); hyperglycemic + ovariectomized (STZ+OVX); Ovariectomized + supplemented (OVX+S) and hyperglycemic + ovariectomized + supplemented (STZ+OVX+S). Glucose, triglycerides, cholesterol, calcium, oestrogens (E2), C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX) and N-terminal propeptides of procollagen type I (PINP) were quantified by standard methods in serum, 60 days after ovariectomy and 53 days after the beginning of the supplementation. The body weight, the vertebral bone microarchitecture (histomorphometry-L4), the biomechanical properties of the femur (bending tests), cortical thickness and ultrastructure of the tibia diaphysis (scanning electron microscopy - SEM) were also evaluated as well as the femoral bone and urinary calcium (atomic absorption spectrometry), in all animals. Aorta crossa, kidney and liver histology and calcium deposits (hematoxylin-eosin and Von-Kossa staining) were evaluated in OVX+S animals.

The results indicate that:

The oyster shell and guar gum supplement, even with low doses of calcium, attenuated the calciuria, the hypocalcaemia, the reduction of the tibia cortical thickness and the femoral demineralization, giving greater femoral stiffness and toughness without apparent risk of vascular, liver and kidney injury and deposits formation.

Chronic hyperglycemia, through increased type 1 collagen formation, modulates bone microarchitecture into less fragile structures despite the lower calcium content, even in the absence of oestrogens.

The calcium and guar gum supplement contributed to preserve the bone cortical ultrastructure and to attenuate the trabecular thickness reduction observed after ovariectomy in the ovariectomized animals with chronic hyperglycemia. However, it has not been possible to prove the effect of guar gum, in the dose used, on the glycaemia and triglycerides in these animals.

**Key words:** Osteoporosis, cortical/trabecular bone, guar gum, oyster shell calcium, type 2 Diabetes, chronic hyperglycemia

## Índice de matérias

	<b>CAPÍTULO - 1</b>	
1.	<b>Introdução – Revisão Bibliográfica</b>	01
1.1.	Tecido ósseo	02
1.1.1.	Caracterização	02
1.2.	Estrutura e composição celular	03
1.2.1.	Osteoblastos	06
1.2.1.1	Diferenciação dos osteoblastos em osteócitos	06
1.2.2.	Osteócitos	07
1.2.3.	Osteoclastos	07
1.3.	Estrutura e composição mineral	08
1.4.	Metabolismo do tecido ósseo	09
1.5.	A osteoporose	13
1.5.1.	Fatores de risco de osteoporose	15
1.5.1.1.	Diabetes mellitus e microestrutura óssea (Metabolismo ósseo)	15
1.5.2.	Prevenção e tratamento da osteoporose	20
1.5.2.1.	Suplementação com cálcio e vitamina D	21
1.5.2.2.	Tratamento farmacológico	25
1.5.2.3.	Perspetiva para novos tratamentos da osteoporose – novos alvos terapêuticos e novos mecanismos de ação.	26
1.6.	Benefícios do consumo de fibras alimentares na diabetes e na osteoporose	27
1.6.1.	Fibra solúvel e metabolismo da glucose	28
1.6.2.	Fibra solúvel e metabolismo dos lípidos	29
1.6.3.	Goma guar	29
1.6.3.1.	Origem e composição	29
1.6.3.2.	Benefícios do consumo de goma guar	31
1.7.	Modelos animais na investigação da osteoporose	32
1.8.	Modelos animais na investigação da diabetes	32
1.8.1.	Ação diabetogénica da estreptozotocina	33
1.8.2.	Bases bioquímicas da citotoxicidade que resultam na morte da célula	34
	<b>CAPÍTULO - 2</b>	37
2.	<b>Justificação do tema</b>	38
	<b>CAPÍTULO - 3</b>	41
3.	<b>Objetivo</b>	41
3.1.	Objetivo geral	42
	<b>CAPÍTULO - 4</b>	43
4.	<b>Materiais e métodos</b>	44
4.1.	Preparação do suplemento rico em cálcio	44
4.1.1.	Preparação e análise do carbonato de cálcio em pó (concha de ostra)	44
4.1.2.	Análise do teor em cálcio da ração e preparação as pellets com goma guar e pó de concha de ostra.	45
4.1.3.	Metodologia para a suplementação com cálcio e goma guar	46
4.2.	Animais de experiencia	46
4.2.1.	Peso dos animais	47
4.2.2.	Indução da hiperglicemia	47
4.2.3.	Metodologia cirúrgica – ovariectomia	47

4.2.4.	Recolha de urina	48
4.2.5.	Sacrifício dos animais, colheita de sangue, ossos e órgãos	48
4.3.	Análise dos parâmetros sanguíneos	49
4.3.1.	Marcadores bioquímicos e hormonais	49
4.3.2.	Marcadores da remodelação óssea	49
4.4.	Análise na urina	50
4.5.	Análise histomorfométrica do osso trabecular vertebral	50
4.6.	Análise por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) da tíbia (osso cortical)	50
4.7.	Parâmetros químicos e biomecânicos do osso cortical femoral	51
4.7.1.	Análise do conteúdo em cálcio	51
4.7.2.	Ensaio biomecânicos de flexão	52
4.8.	Análise histológica do fígado, rim e crossa da aorta	54
4.9.	Análise estatística	54
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
	<b>CAPÍTULO - 5</b>	55
<b>5.</b>	<b>Efeito da hiperglicemia crônica na composição mineral, microestrutura, propriedades biomecânicas e remodelação óssea num modelo animal com e sem osteoporose</b>	56
5.1.	Introdução/Objetivo	56
5.2.	Material e métodos	57
5.2.1.	Desenho experimental	57
5.2.2.	Indução da hiperglicemia	57
5.3.	Resultados	58
5.3.1.	Parâmetros fisiológicos e bioquímicos antes do sacrifício	58
5.3.2.	Parâmetros bioquímicos séricos e urinários após sacrifícios	59
5.3.2.1.	Marcadores bioquímicos da remodelação óssea	60
5.3.3.	Histomorfometria óssea da quarta vértebra lombar (L4)	63
5.3.4.	Espessura cortical óssea da tíbia	65
5.3.5.	Avaliação da microestrutura do osso cortical da tíbia	67
5.3.6.	Parâmetros físico-químicos avaliados no osso femoral	68
5.3.6.1.	Diâmetro e peso dos fêmures	68
5.3.7.	Conteúdo em cálcio	69
5.3.8.	Propriedades biomecânicas do osso	70
5.4.	Discussão e conclusão	73
	<b>CAPÍTULO - 6</b>	79
<b>6.</b>	<b>Avaliação da eficácia e segurança, do suplemento de carbonato de cálcio (pó de concha de ostra) e goma guar, no tratamento/prevenção da osteoporose</b>	80
6.1.	Introdução/Objetivos	80
6.2.	Material e métodos	82
6.2.1.	Modelo experimental	82
6.3.	Resultados	83
6.3.1.	Análise da composição do pó de concha de ostra e possíveis contaminantes	83
6.3.2.	Análise da composição em cálcio da ração	84
6.3.3.	Parâmetros fisiológicos antes do sacrifício	85
6.3.4.	Parâmetros bioquímicos após sacrifícios	86
6.3.4.1.	Parâmetros bioquímicos séricos e urinários	86
6.3.4.2.	Marcadores bioquímicos da remodelação óssea	87

6.4	Histomorfometria óssea da quarta vértebra lombar (L4)	89
6.5.	Parâmetros estruturais da tíbia	90
6.5.1.	Espessura cortical óssea da tíbia	90
6.5.2.	Avaliação da microestrutura do osso cortical	91
6.6.	Parâmetros físico-químicos avaliados no osso femoral	92
6.6.1.	Diâmetros e peso dos fêmures	92
6.6.2	Teor em cálcio dos fêmures	93
6.6.3.	Propriedades biomecânicas dos fêmures	94
6.7.	Análise macroscópica e massa do fígado, rim e coração	96
6.8.	Exames histológicos	97
6.8.1.	Fígado e rim	97
6.8.2.	Aorta torácica	99
6.9.	Discussão e conclusão	101
	<b>CAPÍTULO - 7</b>	105
7.	<b>Avaliação do efeito do suplemento de carbonato de cálcio (pó de concha de ostra) e goma guar, nos parâmetros bioquímicos e no osso osteoporótico de animais com hiperglicemia crônica</b>	106
7.1.	Introdução/objetivo	106
7.2.	Material e métodos	108
7.2.1.	Desenho experimental	108
7.3.	Resultados	109
7.3.1.	Parâmetros fisiológicos e bioquímicos antes do sacrifício	109
7.3.2.	Parâmetros bioquímicos após sacrifício	110
7.3.2.1.	Parâmetros bioquímicos séricos e urinários após sacrifícios	110
7.3.2.2.	Marcadores bioquímicos da remodelação óssea	111
7.3.3.	Histomorfometria óssea da quarta vértebra lombar (L4)	111
7.3.4.	Espessura cortical óssea da tíbia	112
7.3.5.	Avaliação da microestrutura do osso cortical	112
7.3.6.	Parâmetros físico-químicos avaliados no osso femoral	114
7.3.6.1.	Diâmetro e peso dos fêmures	114
7.3.6.2.	Teor em cálcio dos fêmures	114
7.3.7.	Propriedades biomecânicas dos fêmures	115
7.4.	Discussão e conclusão	116
	<b>CAPÍTULO - 8</b>	119
8.	<b>Experiência complementar</b>	120
8.1.	Suplementação	120
8.2.	Introdução/objetivo	120
8.3.	Material e métodos	121
8.3.1.	Animais de experiência	121
8.3.2.	Análise estatística	122
8.4.	Resultados	122
8.4.1.	Níveis de glicemia no sangue total	122
8.4.2.	Peso corporal	123
8.4.3.	Peso de órgãos e de ossos	125
8.4.4.	Glicemia trigliceridemia	127
8.4.5.	Cálcio total ingerido por dia	128
8.4.6.	Cálcio urinário	129
8.5.	Discussão dos resultados do estudo complementar	130
8.6.	Conclusão	132

	<b>CAPÍTULO - 9</b>	135
9.	<b>Síntese e conclusões</b>	136
10.	<b>Referência bibliográfica</b>	139
	<b>Anexo – certificado da ração standard 4RF21 GLP</b>	155

## Índice de figuras

<b>Figura 1.01</b>	Arquitetura geral de um osso longo (Kierszenbaum, 2012).	5
<b>Figura 1.02</b>	As origens e localizações de células ósseas – Adaptado de Physical Therapy. Volume 86. Number 1. January 2006.	6
<b>Figura 1.03</b>	Regulação da Osteoclastogénese por recetor ativador de NF- $\kappa$ B ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG). Adaptado de Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. <i>Clin J Am Soc Nephrol</i> 3 (3): S131-S139.	8
<b>Figura 1.04</b>	Processo de remodelação óssea Adaptado de: <a href="http://www.york.ac.uk/res/btr/Image%20Library/Bone%20remodelling.jpg">http://www.york.ac.uk/res/btr/Image%20Library/Bone%20remodelling.jpg</a>	10
<b>Figura 1.05</b>	Regulação Celular da osteoclastogénese. Adaptado de Singh et al. <i>Int J Crit Illn Inj Sci.</i> 2012 May-Aug; 2(2): 75–81. Doi: <a href="https://doi.org/10.4103/2229-5151.97271">10.4103/2229-5151.97271</a> .	11
<b>Figura 1.06</b>	Representação da estrutura química da goma guar. (EFSA, 2007).	30
<b>Figura 1.07</b>	Estrutura química da glucose (a), da N-acetilglucosamina (b) e da estreptozotocina (c).	34
<b>Figura 1.08</b>	Mecanismo dos eventos tóxicos induzidos pela estreptozotocina (Szkudelski, 2001).	35
<b>Figura 1.09</b>	Biopsia ao pâncreas de ratos normais (A). Biopsia ao pâncreas de ratos diabéticos (B), que confirma a destruição das células e ilhéus devido ao efeito da estreptozotocina (Akbarzadeh et al., 2007).	36
<b>Figura 4.01</b>	As figuras A,B e C identificam animais em gaiolas metabólicas para recolha da urina de 12h.	48
<b>Figura 4.02</b>	As figuras A,B e C identificam animais expostos para colheita de sangue feita por punção cardíaca.	49
<b>Figura 4.03</b>	Doze medições da espessura do osso cortical (linha vermelha) obtidas a partir de um corte transversal da tíbia.	51
<b>Figura 4.04</b>	Ensaio de flexão em 3 pontos em fémur de rato Wistar.	52
<b>Figura 4.05</b>	Curva tensão ( $\sigma$ ) – extensão( $\epsilon$ ) correspondente a um fémur de um rato hiperglicémico e osteoporótico.	53
<b>Figura 5.01</b>	Desenho experimental utilizado para o estudo do efeito da hiperglicemia crónica.	57
<b>Figura 5.02</b>	Peso corporal final (D60) dos animais estudados: C-controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ- hiperglicémico (n=7); STZ+OVX-hiperglicémico ovariectomizado (n=7); *p<0.05; **p<0.01 e *** p<0.001	58
<b>Figura 5.03</b>	Gráfico do nível sérico de glucose dos animais estudados: C- controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ-hiperglicémico (n=7); STZ+OVX-hiperglicémico ovariectomizado; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.	59
<b>Figura 5.04</b>	Gráfico do nível sérico de Triglicéridos dos animais estudados: C-controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ-hiperglicémico (n=7); STZ+OVX-hiperglicémico ovariectomizado; *p<0.05.	59
<b>Figura 5.05</b>	Controlo (n=7); OVX – ovariectomizado (n=7); STZ – hiperglicémico (n=7); STZ+OVX – hiperglicémico ovariectomizado (n=7); *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.	60

<b>Figura 5.06</b>	Gráfico A) CTX (serum C-terminal telopeptide of type 1 collagen) e B) P1NP (N-terminal propeptides of procollagen type I)- dos grupos dos animais estudados: C-controlo, OVX-ovariectomizado, STZ-hiperglicémicos e STZ+OVX- hiperglicémicos ovariectomizados; *p<0.05; **p<0.01.	61
<b>Figura 5.07</b>	Gráfico da razão do P1NP/CTX indica as alterações existentes entre formação e reabsorção do osso dos animais estudados: C- controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ-hiperglicémico (n=7); STZ+OVX- hiperglicémico ovariectomizado; *p<0.01.	61
<b>Figura 5.08</b>	Avaliação por histomorfometria óssea da quarta vértebra lombar (L4), nos grupos estudados: A) C-controlo, B) OVX-ovariectomizados e C) STZ-hiperglicémicos. As seções transversais foram obtidas com 5 µm de espessura e coradas com azul de anilina, de modo a distinguir osso e medula óssea, permitindo a análise estrutural do osso.	63
<b>Figura 5.09</b>	A) Espessura trabecular (Tb.Th), B) Distância trabecular (Tb.Sp), C) Razão do volume ósseo sobre o volume total de tecido (BV/TV); C-controlo (n=6); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ-hiperglicémicos (n=6); STZ+OVX-hiperglicémico ovariectomizado (n=7); *p<0.05 e **p<0.01.	64
<b>Figura 5.10</b>	Imagens da espessura do osso cortical da tíbia, obtidas por SEM, com uma ampliação de 20x, dos animais estudados.	66
<b>Figura 5.11</b>	Imagens SEM (cortes longitudinais, obtidos com ampliação de 150x),representativas do osso da tíbia dos animais estudados: C-controlo (A); OVX-ovariectomizado (B); STZ-hiperglicémico (C); STZ+OVX-hiperglicémico ovariectomizado (D).	67
<b>Figura 5.12</b>	Gráfico do diâmetro dos fêmures dos animais estudados: C-controlo (n=6); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ- hiperglicémico (n=6); STZ+OVX- hiperglicémico ovariectomizado (n=7). *p<0.05.	68
<b>Figura 5.13</b>	Porcentagem do cálcio dos fêmures dos animais estudados: C-controlo (n=6); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ- hiperglicémico (n=6); STZ+OVX- hiperglicémico ovariectomizado (n=7); *p<0.05 e **p<0.01	69
<b>Figura 5.14</b>	Curvas de tensão -extensão exemplificativas. Um animal de cada grupo: Hiperglicémico ovariectomizado – (STZ+OVX) e ovariectomizado - (OVX).	71
<b>Figura 6.01</b>	Desenho experimental utilizado para os estudos dos animais ovariectomizados suplementados com cálcio e goma guar.	83
<b>Figura 6.02</b>	Evolução do peso corporal dos grupos de animais estudados: C-controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7) e OVX+S- ovariectomizado suplementado (n=7). *p<0,05.	85
<b>Figura 6.03</b>	Gráfico A) CTX (serum C-terminal telopeptide of type 1 collagen) e B) P1NP (N-terminal propeptides of procollagen type I) - dos grupos dos animais estudados: C-controlo, OVX-ovariectomizado, OVX+S – ovariectomizados suplementados. O nível de significância foi (*p<0.05) e (**p<0.01).	88
<b>Figura 6.04</b>	Exemplo de imagem de um corte transversal do osso vertebral (L4) de um animal do grupo OVX+S, usada para avaliação quantitativa dos parâmetros histomorfométricos.	89
<b>Figura 6.05</b>	Corte transversal do osso cortical da tíbia de um animal OVX+S, obtida por SEM, com uma ampliação de 20X.	90

<b>Figura 6.06</b>	Imagens (SEM), obtidas com ampliação 150x dos cortes longitudinais das tíbias, representativas de cada grupo de animais. Ovariectomizados (OVX) <b>figura. 6.06-A</b> e Ovariectomizados suplementados (OVX+S) <b>figura. 6.06-B</b> .	91
<b>Figura 6.07</b>	Gráfico diâmetro dos fêmures dos animais estudados: C-controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7) e OVX+S-ovariectomizado suplementado (n=7), p<0.05.	93
<b>Figura 6.08</b>	Gráfico do teor de cálcio dos fêmures dos animais estudados: C-controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7) e OVX+S-ovariectomizado suplementado (n=7), *p<0,05.	94
<b>Figura 6.09</b>	Curvas de tensão-extensão dos seguintes grupos de animais: Controlo- (C); ovariectomizados - (OVX) e ovariectomizados suplementados - (OVX+S).	95
<b>Figura 6.10</b>	Cortes histológicos de fígado (ampliação 100x). Imagens de um animal de cada grupo (OVX e OVX+S) A - Coloração hematoxilina-eosina (HM); B- Coloração de Von Kossa (VK).	97
<b>Figura 6.11</b>	Cortes histológicos do rim; ampliação 200x: medula (túbulos renais <b>fig. C</b> ) e córtex renal (glomérulos <b>fig. D</b> ). Imagens de um animal de cada grupo (OVX e OVX+S) A - Coloração hematoxilina-eosina (HM); B- Coloração de Von Kossa (VK).	98
<b>Figura 6.12</b>	Cortes histológicos em coloração de Hematoxilina-Eosina. Ampliação 40x. A- animal saudável (C); B-Animal ovariectomizado não suplementado (OVX); C- animal ovariectomizado suplementado (C+S).	99
<b>Figura 6.13</b>	Pesquisa de depósitos de cálcio em secções de crossa da aorta. Cortes histológicos em coloração de Von Kossa, ampliação 40x. A-animal saudável (C); B-Animal ovariectomizado não suplementado (OVX); C- animal ovariectomizado suplementado (C+S).	100
<b>Figura 7.01</b>	Desenho experimental utilizado para os estudos dos animais hiperglicémicos ovariectomizados suplementados com cálcio e goma guar durante 7 semanas e meia, com início após uma semana de recobro da ovariectomia.	108
<b>Figura 7.02</b>	Peso corporal dos animais dos grupos STZ (n=7); STZ+OVX (n=7) e STZ+OVX+S (n=3).	109
<b>Figura 7.03</b>	Corte transversal do osso cortical da tíbia de um animal do grupo VI (STZ+OVX+S), obtida por SEM, com uma ampliação de 20X.	112
<b>Figura 7.04</b>	Imagens (SEM), obtidas com ampliação 150x dos cortes longitudinais das tíbias, representativas de cada grupo de animais: A) STZ+OVX+S e B) STZ+OVX.	113
<b>Figura 8.01</b>	Grupos experimentais de acordo com o tratamento e a alimentação: Controlo normoglicémico- (C), Normoglicémico suplementado - (C+S), Hiperglicémico - (STZ) e Hiperglicémico suplementado - (STZ+S).	121
<b>Figura 8.02</b>	Gráfico dos valores de glicemia dos ratos Wistar tratados com soro fisiológico (controlo) e tratados com STZ.	122
<b>Figura 8.03</b>	Gráfico da variação do peso corporal ao longo do estudo, dos quatro grupos de animais: C - controlo (n=5), C+S - controlo suplementados (n=7), STZ - animais hiperglicémicos (n=5) e STZ+S - animais hiperglicémicos suplementados (n=7); # indica diferenças significativas (p<0,01) entre o grupo C e o grupo STZ; indica diferenças significativas (*p<0,005 e **p<0,001) entre o grupo STZ e o grupo STZ+S.	123

<b>Figura 8.04</b>	Gráfico do consumo cumulativo de ração em gramas por quilograma de peso corporal, ao longo do estudo, dos quatros grupos animais: C - controlo normoglicémico (n=5), C+S - controlo normoglicémico suplementado (n=7), STZ – hiperglicémico (n=5) e STZ+S – hiperglicémico suplementado * p<0,05 e **p<0,01) entre o grupo controlo e os grupos STZ (suplementado ou não) a partir da segunda semana.	124
<b>Figura 8.05</b>	Gráfico do consumo cumulativo de água por kg de peso corporal ao longo do estudo: ratos controlo (n=5), controlo suplementado (n=7), hiperglicémicos (n=5) e hiperglicémicos suplementados. X indica diferenças significativas (p<0,05) entre o grupo controlo e o grupo STZ; # indica diferenças significativas (p<0,05) entre o grupo controlo e o grupo STZ+S; * indica diferenças significativas (p<0,05) entre o grupo STZ e o grupo STZ+S.	125
<b>Figura 8.06</b>	Gráfico do peso dos órgãos (normalizados pelo peso corporal do animal) dos animais no final do estudo: controlo normoglicémico (n=5), controlos normoglicémicos suplementados (n=7), hiperglicémicos (n=5) e hiperglicémicos suplementados (n=7) *p<0,05;**p<0,01; ***p<0,005; ****p<0,001.	126
<b>Figura 8.07</b>	Gráfico do peso dos ossos normalizado (tíbias e fémures), dos animais no final do estudo: controlos normoglicémicos (n=5), controlos normoglicémicos suplementados (n=7), hiperglicémicos (n=5) e hiperglicémicos suplementados (n=7); * p<0,05.	126
<b>Figura 8.08</b>	Gráfico da monitorização das glicemias em jejum dos animais hiperglicémicos (n=5) e hiperglicémicos suplementados (n=7) ao longo do estudo, * p<0,05.	127
<b>Figura 8.09</b>	Gráfico do efeito da suplementação, na glicemia e nos triglicéridos dos grupos de animais: controlo normoglicémico (n=5), controlos normoglicémicos suplementados (n=7),hiperglicémicos (n=5) e hiperglicémicos suplementados (n=7); *p<0,05;**p<0,01; *** p<0,0005.	128
<b>Figura 8.10</b>	Gráfico da calciúria (mg/12h) dos grupos de animais estudados: controlos normoglicémicos (n=5), controlos normoglicémicos suplementados (n=7), hiperglicémicos (n=5) e hiperglicémicos suplementados (n=7); **p<0,01.	129

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.01</b>	Classificação da densidade mineral óssea (OMS).	14
<b>Tabela 1.02</b>	Recomendação nutricional de cálcio de acordo com a faixa etária.	22
<b>Tabela 1.03</b>	Composição global, em percentagem, da goma guar natural (sem tratamento). (EFSA, 2007).	30
<b>Tabela 4.01</b>	Parâmetros de avaliação (concentração padrão, comprimento de onda, taxa de fluxo, limite de detecção e fator de diluição) dos teores dos metais utilizados no processo analítico. Designação n.d. – não detetado.	45
<b>Tabela 4.02</b>	Grupos experimentais de acordo com o tratamento a que os animais foram submetidos.	47
<b>Tabela 5.01</b>	Resultados dos marcadores bioquímicos e fisiológicos dos grupos de animais estudados: Controlo (C), ovariectomizado (OVX), hiperglicémico (STZ) e hiperglicémico + ovariectomizado (STZ+OVX).	62
<b>Tabela 5.02</b>	Medições da vértebra lombar (L4), por microscopia eletrónica de varrimento.	65
<b>Tabela 5.03</b>	Espessura do osso cortical (tíbia) avaliada em 12 pontos nos grupos de animais estudados. Os resultados são valores médios $\pm$ desvio padrão; n=6 para C e STZ e n=7 para os OVX e STZ+OVX; <sup>a</sup> p<0.05; comparado ao controlo.	65
<b>Tabela 5.04</b>	Parâmetros físicos do fémur dos animais estudados. C - Controlo; OVX – Ovariectomizado, STZ – hiperglicémico, STZ+OVX- hiperglicémico ovariectomizado, médias $\pm$ erro padrão; n=7 por grupo; <sup>a</sup> p<0.05; <sup>aa</sup> p<0.01; <sup>aaa</sup> p<0.001 comparado ao C; <sup>b</sup> p<0.05 comparado ao grupo OVX.	69
<b>Tabela 5.05</b>	Percentagem de cálcio no osso femoral: C – Controlo; OVX – Ovariectomizado; STZ – hiperglicémico; STZ+OVX – hiperglicémico ovariectomizado, médias $\pm$ erro padrão; n=7 por grupo; <sup>a</sup> p<0.05; <sup>aa</sup> p<0.01 comparado ao controlo.	70
<b>Tabela 5.06</b>	Propriedades biomecânicas obtidas nos ensaios de flexão em três pontos dos fémures direito dos animais estudados n=7 por grupo C, STZ, OVX e STZ+OVX.	71
<b>Tabela 5.07</b>	Correlação dos parâmetros biomecânicos com os marcadores bioquímicos de remodelação óssea (Spearman test).	72
<b>Tabela 6.01</b>	Teores máximos de metais pesados que devem ser aplicados para os bivalves para efeitos de Saúde Pública (mg/kg peso fresco) de acordo com o Regulamento (CE) n <sup>o</sup> 1881/ 2006 de 19 de Dezembro <sup>(1)</sup> e Regulamento (CE) n <sup>o</sup> 629/2008 de 2 de Julho <sup>(2)</sup> .	84
<b>Tabela 6.02</b>	Composição química maioritária do pó de conchas de ostras, espécie <i>Crassostrea gigas</i> .	84
<b>Tabela 6.03</b>	Peso corporal dos animais estudados: n=7; Controlo saudável (controlo), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado suplementado (OVX+S). <sup>aa</sup> p<0.01 comparado ao controlo.	85
<b>Tabela 6.04</b>	Marcadores bioquímicos dos grupos de animais estudados: Controlo ovariectomizado (OVX), ovariectomizado suplementado (OVX+S). n=7; <sup>a</sup> p<0.05 <sup>aa</sup> p<0.01 comparativamente ao Controlo DL – Limite de detecção = 11.8 pg/mL.	87

<b>Tabela 6.05</b>	Marcadores de remodelação óssea dos grupos de animais estudados: Controlo saudável (C), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado suplementado (OVX+S). n=7 para todos os grupos <sup>a</sup> p<0.05 <sup>aa</sup> p<0.01 comparativamente ao Controlo.	88
<b>Tabela 6.06</b>	Medições da vértebra lombar (L4), por microscopia eletrónica de varredura. Os resultados são valores médios ± erro padrão ; n=6 para os grupos controlo (C); n=7 para OVX e OVX+S; <sup>a</sup> p<0.05; <sup>aa</sup> p<0.01 comparado ao controlo.	90
<b>Tabela 6.07</b>	Espessura do osso cortical (tíbia) avaliada em 12 pontos nos grupos de animais estudados. Controlo(C) OVX e OVX+S; médias ± erro padrão; n=6; <sup>a</sup> p<0.05; comparado ao controlo.	91
<b>Tabela 6.08</b>	Parâmetros físicos do fémur. n=7 por grupo; <sup>a</sup> p<0.05, <sup>aa</sup> p<0.01 <sup>aaa</sup> p<0.001 comparado ao controlo.	93
<b>Tabela 6.09</b>	Teor em cálcio do fémur. n=7 por grupo; <sup>a</sup> p<0.05; comparado ao controlo.	94
<b>Tabela 6.10</b>	Propriedades biomecânicas dos fémures dos grupos de ratos fêmeas estudados: controlo saudável (C), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado suplementado (OVX+S); n=7 por grupo; <sup>a</sup> p<0.05; comparado ao C, <sup>b</sup> p<0.05, comparado ao OVX+S.	95
<b>Tabela 6.11</b>	Avaliação física dos órgãos coração, fígado e rins: massa e massa normalizada pela massa corporal (MC) em cada grupo: Controlo (C); Ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado suplementado (OVX+S); n= 7 por grupo; <sup>a</sup> p<0.05 comparado ao controlo.	96
<b>Tabela 7.01</b>	Resultados dos pesos corporais imediatamente antes da ovariectomia (D0) e no final do estudo (D60) STZ+OVX+S (n=3); STZ, STZ+OVX e OVX+S (n=7); médias ± erro padrão.	110
<b>Tabela 7.02</b>	Resultados dos marcadores bioquímicos, séricos e urinários dos grupos: STZ+OVX+S n=3; STZ+OVX n=7 e OVX+S n=7; médias ± erro padrão.	110
<b>Tabela 7.03</b>	Marcadores de remodelação óssea dos grupos: STZ+OVX+S n=3; STZ+OVX e OVX+S n=7; médias ± erro padrão.	111
<b>Tabela 7.04</b>	Medições da vértebra lombar (L4), por microscopia eletrónica de varrimento os resultados são valores médios ± erro padrão; n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para STZ+OVX e OVX+S.	111
<b>Tabela 7.05</b>	Espessura do osso cortical (tíbia) avaliada em 12 pontos nos grupos de animais estudados; médias ± erro padrão. n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para os grupos STZ+OVX e OVX+S.	112
<b>Tabela 7.06</b>	Parâmetros físicos do fémur: n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para STZ+OVX e OVX+S; médias ± erro padrão	114
<b>Tabela 7.07</b>	Teor em cálcio do fémur. n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para os grupos STZ;STZ+OVX; OVX+S; médias ± erro padrão.	115
<b>Tabela 7.08</b>	Propriedades biomecânicas dos fémures dos grupos estudados: n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para os grupos STZ+OVX e OVX+S; médias ± erro padrão.	115
<b>Tabela 8.01</b>	Peso corporal dos animais estudados, no início e no final do período de suplementação: Controlo saudável (controlo) n= 5, controlo suplementado (C+S) n=7; hiperglicémico n=5; hiperglicémico suplementado (STZ+S) n=7. Os resultados são valores médios ± desvio padrão.	124
<b>Tabela 8.02</b>	Valores das glicemias e dos triglicéridos séricos dos animais estudados, após sacrifício. Controlo saudável (C) n= 5, controlo suplementado (C+S) n=7; hiperglicémico (STZ) n=5 e hiperglicémico suplementado (STZ+S) n=7.	128
<b>Tabela 8.03</b>	Cálcio total ingerido por dia na ração e no suplemento de pó de concha de ostra.	129

## Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

<b>AACC</b>	Associação Americana de Químicos de Cereais - ( <i>American Association of Cereal Chemists</i> ).
<b>Al</b>	Alumínio
<b>AAS</b>	Espectrofotometria de absorção atômica - ( <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i> )
<b>AOAC</b>	Associação Oficial de Química Analítica - ( <i>Association of Official Analytical Chemists</i> )
<b>As</b>	Arsénio
<b>BV/TV</b>	Volume ósseo
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de Cálcio
<b>CAS</b>	Chemical Abstracts Service
<b>Cd</b>	Cadmio
<b>Co</b>	Cobalto
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>COMA</b>	Comité sobre os Aspectos Médicos de Política Alimentar - ( <i>Committee on Medical Aspects of Food Policy</i> ).
<b>Cr</b>	Cromio
<b>CTX</b>	Telopectídeo C-terminal do colagénio tipo I - ( <i>C-terminal telopeptide of type 1 collagen</i> )
<b>Cu</b>	Cobre
<b>D</b>	Diâmetro
<b>D0</b>	Dia zero
<b>D60</b>	Dia sessenta
<b>dL</b>	Decilitro
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DMO</b>	Densidade Mineral Óssea - ( <i>BMD – Bone Mineral Density</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico - ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DXA</b>	Absorção de raio-X de dupla energia
<b>E</b>	Módulo de elasticidade - ( <i>modulo de Young</i> )
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EFSA</b>	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar – ( <i>European Food Safety Authority</i> )
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América - ( <i>United States of America</i> )
<b>F</b>	Força
<b>FAO</b>	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - ( <i>Food and Agriculture Organization</i> )
<b>FAS</b>	Síntese de ácidos gordos - ( <i>Fatty acid synthase</i> )
<b>Fe</b>	Ferro
<b>g</b>	Grama
<b>g/dia</b>	Grama/dia
<b>g/kg</b>	Grama/quilograma
<b>g/mol</b>	Grama/mol
<b>GIP</b>	Polipeptídeo inibidor gástrico - ( <i>Gastric inhibitory polypeptide</i> ).
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like peptide-1
<b>GLUT2</b>	Glucose transporter 2
<b>GPO/POD</b>	Glicerol-3-fosfato-oxidase/Peroxidase

<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade - (High density lipoprotein)
<b>Hg</b>	Mercúrio
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Ácido nítrico
<b>IDF</b>	Federação internacional de diabetes - (International Diabetes Federation).
<b>IMM</b>	Instituto de Medicina Molecular
<b>Ip</b>	Intraperitoneal
<b>IST</b>	Instituto Superior Técnico
<b>JECFA</b>	Comité Mixto FAO / OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares - (JECFA - Joint Expert Committee on Food Additives).
<b>Kg</b>	Quilogramas
<b>Kn</b>	Kilo Newton (medida de força).
<b>L4</b>	Lombar4 - (quarta vertebra lombar).
<b>LD</b>	Limite de detecção.
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade - (Low density lipoprotein)
<b>M-CSF</b>	Fator estimulador das colonias dos macrófagos - (Macrophage Colony Stimulating Factor).
<b>mg</b>	Miligramas.
<b>mg/dL</b>	Miligramas/decilitro
<b>mg/kg</b>	Miligramas/quilograma
<b>mg/L</b>	Miligramas/litro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mL/min</b>	Mililitro/minuto
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mm/g</b>	Milímetro/grama
<b>mm/s</b>	Milímetro/segundo
<b>Mn</b>	Manganês
<b>n</b>	Número
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogénio ou azoto
<b>Na</b>	Sódio
<b>Nd</b>	Não detetável
<b>ng/mL</b>	Nanograma/mililitro
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>OP</b>	Osteoporose - (Osteoporosis)
<b>OPG</b>	Osteoprotegrina - (Osteoprotegerin)
<b>OVX</b>	Ovariectomizado - (Ovariectomized)
<b>P1NP</b>	Propéptido N-terminal do procologénio tipo I - (N-terminal propeptide of type 1 procollagen). 23
<b>PA</b>	Pró-análise
<b>Pb</b>	Chumbo
<b>pg/mL</b>	Picograma/mililitro
<b>ppm</b>	parte por milhão
<b>PTH</b>	Hormona paratiróide - (Parathyroid hormone)
<b>RANK</b>	Receptor de ativação do fator nuclear KB - (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B)
<b>RANKL</b>	Receptor de ativação do fator nuclear KB-ligando – (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B - Ligand)
<b>s</b>	Segundos
<b>S</b>	Suplementado
<b>sc</b>	Subcutâneo

<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscopy
<b>Sham</b>	Controlo
<b>Sn</b>	Estanho
<b>SPSS</b>	Statistical package for social Sciences Manager
<b>STZ</b>	Estreptozotocina - (Streptozotocin)
<b>Tb.Sp</b>	Separação trabecular
<b>Tb.Th</b>	Espessura trabecular
<b>UK</b>	Reino Unido - (United Kingdom)
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WHO</b>	Organização mundial da saúde - (World Health Organization)
<b>Zn</b>	Zinco
<b><math>\Delta l</math></b>	Deslocamento
<b>E</b>	Extensão
<b><math>\lambda</math></b>	Lambda - (medida do comprimento de onda)
<b><math>\mu\text{g/Kg}</math></b>	Micrograma/quilograma
<b><math>\mu\text{g/L}</math></b>	Micrograma/Litro
<b><math>\mu\text{g/mL}</math></b>	Micrograma/mililitro
<b><math>\sigma</math></b>	Tensão
<b><math>\sigma_{\text{ced}}</math></b>	Tensao de cedência
<b><math>\sigma_{\text{ult}}</math></b>	Ultimate stress



# **CAPÍTULO – 1**

## **INTRODUÇÃO - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1. Introdução**

### **1.1. Tecido ósseo**

#### **1.1.1. Caracterização**

O osso é um tecido dinâmico que sofre uma adaptação contínua ao longo da vida para alcançar e preservar o tamanho do esqueleto, forma e integridade estrutural e regular a homeostase mineral (Sagalovsky, 2013). As fibras do osso são majoritariamente compostas por colagénio tipo 1 impregnada de mineral na forma de hidroxiapatite. A integridade funcional e a força do esqueleto estão mantidas por estas estruturas altamente reticuladas (Wheater, 2013). A mineralização da matriz confere a este tecido uma extrema dureza, permitindo-lhe desempenhar importantes funções de sustentação e proteção. Além de contribuir para a forma do corpo, os ossos exercem várias outras funções importantes: suporte, proteção, movimento, armazenamento de minerais e de fatores de crescimento e formação de células sanguíneas. O osso é um reservatório para minerais, principalmente cálcio e fósforo. Os minerais armazenados são libertados na corrente sanguínea quando necessário para serem distribuídos a toda as partes do corpo (Marieb & Hoehn, 2008).

O osso contém componentes orgânicos e inorgânicos. A extrema rigidez do tecido ósseo é resultado da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz. Seus componentes orgânicos básicos incluem as células (osteogénicas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e o osteoide, a parte orgânica da matriz (Marieb & Hoehn, 2008). O osteoide, que forma aproximadamente um terço da matriz, inclui a substância fundamental amorfa, formada por proteoglicanos e as fibras glicogénicas, ambos sintetizados e secretados pelos osteoblastos. Estas substâncias orgânicas em particular o colagénio do tipo I, contribuem não apenas para a estrutura do osso, mas também para a flexibilidade e a grande força de tensão que permitem ao osso resistir ao estiramento e a torção. A resistência do osso é determinada por vários factores como a geometria, a composição, a dimensão e a proporção do osso trabecular e do osso cortical (Clarke, 2008).

A resistência excepcional e a força de tensão do osso têm sido objeto de intensas pesquisas. Parece que a resistência do osso é devida à presença de ligações nas moléculas de colagénio ou entre elas, que se rompem facilmente sob impacto, dissipando energia para evitar que a força cause uma fratura. Na ausência de trauma continuado ou adicional, a maioria dessas ligações é refeita (Marieb & Hoehn, 2008).

O componente inorgânico do tecido ósseo, 65% da sua massa, consiste em hidroxiapatite inorgânica, ou sais minerais, principalmente na forma de fosfatos de cálcio presentes como minúsculos cristais firmemente agrupados nas fibras colagénicas e ao redor delas na matriz

celular. Esses cristais são responsáveis pelas características de rigidez do osso, que lhe confere resistência à compressão. A osteocalcina (OC) é a proteína não colagénica mais abundante, é sintetizada pelos osteoblastos e tem propriedades específicas na mineralização do osso (Kierszenbaum, 2012). A osteocalcina (OC) é secretada por osteoblastos maduros, condrócitos hipertróficos e odontoblastos, o seu gene está localizado no cromossoma 1 (1q25-q31). É constituída por uma sequência de 49 aminoácidos cujas posições 17, 21 e 24 são ocupadas pelo ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico (Gla) que é responsável pela fixação do cálcio e da hidroxiapatite na matriz extracelular o que equivale a dizer que é responsável pela efetiva mineralização que se verifica no tecido ósseo. (Avolio, Brandão, Oliveira, Costa & Alonso, 2008). A osteocalcina (OC) tem sua síntese estimulada pela 1,25 dihidroxivitamina D3 (calcitriol) sendo que a vitamina K1 constitui um cofator essencial para que ocorra a  $\gamma$ -carboxilação pós-traducional do resíduo glutamyl que formará os resíduos  $\gamma$ -carboxiglutamyl. Este processo permitirá a mineralização da matriz depositada (Avolio, Brandão, Oliveira, Costa & Alonso, 2008).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, indicam ainda, ter participação no recrutamento e diferenciação osteoclástica mas outras funções ainda precisam ser esclarecidas.

Os níveis séricos de osteocalcina são significativamente influenciados pelo sexo, idade e função renal.

No osso *in vivo*; 25% do peso é atribuído a água; cerca de 85% da água distribui-se na matriz orgânica e 15% nos canais e cavidades das zonas calcificadas (Canhão, 2007). A matriz extra celular é mineralizada logo após a sua deposição. O tecido ósseo cortical e o tecido ósseo esponjoso possuem os mesmos elementos constitutivos quanto a células e matriz óssea tendo, no entanto, importantes diferenças estruturais e funcionais (Kierszenbaum, 2012).

## **1.2. Estrutura e composição celular**

Morfologicamente o osso está caracterizado como trabecular (esponjoso) ou cortical (compacto). Funcionalmente o osso esponjoso está mais associado com a capacidade metabólica do que o osso cortical, enquanto o osso cortical em geral, proporciona maior força mecânica (Downey & Siegel, 2006).

O osso compacto ou cortical é constituído por várias unidades microestruturais, os sistemas de Havers ou osteons, que se distribuem de forma circular, à volta do canal de Havers. Cada osteon é formado por várias lamelas intersticiais concêntricas. Perpendicularmente aos canais de Havers distribuem-se os canais de Volkmann, fundamentais para a vascularização do osso. Entre os sistemas de Havers, existe uma camada fina, de matriz não mineralizada, que se denomina linha cimentada. Estas zonas são fundamentais para manter íntegras as

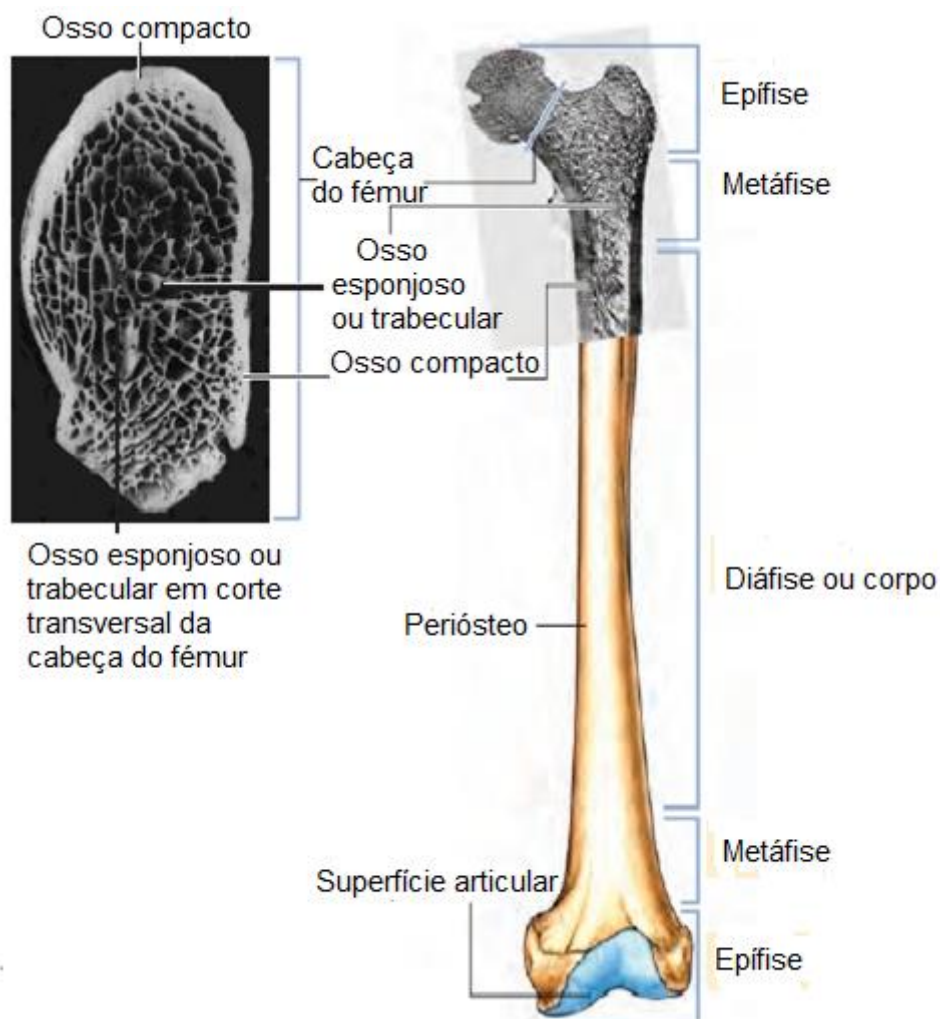
propriedades do osso, na adaptação e resposta a cargas e microtraumatismos. Nalgumas situações patológicas, a espessura e a extensão dessa camada pode aumentar ou diminuir como por exemplo na osteomalácia, raquitismo, calo ósseo fraturário ou doença óssea de Paget (Canhão, 2007).

O osso esponjoso ou trabecular é formado por delgadas trabéculas, constituídas por lamelas ósseas, na sua maioria paralelas entre si, delimitando amplas cavidades intercomunicantes ocupadas, no osso vivo, por medula óssea (Marieb & Hoehn, 2008; Kierszenbaum, 2012). As trabéculas estão organizadas sob a forma de uma rede tridimensional, seguindo sempre as linhas das forças mecânicas, disposição que confere ao osso esponjoso uma ótima resistência às cargas transmitidas pelas superfícies articulares.

A superfície de corte do tecido ósseo compacto aparece sólida e bastante homogênea, ao passo que o tecido ósseo esponjoso tem a aparência de uma esponja (**Fig.1.01**). Nos ossos longos, como o fêmur, o corpo ou diáfise consiste em osso compacto formando um cilindro oco com espaço medular central, chamado de cavidade medular.

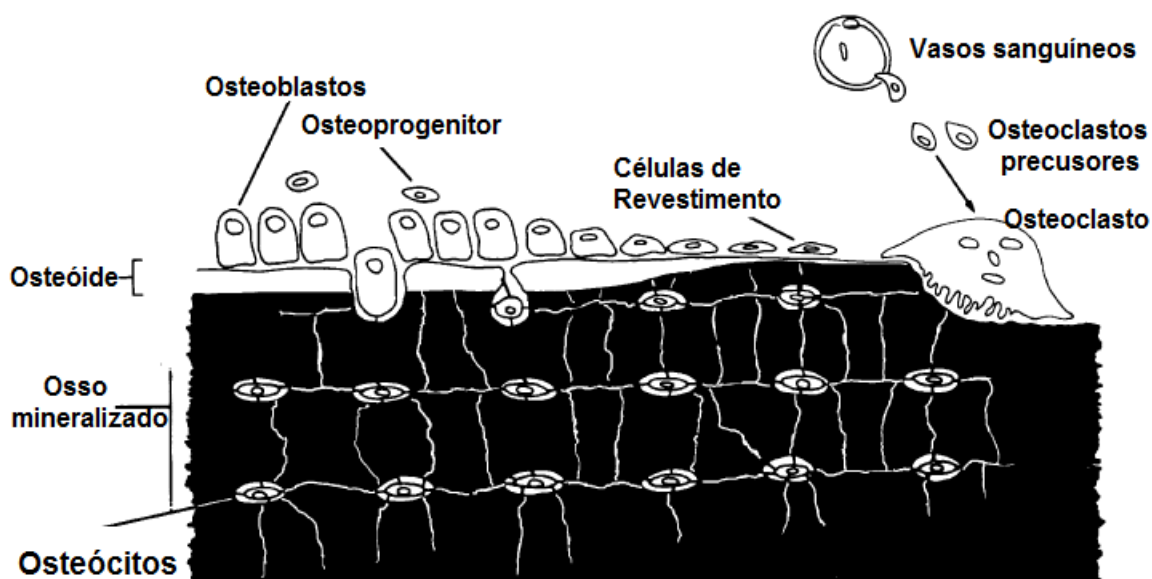
As extremidades dos ossos longos, chamadas de epífises, consistem em osso esponjoso revestido por uma fina camada de osso compacto. Durante o crescimento do indivíduo, as epífises são separadas da diáfise por uma placa epifisária cartilaginosa, conectada à diáfise por osso esponjoso. Uma delgada região de transição, chamada de metáfise, conecta a epífise e a diáfise (Kierszenbaum, 2012). A placa epifisária e o osso esponjoso adjacente representam a zona de crescimento, responsável pelo aumento do crescimento do osso em comprimento.

A cavidade medular da diáfise e os espaços no interior do osso esponjoso são revestidos pelo endóstio, também com potencial osteogénico (Clark, 2005; Kierszenbaum, 2012).



**Figura 1.01** - Arquitetura geral de um osso longo (Kierszenbaum, 2012).

A sua composição celular é formada por quatro tipos de células: osteoblastos, osteoclastos, células de revestimento que se encontram presentes na superfície óssea e osteócitos no seu interior mineralizado (**Fig.1.02**). Os osteoblastos, as células de revestimento e os osteócitos têm origem nas células osteoprogenitoras locais, ao passo que os osteoclastos têm origem hematopoiética (Downey & Siegel, 2006).



**Figura 1.02** - As origens e localizações de células ósseas – Adaptado de Physical Therapy. Volume 86. Number 1. January 2006.

### 1.2.1. Osteoblastos

Osteoblasto ou célula formadora do osso origina-se de um precursor mesenquimatoso do estroma da medula óssea (McPhee & Ganong, 2007). Os osteoblastos são células altamente polarizadas: eles depositam osteoide, a matriz orgânica não mineralizada do osso, ao longo da interface osteoblasto-osso. Os osteoblastos iniciam e controlam a mineralização subsequente do osteoide. Seus produtos específicos são o colagénio tipo I, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea. Além disso, os osteoblastos produzem fatores de crescimento, em particular os membros da família de proteínas morfogenéticas ósseas, com atividades osteoindutivas (Kierszenbaum, 2012). Quando a formação óssea está completa, os osteoblastos achatam-se e transformam-se em osteócitos.

#### 1.2.1.1. Diferenciação dos osteoblastos em osteócitos

Os osteoblastos derivam de uma célula mesenquimal pluripotente que dá origem as células musculares, adipócitos, fibroblastos e condroblastos.

Dois genes osteoblasto-específico controlam a diferenciação da progénie osteoblástica: *Cbfa1/Runx2* (para a família do fator de ligação-centro/proteína homeodomínio runt2) que codifica um fator de transcrição que induz a diferenciação dos osteoblastos e controlam a expressão de osteocalcina, O *Cbfa1/Runx2* é o mais precoce e específico indicador de osteogênese, a sua expressão é induzida pela BMP7 (família de proteínas morfogénicas ósseas), e é seguida pela expressão de osteocalcina e osteopontina. A osteocalcina é uma proteína

secretora específica, que só se expressa nos osteoblastos terminalmente diferenciados, sob o controlo do Cbfa1/Runx2 (Kierszenbaum, 2012; Canhão, 2007).

### **1.2.2. Osteócitos**

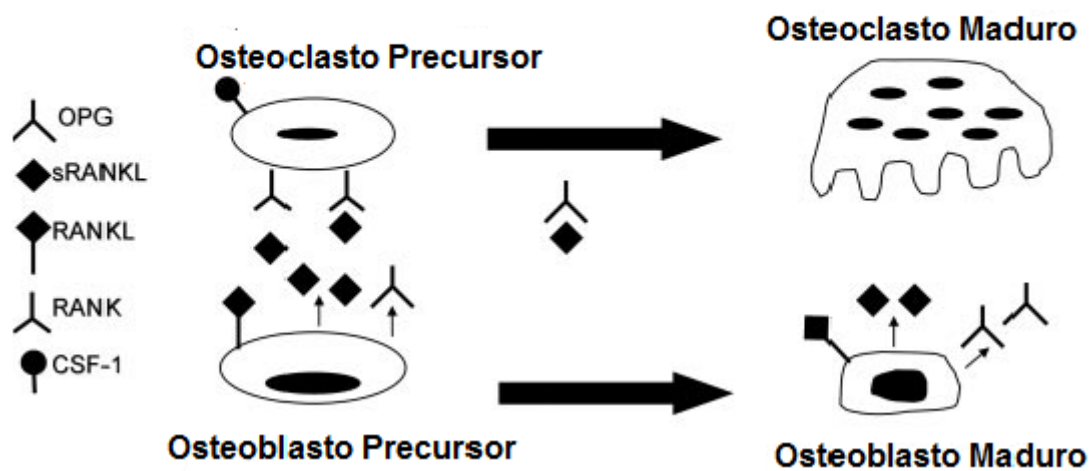
Os osteócitos são células muito ramificadas, com o seu corpo ocupando pequenos espaços entre lamelas, chamados de lacunas. Pequenos canais, os canalículos, percorrem através das lamelas e interconectam as lacunas vizinhas. Os processos celulares adjacentes, encontrados no interior dos canalículos, são conectados por junções comunicantes. Os nutrientes difundem-se a partir dos vasos sanguíneos vizinhos, localizados no interior do canal haversianos, através dos canalículos das colunas. A densa rede de osteócitos depende não somente da comunicação intracelular através das junções comunicantes, mas também da mobilização de nutrientes e de moléculas de sinalização ao longo do ambiente extracelular, facilitada pelos canalículos que percorrem lacuna a lacuna. A vida de um osteócito depende desse processo de difusão dos nutrientes, e a da matriz óssea depende dos osteoides. Os osteócitos podem permanecer vivos por anos se o fornecimento vascular for contínuo (Kierszenbaum, 2012). A presença de lacunas vazias no osso em envelhecimento sugere que os osteócitos podem sofrer apoptose, provavelmente causada pela ruptura de suas junções comunicantes intercelulares ou interações matriz-célula. A apoptose dos osteócitos que ocorre em situações de deficiência de estrogénios, corticoterapia, envelhecimento e após agressão do osso, associa-se à perda de resistência, mesmo antes da perda de massa óssea ser detetada (Canhão, 2007). O tratamento com estrogénios e bifosfonatos pode ajudar a prevenir a apoptose dos osteoblastos e osteócitos, e a manter a resistência do osso (Clarke, 2008).

