



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**HILDA MICHELLY PAIVA DOS SANTOS**

**Efeito da associação de *Ginkgo biloba* e exercício físico no  
tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas**

**Recife – 2013**

**HILDA MICHELLY PAIVA DOS SANTOS**

**Efeito da associação de *Ginkgo biloba* e exercício físico no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Concentração em Morfofisiologia Animal**

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira**

**Co-orientador:**

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**

**Prof. Dr. Fabiano Séllos Costa**

**Recife – 2013**

**HILDA MICHELLY PAIVA DOS SANTOS**

**“Efeito da associação de *Ginkgo biloba* e exercício físico no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas.”**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia Animal.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira (Orientadora) - UFRPE

---

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

---

Prof. Dr. Fabiano Séllos Costa – UFRPE

---

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares – UFRPE

Ficha catalográfica

S237e Santos, Hilda Michelly Paiva dos  
Efeito da associação de *Ginkgo biloba* e exercício físico  
no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides  
em ratas / Hilda Michelly Paiva dos Santos. -- Recife, 2013.  
113 f. : il.

Orientadora: Valéria Wanderley Teixeira.  
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2013.  
Referências.

1. Osteoporose 2. Bioquímica 3. Histoquímica 4. *Ginkgo  
biloba* (EGb 761) 5. Densitometria óssea 6. Natação  
I. Wanderley-Teixeira, Valéria, orientadora II. Título

CDD 636.089

**DEDICATÓRIA:**

*Ao amor incondicional dos meus pais.*

*“...em seu coração o homem planeja o seu caminho, mas é o Senhor quem dirige seus passos...”*

**(Provérbios 13,9)**

## **AGRADECIMENTOS**

Foi a dois anos que comecei algo... Algo que agora apresento a vocês. Acredito que a elaboração de uma dissertação seja um produto coletivo, embora sua redação, responsabilidade e estresse seja predominantemente individual. Gostaria de dedicar algumas palavras àqueles que fizeram parte direta ou indiretamente deste trabalho ou ainda por simplesmente existirem...

À Deus por sua presença constante em minha vida. Como é maravilhoso viver para ti! Dou graça por toda a paciência, perseverança e determinação que a mim concedestes para que chegasse com êxito ao final dessa etapa.

Aos meus pais, Jorge Inácio e Sandra Maria, por serem meu alicerce, meus exemplos de vida e estímulo constante. Se hoje subo mais um degrau na grande escada que é a vida, só consegui porque sei que tenho vocês para me apoiarem sempre. Amooooo vocês!!!.

À minha família pela compreensão nos momentos de ausência física, amor e carinho constante. Essa vitória também é de vocês. Em especial ao meu irmão William Inácio.

Ao meu segundo pai, Silvio José, que embora não esteja mais entre nós, tenho certeza que está vibrando com mais essa minha conquista. Eternas saudades!!!!

Ao meu noivo Antonio Barbalho, pela eterna cumplicidade, amor, respeito, auxílio e principalmente pela sua presença em minha vida. Amo- te!

Aos meus orientadores: Valéria Wanderley e Álvaro Teixeira, meus agradecimentos pela orientação, confiança, disponibilidade e oportunidades de crescimento profissional. Sem dúvida são pessoas maravilhosas que a faculdade me permitiu conhecer, e um estímulo para ver na universidade um caminho para a vida...

Ao Prof. Fabiano Séllos Costa, pela imensurável contribuição nessa pesquisa, pelos ensinamentos e demonstração de profissionalismo com a causa científica.

A equipe Focus Diagnóstico Veterinário, pelo acolhimento, auxílio e grande ajuda com o suporte tecnológico. Em especial a Lorena e leverton pela dedicada atenção na análise dos dados.

Ao Prof. Frederico Celso, pelo seu apoio e auxílio no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e conclusão desta dissertação.

A Prof<sup>a</sup> Márcia Figueiredo pelo auxílio com as análises histopatológicas.