### **1.2.3. Osteoclastos**

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas especializadas na reabsorção óssea. Os osteoclastos são células diferenciadas que se originam continuamente a partir de precursores hematopoiéticos da linhagem monocítica e não se dividem. A formação de osteoclastos requer fatores de crescimento hematopoiéticos, como o fator estimulador das colônias dos macrófagos (M-CSF), e precisa de um sinal vindo das células do estroma da medula (McPhee & Ganong, 2007). O ligando do receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANKL) liga-se ao seu receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANK) nos precursores dos osteoclastos e sinaliza para o interior da célula. Uma variedade de células, incluindo as da medula, produz um recetor solúvel, a osteoprotegerina (OPG), que se liga ao ligando do receptor do fator nuclear kapa B (RANKL), impedindo, dessa forma, a sua interação com o recetor ativador do fator nuclear kapa B (RANK), interrompendo a diferenciação e ativação dos osteoclastos

(Fig.1.03). Conforme os osteoclastos amadurecem, adquirem a capacidade de produzir enzimas específicas e finalmente fundem-se para constituir a célula multinucleada madura. O processo de maturação é acelerado por hormonas de reabsorção óssea, como a paratormona (PTH) provavelmente por meio dos seus efeitos no sistema RANKL/OPG (McPhee & Ganong, 2007).

### Regulação da Osteoclastogénese por RANKL e OPG



**Figura 1.03** - Regulação da Osteoclastogénese pelo ligando receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG). Adaptado de Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 (3): S131-S139.

Para reabsorver o osso, o osteoclasto móvel pousa sobre uma superfície óssea e sela uma área, formando um anel adesivo, no qual as integrinas celulares se ligam fortemente às proteínas da matriz óssea. Tendo isolado uma área da superfície óssea, o osteoclasto desenvolve sobre a superfície uma estrutura de membrana plasmática intensamente invaginada, chamada de borda pregueada, uma organela distinta, que, porém, age essencialmente como um enorme lisossoma, dissolvendo os minerais dos ossos secretando ácido sobre a superfície óssea isolada e, simultaneamente, fragmentando a matriz óssea pela secreção de collagenase e catepsina.

### 1.3. Estrutura e composição mineral

A porção inorgânica do osso é formada principalmente por cristais de hidroxiapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  que se depositam sobre a matriz de colagénio do osso. Estes sais que são semelhantes nas suas propriedades físicas ao mármore, apresentam uma grande força de

compressão, dureza e rigidez. Estes cristais depositam-se sobre as fibras de colagénio e compõem a matriz interna mineralizada do osso. No nível seguinte estas fibrilas têm um arranjo lamelar que contem fibras unidireccionais dispostas em vários ângulos e nas diferentes camadas ou como um bloco de fibrilas orientadas de forma aleatória (Bartel, Davy, & Keaveny, 2007). Estas lamelas podem organizar-se em anéis concêntricos á volta de um canal de Havers que inclui vasos sanguíneos, nervos e células ósseas, constituindo o osteon, a unidade óssea do osso cortical. O osteon é continuamente quebrado e substituído pela ação de vários tipos de células num processo designado por remodelação óssea. O osso cortical é constituído por uma microestrutura que lhe confere maior resistência à compressão do que à tensão e cujo módulo elástico e de força pode variar bastante em resultado da variabilidade da sua porosidade, que tem tendência a aumentar com a idade. Sendo a porosidade a principal diferença entre o osso cortical e o osso trabecular. No homem, o osso cortical apresenta-se muito menos poroso (5-30%) do que o osso trabecular (60-95%), o que lhes confere propriedades mecânicas diferentes (Bartel, Davy, & Keaveny, 2007).

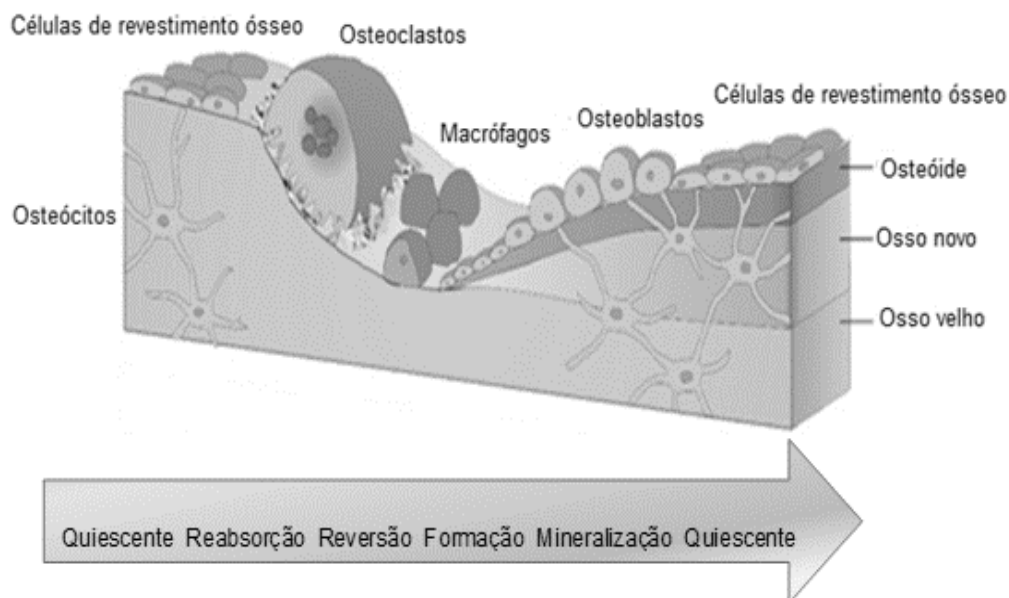
#### **1.4. Metabolismo do tecido ósseo**

O tecido ósseo é um tecido dinâmico e ativo, que está em constante modificação, através dos mecanismos de crescimento, modelação e remodelação óssea. A modelação óssea é a responsável pela arquitetura óssea, que envolve forma, tamanho, quantidade e disposição estrutural de seu tecido, obedecendo a estímulos mecânicos externos e não mecânicos locais e sistémicos. As alterações na forma e no tamanho do osso tendem a desaparecer com a paragem do crescimento ósseo, as mudanças na sua estrutura microscópica persistem ao longo da vida (Aires, 2008).

A remodelação óssea é um processo fisiológico que mantém a integridade do esqueleto removendo o osso velho e substituindo por uma matriz jovem (Sagalovsky, 2013). A remodelação óssea é um dos principais mecanismos envolvidos na manutenção do equilíbrio do cálcio no fluído extracelular. As células responsáveis pela reabsorção do osso são os osteoclastos e, pela formação, os osteoblastos. A paratormona (PTH) é a principal hormona envolvida na ativação destas células (Aires, 2008). Os fenómenos que levam à ativação ainda são pouco conhecidos. Tanto os estímulos sistémicos (PTH) como os locais (microfraturas) podem iniciar o processo de ativação da remodelação óssea (Aires, 2008). O osso é então reabsorvido pelos osteoclastos e formado na mesma região pelos osteoblastos. Quando a formação óssea está completa, os osteoblastos achatam-se e transformam-se em osteócitos.

A remodelação óssea é um processo contínuo, caracterizado pela sequência de ativação, reabsorção, reversão e formação (**Fig.1.04**). A remodelação pode desenvolver-se de

forma aleatória mas também pode ocorrer seletivamente nas áreas que precisam de reparação. O seu propósito é estabelecer um ponto ideal de resistência óssea com a reparação de lesões microscópicas (denominadas microfissuras) e manter a homeostasia do cálcio. (Kierszenbaum, 2012). Existem duas formas de remodelação óssea: a remodelação do tecido ósseo cortical (tecido ósseo compacto) que consiste na reabsorção de sistemas de Havers antigos, que ocorre dentro do osteon, seguida pela organização de novos sistemas de Havers, e a remodelação óssea trabecular que ocorre na superfície do osso. A superfície endosteal trabecular é remodelada por um mecanismo semelhante ao da remodelação óssea cortical. (Kierszenbaum, 2012).



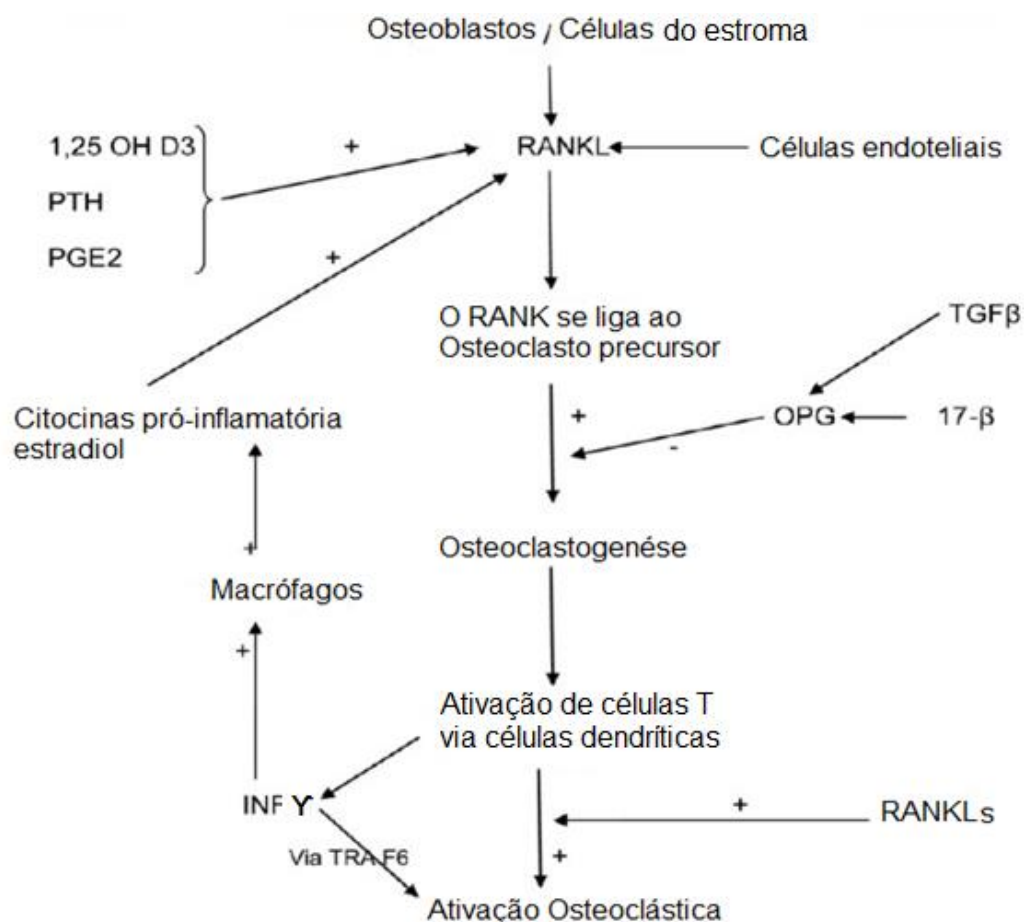
**Figura 1.04** - Processo de remodelação óssea

Adaptado de: (<http://www.york.ac.uk/res/btr/Image%20Library/Bone%20remodelling.jpg>)

A ativação envolve o recrutamento e a ativação de monócitos-macrófagos precursores mononucleares osteoclásticos da circulação, elevação do endóstio que contém as células de revestimento e fusão de múltiplas células mononucleares para formar pré-osteoclastos multinucleados. Os pré-osteoclastos fundem-se com a matriz óssea via interação entre os recetores de integrina das suas membranas celulares e os resíduos peptídicos da matriz proteica que contém {arginina, glicina e asparagina} de modo a formar zonas de consolidação ao redor do osso reabsorvido pelos osteoclastos multinucleados (Clarke, 2008).

A reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos ocorre aproximadamente durante 2 a 4 semanas por cada ciclo de remodelação (Clarke, 2008). Os osteoclastos são transitoriamente ativos em resposta à demanda metabólica para a mobilização de cálcio do osso para

o sangue. A atividade osteoclástica é regulada diretamente pela calcitonina, pela vitamina D3 e por moléculas reguladoras produzidas pelos osteoblastos e pelas células do estroma da medula óssea (Kierszenbaum, 2012). A osteoclastogênese (**Fig.1.05**) é desencadeada por duas moléculas relevantes produzidas pelos osteoblastos: (1) O fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF) e (2) o ligando (RANKL) do fator nuclear kapa B (NF- $\kappa$ B) (Kierszenbaum, 2012; Singh, Mehdi, 2012). A reabsorção óssea envolve, primeiro, a dissolução dos componentes inorgânicos do osso (desmineralização óssea) mediada pela H<sup>+</sup> - ATPase (adenosina fosfatase) no interior do ambiente ácido, seguida pela degradação enzimática orgânica (colagénio tipo I e proteínas não colagénicas) pela catepsina K, resultando na formação de uma concavidade rasa chamada lacuna de Howship na superfície do osso trabecular. A ação dos osteoclastos é antagonizada pela osteoprotegerina (OPG), secretada por células mesenquimatosas locais e osteoblastos, que se une ao RANKL. A fase de reabsorção é concluída por células mononucleares depois da apoptose dos osteoclastos multinucleados (Kierszenbaum, 2012; Clarke, 2008).



**Figura 1.05** - Regulação Celular da osteoclastogênese. Adaptado de Singh et al. *Int J Crit Illn Inj Sci.* 2012 May-Aug; 2(2): 75–81. Doi: 10.4103/2229-5151.97271

Reversão – durante a fase de reversão, a reabsorção óssea transita para a formação. Ao completar a reabsorção óssea as cavidades de reabsorção contém uma variedade de células mononucleares, que incluem monócitos, osteócitos libertados pela matriz óssea e pré-osteoblastos recrutados para iniciar uma nova formação óssea. Os sinais de ligação entre o fim da reabsorção e o início da formação óssea ainda são desconhecidos. Pensa-se que os sinais de ligação incluem fatores derivados da matriz óssea, tais como: fator de crescimento de transformação (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF-2), proteínas ósseas morfogenéticas, e PDGF, ou fator de crescimento fibroblástico. A concentração de fator de crescimento de transformação (TGF- $\beta$ ) na matriz óssea correlaciona-se com índices histomorfométricos de remodelação óssea e com a osteocalcina e a fosfatase alcalina óssea séricas. O fator de crescimento de transformação (TGF- $\beta$ ) libertado da matriz óssea diminui a reabsorção dos osteoclastos através da inibição da produção de RANKL pelos osteoblastos. Tem sido ainda proposto que a inversão de fase possa também ser mediada pelo gradiente de tensão nas lacunas (Clarke, 2008).

A fase de formação óssea leva 4 a 6 meses a completar-se. Os osteoblastos sintetizam nova matriz orgânica de colagénio tipo 1 e outras proteínas da matriz óssea; osteopontina, osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e sialoproteína óssea, e regulam a mineralização da matriz pela libertação de pequenas lacunas da matriz ligada à membrana que concentram cálcio e fosfato e destroem enzimaticamente inibidores da mineralização tais como pirofosfato ou proteoglicanos. Os osteoblastos que estão em volta da matriz ou dentro dela transformam-se em osteócitos com uma extensa rede canicular que os liga à superfície das células de revestimento, aos osteoblastos, e aos osteócitos e são mantidos por uma junção de lacunas entre os processos citoplasmáticos que se prolongam a partir dos osteócitos. Na fase final de formação óssea a maior parte dos osteoblastos entram em apoptose (50% a 70%), os restantes diferenciam-se em osteócitos ou em células de revestimento (Clarke, 2008). Os osteócitos são sensíveis às forças mecânicas, podem reabsorver o osso adjacente, promovem a mineralização e inibem a formação óssea mediante a secreção de esclerostina, que afeta a via de sinalização WnT dos osteoblastos (Gallagher, 1980). Após a fase da formação, começa a fase de repouso até à próxima remodelação óssea.

Os processos de formação e reabsorção óssea são acoplados e dependentes, e o domínio de um sobre o outro resulta em ganho ou perda de massa óssea. Os marcadores de remodelação podem ser subdivididos em marcadores de formação e de reabsorção óssea, produzidos pelos osteoblastos e osteoclastos, respetivamente. (Saraiva & Lazaretti-Castro, 2002). Os marcadores de formação óssea são ou subprodutos de osteoblastos ativos, expressos durante as várias fases do seu desenvolvimento, ou enzimas osteoblásticas.

Os marcadores de formação óssea mais amplamente usados são medidos no soro ou plasma, e incluem, a fosfatase alcalina específica do osso (BSAP), a osteocalcina e o propéptido amino ou carboxiterminal do pró colagénio tipo I (P1NP, P1CP). (Wheater *et al.*, 2013).

A maior parte dos marcadores de reabsorção óssea são produtos de degradação do colagénio ósseo, sendo a exceção a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP5b). Incluem como exemplos, o carboxiterminal e amino-terminal do colagénio tipo I (CTX e NTX), sendo o CTX sérico o mais usado. (Wheater *et al.*, 2013)

Em condições normais, no adulto, a formação óssea é equivalente á reabsorção. Mas na menopausa devido à falta dos efeitos dos estrogénios, aumenta a quantidade de cavidades de reabsorção que não são totalmente preenchidas por osso novo, o que determina uma nítida perda de osso. Este desequilíbrio é maior nos primeiros cinco anos após a menopausa. Um possível mecanismo de ação dos estrogénios nestes processos será a estimulação da produção de OPG que bloqueia as ações do RANKL. (Gallagher, 1980)

### **1.5. A Osteoporose**

Como processo patológico, a osteoporose provoca uma diminuição da densidade óssea, fator fundamental que contribui para um maior risco de fratura. Como definição recomendada de acordo com a conferência de consenso de 1991, “Osteoporose é uma doença caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, conduzindo a fragilidade do osso e um conseqüente aumento do risco de fratura”.

E segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS): A osteoporose é um transtorno no qual se produz uma redução da massa óssea sem mudanças perceptíveis na relação entre os elementos mineralizados e os não mineralizados. (OMS, 1994).

A osteoporose é tradicionalmente classificada como primária ou secundária. O termo osteoporose primária aplica-se à perda óssea associada ao processo de envelhecimento e, nas mulheres, às perdas adicionais relacionados com a menopausa. A osteoporose pós-menopausa é caracterizada por uma diminuição progressiva da massa óssea que começa na menopausa devido à deficiência em estrogénios, o que ocasiona maior reabsorção óssea. A osteoporose secundária, por sua vez, é causada ou agravada pela exposição a outras doenças ou terapêuticas (Cunha, 2005; Carvalho, 2012). Em ambas as situações, independentemente da causa principal da osteoporose, outros fatores podem agravar a perda óssea, tais como: deficiência de vitamina D, hiperparatiroidismo secundário e também a hipercalcúria (Carvalho, 2012).

Para fins de diagnóstico a Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) definiu osteoporose com base na densidade mineral óssea (DMO), avaliada por absorção de raio x de

dupla energia (DXA), comumente expressa pelo T-score. Assim, um T-score maior ou igual a -2,5 desvios padrão abaixo do pico médio de massa óssea, define a osteoporose (Lewiecki, 2004; OMS, 1994). A densidade mineral óssea (DMO) inicia o seu declínio por volta dos 30 anos de idade, altura em que se atinge o pico médio de massa óssea do adulto (**Tabela 1.01**).

**Tabela 1.01** - Classificação da densidade mineral óssea (OMS).

<b>Classificação</b>	<b>T - Scores</b>
<b>Normal</b>	T $\geq$ -1.0
<b>Osteopenia</b>	Entre -1 e - 2,5
<b>Osteoporose</b>	T $\leq$ -2,5
<b>Osteoporose severa</b>	T $\leq$ -2,5 + fratura de fragilidade

A classificação da OMS baseia-se em dados epidemiológicos em mulheres caucasianas pós-menopáusicas com DMO medidos na coluna, na anca, e no punho. A prevalência de osteoporose neste grupo é de cerca de 30% (Lewiecki, 2004).

A osteoporose é um problema global de saúde, caracterizado por redução na DMO com o aumento da porosidade e da susceptibilidade a fraturas (Wongdee & Charoenphandhu, 2011). O desenvolvimento da osteoporose é estimulado pelo baixo nível de estrogénio e por outros fatores (Lewiecki, 2004). Ela pode ser causada pela aceleração da reabsorção óssea e/ ou desaceleração da formação óssea. Clinicamente, a osteoporose geralmente resulta de uma combinação de deficiência de estrogénio pós-menopausa e de perda óssea relacionada com a idade. A perda óssea irreversível pode resultar de um desequilíbrio entre as atividades de osteoclastos e osteoblastos, isto é, a reabsorção óssea aumentada e/ ou a formação óssea suprimida, resultando num desacoplamento que pode prolongar a duração do ciclo de remodelação óssea.

Independentemente da etiologia, a osteoporose é iniciada pelo desacoplamento da formação e reabsorção óssea (Wongdee & Charoenphandhu, 2011). A nível molecular, a reabsorção óssea aumentada e a osteoporose geralmente resultam, em parte, do excesso de produção de RANKL e de outras citocinas/mediadores que regulam a diferenciação e a função dos osteoclastos. Estes incluem a ciclooxygenase-2 (Cox-2), a prostaglandina (PG) E2, o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , as interleucinas (IL)-1, IL-6 ou IL-11, os quais conduzem todos ao recrutamento e diferenciação dos pré-osteoclastos. Assim, quanto maior for o aumento dos níveis destas citocinas osteoclastogénicas, maior será a progressão da perda óssea (Wongdee & Charoenphandhu, 2011).

### 1.5.1. Fatores de risco de osteoporose

Vários estudos foram realizados no sentido de estabelecer os principais fatores de risco para a osteoporose, entre eles destacam-se: a idade, o sexo, o uso de glicocorticóides, a osteoporose secundária, a história familiar, a fratura prévia por fragilidade, o baixo índice de massa corporal, o tabagismo, a inatividade física, o excesso de consumo de álcool, (Lewiecki, 2004; WHO, 2004; Wongdee & Charoenphandhu, 2011). Para além disso, outras condições patológicas, particularmente o hiperparatiroidismo e a diabetes mellitus tipo 1 (DM1), são também fatores de risco para a perda óssea osteoporótica (Wongdee & Charoenphandhu, 2011).

#### 1.5.1.1. Diabetes mellitus e microestrutura óssea (Metabolismo ósseo)

A diabetes mellitus é uma doença crónica há muito associada com inúmeras complicações, a longo prazo, que afetam principalmente os seguintes órgãos: olhos, rins, coração e sistema nervoso. Apenas recentemente dados indicam que a diabetes mellitus está relacionada com complicações na estrutura esquelética. Na verdade, com a diabetes mellitus parece dar-se uma alteração na qualidade óssea, ou seja, nas características materiais e estruturais do tecido ósseo; alterações estas que poderão estar diretamente relacionadas com a hiperglicemia crónica.

Relativamente ao metabolismo ósseo em diabéticos, verificaram-se resumidamente as seguintes evidências:

- a) Em modelos pré-clínicos (Karim, Tang, Sroga, & Vashishth, 2013).
  - Diminuição na remodelação e na formação óssea em ratos com DM1 induzida por streptozotocina (STZ);
  - Produtos finais de glicação avançada (AGES) acumulados no colagénio originando derivados da glucose nas ligações cruzadas entre as fibras;
  - Ossos com mais microfissuras e diminuição da resistência a fraturas;
  - Os AGES suprimem a reabsorção osteoclástica e a remodelação óssea.
  
- b) Em modelos clínicos (Ardawi *et al.*, 2013; Yamamoto, Yamaguchi, Nawata, Yamau-chi, Sugimoto, 2012).
  - A diabetes mellitus tipo 2 (DM2) aumenta o risco de fratura apesar dos valores elevados de índice de massa óssea (IMO) e densidade mineral óssea (DMO) elevada ou normal;
  - Redução da remodelação óssea e redução desproporcional na formação óssea em doentes com DM2;

- Baixa osteocalcina sérica (OC), P1NP e tendência a diminuir os níveis de PTH;
- Os níveis dos marcadores de reabsorção óssea em DM2 são menos consistentes, com os dados mostrando reduzida ou nenhuma diferença;
- Estudos histomorfométricos de cristas ilíacas mostram redução da formação óssea em pessoas com DM2;
- Baixos níveis de IGF-1;
- Níveis séricos de carboxi-metil-lisina (AGE) associados ao maior risco de fratura na anca.

A diabetes mellitus (DM) tem sido associada a doenças ósseas metabólicas tais como osteoporose e a fraturas de baixo impacto, bem como a outras situações relacionadas, incluindo quedas em doentes geriátricos (Wongdee & Charoenphandhu, 2011).

No entanto, as alterações ósseas diferem acentuadamente nos dois tipos principais de diabetes (DM1 e DM2) o que possivelmente, resulta de diferentes mecanismos celulares e moleculares envolvidos na sua fisiopatologia (Wongdee & Charoenphandhu, 2011).

A DM1 também conhecida como diabetes insulino dependente resulta da ausência total de produção de insulina, que leva a hiperglicemia nos jovens. De acordo com Wongdee & Charoenphandhu (2011), além das habituais complicações neurovasculares, ambos os doentes masculinos e femininos com DM1 manifestam baixa densidade mineral óssea na anca, colo do fêmur e coluna vertebral, o que pode eventualmente levar a um aumento da incidência de fraturas ósseas. Em contraste, os dados sobre as alterações esqueléticas na DM2, ou DM não insulino dependente, parecem conflituosos, e a explicação exata ainda é desconhecida. Como no exemplo do trabalho de Yamaguchi *et al.*, (2009), citado por Wongdee & Charoenphandhu, (2011), usando DXA demonstraram que, em 187 homens com diabetes mellitus tipo 2, houve um aumento da densidade mineral óssea no colo do fêmur com baixa prevalência de fraturas vertebrais. Da mesma forma, Petil *et al.*, (2010) relatou uma maior DMO em doentes com DM2 quando comparados com voluntários não diabéticos da mesma idade. Em contraste, vários outros investigadores relataram um efeito negativo da diabetes tipo 2 sobre a DMO. Por exemplo (Yaturu, Humphrey, Landry, & Jain, 2009), encontraram DMO da anca baixas em doentes com DM2, quando comparados com indivíduos normais da mesma idade. Além disso, tem sido relatado um aumento do risco de fraturas em vários locais, incluindo a coluna vertebral e anca, nos doentes com DM2. No entanto, essas fraturas e quedas poderão resultar de insuficiências visuais (a partir de retinopatia diabética e catarata), do desequilíbrio da marcha (a partir da neuropatia periférica) e/ou do excesso de peso, os quais são características clínicas comuns na DM2. A neuropatia diabética periférica na DM2 também pode levar

à destruição local dos ossos que suportam o peso em volta das articulações (especialmente no tornozelo e no pé), conhecida como osteoartropatia de Chacot, o que pode causar dor, fraturas e deformação da articulação.

A DM1 com níveis baixos ou ausentes de Insulina e de IGF-1 em circulação, ocorre geralmente em crianças antes de atingirem o pico de massa óssea, enquanto a DM2 é mais comum em adultos que já atingiram o pico de massa óssea. Assim, a DM1 e a DM2 induzem complicações ósseas de diferentes magnitudes. Especificamente, em ambos os sexos, a DMO do fémur proximal parece ser significativamente menor no DM1 do que no DM2. Esta diferença pode ser devida ao facto dos doentes com DM1 não terem insulina, que é um fator osteogénico capaz de estimular a proliferação dos osteoblastos. Alternativamente, o tempo de progressão da doença é muito diferente na DM1 e DM2 o que pode contribuir para os seus diferentes efeitos no osso. De acordo com Wongdee & Charoenphandhu, (2011) um recente inquérito de base populacional com 1964 doentes diabéticos, em Rochester, Minnesota, revelou que a incidência de fraturas da anca uma das mais comuns fraturas osteoporóticas, aumentou apenas ao longo de 10 anos, e não se correlacionou com a obesidade ou tratamentos prolongados da DM2. No entanto, outros fatores, incluindo a idade avançada, fratura anterior e utilização a longo prazo de corticoides, podem também predispor doentes com DM2 para osteoporose e fratura de baixo impacto, enquanto a atividade física, o exercício e o índice de massa corporal elevado são protetores.

Por outro lado, de acordo com os vários estudos referenciados por Moreira & Dempster (2015), verificou-se que doentes com DM1 e DM2 apresentavam um aumento da fragilidade óssea, que parece ser independente da DMO, visto que nos doentes com DM2 em geral, a densidade mineral óssea era normal, enquanto nos doentes com DM1 a DMO era baixa, o que pode contribuir para o aumento do risco de fraturas. A este respeito, o estudo analisou a resistência material óssea utilizando um teste de microidentificação in vivo, e demonstrou que as mulheres pós-menopausa com DM2 apresentavam menor resistência óssea, e, portanto, propriedades materiais ósseas comprometidas, que foram correlacionadas negativamente com a hemoglobina glicada (Hb A1c). Estes resultados sugerem que o aumento do risco de fratura em diabéticos possa estar relacionado com uma pobre qualidade óssea, levantando questões quanto à ultraestrutura óssea, às propriedades mecânicas do osso e à remodelação óssea nestes doentes.

Num outro estudo Armas, Akhter, Drincic, & Recker, (2012), em que se realizaram medições histomorfométricas e por micro-CT em 18 doentes com DM1 com uma duração da doença de 15 anos, cinco dos indivíduos tinha um histórico de fraturas de fragilidade. Este grupo tinha um controlo razoável da glicemia, com a metade dos indivíduos a apresentarem

níveis de HbA1c inferiores a 7%. As biópsias ósseas foram comparadas com os dos controlos de mesma idade. No geral, não houve diferenças significativas entre doentes com DM1 e os controlos nos parâmetros estruturais medidos pelas duas técnicas. No entanto, os indivíduos com fraturas, tinham tendências estruturais e dinâmicas diferentes dos indivíduos não fraturados em ambos os métodos de análise, as suas trabéculas eram mais em forma de haste (rod-like) do que em forma de placa (plate-like), o que presumivelmente contribuiria para a sua maior fragilidade óssea. Além disso, os doentes com fraturas demonstraram uma tendência para uma diminuição dos parâmetros de remodelação óssea do que aqueles sem fraturas, mas a única diferença estatisticamente significativa foi um menor tempo para ocorrer a mineralização óssea nos doentes com DM1.

No entanto, um estudo histomorfométrico em DM2 (Leite Duarte, & da Silva, 1996), demonstrou uma diminuição significativa nos parâmetros estruturais cortical e esponjoso (Por exemplo, volume ósseo e espessura cortical) em 26 doentes diabéticos (50-89 anos de idade), quando comparados com os controlos. Estas deficiências estruturais foram acompanhadas por uma diminuição na formação óssea, como indicado pela superfície inferior dos osteoblastos. Um outro estudo (Krakauer, McKenna, Buderer, Rao, Whitehouse, & Parfitt, 1995) com 8 doentes com idade entre 37-67 anos, seis dos quais tinham DM2 e dois DM1, demonstrou que os parâmetros de remodelação óssea (por exemplo, a superfície de mineralização, taxa de aposição mineral e taxa de formação óssea) foram significativamente menores nos DM2 do que nos controlos, sugerindo uma disfunção osteoblástica. Um estudo recente também referenciado por Moreira & Dempster, (2015), que mostra uma diminuição dos parâmetros de formação óssea baseados em tetraciclina em indivíduos com diabetes tipo 2 (com idades entre  $58 \pm 6$  anos), em comparação com controlos pareados por idade. Marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea também foram menores nos pacientes diabéticos do que nos controlos, confirmando os achados histomorfométricos (Manavalan, *et al.*, 2012)

Outros estudos demonstraram também uma redução dos marcadores ósseos acompanhados por baixos níveis circulantes de PTH (Yamamoto, Yamaguchi, Nawata, Yamauchi, Sugimoto, 2012; Garcia-Martin, *et al.*, 2012; Gennari, 2012). Além disso, uma combinação de PTH reduzida no soro e de osteocalcina parece confirmar o risco de fratura da coluna vertebral lombar independente da DMO (Yamamoto, Yamaguchi, Nawata, Yamauchi, Sugimoto, 2012). A Esclerostina, um inibidor da via canônica Wnt, mostrou-se elevado em DM2 e foi associado ao aumento do risco de fratura vertebral. No entanto, para além do aumento de esclerostina no soro, níveis reduzidos de IGF-1 foram também associados com fraturas vertebrais em mulheres pós-menopausa com DM2 (Ardawi, *et al.*, 2013).

Para além da alteração na microestrutura óssea e na remodelação demonstrada pela histomorfometria óssea, a matriz óssea na diabetes parece ter propriedades materiais comprometidas devido à acumulação de produtos finais de glicolização avançada (AGEs). A diminuição da resistência do osso tem sido associada com a acumulação dos AGEs, que ocorre como um resultado da hiperglicemia e do envelhecimento. A este respeito, um aumento na pentosidina urinária (produto final da glicação – AGEs) foi também relacionado com um aumento nas fraturas vertebrais em doentes com DM2 (Moreira & Dempster, 2015).

De acordo com Wongdee & Charoenphandhu (2015), as primeiras investigações clínicas a este respeito em doentes com DM2, concentravam-se principalmente nas mudanças do osso trabecular, contudo as investigações mais recentes procuraram estudar as alterações corticais e as propriedades mecânicas do osso. Ao utilizar técnicas mais avançadas, tais como a tomografia computadorizada de alta resolução em 3 dimensões e a microidentificação verificou-se que a DM2 afetou negativamente a resistência óssea, apesar da presença relativamente alta da DMO. Vários estudos transversais em doentes com DM2 usando tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HR-pQCT) e ressonância magnética (MRI) revelaram consistentemente defeitos da qualidade do osso cortical e trabecular o que aumentaria o risco de fratura. Farr, Drake, Amin, Melton III, McCready, & Khosla, 2014, avaliando a qualidade do osso com HR-pQCT em 30 doentes com DM2 na pós-menopausa, no rádio distal e na tíbia distal evidenciaram uma menor espessura cortical em doentes com DM2 do que nos controlos não diabéticos, enquanto o teste de microidentificação óssea mostrou uma menor resistência material óssea (BMS) em doentes com DM2. Além disso, a qualidade do osso do rádio avaliada por ressonância magnética (MRI), mostrou a existência de cavidades da rede trabecular sendo aproximadamente 10% maior em doentes com doentes com DM2 na pós-menopausa do que em controlos normais. O osso cortical foi igualmente afetado nos doentes com DM2.

Outro exemplo citado foi o dos resultados encontrados por Patsch, *et al.*, (2013), que investigaram alterações na microestrutura óssea em doentes com DM2 na pós-menopausa com ou sem fraturas de rádio e da tíbia usando DXA e HR-pQCT. Curiosamente, estes autores descobriram que os doentes com DM2 com fraturas tinham um maior volume do poro cortical, e uma maior porosidade cortical e superfície óssea endocortical, do que os doentes diabéticos sem fraturas (Patsch, *et al.*, 2013). Estes resultados eram consistentes com um estudo anterior efetuado num grupo de doentes com DM2 que apresentavam também um maior volume de poro cortical (aproximadamente 150%) e maior porosidade cortical (aproximadamente 125%) do que os indivíduos normais (Burghardt, *et al.*, 2010). Estes defeitos corticais foram muitas vezes acompanhados por propriedades mecânicas, alteradas tais como o aumento de

rutura e baixa resistência à flexão óssea, que levou à redução na resistência óssea global e aumento do risco de fratura.

Assim, de acordo com vários autores (Farr, Drake, Amin, Melton III, McCready, & Khosla, 2014; Patsch, *et al.*, 2013; Pritchard, 2012; Burghardt, *et al.*, 2010) citados por Wongdee & Charoenphandhu (2015), a DM2 compromete a microestrutura óssea por induzir de forma aberrante a função das células ósseas (insuficiência celular) e uma estrutura da matriz anormal (imperfeição da matriz). A respeito do efeito celular, a DM2 parece estar associada ao aumento da apoptose dos osteoblastos, à diminuição da diferenciação osteoblástica, e a uma maior reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, que poderão resultar, em parte, da hiperglicemia e da resistência à insulina. A acumulação prolongada de AGEs que coexistem com uma diminuição na atividade da lisil-oxidase no osso pode ser causa de um alinhamento do colagénio e estrutura anormais, levando a uma maior fragilidade óssea. Contudo, são vários os fatores que podem contribuir para a confusão dos resultados encontrados nos doentes com DM2, em particular o ganho de peso, a obesidade e a dislipidemia, que podem mascarar os efeitos prejudiciais da DM2 e vir a atrasar o diagnóstico da osteoporose diabética, pois o osso pode já estar danificado apesar da DMO se encontrar relativamente elevada.

### **1.5.2. Prevenção e tratamento da osteoporose**

Muitas orientações têm sido publicadas sobre a gestão da osteoporose, em que as decisões terapêuticas se baseiam, principalmente, nos resultados da DMO avaliada por DXA, em combinação com a avaliação clínica dos fatores de risco que o doente apresenta (Bandeira, Gharib, Golbert, Griz, & Faria, 2014). Sendo que o principal objetivo da terapêutica, na osteoporose, é a prevenção primária ou secundária de fraturas.

Na última década, tem sido proposta a utilização de um algoritmo (FRAX™) que aglutina os principais fatores de risco tais como a idade, o género, o índice de massa corporal (IMC), a fratura prévia, a história familiar de fratura de fémur, a corticoterapia prolongada, o tabagismo, a ingestão de mais de três unidades de álcool por dia, a osteoporose secundária e a artrite reumatoide, aos valores da densidade mineral óssea do colo do fémur, para identificar os indivíduos com indicação mais objetiva de tratamento (WHO, 2004). Desta forma, calcula-se, facilmente, o risco absoluto e individual de fratura em dez anos (anca e outras fraturas maiores) sendo que esta ferramenta pode ser usada para a tomada de decisão naqueles indivíduos que não preenchem os critérios vigentes de indicação de terapêutica.

O desenvolvimento dos modelos para avaliação do risco de fratura foi baseado em estudos populacionais prospetivos, meta-análises e revisões sistemáticas, bem como em dados do centro de doenças osteometabólicas da Universidade de Sheffield, Inglaterra, em colaboração com a OMS.

De acordo com os vários estudos efetuados, os doentes com osteoporose devem ser orientados para a correção dos hábitos de vida deletérios, como o tabagismo e o consumo abusivo de bebidas alcoólicas e café, assim como para o aumento da atividade física, a exposição solar e a ingestão de alimentos ricos em cálcio e vitamina D (Pinheiro & Domiciano, 2010; Jordan, Barry, & Murphy, 2006). Sendo que, de acordo com Pinheiro & Domiciano, (2010) o tratamento farmacológico estará apenas indicado para doentes com um maior risco de fraturas.

Embora controversos, os exercícios físicos são de fundamental importância para a prevenção e tratamento da perda óssea. De acordo com a National Osteoporosis Foundation (NOF, 2014), mulheres com osteoporose devem realizar exercícios físicos durante pelo menos 30 minutos, três vezes por semana. Uma meta-análise de 43 ensaios clínicos aleatórios com 4.320 mulheres pós-menopausa mostrou um efeito positivo significativo do exercício sobre a DMO da coluna lombar e do trocanter (Martyn-St J & Carrol, 2008). O tipo mais eficaz de exercício para a DMO do colo do fêmur foi o treino de resistência usando a força progressiva. Um programa individual combinado de mais do que um tipo de exercício foi o mais eficiente para a DMO da coluna lombar.

#### **1.5.2.1. Suplementação com cálcio e vitamina D**

Um aspeto particularmente importante, na prevenção da osteoporose é a ingestão adequada de cálcio e de vitamina D, sendo que a sua suplementação deve ter por base a quantidade destes nutrientes presentes diariamente na alimentação.

O carbonato de cálcio (40% de biodisponibilidade) é a forma de cálcio mais usada e com mais evidências no que respeita à preservação da saúde óssea (Martindale, 2009). Pode, contudo ocasionar como efeitos secundários, desconforto digestivo, especialmente obstipação intestinal (10% a 20% dos casos) e litíase renal. O citrato de cálcio (21% de biodisponibilidade) pode ser usado em doentes com intolerância ao carbonato e em indivíduos que realizam ressecções gástricas ou com antecedentes de litíase renal e gastrite atrófica. Em mulheres na pós-menopausa sem terapia de reposição hormonal (TRH) recomendam-se doses diárias de cálcio de 1200 a 1500 mg. Nas mulheres sob terapêutica de reposição hormonal, mulheres na pré-menopausa e homens, usam-se 1000 a 1200 mg/dia. A quantidade mínima e ideal para o consumo diário de cálcio é baseada no género, idade e momentos de maior necessidade ao longo da vida, como adolescência, lactação e climatério. Homens idosos e mulheres com longo tempo de menopausa necessitam de maior ingestão de cálcio dietético, (**Tabela 1.02**) devido à diminuição da absorção intestinal e à diminuição da conservação renal do cálcio.

**Tabela 1.02** - Recomendação nutricional de cálcio de acordo com a faixa etária.

Grupo/Idade	Cálcio (mg/dia)
0 - 6 meses	200
7 - 12 meses	260
1 - 3 anos	700
4 - 8 anos	1000
9 - 13 anos	1300
14 - 18 anos	1300
19 - 30 anos	1000
31 - 50 anos	1000
51 - 70 anos (homem)	1000
51 - 70 anos (mulher)	1200
>71 anos	1000
14 - 18 anos (grávidas/lactantes)	1300
19 - 50 anos (grávidas/lactantes)	1000

(Adaptado de: Institute of Medicine – of the National Academies – 2010)

As doses diárias recomendadas de ingestão de cálcio variam também consoante os países. Nos EU é recomendada a ingestão de 1200 mg/dia de cálcio (o que corresponde a 3000 mg/dia de carbonato de cálcio) a mulheres a partir dos 51 anos e homens septuagenários enquanto no Reino Unido e países nórdicos europeus as doses recomendadas são da ordem dos 800 mg (EFSA, 2015). Em Portugal é recomendado o consumo de pelo menos 900 mg de cálcio por dia (Tavares, *et al.*, 2007). O limite máximo de ingestão diária de cálcio para esta faixa etária é de 2000 mg cálcio. Uma dose diária de 800 mg obtém-se facilmente numa dieta equilibrada, já uma dose de 1200 mg é mais difícil ser atingida requerendo para tal a adição de suplemento de cálcio. No entanto, há que ter em conta que há vários fatores que condicionam a biodisponibilidade do cálcio; a absorção intestinal de cálcio diminui durante a terapêutica com corticosteróides e com antagonistas da bomba de prótons, com a idade e na ausência de estrogénios (Van Staa, Leufkens, Abenhaim, Zhang & Cooper, 2000).

Como o efeito dos sais de cálcio na osteoporose depende em grande parte da sua biodisponibilidade (Smith, Fallon, Lee, & Finkelstein, 2004), a solução para este problema tem passado pelo aumento das doses e pela associação à vitamina D, sendo prática terapêutica a suplementação com doses de 1000 a 1200 mg de cálcio por dia.

Vários ensaios clínicos apontam para os benefícios ósseos da suplementação com cálcio, associada ou não à vitamina D (Smith, Fallon, Lee, & Finkelstein, 2004; Schoenmakers *et al.*, 2013). Contudo, várias revisões sistemáticas e meta-análises levadas a cabo desde

2010 (Schoenmakers *et al.*, 2013; Bolland *et al.*, 2013; Bolland *et al.*, 2015) levantam variadas preocupações de segurança incluindo risco de acidentes trombóticos (coronários e cerebrovasculares) para doses de cálcio superiores a 805 mg/dia sugerindo uma relação risco/benefício não favorável à suplementação de cálcio. Um estudo elaborado no sul de Espanha (Sanfélix-Gimeno *et al.*, 2013) demonstra que a prescrição de suplementos de cálcio não tem habitualmente em conta a quantidade de cálcio ingerida na dieta por cada indivíduo, realçando que a suplementação com cálcio é inapropriada na maioria dos casos pecando, principalmente, por excesso. A formulação dos suplementos de cálcio bem como a dose a utilizar para obter benefícios ao nível do esqueleto sem causar efeitos adversos é um assunto atual e importante. Aproximadamente 30% do cálcio ingerido através da dieta num adulto saudável é absorvido pelo intestino delgado. A absorção do cálcio faz-se por transporte ativo, que é controlada pela 1,25-dihidroxitamina D, e por difusão passiva, quando há elevada ingestão de cálcio. A solubilidade dos vários tipos de sais de cálcio é importante para este processo de absorção, uma vez que o cálcio só pode ser absorvido na forma dissolvida. No entanto, a solubilidade do cálcio é primariamente dependente do pH. Sendo assim, o pH do trato digestivo é um fator importante neste processo de absorção. Existem variações de pH ao longo do trato digestivo: muito baixo no estômago (pH 1-2), cerca de 6 no duodeno, aumentando gradualmente no intestino delgado desde 6 ou 6,5 no jejuno proximal até 7,4 e 7,5 no íleo. O cálcio não é absorvido no estômago, mas sim no intestino delgado e grosso (Van Der Velde, Brouwers, Geusens, Lems, & Van Den Bergh, 2014). No entanto, uma quantidade considerável do cálcio ingerido não é absorvida pelos intestinos e simplesmente é eliminada do corpo através das fezes. Para além disto, o sistema de transporte ativo que realiza a absorção do cálcio está sob controlo hormonal sendo este controlo o principal mecanismo regulador do balanço de cálcio corporal total (Van Der Velde, Brouwers, Geusens, Lems, & Van Den Bergh, 2014). A excreção renal de cálcio é regulada por dois mecanismos principais: reabsorção tubular de cálcio e filtração de cálcio (Peacock, 2010). Cerca de 60% do cálcio plasmático é filtrado no glomérulo renal (o restante está ligado às proteínas plasmáticas), e a maior parte deste cálcio filtrado é reabsorvida e não há secreção tubular de cálcio. Portanto, a excreção urinária de cálcio é a diferença entre a quantidade filtrada e a quantidade reabsorvida. Assim, o controlo da excreção de cálcio é exercido principalmente sobre a reabsorção, sofrendo esta uma diminuição quando a concentração plasmática de cálcio aumenta, e um aumento quando o cálcio plasmático diminui.

As duas principais hormonas que regulam a concentração plasmática de cálcio são a hormona paratiroideia (PTH - produzida pelas glândulas paratiróides) e a 1,25-dihidroxitamina D (também denominada calcitriol, sendo esta a forma ativa da vitamina D). Uma terceira

hormona, a calcitonina (secretada pelas células parafoliculares que se encontram na glândula tireóide) também desempenha um papel importante, embora limitado.

Os ossos, rins e vias gastrointestinais estão sujeitos direta ou indiretamente ao controle pela PTH. A produção desta hormona é controlada pela concentração extracelular de cálcio que atua diretamente sobre as células secretoras através de um receptor de cálcio na membrana plasmática. A diminuição da concentração plasmática de cálcio estimula a secreção da PTH, e um aumento na sua concentração acarreta justamente o inverso. A PTH exerce assim várias ações que aumentam a concentração extracelular de cálcio, com isso compensando a diminuição na sua concentração (Vander, Sherman, & Luciano, 2006).

A regular e adequada exposição solar, de pelo menos 15 minutos ao dia, é necessária para a síntese cutânea da vitamina D (Pinheiro & Domiciano, 2010; NOF, 2015) que é fundamental para a absorção de cálcio no intestino. Atualmente, a National Osteoporosis Foundation (NOF, 2015), recomenda a suplementação diária de 800-1000 UI de vitamina D em indivíduos com osteoporose, especialmente idosos e naqueles sujeitos a corticoterapia prolongada. A suplementação é usada para a prevenção de fraturas. As principais reações adversas são a hipercalcemia e a hipercalcúria.

A vitamina D desempenha um papel vital na mineralização óssea e no metabolismo do cálcio e do fósforo. (Kierszenbaum, 2012). Ela é considerada uma pró-hormona esteróide com duas formas moleculares: vitamina D3 (coleciferol) e vitamina D2 (ergocalciferol). A principal fonte de vitamina D é endógena, sendo sua produção estimulada pela exposição solar, podendo em menores quantidades ser obtidas a partir de alguns alimentos, como peixes oleosos, por exemplo o salmão e óleos de peixe, incluindo o óleo de fígado de bacalhau. (Holick, 2006). A vitamina D2 é formada na pele mediante a conversão do 7-de-hidrocolesterol em coleciferol após a exposição à luz ultravioleta. O calciferol passa à circulação sanguínea e é transportado ao fígado, onde é convertido em 25-hidroxicolecalciferol pelo acréscimo de um grupo hidroxilo à cadeia lateral. (Kierszenbaum, 2012). Esta, por sua vez, é convertida nos rins pela ação da  $1\alpha$ -hidroxilase na sua forma biologicamente ativa, que é o  $1,25$ -dihidroxicolecalciferol (calcitriol). O calcitriol aumenta a absorção intestinal de cálcio, e estimula a atividade osteoclástica (Chen, 2007). A principal ação do calcitriol é estimular o transporte intestinal de cálcio. No osso, o calcitriol regula diversas funções osteoblásticas, mas também estimula os osteoclastos a reabsorverem osso, libertando cálcio para manter a sua concentração extracelular, o que resulta provavelmente da ativação da via de sinalização RANKL/RANK (McPhee & Ganong, 2007). O nível elevado da PTH estimula a liberação do cálcio do osso e a retenção de cálcio pelo rim. Além disso, o aumento na PTH, a queda no cálcio e simultaneamente a queda no nível sérico de fosfato (tanto em razão da ingestão diminuída quanto da

fosfatúria induzida pela PTH) ativam a síntese renal de calcitriol. O calcitriol aumenta a fração de cálcio absorvida pelo intestino, elevando em seguida a sua libertação pelo osso e restabelecendo o nível sérico normal (McPhee & Ganong, 2007).

### 1.5.2.2. Tratamento farmacológico

A terapia de reposição hormonal (HRT) foi um dos tratamentos mais utilizado na prevenção da osteoporose, na mulher, pós-menopausa, dado que melhora a DMO na anca e na coluna vertebral em 5% e 2,5%, respetivamente (Chau & Edelman, 2002). No entanto, a indicação da sua utilização na prevenção da osteoporose, mudou recentemente devido á falta de dados relativos à redução da fratura da anca avaliados a partir da análise dos resultados de grandes ensaios clínicos randomizados. A Food and Drug Administration (FDA) retirou a aprovação dos estrógenos para o tratamento da osteoporose, mas manteve a sua indicação na prevenção da mesma. A terapia de reposição hormonal indicada em mulheres nos primeiros anos de pós-menopausa e com sintomas climatéricos é capaz de preservar a densidade óssea e reduzir a incidência de fraturas não vertebrais e vertebrais. As principais contraindicações são doentes com história prévia de cancro de mama ou do endométrio, antecedentes de insuficiência hepática ou renal, diabetes mellitus descompensada e fenómenos tromboembólicos.

A **HRT** não tem demonstrado ter efeitos adversos definitivos sobre o metabolismo da glucose mas a sua utilização em mulheres com DM2, deve ser limitada a formulações de baixa dosagem, tal como é recomendado pela recente declaração do consenso norte-americano da Menopause Society (NAMS, 2011). Para os homens, a reposição androgénica, quando usada, demonstra uma melhoria na DMO. A reposição androgénica está contra indicada em homens com história de cancro da próstata. Pouco se sabe sobre os efeitos metabólicos da testosterona na diabetes.

Moduladores seletivos do recetor de estrógeno (SERMs) ligam-se com elevada afinidade ao recetor de estrógeno, com propriedades agonistas e antagonistas, que variam, dependendo do órgão alvo (Bandeira, Gharib, Golbert, Griz, & Faria, 2014).

O **Raloxifeno (RLX)** é um modulador seletivo do recetor de estrógeno (SERMs), que tem indicações para a prevenção e tratamento da osteoporose (Jordan, Barry, & Murphy, 2006). Preserva a densidade óssea da coluna lombar e reduz a taxa de fraturas vertebrais em cerca de 40%. No entanto, não previne fraturas não vertebrais, incluindo a da anca. É capaz de melhorar o perfil lipídico (redução do LDL- colesterol) e reduz a incidência de cancro de mama em 90% (Pinheiro & Domiciano, 2010). Inconvenientes desta terapia são os sintomas de afrontamentos da menopausa, dor mamária e sangramento vaginal e também um aumento

na incidência de eventos tromboembólicos (Jordan, Barry, & Murphy, 2006; Pinheiro & Domiciano, 2010). Estudos recentes demonstraram que a glicemia em jejum, a hemoglobina A1c, e os níveis de insulina em doentes diabéticos tipo 2 não são afetados pela terapêutica com RLX (Andersson *et al.*, 2002; Matsumura *et al.* 2010).

**Bisfosfonatos** - são análogos do pirofosfato e ligam-se a cristais de hidroxiapatite na matriz óssea. Ocasionalmente inibem a reabsorção óssea pelo aumento da apoptose dos osteoclastos (Pinheiro & Domiciano, 2010).

As recomendações atuais de tratamento são o uso de bisfosfonatos (BPNs), como resultado de inúmeros estudos clínicos que demonstram reduções significativas de 50 a 70% nas fraturas da coluna vertebral e de fraturas não vertebrais de 30% a 50%, incluindo a da anca. Os BPNs administrados por via oral, como o alendronato e o risedronato têm má absorção e devem por isso ser tomados em jejum, com água, e fora das refeições (Pinheiro & Domiciano, 2010).