A Cibele Alves, minha estatística particular, pela enorme assistência nas análises reforçando o famoso jargão: quem tem amigos não sofre! Te adoro Ciba!!!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Histologia, por ter cedido às instalações e os animais para elaboração deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Histologia, os quais contribuíram significativamente para esse trabalho, pois, ninguém é tão bom sozinho, quanto em equipe. Em especial aos meus queridos “Caçadores de Ossos”, Mariana Bruno, Clóvis Lapa e Ismaela Melo, vocês tornaram a caminhada mais amena. Me ensinaram o verdadeiro significado da palavra amizade. Estamos juntos para o que der e vier!

A Veruska Alexandrino e Franklin Magliano pela ajuda preciosa nos momentos finais dessa dissertação.

Às cobaias que cederam involuntariamente suas vidas para que inúmeras outras sejam salvas. A vocês, todo o meu respeito.

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para alcançar nossos sonhos e objetivos. Muitas vezes, um simples gesto pode mudar nossa vida e contribuir para nosso sucesso.... Muito Obrigada!!!

## RESUMO

A osteoporose é um distúrbio ósseo sistêmico caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO), com deteriorização da microarquitetura óssea, levando a um aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas. O tratamento da osteoporose envolve a utilização de bifosfatos, calcitonina, terapia de reposição de hormônio da paratireoide e exercícios físicos. Entretanto, vários estudos *in vitro* têm revelado que o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) e componentes (quercetina e kaempferol) apresentaram ação agonista estrogênico, além de contribuir para o mecanismo de defesa celular contra hiperproliferação celular, iniciação e progressão de neoplasias. Assim, a presente pesquisa avaliou o efeito do extrato de *G. biloba* nas dosagens de 14, 28 e 56mg/Kg/dia e da sua associação com o protocolo de exercício de natação sobre a osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas adultas, através da análise histopatológica, histoquímica (detecção de cálcio pelo Von Kossa), bioquímica (níveis séricos de cálcio e fosfatase alcalina e concentração molar de hidroxiprolina) e pela tomografia computadorizada quantitativa. A indução da osteoporose foi efetuada mediante administração da dexametasona na dosagem de 7mg/Kg por 5 semanas. Como controle positivo utilizou-se o alendronato de sódio na dosagem de 0,2mg/Kg/dia. As avaliações foram realizadas no 1°, 25° e 50° dias de tratamento. Os resultados mostraram que as menores dosagens do extrato associada ou não a um protocolo de natação apresentaram resultados similares aos observados nos animais do grupo controle e nos tratados com alendronato de sódio, porém a maior dosagem do extrato sem associação do protocolo de natação ocasionou hipercalcemia no 25° dia, e no 50° dia quando associado ao protocolo de natação. Assim conclui-se que o extrato de *G. biloba* isolado ou associado a um protocolo de natação nas dosagens de 14 e 28mg/Kg reverte o quadro da osteoporose induzida em ratas. Entretanto, são necessários maiores estudos com a finalidade de melhor compreender o efeito dose/tempo desse extrato associado ou não a uma atividade física na patologia da osteoporose e suas possíveis consequências na fisiologia de outros sistemas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Osteoporose, bioquímica, histoquímica, *Ginkgo biloba* (EGb 761), densitometria óssea, natação.

## ABSTRACT

Osteoporosis is a systemic disorder characterized by decreased bone mineral density (BMD), with deterioration of bone microarchitecture, leading to increased skeletal fragility and fracture risk. Treatment of osteoporosis involves the use of bisphosphonates, calcitonin, PTH replacement, therapy and exercise. However, several *in vitro* studies have shown that *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and its components showed estrogenic agonist action, and contributes to cellular defense mechanism against cellular proliferation, initiation and progression of cancer. Thus, the present study evaluated the effect of the extract of *G. biloba* in dosages of 14, 28 and 56mg/Kg/day and its association with the protocol of swimming exercise on glucocorticoid-induced osteoporosis in adult rats by histopathology, immunohistochemistry (detection of calcium by the Von Kossa stain), biochemistry (serum calcium, alkaline phosphatase and molar concentration of hydroxyproline) and quantitative computed tomography. The induction of osteoporosis was effected by administration of dexamethasone at dose of 7mg/kg for 5 weeks. As a positive control we used the sodium alendronato at dose of 0.2 mg/kg/day. The evaluations were performed at 1 °, 25 ° and 50 ° days of treatment. The results showed that lower doses of the extract with or without a swimming protocol showed similar results to those observed in control animals and the ones treated with sodium aledronato, but the highest dosage of the extract without the associating of the swimming protocol caused hypercalcemia at 25th day, and on the 50th day when associated with swimming protocol. It is concluded that the extract of *G. biloba* isolated or associated with a swimming protocol at doses of 14 and 28mg/Kg reverts induced osteoporosis in rats. However, more studies are necessary in order to better comprehend the effect of dose/time of this extract with or without a physical activity in the pathology of osteoporosis and its possible consequences on the physiology of other systems.

**KEYWORDS:** Osteoporosis, biochemistry, immunohistochemistry, *Ginkgo biloba* extract (EGb 761), bone densitometry, swimming.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Ciclo de remodelação óssea por osteoclasia.....22

**Figura 2.** Microfotografia do osso trabecular normal (a) e osteoporótico (b).....23

**Figura 3.** Desenho esquemático representando a estrutura química do cortisol (Glicocorticoide).....25

**Figura 4.** Exame de tomografia computadorizada quantitativa em animais experimentais.....29

**Figura 5.** Folhas de *Ginkgo biloba* L.....30

### CAPÍTULO II

**Figura 1:** Fêmures dos animais dos grupos I, II e III. A, B – Grupo Controle (I). A - Observar arquitetura óssea preservada. B – Observar presença de osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo) ativos. Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. C e D –Grupo II (Osteoporose). C - Observar perda de microarquitetura óssea. D – Notar trabéculas epifisárias delgadas com osteoblastos inativos (Seta grossa) e áreas com matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. E e F – Grupo III (Controle Positivo). E - Observar arquitetura óssea preservada. F –Observar trabécula espessa com presença de osteoblastos (seta grossa), osteócitos (círculo) e matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. Seta longa – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário.....62

**Figura 2:** Fêmures dos animais dos grupos IV, V e VI. A e B – Grupo IV (EGb1 14 mg/Kg). A - Observar perda da microarquitetura óssea. B – Observar osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo). Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. C e D– Grupo EGb2 28 mg/Kg (V). C - Observar arquitetura óssea

preservada. D – Observar osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo). Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. E e F – Grupo VI (EGb3 56 mg/Kg). E - Observar recuperação da microarquitetura óssea. F – Observar trabéculas espessa. Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. Seta longa – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário.....63

**Figura 3:** Detecção de Cálcio nos fêmures dos animais dos grupos experimentais. A - Grupo controle (I). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. B – Grupo Osteoporose (II). Evidenciar fraca reação para cálcio. C – Grupo Controle Positivo (III), D – Grupo EGb1 14mg/Kg e E – Grupo EGb2 28mg/Kg. Notar moderada reação para o cálcio. F – Grupo EGb3 56mg/Kg (VI). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. Coloração Von Kossa. Aumentos 107X. Setas – Marcação positiva para cálcio.....64

### CAPÍTULO III

**Figura 1:** Tanque de natação utilizado no experimento.....84

**Figura 2:** Fêmures dos animais dos grupos I, II e III. A, B – Grupo Controle (I). A - Observar arquitetura óssea preservada (\*). B – Observar presença de osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo) ativos. Coloração H.E. Aumentos 107X, 428X, respectivamente. C e D – Grupo II (Osteoporose). C - Observar perda de microarquitetura óssea (\*). D – Notar trabécula epifisárias delgada com superfícies com osteoblastos inativos (Seta grossa) e áreas com matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumentos 107X, 428X, respectivamente. E e F – Grupo III (Alendronato de Sódio). E - Observar conectividade desejável entre as trabéculas (\*). F – Observar trabécula espessa com presença de osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo) ativos. Aumentos 107X, 428X, respectivamente. Seta longa – Cartilagem articular.....85