**PTH** - é um potente agente anabolizante para o tratamento da osteoporose. A PTH é o principal regulador da homeostase do cálcio. Apesar do hiperparatireoidismo primário e secundário poder causar osteoporose, a exposição intermitente à PTH pode aumentar a massa óssea (Neer *et al.*, 2001).

Indicado para casos graves de osteoporose, com pelo menos uma fratura por baixo impacto, ou em doentes com falência terapêutica aos bisfosfonatos ou outros fármacos anticatabólicos. As principais contra indicações são a presença de metástases ósseas e radioterapia do esqueleto, doença de Paget, elevação da fosfatase alcalina (Pinheiro & Domiciano, 2010).

**Ranelato de estrôncio** - agente com ação mista, capaz de estimular a formação óssea e inibir a reabsorção óssea, embora o mecanismo de ação exato não seja bem esclarecido, é administrado por via oral. Reduziu a taxa de fraturas vertebrais e não vertebrais em torno de 40%, incluindo as da anca, particularmente em indivíduos de maior risco, com T-score femoral abaixo de 3 desvio padrão (Pinheiro & Domiciano, 2010).

### **1.5.2.3. Perspetivas para novos tratamentos da osteoporose – novos alvos terapêuticos e novos mecanismos de ação**

**Denosumabe** – é um anticorpo monoclonal humano dirigido contra o ligando do receptor ativador do NFκB (RANK-L), bloqueando a principal via envolvida na formação e diferenciação dos osteoblastos (RANK/RANK-L/Osteoprotegerina). RANK-L é uma proteína da superfamília TNF que existe nas formas transmembrana e solúvel e é expressa principalmente nas células de linhagem osteoblástica, enquanto o RANK é expresso pelos osteoclastos e

seus precursores (Pinheiro & Domiciano, 2010). A interação dessas moléculas é antagonizada pela osteoprotegerina, que é um recetor solúvel do RANK-L, produzido pelos osteoblastos. Diversas moléculas (como paratormona 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) são capazes de modular a expressão de RANK e/ou osteoprotegerina, bem como afetar o processo de sinalização induzida pela ligação RANK-RANK-L. O Denosumabe administrado por via subcutânea, a cada seis meses, mostrou redução da taxa de fraturas vertebrais em 68% e fraturas de quadril em 40%, além de promover aumento da densidade mineral óssea na coluna e no fêmur. Observou-se, também redução sustentada dos marcadores do metabolismo ósseo, inclusive com maior supressão da remodelação óssea quando comparada aos bisfosfonatos. Este fármaco é pois uma alternativa válida tanto no tratamento de primeira linha para osteoporose como após o uso de bisfosfonatos. (Saag & Geusens, 2009; Pinheiro & Domiciano, 2010).

**Catepsina K** – é uma cisteína-protease altamente expressa nos osteoclastos, fundamental para a degradação de proteínas da matriz óssea, como o próprio colagénio, a osteopontina e a osteonectina. A Inibição da catepsina K representa uma possibilidade para o tratamento da osteoporose e de outras patologias caracterizadas pelo aumento da reabsorção óssea. (Saag & Geusens, 2009; Pinheiro & Domiciano, 2010)

**Calciolíticos** – agentes que atuam promovendo a libertação da PTH pelas glândulas paratiroides. Está estabelecido que repetidas doses intermitentes da PTH atuam promovendo a formação óssea (Pinheiro & Domiciano, 2010).

**Antiesclerostina** – a via de sinalização Wnt desempenha um papel particularmente importante na formação óssea. As proteínas Wnt ligam - se a um complexo formado por um recetor “frizzled” acoplado a proteína G e pelo co-recetor LRP5/6. A ativação da via Wnt induz uma cascata de eventos intracelulares que estabilizam a b-catenina que, dessa forma, é transferida para o núcleo, onde se liga a fatores de transcrição e modula a expressão de genes que promovem a diferenciação, ativação e recrutamento dos osteoblastos. Antagonistas naturais dessa via incluem a molécula Dickkopf (DKK1), as proteínas “frizzled-like” (sFRP1/2) e a esclerostina (SOST). (Saag & Geusens, 2009; Pinheiro & Domiciano, 2010).

## **1.6. Benefícios do consumo de fibras alimentares na diabetes e na osteoporose**

A American Association of Cereal Chemists (AACC) define fibra alimentar como "as partes edíveis de plantas ou carboidratos análogos que resistem à digestão e absorção no intestino delgado humano, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. A fibra alimentar Inclui polissacáridos, oligossacáridos, lignina e substâncias relacionadas.

De acordo com a sua solubilidade em água, as fibras alimentares classificam-se em: fibras solúveis (pectinas, gomas, mucilagens e polissacáridos de reserva) e fibras insolúveis (celulose, hemicelulose e lignina).

### **1.6.1. Fibra solúvel e metabolismo da glucose**

A fibra alimentar solúvel está associada a níveis de glucose pós-prandial mais baixos e ao aumento da sensibilidade à insulina em doentes diabéticos e em indivíduos saudáveis, efeitos que são geralmente atribuídos às suas propriedades espessantes e/ou de gelificação (Papathanasopoulos, 2010; Sierra, 2002; Sierra, 2001; Hanai, 1997).

A fibra alimentar solúvel exerce efeitos fisiológicos sobre o estômago e o intestino delgado que modulam respostas à glicemia pós-prandial. Estas incluem:

1. Atraso no esvaziamento gástrico; (Papathanasopoulos & Camilleri, 2010; Jenkins, *et al.*, 1989).
2. Modificação da atividade gastrointestinal mioelétrica e atraso do trânsito no intestino delgado; (Papathanasopoulos & Camilleri, 2010; Jenkins *et al.*, 1978; Cherbut, Albina, & Champ, 1990; Schonfeld, Evans, & Wingate, 1997).
3. Difusão reduzida da glucose através da camada impassível de água (Papathanasopoulos & Camilleri, 2010; Johnson & Gee, 1981)
4. Reduzida acessibilidade da  $\alpha$ -amilase aos seus substratos, devido ao aumento da viscosidade do conteúdo intestinal. (Papathanasopoulos & Camilleri, 2010; Poksay & Schneeman *et al.*, 1983).

O fator determinante para o efeito a nível da glicemia é o aumento da viscosidade e as propriedades de formação do gel de fibra solúvel. O efeito hipoglicemiante pode ser invertido por meio de hidrólise da fibra solúvel ou após aquecimento ultra-elevado e homogeneização (Papathanasopoulos & Camilleri, 2010; Jenkins *et al.*, 1978; Torsdottir, Alpsten, & Andersson, 1989). Além disso, a absorção intestinal de carboidratos pode ser prolongada por este tipo de fibra, em parte pela alteração dos níveis de incretinas (por exemplo, aumentando os níveis de péptido semelhante a glucagon-1, GLP-1). (Papathanasopoulos & Camilleri, 2010; Leclere, Champ, Boillt., 1994). Em estudos experimentais utilizando a técnica *clamp*, verificou-se que esta fibra também influencia os mecanismos de captação periférica de glucose, incluindo o aumento da expressão do transportador de glucose tipo-4 dependente da insulina no músculo-esquelético, aumentando assim a captação de glucose por este tecido, aumentando a sensibi-

lidade à insulina e normalizando conseqüentemente os níveis de glicose no sangue. (Papathanasopoulos & Camilleri, 2010; Cameron-Smith, Habito, & Barnett, 1997; Song, Sawamura, & Ikeda, 2000).

### **1.6.2. Fibra solúvel e metabolismo dos lípidos**

Estudos em animais têm elucidado que os principais efeitos mecanísticos da fibra solúvel no metabolismo lipídico se relacionam com a perda de ácidos biliares nas fezes. Como resultado há uma redução das concentrações de colesterol hepático, uma modificação da atividade das enzimas que regulam a homeostasia do colesterol, uma *up-regulation* dos receptores da lipoproteína de baixa densidade, bem como um aumento na *clearance* plasmática desta. (Papathanasopoulos & Camilleri, 2010; Jenkins, Kendall, & Vuksan, 2000; Horton, Ja, & Spady, 1994; Fernandez, 1995; Roy, Veja-Lopez, & Fernandez, 2000). O efeito hipotriglicéridémico das fibras solúveis está por sua vez associado à diminuição da absorção dos lípidos provenientes da alimentação e da reduzida atividade no fígado da síntese de ácidos gordos (FAS). (Butt, Shahzadi, Sharif, & Nasir, 2007; Yamamoto, 2001).

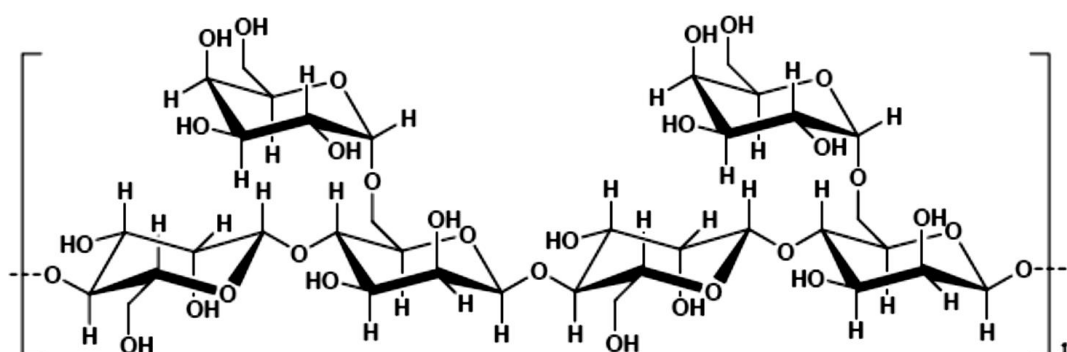
### **1.6.3. Goma guar**

#### **1.6.3.1. Origem e composição**

O feijão guar, de nome científico *Cyamopsis tetragonoloba*, é um legume cultivado durante todo o ano principalmente na Índia e no Paquistão, e em pequenas quantidades nos Estados Unidos, Austrália e África. No seu estado imaturo (vagem) é utilizado principalmente para alimentar o gado ou como adubo (Butt, Shahzadi, Sharif, & Nasir, 2007). A goma guar (E412), extraída deste feijão, foi autorizada para uso como aditivo alimentar na Diretiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia. (EFSA, 2007; PECUE, 1995) Esta goma forma hidrocolóides dispersíveis em água (mesmo a baixa temperatura), que engrossam formando um gel (Saeed, Mosa-Al-Reza, Fatemeh, & Saeideh, 2012). Esta capacidade de hidratar sem aquecimento torna a goma guar muito útil, sendo atualmente utilizada como agente espessante, emulsificante e estabilizante numa grande variedade de categorias alimentares. As especificações para a goma guar foram estabelecidas em 1996 pela Comissão Europeia na Diretiva 96/77/C que estabelece os critérios de pureza específicos dos aditivos alimentares que não sejam corantes e edulcorantes alimentares. A descrição incluída na especificação para a goma guar nesta Diretiva refere que “ A goma guar é o endosperma moído de sementes de variedades naturais de guar, *Cyamopsis tetragonolobus* Taub. Consiste essencialmente num polissacárido hidrocoloidal de elevada massa molecular constituído

por unidades de galactopirranose e de manopirranose combinadas entre si por ligações glicosídicas (constituindo o que, do ponto de vista químico, pode ser classificado de galactomano) ” (EFSA, 2007).

A goma guar, de código CAS número 9000-30-0, consiste assim, numa cadeia principal de resíduos de D-manose, unidos entre si por ligações  $\beta$ -1,4, ramificada por resíduos de D-galactose unidos entre si por ligações  $\alpha$ -1,6. Há entre 1,5 a 2 resíduos de manose por cada resíduo de galactose (**Fig. 1.06**). (EFSA, 2007).



**Figura 1.06** - Representação da estrutura química da goma guar. (EFSA, 2007).

O conteúdo em galactomano é igual ou superior a 75% e o peso molecular da goma com qualidade alimentar foi especificado entre 50 000 g/mol e 8 000 000 g/mol pela União Europeia e pela Food and Agriculture Organization/ World Health Organization/ Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (FAO/WHO/JECFA) (EFSA,2007). A composição global, em percentagem, da goma guar natural (sem tratamento) é apresentada na **tabela 1.03**.

**Tabela 1.03** - Composição global, em percentagem, da goma guar natural (sem tratamento). (EFSA, 2007).

Composição		Goma guar natural (%)
Humidade		8,5
Conteúdo em goma	Solúvel	66,5
	Insolúvel	18
Sais		0,0
Açúcares		2,0
Proteínas		5,0
Proporção Galactose/Manose		0,57

### 1.6.3.2. Benefícios do consumo de goma guar

As propriedades terapêuticas e medicinais resultantes do elevado teor de fibra solúvel desta goma contribuem para melhorar o perfil bioquímico sérico de primatas humanos e não-humanos, reduzindo o colesterol total e triglicéridos no soro, aumentando o nível de HDL, assim como o controlo dos índices glicémicos e da obesidade (Butt, Shahzadi, Sharif, & Nasir, 2007). Em alguns estudos em indivíduos saudáveis e doentes diabéticos não insulino-dependentes verificou-se que a goma guar prolonga o esvaziamento gástrico inicial, reduzindo o aumento da glicemia e as concentrações de insulina pós-prandiais (Saeed, Mosa-Al-Reza, Fatemeh, & Saeideh, 2012).

A goma guar atua assim como um impedimento físico, uma vez que aumenta a viscosidade do conteúdo gastrointestinal, atrasando a digestão e posterior absorção dos carboidratos, sendo esta teoria suportada por estudos nos quais se verificou que a goma guar diminui a resposta pós prandial à glucose quando misturada com uma variedade de refeições teste (Leclere, Champ, & Boillot, 1994; Cameron-Smith, Habito, & Barnett, 1997). Pensa-se que as reduções a longo prazo na taxa de absorção pós-prandial de carboidratos aquando da suplementação com goma guar aumentem a sensibilidade à insulina, através das ações combinadas de redução das secreções diurnas de insulina, diminuição da libertação pós-prandial da hormona contra reguladoras da insulina e redução da secreção do péptido gástrico intestinal - GIP (Cameron-Smith, Habito, & Barnett, 1997). Este duplo efeito sobre a diminuição da absorção da glucose e o aumento da sua captação periférica contribui para a redução dos níveis de glucose em circulação, que por sua vez influenciam os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c).

Vários estudos têm evidenciado que níveis elevados de HbA1c contribuem para a acumulação de AGEs na matriz óssea, o que aumenta o risco de fratura (Wongdee & Charoenphandhu, 2011; Karim & Bouxsein, 2016). Assim, um controlo glicémico adequado, no doente diabético, pode ajudar a diminuir os níveis de HbA1c e a diminuir o risco de fratura óssea nestes doentes.

A goma guar melhora também a função intestinal, tendo efeitos bifidogénicos ou seja estimula seletivamente o crescimento das bifidobactérias, bactérias benéficas do cólon (Saeed, Mosa-Al-Reza, Fatemeh, & Saeideh, 2012). Uma vez que esta exerce uma ação física sobre o intestino, estimulando os movimentos peristálticos, contribui também para evitar a obstipação, bem como reduzir a incidência de patologias como a diverticulite e o cancro do cólon (Saeed, Mosa-Al-Reza, Fatemeh, & Saeideh, 2012).

Sendo a obstipação um dos problemas da suplementação com sais de cálcio este efeito é particularmente importante existindo ainda evidências, num estudo em animais, que a goma

guar favorece a absorção de cálcio mesmo após gastrectomia (Hara, Suzuki, Kasai, Aoyama, Ohta, 1999).

### **1.7. Modelos animais na investigação da osteoporose**

Podem ser utilizados vários modelos para induzir osteopenia e osteoporose em animais de experiência, nomeadamente em rato (Lelovas, Xanthos, Thoma, Lyritis, & Dontas, 2008). A semelhança nos mecanismos fisiopatológicos observadas nos esqueletos do Homem e do rato associados á facilidade da sua utilização levaram a que este seja um modelo válido para o estudo da osteoporose.

Na investigação da osteoporose pós-menopausa, o modelo animal mais utilizado é o da ovariectomia. Após ovariectomia, a reabsorção óssea no rato fêmea, tal como acontece na mulher, excede a formação de osso provocando perda óssea, observando-se uma diminuição significativa no osso tibial proximal aos 14 dias, no colo femural aos 30 dias e no corpo vertebral lombar por volta dos 60 dias (Wronski, Cintron, & Dann, 1988; Wronski, Dann, & Horner, 1990).

No osso cortical o aumento da cavidade medular é uma medida indireta da perda de massa óssea, sendo a análise da zona interna do osso cortical um índice sensível de perda de osso pois a reabsorção óssea ocorre predominantemente nessa zona (Danielsen, Mosekilde, & Svenstrup, 1993).

### **1.8. Modelos animais na investigação da diabetes**

A indução experimental da diabetes mellitus em modelos animais é essencial para o avanço do nosso conhecimento e compreensão dos diversos aspetos da sua patogénese. Vários métodos têm sido utilizados para induzir a diabetes em animais de laboratório com um sucesso variável e muitas dificuldades. (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013; Fajardo, Karim, Calley, & Bouxsein, 2014).

Os modelos animais para o estudo da diabetes podem ser classificados em três tipos: métodos que induzem a patologia, modelos genéticos espontâneos ou manipulados e outros (Kumar *et al.*, 2012).

A principal característica da diabetes tipo 1 é a destruição das células  $\beta$  do pâncreas levando à ausência de produção de insulina, sendo que em modelos animais esta deficiência na produção de insulina é conseguida através de uma grande variedade de diferentes mecanismos desde a destruição química das células  $\beta$  até à criação de roedores que espontaneamente desenvolvem diabetes autoimune (King, 2012). A remoção cirúrgica do pâncreas é um

método eficaz, no entanto para induzir diabetes pelo menos 90-95% do pâncreas deve ser retirado (Abeeleh, 2009).

Nos modelos de diabetes induzidos quimicamente, uma elevada percentagem de células  $\beta$  endógenas são destruídas e, por conseguinte, há uma reduzida produção endógena de insulina, levando a hiperglicemia e, no caso da diabetes tipo 1, perda de peso, e aumento do peso, no caso da diabetes tipo 2. Os compostos mais usados para induzir quimicamente a diabetes são a estreptozotocina e o aloxano (sendo que o intervalo da dose que pode ser administrada é mais estreito neste último. (King, 2012; Szkudelski *et al*, 2001). Este tipo de diabetes quimicamente induzida é apropriado para testar fármacos ou terapias cujo principal mecanismo de ação é reduzir a glicemia de uma forma independente das células  $\beta$  (King, 2012).

### 1.8.1. Ação diabetogénica da Estreptozotocina

A estreptozotocina (STZ), consoante a dose e a via de administração (intravenosa ou intraperitoneal), pode induzir quer DM1 quer DM2. (Szkudelski, 2001).

A STZ, um análogo citotóxico da glucose (2-desoxi-2- (3-metil-3-nitrosoureia) -1-D-glucopiranosose), é um composto natural produzido pela bactéria do solo *Streptomyces achromogenes* que exhibe um amplo espectro de propriedades antibacterianas. Após a sua descoberta foi usada como agente quimioterapêutico alquilante no tratamento de metástases de tumores nas células dos ilhéus pancreáticos e outras neoplasias (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013).

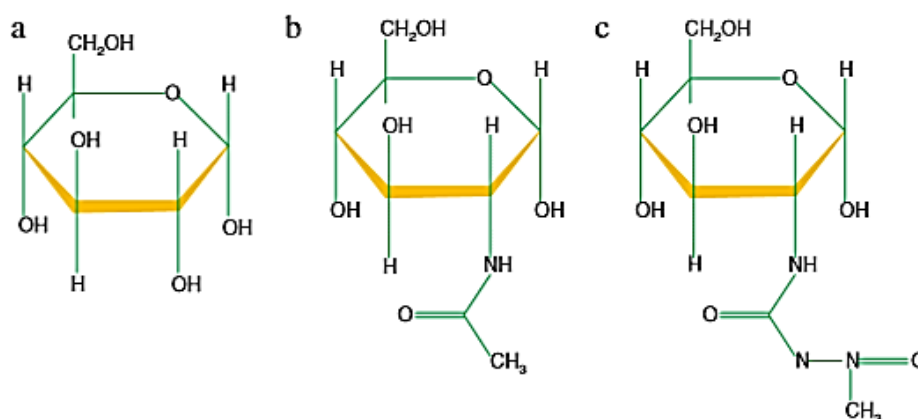
A STZ atua como um inibidor de síntese do ADN quer em células bacterianas quer em células de mamíferos (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013). Esta é citotóxica para as células  $\beta$  do pâncreas, induzindo uma rápida e irreversível necrose das mesmas. Enquanto uma dose diabetogénica única desta toxina (70-250 mg/kg de peso corporal) induz a destruição completa das células da maioria das espécies em 24 horas, doses sub-diabetogénicas múltiplas danificam parcialmente os ilhéus, desencadeando assim, um processo inflamatório que conduz à infiltração de macrófagos e linfócitos que é seguido pelo aparecimento de uma deficiência de insulina (Arora *et al.*, 2009).

A STZ induz diabetes em ratos, murganhos, macacos, hamsters, coelhos e cobaios. Apesar dos compostos de nitrosoureia serem geralmente lipofílicos, o que dá origem a uma captação rápida pelas células, a STZ pelo contrário, é um composto hidrofílico devido à substituição na hexose (**Fig.1.07**), o que limita a sua captação pelas células. A toxicidade seletiva para as células  $\beta$  e a ação diabetogénica estão relacionadas com a parte glicosídica da sua estrutura o que permite a sua entrada nas células  $\beta$  via transportador da glucose de baixa

afinidade (GLUT2), que se encontra na membrana plasmática. As células  $\beta$  captam mais glucose que outras células sendo mais sensíveis à STZ. Outras células que expressam o transportador GLUT2 como os hepatócitos e as células tubulares renais são também suscetíveis à STZ. Isto explica o facto dos animais experimentais em que é administrada STZ tenderem a desenvolver danos a nível do fígado e rins. No entanto, as células  $\alpha$  bem como as células do parênquima extra-pancreático permanecem intactas após a administração da STZ, o que reforça as suas propriedades seletivas para as células  $\beta$ . A STZ provoca também danos no tecido cardíaco e no tecido adiposo. Para além disto, aumenta o stress oxidativo, a inflamação e a disfunção endotelial quando as concentrações do fármaco ou dos seus metabolitos no fígado, pâncreas e intestino são consistentemente mais elevadas do que as no plasma (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013).

### 1.8.2. Bases bioquímicas da citotoxicidade que resultam na morte da célula

A STZ como já referido é um análogo da glucose (glu) e também da N-acetilglucosamina (GlcNAc), como mostra a **figura 1.07** (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013).



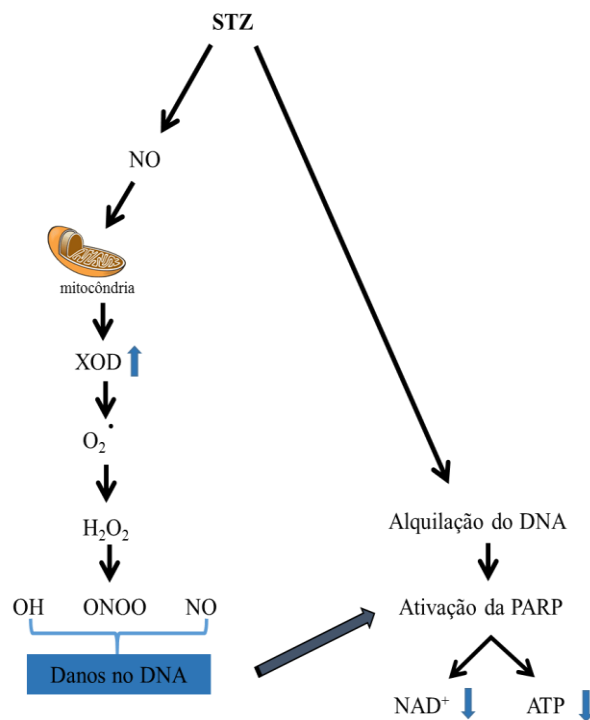
**Figura1.07** - Estrutura química da glucose (a), da N-acetilglucosamina (b) e da estreptozotocina (c).

Após a sua captação a STZ provoca a morte das células  $\beta$  através da fragmentação do ADN que se dá devido à parte nitrosourea da sua estrutura. As três principais vias associadas à morte da célula são:

1- Alquilação (metilação) do ADN através da formação do carbocatião (CH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Mais de 70% da metilação ocorre no N7 da guanina formando N7 metilguanina (N7-MeG) (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013). Na tentativa de reparar o ADN danificado há a ativação da enzima nuclear PARP (poli ADP-ribose sintetase) que depleta o NAD<sup>+</sup> celular e as reservas de ATP celular levando à inibição da produção de insulina (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013).

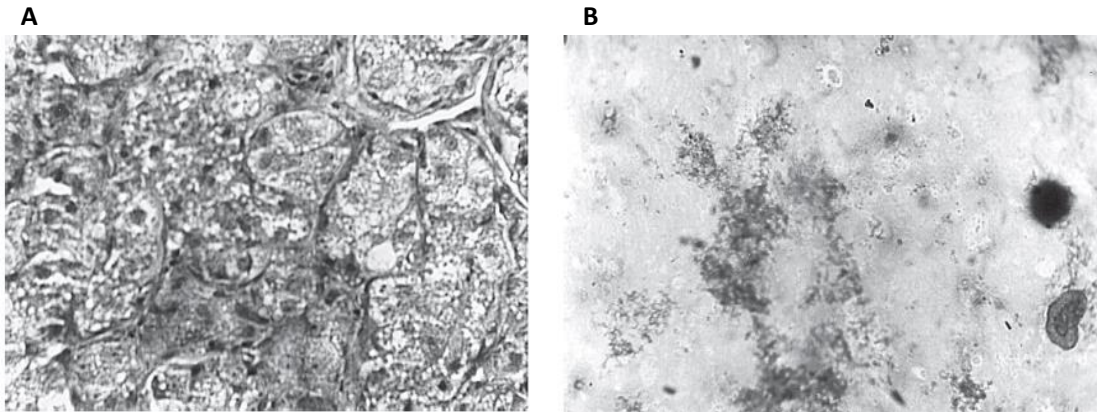
2- Produção de monóxido de azoto (NO), que por exemplo aumenta a atividade da guanililciclase e a formação de cGMP e restringe parcialmente a produção de ATP pela mitocôndria (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013)

3- Produção de radicais livres como o anião superóxido, devido à ação da STZ na mitocôndria e também ao aumento da atividade da xantina oxidase (que tem alta atividade nas células  $\beta$ ). A partir deste radical forma-se o peróxido de hidrogénio e posteriormente o radical hidroxilo (Eleazu, Eleazu, Chukwuma, & Essien, 2013). Pode-se afirmar que as potentes propriedades alquilantes da STZ são a principal razão da sua toxicidade. No entanto, a ação sinérgica do NO e das espécies reativas de oxigénio também pode contribuir para a fragmentação do ADN e outras alterações prejudiciais causadas por esta toxina (Szkudelski, 2001). A (**Fig.1.08**) resume o mecanismo dos eventos tóxicos induzidos pela estreptozotocina nas células  $\beta$  do pâncreas.



**Figura 1.08** - Mecanismo dos eventos tóxicos induzidos pela estreptozotocina (Szkudelski, 2001).

Biópsias ao pâncreas de ratos normais e de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina, após fixação com formol a 10% e coloração de hematoxilina/eosina (observação com ampliação de 4000 vezes, microscópio de Leitz) revelam que nos ratos diabéticos, as células  $\beta$  e conseqüentemente os ilhéus de Langerhans se encontram irreversivelmente degenerados (Fig. 1.09 A e B) (Akbarzadeh *et al.*, 2007).



**Figura 1.09-** Biópsia ao pâncreas de ratos normais (A). Biópsia ao pâncreas de ratos diabéticos (B), que confirma a destruição das células e ilhéus devido ao efeito da estreptozotocina (Akbarzadeh *et al.*, 2007).

# **CAPÍTULO – 2**

## **JUSTIFICAÇÃO DO TEMA**

## 2. Justificação do tema

A Osteoporose é uma doença assintomática e degenerativa associada ao envelhecimento e à diminuição de hormonas sexuais (pós-menopausa na mulher) que leva a uma diminuição progressiva da massa óssea e à deterioração da microarquitetura do osso tornando o esqueleto, em particular o osso trabecular, mais frágil e com maior risco de sofrer fraturas (Gonçalves, Rodrigues, Canhão & Fonseca, 2013). É considerada um grave problema de saúde pública, com uma prevalência crescente à medida que aumenta a esperança de vida dos indivíduos. Em Portugal, estima-se que o número total de fraturas por fragilidade óssea seja de 9500 por ano e que 10 a 20% dos doentes morrem no ano seguinte à fractura e como consequência desta. O impacto da osteoporose nos custos com a saúde tem vindo a aumentar, calculando-se que em 2013, o custo das fraturas de fragilidade na Europa tenha atingido os 30 biliões de euros (Gonçalves, Rodrigues, Canhão & Fonseca, 2013).

Se não for prevenida precocemente, ou se não for tratada, a perda de massa óssea vai aumentando progressivamente, de forma assintomática, sem manifestações, até à ocorrência de uma fratura. A identificação e a avaliação de populações sujeitas a um maior risco de desenvolver osteoporose é fundamental na prevenção e no tratamento mais eficaz da doença.

A Diabetes mellitus (DM) é também uma doença crónica com elevada incidência na população idosa e estima-se que tal como a osteoporose a sua incidência aumentará dramaticamente em todo o mundo nos próximos 15 anos (Mathers & Loncar, 2006). A diabetes mellitus tem sido apontada como um fator de predisposição para a osteoporose, no entanto existe alguma controvérsia a este respeito. A questão da diabetes ser um fator de risco para a osteoporose ou a osteopenia ser uma complicação da diabetes ainda não está totalmente esclarecida, em particular no caso da DM2.

A industrialização dos alimentos associada a um ritmo acelerado de vida nos países desenvolvidos conduz a um aumento do consumo de produtos alimentares com baixo valor nutricional, contribuindo para o desenvolvimento de vários tipos de doenças metabólicas, incluindo a DM2 e a osteoporose. O recurso a suplementos alimentares que contrabalançam deficiências nutricionais tem por este motivo, vindo a crescer.

No caso da osteoporose são múltiplas as ofertas de suplementos ricos em cálcio e cálcio associado à vitamina D (Van Der Velde, Brouwers, Geusens, Lems & Van Den Bergh, 2014), já que a deficiência em estrogénios e o próprio processo de envelhecimento reduzem a absorção intestinal de cálcio (O'Connell & Stamm, 2004). Contudo, a suplementação com cálcio, apesar de recomendada na prevenção da fratura óssea em indivíduos saudáveis bem como na osteoporose associada ao

envelhecimento e à menopausa, é assunto controverso, sobretudo por motivos de segurança decorrentes da deposição de cálcio extra-ósseo, nomeadamente na parede vascular e no rim.

A formulação dos suplementos de cálcio bem como a dose a utilizar para obter benefícios ao nível do esqueleto sem causar efeitos adversos é um assunto importante. Problemas de segurança nas doses recomendadas (1-1.2 g) de suplemento de cálcio justificam a avaliação da sua eficácia em doses mais baixas.

A Ostra abunda na orla costeira Portuguesa e a sua concha, rica em carbonato de cálcio, reduzida a pó, poderá ser utilizada como suplemento de cálcio. A biodisponibilidade do cálcio de concha de ostra tem sido extensamente estudada, desde o início da década de 90 (Fujita, Fukase, Nakada, & Koishi, 1988; Fujita, Ohue, Fujii, Miyauchi, & Takagi, 1996; Fujita, Ohue, Fujii, Miyauchi, & Takagi, 2004). Todos estes estudos, inclusive o de Nunes *et al.*, (2006), revelaram que o carbonato de cálcio proveniente da concha da ostra é melhor absorvido pelo organismo que o carbonato de cálcio de outras fontes.

O consumo alimentar de fibras, por outro lado tem sido também extensamente recomendado. As fibras alimentares solúveis cujas fontes principais são as frutas, verduras, farelo de aveia, cevada e as leguminosas podem ser utilizadas na prevenção e tratamento da DM2, tendo sido demonstrado em vários estudos em animais, que retardam o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal e reduzem a absorção da glucose e a acessibilidade da  $\alpha$ -amilase aos seus substratos impedindo o aumento pós-prandial da glucose e da insulina, o que leva também à diminuição da hemoglobina A1c (Cameron-Smith, Habito, Barnett, & Collier, 1997; Saeed, Mosa-Al-Reza, Fatemeh, & Saeideh, 2012). As fibras solúveis promovem também o aumento da absorção de cálcio no cólon, independente da vitamina D (Hara *et al.*, 1996; Rizzoli, 2016), fator favorável, principalmente na pós-menopausa e no idoso, em que a absorção de cálcio no duodeno está diminuída.

A grande incidência, destas duas patologias na população portuguesa e a possibilidade de travar a sua evolução com medidas terapêuticas acessíveis e de baixo custo, justifica, do nosso ponto de vista, um maior investimento no estudo da sua fisiopatologia, bem como no desenvolvimento de terapêuticas inovadoras, eficazes e seguras.



# **CAPÍTULO - 3**

## **OBJETIVO GERAL**

### **3. Objetivo**

#### **3.1. Objetivo geral**

Com este trabalho pretendeu-se utilizar um modelo animal de rato que simula a osteoporose que ocorre na mulher na pós-menopausa para estudar o efeito de um suplemento alimentar rico em cálcio, obtido a partir de um resíduo, a concha de ostra, e de uma fibra alimentar solúvel, no metabolismo, composição, microarquitetura e propriedades mecânicas do osso nesta condição patológica, em situações de normoglicemia e hiperglicemia crónica.

# **CAPÍTULO-4**

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. Material e Métodos

### 4.1. Preparação do Suplemento rico em Cálcio

#### 4.1.1. Preparação e análise do Carbonato de cálcio em pó (Concha de ostra)

As amostras de conchas de ostras (*Crassostrea gigas*) foram colhidas numa estação de aquacultura do estuário do Sado (Sapalsado, Setúbal) entre Novembro de 2003 e Junho de 2004. Após a remoção da parte edível dos bivalves, as conchas foram lavadas e desinfetadas em hipoclorito de sódio a 1% (Merck, Alemanha) e secas em estufa a  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 8 horas. As conchas foram trituradas em moinho de crivo e a granulometria obtida por tamisação (tamis com malha: 0,063). O pó das conchas foi sujeito à digestão com ácido nítrico concentrado (P.A., Merck, Alemanha) para análise dos contaminantes (mercúrio, cádmio, chumbo e arsénio) e para quantificação do teor de minerais (cálcio, potássio, sódio, zinco, magnésio, ferro, manganês, alumínio, estanho, cobalto, cobre, níquel e crómio) na amostra. As amostras foram digeridas, em bloco digestor, com ácido nítrico a 65% (P.A.) e a uma temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. Após a digestão, as amostras foram filtradas e diluídas para 100mL (solução mãe) em água desionizada. Para a quantificação do cálcio e dos outros minerais e contaminantes, a leitura foi feita por espectrómetro de absorção atómica (AAS) com chama e lâmpada de cátodo oco, utilizando espectrómetro UNICAM 939 AA de acordo com o protocolo da AOAC - official methods of analysis - 985.1 (Peters *et al.*, 2003). O aparelho de sistema de vapor UNICAM VP 90 foi associado ao UNICAM 939 AA Spectrometer para as leituras das concentrações de Hg e As. As leituras dos elementos foram feitas nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) em nm indicados na **tabela 4.01**, através de curvas analíticas, elaboradas com soluções uni-elementares preparadas por diluição da solução padrão mãe de 1000 ppm cujas concentrações se encontram indicadas na referida tabela. O mercúrio foi determinado pela técnica de espectrometria de absorção atómica com gerador de hidretos, nas seguintes condições: Lâmpada de cátodo oco de mercúrio com o comprimento de onda de 253,7 nm (fluxo do gás de arraste  $\text{N}_2$ ). Utilizou-se uma curva de calibração para o mercúrio com variações de concentração descrita na mesma tabela, preparadas por diluição a partir da solução mãe.

**Tabela 4.01** Parâmetros de avaliação (concentração padrão, comprimento de onda, taxa de fluxo e limite de detecção) dos teores dos metais utilizados no processo analítico.

Elementos	Conc. Padrão (ppm)	(λ) nm	Taxa de fluxo (L/min)	Limite de detecção (mg/L)
Ca (**)	0,6; 1,0; 1,4	422,7	4,0 a 4,4	0,015
K (**)	0,5; 0,8; 1,1	766,5	1,1 a 1,3	0,012
Na (**)	0,4; 0,8; 1,2	589,0	0,9 a 1,2	0,013
Mg (**)	0,1; 0,2; 0,3	258,2	0,9 a 1,2	0,003
Fe (**)	1,0; 2,5; 5,0	248,3	0,8 a 1,0	0,060
Al (**)	7,5; 15; 30	309,3	4,1 a 4,4	0,340
Zn (**)	0,8; 1,2; 2,4	213,9	0,9 a 1,2	0,013
Cu (**)	1,0; 2,5; 5,0	324,8	0,8 a 1,1	0,041
Mn (*)	2,0; 4,0; 6,0	279,5	0,9 a 1,2	0,029
Cd (*)	1,0; 1,5; 2,0	226,5	1,0 a 1,3	0,032
Co (**)	2,0; 5,0; 8,0	240,7	0,8 a 1,0	0,081
Cr (**)	2,0; 3,0; 5,0	357,9	4,0 a 4,4	0,050
Sn (***)	10; 20; 40	224,6	4,3 a 4,7	0,430
Pb (*)	2,0; 5,0; 10	261,4	0,9 a 1,2	0,100
As	5,0; 10; 20ppb	193,7	4,1 a 4,6	0,32µg/L
Hg	5,0; 10; 20ppb	253,7	1,1 a 1,3	1,232µg/L

(\*) – 5% HNO<sub>3</sub>; (\*\*) – 6,5% HNO<sub>3</sub>; (\*\*\*) – 10% HNO<sub>3</sub>

#### 4.1.2. Análise do teor em cálcio da ração e preparação das pellets com goma guar e pó de concha de ostra.

O teor em cálcio da ração foi analisado para o lote da ração administrada aos animais durante o estudo, pelo mesmo método usado para a determinação do cálcio no pó de concha de ostra, já descrito anteriormente.

As pellets, utilizadas para a suplementação com cálcio foram preparadas a partir da ração comercial (4RF21-GPL certificate, Mucedola, Milão – Itália), a ração comercial foi triturada e associada ao pó da concha de ostra e da fibra solúvel comercial - goma guar (Solé Graells – Barcelona, Espanha). Cada pellet continha 105 mg/Kg de pó de concha de ostra e 43 mg/Kg de goma guar. A pellet foi depois moldada com o mesmo formato da pellet comercial e seca em estufa a uma temperatura de 65°C. A dose de pó de concha de ostra administrada contém uma dose de cálcio equivalente a 43.6 mg/Kg/dia. Esta dose equivale à suplementação, no homem de 7.0 mg/Kg/dia de cálcio elementar. A quantidade de cálcio utilizada na preparação do suplemento foi calculada tendo por base a dose diária de consumo de cálcio recomendada na mulher após os 50 anos (1,2 g/dia) (Ross et al., 2011), tendo sido, neste caso, utilizada

uma dose equivalente a aproximadamente um quarto da dose máxima diária de cálcio admitida por consenso (2000 mg/dia) (Ross *et al.*, 2011) ou seja 420 mg/dia. A dose de goma guar utilizada corresponde a uma dose humana de 6.9 mg/Kg/dia. Quer a dose de cálcio quer a de goma guar foram ajustadas para o rato tendo por base o fator de conversão da FDA (USD, FDA, CDER, 2005).

#### 4.1.3. Metodologia para a suplementação com cálcio e goma guar

Durante todo o período experimental os ratos foram alojados em gaiolas individuais e alimentados com a ração comercial. Os animais dos grupos suplementados, além da ração comercial, receberam diariamente uma pellet que foi preparada com o pó da concha e a goma guar. A suplementação iniciou-se uma semana após a ovariectomia dos animais e foi administrada durante 53 dias. Os animais não suplementados, consumiram apenas a ração comercial.

#### 4.2. Animais de experiência

Nos ensaios, foram utilizados ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*), com 2,5 meses de idade e peso médio  $220 \pm 20$ g, provenientes do laboratório Harlan (Espanha). Os animais foram alojados em gaiolas padrão, à temperatura média de  $21 \pm 2^\circ$  C, com um ciclo claro/escuro de 12 horas, no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, alimentados com ração comercial (4RF21-GPL certificate, Mucedola, Milão – Itália) e água desionizada *ad libitum* e sujeitos a 10 dias de aclimação antes de qualquer procedimento experimental.

Os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com os princípios éticos da declaração de Helsínquia e as regras comunitárias e nacionais aplicáveis à proteção de animais utilizados em investigação e outros fins científicos (Diretiva 86/609/CEE, D.L. nº 129/92, Portaria nº 1005/92, e toda a legislação posterior).

Ao todo foram utilizados 42 animais, distribuídos de forma aleatória por 6 grupos, cada um com 7 animais, que correspondem aos diferentes processos a que foram submetidos, conforme **tabela 4.02**. A cirurgia simulada ou ovariectomia foi realizada aos 3 meses de idade dos animais e a suplementação foi iniciada no grupo V e VI, sete dias após a mesma. Contudo, nalgumas experiências foram obtidos resultados apenas para 6 animais por grupo.

**Tabela 4. 02** – Grupos experimentais de acordo com o tratamento em que os animais foram Submetidos.

<b>Grupos</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>Identificador</b>
<b>I</b>	Cirurgia sem ovariectomia	C
<b>II</b>	Ovariectomia	OVX
<b>III</b>	Indução da hiperglicemia	STZ
<b>IV</b>	Indução da hiperglicemia/Ovariectomia	STZ + OVX
<b>V</b>	Ovariectomia/suplementação	OVX + S
<b>VI</b>	Indução da hiperglicemia/Ovariectomia/suplementação	STZ+OVX+S

Para evitar repetições, nos capítulos relativos a cada uma das experiências efetuadas, são explicados com mais detalhe os modelos experimentais utilizados.

#### **4.2.1. Peso dos animais**

O peso dos animais de todos os grupos foi obtido, no início e no final do período de experimentação imediatamente antes do sacrifício dos animais, em balança eletrônica digital (marca Adam Equipment, modelo ADG 3000), com precisão de 0,1g.

#### **4.2.2. Indução da hiperglicemia**

Após jejum de 12 horas, foi administrada, por via intraperitoneal uma dose única (40 mg/kg) de estreptozotocina (Sigma - EUA) aos ratos dos grupos III e IV foram considerados animais hiperglicêmicos os ratos que apresentaram glicemia em jejum igual ou superior a 160 mg/dL, no momento do sacrifício. A glicemia foi determinada utilizando fitas e aparelho Accu-Chek Active (Roche – USA), a partir de uma gota de sangue obtida da veia da cauda do animal. A glicemia em jejum foi monitorizada semanalmente pela manhã durante o período experimental nestes grupos.

Aos animais dos grupos I, II e V foi administrado, pela mesma via, o mesmo volume de soro fisiológico, nestes animais as glicemias foram determinadas apenas no início e no fim do período experimental estabelecido.

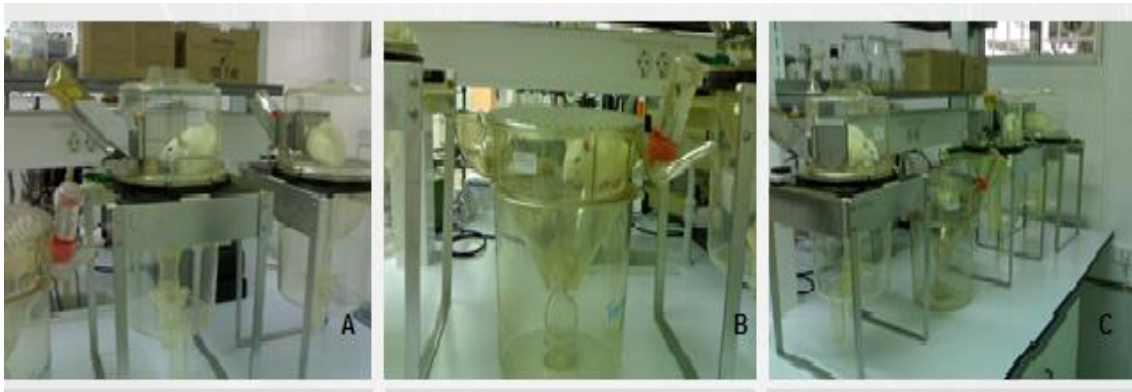
#### **4.2.3. Metodologia cirúrgica – Ovariectomia**

A ovariectomia foi efetuada a 28 ratos Wistar fêmeas com 3 meses de idade. Previamente à cirurgia os animais foram submetidos a um jejum de 12h, identificados e pesados. A indução da anestesia foi efetuada por administração, via intraperitoneal, de medetomidina (Dexra PLC, UK®) (50µg/ Kg) e após 5 minutos os animais foram anestesiados por inalação de

uma mistura de gás isoflurano e de oxigênio. Foram também administrados por via subcutânea, profilaticamente, amoxicilina (Amoxisol retard, Bayer®) 100mg/Kg) e cetoprofeno (Romefen, Merial Portuguesa®) (1mg/Kg). No final do procedimento cirúrgico foi administrado atipamazol (Dechra PLC UK) (250 µg/Kg), para reverter a anestesia. Sob anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal e submetidos a laparotomia por incisão abdominal. Os dois ovários foram individualizados e as respectivas trompas e vasos foram laqueados após o que foram removidos. Durante o procedimento cirúrgico a temperatura corporal foi mantida entre 37°C e 38°C através do uso de um cobertor térmico. Os animais dos grupos controlo (C) e STZ foram submetidos a todo o procedimento cirúrgico exceto à remoção dos ovários, bem como à mesma terapêutica.

#### 4.2.4. Recolha de urina

Antes do sacrifício (12h) os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, em jejum, para a colheita das amostras de urina. As amostras foram acondicionadas e congeladas a temperatura < -20°C para posterior análise (**Fig. 4.01**).



**Figura 4.01** – As figuras A, B e C identificam animais em gaiolas metabólicas para colheita de urina de 12h.

#### 4.2.5. Sacrifício dos animais, colheita de sangue, ossos e órgãos

Os animais foram identificados, pesados e posteriormente foram sacrificados com uma dose de uretano a 28% (Sigma, China) de acordo com o peso de cada animal, as colheitas de sangue foram feitas por punção cardíaca e as amostras centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos (**Fig. 4.02**). O soro foi acondicionado a temperatura < -20°C, para determinação dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos e hormonais. Após disseção anatômica dos músculos e remoção completa dos tecidos moles, os fêmures e as tíbias foram identificados, e

congelados (< -20°C). As vértebras (L4) foram colocadas em etanol a 70%, e os órgãos: fígado, coração com crossa da aorta e rim, foram limpos, lavados com soro fisiológico e colocados em formol a 10% em tampão fosfato.



**Figura 4.02** – As figuras A,B e C identificam animais expostos para colheita de sangue feita por punção cardíaca.

### **4.3. Análises dos parâmetros sanguíneos**

#### **4.3.1 Marcadores bioquímicos e hormonais**

Os parâmetros bioquímicos foram determinados no soro por métodos colorimétricos e enzimáticos no Analisador automático (Olympus AU2700, Hamburgo, Alemanha) e incluíram:

- Glucose (método da hexoquinase- leitura UV)
- Colesterol total (método da colesterol oxidase),
- Colesterol de HDL (método CPO/PAP),
- Colesterol de LDL determinação direta (método CHO/PAP),
- Triglicéridos (ensaio enzimático GPO/POD),
- Cálcio total (método do arsenazo III) (sensibilidade: 0,13 mg/dL)

Parâmetros hormonais:

Os Estrogénios (E<sub>2</sub>) foram determinados no soro, por um ensaio de ELISA (sensibilidade: 11,8 pg/mL), no equipamento ADVIA Centaur da Siemens Health Care – Alemanha.

#### **4.3.2. Marcadores da remodelação óssea**

Foram analisados no sangue (soro) recolhido após sacrifício dos animais, dois marcadores de remodelação óssea, um de reabsorção o Telopectido C-terminal do colagénio tipo I (CTX) e outro de formação, o Propeptido N-terminal do procolagénio tipo I (P1NP). Os dois marcadores foram analisados pelo método ELISA, por testes comerciais (sensibilidades: 2,0

e 0,7 ng/mL, respetivamente) e de acordo com as indicações do fabricante (Immunodiagnostic Systems, Boldon Tyme and Wear, UK).

#### **4.4. Análises na urina**

Para a determinação do teor de cálcio na urina, os volumes da urina de 12 h, foram medidos e as amostras foram digeridas, em bloco digestor, com ácido nítrico a 65% PA, e a uma temperatura de 120°C, durante 4 horas. Após a digestão as amostras foram filtradas e diluídas para 25 mL em água desionizada. Para a quantificação do cálcio a leitura foi feita por espectrofotometria de absorção atómica (AAS) a 422,7 nm (limite de deteção de 0,01mg/L), por uma técnica adaptada de EPA7000a (Combs *et al*, 2003).

#### **4.5. Análise histomorfométrica do osso trabecular vertebral**

Após o sacrifício dos animais, efetuou-se a disseção anatómica dos músculos e a remoção completa dos tecidos moles e a 4ª vértebra lombar (L4) foi recolhida em cada animal após o sacrifício e armazenada em etanol a 70%, para análise histomorfométrica do osso trabecular. O processamento dos tecidos envolveu a fixação em etanol a 70%, desidratação com concentrações crescentes de etanol (96% a 100%) e a impregnação e inclusão em solução de metilmetacrilato (MMA) (Vidal, *et al.*, 2015). A amostra foi cortada em secções transversais seriadas de 5- $\mu$ m, com uma lâmina de tungstênio num micrótomato Minot semiautomatizado (Leica RM2145), posteriormente coradas com azul de Anilina de modo a poder distinguir o osso da medula óssea. As imagens do osso trabecular vertebral (L4) foram obtidas com uma ampliação de 1.25X num microscópio óptico (Leica DM2500), com câmara de vídeo (Leica CCD) da Leica microsystems, Wetzlar, Alemanha. As medições foram realizadas utilizando o software NIH Image J 1.46R.

Foram avaliados os seguintes índices: volume ósseo - BV/TV, espessura trabecular -Tb.Th ( $\mu$ m) e separação trabecular -Tb.Sp ( $\mu$ m). Todas as variáveis foram expressas e calculadas de acordo com as recomendações da American Society for Bone and Mineral Research (Parfitt, *et al.*, 1987). As análises foram efetuadas por um perito, em ensaio cego.

#### **4.6. Análise por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) da tíbia (osso cortical)**

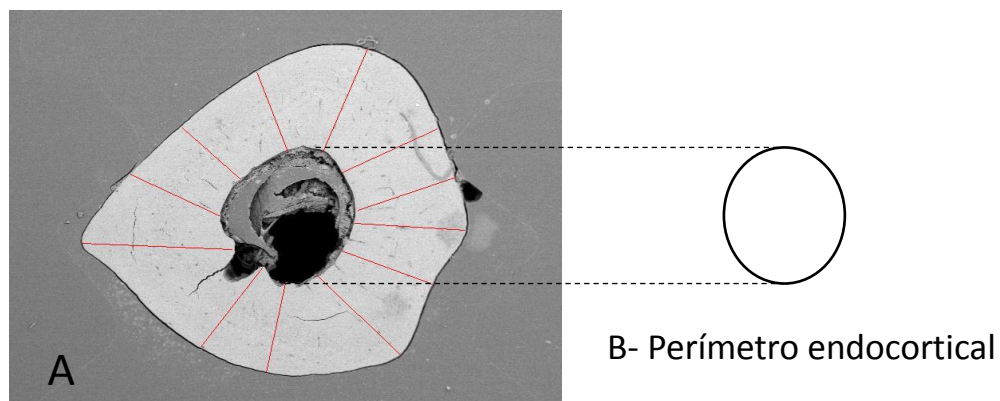
A análise do osso cortical foi efetuada na zona média das diáfises das tíbias direitas dos animais que foram descongeladas imediatamente antes dos ensaios.

Secções longitudinais e transversais da tíbia, foram inseridas em resina epoxídica transparente e montadas numa mistura de resina Mecaprex MA2 (04008) e endurecedor para resina

Mecaprex MA2 (Presi SA. Tavernolles, 38320 Brie & Angonnes, France) numa proporção de 100:12. Após 24 horas, as amostras de osso foram polidas usando lixas de diferentes granulometrias (200, 320, 600, 800 e 1000).

Após a deposição de uma camada condutora uniforme sobre as amostras, foi realizada a análise num microscópio eletrónico de varrimento FEG-SEM (modelo 7001 F, JEOL) com uma emissão de um feixe de electrões de 15 Kv. As imagens foram obtidas com elétrons retrodifundidos, com ampliações de 20x a 150x.

As medições da espessura do osso cortical da tibia foram efetuadas a partir de imagens de seções transversais recorrendo a um software de análise de imagem comercial (Sigma scan pro 5). Para cada tibia, foram obtidas 12 medidas da espessura do osso cortical conforme a **figura 4.03-A**. Para alguns animais, foram ainda obtidos, a partir das imagens dos mesmos cortes de osso da tibia, os valores dos perímetros endocorticais, que correspondem ao canal medular, recorrendo ao software NIH Image J. (**Fig. 4.03-B**).



**Figura 4.03 – A -** Doze medições da espessura do osso cortical (linha vermelha) obtidas a partir de um corte transversal da tibia; **B -** Medição do perímetro endocortical.