**Figura 3:** Fêmures dos animais dos grupos IV, V e VI. A e B – Grupo IV (EGb 14 mg + Natação). A - Observar recuperação da microarquitetura óssea. B – Observar osteoblastos (seta grossa), osteócitos (círculo) ativos e áreas com matriz alterada

(ma).Coloração H.E. Aumentos42X, 428X, respectivamente. C e D– Grupo EGb 28 mg + natação (V). C - Observar arquitetura óssea preservada. D – Observar trabécula espessa comosteoblastos (seta grossa), osteócitos (círculo) e áreas com matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumentos42X, 428X, respectivamente.E e F – Grupo VI (EGb 56 mg + natação). E - Observar recuperação da microarquitetura óssea. F – Observar trabéculas espessa. Coloração H.E. Aumentos42X, 428X, respectivamente. Seta longa – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário.....86

**Figura 4:** Detecção de Cálcio nos fêmures dos animais dos grupos experimentais. A - Grupo controle (I). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. B – Grupo Osteoporose (II). Evidenciar fraca reação para cálcio. C – Grupo Controle Positivo (III), D – Grupo EGb 14mg + Natação. E – Grupo EGb 28mg + Natação. Notar intensa reação para o cálcio. F – Grupo EGb 56mg + Natação (VI). Evidenciar intenso depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. Coloração Von Kossa. Aumentos 107X. Setas – Marcação positiva para cálcio. ....87

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1:** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos resultados da densitometria óssea em unidades Hounsfield (HU) dos grupos experimentais.....60
- Tabela 2:** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos níveis séricos de cálcio (mg/dL) dos grupos experimentais.....60
- Tabela 3:** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos níveis séricos de fosfatase alcalina (U.I/L) dos grupos experimentais.....61
- Tabela 4:** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos níveis de hidroxiprolina (µmol/g) ao final do tratamento dos grupos experimentais.....61

### CAPÍTULO III

- Tabela 1:** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos resultados da densitometria óssea em unidades Hounsfield (HU) nos animais dos grupos experimentais.....82
- Tabela 2:** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos níveis séricos de Cálcio (mg/dL) nos animais dos grupos experimentais.....82
- Tabela 3:** <sup>1</sup>Médias ± desvio padrão dos níveis séricos de Fosfatase Alcalina (U.I/L) nos animais dos grupos experimentais.....83
- Tabela 4:** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão do nível sérico de Hidroxiprolina (µmol/g) nos animais dos grupos experimentais ao final do tratamento.....83

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  - Micrograma (s)

$\mu\text{L}$  - Microlitro (s)

$\mu\text{m}$  - Micrômetro (s)

$\text{Ca}^{2+}$  - Cálcio

CEUA/UFRPE – Comissão de Ética de Uso de Animais/Universidade Federal Rural de Pernambuco.

cm - Centímetro

CMO – Conteúdo Mineral Ósseo

TCQ – Tomografia Computadorizada Quantitativa

DMO – Densidade Mineral Óssea

DPA – Dual Photon Absorptiometry

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EGb – Extrato de *Ginkgo biloba*

g - Gramas

GCs – Glicocorticoides

GH – Hormônio do Crescimento

HU – Unidade de Hounsfield

IGF - I - Fator de crescimento semelhante à insulina I

kDa - KiloDalton

mg - Miligrama (s)

min – Minutos

mL - Mililitro (s)

$\text{Na}^{2+}$  - Sódio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PTH – Hormônio da Paratireoide

rpm – Rotações por Minutos

SPA – Single Photon Absorptiometry

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1. Tecido Ósseo.....	20
2.2. Osteoporose.....	22
2.3. Glicocorticoides.....	24
2.4. Exercícios Físicos e Metabolismo Ósseo.....	26
2.4.1 Natação.....	28
2.5. Tomografia Computadorizada Quantitativa (TCQ).....	28
2.6. <i>Ginkgo biloba</i> .....	30
2.6.1.Utilização Clínica do <i>G. biloba</i> .....	31
2.6.2. Propriedades Estrogênicas do <i>Ginkgo biloba</i> .....	32
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	34