## 4.7. Parâmetros químicos e biomecânicos do osso cortical femoral

### 4.7.1 Análise do conteúdo em cálcio

Para a determinação do teor de cálcio no osso femoral, a metodologia usada para a digestão e dissolução foi adaptada de AOAC 985.01 (Peters, *et al.*, 2003). As análises foram realizadas nos fêmures esquerdos de cada animal por uma técnica adaptada de EPA7000a (Peters, *et al.*, 2003). Os ossos foram previamente secos em estufa a  $103 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 12 horas após o que foram digeridos a  $120^\circ\text{C}$  com ácido nítrico a 65% PA durante 4h. Após a digestão as amostras foram filtradas e diluídas para 100ml em água desionizada. Para a quantificação

do cálcio a leitura foi efetuada por espectrofotometria de absorção atômica (AAS) a 422,7 nm (limite de deteção de 0,01mg/L).

#### 4.7.2 Ensaio biomecânicos de flexão

Os ossos femorais direitos recolhidos na altura do sacrifício dos animais foram submetidos a um ensaio mecânico de flexão em três pontos numa máquina universal de ensaios mecânicos (Instron 5566, Instron Corporation, Canton, USA) com uma célula de carga de 500 kN, com uma velocidade do travessão de 0.01mm/s e uma distância entre os apoios de 15 mm (**Fig. 4.04**). Num ensaio de flexão regista-se a força – deslocamento que posteriormente se converte numa curva tensão-extensão.



**Figura 4.04** - Ensaio de flexão em 3 pontos em fémur de rato Wistar.

Imediatamente antes do ensaio, as amostras foram descongelados à temperatura ambiente, pesadas numa balança digital e o diâmetro dos fémures foi medido com um paquímetro. Os ensaios mecânicos de flexão, foram realizados na região média das diáfises dos fémures. As variáveis foram obtidas por elaboração de curvas de tensão-extensão (**Fig. 4.05**) obtidas com o software Bluehill 2 (Instron, copyright 1997 – 2007) e analisadas pelo software MATLAB 7.1. A amostra a ensaiar foi colocada sobre dois apoios inferiores e a zona superior da amostra contactava com um apoio central, sobre o qual foi aplicada uma carga (L). A amostra teve uma deflexão no ponto central igual a  $\Delta l$ .

Assumindo uma forma cilíndrica para os fêmures dos ratos, obtêm-se curvas tensão  $\sigma$ -extensão  $\varepsilon$  através das equações:

$$(1) \sigma = \frac{L s}{\pi (d/2)^3}$$

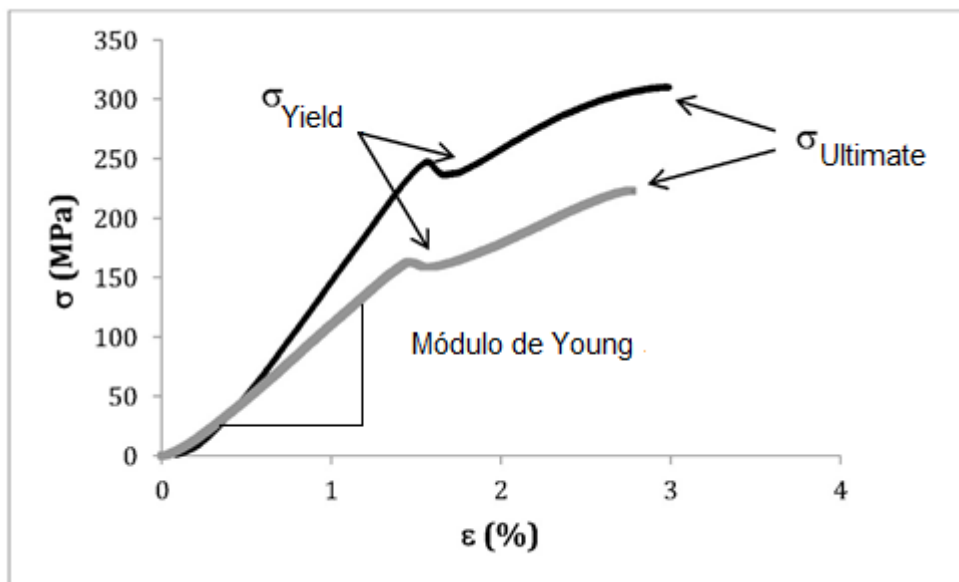
$$(2) \varepsilon = \frac{12(d/2)\Delta l}{s^2}$$

em que  $\sigma$  é a tensão (MPa), L=carga (N), s=distância entre apoios inferiores (mm), d= diâmetro exterior do fêmur (mm),  $\Delta l$  = deslocamento no ponto médio (mm) e  $\varepsilon$  a extensão(%). No caso em estudo usou-se  $s = 15$  mm.

Os parâmetros que se retiram das curvas tensão – extensão são:

- módulo de Young (E) ou módulo de elasticidade;
- tensão de cedência ( $\sigma_{\text{yield}} = \text{yield stress}$ );
- tensão máxima ou de fratura ( $\sigma_{\text{ult}} = \text{ultimate stress}$ );
- extensão máxima ( $\varepsilon_{\text{ult}} = \text{ultimate strain}$ ).

O módulo de Young avalia a rigidez do material, enquanto tanto a tensão de cedência como tensão máxima quantificam a resistência mecânica. Um material tem maior rigidez se tiver um módulo de Young mais elevado e tem maior resistência mecânica se tiver maior tensão de cedência e tensão máxima. Na **figura 4.05** apresenta-se o exemplo de uma curva tensão ( $\sigma$ ) – extensão ( $\varepsilon$ ), em que se indicam os parâmetros medidos.



**Figura 4.05** Curva tensão ( $\sigma$ ) – extensão ( $\varepsilon$ ) correspondente a um fêmur de um rato hiperglicémico e osteoporótico.

O módulo de Young (E) é o declive da curva na zona elástica e foi calculado entre as tensões de 50 e 100N. A tensão de cedência ( $\sigma_{\text{yield}}$ ) ou yield stress corresponde ao aparecimento da

primeira fissura do osso, que depois se propagou. O osso acabou por se separar em duas partes no ponto final do gráfico, isto é,  $\sigma_{ult}$  e  $\epsilon_{ult}$ .

#### **4.8 Análise histológica do fígado, rim e croça da aorta**

O fígado e rim de um animal dos grupos (C); (OVX) e (OVX+S) conservados em formol a 10% em tampão fosfato, foram mergulhados em xilol e depois em parafina líquida a partir da qual se obtiveram os blocos com o tecido impregnado. Foram efetuados cortes com um micrótomo Leica SM 2000R, que foram montados em lâmina e corados pelos métodos de hematoxilina – eosina (para avaliação da morfologia geral do tecido) e de Von Kossa (para a detecção de eventuais depósitos de cálcio) (Bancroft & Gamble, 2012). Após a coloração, as lâminas foram montadas em Entellan® e observadas ao microscópio óptico (Nikon Labophot) com uma ampliação de 100x para os cortes de fígado, 200x para os cortes de rim e 400x para a croça da aorta.

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados quantitativos são apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram analisados pela aplicação do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Consideraram-se significativas as diferenças entre grupos experimentais a partir de valores de  $p < 0,05$ . A análise estatística foi efetuada com o recurso ao software SPSS (Statistical Package for Social Sciences Manager, Inc. Chicago. IL. USA) e ao GraphPad Prisma. A análise de correlação entre dados foi realizada recorrendo ao teste de correlação de Spearman.

## **CAPÍTULO-5**

**EFEITO DA HIPERGLICEMIA CRÓNICA NA COMPOSIÇÃO MINERAL, MICROESTRUTURA, PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS E REMODELAÇÃO ÓSSEA NUM MODELO ANIMAL COM E SEM OSTEOPOROSE.**

## **5. Efeito da hiperglicemia crônica na composição mineral, microestrutura, propriedades biomecânicas e remodelação óssea num modelo animal com e sem osteoporose.**

### **5.1. Introdução/Objetivo**

A estrutura óssea tem de ser rígida, flexível e leve para poder resistir às cargas e torções a que está sujeita e simultaneamente permitir o movimento do esqueleto. Estas propriedades biomecânicas são determinadas por um conjunto complexo de fatores interdependentes tais como a massa óssea, a estrutura geométrica e a composição orgânica e mineral do tecido ósseo, que influenciam a qualidade do osso e condicionam a sua integridade estrutural e a sua resistência (Fonseca, 2012; Alexeeva *et al.*, 1994).

A estrutura do osso é pois influenciada pelas suas propriedades nanoestruturais mas também pela remodelação óssea. As propriedades nanoestruturais do osso dependem diretamente da forma como as células, o tecido orgânico (colagenoso) e os cristais de fosfato de cálcio interagem (Fonseca, 2012).

É do conhecimento geral que, com o tempo, a diabetes pode causar lesão micro e macrovascular bem como dos nervos periféricos aumentando o risco de doença cardíaca e de acidente vascular cerebral, retinopatia, neuropatia, infeção e insuficiência renal crónica, efeitos esses que têm vindo a ser associados à hiperglicemia crónica.

A qualidade do osso pode também ser afetada pela diabetes. Contudo, existe ainda alguma controvérsia no modo como a diabetes afeta o tecido ósseo em particular na diabetes tipo 2 (Vestergaard, 2007; Starup-Linde & Vestergaard, 2015). Alguns estudos, sugerem que a diabetes tipo 2 afeta quer o osso trabecular quer o osso cortical, aumentando assim o risco de fraturas do quadril, vértebra e rádio. Embora tenha sido identificada osteopenia em doentes com diabetes tipo 2 indicando a necessidade de uma deteção e intervenção mais precoce da osteoporose nestes doentes (Yahuru, 2009; Wongdee & Charoenphandhu, 2011). Existem muitos estudos que apontam para o aumento da DMO em mulheres diabéticas na pós-menopausa, em particular nas que apresentam um índice elevado de massa corporal (Rubin, Schwartz, Kanis, & Leslie, 2013; Sta Romana & Li-Yu, 2007). Assim, o papel da diabetes na remodelação e estrutura óssea bem como na resistência do osso não está ainda completamente esclarecido, embora vários fatores associados á alteração da qualidade do osso, tenham vindo a ser apontados como possíveis responsáveis do aumento do risco de fratura quer na DM1 quer na DM2, sendo um deles a hiperglicemia crónica (Starup-Linde & Vestergaard, 2015)

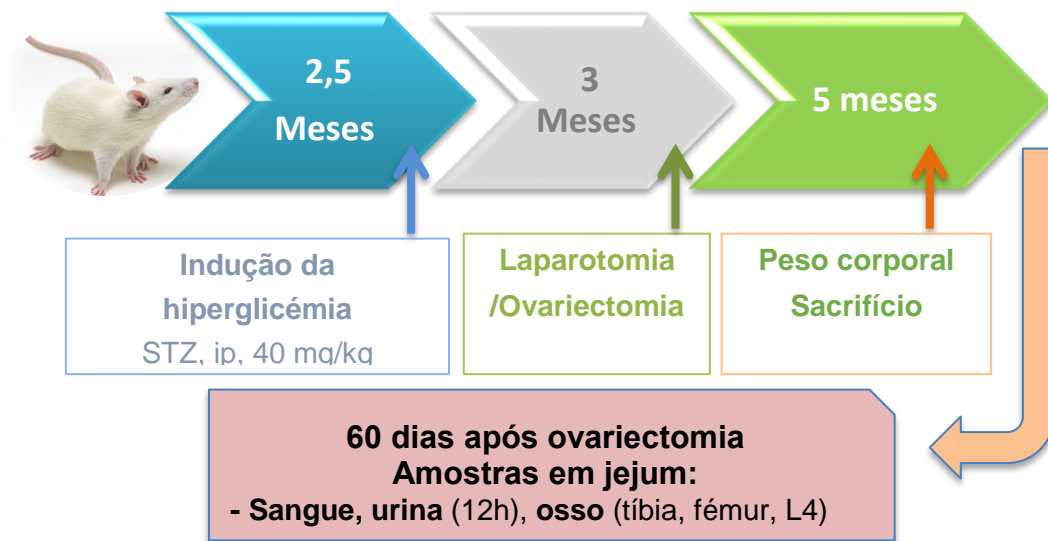
O principal objetivo deste estudo foi o de comparar os efeitos da hiperglicemia crónica na, remodelação óssea, qualidade do osso trabecular e composição mineral; propriedades

biomecânicas e microestrutura do osso cortical em ratos fêmeas saudáveis, com ratos com níveis reduzidos de estrogénios após ovariectomia. Os dados dos animais hiperglicémicos foram também comparados com os de um grupo de animais controlo, sujeitos a laparotomia mas sem ovariectomia.

## 5.2. Material e Métodos

### 5.2.1. Desenho experimental

O desenho experimental utilizado está esquematizado na **Fig. 5.01**.



**Figura 5.01** - Desenho experimental utilizado para o estudo do efeito da hiperglicemia crônica.

### 5.2.2. Indução da hiperglicemia

Após jejum de 12 horas, foi administrado, por via intraperitoneal uma dose única (40 mg/kg) de estreptozotocina (Sigma - EUA) aos ratos dos grupos III e IV. A glicemia foi monitorizada semanalmente, utilizando fitas e aparelho Accu-Chek Active (Roche – USA), a partir de uma gota de sangue obtida da veia da cauda do animal. O peso corporal dos animais foi também monitorizado pela manhã, durante o período experimental, nestes grupos.

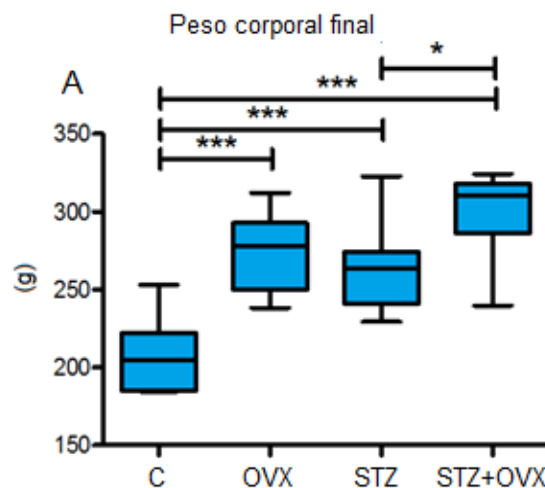
Aos animais dos grupos I, II e V foram administrados, pela mesma via, os mesmos volumes de soro fisiológico.

Nos animais controlo (I) e nos não hiperglicémicos ovariectomizados (II e V), as glicemias foram determinadas apenas no início e no fim do período experimental estabelecido.

### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos antes do sacrifício

O peso corporal final (**Fig.5.02**) aumentou em todos os grupos em relação ao controle (C) ( $p < 0,05$ ), tendo sido observado um aumento de 18,1% ( $p < 0,05$ ) no grupo STZ comparativamente ao controle. O maior ganho de peso observou-se contudo nos grupos de animais ovariectomizados (OVX e STZ+OVX) que apresentaram no final do estudo pesos 5 a 7 vezes superiores aos do grupo C. As diferenças de peso corporal observadas entre OVX e STZ+OVX não foram significativas, contudo o peso dos animais STZ+OVX foi significativamente maior do que o dos animais STZ.



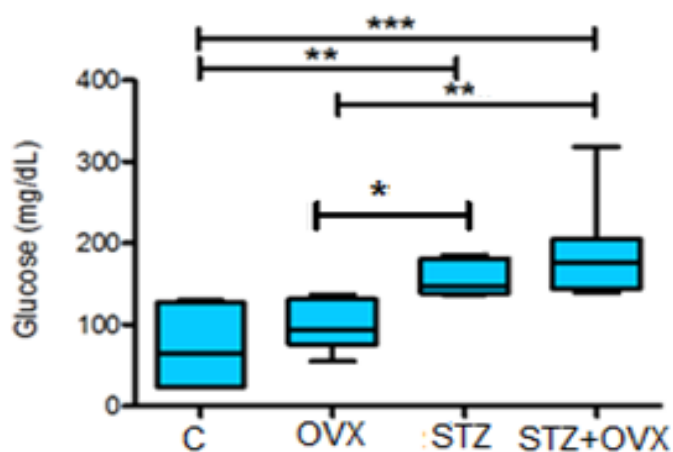
**Figura 5.02** Peso corporal final (D60) dos animais estudados: C-controle (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ- hiperglicêmico (n=7); STZ+OVX- hiperglicêmico ovariectomizado (n=7); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Os animais tratados com streptozotocina (STZ) (n= 14) apresentaram níveis de glucose em jejum, antes da ovariectomia acima de  $247,4 \pm 51$  mg/dL. A monitorização desses níveis ao longo do estudo confirmou a permanência do estado hiperglicêmico nesses animais de acordo com os níveis de glucose no soro medidos após o sacrifício. Foram considerados hiperglicêmicos os ratos que apresentaram glicemias séricas em jejum iguais ou superiores a 160 mg/dL, no momento do sacrifício (**Tabela 5.01**).

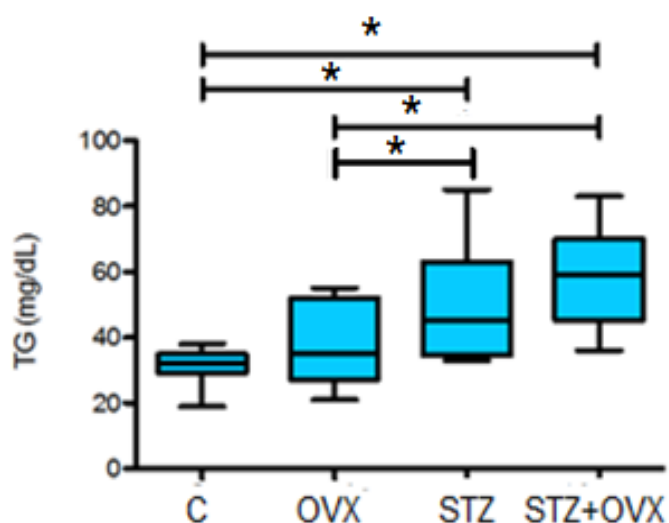
### 5.3.2. Parâmetros bioquímicos séricos e urinários após sacrifício

Os resultados dos parâmetros bioquímicos determinados no soro e na urina de acordo com cada um dos grupos estudados: Controlo (C), ovariectomizado (OVX), hiperglicêmico (STZ) e hiperglicêmico ovariectomizado (STZ+OVX), estão compilados na **tabela 5.01**.

Os níveis séricos de E2 dos animais ovariectomizados estavam abaixo do limite de detecção (11.8 pg/ml), evidenciando assim o sucesso da ovariectomia, embora tenham sido doseados nos grupos de ratos Wistar fêmeas em que este procedimento não foi efetuada (**Tabela 5.01**). Os níveis séricos de glucose (**Fig.5.03**) e de triglicéridos (**Fig.5.04**) foram mais elevados no grupo hiperglicêmico (STZ e STZ+OVX). A ovariectomia não modificou significativamente os níveis de glicemia e de triglicéridos.



**Figura 5.03** Gráfico do nível sérico de glucose dos animais estudados: C - controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ-hiperglicêmico (n=7); STZ+OVX - hiperglicêmico ovariectomizado; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

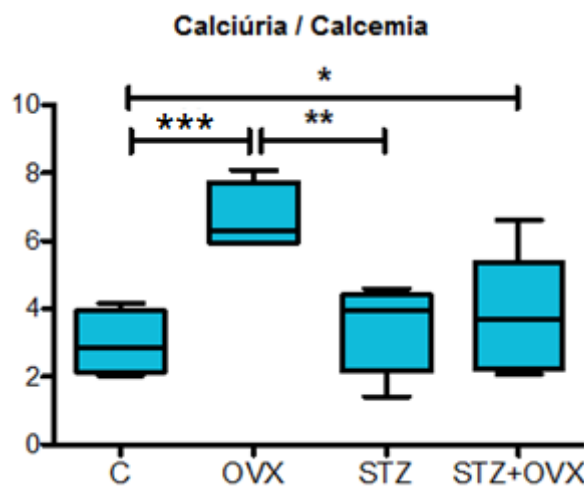


**Figura 5.04** Gráfico do nível sérico de Triglicéridos dos animais estudados: C- controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ-hiperglicêmico (n=7); STZ+OVX-hiperglicêmico ovariectomizado; \*p<0.05.

Os níveis de colesterol total e do colesterol LDL e HDL, não mostraram alterações significativas entre os grupos estudados (**Tabela 5.01**).

Os animais do grupo OVX apresentaram níveis séricos de cálcio diminuídos e calciúria aumentada em comparação com os animais do grupo controle. ( $p < 0.05$ ). A calciúria (concentração de cálcio na urina) foi maior nos animais ovariectomizados em comparação com os restantes grupos. Contudo, observou-se um aumento significativo do volume de urina excretado nas 12h entre os grupos dos animais com hiperglicemia (STZ e STZ+OVX) comparativamente aos grupos normoglicêmicos (C  $p < 0.01$  e OVX  $p < 0.05$ ) (**Tabela 5.01**).

A razão calciúria/calcemia (**Fig.5.05**) confirma o aumento da excreção do cálcio nos animais ovariectomizados (OVX), que é duas vezes maior do que a do grupo controle. Embora esta razão seja ligeiramente maior no grupo dos animais hiperglicêmicos (STZ e STZ+OVX), estes apresentam também, diferenças significativas quando comparados com o grupo OVX.



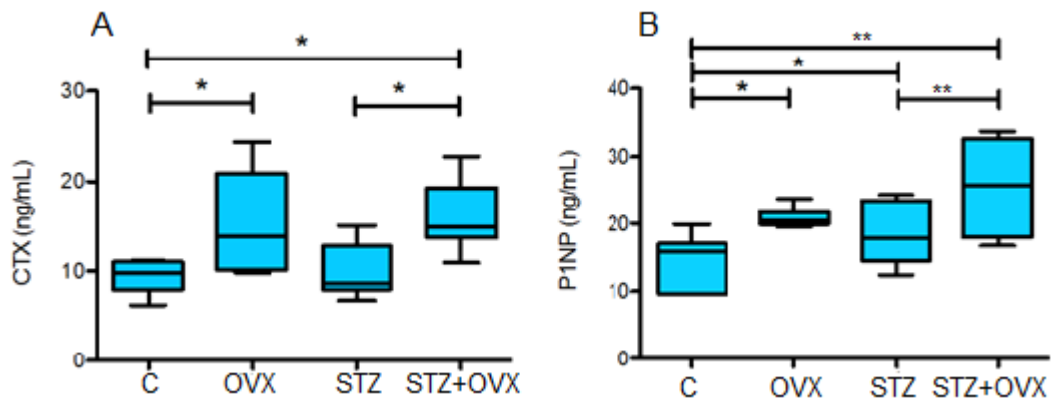
**Figura 5.05** – controlo (n=7); OVX – ovariectomizado (n=7); STZ – hiperglicêmico (n=7); STZ+OVX – hiperglicêmico ovariectomizado (n=7); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Contudo, a depuração do cálcio é muito semelhante nos animais ovariectomizados (OVX e STZ+OVX), sendo cerca de duas vezes e meia superior à do grupo controle (**Tabela 5.01**).

### 5.3.2.1. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea

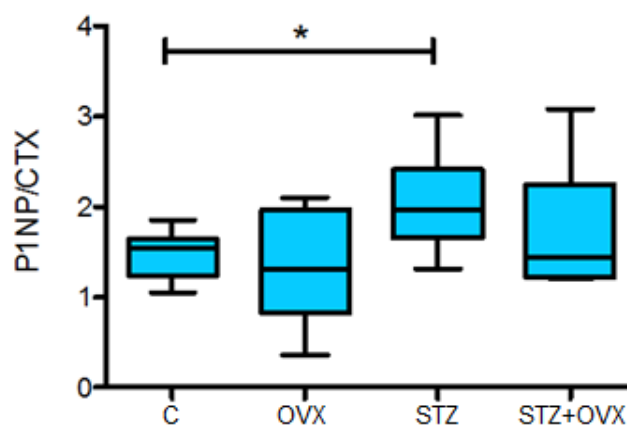
O marcador sérico de reabsorção óssea, CTX, foi maior nos animais ovariectomizados (OVX,  $p < 0.05$ ) e (STZ+OVX,  $p < 0.001$ ) quando comparado com o grupo controle e com os hiperglicêmicos ( $p < 0.05$ ) (**Tabela 5.01**).

O marcador de formação óssea, P1NP, foi também superior nos animais hiperglicêmicos (27%) bem como nos ratos ovariectomizados normo (46%, $p<0.05$ ) e hiperglicêmicos (71%,  $p<0.01$ ), quando comparados com o grupo controle (**Fig. 5.06 A e B e Tabela 5.01**).



**Figura 5.06** Gráfico A) CTX (serum C-terminal telopeptide of type 1 collagen) e B) P1NP (N-terminal propeptides of procollagen type I)- dos grupos dos animais estudados: C-controlo, OVX-ovariectomizado, STZ-hiperglicêmicos e STZ+OVX- hiperglicêmicos ovariectomizados; \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

A razão do P1NP/CTX (**Fig.5.07**) aumenta 22% nos hiperglicêmicos (STZ) e diminui 14% nos ovariectomizados (OVX), quando comparada com a do grupo controlo, enquanto nos animais STZ+OVX a mesma razão é semelhante à dos animais do grupo controlo. Estes resultados sugerem uma tendência para a formação de osso nos animais STZ+OVX em oposição ao que acontece nos animais OVX.



**Figura 5.07** Gráfico da razão do P1NP/CTX indica as alterações existente entre formação e reabsorção do osso dos animais estudados: C-controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ-hiperglicémico (n=7); STZ+OVX- hiperglicémico ovariectomizado; \* $p<0.01$

**Tabela 5.01** Resultados dos marcadores bioquímicos e fisiológicos dos grupos de animais estudados: Controlo (C), ovariectomizado (OVX), hiperglicémico (STZ) e hiperglicémico + ovariectomizado (STZ+OVX).

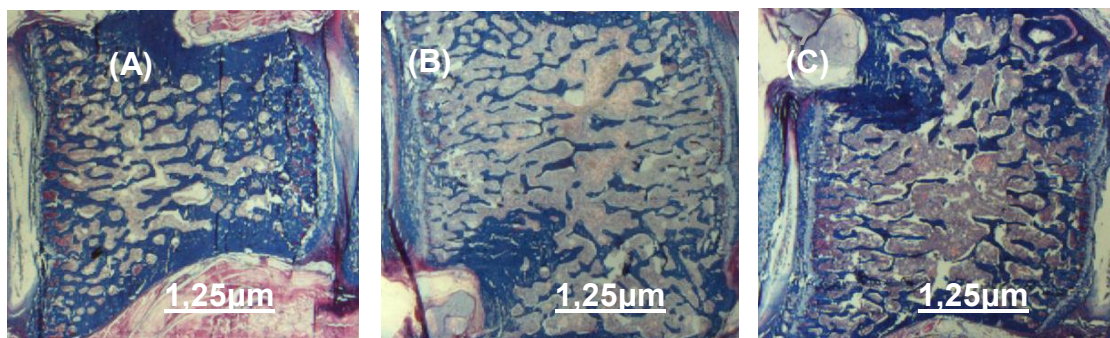
Variáveis	Controlo	OVX	STZ	STZ+OVX
Peso corporal (g) D0	200.31 ± 5.92	206.57 ± 6.53	<b>239.55 ± 4.42<sup>a</sup></b>	<b>249.16 ± 10.41<sup>a</sup></b>
Peso corporal (g) D60	218.49 ± 4.97	<b>274.74 ± 9.98<sup>aa</sup></b>	<b>270.40 ± 10.37<sup>a</sup></b>	<b>300.49 ± 10.41<sup>aaa</sup></b>
E2 (pg/mL)	16.5 ± 2.6	< DL	31.9 ± 7.7	< DL
Glicemia (mg/dL)	66.0 ± 15.2	87.3 ± 10.5	<b>167.3 ± 7.3<sup>aa,b</sup></b>	<b>198.0 ± 21.7<sup>aaa,bb</sup></b>
Triglicéridos (mg/dL)	31.3 ± 2.3	34.3 ± 3.7	<b>53.8 ± 5.9<sup>a</sup></b>	<b>57.7 ± 6.1<sup>a</sup></b>
Colesterol total (mg/dL)	84.6 ± 3.8	97.0 ± 4.8	90.6 ± 4.8	98.7 ± 4.3
HDL (mg/dL)	39.3 ± 2.5	45.3 ± 2.9	38.2 ± 3.0	37.5 ± 5.9
LDL (mg/dL)	38.2 ± 3.2	49.1 ± 5.6	39.3 ± 4.3	43.7 ± 3.3
Calcemia (mg/dL)	10.47 ± 0.19	<b>9.76 ± 0.15<sup>a</sup></b>	10.26 ± 0.23	9.94 ± 0.29
Urina 12h (ml)	3.9 ± 0.7	4.3 ± 0.7	<b>7.2 ± 0.7<sup>aa,b</sup></b>	<b>7.6 ± 0.8<sup>aa,b</sup></b>
Calciúria (mg/dL)	31.48 ± 4.47	<b>65.14 ± 3.29<sup>a</sup></b>	<b>34.68 ± 4.77<sup>b</sup></b>	37.59 ± 6.13 <sup>b</sup>
Calciúria/calcemia	2.98 ± 0.3	<b>6.68 ± 0.27<sup>aaa</sup></b>	<b>3.43 ± 0.34<sup>bb</sup></b>	<b>3.75 ± 0.48<sup>b</sup></b>
Depuração do Cálcio (ml/min)	0.016 ± 0.002	<b>0.040 ± 0.002<sup>a</sup></b>	0.034 ± 0.005	<b>0.040 ± 0.007<sup>a</sup></b>
CTX (ng/mL)	9.4 ± 0.6	<b>15.5 ± 1.9<sup>a,c</sup></b>	9.4 ± 0.9	<b>15.9 ± 1.4<sup>a,c</sup></b>
PINP (ng/mL)	14.7 ± 1.3	<b>21.3 ± 0.6<sup>a</sup></b>	18.6 ± 1.6	<b>25.0 ± 2.2<sup>aa</sup></b>
PINP/CTX	1.57 ± 0.06	1.39 ± 0.11	<b>1.97 ± 0.09<sup>bb</sup></b>	1.66 ± 0.13

Os resultados são valores médios ± erro padrão; n=7 por grupo; <sup>a</sup> p<0.05; <sup>aa</sup>p<0.01, <sup>aaa</sup>p<0.001 comparado ao controlo; <sup>b</sup> p<0.05, <sup>bb</sup> p<0.01 comparado ao OVX; <sup>c</sup> p<0.01, <sup>cc</sup>p<0.001 comparado ao STZ; DL: Limite de deteção = 11.8 pg/mL.

### 5.3.3. Histomorfometria óssea da quarta vértebra lombar (L4)

A histomorfometria óssea foi utilizada para quantificar os parâmetros estruturais do osso trabecular vertebral, tais como: espessura trabecular, separação trabecular e volume ósseo a fim de determinar os efeitos da ovariectomia e da hiperglicemia na microestrutura óssea trabecular (**Fig. 5.08 A, B e C**).

Os dados do estudo histomorfométrico (**Tabela 5.02**) são consistentes com os resultados dos marcadores de remodelação óssea apresentados na **tabela 5.01**.



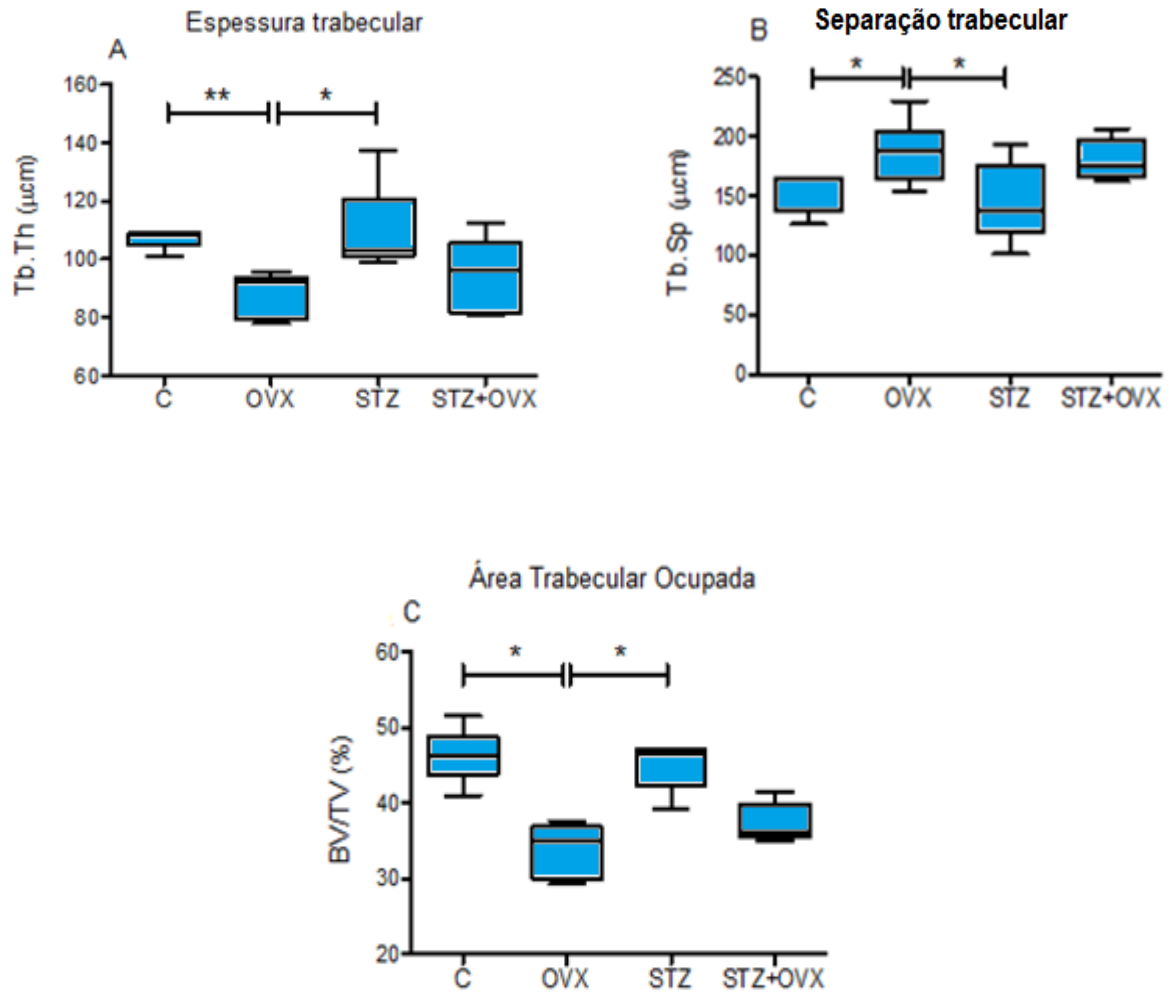
**Figura 5.08** Avaliação por histomorfometria óssea da quarta vértebra lombar (L4), nos grupos estudados: A) C-controlo, B) OVX-ovarietomizados e C) STZ-hiperglicêmicos. As seções transversais foram obtidas com 5 μm de espessura e coradas com azul de anilina, de modo a distinguir osso e medula óssea, permitindo a análise estrutural do osso.

A espessura trabecular (Tb.Th) foi significativamente menor no grupo de animais OVX e no grupo dos STZ+OVX quando comparada com o grupo C ( $p < 0.01$ ) e com o grupo STZ ( $p < 0.05$ ) (**Fig.5.09-A e Tabela 5.02**).

A distância trabecular (Tb Sp) no grupo OVX foi maior que nos demais grupos, sendo significativa, quando comparada com os grupos C ( $p < 0.01$ ) e STZ ( $p < 0.05$ ). (**Fig.5.09 - B e Tabela 5.02**).

Na avaliação da razão do volume ósseo sobre o volume total do tecido ou área trabecular (BV/TV), o grupo OVX apresentou valores inferiores ao grupo C ( $p < 0.05$ ) e ao grupo STZ ( $p < 0.05$ ) (**Fig.5.09 - C e Tabela 5.02**). O grupo STZ+OVX, embora com um volume ósseo mais baixo do que o dos grupos C e STZ não apresentou diferenças significativas relativamente a esses grupos.

Nas vértebras dos animais STZ+OVX, foi assim observada uma tendência para melhoria da microarquitetura do osso trabecular quando comparada com a dos OVX (+7.7%, -3.6% e +9.6% melhor Tb.Th, Tb.Sp e BV/TV, respectivamente).



**Figura 5.09** A) Espessura trabecular (Tb.Th), B) Distância trabecular (Tb.Sp), C) Razão do volume ósseo sobre o volume total de tecido (BV/TV); C- controlo (n=6); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ-hiperglicémicos (n=6); STZ+OVX-hiperglicémico ovariectomizado (n=7); \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$

**Tabela 5.02** Medições da vértebra lombar (L4), por microscopia eletrónica de varrimento.

Variáveis	Controlo	OVX	STZ	STZ+OVX
Área trabecular ocupada BV/TV(%)	46.34 ± 1.66	<b>34.00 ± 1.39<sup>a,c</sup></b>	45.14 ± 1.49	37.25 ± 1.05
Espessura trabecular Tb.Th (µm)	107.20 ± 1.63	<b>88.36 ± 3.07<sup>aa,c</sup></b>	109.39 ± 7.08	95.14 ± 4.98
Separação trabecular Tb.Sp (µm)	153.62 ± 6.19	<b>187.05 ± 9.09<sup>a,c</sup></b>	145.11 ± 12.31	180.31 ± 5.68

Os resultados são valores médios ± erro padrão; n=6 para os grupos controlo (C) e hiperglicémicos (STZ) e n=7 para os grupos ovariectomizados (OVX e STZ+OVX); <sup>a</sup> p<0.05; <sup>aa</sup> p<0.01 comparado ao controlo; <sup>c</sup> p<0.05 comparado ao grupo OVX.

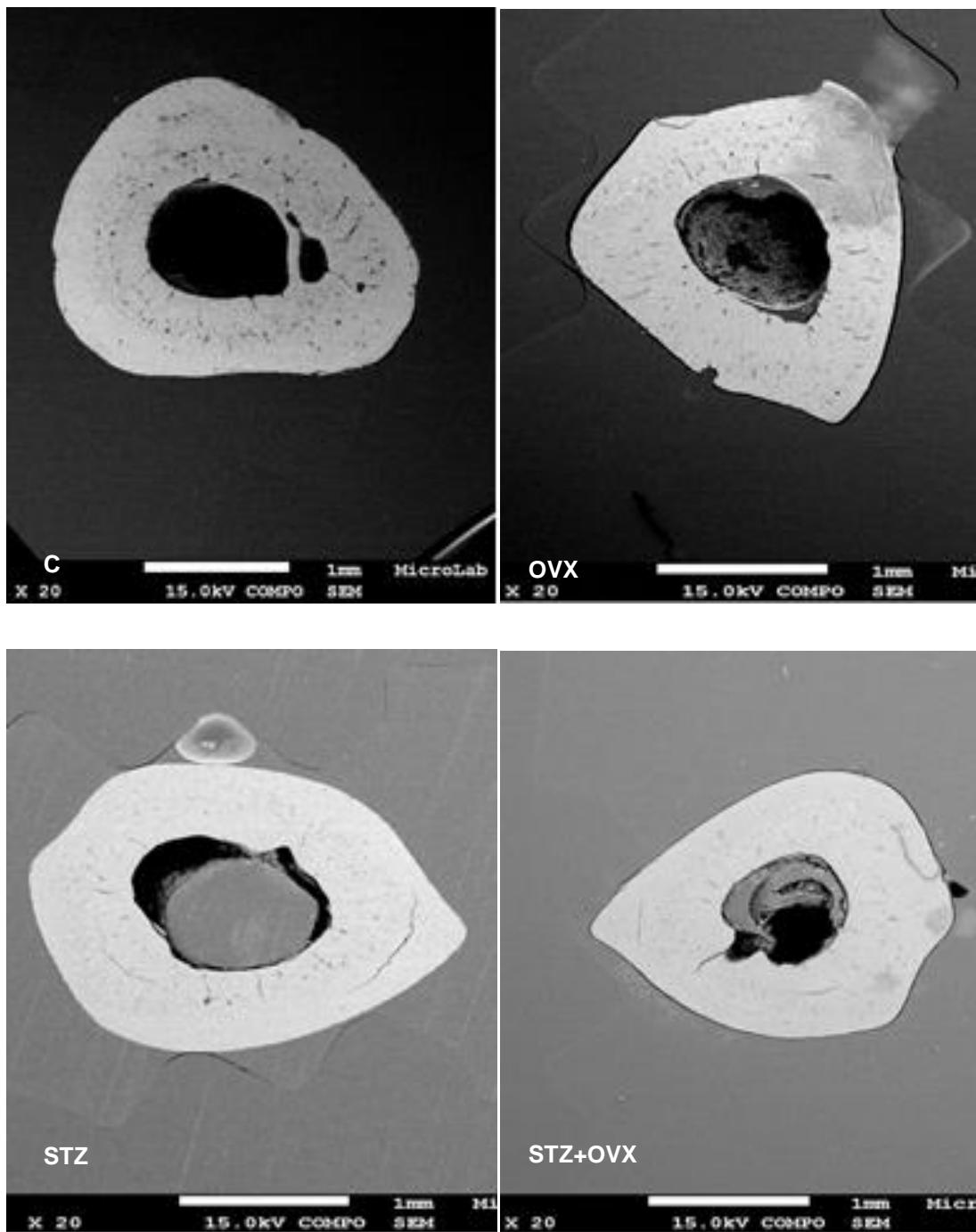
### 5.3.4. Espessura cortical óssea da tíbia

A análise das imagens da seção transversal da zona média da tíbia, obtidas com uma ampliação de 20x (**Fig.5.10**) mostrou uma redução de 7% da espessura cortical da tíbia dos animais OVX comparados com os C (p<0.05), bem como um aumento de 36% do canal medular (perímetro endocortical) (**Tabela 5.03**). Enquanto nos animais hiperglicémicos (ovariectomizados ou não) o aumento do canal medular (35.4% e 38.6%) não foi acompanhado de alterações relevantes da espessura do osso cortical (0,5-3% de redução) (**Tabela 5.03**).

**Tabela 5.03** Espessura do osso cortical e do perímetro endocortical (tíbia) avaliada em 12 pontos nos grupos de animais estudados; n=6 para C e STZ e n=7 para os OVX e STZ+OVX.

Variáveis	C	OVX	STZ	STZ+OVX
Espessura do osso cortical (mm)	0.636 ± 0.010	<b>0.593 ± 0.014<sup>a</sup></b>	0.633 ± 0.023	0.616 ± 0.016
Perímetro endocortical (mm)	4.63 ± 0.09	<b>6.31 ± 0.25<sup>a</sup></b>	<b>6.42 ± 0.26<sup>aa</sup></b>	<b>6.27 ± 0.32<sup>a</sup></b>

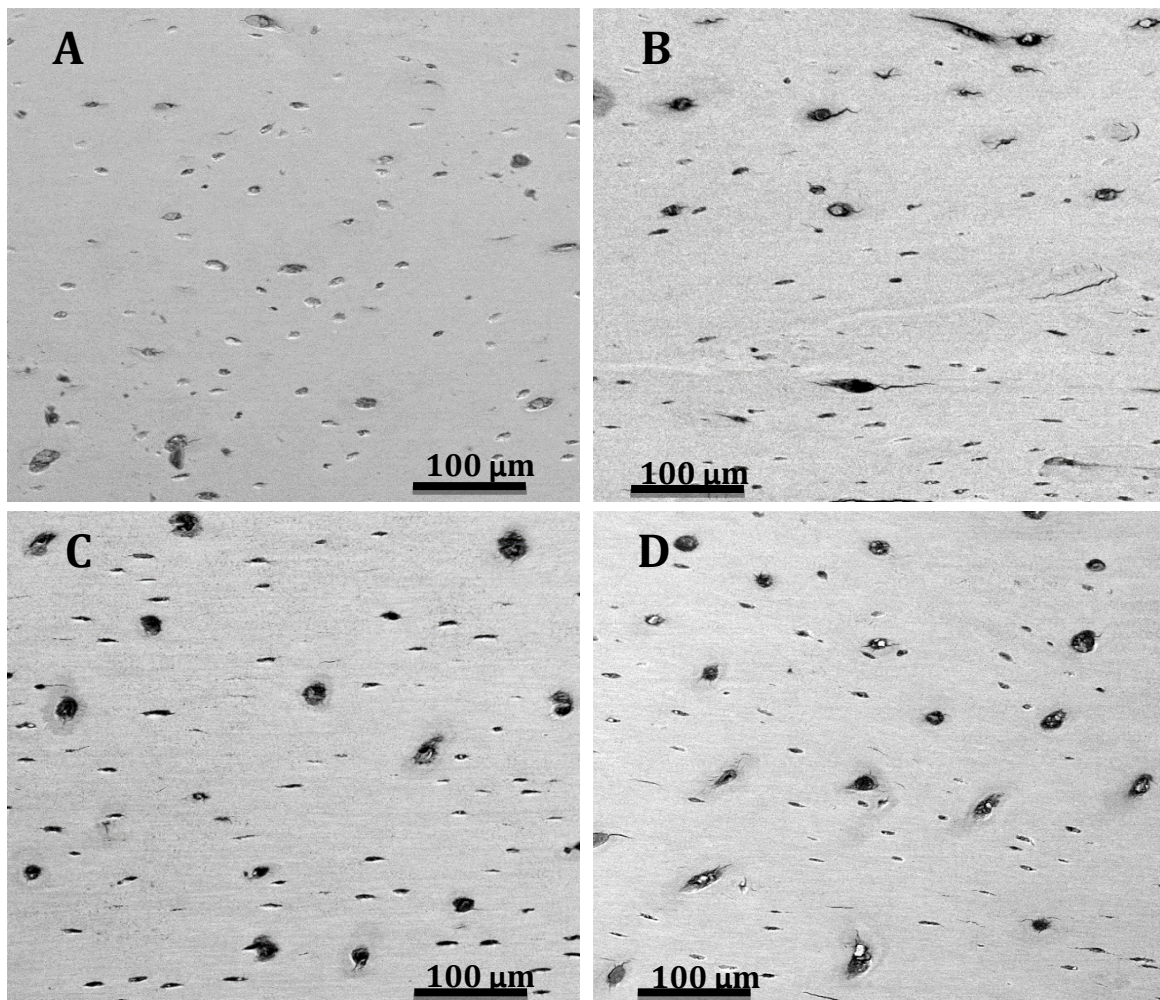
Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup> p<0.05; comparado ao controlo.



**Figura 5.10** Imagens da espessura do osso cortical da tíbia, obtidas por SEM, com uma ampliação de 20x, dos animais estudados.

### 5.3.5. Avaliação da microestrutura do osso cortical da tíbia

As imagens apresentadas na **Fig. 5.11**, são representativas dos dados da Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) do osso da tíbia dos animais estudados, obtidas a partir dos cortes longitudinais da zona média do osso e efetuadas com uma ampliação de 150x. A avaliação qualitativa da microscopia eletrônica das seções longitudinais da tíbia de animais hiperglicêmicos mostrou uma estrutura óssea preservada com osteons separados por osso intersticial, lacunas e osteócitos conectados por canalículos (**Fig. 5.11-C**), uma estrutura similar á do grupo controlo (**Fig.5.11-A**). No entanto, este grupo de animais (STZ) mostrou um aumento do número e tamanho das lacunas ósseas quando comparado com o grupo controlo. Em oposição, foram observadas alterações na estrutura óssea de ambos os grupos ovariectomizados (**Fig.5.11- B**) e hiperglicêmicos ovariectomizados (**Fig.5.11-D**).Várias microfissuras, áreas reabsortivas, aumento do número de lacunas/osteócitos foram observados especialmente no grupo de animais ovariectomizados.



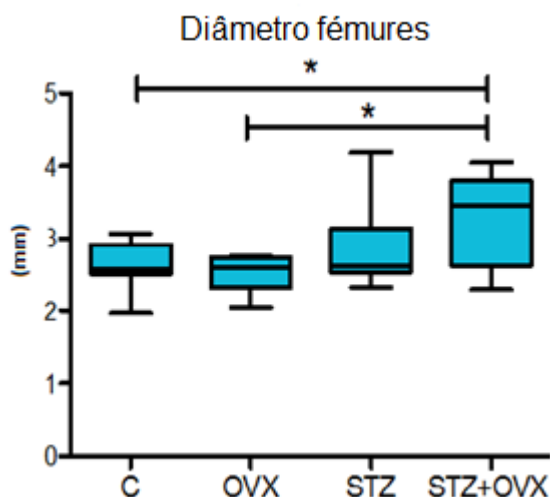
**Figura 5.11** - Imagens SEM (cortes longitudinais da tíbia, obtidos com ampliação de 150x),representativas do osso da tíbia dos animais estudados: C-controlo (A); OVX-ovariectomizado (B); STZ-hiperglicémico (C); STZ+OVX-hiperglicemico ovariectomizado (D).

### 5.3.6. Parâmetros físico-químicos avaliados no osso femoral

#### 5.3.6.1. Diâmetro e peso dos fêmures

O peso dos fêmures dos animais dos grupos OVX, STZ e OVX+STZ, foram significativamente maiores que os dos animais do grupo C, acompanhando o grande aumento de peso que estes animais registaram comparativamente aos do grupo C ao longo da experiência (D0 a D60), contudo quando o peso do fêmur é normalizado ao peso do animal as diferenças deixam de ser significativas (**Tabela 5.04**).

O diâmetro dos fêmures (**Fig.5.12**) aumentou nos dois grupos de animais hiperglicêmicos sendo este aumento significativo no grupo hiperglicêmico ovariectomizado (STZ+OVX) comparativamente aos grupos ovariectomizado (OVX) e controle (C) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 5.12** Gráfico do diâmetro dos fêmures dos animais estudados: C-controle (n=6); OVX-ovariectomizado (n=7); STZ- hiperglicêmico (n=6); STZ+OVX- hiperglicêmico ovariectomizado (n=7). \* $p < 0.05$ .

Contudo, quer o peso quer o diâmetro dos fêmures dos animais STZ+ OVX quando normalizados com o peso dos animais deixa de ser significativo quando comparado aos dos animais do grupo controle, contrastando com o que acontece com o diâmetro normalizado dos fêmures do grupo OVX que é significativamente inferior ao dos animais não ovariectomizados normo e hiperglicêmicos ( $< 0,001$  para o C e  $< 0.05$  para o STZ). (**Tabela 5.04**)

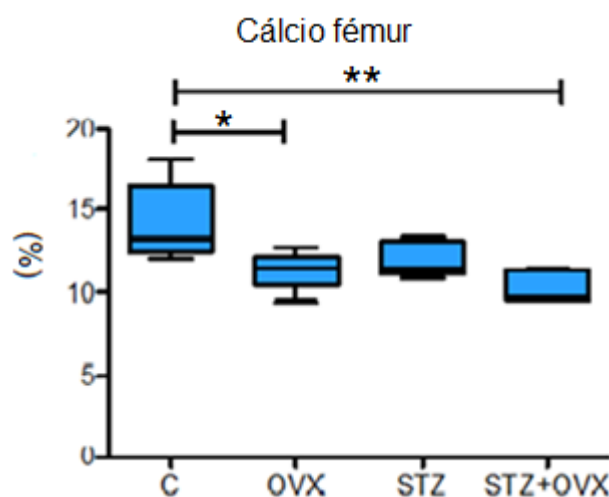
**Tabela 5.04** Parâmetros físicos do fêmur dos animais estudados. C - Controlo; OVX – Ovariectomizado; STZ – hiperglicémico; STZ+OVX- hiperglicémico ovariectomizado, n=7 por grupo.

Variáveis	Controlo	OVX	STZ	STZ+OVX
Diâmetro (mm)	2.61 ± 0.13	2.54 ± 0.10	2.76 ± 0.13	<b>3.22 ± 0.21<sup>a,b</sup></b>
Diâmetro fêmur / peso corporal (µ/g)	12.60± 0.45	<b>9.28 ± 0.43<sup>aaa</sup></b>	11.03 ± 0.45	10.92 ± 0.51
Peso fêmur (g)	0.59 ± 0.03	<b>0.73±0.03<sup>a</sup></b>	<b>0.72±0.02<sup>a</sup></b>	<b>0.79±0.03<sup>aaa</sup></b>
Peso fêmur/Peso corporal (µg/g)	2.68±0.07	2.58±0.05	2.74±0.06	2.64±0.02

Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup> p<0.05; <sup>aa</sup> p<0.01; <sup>aaa</sup> p<0.001 comparado ao C; <sup>b</sup> p<0.05 comparado ao grupo OVX.

### 5.3.7. Conteúdo em cálcio

Os resultados obtidos na absorção atômica mostraram níveis percentuais de cálcio mais reduzidos nos ossos dos fêmures dos ratos ovariectomizados normais (OVX, p<0.05) ou hiperglicémicos (STZ+OVX), p<0.01) comparado com ratos controlo (**Tabela 5.05 e Fig.5.13**). Uma tendência semelhante, para um menor conteúdo ósseo em cálcio foi também observada nos fêmures dos animais hiperglicémicos (STZ) comparativamente aos do grupo controlo (C) ainda que esta diferença não tenha sido significativa (**Tabela 5.05**).



**Figura 5.13** Percentagem do Cálcio dos fêmures dos animais estudados: C-controlo (n=6); OVX- ovariectomizado (n=7); STZ- hiperglicémico (n=6); STZ+OVX- hiperglicémico ovariectomizado (n=7); \*p<0.05 e \*\*p<0.01.

**Tabela 5.05** – Percentagem de cálcio no osso femoral: C - Controle; OVX – Ovariectomizado, STZ– hiperglicêmico, STZ+OVX- hiperglicêmico ovariectomizado; n=7 Por grupo.

Variáveis	Controle	OVX	STZ	STZ+OVX
Cálcio (%)	14.17 ± 1.05	<b>11.07 ± 0.35<sup>a</sup></b>	11.96± 0.46	<b>10.31 ± 0.41<sup>aa</sup></b>

Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup> p<0.05; <sup>aa</sup> p<0.01, comparado ao controle.

### 5.3.8. Propriedades biomecânicas do osso

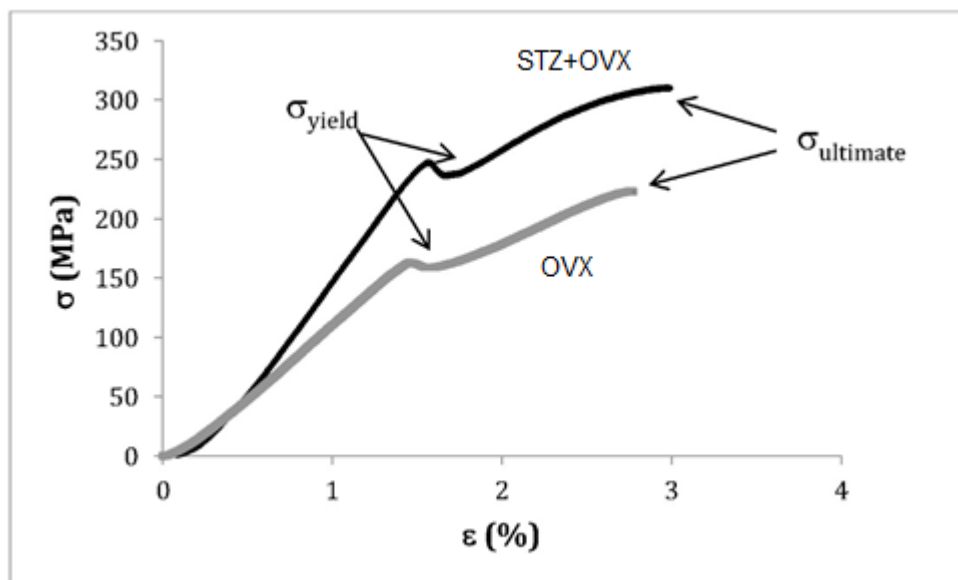
As curvas de tensão – extensão obtidas nos ensaios mecânicos de flexão em três pontos, conforme o exemplo dado na **Fig. 4.05**, permitiram estudar as propriedades biomecânicas dos fêmures dos diferentes grupos de animais a partir da análise dos parâmetros: módulo de Young, tensão de cedência ( $\sigma$  yield) e tensão máxima ( $\sigma$  ultimate) (**Tabela 5.06**).

Nestes ensaios, em que cada curva pode ser dividida em duas fases: antes e após deformação do osso, os animais do grupo OVX mostraram ter uma tendência para ter valores mais baixos em todas as variáveis avaliadas quando comparados com os do grupo C (**Tabela 5.06**) embora os resultados não sejam estatisticamente significativos, talvez devido ao baixo número de animais.

Por outro lado, os valores obtidos para as diferentes variáveis nos animais STZ+OVX, foram significativamente superiores às obtidas no grupo OVX. A **Fig.5.14** apresenta duas curvas representativas desses ensaios. Nestas curvas pode observar-se que o módulo de Young que reflete a rigidez do osso, é mais elevado no animal hiperglicêmico ovariectomizado (STZ+OVX) do que no animal normoglicêmico ovariectomizado (OVX). O mesmo acontece relativamente à força mecânica avaliada pela tensão de cedência ( $\sigma$  yield), (indicando que mais força é necessária para provocar as primeiras microfissuras e iniciar as deformações plásticas e definitivas do osso) e à tensão máxima ( $\sigma$  ult) que reflete a força a que o osso tem de ser submetido para fraturar.

Estes resultados indicam que os ossos dos fêmures de animais STZ+OVX são menos frágeis do que os dos animais OVX.

Contudo é importante salientar que o diâmetro dos fêmures dos animais STZ+OVX é também maior quando comparado com os grupos de animais OVX e C ( $p < 0.05$ ) (**Tabela 5.04**) embora essa diferença deixe de ser estatisticamente significativa quando o diâmetro do fêmur é corrigido pelo peso corporal dos animais (**Tabela 5.04**).



**Figura 5.14** Curvas de tensão - extensão exemplificativas. Um animal de cada grupo: Hiperglicêmico ovariectomizado – (STZ+OVX) e ovariectomizado - (OVX).

**Tabela 5.06** Propriedades biomecânicas obtidas nos ensaios de flexão em três pontos dos fêmures direito dos animais estudados,  $n=7$  por grupo C, STZ, OVX e STZ+OVX.

Variáveis	Controlo	OVX	STZ	STZ+OVX
<b>Tensão de cedência (MPa)</b>	191.79 ± 12.39	<b>176.86 ± 3.43<sup>a</sup></b>	205.18 ± 15.98	240.79 ± 15.02
<b>Tensão máxima (MPa)</b>	261.14 ± 17.88	<b>219.18 ± 5.22<sup>aa, b</sup></b>	272.32 ± 17.33	319.69 ± 24.64
<b>Módulo de Young (GPa)</b>	14.76 ± 1.25	<b>11.79 ± 0.25<sup>aa, b</sup></b>	15.79 ± 0.43	18.20 ± 1.52

Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup>  $p < 0.05$  e  $p^{aa} < 0.01$  comparado com o grupo STZ+OVX; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparado ao grupo STZ.

A resistência mecânica avaliada respetivamente pela tensão de cedência e tensão máxima, foi correlacionada com os resultados dos marcadores do turnover ósseo (CTX; P1NP e P1NP/CTX) de todos os grupos estudados, tendo revelado a existência de uma correlação positiva apenas para o grupo dos animais STZ (**Tabela 5.07**).

Estes resultados indicam que a maior formação óssea que ocorre nestes animais, conferindo-lhes uma relação P1NP/CTX superior à dos animais normoglicémicos, está de alguma forma implicada na maior resistência que o seu osso cortical apresenta à fratura, quando submetido a uma força externa.

**Tabela 5.07** Correlação dos parâmetros biomecânicos com os marcadores bioquímicos de remodelação óssea (Spearman test).

Correlação	CTX	P1NP	P1NP/CTX
Tensão de cedência	-	STZ(+0,801)	STZ(+0,931)
Tensão máxima	-	C(-0,782)	STZ(+0,801)
Extensão máxima	-	-	-
Módulo de Young	-	-	-

#### 5.4. Discussão e conclusão

Muitos estudos têm investigado a relação entre a diabetes e a osteoporose (Schwartz, *et al.*, 2011; Giangregorion, *et al.*, 2012; Farr, Drake, Amin, Melton, McCready, & Khosla, 2014), e diferentes teorias têm sido propostas, contudo, o mecanismo pelo qual a diabetes aumenta o risco de fraturas ósseas, independente do valor da DMO, ainda não foi completamente identificado.

Alguns autores propõem que o aumento do risco de fraturas encontrado nos doentes com DM2 possa ser devido a outros factores, tais como: as alterações na geometria óssea ou na microarquitetura do osso que comprometem a resistência óssea mas que não se refletem nos valores da densitometria óssea (DMO), que muitas vezes se encontram aumentados (Pritchard, *et al.* 2012).

Assim sendo, embora muito divulgada e utilizada na prática clínica a DMO, não apresenta a especificidade e sensibilidade requeridas para calcular o risco de fratura óssea nos doentes diabéticos sendo importante conhecer a fisiopatologia e principais alterações estruturais do osso nesta condição patológica, não só para identificar melhor o risco de fratura mas sobretudo para poder intervir na sua prevenção e tratamento (Karim & Bouxsein, 2016).

Atualmente, existem cada vez mais evidências de que a hiperglicemia possa comprometer a ultraestrutura e a competência biomecânica do osso (Saito, M. & Marumo, K., 2010) e estar assim, na origem do aumento do risco de fratura na diabetes (Starup-Linde & Vestergaard, 2015).

Neste trabalho, começámos por estudar os efeitos da hiperglicemia crónica sobre a qualidade do osso trabecular (histomorfometria) e cortical (morfologia, composição química e propriedades biomecânicas), bem como nos marcadores séricos de remodelação óssea e nos níveis de cálcio, usando para isso ratos fêmeas normo e hiperglicémicos que foram submetidos a ovariectomia. O estado hiperglicémico crónico no rato foi obtido pela degeneração das células beta dos ilhéus de Langerhans, induzida por uma dose única de streptozotocina (STZ), (Akbarzadeh, *et al.*, 2007).

Para avaliar os efeitos da hiperglicemia crónica na qualidade óssea foram estudados diferentes parâmetros de acordo com os grupos estudados: Controlo normoglicémico (C), ovariectomizado (OVX), hiperglicémico (STZ) e hiperglicémico ovariectomizado (STZ+OVX).

Os resultados dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos em amostras de soro do modelo de rato hiperglicémico mostraram, como seria de esperar, níveis significativamente mais elevados de glicemia e de triglicéridos e um aumento do volume urinário e do peso corporal, comparados com os dos animais saudáveis. Este modelo animal, por não apresentar resistência à insulina, induzida, por exemplo, por uma dieta rica em gordura (Skovso, 2014), permitiu a avaliação do impacto da hiperglicemia crônica induzida apenas pela redução de insulina, na qualidade óssea, excluindo, em parte, a interferência de outros fatores metabólicos complexos presentes na DM2, associados à ausência de resposta celular à insulina.

Na análise dos marcadores de remodelação óssea, não foram observadas diferenças significativas do marcador de reabsorção óssea – CTX, no grupo de animais hiperglicêmicos relativamente aos animais do grupo controlo. Contudo, verificou-se um aumento do marcador de formação óssea - P1NP, observando-se também um aumento da razão P1NP/CTX, nos animais hiperglicêmicos em comparação com os animais normoglicêmicos, o que sugere que a hiperglicemia crônica induziu a remodelação óssea, com prevalência de formação de colagénio tipo 1. Estes resultados estão de acordo com os encontrados num estudo recente realizado *in vitro* (Cunha, Ferreira, Maquigussa, Naves, & Boim, 2014) que demonstrou que quando sujeitos a níveis elevados de glucose ou ao aumento da pressão osmótica (com manitol), os osteoblastos aumentam cerca de 12 vezes a secreção de colagénio do tipo 1, que resulta num aumento da produção da matriz orgânica do osso.

Contudo, os estudos histomorfométricos efetuados no osso trabecular vertebral (L4), que avaliaram, entre outros parâmetros, a espessura trabecular dos ossos desses animais, não revelaram alterações deste parâmetro comparativamente ao grupo controlo, tal como foi descrito em estudos anteriores efetuados em rato (Verhaeghe, Suiker, Einhorn, Geusens, Visser, Van Herck, Van Bree, Magitsky & Bouillon, 1994) em oposição ao aumento da espessura trabecular relatada em humanos (Vestergaard, 2007).

A análise do diâmetro do osso cortical da tíbia dos animais hiperglicêmicos também não demonstrou a existência de diferenças significativas relativamente aos animais normoglicêmicos.

Os resultados da análise química do cálcio, por absorção atômica, revelaram que a fração da excreção de cálcio e a depuração urinária de cálcio aumentaram enquanto o teor de cálcio no osso femoral diminuiu nos animais hiperglicêmicos. Estes resultados estão de acordo com o observado por outros autores (McNair, Madsbad, Christensen, Christiansen, Faber, Binder, & Transbøl, 1979), nos doentes diabéticos, e com os ensaios *in vitro* que reportam uma deficiente mineralização óssea revelada pela

diminuição da fosfatase alcalina óssea em cerca de 50%, produzida pelos osteoblastos quando sujeitos a um meio muito rico em glucose (Cunha, Ferreira, Maquigussa, Naves, & Boim, 2014).

No entanto, os estudos morfológicos do osso cortical das tíbias, realizados por microscopia eletrônica, revelaram, nos animais hiperglicêmicos, uma estrutura óssea preservada mas com um aumento do número e tamanho das lacunas ósseas e um aumento significativo do canal medular quando comparados com os controles. Por outro lado, a rigidez mecânica e força do osso femoral dos animais hiperglicêmicos não foram afetadas em comparação com os animais do grupo controle. Contudo, a força mecânica (avaliada pela tensão de cedência e pela tensão máxima) do osso femoral dos animais hiperglicêmicos, correlacionou-se positivamente com as mudanças observadas dos marcadores da remodelação óssea.

O efeito da diabetes na força e na rigidez do osso ainda está por esclarecer. Alguns autores sustentam que a diabetes provoca um aumento da rigidez (Einhorn, Boskey, Gundberg, Vigorita, Devlin & Beyer, 1988). Enquanto outros afirmam que se observa uma diminuição da mesma (Verhaeghe *et al.*, 1994; Reddy, Stehno-Bittel, Hamade & Enwemeka, 2001; Funk, Hale, Carmines, Gooch & Hurwitz, 2000). Em ratos diabéticos tipo 1 (com perda de peso) foi observado que a diminuição da rigidez e da força do osso pode ser atribuída a um paragem do crescimento do osso cortical e ao menor tamanho da sua secção transversal (Silva, Brodt, Lynch, Mckenzie, Tanoye, Nyman, & Wang, 2009). Por outro lado, um estudo efetuado num modelo animal de rato, que simula a diabetes tipo 2 (Zucker diabetic Sprague Dawley model), evidenciou alterações da nanoestrutura do colagénio tipo I que induzem uma mudança conformacional do mesmo, bem como alterações mecânicas, como o aumento da resistência à deformação plástica (Hammond, Gallant, Burr, & Wallace, 2014)

Neste trabalho, observou-se um aumento da remodelação óssea nos ratos hiperglicêmicos, indicando um aumento significativo na formação de osso versus reabsorção óssea. Como consequência da remodelação óssea, as fibras colagénicas alinham-se na mesma direção ao longo dos pontos de carga o que poderá explicar o aumento da resistência mecânica que se observa (Caetano-Lopes *et al.*, 2010).

É sabido, que embora os dois tipos de diabetes (DM1 e DM2) se caracterizem pela existência de hiperglicemia, as duas formas de doença têm efeitos diferentes na estrutura e nas propriedades biomecânicas do osso (Hough, Pierroz, Cooper, Ferrari, & The IOF CSA Bone and Diabetes Working Group, 2016; Starup-Linde & Vestergaard, 2015). Uma possível explicação para a existência de tais diferenças poderá ter a ver com os níveis de glicemia que são mais elevados na DM1 com as alterações do peso

corporal, que aumenta na DM2 e diminui na DM1 (Silva, Brodt, Lynch, Mckenzie, Tanoye, Nyman, & Wang, 2009). Além disso, acredita-se que a glicolisação do colagénio e o aumento dos produtos de glicolisação avançada (AGE), que não foram quantificados neste estudo, poderão ter um papel relevante nas mudanças ultraestruturais do osso, observadas nos doentes DM1 e DM2 bem como nos modelos animais (Wongdee & Charoenphandhu, 2011; Reinwald, Peterson, Allen, & Burr, 2009; Hammond, Gallant, Burr, & Wallace, 2014).

Como o aumento da fragilidade óssea tem sido atribuída aos AGES, podemos pressupor que os AGEs poderão não estar presentes em quantidades relevantes nos ossos dos ratos Wistar tratados com STZ deste estudo. Contudo, num estudo *in vitro*, em osso cortical de bovino, sujeito a incubação num meio rico em ribose, que desencadeou a glicolisação não enzimática do colagénio, também foi observado um aumento do módulo de Young, nos ensaios biomecânicos efetuados, embora não tenham sido observadas alterações na tensão máxima de cedência. (Vashishth, Gibson, Khoury, Schaffler, Kimura, & Fyhri, 2001).

O sucesso da ovariectomia efetuada para induzir a osteoporose nos animais dos grupos OVX e STZ+OVX, foi comprovado pelos níveis séricos de E2 que se encontravam abaixo do limite de deteção da técnica usada no seu doseamento, em oposição aos níveis elevados observados nos animais controlo e STZ.

O peso corporal destes animais também aumentou significativamente em relação ao dos animais do grupo controlo, tal como foi observado noutros estudos (Kalu, 1991; Zhao, Zhang, Shen, Qi, Wang, Qian, & Deng, 2013). Como se esperava, os animais ovariectomizados mostraram também uma diminuição do osso cortical e trabecular. Resultados similares foram obtidos em mulheres pós-menopausa, onde a osteoporose induz a diminuição da espessura trabecular e cortical (Seeman, 2008) e também em modelos animais (Muhammad, Luke, Shuid, Mohamed, & Soelaiman, 2012; Zhao, Zhang, Shen, Qi, Wang, Qian, & Deng, 2013). Contrariamente, não foi observado no osso trabecular e cortical dos animais hiperglicémicos ovariectomizados (STZ+OVX) perda significativa de osso quando os dados histomorfométricos das vértebras e a espessura da tíbia foram comparados com os dos animais do grupo controlo, tal como foi também descrito em mulheres com DM2 na pós-menopausa (Farr, Drake, Amin, Melton III, McCready, & Khosla, 2014).

Para além disso, os estudos morfológicos do osso cortical efetuados por microscopia eletrónica, revelaram que os animais STZ+OVX apresentavam uma microarquitetura óssea melhor preservada do que os animais do grupo OVX. Estes resultados sugerem que, pelo menos em ratos, os ossos de indivíduos com hiperglicemia crónica e deficiência em estrogénios estão mais protegidos relativamente

à perda de massa óssea que ocorre como resultado da ausência de estrogénios que caracteriza a osteoporose pós-menopausa. Estes dados podem explicar os níveis de DMO mais elevados observados nas mulheres diabéticas pós-menopausa, quando comparados com os das não diabéticas (Vestergaard, 2007). Resultados similares foram obtidos recentemente num estudo *in vivo* efetuado em mulheres com DM2 na pós-menopausa. Neste estudo, as mulheres diabéticas apresentavam um aumento da DMO ao nível regional, da espessura do osso cortical da tíbia e do rádio, bem como do osso trabecular vertebral, mas também apresentavam uma diminuição dos marcadores de remodelação óssea (CTX e P1NP, embora apresentassem uma razão P1NP/CTX aumentada, bem como um aumento significativo da porosidade do osso cortical, avaliada por técnica de microidentação, no rádio. (Farr, Drake, Amin, Melton III, McCready & Khosla, 2014).

Também o osso femoral dos animais hiperglicémicos ovariectomizados mostrou ter uma rigidez e uma resistência mecânica mais elevada (avaliada pelo módulo de Young), que foi significativa quando comparada à dos animais ovariectomizados.

Baseando-nos nos resultados do osso trabecular, osso cortical, formação de colagénio e biomecânica óssea (rigidez e resistência à fratura), poderá concluir-se que a hiperglicemia crónica afeta positivamente os ossos dos ratos deficientes em estrogénios. Doentes osteoporóticos tiveram piores propriedades mecânicas, avaliada pelo módulo de Young e pela tensão de cedência quando comparados aos controlos saudáveis (Ciarelli, Fyhrie, Schaffler, & Goldstein, 2000). O mesmo foi observado em ratos (Zhao, Zhang, Shen, Qi, Wang, Qian, Deng, 2013). No nosso estudo, as propriedades biomecânicas do fémur dos animais ovariectomizados foram negativamente afetadas embora sem significado estatístico, relativamente ao controlo saudável. Estes resultados corroboram com os dados da microscopia eletrónica que revelaram a existência de várias microfissuras, áreas reabsortivas e um número maior de lacunas no osso da tíbia dos animais ovariectomizados. Notou-se também que, os fémures de animais normais e hiperglicémicos ovariectomizados estavam menos mineralizados (com menos cálcio) que os fémures dos animais saudáveis.

Os nossos resultados sugerem que a hiperglicemia crónica provoca uma modificação da microarquitetura óssea originando estruturas menos frágeis, quer pelo aumento de dimensão do canal medular ósseo que afasta a matriz cortical do eixo interno do osso quer pelo aumento da formação do colagénio tipo 1. Estas modificações volumétricas aumentam a resistência do osso à fractura (Seeman, 2015). A hiperglicemia crónica induz também a desmineralização do osso cortical. Podemos assim especular que no osso exposto a níveis cronicamente elevados de glucose, o aumento das lacunas no osso cortical conduz, a longo prazo, ao aumento significativo

da sua porosidade que localizada longe do eixo central do osso pode levar à diminuição da resistência do mesmo (Pritchard JM.2013) o que pode ser acentuado pela perda de cálcio.

Este mecanismo poderá explicar, pelo menos em parte, o facto dos doentes diabéticos que apresentam maior porosidade cortical terem maior probabilidade de vir a ter fraturas por fragilidade. Por outro lado a matriz de colagénio recém-formada poderá também vir a acumular AGEs o que poderá a longo prazo contribuir também para o aumento da fragilidade do osso.

### **Conclusão:**

A hiperglicemia crónica modula a microarquitetura óssea, em estruturas menos frágeis mesmo na ausência de estrogénio induzida por ovariectomia. Estes resultados contribuem para melhor compreender as incongruências relatadas em diferentes estudos realizados em mulheres diabéticas pós-menopausa.

Contudo, serão necessários mais estudos para clarificar o mecanismo fisiopatológico que está na base da alteração estrutural do osso, observada na DM2, de modo a que se possam desenvolver estratégias para a identificação precoce da doença óssea associada a esta condição patológica, bem como para o desenvolvimento de novas abordagens e estratégias terapêuticas.

## **CAPÍTULO-6**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA, DO SUPLEMENTO DE CARBONATO DE CÁLCIO (PÓ DE CONCHA DE OSTRAS) E GOMA GUAR, NO TRATAMENTO / PREVENÇÃO DA OSTEOPOROSE.**

## **6. Avaliação da eficácia e segurança, do suplemento de carbonato de cálcio (pó de concha de ostra) e goma guar, no tratamento/prevenção da Osteoporose.**

### **6.1. Introdução/Objetivos**

A suplementação com cálcio, apesar de recomendada na prevenção da fratura óssea em indivíduos saudáveis bem como na osteoporose associada ao envelhecimento e à menopausa (Nieves, 2005) é assunto controverso. Sobretudo por motivos de segurança decorrentes da deposição de cálcio extra-ósseo, nomeadamente na parede vascular e no rim. A Osteoporose tem uma prevalência estimada de 200 milhões de pessoas a nível mundial (Kanis, 2007), sendo que uma em cada 3 mulheres e um em cada 5 homens com mais de 50 anos sofrerá fractura devido à osteoporose (Melton,1992; Melton, 1998; Kanis *et al.*, 2000). Na Europa, em 2010 a osteoporose atingia mais de 27 milhões de pessoas e estima-se que aumente 23% até 2025 atingindo perto de 34 milhões de pessoas (Hernlund,2013). O estudo EpiReumaPT (Rodrigues *et al.*, 2014) revelou uma prevalência de osteoporose em 10.2% da população portuguesa e a nível Europeu Portugal é o quinto país com menor incidência de fractura da extremidade proximal do fémur (Hernlund, 2013), com uma ocorrência anual de 9500 destas fracturas por fragilidade óssea (Branco, 2009). O elevado número de fracturas e morbilidades associadas à osteoporose tem um grande impacto não só nos gastos em saúde, com estimativas de custo superiores a 35 biliões/ano na Europa (Hernlund, 2013), como também na produtividade desta população profissionalmente ativa e dos seus familiares-cuidadores.

Face ao exposto, a formulação dos suplementos de cálcio bem como a dose a utilizar para obter benefícios ao nível do esqueleto sem causar efeitos adversos é um assunto importante. Problemas de segurança nas doses recomendadas (1-1.2 g) de suplemento de cálcio justificam a avaliação da sua eficácia em doses mais baixas. Por este motivo, um dos objetivos deste estudo foi testar o efeito, no osso femoral e vertebral, de ratos fêmeas deficientes em estrogénios, de uma dose de cálcio equivalente a um quinto do limite máximo diário recomendado na mulher pós-menopausa, um terço da dose de suplementação praticada atualmente (1.2 g/dia), isto é 420 mg/dia.

O outro objetivo deste estudo foi avaliar a segurança da administração desta formulação de cálcio, através de estudos histológicos efetuados nos órgãos onde este mais se deposita, vasos sanguíneos, rim e fígado.

Como fonte de cálcio recorreu-se à concha-de-ostra com base em estudos que demonstram que o  $\text{CaCO}_3$  destas conchas (900 mg/dia de cálcio) aumenta a densidade mineral óssea (DMO) em animais e em mulheres com osteoporose (Fujita *et al*,1993; Omi & Ezawa,1993) e como adjuvante da absorção de cálcio adicionou-se goma Guar com base em evidências que sugerem que esta fibra solúvel favorece a absorção de cálcio em ratos gastroesterectomizados (Hara, Suzuki, Kasai, Aoyama, & Ohta,1999).

## 6.2. Material e Métodos

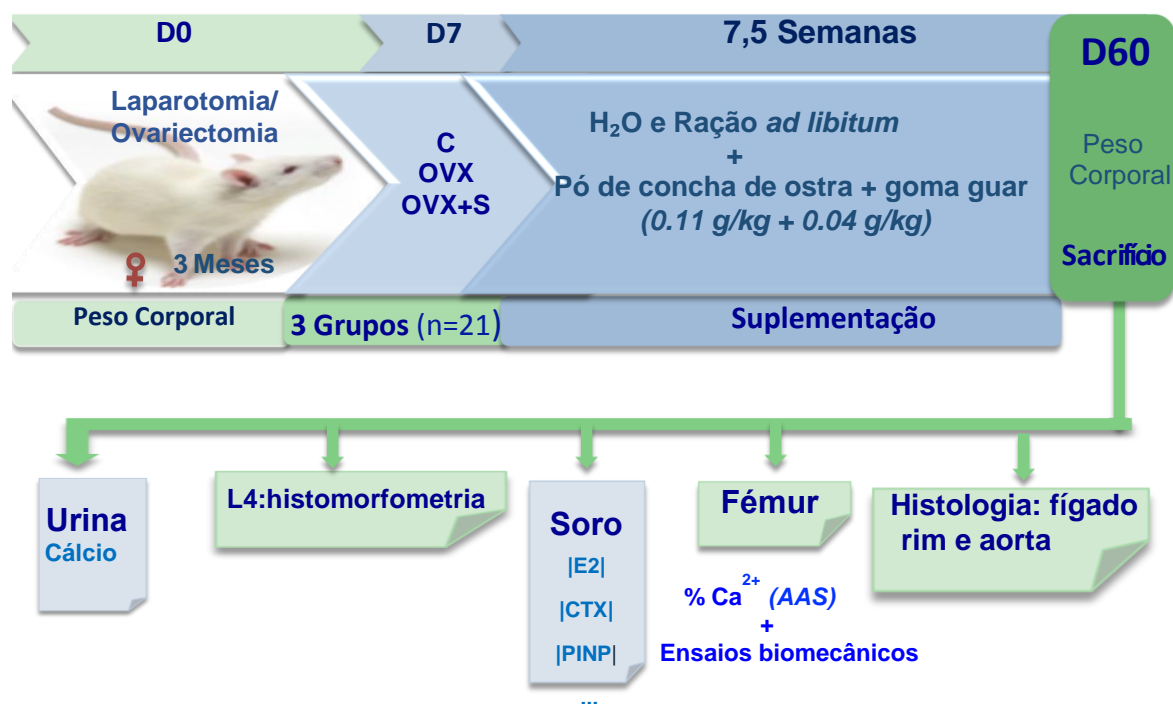
### 6.2.1 Modelo experimental

Esta fase do trabalho foi em tudo igual à descrita no capítulo 5 com exceção do facto de se terem utilizado apenas animais normoglicémicos divididos em 2 grupos de 7 animais cada um (C; OVX) e um grupo de animais normoglicémicos ovariectomizados (OVX+S), que foi suplementado diariamente com pó de concha de ostra e goma guar, nas doses respectivamente de 105 mg/Kg e 43 mg/Kg, durante 53-dias (dose equivalente humana de 420 mg/dia de cálcio e 414 mg/dia de guar).

A dose de pó de concha de ostra administrada, contém uma dose de cálcio equivalente a 43,6 mg/Kg/dia. Esta dose equivale á suplementação no homem de 7.0 mg/Kg/dia de cálcio elementar. A dose de goma guar utilizada corresponde a uma dose humana de 6.9 mg/Kg/dia. A dose de suplementação e a duração da mesma foram definidas tendo por base outros estudos (Kalu, 1991; Hara, Susuki, Kasai, Aoyama & Ohta,1999). Quer a dose de cálcio quer a de goma guar foram ajustadas para o rato tendo por base o fator de conversão da FDA (2005). Os animais não suplementados, ingeriram, durante o mesmo período, uma pellet idêntica constituída apenas com ração comercial standard 4RF21-GLP. Durante todo o período experimental os animais foram alojados em gaiolas individuais e alimentados com ração comercial (4RF21 LPG, Mucedola Srl, Milan, Italy) e água desionizada *ad libitum*.

No final da suplementação (D60) avaliaram-se: o peso corporal, biomarcadores séricos, histologia e depósitos tecidulares de cálcio (Von Kossa), cálcio femoral e calciúria (absorção atómica); biomecânica do fémur (curvas de tensão/extensão); histomorfometria vertebral (L4) e a espessura e morfologia do osso cortical por análise de cortes da tibia por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). As técnicas usadas foram já descritas no capítulo IV Material e métodos.

O desenho experimental utilizado está esquematizado na **Fig.6.01**.



**Figura 6.01** Desenho experimental utilizado para os estudos dos animais suplementados com cálcio e goma guar.

### 6.3. Resultados

#### 6.3.1. Análise da composição do pó de concha de ostra e possíveis contaminantes

Existem numerosas informações científicas relativamente aos teores de metais pesados na parte edível do género *Crassostrea*, bem como de outros bivalves (Pereira *et al.*, 2002, Huanxin *et al.*, 2000, Florence *et al.*, 1994, Ashton, 1991). No entanto, tanto quanto se sabe, para a concha deste molusco, os dados não se encontram ainda facilmente disponíveis para consulta especialmente no que diz respeito à caracterização da concha da ostra portuguesa. Verifica-se ainda que os teores máximos que devem ser aplicados para os produtos da Pesca para efeitos de Saúde Pública, são ainda insuficientes, uma vez que somente existem valores de referência para o Cd, Pb e Hg para os bivalves (**Tabela 6.01**) na legislação da União Europeia (U.E.).

**Tabela 6.01.** Teores máximos de metais pesados que devem ser aplicados para os bivalves para efeitos de Saúde Pública (mg/kg peso fresco) de acordo com o Regulamento (CE) nº 1881/ 2006 de 19 de Dezembro <sup>(1)</sup> e Regulamento (CE) nº 629/2008 de 2 de Julho<sup>(2)</sup>.

Entidade competente	Metais		
	Cd (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Hg (mg/kg)
UE	1,0 <sup>(1),(2)</sup>	1,5 <sup>(1)</sup>	0,50 <sup>(*)</sup>

(\*) Produtos da pesca e parte comestível da maioria dos peixes. O regulamento não especifica os teores máximos de Hg para os bivalves.

Relativamente às análises efetuadas, não foram detetados no pó de concha de ostra utilizado, os metais As, Hg, Cd, Co, Sn e Cu pelo facto dos seus valores serem inferiores aos limites de deteção, respetivamente de 0,32µg/L, 1,232µg/L, 0,032mg/L, 0,081mg/L, 0,430mg/L e 0,041mg/L.

A análise química do pó de conchas de ostras mostrou ainda, que a amostra é composta predominantemente por carbonato de cálcio numa proporção de 97,3% e que a concentração de cálcio elementar nesse sal é de 40% (**Tabela 6.02**).

**Tabela 6.02.** Composição química maioritária do pó de conchas de ostras, espécie *Crassostrea gigas*.

Local de amostragem	Espécie	CaCo <sub>3</sub> (%)	MgO (%)	P <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	Na <sub>2</sub> O (%)	K <sub>2</sub> O(%)
Sapalsado	<i>Crassostrea gigas</i>	97,3	0,5	0,0	2,0	0,1

### 6.3.2. Análise da composição em cálcio da ração

Foi analisado o lote da ração administrada aos animais durante o estudo, pelo mesmo método usado para a determinação do cálcio no pó de conchas de ostras,

descrito anteriormente. A determinação analítica revelou um teor de cálcio presente na ração na ordem de 7186 mg/kg.

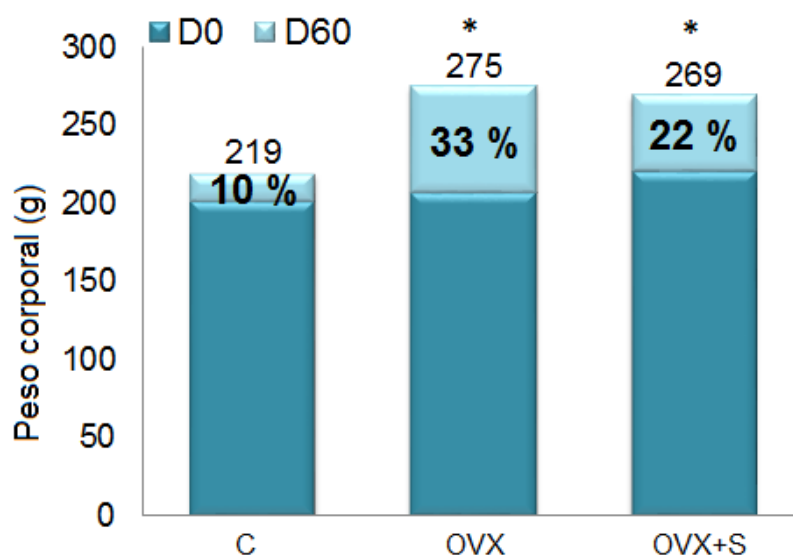
### 6.3.3. Parâmetros fisiológicos antes do sacrifício

O peso corporal dos animais dos três grupos estudados, foi registrado no início do estudo (D0) e no final do mesmo (D60) (**Tabela 6.03**). O mesmo não apresentava diferenças significativas entre os animais dos 3 grupos no D0, o que era de esperar dado que os animais foram aleatoriamente divididos, mas aumentou respetivamente 10%, 33% e 22% no grupo controlo, ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado suplementado (OVX+S) após os dois meses de estudo (D60) (**Fig.6.02**)

**Tabela 6.03** Peso corporal dos animais estudados: n=7; Controlo saudável (controlo), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado suplementado (OVX+S).

Variável	Controlo	OVX	OVX+S
Peso corporal (g) no D0	200.31 ± 5.92	206.57 ± 6.53	220.41 ± 11.06
Peso corporal (g) no D60	218.49± 4.97	<b>274.74 ± 9.98<sup>aa</sup></b>	<b>268.88 ± 6.77<sup>aa</sup></b>

Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>aa</sup>p<0.01 comparado ao controlo.



**Figura 6.02** Evolução do peso corporal dos grupos de animais estudados: C-controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7) e OVX+S- ovariectomizado suplementado (n=7). \*p<0,05, comparado ao controlo.

### 6.3.4. Parâmetros bioquímicos

#### 6.3.4.1. Parâmetros bioquímicos séricos e urinários

Os níveis séricos de E2 de ambos os grupos ovariectomizados encontravam-se abaixo do limite de detecção (11.8 pg/ml).

Os níveis séricos de glucose, triglicéridos, colesterol total, LDL e HDL não mostraram diferenças significativas entre os grupos de animais no final do estudo, mas a calcemia diminuiu 6% nos animais ovariectomizados ( $p < 0.05$ ) enquanto que nos animais ovariectomizados suplementados apenas diminuiu 5% comparativamente aos animais saudáveis.

O aumento da diurese observado nos animais ovariectomizados não foi estatisticamente diferente entre os grupos, e a hiper calciúria registada em ambos os grupos ovariectomizados foi apenas significativa ( $p < 0,01$ ) nos animais ovariectomizados não-suplementados. O rácio calciúria/calcemia confirma a maior excreção de cálcio em ambos os grupos ovariectomizados, cerca do dobro da observada nos animais saudáveis (controlo) sendo novamente apenas significativa ( $p < 0,01$ ) no grupo ovariectomizado não-suplementado. Contudo a depuração do cálcio foi equivalente nos animais ovariectomizados.

Na **tabela 6.04** apresentam-se os marcadores bioquímicos analisados no soro e na urina de 12h, de cada grupo de animais estudados.

**Tabela 6.04** Marcadores bioquímicos dos grupos de animais estudados: Controlo, ovariectomizado (OVX), ovariectomizado suplementado (OVX+S); n=7 para todos os grupos.

Variáveis	Controlo	OVX	OVX+S
E2 (pg/mL)	16.5 ± 2.6	< DL	< DL
Glicemia (mg/dL)	66.0 ± 15.2	87.3 ± 8.8	88.2 ± 7.8
Triglicéridos (mg/dL)	31.3 ± 2.3	34.3 ± 3.7	36.5 ± 4.1
Colesterol (mg/dL)	84.6 ± 3.8	97.0 ± 4.8	97.4 ± 3.7
HDL (mg/dL)	39.3 ± 2.5	45.3 ± 2.9	44.3 ± 1.1
LDL (mg/dL)	38.2 ± 3.2	49.1 ± 5.6	44.4 ± 4.0
Calcemia (mg/dL)	10.5 ± 0.2	<b>9.8 ± 0.1<sup>a</sup></b>	10.0 ± 0.1
Vol. urinário (mL/12h)	3.9 ± 0.8	4.3 ± 0.7	5.2 ± 0.7
Calciúria (mg/dL)	31.5 ± 4.5	<b>65.1 ± 3.3<sup>a</sup></b>	55.3 ± 9.4
Calciúria / Calcemia	3.0 ± 0.5	<b>6.7 ± 0.5<sup>aa</sup></b>	5.7 ± 1.2
Depuração do cálcio (mL/min)	0.016±0.002	<b>0.040±0.002<sup>aa</sup></b>	<b>0.040±0.006<sup>a</sup></b>

Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup> p<0.05 <sup>aa</sup>p<0.01 comparativamente ao controlo. DL – Limite de detecção = 11.8 pg/mL.

#### 6.3.4.2. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea

O marcador sérico de reabsorção óssea, CTX, aumentou cerca de 70% em ambos os grupos de animais ovariectomizados (OVX e OVX+S) (p<0.05) comparativamente aos animais saudáveis (controlo). O marcador sérico de formação óssea, P1NP, também aumentou em média 47% em ambos os grupos ovariectomizados (p<0.05) comparativamente aos animais saudáveis (**Fig. 6.03**). Os diferentes valores de rácio P1NP/CTX obtidos para cada um dos grupos, revelam uma diminuição de 12.5% e 19% respectivamente nos grupos ovariectomizados suplementados ou não

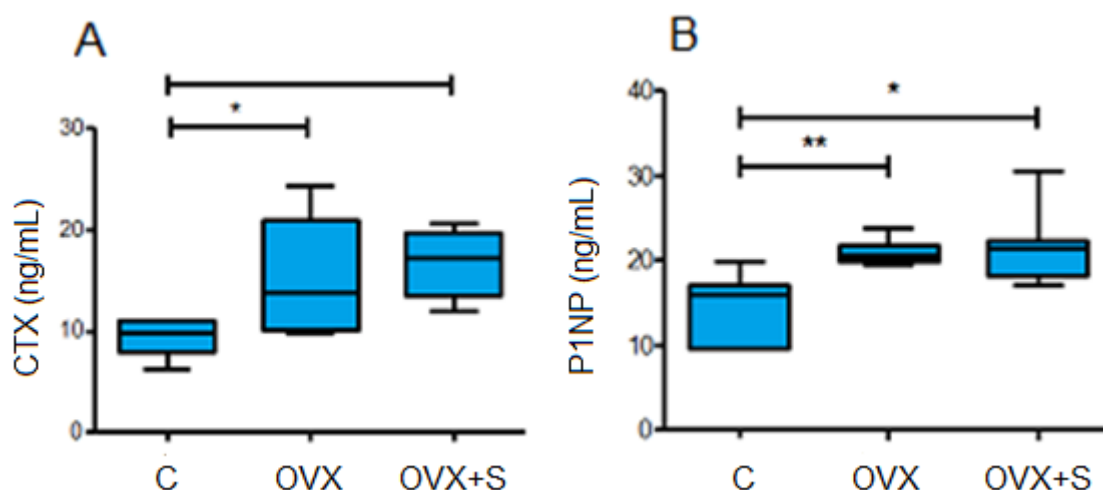
comparativamente aos animais saudáveis (controle), respectivamente, mas sem significado estatístico (**Tabela 6.05**).

A reabsorção e formação ósseas foram maiores nos grupos ovariectomizados, indicando um desequilíbrio entre a formação/reabsorção, com um grande incremento especialmente da reabsorção óssea, nos animais ovariectomizados, como seria de esperar.

**Tabela 6.05** Marcadores de remodelação óssea dos grupos de animais estudados: Controle saudável (controle), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado suplementado (OVX+S); n=7 para todos os grupos.

Variáveis	Controle	OVX	OVX+S
CTX (ng/mL)	9.4 ± 0.64	15.4 ± 1.86 <sup>a</sup>	15.4 ± 1.34 <sup>aa</sup>
PINP (ng/mL)	14.7 ± 1.26	21.3 ± 0.61 <sup>aa</sup>	21.4 ± 1.48 <sup>aa</sup>
PINP/CTX	1.57 ± 0.06	1.39 ± 0.11	1.41 ± 0.06

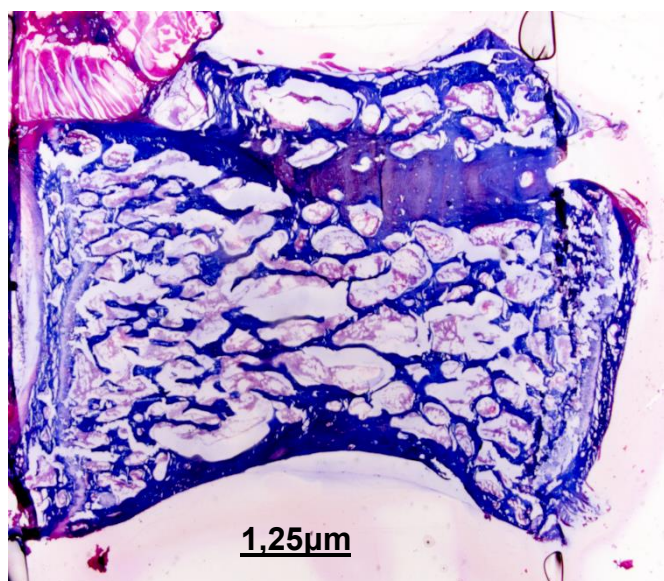
Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup>p<0.05 <sup>aa</sup>p<0.01 comparativamente ao controle.



**Figura 6.03** Gráfico A) CTX (serum C-terminal telopeptide of type 1 collagen) e B) P1NP (N-terminal propeptides of procollagen type I) - dos grupos dos animais estudados: C- controle, OVX-ovariectomizado, OVX+S – ovariectomizados suplementados. O nível de significância foi (\*p<0.05) e (\*\*p<0.01).

#### 6.4. Histomorfometria óssea da quarta vértebra lombar (L4)

A espessura trabecular do osso vertebral (L4) dos ratos ovariectomizados sofreu uma redução de -18% ( $p < 0.01$ ) e a distância trabecular aumentou cerca de +22% ( $p < 0.05$ ), quando comparada com a dos animais saudáveis (**Tabela 6.06**). Adicionalmente verificou-se uma diminuição significativa da área trabecular nos animais ovariectomizados comparada à dos animais saudáveis (-27%,  $p < 0.01$ ). Estes resultados confirmam a osteoporose que ocorreu em consequência da ovariectomia. No caso dos animais suplementados com cálcio, estes apresentam uma arquitetura óssea semelhante à dos animais ovariectomizados (**Fig.6.04**) que não foram suplementados e diferente dos animais saudáveis o que está de acordo com os resultados dos marcadores de remodelação óssea que também são semelhantes nestes dois grupos de animais (**Tabela 6.05**).



**Fig.6.04** Exemplo de imagem de um corte transversal do osso vertebral (L4) de um animal do grupo OVX+S, usada para avaliação quantitativa dos parâmetros histomorfométricos

**Tabela 6.06** Medições da vértebra lombar (L4), por microscopia eletrónica de varredura.

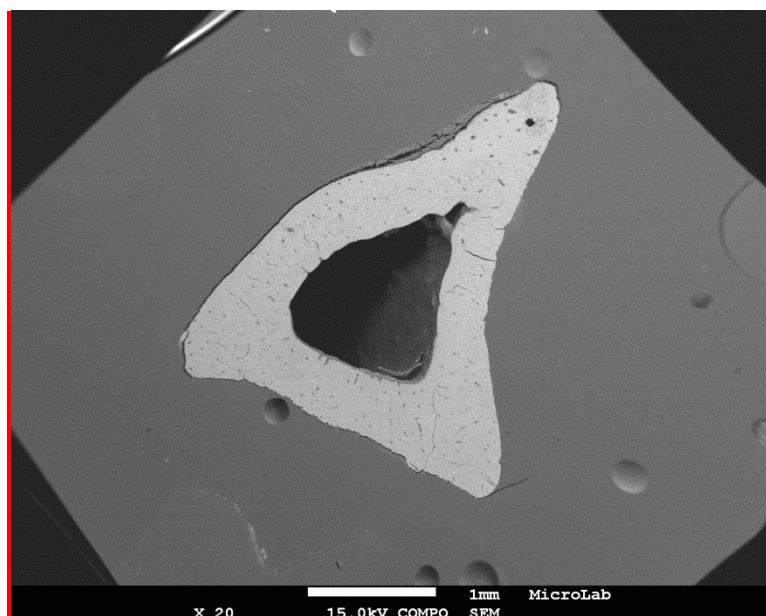
Variáveis	Controlo	OVX	OVX+S
Área trabecular ocupada BV/TV (%)	46.34 ± 1.66	<b>34.00 ± 1.39<sup>a</sup></b>	<b>35.89 ± 2.28</b>
Espessura trabecular Tb.Th (µm)	107.20 ± 1.63	<b>88.36 ± 3.07<sup>aa</sup></b>	<b>92.45 ± 2.17<sup>a</sup></b>
Separação trabecular Tb.Sp (µm)	153.62 ± 6.19	<b>187.05 ± 9.09<sup>a</sup></b>	<b>189.05 ± 13.30</b>

Os resultados são valores médios ± erro padrão; n=6 para os grupos controlo (C); n=7 para OVX e OVX+S; <sup>a</sup> p<0.05; <sup>aa</sup> p<0.01 comparado ao controlo.

## 6.5. Parâmetros estruturais da tíbia

### 6.5.1. Espessura cortical óssea da tíbia

A análise da espessura cortical do osso da tíbia medida a partir das imagens (SEM) de secções transversais do mesmo, com uma amplificação de 20x (**Fig. 6.05**) mostram uma diminuição significativa da mesma, nos animais ovariectomizados quando comparada á dos animais do grupo controlo (p<0.05). Contudo, nos animais ovariectomizados que foram suplementados não se observaram alterações significativas da espessura cortical do osso tibial quando comparadas com as dos animais do grupo controlo (**Tabela 6.07**).



**Figura 6.05** Corte transversal do osso cortical da tíbia de um animal OVX+S, obtida por SEM, com uma ampliação de 20X.

**Tabela 6.07** Espessura do osso cortical (tíbia) avaliada em 12 pontos nos grupos de animais estudados. Controlo (C), OVX e OVX+S; n=6 por grupo.

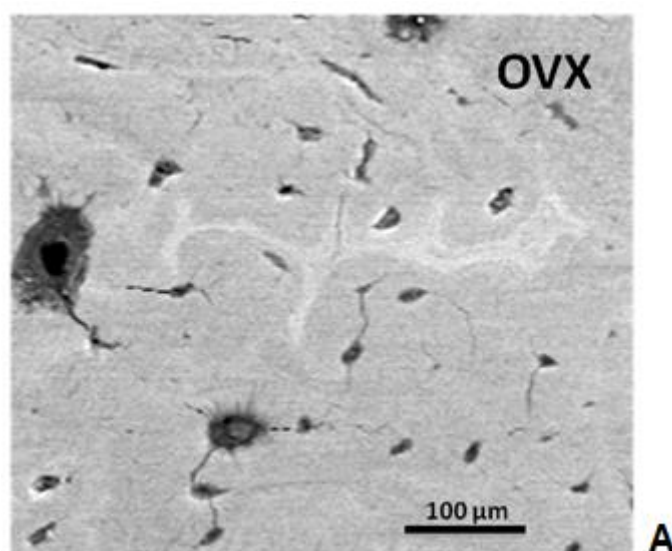
Variáveis	C	OVX	OVX+S
Espessura do osso cortical (mm)	0.636 ± 0.010	<b>0.592 ± 0.014<sup>a</sup></b>	0.622 ± 0.016

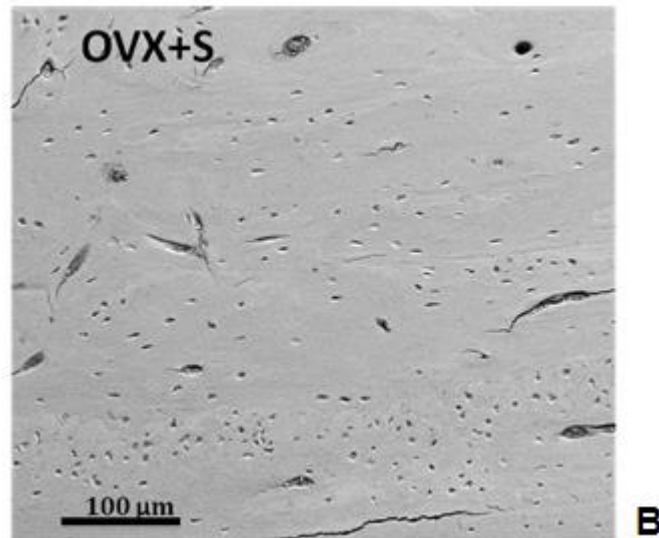
Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup> p<0.05; comparado ao controlo.

### 6.5.2. Avaliação da microestrutura do osso cortical

A avaliação qualitativa da microscopia eletrónica das seções longitudinais da tíbia dos animais ovariectomizados evidenciou o aumento do número de lacunas/osteócitos, bem como o aumento do número de áreas em reabsorção e a presença de numerosas microfissuras. (**Fig. 6.06-A**). Estes resultados evidenciam as alterações da microestrutura óssea cortical que ocorreram na sequência da ausência de estrogénios, que contribuem para o aumento da fragilidade destes ossos.

As imagens dos cortes do osso cortical da tíbia dos animais ovariectomizados que foram suplementados com cálcio, permitem observar que nestes animais o interstício ósseo está melhor preservado, apresentando um menor número de lacunas e de microfissuras, quando comparado com o osso dos animais não suplementados (**Fig. 6.06-B**).



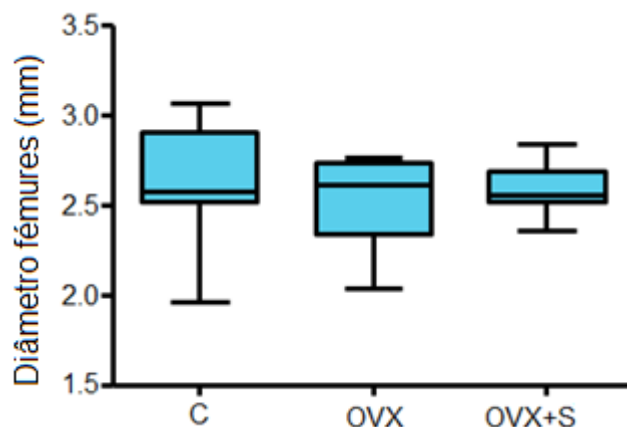


**Figura 6.06** - Imagens (SEM), obtidas com ampliação 150x dos cortes longitudinais das tíbias, representativas de cada grupo de animais. Ovariectomizados (OVX) **figura. 6.06-A** e Ovariectomizados suplementados (OVX+S) **figura. 6.06-B**.

## **6.6. Parâmetros físico-químicos avaliados no osso femoral**

### **6.6.1. Diâmetro e peso dos fêmures**

Como seria de esperar observou-se uma redução do diâmetro do fêmur (-2.8%), nos animais ovariectomizados (OVX) embora não se tenha observado uma diferença significativa do mesmo, em comparação com o controlo. Contudo, quando o diâmetro do fêmur é normalizado pelo peso corporal, esta redução torna-se significativa ( $p < 0.001$ ) (-26%) (**Tabela 6.08**) e é acompanhada de uma redução de 3.9% na massa femoral normalizada. Nos animais ovariectomizados suplementados, a redução do diâmetro normalizado do fêmur é atenuada (-1.2%), não é significativa e ocorre sem alteração da massa femoral normalizada quando comparada com a dos animais do grupo controlo (**Tabela 6.08**).



**Figura 6.07** Gráfico diâmetro dos fêmures dos animais estudados: C-controlo (n=7); OVX-ovariectomizado (n=7) e OVX+S-ovariectomizado suplementado (n=7),  $p < 0.05$ .

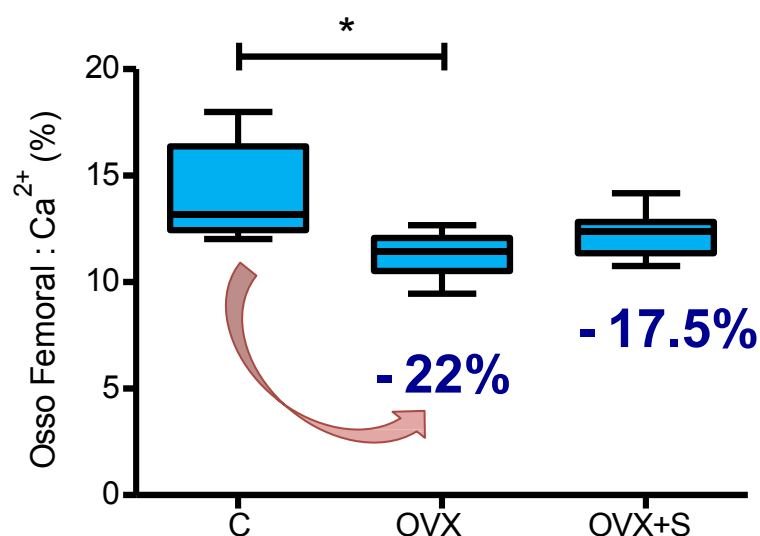
**Tabela 6.08** Parâmetros físicos do fêmur; n=7 por grupo.