### CAPÍTULO II

Extrato de <i>Ginkgo biloba</i> (EGb761) auxilia no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas.....	45
Resumo.....	46
1. Introdução.....	47
2. Material e métodos.....	48
3. Resultados.....	51
4. Discussão.....	53
5. Conclusão.....	56
6. Referências .....	56

### CAPÍTULO III

Efeito da associação combinada do Extrato de <i>Ginkgo biloba</i> (EGb761) e exercício de natação sobre o tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas.....	65
---	----

Resumo.....	66
1. Introdução.....	67
2. Material e Métodos.....	68
3. Resultados.....	73
4. Discussão.....	75
5. Conclusão.....	77
6. Referências.....	78
Anexo.....	88

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido dinâmico e que se remodela por toda a vida do indivíduo (SIMON, 2005). A função mecânica deste inclui a proteção de estruturas vitais e suporte para os tecidos moles (LERNER, 2000). Entretanto, o osso contém uma matriz mineralizada, a matriz óssea, que funciona como reserva de íons, principalmente cálcio e fosfato, para a manutenção da homeostase sérica (LERNER, 2000). É em consequência desta função orgânica que o osso precisa ser continuamente remodelado (PHAN; XU; ZHENG, 2004; LERNER, 2006). A remodelação óssea é, portanto, o mecanismo de manutenção do metabolismo ósseo, apresentado por um equilíbrio entre os processos de reabsorção e formação óssea, realizados por células ósseas especializadas (SIMON, 2005; NAKAMURA et al., 2007). Porém, na osteoporose, condição patológica caracterizada por progressiva perda de massa óssea, ocorre um relativo aumento da reabsorção em relação à formação óssea (OURSLEER, 1998; SIMON, 2005; NAKAMURA et al., 2007).

A osteoporose é um distúrbio ósseo sistêmico caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO), com deterioração da microarquitetura óssea, levando a um aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas (PINTO et al., 2006). Estimativas alarmantes sugerem que uma de cada duas mulheres apresentará uma fratura osteoporótica em algum momento de sua vida, tornando a osteoporose um problema de saúde pública (ROUX, 2001).

São múltiplas as causas para o aparecimento e/ou desenvolvimento da osteoporose. Sendo comum no processo de envelhecimento, ocorrendo com maior frequência nas mulheres após a menopausa, processo biológico normal do organismo feminino, caracterizado pela interrupção do ciclo menstrual (BALASCH, 2003). Nesta condição, a mulher adulta apresenta uma diminuição do nível de estrógeno (RIGSS, 2000; LIANG et al., 2008), observação que propiciou o uso da terapia de reposição de estrógeno para prevenção da osteoporose na menopausa (BALASCH, 2003).

Do ponto de vista clínico, a osteoporose é classificada em dois grupos principais: primária e secundária. A primária é subdividida em: osteoporose juvenil idiopática, osteoporose idiopática em adulto jovem, osteoporose involucional tipo I ou pós-menopausa e osteoporose involucional tipo II ou senil (LIANG et al., 2008).

Já a osteoporose secundária é atribuída a vários distúrbios e condições clínicas como o uso de fármacos, hipertireoidismo, imobilizações, quimioterapia, entre outros, que resultem em perda óssea (BALASCH, 2003). Dentre os medicamentos que quando usados por períodos prolongados, podem causar perda de massa óssea, podem-se citar os glicocorticoides, anticonvulsivantes, heparina, ciclosporina A, etanol e outros (NETO et al., 2002; SOUZA, 2010).