Variáveis	Controlo	OVX	OVX+S
Diâmetro (mm)	2.61 ± 0.13	2.54 ± 0.10	2.58 ± 0.15
Diâmetro fêmur / peso corporal (µg)	12.60 ± 0.05	<b>9.28 ± 0.04<sup>aaa</sup></b>	<b>9.71 ± 0.03<sup>aa</sup></b>
Peso fêmur (g)	0.59 ± 0.03	<b>0.72 ± 0.03<sup>aa</sup></b>	<b>0.73 ± 0.03<sup>aa</sup></b>
Peso fêmur/Peso corporal (µg/g)	2.68 ± 0.07	2.58 ± 0.05	2.62 ± 0.07

Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup>  $p < 0.05$ , <sup>aa</sup>  $p < 0.01$  <sup>aaa</sup>  $p < 0.001$  comparado ao controlo.

### 6.6.2. Teor em cálcio dos fêmures

O doseamento do teor de cálcio, por espectrofotometria de absorção atômica, revelou uma redução de 22% do conteúdo em cálcio dos fêmures dos animais ovariectomizados ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 6.09**), comparativamente aos animais saudáveis (**Fig. 6.08**). Nos animais ovariectomizados suplementados, a tendência de redução do conteúdo em cálcio do osso femoral foi menor (-17.5%) e sem significado estatístico comparativamente ao teor de cálcio dos fêmures dos animais saudáveis (**Fig. 6.08**).



**Figura 6.08** Gráfico do teor de cálcio dos fêmures dos animais estudados: C - controle (n=7); OVX - ovariectomizado (n=7) e OVX+S - ovariectomizado suplementado (n=7), \*p<0,05.

**Tabela 6.09** Teor em cálcio do fêmur; n=7 por grupo.

Variáveis	Controlo	OVX	OVX+S
Cálcio (%)	14.17 ± 0.86	11.07 ± 0.35 <sup>a</sup>	11.70 ± 0.37

Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup>p<0.05; comparado ao controlo.

### 6.6.3. Propriedades biomecânicas dos fêmures

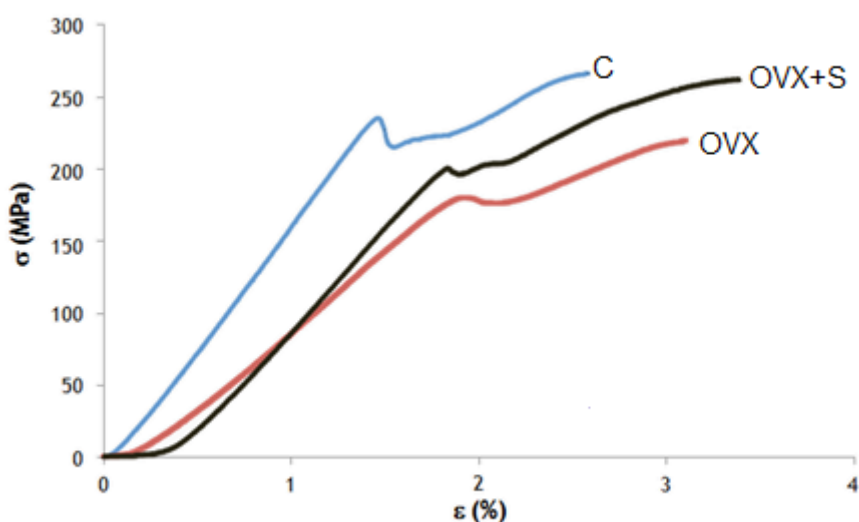
As curvas de tensão – extensão obtidas nos ensaios mecânicos de flexão em três pontos, exemplificadas na (**Fig. 6.09**), foram utilizadas para calcular os parâmetros que caracterizam as propriedades biomecânicas do osso do fêmur (**Tabela 6.10**), nomeadamente tensão de cedência (Yield stress), tensão máxima de fratura (ultimate stress) e rigidez traduzida pelo módulo elástico (Young's module). Os fêmures dos animais ovariectomizados mostraram uma tendência para valores menores das propriedades biomecânicas avaliadas comparativamente às dos fêmures dos animais saudáveis sendo significativa a diferença na rigidez do osso avaliada pelo módulo de Young.

Os fêmures dos animais ovariectomizados suplementados apresentam propriedades mecânicas significativamente superiores comparativamente às dos fêmures dos animais ovariectomizados não-suplementados, nomeadamente: módulo elástico, refletindo maior rigidez ( $p < 0,05$ ); e tensão máxima de fratura ( $p < 0,05$ ) refletindo maior resistência máxima do osso à fratura; a força/resistência mecânica avaliada pela tensão de cedência também aumentou mas não significativamente (**Tabela 6.10**).

**Tabela 6.10.** Propriedades biomecânicas dos fêmures dos grupos de ratos fêmeas estudados: controlo saudável (C), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado suplementado (OVX+S); n=7 por grupo.

Variáveis	Controlo	OVX	OVX+S
Tensão de Cedência (MPa)	191.79 ± 12.39	176.86 ± 3.43	182.29 ± 5.86
Tensão Máxima de Fratura (MPa)	261.14 ± 17.88	<b>219.18 ± 5.22<sup>b</sup></b>	256.20 ± 11.81
Módulo de Young (GPa)	14.76 ± 1.25	<b>11.79 ± 0.25<sup>a,b</sup></b>	14.05 ± 0.48

Os resultados são valores médios ± erro padrão; <sup>a</sup>  $p < 0.05$ ; comparado ao C, <sup>b</sup>  $p < 0.05$ , comparado ao OVX+S



**Figura 6.09** Curvas de tensão-extensão dos seguintes grupos de animais: Controlo- (C); ovariectomizados - (OVX) e ovariectomizados suplementados - (OVX+S).

## 6.7. Análise macroscópica e massa do fígado, rim e coração

O exame macroscópico não revelou alterações nos três órgãos estudados (coração, fígado e rim), em todos os grupos de animais estudados e a massa normalizada do coração revelou ausência de diferenças significativas entre os grupos estudados: animais saudáveis ( $4.8 \pm 0.5$ ), ovariectomizados suplementados ( $4.3 \pm 0.1$ ) e não suplementados ( $4.2 \pm 0.3$ ). Contudo as massas normalizadas do fígado e do rim, foram significativamente menores nos grupos dos animais ovariectomizados (OVX) ( $19.2 \pm 0.6$  e  $5.2 \pm 0.1$ ) e (OVX+S) ( $20.5 \pm 0.6$  e  $4.9 \pm 0.3$ ), quando comparadas com as do grupo controle (**Tabela 6.11**).

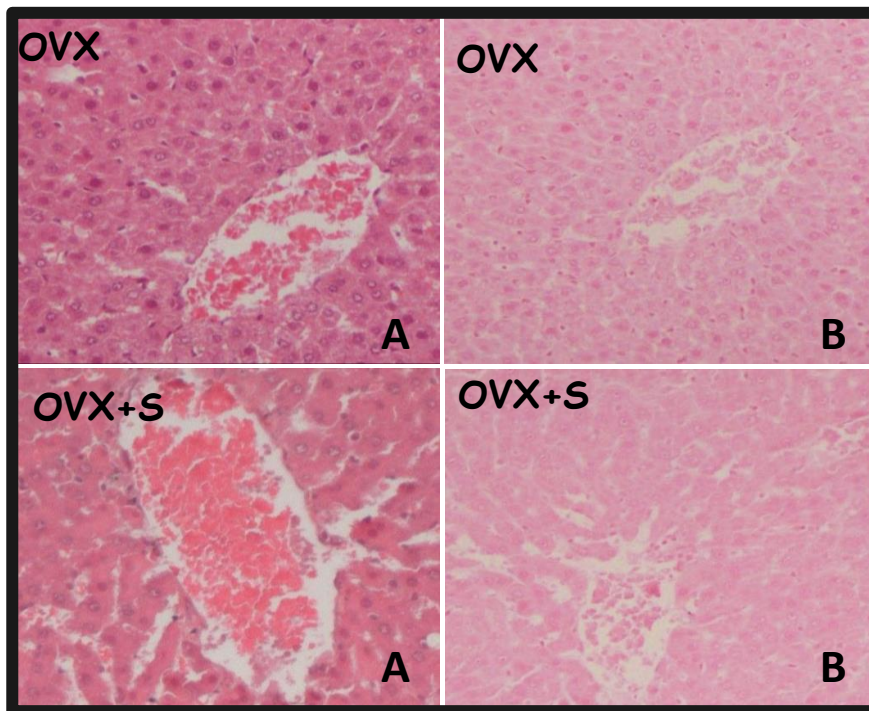
**Tabela 6.11** Avaliação física dos órgãos coração, fígado e rins: massa e massa normalizada pela massa corporal (MC) em cada grupo: Controle (C); Ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado suplementado (OVX+S); n= 7 por grupo; <sup>a</sup>p<0.05 comparado ao controle.

Variáveis	Coração		Fígado		Rim	
	mg	mg/MC x 10 <sup>3</sup>	m(g)	m/MC x 10 <sup>3</sup>	m(g)	m/MC x 10 <sup>3</sup>
<b>C</b>	1.01±0.15	4.8±0.5	5.43±0.2	26.2±0.8	1.40±0.06	6.8±0.2
<b>OVX</b>	1.14±0.10	4.2±0.3	5.30±0.26	<b>19.2±0.6<sup>a</sup></b>	1.45±0.07	<b>5.2±0.1<sup>a</sup></b>
<b>OVX+S</b>	1.19±0.06	4.3±0.1	5.68±0.25	<b>20.5±0.6<sup>a</sup></b>	1.37±0.07	<b>4.9±0.3<sup>a</sup></b>

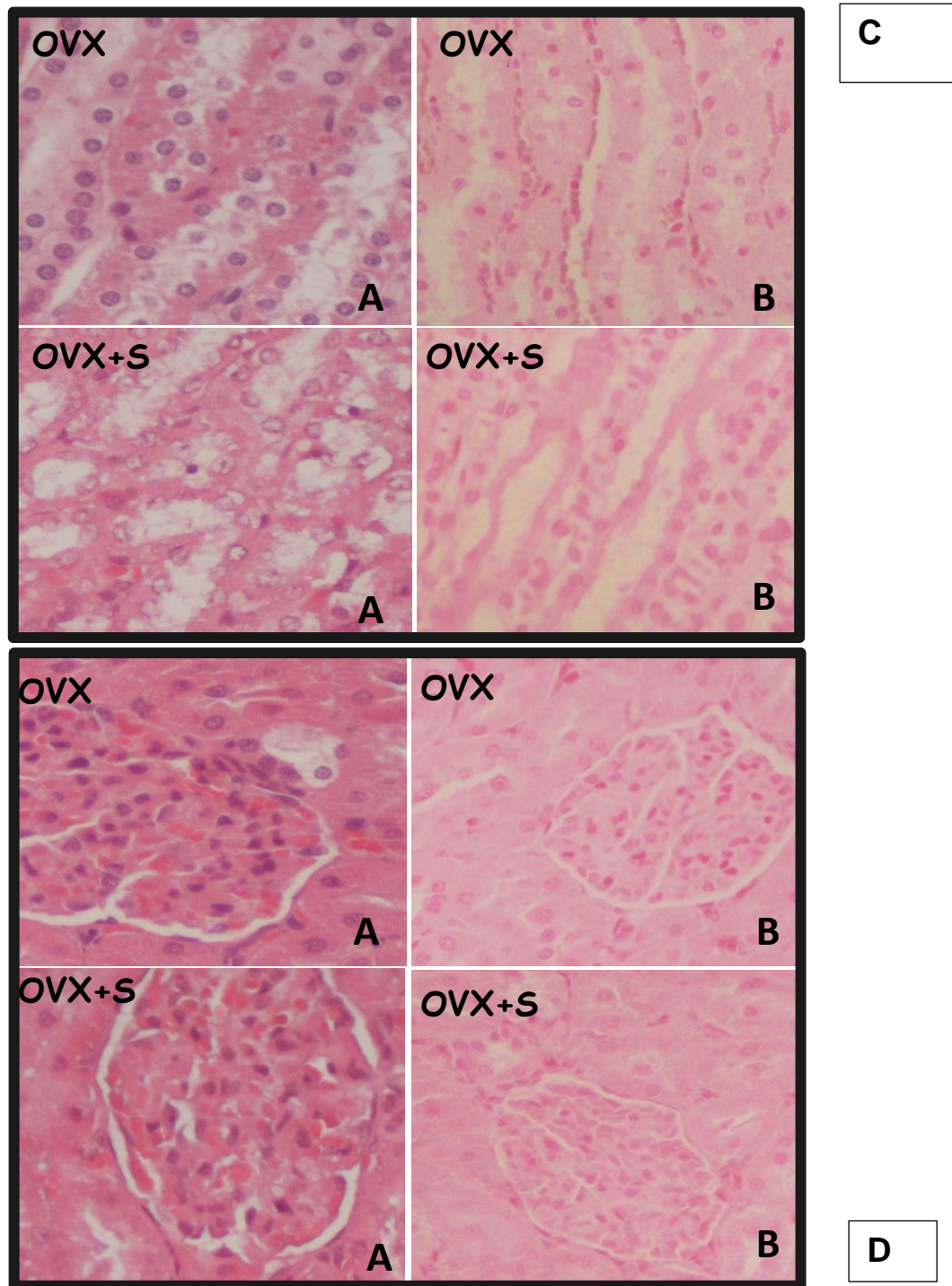
## 6.8. Exames histológicos

### 6.8.1. Fígado e Rim

Os cortes histológicos do fígado (**Fig. 6.10**) e rim (**Fig.6.11**) corados com a coloração de hematoxilina-eosina e Von Kossa revelaram a preservação dos tecidos em todos os grupos de animais estudados, e a ausência de depósitos de cálcio nos tecidos dos animais suplementados (OVX + S) (**Figs.6.10-B e 6.11-B**).



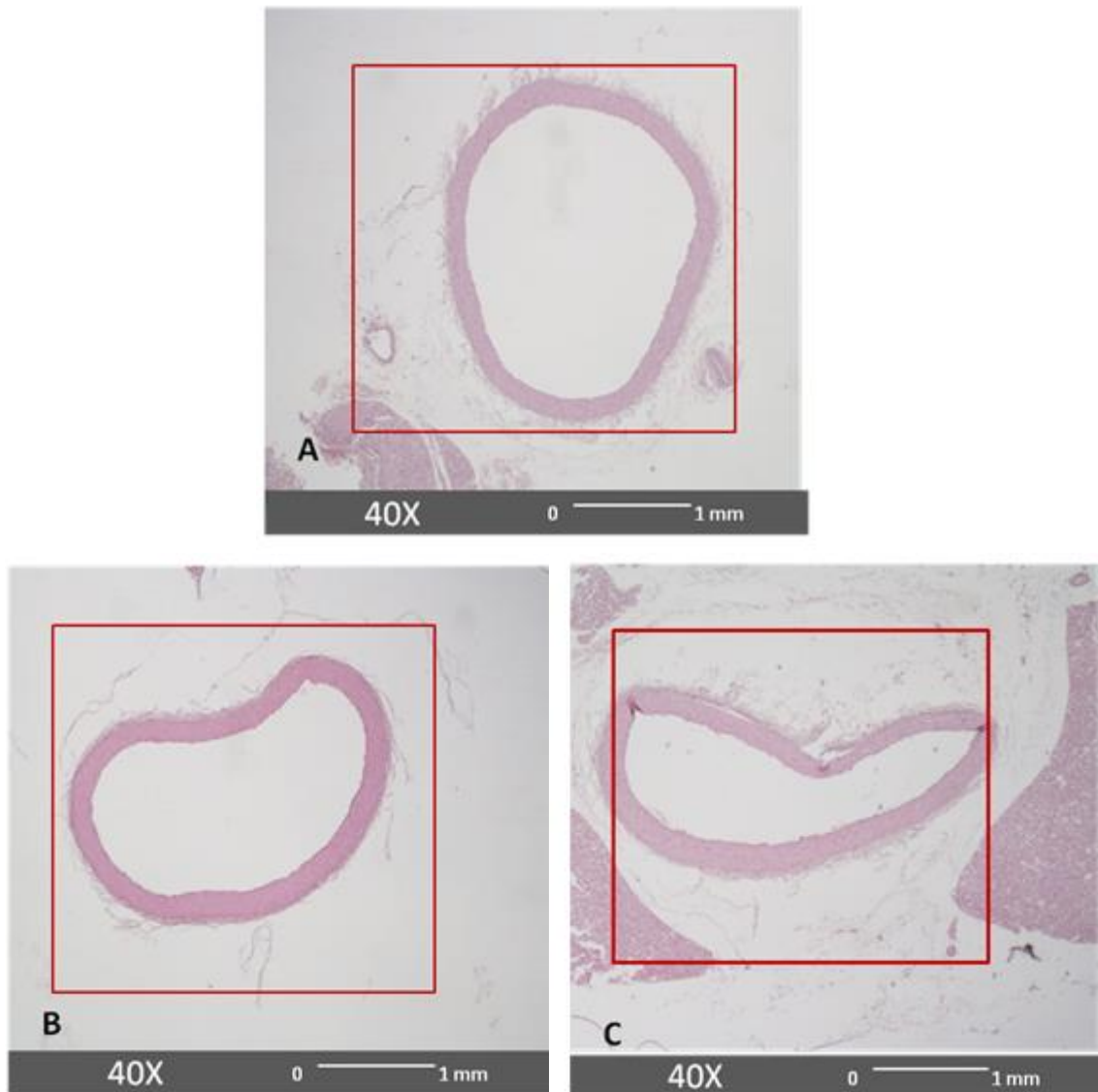
**Figura 6.10** Cortes histológicos de fígado (ampliação 100x). Imagens de um animal de cada grupo (OVX e OVX+S) A- Coloração hematoxilina-eosina (HM); B- Coloração de Von Kossa (VK).



**Figura 6.11** Cortes histológicas do rim; ampliação 200x: medula (túbulos renais **fig. C**) e córtex renal (glomérulos **fig. D**). Imagens de um animal de cada grupo (OVX e OVX+S) A - Coloração hematoxilina-eosina (HM); B- Coloração de Von Kossa (VK).

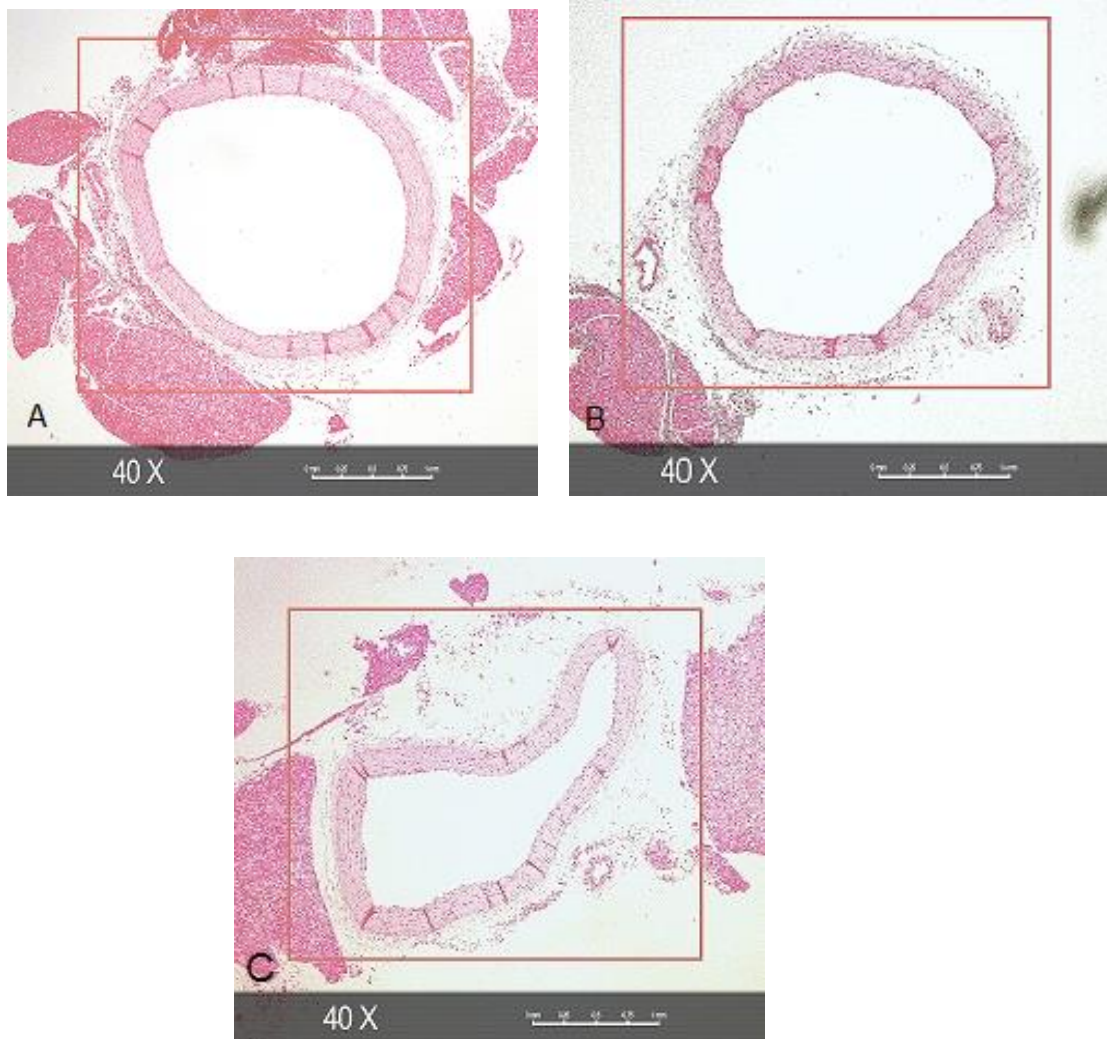
### 6.8.2. Aorta torácica

Os cortes histológicos de secções da croça da aorta dos animais estudados corados com hematoxilina-eosina (**Fig. 6.12**), mostram a preservação deste tecido.



**Figure 6.12** Cortes histológicos em coloração de Hematoxilina-Eosina. Ampliação 40x. A- animal saudável (C); B-Animal ovariectomizado não suplementado (OVX); C- animal ovariectomizado suplementado (OVX+S).

Os mesmos cortes sujeitos à coloração de Von Kossa (**Fig. 6.13**), revelaram a ausência de depósitos de cálcio em qualquer uma das preparações observadas para cada grupo de animais estudado.



**Figure 6.13** Pesquisa de depósitos de cálcio em secções de crossa da aorta. Cortes histológicos em coloração de Von Kossa, ampliação 40x. A- animal saudável (OVX); B-Animal ovariectomizado não suplementado (OVX); C- animal ovariectomizado suplementado (C+S).

## 6.9. Discussão e conclusão

Com este trabalho pretendeu-se utilizar um modelo animal de rato que simula a osteoporose que ocorre na mulher na pós-menopausa, para estudar o efeito de um suplemento alimentar rico em cálcio, obtido a partir de um resíduo, a concha de ostra, e de uma fibra alimentar solúvel, a goma guar, no metabolismo, composição, microarquitetura e propriedades biomecânicas do osso.

A ovariectomia efetuada no rato, acompanhada da conseqüente diminuição dos níveis séricos de estrogénios simula a deficiência em estrogénios que se verifica na pós-menopausa na mulher. Sendo esta, a principal causa da rápida perda de massa óssea e de aumento da fragilidade do osso que conduz à osteoporose pós-menopáusicas, a ovariectomia tem sido o modelo animal mais utilizado, para estudar esta patologia e o efeito de fármacos na sua terapêutica.

Vários trabalhos apontam para o efeito dos estrogénios sobre a absorção intestinal de cálcio. A sua administração, aumenta a absorção de cálcio na mulher na pós-menopausa (Gallagher, Riggs, & DeLuca, 1980; Gennari, Agnusdei, Nardi & Civitelli, 1990) e no rato (Arjmandi, Hollis, & Kalu, 1994) contudo, o efeito da diminuição dos estrogénios na absorção intestinal de cálcio, no rato, não é coincidente nos vários estudos efetuados (Thomas, Hope, & Ibarra, 1988; Lindgren & DeLuca, 1982). Alguns desses estudos indicam uma diminuição da sua absorção (Kalu, Liu, Hardin & Hollis, 1989; Akao, Abe, Sato, Hasegawa-Tanigome, Kumagai & Kumagai, 2015) que parece não depender dos níveis da  $1,25(\text{OH})_2$  vitamina D (Gennari, Agnusdei, Nardi & Civitelli, 1990)

No presente estudo, a ovariectomia diminuiu significativamente a calcemia, efeito que pode atribuir-se ao aumento significativo da excreção urinária de cálcio verificada, já que nos animais ovariectomizados que foram suplementados também observámos hipercalcúria mas sem diferenças significativas de calcemia comparativamente aos animais saudáveis, o que indica que o aumento do aporte de cálcio, resultante da suplementação possa ter contribuído para minimizar o desequilíbrio da homeostase do cálcio observado na deficiência estrogénica.

O aumento do cálcio sérico bem como do teor em cálcio do osso femoral observado nos animais ovariectomizados suplementados, veio comprovar que o cálcio da concha-de-ostra na presença da goma guar é absorvido no intestino e promove uma eficaz mineralização óssea. A biodisponibilidade do cálcio da concha de ostra já

anteriormente tinha sido verificada na mulher e no rato com deficiência estrogénica (Fujita, Fujii, Kitagawa & Fukase, 1993; Omi & Ezawa, 1993) através da avaliação da densidade mineral óssea e da resistência máxima à fratura do fémur embora para mais do dobro da dose equivalente humana agora utilizada (900 mg). Estudos em animais comprovaram também que a biodisponibilidade do cálcio melhora com a associação à goma guar mesmo em condições adversas à sua absorção (Hara, Suzuki, Kasai, Aoyama & Ohta, 1999)

No presente estudo, o suplemento testado, embora numa dose baixa de cálcio, demonstrou ainda, atenuar a desmineralização óssea que se observa após ovariectomia e conferir maior rigidez (módulo elástico) e maior resistência máxima à fractura e uma tendência para maior resistência à deformação plástica e primeiras microfraturas (tensão de cedência), do fémur dos animais ovariectomizados. Estes resultados sugerem, portanto, que os ossos dos fémures dos animais ovariectomizados suplementados passaram a ser menos frágeis do que os de animais ovariectomizados não-suplementados. Todos os grupos de animais tiveram acesso, *ad libitum*, a água desmineralizada e a ração. A ração, como única fonte de cálcio dos animais saudáveis e dos ovariectomizados, foi suficiente para manter ossos saudáveis nos primeiros mas não nos segundos. As diferenças na mineralização e fragilidade dos fémures encontradas entre animais ovariectomizados suplementados ou não apontam para um efeito benéfico da suplementação mesmo com doses baixas de cálcio, no osso de animais deficientes em estrogénios.

A diminuição do incremento do peso corporal observada nos animais ovariectomizados suplementados (22%) comparativamente ao grupo ovariectomizado não suplementado (33%) foi outro efeito benéfico observado neste estudo. Num estudo adicional (ver capítulo VII) a suplementação de animais saudáveis não alterou a quantidade de ração e de água ingerida relativamente ao grupo controlo, o que sugere que o menor incremento de massa corporal observada no grupo suplementado poderá ser atribuído à goma guar. Não foram, contudo, observados os efeitos benéficos descritos para a goma guar, nos níveis de colesterol (Behall, 1990) Este facto pode ser explicado pela inexistência de hipercolesterolemia nos animais estudados e pela baixa dose de goma guar utilizada.

A dose de suplemento de cálcio de concha de ostra diariamente administrada 43.6 mg/kg corresponde a uma dose humana equivalente de 7.0 mg/kg/dia (USD, FDA, CDER, 2005). Esta dose de suplemento, pretendeu simular uma dose moderadamente baixa de suplemento de cálcio (420 mg/dia), um quinto da dose máxima diária

recomendada na mulher pós-menopausa (2000 mg/dia) e um terço da dose superior geralmente utilizada em suplementação (1200 mg/dia).

A maior parte da população não ingere diariamente na dieta quantidades de cálcio acima dos limites recomendados; sendo que a ingestão de cálcio em excesso provém do recurso a suplementos de cálcio. A utilização de suplementos de cálcio é muito comum na população idosa dos países mais desenvolvidos, principalmente na mulher pós-menopausa. Contudo alguns estudos têm mostrado que, tanto nos EUA como na Europa, esta população, por vezes, ingere quantidades de cálcio acima dos limites máximos recomendados principalmente por ingestão de doses de suplementos inadequadas à dieta individual (EFSA NDA Panel,2015; Sanfélix-Gimeno, Sanfélix-Genovés, Rodriguez-Bernal, Peiró & Hurtado,2013). As dificuldades no ajuste de dose são ainda acrescidas pela diminuição de absorção de cálcio na pós-menopausa mas também por algumas terapêuticas farmacológicas, frequentemente usadas nestas idades. Entre outros fármacos, por exemplo, os corticosteróides e os inibidores da bomba de prótons comprometem a biodisponibilidade do cálcio (Van Staa, Leufkens, Abenhaim, Zhang & Cooper, 2000; Zhou, Huang, Li, Sun & Liu, 2015).

Revisões sistemáticas têm mostrado que, nos adultos, o excesso de cálcio obtido através de suplementos e não da dieta, para além de causar obstipação e transtornos gastrointestinais, por vezes graves, aumenta o risco de litíase renal e de acidentes cardiovasculares (US Institute of Medicine 2010; Bolland, Leung, Tai, Bastin, Gamble, Grey & Reid, 2015). A necropsia e as análises histopatológicas efetuadas no presente estudo, comprovam a segurança da formulação e da dose de cálcio utilizada neste trabalho, já que não foram observados quaisquer sinais de toxicidade, nem alterações histológicas ou depósitos de cálcio nos principais órgãos alvo (rim, fígado e croça da aorta) dos animais que receberam o suplemento.

### **Conclusão:**

A suplementação com pó de concha-de-ostra e goma guar, numa dose equivalente humana moderadamente baixa de cálcio, durante 53 dias, de animais deficientes em estrogénios, atenuou a hipocalcemia, a calciúria, a desmineralização e fragilidade ósseas, e o incremento da massa corporal, sem aparente depósito de cálcio nos órgãos mais vulgarmente afetados (rim e vasos sanguíneos).

Estes resultados confirmam a biodisponibilidade do cálcio do suplemento de concha-de-ostra associado à goma guar e sugerem que o tratamento com este suplemento de cálcio, mesmo numa dose baixa, protege o osso cortical e diminui a probabilidade de

fractura, pelo menos do osso femoral, comprovando que a personalização da suplementação com cálcio numa dose e formulação adequadas é um meio barato, seguro e eficaz de prevenção da fragilidade do osso associada à osteoporose por deficiência em estrogénios.

## **CAPÍTULO-7**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SUPLEMENTO DE CARBONATO DE CÁLCIO (PÓ DE CONCHA DE OSTRAS) E GOMA GUAR, NOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E NO OSSO OSTEOPORÓTICO DE ANIMAIS COM HIPERGLICEMIA CRÔNICA.**

## **7. Avaliação do efeito do suplemento de carbonato de cálcio (pó de concha de ostra) e goma guar, nos parâmetros bioquímicos e no osso osteoporótico de animais com hiperglicemia crônica**

### **7.1. Introdução/Objetivo**

É atualmente consensual que a DM2 é um fator adicional de risco de fratura, que pode ser superior a 2x o risco dos indivíduos não diabéticos, embora apresentem um aumento da densidade mineral óssea (Ferrari, 2016). Schwartz *et al.*, (2001) em estudo prospetivo de mulheres mais velhas, obtido a partir de um estudo de fraturas osteoporóticas confirmaram que mulheres com DM2 têm maiores taxas de fraturas nas regiões da bacia, úmero e pé, quando comparadas com mulheres não diabéticas.

Quando considerados todos os fatores de risco associados à osteoporose, os doentes com diabetes são mais propensos às complicações microvasculares como a retinopatia diabética, que ocorre em até 60% em pacientes DM2, e a nefropatia diabética, cuja prevalência pode chegar a 40% (Murussi, Campagnolo, Beck, Gross & Silveiro, 2007), citados por Dall`Alba & Azevedo, (2010). Além disso, a DM2 está intimamente associada à síndrome metabólica, que pode ser definida como um conjunto de desordens clínicas interrelacionadas, tais como obesidade, resistência à insulina, tolerância diminuída à glicose, hipertensão arterial e dislipidemia (Alberti *et al.*, 2009) citado por Dall`Alba & Azevedo, (2010). Embora a relação entre a DM2 e osteoporose tenha sido amplamente investigada, continua a ser desconhecido o mecanismo fisiopatológico envolvido. A diabetes pode influenciar os ossos através de diversos mecanismos, alguns dos quais podem ter efeitos contraditórios. A obesidade difundida na DM2 está fortemente associada com uma maior densidade mineral óssea, provavelmente através de cargas mecânicas e fatores hormonais, incluindo a insulina, o estrogênio e a leptina (Wakasugi, Wakao, Tawata, Gan, Koizumi & Onaya, 1993; Thomas *et al.*, 2001; Felson, Zhang, Hannan & Anderson, 1993) citados por Abdulameer, Sulaiman, Hassali, Subramaniam & Sahib, 2012.

Contudo, um estudo realizado em mulheres diabéticas asiáticas com um índice de massa corporal normal, aponta para que não seja o aumento do índice de massa corporal (IMD) a causa para o aumento da DMO (Chandran, Tan & Tay, 2016).

As ações benéficas de dietas ricas em fibras solúveis sobre a sensibilidade à insulina em diabetes mellitus não insulino dependente e diabetes mellitus dependente de insulina, estão bem documentadas (Vuorinen-Markkola, Sinisalo, & Koivisto, 1992; Butt, Shahzadi, Sharif & Nasir, 2007; Saeed, Mosa-Al-Reza, Fatemeh, & Seideh, 2012; Papathanasopoulos & Camilleri, 2010).

As fibras alimentares solúveis têm um papel importante em pacientes portadores da diabetes mellitus, através dos seus efeitos benéficos sobre a homeostase glicêmica, perfil lipídico, saciedade, peso corporal e fatores de risco para doenças cardiovasculares (Venn & Mann, 2004). A goma guar pode ser eficazmente usada para reduzir a glicose no sangue pós-prandial (Bhardwaj *et al.*, 1994).

As propriedades de viscosidade e de formação de gel de fibras solúveis retardam o esvaziamento gástrico, diminuindo a resposta da glicose pós-prandial, e reduzindo os níveis de colesterol total e de LDL e ainda induzem uma perda de peso moderada, devido ao baixo conteúdo energético e aumento da saciedade (Howarth, 2001) citado por Butt, Shahzadi, Sharif & Nasir, 2007.

O combate à osteoporose exige determinados níveis de cálcio no organismo seja pela ingestão natural do nutriente ou na forma de suplemento. É necessário tomar quantidade suficiente de cálcio (Ca) para a prevenção da osteoporose (Omi & Ezawa, 1993). Suplementação com cálcio de concha de ostra é recomendada na prevenção da osteoporose associada ao envelhecimento e à menopausa (Nunes, Santana, Sobrinho, de La Roca, Lima & Neto, 2006).

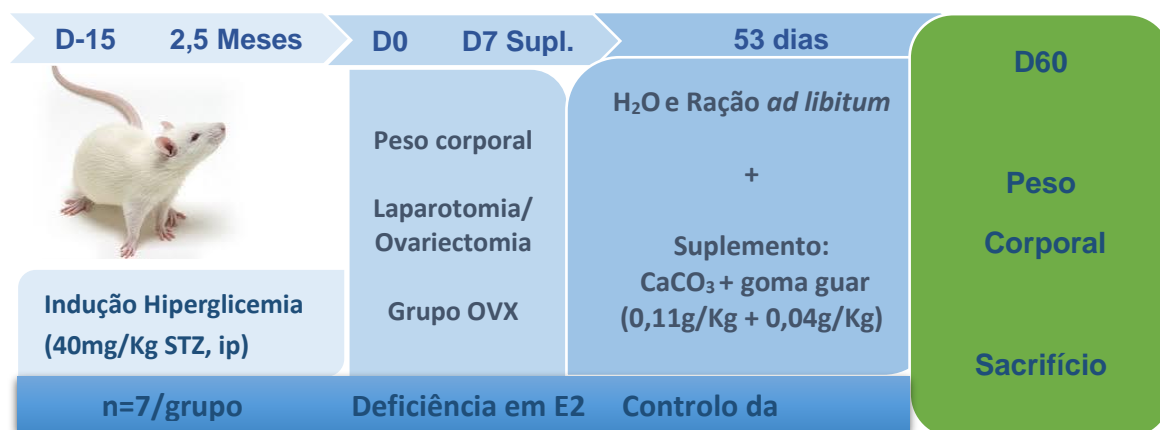
Estudos demonstram que o  $\text{CaCO}_3$  de concha de ostra aumenta a densidade mineral óssea (DMO) em animais com osteoporose (Omi & Ezawa, 1993; Fujita, Fujii, Kitagawa, & Fukase, 1993).

As fibras solúveis, muito fermentáveis diminuem o pH e aumentam a absorção intestinal de cálcio de forma passiva no cólon (Charles, 1992). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da goma guar incorporada no pó de concha de ostra, rico em carbonato de cálcio, usado na forma de suplemento administrado diariamente, em ratos hiperglicêmicos ovariectomizados, e ao fim de 53 dias de suplementação avaliar o peso corporal, glicemia, calcemia, triglicéridos, colesterol, CTX, P1NP e cálcio urinário e femoral, bem como os efeitos no osso cortical e trabecular, comparando-os com os dos animais hiperglicêmicos ovariectomizados não suplementados (Grupo IV) e com os ovariectomizados normoglicêmicos suplementados (Grupo VI).

## 7.2. Material e Métodos

### 7.2.1. Desenho experimental

O desenho experimental utilizado está esquematizado na **Fig. 7.01**.



**Figura 7.01** Desenho experimental utilizado para os estudos dos animais hiperglicêmicos ovariectomizados suplementados com cálcio e goma guar, durante 53 dias, com início após uma semana de recobro da ovariectomia.

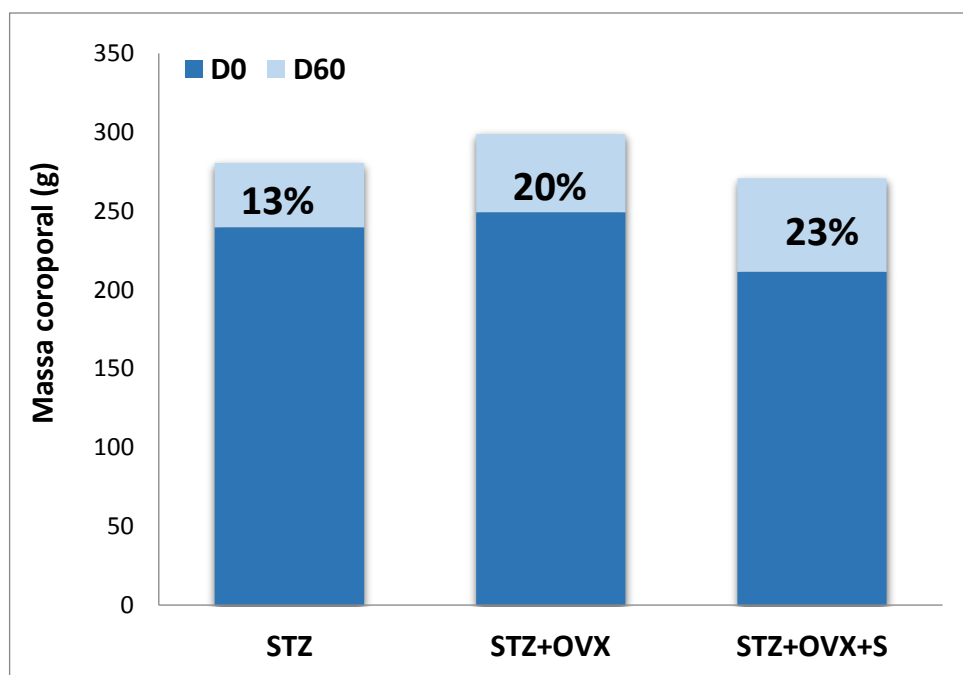
As metodologias usadas para a indução da hiperglicemia, ovariectomia e suplementação dos animais, bem como as metodologias utilizadas para a análise das amostras biológicas (sangue; urina e osso) foram já descritas detalhadamente nos capítulos 5, 6 e 7.

Em resumo, a um grupo de ratos fêmeas Wistar (n = 7), hiperglicêmicos e ovariectomizados (STZ+OVX+S) foi administrado um suplemento sob a forma de pellet, preparado com pó de concha-de-ostrea (0,11 g/Kg de carbonato de cálcio) e goma guar (0,04 g/Kg) durante 53 dias. A suplementação iniciou-se uma semana após a ovariectomia dos animais. Ao 60º dia após a cirurgia, os animais foram sacrificados e avaliou-se: peso corporal, glicemia, calcemia, triglicéridos, colesterol, CTX, P1NP, cálcio urinário, qualidade do osso trabecular vertebral (histomorfometria) e cortical tibial (microscopia eletrônica varrimento-SEM) bem como o peso, diâmetro, conteúdo em cálcio e parâmetros biomecânicos do osso femoral.

### 7.3. Resultados

#### 7.3.1. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos antes do sacrifício

Na altura do sacrifício 4 dos 7 animais tratados com o suplemento não se podiam considerar hiperglicémicos, porque apresentavam glicemias no sangue total, em jejum, inferiores a 120 mg/dL, embora tivessem apresentado glicemias antes da ovariectomia superiores a 200 mg/dL. Por esse motivo optou-se por apresentar apenas os resultados dos 3 animais, com valores de glicemia, após o sacrifício, superiores a 130 mg/dL. Assim, a avaliação dos resultados, dado o número reduzido de animais deste grupo, será apenas qualitativa, não dando lugar a comparações estatísticas. As médias encontradas são comparadas com a do grupo STZ+OVX e para alguns parâmetros também com as dos STZ e/ou OVX+S. Os 3 animais STZ+OVX+S, apresentaram um peso corporal final de  $260.7 \pm 3.0g$ , tendo sofrido um aumento de peso de 23% entre o Dia 0 e o Dia 60. Este aumento de peso foi idêntico ao verificado no grupo de animais STZ+OVX (20%) e OVX+S (22%) (**Tabela 7.01**), contudo o peso médio no final do estudo, destes três animais, era ligeiramente inferior ao dos animais dos grupos STZ e STZ+OVX (**Fig.7.02**).



**Figura 7.02** – Peso corporal dos animais dos grupos STZ (n=7); STZ+OVX (n=7) e STZ+OVX+S n=3

**Tabela 7.01** Resultados dos pesos corporais imediatamente antes da ovariectomia (D0) e no final do estudo (D60) STZ+OVX+S (n=3); STZ, STZ+OVX e OVX+S (n=7); médias  $\pm$  erro padrão.

Variáveis	STZ+OVX+S	STZ+OVX	STZ	OVX+S
Peso corporal (g) D0	211.4 $\pm$ 8.0	249.2 $\pm$ 10.4	<b>239.6 <math>\pm</math> 4.4</b>	220.4 $\pm$ 11.1
Peso corporal (g) D60	260.7 $\pm$ 3.0	<b>298.8 <math>\pm</math> 10.27</b>	<b>270.4 <math>\pm</math> 10.4</b>	268.9 $\pm$ 6.8

### 7.3.2. Parâmetros bioquímicos

#### 7.3.2.1. Parâmetros bioquímicos séricos e urinários

Os resultados dos parâmetros bioquímicos determinados no soro e na urina dos 3 animais deste grupo, estão compilados na **tabela 7.02**. Nesta tabela foram também colocados os resultados dos grupos STZ+OVX e OVX+S para facilitar a comparação dos dados. Os níveis séricos de E2 estavam abaixo do limite de detecção (11.8  $\mu$ g/ml), evidenciando assim o sucesso da ovariectomia nestes animais.

**Tabela 7.02** Resultados dos marcadores bioquímicos, séricos e urinários dos grupos: STZ+OVX+S n=3; STZ+OVX n=7 e OVX+S n=7; médias  $\pm$  erro padrão.

Variáveis	STZ+OVX+S	STZ+OVX	OVX+S
Glicemia (mg/dL)	138.7 $\pm$ 6.5	<b>198.0 <math>\pm</math> 21</b>	88.2 $\pm$ 7.8
Triglicéridos (mg/dL)	30.3 $\pm$ 1.1	<b>57.7 <math>\pm</math> 6.1</b>	36.5 $\pm$ 4.1
Colesterol total (mg/dL)	84.3 $\pm$ 4.7	<b>98.7 <math>\pm</math> 4.3</b>	97.4 $\pm$ 3.7
HDL (mg/dL)	47.3 $\pm$ 2.3	<b>37.5 <math>\pm</math> 5.9</b>	44.3 $\pm$ 1.1
LDL (mg/dL)	31.3 $\pm$ 2.9	43.7 $\pm$ 3.3	44.4 $\pm$ 4.0
Calcemia (mg/dL)	10.2 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 0.3	10.0 $\pm$ 0.1
Urina 12h (mL)	<b>8.9<math>\pm</math>1.8</b>	7.6 $\pm$ 0.8	5.2 $\pm$ 0.7
Calciúria (mg/dL)	34.8 $\pm$ 4.3	37.6 $\pm$ 6.1	<b>55.3 <math>\pm</math> 9.4</b>
Calciúria/calcemia	<b>3.4<math>\pm</math>0.4</b>	3.8 $\pm$ 0.5	5.7 $\pm$ 1.2

### 7.3.2.2. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea

A razão do P1NP/CTX (**Tabela 7.03**) dos animais STZ+OVX+S é semelhante á dos STZ+OVX e é superior em cerca de 13.5%. à dos OVX+S. Estes resultados parecem apontar para a ausência de efeito do suplemento de cálcio nos marcadores de remodelação óssea nos animais hiperglicémicos ovariectomizados.

**Tabela 7.03** Marcadores de remodelação óssea dos grupos: STZ+OVX+S n=3; STZ+OVX e OVX+S n=7; médias ± erro padrão.

Variáveis	STZ+OVX+S	STZ+OVX	OVX+S
CTX (ng/mL)	17.6±4.9	15.9 ± 1.4	15.4 ± 1.3
PINP (ng/mL)	24.5±2.5	25.0 ± 2.3	21.4 ± 1.5
PINP/CTX	1.60±0.4	1.66 ± 0.13	<b>1.41± 0.06</b>

### 7.3.3. Histomorfometria óssea da quarta vértebra lombar (L4)

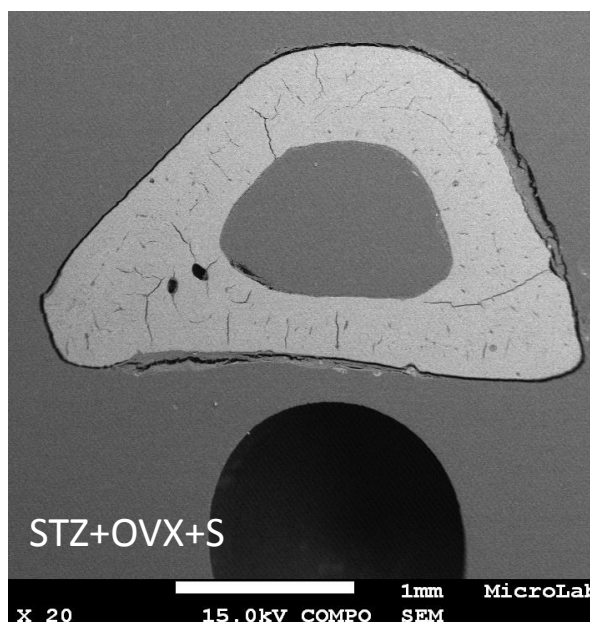
Os dados da histomorfometria da L4 (BV/TV e Tb.Sp) dos animais STZ+OVX+S são semelhantes aos dos STZ+OVX, (**Tabela 7.04**), o que está de acordo com aos dados dos marcadores de remodelação óssea que também são semelhantes. Contudo a espessura trabecular apresentou uma menor redução neste grupo de animais.

**Tabela 7.04** Medições da vértebra lombar (L4), por microscopia eletrónica de varrimento Os resultados são valores médios ± erro padrão; n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para STZ+OVX e OVX+S.

Variáveis	STZ+OVX+S	STZ+OVX	OVX+S
Área trabecular ocupada BV/TV (%)	37.80 ± 1.30	37.25 ± 1.05	35.89 ± 2.28
Espessura trabecular Tb.Th (µm)	<b>99.30 ± 3.30</b>	95.14 ± 4.90	92.45 ± 2.17
Separação trabecular Tb.Sp (µm)	180.80 ± 6.19	180.31 ± 5.68	189.05 ± 13.30

### 7.3.4. Espessura cortical óssea da tíbia

A análise das imagens da seção transversal média da diáfise da tíbia, obtidas com uma ampliação de 20x10 (**Fig.7.03**), dos três animais estudados, mostrou uma espessura do osso cortical da tíbia nos animais STZ+OVX+S equivalente à dos STZ+OVX (**Tabela 7.05**), parecendo não ter havido qualquer efeito do suplemento, embora só tenham sido considerados 3 animais.



**Figura 7.03** Corte transversal do osso cortical da tíbia de um animal do grupo STZ+OVX+S, obtida por SEM, com uma ampliação de 20X10.

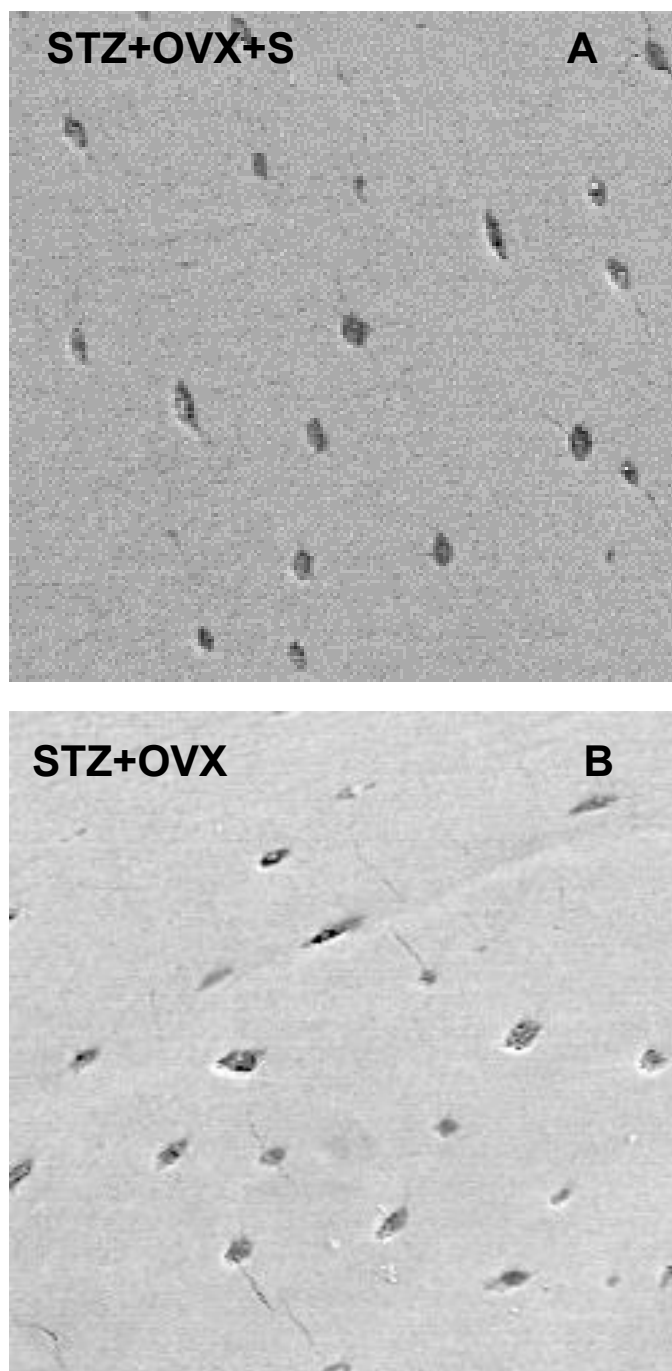
**Tabela 7.05** Espessura do osso cortical (tíbia) avaliada em 12 pontos nos grupos de animais estudados; médias  $\pm$  erro padrão. n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para os grupos STZ+OVX e OVX+S.

Variáveis	STZ+OVX+S	STZ+OVX
Espessura do osso cortical (mm)	0.619 $\pm$ 0.016	0.616 $\pm$ 0.016

### 7.3.5. Avaliação da microestrutura do osso cortical

As imagens dos cortes de osso cortical da tíbia dos animais hiperglicêmicos ovariectomizados, que foram suplementados com cálcio (STZ+OVX+S), permitem observar que nestes animais o interstício ósseo, embora poroso, está melhor preservado, apresentando um menor número de lacunas e de microfissuras, quando

comparado com o osso dos animais não suplementados (STZ+OVX) (**Fig. 7.04 – A e B**).



**Figura 7.04** - Imagens (SEM), obtidas com ampliação 150x dos cortes longitudinais das tíbias, representativas de cada grupo: STZ+OVX+S e STZ+OVX.

### 7.3.6. Parâmetros físico-químicos avaliados no osso femoral

#### 7.3.6.1. Diâmetro e peso dos fêmures

Nos animais STZ+OVX+S o diâmetro normalizado do fêmur é semelhante ao dos animais STZ+OVX e superior ao dos animais OVX+S enquanto a massa femoral normalizada embora superior à do grupo STZ+OVX, é muito semelhante à dos animais OVX+S (**Tabela 7.06**).

**Tabela 7.06** Parâmetros físicos do fêmur: n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para STZ+OVX e OVX+S; médias  $\pm$  erro padrão.

Variáveis	STZ+OVX+S	STZ+OVX	OVX+S
Diâmetro (mm)	2.70 $\pm$ 0.07	3.22 $\pm$ 0.21	2.58 $\pm$ 0.15
Diâmetro fêmur / peso corporal ( $\mu$ /g)	10.9 $\pm$ 0.4	10.7 $\pm$ 0.5	<b>7.3<math>\pm</math> 0.3</b>
Peso fêmur (g)	0.74 $\pm$ 0.07	0.79 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.03
Peso fêmur/Peso corporal ( $\mu$ g/g)	2.76 $\pm$ 0.06	<b>2.64<math>\pm</math>0.02</b>	2.72 $\pm$ 0.07

#### 7.3.6.2. Teor em cálcio dos fêmures

O doseamento do teor de cálcio, por espectrofotometria de absorção atômica, revelou uma redução de 16% do conteúdo em cálcio dos fêmures dos animais hiperglicêmicos ovariectomizados STZ+OVX comparativamente aos animais hiperglicêmicos (STZ). Nos animais STZ+OVX+S, a tendência de redução do conteúdo em cálcio do osso femoral foi um pouco menor (-14%), o grande desvio verificado no doseamento de cálcio nos animais STZ+OVX+S não nos permite concluir a existência ou não de diferenças relativamente ao grupo OVX+S, embora em média este valor seja mais baixo. (**Tabela 7.07**).

**Tabela 7.07** Teor em cálcio do fêmur. n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para os grupos STZ; STZ+OVX; OVX+S; médias  $\pm$  erro padrão.

Variáveis	STZ+OVX+S	STZ+OVX	STZ	OVX+S
Cálcio (%)	10.50 $\pm$ 1.50	<b>10.31 <math>\pm</math> 0.41</b>	11.96 $\pm$ 0.46	11.70 $\pm$ 0.6

### 7.3.7. Propriedades biomecânicas dos fêmures

As curvas de tensão – extensão obtidas nos ensaios mecânicos de flexão em três pontos, permitiram estudar as propriedades biomecânicas dos fêmures dos diferentes grupos de animais a partir da análise dos parâmetros: módulo de Young, que avalia a rigidez do osso e a tensão de cedência e tensão máxima de fratura que avaliam a resistência mecânica do mesmo (**Tabela 7.08**). Os valores obtidos para as diferentes variáveis, nos animais do grupo STZ+OVX+S, foram superiores em média às obtidas no grupo STZ+OVX contudo os três animais apresentaram uma grande dispersão de resultados, nos três parâmetros avaliados. O osso femoral destes animais (STZ+OVX+S) é também bastante mais resistente que o dos animais do grupo OVX+S indicando que os fêmures dos animais hiperglicêmicos ovariectomizados que receberam o suplemento são, à partida, mais resistentes à fratura que o dos animais normoglicêmicos ovariectomizados suplementados, pois foi necessário aplicar mais força para iniciar as deformações plásticas e provocar as primeiras microfissuras bem como para fraturar o osso (embora estes ensaios sejam apenas de 3 animais).

**Tabela 7.08** Propriedades biomecânicas dos fêmures dos grupos estudados: n=3 para o grupo STZ+OVX+S; n=7 para os grupos STZ+OVX e OVX+S; médias  $\pm$  erro padrão.

Variáveis	STZ+OVX+S	STZ+OVX	OVX+S
Tensão de Cedência (MPa)	<b>256.28<math>\pm</math>37.4</b>	240.79 $\pm$ 15.02	182.29 $\pm$ 5.86
Tensão Máxima de Fratura (MPa)	<b>329.92<math>\pm</math>41.51</b>	319.69 $\pm$ 24.64	256.20 $\pm$ 11.81
Módulo de Young (GPa)	<b>18.47<math>\pm</math>3.18</b>	18.20 $\pm$ 1.52	14.05 $\pm$ 0.48

É importante salientar que o peso normalizado dos fêmures bem como a sua % de cálcio eram também superiores nestes animais, embora o diâmetro normalizado do fêmur fosse semelhante ao do grupo STZ+OVX conforme **tabelas 7.05 e 7.06**.

#### **7.4. Discussão e conclusão**

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito do suplemento de cálcio e goma guar já usado nos animais osteoporóticos normoglicémicos, mas agora em animais osteoporóticos hiperglicémicos procurando avaliar-se o seu efeito não só no metabolismo, composição, microarquitetura e propriedades biomecânicas do osso, mas também ao nível do ganho de peso e do metabolismo da glucose, dos lípidos e do cálcio.

Com efeito, o consumo de fibra alimentar embora benéfico para o controlo da glicemia e da dislipidemia associada ou não a esta condição patológica, pode prejudicar a absorção de minerais, nomeadamente do cálcio (Miller, 1989)

Por outro lado o cálcio embora seja maioritariamente absorvido no intestino delgado, de forma dependente da Vitamina D, é também absorvido passivamente no cólon (Charles,1992), tendo-se verificado que a ingestão de fibra alimentar solúvel, altamente fermentável, juntamente com um sal de cálcio restabelece a absorção de cálcio no colon dos ratos, em que a absorção de cálcio está diminuída devido à falência renal (Hara *et al.* 1996), e que a modificação da microbiota do cólon, diminui o pH do intestino grosso, aumentando a absorção de cálcio e o crescimento ósseo quer nos animais, quer no homem (Rizzoli, 2016).

Os resultados obtidos, embora apenas com 3 animais, dado que os outros apresentavam glicemias séricas na altura do sacrifício inferiores a 130 mg/dL, permitem-nos concluir que os valores de triglicéridos, assim como os do colesterol total acompanharam os valores da glicemia sendo mais elevados nos animais ovariectomizados hiperglicémicos não suplementados do que nos suplementados pois estes animais apresentavam níveis de glicemia e de colesterol mais baixos. Relativamente ao ganho de peso, este não foi diferente entre os animais hiperglicémicos ovariectomizados, suplementados ou não ao contrário do que se tinha verificado nos animais normoglicémicos ovariectomizados, nos quais se verificou um menor ganho de peso no final da suplementação.

Quanto ao cálcio sérico, este foi superior nos animais STZ+OVX+S sendo que a razão da calciúria/calcemia diminuiu, tendo possivelmente parte do cálcio do

suplemento sido depositado no osso já que a diminuição do conteúdo em cálcio do fêmur foi também atenuada pelo suplemento.

Ao tal como aconteceu no grupo dos animais ovariectomizados normoglicêmicos o suplemento, não afetou os marcadores de remodelação óssea, embora pareça ter atenuado a perda de osso trabecular (Tb Th) induzida pela ovariectomia. A espessura do osso cortical (tíbia), também não parece ter sido afetada pelo suplemento, embora o interstício ósseo, mesmo se poroso, esteja melhor preservado, apresentando um menor número de lacunas e de microfissuras, quando comparado com o osso dos animais ovariectomizados hiperglicêmicos não suplementados.

Quanto ao diâmetro e á massa femoral normalizada, é importante salientar que o peso normalizado dos fêmures aumentou nos animais suplementados, comparativamente ao grupo que não foi suplementado (STZ+OVX), embora o diâmetro normalizado do fêmur fosse semelhante ao deste grupo e superior ao do grupo (OVX+S). Em linha com estes resultados os parâmetros biomecânicos do osso femoral (módulo de Young, tensão de cedência e tensão máxima de fratura) apresentaram em média valores mais altos, neste três animais embora tenha havido uma grande dispersão nos resultados.

### **Conclusão:**

O Suplemento de cálcio de concha de ostra e goma guar parece ter produzido efeitos semelhantes aos verificados nos animais ovariectomizados normoglicêmicos, com exceção:

- Da massa corporal, cujo incremento, ao contrário do que se verificou nos animais ovariectomizados normoglicêmicos, não foi afetado pelo suplemento, não tendo sido possível constatar o efeito descrito na literatura e já verificado nos animais ovariectomizados suplementados com goma guar sobre o peso corporal.
- Da espessura do osso cortical, onde não foi possível observar nenhuma alteração.

Embora não podendo tirar conclusões sobre o efeito do suplemento ao nível dos metabolismos glucídico e lipídico, foi possível constatar que a suplementação com cálcio da concha de ostra e goma guar reverte parcialmente o desequilíbrio observado no grupo de animais hiperglicêmicos entre a formação da matriz e a mineralização óssea, elevando a percentagem do cálcio no osso e a espessura do osso trabecular.



# **CAPÍTULO - 8**

## **EXPERIÊNCIA COMPLEMENTAR**

## **8. Experiência complementar**

### **8.1. Suplementação**

A experiência complementar deve-se à não confirmação da hiperglicemia induzida pela estreptozotocina no grupo de animais (STZ+S) - hiperglicêmicos suplementados no capítulo 7, no final do período de 53 dias de suplementação após a ovariectomia, pois alguns dos animais que participaram nesse ensaio, revelaram valores de glicemia dentro dos normais no final do estudo. Por esse motivo, foi efetuada uma experiência complementar para verificar se a diminuição da glicemia se poderia atribuir ou não ao suplemento, já que esta só baixou após a ovariectomia.

### **8.2. Introdução/objetivo**

O consumo de fibra alimentar pode potencializar o caráter hipoglicemiante das fibras solúveis, diretamente relacionada com a redução na taxa de absorção da glucose alimentar, derivado ao aumento da viscosidade do conteúdo intestinal, que retarda o contato da glucose com a área absorptiva (Bugni, 2008). De acordo com Frias & Sgarbieri, (1998), o efeito da goma guar promove uma melhoria geral no estado dos ratos diabéticos em termos de ganho de peso corporal, elevação dos índices de absorção e utilização da proteína e redução da glicemia.

Alguns estudos sugerem que a goma guar pode ser usada eficazmente para reduzir a glucose pós-prandial no sangue (Cameron-Smith, D., Habito, R. & Barnett, M., 1997; Brenelli, Campos & Saad, 1997; Track, Cawkwell, Chin, Chiu, Haberer & Honey, 1985).

Os modelos de diabetes experimental em animais de laboratório têm sido amplamente utilizados para simular a diabetes mellitus. O modelo experimental pode ser induzido por estreptozotocina que provoca lesões irreversíveis nas células betas pancreáticas, as quais deixam de produzir a insulina, tornando o organismo diabético (Elliott, Ewchand & Altmann, 1997).

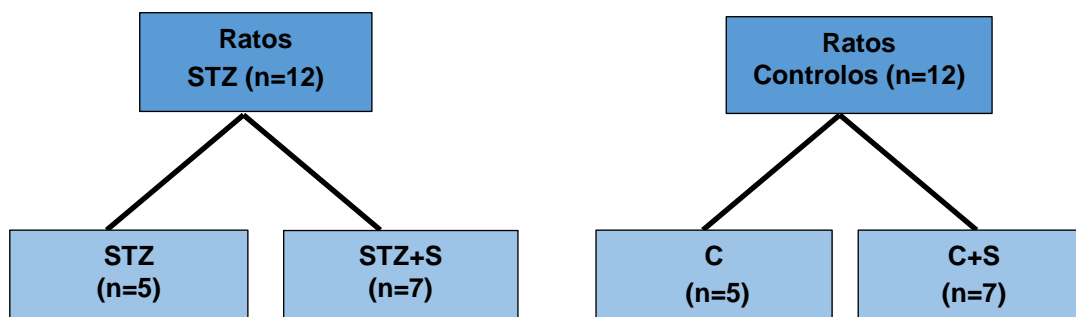
Esta experiência complementar teve como objetivo estudar o efeito da suplementação com cálcio do pó de concha de ostra e goma guar, em ratos com hiperglicemia crônica induzida por estreptozotocina através de comparação de alterações no peso corporal, peso de órgãos e ossos, níveis de glicemia e trigliceridemia no soro, cálcio urinário bem como do consumo da ração e de água e cálcio total ingerido por dia, entre ratos normoglicêmicos (controle) e hiperglicêmicos suplementados ou não.

### 8.3. Material e Métodos

#### 8.3.1. Animais de experiência

Ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*), com 2,5 meses de idade, foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: animal hiperglicémico suplementado (n=7) ou não (n=5) e normoglicémico suplementado (n=7) ou não (n=5) (Fig. 8.01). Os animais foram ambientados durante um período de 2 semanas e suplementados durante 8 semanas. Os animais suplementados ingeriram diariamente uma pellet contendo 0.110 g/Kg de pó de concha de ostra e 0.043 g/Kg de goma guar, respetivamente, enquanto os animais não suplementados ingeriram, durante o mesmo período, uma pellet idêntica mas apenas com ração comercial standard 4RF21-GLP. Durante o período de suplementação foram monitorizados diariamente, o consumo de ração e semanalmente o consumo de água (destilada) e o peso corporal dos animais (Balança Adam Equipment, modelo ADG 3000, precisão de 0,1g). As glicemias em jejum dos animais hiperglicémicos foram medidas no início do estudo, a cada 15 dias e antes do sacrifício no sangue total. As glicemias dos animais controlo foram apenas medidas no soro obtido do sangue colhido por punção cardíaca e através de análises bioquímicas, por métodos colorimétricos e enzimáticos no analisador automático (Olympus AU2700, Hamburgo, Alemanha) (método da hexoquinase- leitura UV para a glicémia) O mesmo método foi usado na avaliação da glicemia no soro dos animais hiperglicémicos, tendo sido usado o método colorimétrico do arsenazo III no mesmo equipamento, para determinar o teor de cálcio urinário nas amostras de urina excretada em 12h e, após sacrifício.

A monitorização da glicemia foi efetuada por meio de tira de teste (OneTouch Ultra-Easy- LifeScan) no sangue recolhido por picada na veia da cauda. Após o sacrifício os rins, fígado e coração, foram pesados em balança analítica (Ohrus, precisão de 0,01mg), lavados com soro fisiológico, após o que foram conservados em formol a 10% em tampão fosfato.



**Figura 8.01-** Grupos experimentais de acordo com o tratamento e a alimentação: Controlo normoglicémico- (C), Normoglicémico suplementado - (C+S), Hiperglicémico- (STZ) e Hiperglicémico suplementado- (STZ+S).

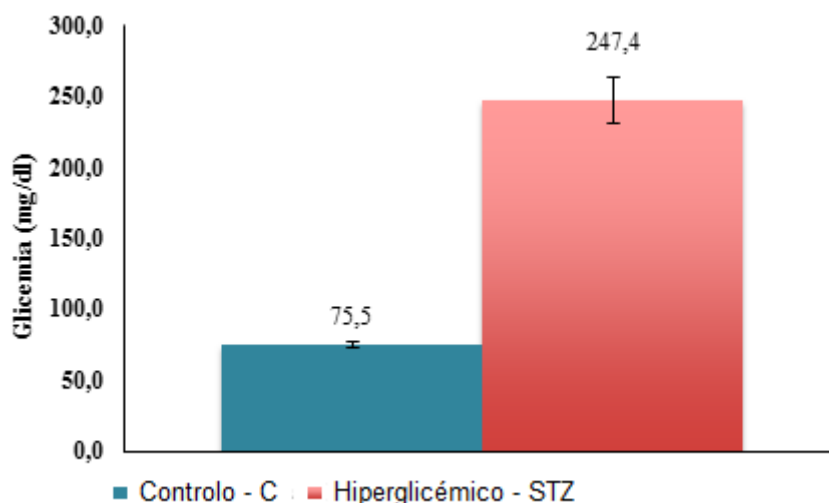
### 8.3.2. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando as ferramentas estatísticas disponíveis no programa Microsoft Excel. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média ( $M \pm SEM$ ). A comparação entre os diferentes grupos foi feita recorrendo ao T-Student. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$

## 8.4. Resultados

### 8.4.1. Níveis de glicemia no sangue total

No final do período de ambientação, todos os animais tinham uma glicemia em jejum considerada dentro dos valores normais ( $75,5 \pm 2,2$  mg/dl). Quinze dias após a indução da hiperglicemia com estreptozotocina (40 mg/kg) a 12 ratos, foi avaliada novamente a glicemia em jejum, para se confirmar que os mesmos se tinham efetivamente tornado hiperglicémicos, o que se veio a confirmar pois os animais destes grupos apresentavam todos valores de glicemia superiores 200 mg/dl (**Fig. 8.02**). Nesse dia os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos e um deles ( $n=7$ ) iniciou a suplementação que foi efetuada por um período de 51 dias. Os animais normoglicémicos também foram divididos em dois grupos tendo um deles sido suplementado. Neste caso o período de suplementação foi mais longo (56 dias).

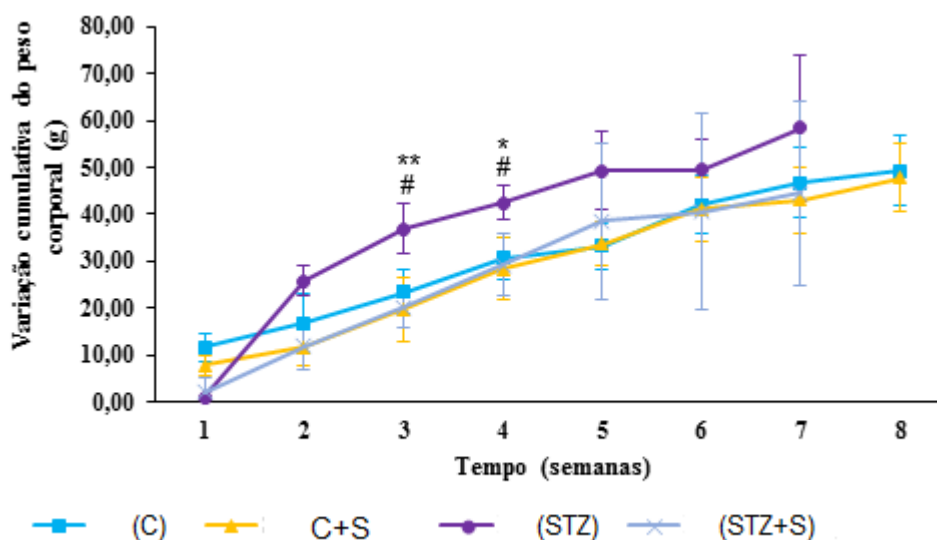


**Figura 8.02** – Gráfico dos valores de glicemia dos ratos Wistar tratados com soro fisiológico (controlo) e tratados com STZ.

### 8.4.2. Peso corporal

O peso corporal de todos os animais foi controlado semanalmente ao longo do estudo. A variação cumulativa do peso corporal foi semelhante entre os grupos de animais normoglicémicos (controlo e suplementados) (**Fig. 8.03**). Os animais hiperglicémicos (STZ) apresentaram maior aumento do peso corporal ao longo do estudo, o qual foi significativo na 3ª e 4ª semana comparativamente ao grupo controlo (C) e ao grupo hiperglicémico suplementado (STZ+S). Contudo, o aumento do peso corporal dos animais hiperglicémicos suplementados (STZ+S) foi semelhante ao dos animais controlo suplementados ou não.

No final do estudo a variação cumulativa do peso corporal nos ratos controlo e nos ratos controlo suplementados foi respetivamente de  $46,8 \pm 7,3$ g e  $42,9 \pm 7,0$ g. Já em relação aos ratos hiperglicémicos, os STZ aumentaram  $58,4 \pm 15,6$ g e os STZ+S aumentaram  $44,5 \pm 19,6$ g, ao longo dos 51 dias de estudo. Sendo que o aumento de peso dos animais do grupo STZ+S foi muito semelhante ao dos animais normoglicémicos. (**Fig. 8.03**)



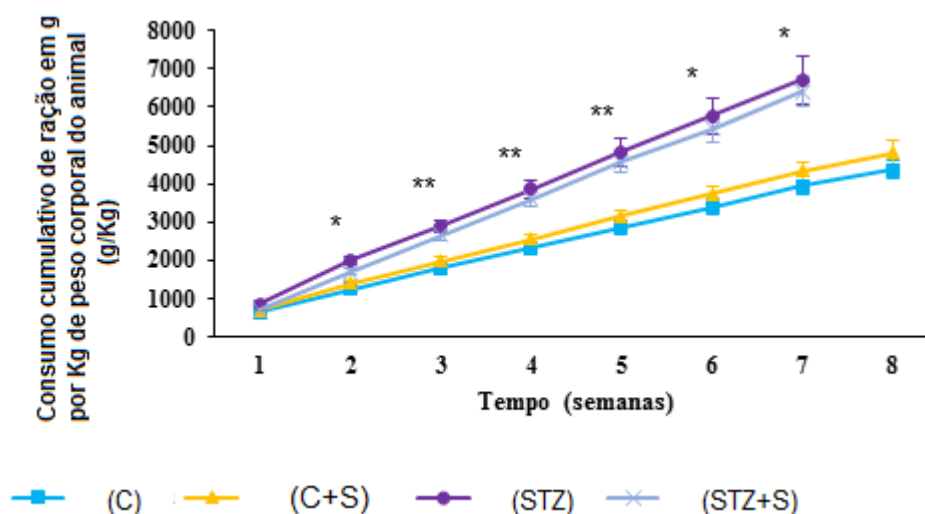
**Figura 8.03** – Gráfico da variação do peso corporal ao longo do estudo, dos quatro grupos de animais: C - controlo (n=5), C+S - controlo suplementados (n=7), STZ - animais hiperglicémicos (n=5) e STZ+S - animais hiperglicémicos suplementados (n=7); # indica diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre o grupo C e o grupo STZ; \* indica diferenças significativas ( $p < 0,005$  e  $**p < 0,001$ ) entre o grupo STZ e o grupo STZ+S.

Embora no final do estudo não existissem diferenças significativas na variação do peso corporal entre os diferentes grupos de animais, o incremento de peso dos animais STZ+S quando avaliado em comparação com os dos animais STZ foi em média de 17.7% contra os 23% destes últimos (**Tabela 8.01**)

**Tabela 8.01** Peso corporal dos animais estudados, no início e no final do período de suplementação: Controlo saudável (controlo) n= 5, controlo suplementado (C+S) n=7; hiperglicémico n=5; hiperglicémico suplementado (STZ+S) n=7. Os resultados são valores médios  $\pm$  desvio padrão.

Variáveis	C	C+S	STZ	STZ+S
Peso corporal (g) D0	153.0 $\pm$ 7.0	150.1 $\pm$ 10.0	253.3 $\pm$ 19.4	251.9 $\pm$ 14.0
Peso corporal (g) D51/D56	199.8 $\pm$ 7.6	193.0 $\pm$ 20.8	311.7 $\pm$ 21.0	296.4 $\pm$ 15.2

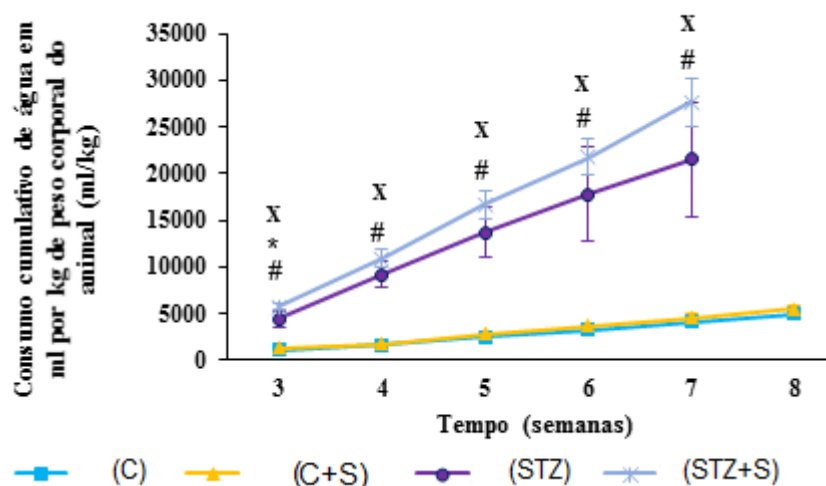
O consumo cumulativo de ração por kg de peso corporal revelou ser superior ( $p < 0,05$ ) nos animais STZ comparativamente aos animais do grupo C (**Fig. 8.04**). Verifica-se que, ao fim da sétima semana de estudo, os ratos STZ consumiram 6707,9 $\pm$ 614,96 g/kg, os animais STZ+S 6404,2 $\pm$ 400,7 g/kg, os do grupo S 4325,4 $\pm$ 246,8 g/kg e os animais controlo (C) 3949,6 $\pm$ 229,0 g/kg de peso corporal.



**Figura 8.04** – Gráfico do consumo cumulativo de ração em gramas por quilograma de peso corporal, ao longo do estudo, dos quatro grupos animais: C - controlo normoglicémico (n=5), C+S - controlo normoglicémico suplementado (n=7), STZ – hiperglicémico (n=5) e STZ+S – hiperglicémico suplementado \*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ) entre o grupo controlo e os grupos STZ (suplementado ou não) a partir da segunda semana.

O consumo cumulativo de água por kg de peso corporal revelou ser maior ( $p < 0,05$ ) nos animais STZ (suplementados ou não) comparativamente aos animais controlo (**Fig. 8.05**).

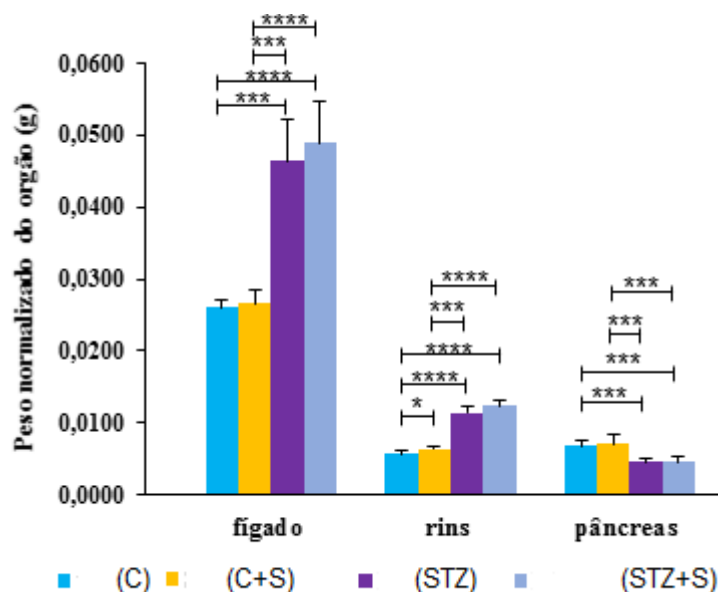
No total, os ratos STZ consumiram  $21530,6 \pm 6089,6$  mL/kg, os animais (STZ+S)  $27600,0 \pm 2670,6$  mL/kg, os ratos (C+S)  $4585,9 \pm 556,7$  mL/kg e os animais controle  $4147,9 \pm 460,4$  mL/kg de peso corporal. Já pela análise da (**Fig. 8.06**) é possível comparar os grupos de animais controles (suplementados ou não), ao longo do estudo, e verificar que não existem diferenças significativas entre estes relativamente ao consumo de água.



**Figura 8.05** – Gráfico do consumo cumulativo de água por kg de peso corporal ao longo do estudo: ratos controle (n=5), controle suplementado (n=7), hiperglicémicos (n=5) e hiperglicemicos suplementados. X indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo STZ; # indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo STZ+S; \* indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo STZ e o grupo STZ+S.

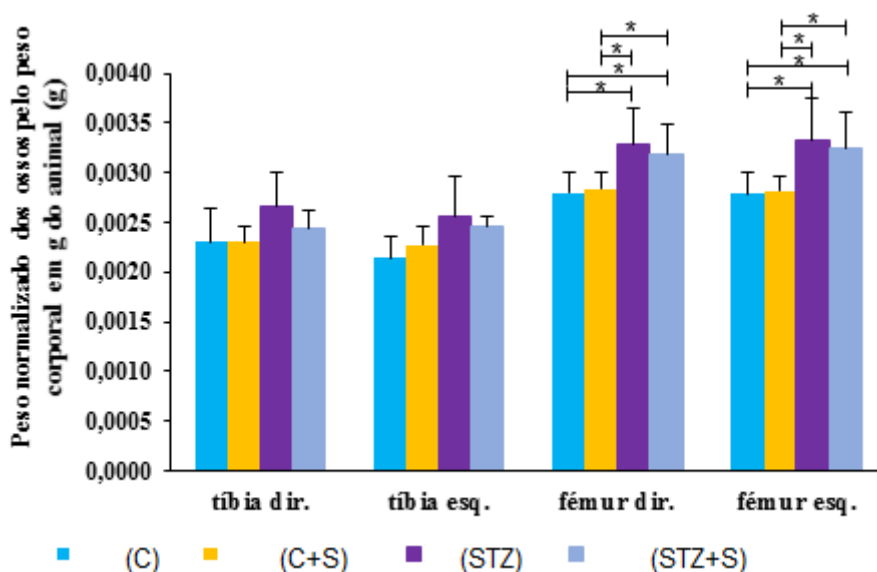
### 8.4.3. Peso de órgãos e de ossos

A Figura 8.06 apresenta o peso dos órgãos normalizado pelo peso corporal dos ratos imediatamente após o sacrifício. O fígado, os rins e o pâncreas dos animais (STZ+S) e (STZ) não apresentaram diferenças significativas entre si, assim como o fígado e o pâncreas dos ratos controles (C e C+S). No entanto, os rins dos animais C+S apresentaram pesos significativamente maiores que os dos animais controle. O fígado e os rins dos animais STZ (suplementados ou não) apresentaram pesos significativamente maiores que o dos ratos controles (C e C+S). O peso do coração dos animais STZ+S apresentou diferenças significativas relativamente aos animais controles (C e C+S), sendo mais pesado. Já o pâncreas dos ratos controles (suplementados ou não) apresentou pesos significativamente maiores que o dos ratos STZ (suplementados ou não).



**Figura 8.06** – Gráfico do peso dos órgãos (normalizados pelo peso corporal do animal) dos animais no final do estudo: controlos normoglicêmicos (n=5), controlos normoglicêmicos suplementados (n=7), hiperglicêmicos (n=5) e hiperglicêmicos suplementados (n=7) \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005; \*\*\*\*p<0,001.

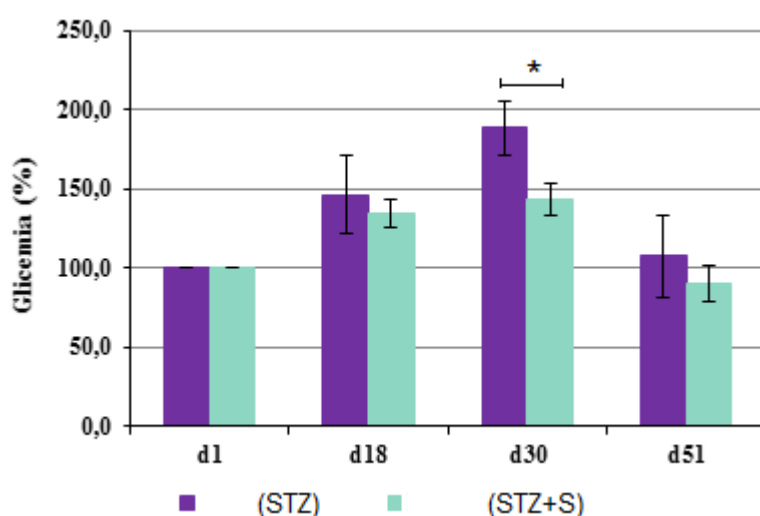
A **figura 8.07** apresenta os pesos dos ossos (tíbia e fêmur), normalizados pelo peso corporal dos ratos imediatamente antes do sacrifício. Tanto os fêmures como as tibias não apresentam diferenças significativas entre os animais controlos suplementados ou não e entre os animais hiperglicêmicos suplementados ou não. Os animais hiperglicêmicos apresentam uma tendência para ossos relativamente mais pesados sendo esta diferença significativa entre os fêmures dos grupos hiperglicêmicos (suplementados ou não) e os animais dos grupos controlo.



**Figura 8.07** – Gráfico do peso dos ossos normalizado (tibias e fêmures), dos animais no final do estudo: controlos normoglicêmicos (n=5), controlos normoglicêmicos suplementados (n=7), hiperglicêmicos (n=5) e hiperglicêmicos suplementados (n=7); \* p<0,05.

#### 8.4.4. Glicemia e trigliceridemia

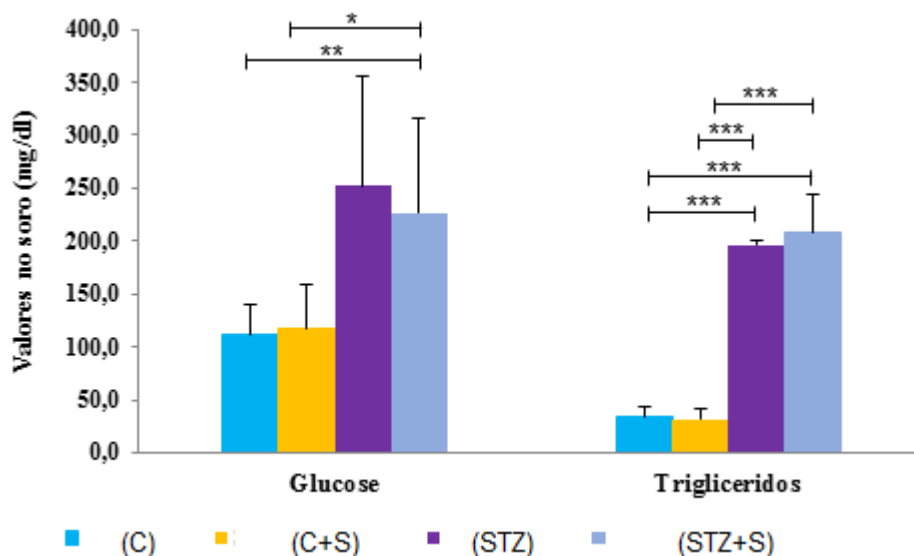
A glicemia em jejum dos animais hiperglicêmicos foi monitorizada durante o estudo tendo sido efetuada a primeira medição no primeiro dia do estudo antes do início da suplementação (dia 1) e as restantes realizadas aos dias 18, 30, e 51 (**Fig. 8.08**). Este controlo revelou uma tendência, ao longo do estudo, nos ratos hiperglicêmicos suplementados para glicemias menores do que os ratos hiperglicêmicos não suplementados, havendo significância estatística no 30º dia. No fim do estudo, os animais hiperglicêmicos não suplementados continuavam a apresentar valores de glicemia ligeiramente superiores aos valores iniciais (dia 1), enquanto os animais hiperglicêmicos suplementados apresentaram glicémias ligeiramente inferiores.



**Figura 8.08** – Gráfico da monitorização das glicemias em jejum dos animais hiperglicêmicos (n=5) e hiperglicêmicos suplementados (n=7) ao longo do estudo, \* p<0,05.

A análise das glicemias efetuadas no final do estudo (**Tabela 8.02**) confirmou mais uma vez, os valores de glicemia muito superiores dos animais hiperglicêmicos em comparação com as dos grupos controlo e a ausência de diferenças significativas da glicemia entre os grupos suplementados ou não (**Fig. 8.09**).

A análise dos triglicéridos de amostras de sangue no final do estudo (**Tabela 8.02**) revelou valores significativamente superiores nos animais hiperglicêmicos suplementados ou não comparativamente aos animais controlos. Contudo, não se observou qualquer efeito significativo no valor de triglicéridos, em resultado da suplementação (**Fig. 8.09**).



**Figura 8.09-** Gráfico do efeito da suplementação, na glicemia e nos triglicéridos dos grupos de animais: controle normoglicêmico (n=5), controles normoglicêmicos suplementados (n=7), hiperglicêmicos (n=5) e hiperglicêmicos suplementados (n=7); \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\* p<0,0005.

**Tabela 8.02** Valores das glicemias e dos triglicéridos séricos dos animais estudados, após sacrifício. Controle saudável (C) n= 5, controle suplementado (C+S) n=7; hiperglicêmico (STZ) n=5 e hiperglicêmico suplementado (STZ+S) n=7.

Variáveis	C	C+S	STZ	STZ+S
Glicémia (mg/dl)	81.5±19.7	89.8±23.5	259.1±101.7	<b>234.6±74.3<sup>ab</sup></b>
Triglicéridos (mg/dl)	33.6±7.5	30.0±10.1	<b>130.3±76.0<sup>aabb</sup></b>	<b>131.7±51.3<sup>aabb</sup></b>

Os resultados são valores médios ± desvio padrão; <sup>a</sup>p<0,05 e <sup>aa</sup>p<0,0005 indica diferenças significativas em relação ao controle; <sup>b</sup>p<0,01 e <sup>bb</sup>p<0,0005 em relação ao controle suplementado.

#### 8.4.5. Cálcio total ingerido por dia

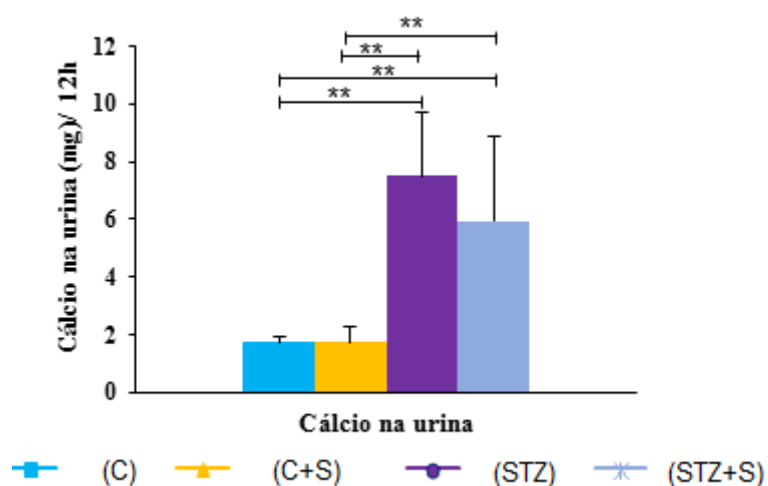
A tabela 8.03 apresenta os valores de cálcio total ingerido por dia, proveniente do suplemento de pó de concha de ostra (107 mg/kg) e da ração *standard* 4RF21-GLP. Confirma-se que os animais suplementados (hiperglicêmicos ou não) ingeriram mais cálcio por dia que os dos respectivos grupos controle, que não foram suplementados. Por outro lado, também se verificou que os animais hiperglicêmicos não suplementados consumiram diariamente mais cálcio que os animais do grupo controle, em resultado do maior consumo de ração.

**Tabela 8.03-** Cálcio total ingerido por dia na ração e no suplemento de pó de concha de ostra.

Grupo de animais	mg de cálcio ingerido/ 24h
Controlos normoglicémicos (C)	739
Controlos suplementados (C+S)	818
Hiperglicémicos (STZ)	1205
Hiperglicémicos suplementados (STZ+S)	1254

#### 8.4.6. Cálcio urinário

A análise do teor de cálcio nas amostras de urina, colhidas no final do estudo (**Fig. 8.10**), revelou valores do cálcio total urinário excretado em 12h, significativamente mais elevados nos grupos hiperglicémicos (suplementados ou não) comparativamente aos grupos controlos.



**Figura 8.10** – Gráfico da calciúria (mg/12h) dos grupos de animais estudados: controlos normoglicémicos (n=5), controlos normoglicémicos suplementados (n=7), hiperglicémicos (n=5) e hiperglicémicos suplementados (n=7); \*\*p<0,01.

## 8.5. Discussão dos resultados do estudo complementar

Os resultados deste estudo complementar, permitiram tirar algumas conclusões, que podem ajudar a compreender a razão da dificuldade encontrada em estudar o efeito do suplemento (pó de concha de ostra e goma guar), no grupo de animais diabéticos ovariectomizados.

Tal como foi descrito anteriormente, a administração intraperitoneal de estreptozotocina na dose de 40 mg/kg, induziu a destruição dos ilhéus pancreáticos (comprovada pela diminuição acentuada e significativa do peso do pâncreas dos animais que sofreram o tratamento) e conseqüentemente a diminuição da produção de insulina. Em conseqüência, estes animais apresentaram sinais característicos de DM2, tais como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, polifagia, poliúria e polidipsia, bem como um aumento mais acentuado de peso corporal, ao longo do estudo, do que os animais controlo.

Relativamente ao efeito do suplemento utilizado, em tudo semelhante ao usado nas experiências anteriores descritas nos Capítulos 6 e 7, verificou-se que os animais do grupo controlo normoglicémico que foram suplementados consumiram mais ração por kg de peso corporal que os animais do grupo controlo enquanto os animais hiperglicémicos suplementados ingeriram menos ração por kg de peso corporal que os hiperglicémicos. O facto dos controlos suplementados terem ingerido mais ração por kg de peso corporal que os controlos contraria a literatura, que afirma que os ratos suplementados com goma guar tendem a ingerir uma menor quantidade de alimento (Nasry, Abo-Youssef, & Abd El-Latif, 2013). A variação cumulativa do peso corporal do grupo suplementado foi contudo menor, embora não significativamente diferente da do grupo controlo, ainda que os primeiros tenham ingerido mais ração. Comparando os ratos hiperglicémicos (suplementados ou não) com os controlos (suplementados ou não) verificou-se que os ratos hiperglicémicos se apresentam hiperfágicos, uma vez que os primeiros consomem significativamente mais ração por kg de peso corporal que os animais dos grupos controlo. Contudo, pôde observar-se que o aumento de peso dos animais do grupo STZ+S, foi inferior ao dos do grupo STZ (em particular na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana após o início da suplementação) e semelhante ao dos animais normoglicémicos embora tivessem consumido praticamente a mesma quantidade de ração que os animais hiperglicémicos não suplementados e bastante mais do que os grupos de animais normoglicémicos.

Estes resultados comprovam o efeito da goma guar, já descrito por outros autores, na diminuição do ganho de peso (Butt, Shahzadi, Sharif, & Nasir, 2007; Track, Cawkwell, Chin, Haberer, & Honey, 1985; Frias, 1998; Seal & Mathers, 2001; Naureen, 2005; Butt, Shahzadi, Suleria, Sultan & Chohan, 2011).

Relativamente ao peso dos órgãos não se observaram diferenças significativas no peso do fígado e do rim, normalizado ao peso corporal, entre os grupos suplementados e os não suplementados (hiperglicémicos ou não), exceto os rins mais pesados dos animais controlo normoglicémicos suplementados face aos controlos. Comparando os ratos controlos aos hiperglicémicos encontram-se também diferenças significativas no peso dos órgãos estudados, com pesos normalizados significativamente maiores do fígado e rim dos hiperglicémicos. Estas diferenças estão relacionadas com a indução da DM2 e com o aumento significativo do peso corporal verificado neste grupo de animais, face aos controlos.

Relativamente ao peso normalizado da tibia e do fémur, não houve qualquer diferença relevante entre os grupos suplementados (hiperglicémicos ou não) e os não suplementados (hiperglicémicos ou não), constatando-se assim que não há um efeito observável que se deva à suplementação de goma guar e cálcio. O peso normalizado do osso, particularmente dos fémures dos animais hiperglicémicos (suplementados ou não) é, no entanto, mais elevado que o dos animais dos grupos controlo, o que se deve ao maior peso corporal dos animais mas provavelmente também ao efeito da hiperglicemia no osso cortical (Farr, Drake, Amin, Melton III, McCreedy & Khosla, 2014).

Os níveis de glicose e triglicéridos nas amostras de soro estudadas, não indicam diferenças significativas entre os grupos suplementados e os não suplementados (hiperglicémicos ou não). Estes resultados não coincidem com os estudos, que referem que a goma guar diminui a glicemia e a trigliceridemia (Cameron-Smith, Habito & Barnett, 1997; Saeed, Mosa-Al-Reza, Fatemeh, & Saeideh, 2012; Track, Cawkwell, Chin, Haberer & Honey, 1985; Frias & Sgarbieri, 1998; Naureen, 2005; Butt, Shahzadi, Suleria, Sultan, & Chohan, 2011; Butt, Aftab, & Sarif, 2007; Nasry, Abo-Youssef, & Abd El-Latif, 2013). Contudo, estes estudos, conduzidos quer em ratos hiperglicémicos (com níveis elevados de ambos os parâmetros) ou em saudáveis, utilizaram doses de goma guar na ração mais elevadas que as administradas neste estudo (Saeed, Mosa-Al-Reza, Fatemeh & Saeideh, 2012). No entanto foi possível observar que a glicemia em jejum (avaliada no sangue total) ao longo do período de suplementação foi sempre mais baixa nos animais hiperglicémicos suplementados do que nos não suplementados tendo sido essa diferença significativamente menor aos 30 dias. No final do período de suplementação o valor médio de glicemia dos animais suplementados era também inferior ao do início da suplementação enquanto no grupo de animais que não foram suplementados a glicemia era até ligeiramente superior à inicial. Destes resultados pode concluir-se que a goma guar na dose usada tenha permitido obter valores de glicemia em jejum mais baixos o que poderá dever-se ao facto da glicemia pós-prandial ter sido menor devido à presença da goma, tal como foi descrito por Bhardwaj *et al.*, 1994.

Em relação ao cálcio, os seus valores foram medidos em amostras de urina não havendo diferenças significativas, quer nos controlos quer nos hiperglicémicos, entre o grupo suplementado e o não suplementado, apesar dos grupos suplementados terem recebido diariamente o suplemento com goma guar e com pó de concha de ostra (que continha 40% de cálcio). Uma possível explicação para o facto de nos ratos suplementados (hiperglicémicos ou não) não haver níveis maiores de cálcio na urina em relação aos não suplementados (hiperglicémicos ou não) passa pela hipótese deste não estar a ser depositado no osso, tal como foi verificado anteriormente nos animais do grupo VI, mas que não pode ser comprovado neste estudo, dado não ter sido efetuada a quantificação do cálcio ósseo. Uma outra hipótese, também não comprovada, é a sua maior eliminação fecal.

Pelo contrário, a calciúria foi significativamente superior nos animais hiperglicémicos, o que se pode dever ao facto da hiperglicemia conduzir a uma taxa de filtração glomerular aumentada, elevando consequentemente a concentração urinária de cálcio (Ward, Yau, Mee, Mawer, Miller, Garland & Riccardi, 2001), mas também ao aumento do aporte de cálcio através da ração como foi verificado.

## **8.6. Conclusão:**

Este estudo permitiu verificar que com a dose de suplementação administrada:

- Há um decréscimo no ganho de peso dos animais (suplementados *versus* controlos e hiperglicémicos suplementados *versus* hiperglicémicos).
- Ao 30º dia do estudo, a glicemia em jejum era significativamente maior nos animais hiperglicémicos não suplementados que nos hiperglicémicos suplementados, sendo que essa diferença se refletiu também no aumento do peso corporal dos animais.
- No 51º dia não se observaram diferenças significativas nos níveis de glicemia em jejum, embora os valores de glicemia tenham regressado aos valores observados no 1º dia de suplementação. Isto é, apresentaram um pico aos 30 dias e a partir daí começaram a diminuir, embora os animais se tivessem mantido hiperglicémicos.
- No 51º dia, nos animais STZ+S, os valores médios da glicemia em jejum foram cerca de 20% mais baixos que os dos animais do grupo STZ.

- No final do estudo não se observaram diferenças significativas nos níveis séricos de glicemia e de triglicéridos em jejum, dos animais suplementados quando comparados com os não suplementados (hiperglicémicos ou não)
- As perdas urinárias de cálcio, mas também a sua ingestão, foram significativamente maiores nos animais hiperglicémicos suplementados ou não.

Relativamente ao principal objetivo deste estudo complementar, foi possível concluir-se que ao longo do estudo, os valores da glicemia em jejum, do grupo STZ, não foram constantes tendo diminuído cerca de 75% entre o 30<sup>o</sup> e o 51<sup>o</sup> dia e que o suplemento, possivelmente devido ao efeito da goma guar na absorção da glucose, contribuiu para uma diminuição ainda mais acentuada dos valores da glicemia, embora estes valores se tenham mantido em média acima dos 200 mg/dL. Por outro lado, nos animais desta experiência complementar, tratados com estreptozotocina (STZ), as glicemias séricas registadas aos 51 dias foram em média bastante mais elevadas ( $234.6 \pm 74.3$ ) do que as observadas aos 53 dias, nos animais STZ+OVX ( $198.00 \pm 21.65$ ) e STZ ( $167.33 \pm 7.54$ ) da experiência descrita no Capítulo 5. Esta diferença pode ser explicada com o facto destes últimos terem sido submetidos a laparotomia o que conduziu a picos pós-operatórios de hiperglicemia e conseqüentemente à morte dos animais que apresentavam à partida glicemias mais elevadas.

Talvez tenham sido estes os motivos para ter sido difícil observar valores séricos de glicemia superiores a 130 mg/dL, nos animais hiperglicémicos ovariectomizados suplementados (STZ+OVX+S), tendo, por isso, sido apenas possível efetuar o estudo completo em 3 animais deste grupo (capítulo 7).

Esta experiência permitiu ainda esclarecer os efeitos da goma guar (na dose utilizada), nos valores de glicemia e de triglicéridos, pois neste grupo de animais que apresentavam níveis significativamente elevados destes analitos não foi verificada uma diminuição significativa dos mesmos.



# **CAPÍTULO – 9**

## **SÍNTESE E CONCLUSÕES**

## 9. Síntese e conclusões

Nos últimos anos, os estudos sobre a relação da osteoporose com a diabetes mellitus têm sido em grande número e têm vindo a crescer as evidências de que os doentes com DM2 apresentam alterações ósseas que parecem estar diretamente associadas aos níveis sanguíneos de glicemia (hemoglobina A1c). Contudo, o mecanismo fisiopatológico que está na base da fragilidade óssea que alguns doentes diabéticos apresentam, não está totalmente esclarecido (Karim & Bouxsein, 2016). Recentemente, alguns autores têm também apontado a acumulação de gordura nos vasos sanguíneos, ou no caso do osso, no canal medular ósseo, como uma possível causa para a alteração do metabolismo do tecido adiposo e do tecido ósseo (Seeman, 2016).

Este trabalho, teve como um dos objetivos, avaliar o efeito da hiperglicemia no tecido ósseo, ao nível ultraestrutural, metabólico e biomecânico, estudando um osso particularmente sensível à fratura – o osso osteoporótico, para procurar ajudar a responder à questão: Será o osso osteoporótico de animais com hiperglicemia crónica, diferente do ponto de vista ultraestrutural e biomecânico e mais suscetível à fratura óssea do que o osso osteoporótico de animais normoglicémicos? Pois, embora vários estudos tenham sido efetuados no rato (Qian, Zhu, Yu, Jiang, & Zhang, 2015; Picke, *et al.*, 2016) para avaliar o efeito da diabetes no osso, nunca foi usado o modelo de rato osteoporótico, que se assemelha mais à condição humana da pós-menopausa.

Por outro lado procurou-se responder também a duas outras questões:

Será eficaz e segura, na osteoporose, a administração de um suplemento de cálcio (carbonato de cálcio do pó de concha de ostra) com elevada biodisponibilidade, numa dose inferior à da suplementação atualmente recomendada (cerca de 1/3), cuja dose parece não ser segura? E, se esse suplemento de cálcio for associado a uma fibra alimentar hidrossolúvel, goma guar, trará benefícios, ao nível metabólico e ósseo, nos animais osteoporóticos com hiperglicemia crónica?

Relativamente às questões colocadas e com as limitações inerentes ao modelo experimental utilizado, o rato Wistar fêmea tornado hiperglicémico por administração de uma dose única de streptozotocina e com osteoporose induzida por ovariectomia, o trabalho efetuado permitiu chegar às seguintes conclusões:

- A hiperglicemia crónica induz alterações ultraestruturais do osso cortical tornando-o menos frágil, quer pelo alargamento do canal medular que afasta a matriz óssea do eixo

do osso conferindo-lhe maior resistência à fratura, mas também pelo aumento da produção de matriz óssea (colagénio tipo 1). Estas alterações na volumetria do osso contribuem para aumentar a sua resistência.

A hiperglicemia induz ainda o aumento das lacunas ósseas que a longo prazo podem conduzir ao aumento da porosidade do osso cortical e contribuir para a crescente fragilidade óssea. Esta fragilidade pode ser agravada pela acentuada perda de cálcio que também se verifica e que conduz a uma progressiva desmineralização óssea. Este mecanismo pode explicar pelo menos em parte, o facto dos doentes diabéticos com elevada porosidade óssea serem mais propensos a fracturas de fragilidade.

- A concha de ostra abundante na orla costeira Portuguesa, reduzida a pó, poderá ser utilizada como suplemento de cálcio, permitindo a utilização de doses mais baixas, dada a sua elevada biodisponibilidade.

De facto o estudo efetuado permitiu chegar à conclusão de que a suplementação com pó de concha-de-ostra e goma guar, numa dose equivalente humana moderadamente baixa de cálcio (420 mg/dia), durante 53 dias, em animais deficientes em estrogénios, atenuou a hipocalcemia, a calciúria, a desmineralização e fragilidade ósseas, e o incremento da massa corporal, sem formação de depósitos vasculares, renais e hepáticos de cálcio. Efeitos semelhantes foram observados nos animais hiperglicémicos osteoporóticos, com exceção das alterações verificadas no peso corporal e na espessura do osso cortical da tibia.

Estes resultados confirmam a biodisponibilidade do cálcio do suplemento de concha-de-ostra associado à goma guar e sugerem que o tratamento com este suplemento de cálcio, mesmo numa dose baixa, protege o osso cortical e diminui a probabilidade de fratura, pelo menos do osso femoral, comprovando que a personalização da suplementação com cálcio numa dose e formulação adequadas é um meio barato, seguro e eficaz de prevenção da fragilidade do osso associada á osteoporose por deficiência em estrogénios.

- A goma guar, administrada numa dose também baixa (dose equivalente humana de 414 mg/dia), parece ter favorecido, tal como já descrito (Hara, Susuki, Kasai, Aoyama & Ohta,1999), a absorção do cálcio presente no suplemento, já que se constatou a deposição óssea de cálcio, nos animais que foram suplementados.

Contudo, embora se tenha verificado uma redução do ganho de peso nos animais normoglicémicos ovariectomizados suplementados, comparativamente aos não suplementados, o mesmo não aconteceu nos animais ovariectomizados

hiperglicémicos. A experiência complementar efetuada para verificar o efeito do mesmo suplemento em ratos só hiperglicémicos permitiu, contudo, verificar um menor incremento do peso corporal dos animais suplementados, apesar destes consumirem mais ração, do que os não suplementados.

Por outro lado não foi possível comprovar o efeito da goma guar na diminuição da glicemia e dos triglicéridos, nos animais hiperglicémicos, embora no final da suplementação os valores da glicemia em jejum fossem cerca de 20% mais baixos nos animais suplementados comparativamente aos não suplementados. A razão para este reduzido efeito pode ter sido a baixa dose de goma guar utilizada no suplemento.

Julgamos, com este trabalho ter dado um contributo para melhor compreender as controvérsias reportadas nos diferentes estudos efetuados nas mulheres diabéticas na pós-menopausa e para chamar a atenção da importância da suplementação com cálcio nesta condição patológica, para a prevenção da fratura óssea, recorrendo a fontes de cálcio com elevada biodisponibilidade e em doses seguras.

A elevada importância deste tema para a saúde pública, dado que a DM2 é a forma mais comum de diabetes e afeta cerca de 344 milhões de pessoas em todo o mundo (Guariguata, Nolan, Beagley, Linnenkamp & Jacqmain, 2013) justifica que se continue a investir no estudo dos mecanismos fisiopatológicos que estão na base das alterações ósseas que ocorrem na DM2, nomeadamente os aspetos hormonais a ela associados e o seu impacto na remodelação e integridade ósseas (exs.: osteocalcina e paratormona), de modo a poder desenvolver *guidelines*, que permitam avaliar o risco de fratura e simultaneamente encontrar soluções terapêuticas que permitam prevenir eficazmente as fraturas nestes doentes.

Face aos resultados obtidos pode concluir-se que a concha de ostra, que constitui um resíduo da indústria alimentar poderá ser aproveitada como suplemento alimentar de cálcio, associada à goma guar com vantagens face aos outros suplementos de cálcio utilizados, em particular nos doentes diabéticos, permitindo assim acrescentar valor à economia do setor agroalimentar.

## 10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdulameer, S.A., Sulaiman, S.A.S., Hassali, M.A.A., Subramaniam, K. & Sahib, M.N. (2012). Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: what do we know, and what we can do? 6: 435– 448. Doi.org/10.2147/PPA.S32745
- ADA - American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 34 (1): 62-69.
- Aires, M.M. (2008). Fisiologia. (Ed. pp. 251). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan
- Akao, M., Abe, R., Sato, N., Hasegawa-Tanigome, A., Kumagai, H., Kumagai, H. (2015). Prevention of Osteoporosis by Oral Administration of Phytate-Removed and Deamidated Soybean  $\beta$ -Conglycinin. *Int J Mol Sci*, 16: 2117-2129. Doi: 10.3390/ijms16012117
- Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Verdi, A. A., Mofidian, S.M.A & Rad, B. L. (2007). Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22 (2): 60– 64. Doi.10.1007/BF02913315.
- Alexeeva, L., Burkhardt, P., Christiansen, C., Cooper, C., Delmas, P., Johnell, O., Johnson, C., Kanis, J.A., Lips, P., Melton, L.J., Meunier, P., Seeman, E., Stepan, J. & Tosteson, A. (1994). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *WHO Technical Report Series*. 843: 1-129.
- American Association of Cereal Chemists. (2001). The Definition of Dietary Fiber. Executive Summary and Dietary Fiber Definition, 46 (1): 112.
- Andersson, B., Johannsson, G., Holm, G., Bengtsson, B.A., Sashegyi, A., Pavo, I., Mason, T, & Andersson, P.W. (2002). Raloxifene does not affect insulin sensitivity or glycemic control in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus: A Randomized Clinical Trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 122 – 128.
- APDP - Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal. (2011). Portal da Diabetes: Factos e números. [Online]. [cited 2014 Agosto]. Available from: <http://www.apdp.pt/index.php/diabetes/factos-e-numeros>.
- Ardawi, M.S., Akhbar, D.H., Alshaikh, A., Ahmed, M.M., Qari, M.H., Rouzi, A.A., Ali, A.Y., Abdulrafee, A.A., & Saeda, M.Y. (2013). Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-1 are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. *Bone*, 56 (2): 355-362. Doi: 10.1016/j.bone.2013.06.029.
- Arjmandi, B.H., Hollis, B.W., & Kalu, D.N. (1994). In vivo effect of 17 $\beta$ -estradiol on intestinal calcium absorption in rats. *Bone Miner*, 26: 181-189.
- Armas, L.A.G., Akhter, M.P., Drincic, A., & Recker, R.R. (2012). Trabecular bone histomorphometry in humans with type 1 diabetes mellitus. *Bone*, 50 (1):91-96.
- Arora, S., Ojha, S., & Vohora, D. (2009). Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice. *Global Journal of Pharmacology*, 3 (2): 81-84).
- Ashton, A. (1991). “Oyster-watch” for monitoring coal ash lagoons in an environmentally sensitive area of Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.*, 22 (7): 334-339.
-

- Avolio, G., Brandão, C.M.A., Oliveira, J.X., Costa, C., & Alonso, G. (2008). O papel da vitamina D3 e da osteocalcina no metabolismo ósseo: uma análise necessária para se otimizar a ósseo integração. *Rev Inst Ciênc Saúde*, 26 (3): 347-50.
- Bandeira, F., Gharib, H., Golbert, A., Griz, L., & Faria, M. (2014). Endocrinology and diabetes: A Problem – Oriented Approach. (Ed.3, pp.310-319). Rio de Janeiro, RJ: Springer. Doi: 10.1007/978-1-4614-8684-8.
- Bartel, D.L., Davy, D.T., & Keaveny, T.M. (2007). Orthopaedic Biomechanics: Mechanics and design in musculoskeletal systems. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22 (12): 1885-92.
- Behall, K.M. (1990). Effect of soluble fibers on plasma lipids, glucose tolerance and mineral balance. *Adv Exp Med Biol*, 270: 7-16.
- Bellet, T., Coppieters, K. & Herrath M. (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiological Reviews Journal*, 91: 79-118.
- Berton, D.C. (2010). Desenvolvimento e Validação de uma Metodologia Bioanalítica para Quantificação de Risedronato em Plasma Humano Utilizando a Técnica de Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). Tese de Mestrado em Ciências da Saúde, Farmacologia Clínica e Geral – Campus Bragança Paulista. Universidade São Francisco, São Paulo, Brasil. 59 pp.
- Bolland, M.J., Avenell, A., Baron, J.A., Grey, A., MacLennan, G.S., Gamble, G.D., & Reid, I.R. (2010). Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. *BMJ*, 341: c3691. Doi:10.1136/bmj.c369.
- Bolland, M.J., Grey, A., Avenell, A., Gamble, G.D., & Reid, I.R. (2011). Calcium supplements with or without vitamin D and risk of cardiovascular events: reanalysis of the Women's Health Initiative limited access dataset and meta-analysis. *BMJ*, 342: d204. Doi:10.1136/bmj.d2040.
- Bolland, M.J., Grey, A., Reid, I.R. (2013). Calcium supplements and cardiovascular risk: 5 years on. *Ther Adv Drug Saf*, 4:199–210. Doi: 10.1177/ 2042098613499790.
- Bolland, M.J., Leung, W., Tai, V., Bastin, S., Gamble, G.D., Grey, A., & Reid, I.R. (2015). Calcium intake and risk of fracture: systematic review. *BMJ*, 351: h4580. Doi: 10.1136/bmj.h4580.
- Bonner-Weir, S., Trent, D. F., & Weir, G. C. (1983). Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *Journal of Clinical Investigation*, 71 (6): 1544– 1553.
- Branco, J.C., Felicíssimo, P., Monteiro, J. A. (2009). Epidemiologia e o impacto socioeconômico das fraturas da extremidade proximal do fêmur, uma reflexão sobre o padrão atual de tratamento da osteoporose grave. *Acta Reumatol Port*, 4: 475-85.
- Brenelli, S.L., Campos, S.D.S., & Saad, M.J.A.. (1997). Viscosity of gums in vitro and their ability to reduce postprandial hyperglycemia in normal subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30 (12):1437-1440. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1997001200009>.
- Bugni, F.M., Da Cunha, I.A., Araújo, M.A., Da Costa, M.C., Pacheco, G.D., Silva, P.F., Balarin, M.R., Da Silva, C.A., & Navarro, I.T. (2008). Action of  $\beta$ -glucan in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Ver Bras Parasitol Vet.*, 17 (1):249-59.
- Burghardt, A.J., Issever, A.S., Schwartz, A.V., Davis, K.A., Masharani, U., Majumdar, S., & Link, T.M. (2010). High-resolution peripheral quantitative computed tomographic imaging of

cortical and trabecular bone microarchitecture in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 5045-5055. Doi:10.1210/jc.2010-0226.

Butt, M., Aftab, A. & Sarif, M. (2007). Influence of Pectin and Guar Gum Composite Flour on Plasma Biochemical Profile of Streptozotocin-Induced Diabetic Male Albino Rats. *International Journal of Food Properties*, 10: 345-361.

Butt, M.S., Shahzadi, N., Sharif, M.K. & Nasir, M. (2007). Guar gum: a miracle therapy for hypercholesterolemia, hyperglycemia and obesity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47: 389-396.

Butt, M.S., Shahzadi, N., Suleria, H.A.R., Sultan, T. & Chohan, M.I. (2011). Effect of dietary fiber in lowering serum glucose and body weight in sprague dawley rats. *Functional Foods in Health and Disease*. 8: 261-278.

Caetano-Lopes, J., Nery, A.M., Canhão, H., Duarte, J., Cascao, R., Rodrigues, A., Perpetuo, I.P., Abdulghani, S., Amaral, P.M., Sakagushi, S., Konttinen, Y., Graca, L., Vaz, M.F., & Fonseca, J.E. (2010). Chronic arthritis leads to disturbances in the bone collagen network. *Arthritis Research Therapy*, 12:R9. Doi: 10.1186/ar2908

Cameron-Smith, D., Habito, R., Barnett, M. & Collier, G.R. (1997). Dietary Guar Gum Improves Insulin Sensivity in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *The Journal of Nutrition*, 127: 359-364.

Carvalho, M., Kulak, C.A.M. & Borba, V.Z.C. (2012). Prevalência de hipercalcúria em mulheres na pós-menopausa com osteoporose. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 56 (1):1-5.

Chandran, M., Tan, M., & Tay, D. (2016). Axial BMD in South East Asian patients with type 2 DM: How do race and BMI matter? *Osteoporosis International*, 27 (1):79.

Charles, P. (1992). Calcium absorption and calcium bioavailability. *Journal of Internal Medicine*, 231 (2): 161-168.

Chau, D.L., & Edelman, S.V. (2002). Osteoporosis and Diabetes, *MD. Clinical Diabetes*, 20 (3): 153-157.

Chen, T.C., Chimeh, F., Lu, Z., Mathieu, J.; Person, K.S., Zhang, A., Kohn, N.; Martinello, S., Berkowitz, R., & Holick, M. F. (2007). Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*, 460 (2): 213-217.

Cherbut, C., Albina, E., & Champ, M. (1990). Action of guar gums on the viscosity of digestive contents and on the gastrointestinal motor function in pigs. *Digestion Journal*, 46: 205-213.

Ciarelli, T., Fyhrie, D., Schaffler, M. & Goldstein, S. (2000). Variations in Three-Dimensional Cancellous Bone Architecture of the Proximal Femur in Female Hip Fractures and in Controls. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(1):32-40, ISSN 0884-0431. Doi: 10.1359/jbmr.2000.15.1.32.

Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3 (3):S131 – S139. Doi.org/10.2215/CJN.04151206.

Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.C., Jorns, A., Lenzen, S., & Eizirik, D. (2005). Mechanisms of Pancreatic Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities. *Diabetes Journal*, 54: S97- S107.

- Correia-Santos, A.M., Suzuki, A., Anjos, J.S., Rêgo, T.S., Almeida, K.C.L., & Boaventura, G.T. (2012). Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratos wistar. *Revista.fmrp.usp.br.*, 45 (4): 436-44.
- Cunha, J.S., Ferreira, V.M., Maquigussa, E., Naves, M.A., & Boim, M.A. (2014). Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. *Cell Tissue Res*, 358 (1): 249-56. Doi: 10.1007/s0044-014-1913-x.
- Cunha, S. (2005). Factores de risco de osteoporose feminina: Avaliação do risco segundo ORAI e realização de DEXA. *Rev. Port. Clin. Geral*, 21:537-543.
- Damasceno, D.C., Netto, A.O., Iessi, I.L., Gallego, F.Q., Corvino, S.B., Dallaqua, B., Sinzato, Y.K., Bueno, A., Calderon, I.M.P., & Rudge, M.V.C. (2014). Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *BioMed Research International Journal*, 2014:1-11. Doi.org/10.1155/2014/819065
- Danielsen, C.C., Mosekilde, L., & Svenstrup, B. (1993). Cortical bone mass composition and mechanical properties in female rats in relation to age, long term ovariectomy and estrogen substitution. *Calcif. Tissue Int*, 52: 26-33.
- De La Garza-Rodea, A., Knaan-shanzer, S., Den Hartigh, J., Verhaegen, A., & Van Bekkum, D. (2010). Anomer-Equilibrated streptozotocin solution for the induction of experimental diabetes in mice (*Mus Musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49 (1): 40-44.
- Deutsch, J., Young, W., & Kalogerist, T. (1978). The stomach signals satiety. *Science Journal*, 201: 165-167.
- Dionand, S.M. (2012). The fragile beauty of bone architecture. *Medicographia*, 34:163-169.
- Donath, M., Ehres, J., Maedler, K., Chumann, D., & Ellingsgaard, H. (2005). Mechanisms of  $\beta$ -Cell Death in Type 2 Diabetes. *Diabetes Journal*, 54 (2): 2-7.
- Drewnowski, A. (1998). Energy density, palatability, and satiety: implications for weight control. *Nutrition Reviews Journal*, 56: 347-353.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). (2015). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for calcium. *EFSA J.*, 13: 4101. Doi:10.2903/j.efsa.2015.4101
- EFSA News Story: EFSA sets European dietary reference value for nutrients intakes. [Online]. 2010 [cited 2014 Julho]. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/nda100326.htm>.
- Einhorn, T.A., Boskey, A.L., Gundberg, C.M., Vigorita, V.J., Devlin V.J., & Beyer, M.M., (1988). The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes. *J Orthop Res*, 6:317–323. Doi: 10.1002/jor.1100060303.
- Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., & Essien, U. N. (2013). Review of The Mechanism of Cell Death Resulting from Streptozotocin Challenge in Experimental Animals, its Practical use and Potential Risk to Humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12: 60. Doi.org/10.1186/2251-6581-12-60.
- Elliott, J. I., Ewchand, H., & Altmann, D. M. (1997). Streptozotocin-induced diabetes in mice lacking  $\beta$ cells. *Clinical Experimental Immunology*, Bethesda, USA, v.109, p.116-120.

- Engelsen, O. (2010). The Relationship between Ultraviolet Radiation Exposure and Vitamin D Status. *Nutrients*, 2 (5): 482 – 495. Doi:10.3390/nu2050482
- Eriksen E.F., Colvard D.S., Berg N.J., Graham M.L., Mann K.G., Spelsberg T.C., & Riggs B.L. (1988). Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 241:84-6.
- Fajardo, R.J., Karim, L., Calley, V.I., & Bouxsein, M.L. (2014). A review of rodent models of type 2 diabetic skeletal fragility, *J. Bone Miner. Res*, 29 1025-1040.
- Farr, J.N., Drake, M.T., Amin, S., Melton III, L.J., McCready, L.K., & Khosla, S. (2014). In vivo assessment of bone quality in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Bone Miner Res*, 29: 787-795. Doi:10.1002/jbmr.2106.
- Fernandez, M. (1995). Distinct mechanisms of plasma LDL lowering by dietary fiber in guinea pig: specific effects of pectin, guar gum and psyllium. *Journal of Lipid Research*, 36: 2394-2404.
- Ferrari, S. (2016). Diabetoporosis and fat tissue. *Osteoporosis International*, 27 (1): 37.
- Florence, T.M., Stauber, J.I., & Ahsanullah, M. (1994). Toxicity of nickel ores to marine organisms. *Sci. Total Environ*, 148: 139-155.
- Fonseca, J.E. (2012). Bone biology: from macrostructure to gene expression. *Medicographia*, 34: 142-148.
- Frias, A.C., & Sgarbieri, V.C. (1998). Guar gum effects on food intake, blood serum lipids and glucose levels of Wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr.*, 53 (1): 15–28.
- Fujita, T., Fujii, Y., Kitagawa, R., & Fukase, M. (1993). Calcium supplementation in osteoporosis. *Osteoporosis International*, 3 (1), 159-162.
- Fujita, T., Fukase, M., Nakada, M., & Koishi, M. (1988). Intestinal absorption of oyster shell electrolyte. *Bone Miner*, 4:321-327
- Fujita, T., Ohue, M., Fujii, Y., Miyauchi, Y., & Takagi, Y. (2004). Reappraisal of katsuragi calcium study, a prospective, double-blind, placebo-controlled study of the effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) on vertebral deformity and fracture. *J Bone Miner Metab*, 22: 32-38.
- Fujita, T., Ohue, T., Fujii, Y., Miyauchi, A., Takagi, Y. (1996). Heated oyster shell-seaweed calcium (AAA Ca) on osteoporosis. *Calc Tissue Int*, 58: 226-230.
- Funk, J.R., Hale, J.E, Carmines, D., Gooch, H.L., & Hurwitz, S.R. (2000). Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *J Orthop Res*, 18 (1):126–132. Doi: 10.1002/jor.1100180118.
- Funk, L.J. (2007). Distúrbios do pâncreas endócrino. In Mcphee S.J., Ganong, W.F. *Fisiopatologia da doença: Uma introdução à medicina clínica*. (Ed.5d, pp. 437-462). Mc Graw Hill; AMGH.
- Galisteo, M., Duarte, J., & Zarzuelo, A. (2008). Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *Nutricional Biochemistry Journal*, 47: 389-396.
- Gallagher, J.C., Riggs, B.L., DeLuca, H.F. (1980). Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 51: 1359-1364.

- Garcia-Martin, A., Rozas-Moreno, P., Reyes-García, R., Morales-Santana, S., García-Fontana, B., García-Salcedo, J.Á., & Muñoz-Torres, M. (2012). Circulating levels of sclerostin are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 234-241.
- Gennari, C., Agnusdei, D., Nardi, P., Civitelli, R. (1990). Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, in oophorectomized women. *J Clin Endocrinol Metab*, 71: 1288 -1293.
- Gennari, L., Merlotti, D., Valenti, R., Ceccarelli, E., Ruvio, M., Pietrini, M.G., Capodarca, C., Franci, M.B., Campagna, M.S., Calabrò, A., Cataldo, D., Stolakis, K., Dotta, F., & Nuti, R. (2012). Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 97:1737 – 1744.
- Giangregorion, L.M., Leslie, W.D., Lix, L.M., Johansson, H., Oden, A., McCloskey, E., & Kanis, J.A. (2012). FRAX underestimates fracture risk in patients with diabetes. *J Bone Miner Res*, 27: 301-308. Doi:10.1002/jbmr.556
- Gonçalves, M.J., Rodrigues, A.M., Canhão, H., & Fonseca, J.E. (2013). Osteoporosis: From bone biology to individual treatment decision. *Acta Med. Port*, 26 (4):445-455.
- Guariguata, L. (2012). By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes research and clinical Practice*, 98: 524-525.
- Guariguata, L., Nolan, T., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Jacqmain, O. (2013). Internacional Diabetes Federation. Diabetes atlas sixth edition. *International Diabetes Federation*
- Hammond, M.A., Gallant, M.A., Burr, D.B., & Wallace, J.M. (2014). Nanoscale changes in collagen are reflected in physical and mechanical properties of bone at the microscale in diabetic rats. *Bone*, 60:26–32. Doi.org/10.1016/j.Bone.2013.11.015.
- Hara, H., Suzuki, T., Kasai, T., Aoyama, Y., & Ohta, A. (1999). Ingestion of Guar Gum Hydrolysate, a soluble fiber, increases calcium absorption in totally gastrectomized rats. *J. Nut.*, 129: 39-45.
- Heini, A., Lara-Castro, C., & Schneider, H. (1998). Effect of hydrolyzed guar fiber on fasting and postprandial satiety and satiety hormones: a double-blind, placebo-controlled trial during controlled weight loss. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 22: 906-909.
- Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., Ivergard, M., McCloskey, E.V., Jonsson, B., Dimai, H.P., & Kanis, J.A. (2013). Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*, 8: 136. Doi: 10.1007/s11657-013-0136-1.
- Holick, M.F. (2006). The role of vitamin D for bone health and fracture prevention. *Curr Osteoporos Rep*, 4 (3): 96-102.
- Horton, J., Já, C., & Spady, D. (1994). Regulation of hepatic 7 alpha-hydroxylase expression by dietary psyllium in the hamster. *The Journal of Clinical Investigation*, 93: 2084-2092.
- Hough, F.S., Pierroz, D.D., Cooper, C., Ferrari, S.L. & IOF CSA Bone and Diabetes Working Group. (2016). Mechanisms in endocrinology: Mechanisms and evaluation of bone fragility in type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*, 174 (4): R127-38. Doi: 10.1530/EJE-15-0820.

- Howarth, N.C., Saltzman, E., & Roberts, S. (2001). Dietary fiber and weight regulation. *Nutrition Reviews Journal*, 59: 129-139.
- Huanxin, W., Lejun, Z. & Presley, B.J. (2000). Bioaccumulation of heavy metals in oyster (*Crassostrea virginica*) tissue and shell. *Environ. Geol.*, 39 (11): 1216-1226.
- IDF - International Diabetes Federation. (2003). *Diabetes Atlas*.
- Institute of Medicine. (2010). Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press.
- Isidro, M., Ruano, B. (2010). Bone disease in diabetes. *Current Diabetes Reviews Journal*, 6: 144-155.
- Jenkins, D. J., Wolever, T. M., Leeds, A. R., Gassull, M. A., Haisman, P., Dilawari, J., Goff, D.V., Metz, G.L, & Alberti, K.G. (1978). Dietary fibres, fibre analogues, and glucose tolerance: importance of viscosity. *British Medical Journal*, 1 (6124): 1392– 1394. Doi: 10.1136/bmj.1.6124.1392.
- Jenkins, D., Kendall, C., & Vuksan, V. (2000). Viscous fibers, health claims, and strategies to reduce cardiovascular disease risk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 401-402.
- Jordan, N., Barry, M., & Murphy, E. (2006). Comparative effects of antiresorptive agents on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *Clin Interv Aging*, 1 (4):377– 387.
- Kalu, D.N. (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Mineral*, 15 (3): 175-91.
- Kanis, J.A. (2007). World Health Organization: Assessment of osteoporosis at the primary health care level. Summary Report of a WHO Scientific Group. WHO, Geneva.
- Karhunen, L., Juvonen, K., & Huotari, A. (2008). Effect of protein, fat carbohydrate and fibre on gastrointestinal peptide release in humans. *Regulatory Peptides Journal*, 149: 70-78.
- Karim, L., & Bouxsein, L. (2016). Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties. *Bone*, 82: 21-27.
- Karim, L., Tang, S.Y., Sroga, G.E., & Vashishth, D. (2013). Differences in non-enzymatic glycation and collagen cross-links between human cortical and cancellous bone. *Osteoporos Int*, 24 (9):2441-2447. Doi: 10.1007/s00198-013-2319-4.
- Kierszenbaum, A.L. (2012). *Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia* (Ed. 3, pp.132-134). Rio de Janeiro, RJ: Elsevier.
- King, A. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166: 877-894.
- Krakauer, J.C., McKenna, M.J., Buderer, N.F., Rao, D.S., Whitehouse, F.W., & Parfitt, A.M. (1995). Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes*, 44 (7): 775-782
- Kumar, S., Singh, R., Vasudeva, N., Sharma, S. (2012). Acute and Chronic Animal Models for The Evaluation of Anti-Diabetic Agents. *Cardiovascular Diabetology Journal*, 11:9.doi:10.1186/1475-2840-11-9.
- Leclere, C., Champ, M., Boillat, J. (1994). Role of Viscous Guar Gums in Lowering the glyce-mic Response After a Solid Meal. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59: 914-921.

- Leite Duarte, M.E., & da Silva, R.D. (1996). Histomorphometric analysis of the bone tissue in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, 51 (1):7-11.
- Lelovas, P.P, Xanthos, T.T, Thoma, S.E., Lyritis, G.P., & Dontas, I.A. (2008). The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comp Med*, 58(5): 424–430.
- Lewiecki, E.M.(2004). Management of osteoporosis. *Clinical and Molecular Allergy*, 2:9. Doi:10.1186/1476-7961-2-9
- Lewis, J.R., Radavelli-Bagatini, S., Rejnmark, L., Chen, J.S., Simpson, J.M., Lappe, J.M., Mosekilde, L., Prentice, R.L., & Prince, R.L. (2015). The effects of calcium supplementation on verified coronary heart disease hospitalization and death in postmenopausal women: a collaborative meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Miner Res.*, 30(1): 165-75. Doi: 10.1002/jbmr.2311.
- Manavalan, J.S., Cremers, S., Dempster, D.W., Zhou, H., Dworakowski, E., Kode, A., Koustoni, S., & Rubin, M.R. (2012). Circulating osteogenic precursor cells in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 97 (9):3240-3250.
- Marcus, R. (2001). Role of exercise in preventing and treating osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am*, 27:131 – 141.
- Marieb E.N. & Hoehn, K. (2008). Anatomia e Fisiologia. (Ed.3. pp.159). Porto Alegre, RS: Artmed.
- Martyn-St J.M & Carroll, S. (2008). Meta-analysis of walking for preservation of bone mineral density in postmenopausal women. *Bone*. 2008;43(3):521-31. Doi: 10.1016/j.bone.2008.05.012.
- Martindale, (2009). The Complete Drug Reference. (Ed.36). London; Chicago: The Pharmaceutical Press.
- Mathers, C.D. & Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 3(11):e44. Doi: 10.1371/journal.pmed.0030442.
- Matsumura, M., Monden, T., Nakatani, Y., Shimizu, H., Domeki, N., Yanagi, K., Ikeda, S., Kawagoe, Y., & Kasai, K. (2010). Effect of raloxifene on serum lipids for type 2 diabetic menopausal women with or without statin treatment. *Med Princ Pract*, 19:68-72. DOI: 10.1159/000252838.
- Maugeri, D., Panebianco, P., Rosso, D., Calanna, A., Speciale, S., Santangelo, A., Rizza, I., Motta, M., Lentini, A., & Malaguarnera, M. (2002). Alendronate reduces the daily consumption of insulin (DCI) in patients with senile type I diabetes and steoporosis. *Arch Gerontol Geriatr*, 34:117 – 122.
- McLellan, K.C.P., Barbalho, S.M., Cattalini, M., Lerario, A.C. (2007). Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. *Rev Nutr.*, 20: 515-24.
- McNair, P., Madsbad, S., Christensen, M.S., Christiansen, C., Faber, O.K., Binder, C., & Transbøl, I. (1979). Bone mineral loss in insulin-treated diabetes mellitus: studies on pathogenesis. *Acta Endocrinol*, 90 (3):463-72.
- McPhee, S.J., & Ganong, W.F. (2007). Fisiopatologia da doença: Uma Introdução à Medicina Clínica (Ed.5, pp.416-420). Rio de Janeiro: McGraw Hill.

- Melton, L.J. III, Atkinson, E.J., O'Connor, M.K., O'fallon, W.M., & Riggs, B.L. (1998). Bone Density and Fracture Risk in Men. *J. Bone Miner Res*, 13: 1915-1923.
- Melton, L.J. III, Chrischilles, E.A., Cooper, C., Lane, A.W., & Riggs, B.L. (1992). Perspective: How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res*, 7: 1005–1010.
- Meyer, M., Clegg, D., Prossnitz, E. & Barton, M. (2011). Obesity, insulin resistance and diabetes: Sex differences and role of estrogen receptors. *Acta Physiologica Journal*, 203: 259-269.
- Miller, D.D. (1989). Calcium in the diet: Food sources Recommended intakes, and Nutritional bioavailability. *Adv. Food Ntr. Res.*, 33: 103-156.
- Moreira, C.A., & Dempster, D.W. (2015). Bone histomorphometry in diabetes mellitus. *Journal Osteoporosis International*, 26 (11): 2559-2560. Doi: 10.1007/s00198-015-3258-z.
- Muhammad, N., Luke, D. A., Shuid, A. N., Mohamed, N., & Soelaiman, I.N. (2012). Two different isomers of vitamin E prevent bone loss in postmenopausal osteoporosis rat model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2012, 161527. Doi.org/10.1155/2012/161527
- NAMS - The North American Menopause Society (2011): 22nd Annual Meeting - Abstract Book, 22:18 – 26.
- Naomi Omi, N., & Ezawa, I. (1993). The effect of “AA Ca (active absorbable calcium)” on bone metabolism of ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 11 (3): S33-S40.
- Nasry, M.R., Abo-Youssef, A.M. & Abd El-Latif, H.A. (2013). Anti-diabetic activity of the petroleum ether extract of Guar gum in streptozotocin-induced diabetic rats: A comparative study. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 2: 51-57. DOI: 10.1016/j.bjbas.2013.09.008
- National Osteoporosis Foundation. (2014). Clinician’s guide to prevention and treatment of osteoporosis. Washington, DC: National Osteoporosis Foundation.
- National Osteoporosis Foundation. (2015). Clinician’s guide to prevention and treatment of osteoporosis. Washington, DC: National Osteoporosis Foundation. Accessed 26 May 2015.
- Naureen, S. (2005). Use of composite flours for chapati preparation in relation to serum profile. Ph.D. dissertation. Institute of Food Science and Technology, University of Agriculture Faisalabad, Pakistan.
- Neer, R.M., Arnaud, C.D., Zanchetta, J.R., Prince, R., Gaich, G.A., Reginster, J.Y., Hodsmann, A.B., Eriksen, E.F., Ish-Shalom, S., Genant, H.K., Wang, O., Mitlak, B.H. (2001). Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 344:1434 – 1441.
- Nieves, J.W. (2005). Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am J Clin Nutr*, 81: 1232S-239S.
- Nunes, L.C.C., Santana, A.K.M., Sobrinho, J.L.S., de La Roca, M.F., de Lima, E.Q., & Neto, P.J.R. (2006). Obtenção de comprimidos contendo cálcio de conchas de ostras: pré-formulação e biodisponibilidade comparativa. *Acta Sci. Health Sci.*, 28 (1): 49-55.
- O'Connell, M.B., & Stamm, P.L. (2004). Calcium Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. 2 (4): 357-371. Doi: 10.1385/BMM:2:4:357.

- Omi, N., & Ezawa, I. (1993). The effect of "AA Ca (Active Absorbable Calcium)" on bone metabolism of ovariectomized rats. *J. Bone Miner Met*, 11: S33-S40
- Papathanasopoulos, A., & Camilleri, M. (2010). Dietary Fiber Supplements: Effects in Obesity and Metabolic Syndrome and Relationship to Gastrointestinal Functions. *Gastroenterology Journal*, 138: 65-72.
- Parfitt, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., & Recker, R.R. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2: 595–610. Doi: 10.1002/jbmr.5650020617.
- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Diretiva 95/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*. Fevereiro de 1995.
- Patsch, J.M., Burghardt, A.J., Yap, S.P., Baum, T., Schwartz, A.V., Joseph, G.B., & Link, T.M. (2013). Increased cortical porosity in type 2 diabetic postmenopausal women with fragility fractures. *J Bone Miner Res*, 28: 313-324. Doi: 10.1002/jbmr.1763.
- Patsch, J.M., Li, X., Baum, T., Yap, S.P., Karampinos, D.C., Schwartz, A.V., & Link, T.M. (2013). Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. *J Bone Miner Res*, 28 (8):1721-8.
- Peacock, M. (2010). Calcium metabolism in health and disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, S23-30: 5 (1).
- Pereira, M., Ludwig, D. (2001). Dietary Fiber and body-weight regulation. Observations and mechanisms. *Pediatric Clinics of North America*, 48: 969-980.
- Pereira, O.M., Henriques, M.B., Znebon, O., Sakuma, A. & Kira, C.S. (2002). Determinação dos teores Hg, Pb, Cd, Cu e Zn em moluscos (*Crassostrea brasiliiana*, *Perna perna* e *Mytilus falcata*). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 61: 19-25.
- Peters, J.B, Combs, S.M., Hoskins, B., Jarman, J., Kovar, J.L., Watson, M.E., Wolf, A.M., & Wolf, M. (2003). Recommended Methods of Manure Analysis Handbook A3769 (pp.30-31). University of Wisconsin-Madison.
- Petit, M.A., Paudel, M.L., Taylor, B.C., Hughes, J.M., Strotmeyer, E.S., Schwartz, A.V., Cauley, J.A., Zmuda, J.M., Hoffman, A.R., & Ensrud, K.E. (2010). Bone mass and strength in older men with type 2 diabetes: the Osteoporotic Fractures in Men Study. *J Bone Miner Res*, 25: 285-29.
- Picke, A.K., Gordaliza, A.I., Campbell, G.M., Glüer, C.C., Salbach-Hirsch, J., Rauner, M., Hofbauer, L.C., & Hofbauer, C. (2016). Bone defect regeneration and cortical bone parameters of type 2 diabetic rats are improved by insulin therapy. *Bone*, 82: 108–115. Doi: 10.1016/j.bone.2015.06.001
- Pinheiro, M.M., & Domiciano, S.D. (2010). Osteoporose. *Revista Brasileira de Medicina-RBM*, 68 (5): 141-149.
- Poksay, K., & Schneeman, B. (1983). Pancreatic and intestinal response to dietary guar gum in rats. *The Journal of Nutrition*, 113: p. 1544-1549.
- Prentice, R.L., Pettinger, M.B., Jackson, R.D., Wactawski-Wende, J., LaCroix, A.Z., Anderson, G.L., et al. (2013). Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women's Health Initiative clinical trial and cohort study. *Osteoporos Int*, 24:567–580. Doi 10.1007/s00198-012-2224-2

- Pritchard, J.M., Giangregorio, L.M., Atkinson, S.A., Beattie, K.A., Inglis, D., Ioannidis, G., Gerstein, H., Punthakee, Z., Adachi, J.D., & Papaioannou, A. (2013). Changes in trabecular bone microarchitecture in postmenopausal women with and without type 2 diabetes: a two year longitudinal study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14: 114. Doi: 10.1186/1471-2474-14-114.
- Pritchard, J.M., Giangregorio, L.M., Atkinson, S.A., Beattie, K.A., Inglis, D., Ioannidis, G., Punthakee, Z., Adachi, J.D., & Papaioannou, A. (2012). Association of larger holes in the trabecular bone at the distal radius in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus compared to controls. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 64:83-91. Doi: 10.1002/acr.20602.
- Qian, C., Zhu C., Yu, Jiang, W., & Zhang, F. (2015). High-Fat Diet/Low-Dose Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats Impacts Osteogenesis and Wnt Signaling in Bone Marrow Stromal Cells. *PLoS One*. 10 (8): e0136390
- Reddy, G.K., Stehno-Bittel, L., Hamade, S., & Enwemeka, C.S. (2001). The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 54(1): 1–8. Doi.org/10.1016/S0168-8227(01)00273-X
- Reginster, J.Y., & Burlet, N. (2006). Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone*, 38:S4-S9.
- Reinwald, S., Peterson, R.G., Allen, M.R., & Burr, D.B. (2009). Skeletal changes associated with the onset of type 2 diabetes in the ZDF and ZSD rodent models. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: E765-E774. Doi:10.1152/ajpendo.90937.2008.
- Rizzoli, R. (2016). Plenary lecture-7: WCO-IOF-ESCEO World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases, 14 – 17 April 2016, Málaga, Spain. *Osteoporosis International*, 27 (1).
- Rodrigues, A.M., Gouveia, N., da Costa, L.P., Eusébio, M., Ramiro, S., Machado, P., Mourão, A.F., Silva, I., Laires, P., Sepriano, A., Araújo, F., Coelho, P.S., Gonçalves, S., Zhao, A., Fonseca, J.E., de Almeida, J.M., Tavares, V., da Silva, J.A., Barros, H., Cerol, J., Mendes, J., Carmona, L., Canhão, H., Branco, J.C. (2015). EpiReumaPt- the study of rheumatic and musculoskeletal diseases in Portugal: a detailed view of the methodology. *Acta Reumatol Port*, 40 (2): 110-24.
- Ross, A. C., Manson, J. E., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., Clinton, S. K., Durazo-Arvizu, R.A., Gallagher, J.C., Gallo, R.L., Jones, G., Kovacs, C.S., Mayne S.T., Rosen, C.J., & Shapses, S. A. (2011). The 2011 Report on Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D from the Institute of Medicine: What Clinicians Need to Know. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96 (1), 53 – 58. Doi.org/10.1210/jc.2010-2704.
- Roy, S., Veja-Lopez, S., & Fernandez, M. (2000). Gender and hormonal status affect the hypolipidemic mechanisms of dietary soluble fiber in guinea pigs. *The Journal of Nutrition*, 130: 600-607.
- Rubin, R.M., Schwartz, A.V., Kanis, J.A., & Leslie, W.D. (2013). Osteoporosis Risk in Type 2 Diabetes Patients. *Expert Rev Endocrinol Metab.*, 8: 423-425.
- Saag, K.G., & Geusens, P. (2009). Progress in Osteoporosis and Fracture Prevention: Focus on Postmenopausal Women. *Arthritis Research & Therapy*, 11:251. Doi: 10.1186/ar2815.
- Saeed, S., Mosa-Al-Reza, H., Fatemeh, A.N., & Saeideh, D. (2012). Antihyperglycemic and Antihyperlipidemic Effects of Guar gum on Streptozotocin-Induced Diabetes in Male Rats. *Pharmacognosy Magazine*, 8: 65-72.

Sagalovsky, S. (2013). Bone Remodeling: Cellular-molecular biology and cytokine RANK-RANKL osteoprotegerin (OPG) system and growth factors. *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 3 (1-2):1-9.

Saito, M., & Marumo, K. (2010). Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*, 21 (2):195-214. Doi: 10.1007/s00198-009-1066-z.

Sakata, T. (1995). A very-low calorie conventional Japanese diet: its implications for prevention of obesity. *Obesity Research Journal*, 56 (2): 233s-339s.

Sanf elix-Gimeno, G., Sanf elix-Genov es, J., Rodriguez-Bernal, C.L., Peir o, S., & Hurtado, I. (2013). Prevalence, Determinants, and inappropriateness of calcium supplementation among Men and Women in a Spanish Mediterranean Area: Cross-sectional data from the ESOSVAL Cohort. *J Bone Miner Res.*, 28: 2286–2294. Doi: 10.1002/jbmr.1977h4580 doi: 10.1136/bmj.h4580.

Saraiva, G.L., & Lazaretti-Castro, M. (2002). Marcadores Bioqu micos da Remoda o  ssea na Pr tica Cl nica. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 46 (1):72-78.

Schoenmakers, I., Francis, R. M., McColl, E., Chadwick, T., Goldberg, G. R., Harle, C., Yarnall, A., Wilkinson, J., Parker, J., Prentice, A., & Aspray, T. (2013). Vitamin D supplementation in older people (VDOP): Study protocol for a randomised controlled intervention trial with monthly oral dosing with 12,000 IU, 24,000 IU or 48,000 IU of vitamin D<sub>3</sub>. *Trials*, 14, 299. Doi: 10.1186/1745-6215-14-299.

Schonfeld, J., Evans, D., & Wingate, D. (1997). Effect of viscous fiber (guar gum) on post-prandial motor activity in human small bowel. *Digestive Diseases and Sciences Journal*, 42: 1613-1617.

Schwartz, Vittinghoff, Bauer, Hillier, Strotmeyer, Ensrud, Donaldson, Cauley, Harris, Koster, Womack, Palermo, & Black. (2011). Association of BMD and FRAX score with risk of fracture in older adults with type 2 Diabetes. *JAMA*, 305: 2184-2192. Doi:10.1001/jama.2011.715.

Seal, C.J. & Mathers, J.C. (2001). Comparative gastrointestinal and plasma cholesterol responses of rats fed on cholesterol free diets supplemented with guar gum and sodium alginate. *British Journal of Nutrition*, 85: 317-324.

Shaw, J., Sicreen, R., & Zimmet, P. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Journal of Diabetes Research and Clinical Practice*, 4-14.

Silva, M.J., Brodt, M.D., Lynch, M.A., Mckenzie, J.A., Tanoye, K.M., Nyman, J.S., & Wang, X. (2009). Type 1 diabetes in young rats leads to progressive trabecular bone loss, cessation of cortical bone growth and diminished whole bone strength and fatigue life. *J Bone Miner. Res*, 24: 1618-1627. Doi: 10.1359/jbmr.090316.

Singh, A., Mehdi, A. A., Srivastava, R. N., & Verma, N. S. (2012). Immunoregulation of bone remodelling. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*, 2 (2), 75 – 81. Doi.org/10.4103/2229-5151.97271

Skovso, S. (2014). Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Invest*, 5: 349-358. Doi:10.1111/jdi.12235

Smith, E., Need, A.G., Schultz, C.G., Horowitz, M. (2004). Does the response of bone mass to calcium supplements depend on calcium absorption efficiency? *Eur J Endocrinol*, 151: 759–763. Doi: 10.1530/eje.0.1510759

- Smith, M.R., Fallon, M.A., Lee, H., & Finkelstein, J.S. (2004). Raloxifene to prevent gonadotropin-releasing hormone agonist-induced bone loss in men with prostate cancer: A randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89(8): 3841–3846.
- Song, Y., Sawamura, M., & Ikeda, K. (2000). Soluble dietary fibre improves insulin sensitivity by increasing muscle GLUT-4 content in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology Journal*, 27: 41-45.
- Sta Romana, M., & Li-Yu, J.T. (2007). Investigation of the relationship between type 2 diabetes and osteoporosis using Bayesian inference. *J Clin Densitom.*, 10: 386-390.
- Starup-Linde, J., & Vestergaard, P. (2015). Management of endocrine disease: Diabetes and osteoporosis: cause for concern? *European Journal of Endocrinology*, 173: R93 – R99. Doi: 10.1530/EJE-15-0155.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research Journal*, 50: 537-546.
- Tavares, V., Canhão, H., Gomes, J.A.M., Simões, E., Romeu, J.C., Coelho, P., Santos, R.A., Malcata, A., Araújo, D., Vaz, C., & Branco, J. (2007). Recomendações para o diagnóstico e terapêutica da osteoporose. *Acta Reumatol Port*, 32:49-59.
- Theobald, H. (2005). Dietary calcium and health. *Nutrition Bulletin*, 30: 237-277.
- Thomas, M.L., Hope, W.G., Ibarra, M.J. (1988). The relationship between long bone growth rate and duodenal calcium transport in female rats. *J Bone Miner Res*, 3: 503-507
- Tonne, J. M., Sakuma, T., Deeds, M. C., Munoz-Gomez, M., Barry, M. A., Kudva, Y. C., & Ikeda, Y. (2013). Global gene expression profiling of pancreatic islets in mice during streptozotocin-induced  $\beta$ -cell damage and pancreatic *Glp-1* gene therapy. *Disease Models & Mechanisms*, 6 (5): 1236– 1245. Doi.10.1242/dmm.012591
- Torsdottir, I., Alpsten, L., & Andersson, H. (1989). Dietary guar gum effects on postprandial blood glucose, insulin and hydroxyproline in humans. *Journal of Nutrition*, 119 (12): 1925-1931.
- Track, N.S., Cawkwell, M.E., Chin, B.C., Chiu, S.S., Haberer, S.A., Honey, C.R. (1985). Guar gum consumption in adolescent and adult rats: short and long term metabolic effects. *Can J. Physiol. Pharmacol.*, 63 (9): 1113–1121.
- Tripathi, B. & Srivastava, A. (2006). Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 12: RA130-147.
- U.S. FDA - Department of Health and Human Services Food, Drug Administration Center for Drug Evaluation, Research (CDER), Guidance for industry; estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, Pharmacology and Toxicology (2005), <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default>.
- U.S. Department of Health and Human Services. (2004). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45513/>.
- Van Der Velde, R.Y., Brouwers, J.R.B.J., Geusens, P.P., Lems, W.F., & Van Den Bergh, J.P.W. (2014). Calcium and vitamin D supplementation: State of the art for daily practice. *Food & Nutrition Research Journal*, 58: 21796. Doi: 10.3402/fnr.v58.21796.

- Van Staa, T.P., Leufkens, H.G.M., Abenhaim, L., Zhang, B., & Cooper, C. (2000). Use of Oral Corticosteroids and Risk of Fractures. *J Bone Miner Res*, 15:993–1000. Doi: 10.1359/jbmr.2000.15.6.993.
- Vandecasteele, C., & Block, C.B. (1993). Lead Analysis. In: *Modern Methods for Trace Element Determination*, (pp 1-74). John Wiley and Sons, Chichester. Reino Unido.
- Vander, A.J., Sherman, J.H., & Luciano, D.S. (2006). Os Rins e a Regulação da Água e de Iões Orgânicos (Ed.9). In *Fisiologia Humana: Os mecanismos das funções corporais*, (pp. 493-539). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Vashishth, D Gibson GJ, Khoury JI, Schaffler MB, Kimura J.e Fyhri DP. (2001). Influence of nonenzymatic glycation on Biomechanical Properties of Cortical Bone. *Bone*, 28 (2): 195 – 201.
- Venn, B.J., & Mann J.I. (2004). Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr.*, 58: 1443-1461.
- Verhaeghe, J., Suiker, A.M.H., Einhorn, T.A., Geusens, P., Visser, W.J., van Herck, E., van Bree, R., Magitsky, S. & Bouillon, R. (1994). Brittle bones in spontaneously diabetic female rats cannot be predicted by bone mineral measurements: Studies in diabetic and ovariectomized rats. *J. Bone Miner. Res*, 9 (10):1657-1667. doi: 10.1002/jbmr.5650091021
- Vestergaard, P. (2007). Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes - a meta-analysis. *Osteoporos Int*, 18: 427–444. Doi: 10.1007/s00198-006-0253-4.
- Vidal, B., Cascão, R., Vale, A.C., Cavaleiro, I., Vaz, M.F., Brito, J.A., Canhão, H., & Fonseca, J.E. (2015). Arthritis Induces Early Bone High Turnover, Structural Degradation and Mechanical Weakness. *PLoS ONE*. 10(1): e0117100. Doi:10.1371/journal.pone.0117100.
- Virally, M., Blickle, J., Girard, J., Halimi, S., Simond, D., & Guillausseau, P.J. (2007). Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & Metabolism Journal*, 33: 231-244.
- Vuorinen-Markkola, H., Sinisalo, M., & Koivisto, V.A. (1992). Guar gum in insulin-dependent diabetes: effects on glycemic control and serum lipoproteins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 56: 1056-1060.
- Ward, D.T., Yau, S.K., Mee, A.P., Mawer, E.B., Miller, C.A., Garland, H.O. & Riccardi, D. (2001). Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12 (4): 779-790.
- Wheater, G., Elshahaly, M., Tuck, S. P., Datta, H. K., & van Laar, J. M. (2013). The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *Journal of Translational Medicine*, 11, 201. Doi: 10.1186/1479-5876-11-201.
- WHO Consultation. (1999). Definition and diagnostic criteria for Diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. WHO definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications, 8-13.
- WHO/ IDF Consultation. (2006). Definition and diagnosis of diabetes and intermediate hyperglycaemia.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicreen, R. & King, H. (2004). Global Prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27: 1047-1053.

- Wong, J., Souza, R., & Kendall, C. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Clinical Gastroenterology Journal*, 40: 235-243.
- Wongdee K, & Charoenphandhu N. (2011). Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. *World J Diabetes*, 2 (3): 41-48. Doi: 10.4239/wjd.v2.i3.41..
- Wongdee, K., & Charoenphandhu, N. (2015). Update on type 2 diabetes-related osteoporosis. *World Journal of Diabetes*, 6 (5), 673-678. Doi: 10.4239/wjd.v6.i5.673.
- Woods, SC. (2005). Signals that influence food intake and body weight. *Physiology & Behavior Journal*, 86: 709-16.
- World Health Organization - WHO. (2004). Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis at Primary Health Care Level. Summary Meeting Report, Brussels, Belgium.
- World Health Organization - WHO. (2014). The top 10 causes of death. [Online]. [cited 2014 Julho]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
- World Health Organization: Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis: Report of a WHO Study Group. (1994). Geneva, World Health Org., Tech. Rep. Ser., n. 843
- Wronski, T.J., Cintron, M., & Dann, L.M. (1988). Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int*, 43: 179-183
- Wronski, T.J., Dann, L.M., & Horner, S.L. (1990). Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 10(4): 295-301.
- Yahuru, S., Humphrey, S., Landry, C., & Jain, S.K. (2009). Decreased bone mineral density in men with metabolic syndrome alone and with type 2 diabetes. *Med Sci Monit.*, 15: CR5-CR9.
- Yamaguchi, T., Kanazawa, I., Yamamoto, M., Kurioka, S., Yamauchi, M., Yano, S., & Sugimoto, T. (2009). Associations between components of the metabolic syndrome versus bone mineral density and vertebral fractures in patients with type 2 diabetes. *Bone*, 45: 174-179.
- Yamamoto, M., Yamaguchi, T., Nawata, K., Yamauchi, M., & Sugimoto, T. (2012). Decreased PTH levels accompanied by low bone formation are associated with vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 97 (4):1277-84. Doi: 10.1210/jc.2011-2537.
- Yaturu, S., Humphrey, S., Landry, C., & Jain, S.K. (2009). Decreased bone mineral density in men with metabolic syndrome alone and with type 2 diabetes. *Med Sci Monit*, 15: CR5-CR9.
- Yoon, J.W. & Jun, H.S. (2005). Autoimmune Destruction of Pancreatic  $\beta$  Cells. *American Journal of Therapeutics*, 12: 580-591.
- Zhao, Q., Zhang, L., Shen, X., Qi, J., Wang, J., Qian, N., Deng, L. (2013). Bone Selective Protective Effect of a Novel Bone-seeking Estrogen on Trabecular Bone in Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int*, 93: 172-183. Doi:10.1007/s00223-013-9739-1.
- Zhou, B., Huang, Y., Li, H., Sun, W., & Liu, J. (2015). Proton-pump inhibitors and risk of fractures: an update meta-analysis. *Osteoporosis International*, 26 (10): 1-9. Doi: 10.1007/s00198-015-3365-x.



ANEXO – Certificado da ração *standard* 4RF21 GLP (pellets de 12mm)

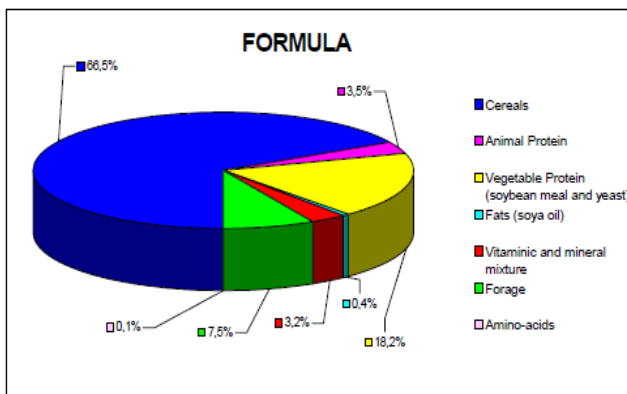


**4RF21 GLP certificate**

**Mice and Rats**

Shape 12 mm pellets

Packing 20 kg bag



AMINO-ACIDS		FATTY ACIDS	
Calculated/kg		Calculated/kg	
Arginine	10937 mg	Palmitic Acid 16:0	4387 mg
Cystine	3862 mg	Palmitoleic Acid 16:1	202 mg
Lysine	9721 mg	Stearic Acid 18:0	675 mg
Methionine	4454 mg	Oleic Acid 18:1	5046 mg
Tryptophan	2826 mg	Linoleic Acid 18:2	12335 mg
Glycine	8746 mg	Linolenic Acid 18:3	1169 mg

**CONTENTS OF VITAMINS AND MINERALS**

Vitamin calculated/kg	Nat. Value	Added	TOTAL
Vitamin A	U.I. 0,00	14400	14400
Vitamin D3	U.I. 0,00	1260	1260
Vitamin B1	mg 3,7	13,5	17,2
Vitamin B2	mg 8,4	6,8	15,2
Vitamin B6	mg 4,8	6,0	10,7
Vitamin B12	mg -	0,027	0,027
Vitamin E (α-tocopherol)	mg 14,8	49,5	64,3
Vitamin K3 (menadione sodium bisulfite)	mg 0,4	2,8	3,2
Niacin	mg 40,8	55,0	95,8
Folic acid	mg 0,4	1,9	2,3
D-Pantothenic Acid	mg 10,4	14,4	24,8
Biotin	mg 0,12	0,28	0,40
Choline	mg 1251	1005	2256

**ANALYSIS**

	Calculated	Min	Max	Declared
Water	11,09%	8,40%	13,20%	12,00%
Protein	19,42%	16,65%	24,05%	18,50%
Fat	2,58%	2,00%	6,00%	3,00%
Fiber	5,54%	3,30%	6,90%	6,00%
Ash	6,76%	4,90%	7,70%	7,00%
NFE	54,61%	-	-	53,50%

Minerals calculated/kg	Nat. Value	Added	TOTAL
Phosphorus	mg 5158	2431	7589
Calcium	mg 6012	3151	9163
Sodium	mg 1671	1947	3618
Potassium	mg 8335	-	8335
Magnesium	mg 1980	0	1980
Chlorine	mg 1381	3003	4383
Manganese (sulf. mang. monohydrate)	mg 32	54	86
Iron (iron sulfate heptahydrate)	mg 300	180	480
Copper (copper sulfate pentahydrate)	mg 14,0	11,7	25,7
Zinc (zinc sulfate monohydrate)	mg 35,5	67,5	103,0
Cobalt (cobalt carbonate basic monohydrate)	mg 0,22	0,63	0,85
Iodine (calcium iodate anhydrous)	mg 0,08	0,9	1,0

METABOLIZABLE ENERGY [kCal/kg] 2888

RAW ENERGY [kCal/kg] 3952

4RF21 GLP certificate PF1610R0