Os glicocorticoides são anti-inflamatórios esteroides amplamente utilizados para diversas finalidades médicas, tais como doenças autoimunes, asma, doenças de colágeno e doença renal crônica. Talvez sua maior limitação seja o impacto negativo sobre a massa óssea (LUCINDA et al., 2010). Eles têm uma relação complexa com o metabolismo ósseo. Em condições normais, participam da diferenciação e ativação dos osteoblastos, células responsáveis pela formação da matriz óssea no tecido. Porém, em excesso, os glicocorticoides interferem diretamente, via receptores, na proliferação, diferenciação e apoptose destas células (COOPER, 2008). Entre os efeitos do uso dos glicocorticoides por longos períodos estão a redução do número de osteoblastos, diminuindo, dessa maneira, a formação da matriz óssea (LUCINDA et al., 2010).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ocorrência de osteoporose nessa condição, como a ação direta dos glicocorticoides nas paratireoides e nas células ósseas, alterações na produção de prostaglandinas, citocinas, interleucinas, alterações na secreção do hormônio do crescimento (GH), do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e esteroides gonadais (COOPER, 2008).

Os bifosfatos são drogas muito eficientes no tratamento da osteoporose, porém alguns efeitos adversos destes medicamentos têm sido relatados, tais como: intolerância gastrointestinal (SOUZA, 2010) e osteonecrose mandibular (POZZI et al., 2007). Desta forma é interessante a busca por alternativas ao tratamento da osteoporose secundária. Dentre essas alternativas estão os fitoestrógenos que têm apresentado benefícios da prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes e obesidade, sintomas da menopausa, doença renal e

váriostipos de câncer (DANG; LOWIC, 2005; DAS et al., 2005). Segundo Neto et al. (2002) existem várias estratégias de controle para osteoporose, dentre elas encontram-se as medidas farmacológicas, como o uso de drogas antirreabsortivas ou que propiciam maior formação óssea; nutricionais, como a maior ingestão de cálcio; e físicas, como a prática regular de exercícios físicos apropriados (GERALDES, 2003).

Neste contexto, o exercício físico pode contribuir no processo de ganho/manutenção de massa óssea, sendo importante no campo da prevenção. Algumas pesquisas não encontraram qualquer correlação entre a prática de exercícios físicos e o aumento da densidade ou qualidade óssea (HUMPHRIES et al., 2000; BEMBEN et al., 2000; LIU et al., 2003), contudo, grande parte das pesquisas feitas nesta área aponta para um efeito benéfico do exercício físico sobre a massa óssea (RYAN et al., 1998; KEMMLER et al., 2002; VINCENT, BRAITH, 2002; GERALDES, 2003).

De acordo com as conclusões de Zazula; Pereira (2003), entre os benefícios do exercício físico para prevenção e/ou como parte do tratamento da osteopenia e osteoporose, destacam-se: aumento da densidade óssea; hipertrofia das trabéculas; aumento da atividade dos osteoblastos; aumento da densidade do colágeno; incremento de incorporação de cálcio no osso.

*Ginkgo biloba* L. é uma das mais antigas árvores da terra, com 200 milhões de anos, sendo o único sobrevivente da família Ginkgoaceae, classe ginkgoatae. As sementes desta planta têm sido utilizadas na medicina chinesa por mais de 5000 anos para o tratamento da asma, tosse e leucorréia (DONFRACESCO; DELL'UOMO, 2004). As folhas começaram a serem usadas mais tarde, em 1436, para tratar problemas de pele (ZEHRA et al., 2010).

Atualmente, o *G. biloba* tem sido muito utilizado na prevenção do envelhecimento, na preservação da memória, na prevenção de doenças cardiovasculares, na doença de Alzheimer, na demência relacionada com a idade, processos inflamatórios e também foi testado na síndrome de Down com bons resultados (HARLEY et al., 2003; DONFRACESCO; DELL'UOMO, 2004; ZHOU et al., 2006; ZEHRRA et al., 2010).

Oh; Chung (2004) estudaram a ação do extrato de *G. biloba* (EGb 761) e seus componentes *in vitro*, e observaram que este extrato apresentou ação sobre o receptor de estrógeno do subtipo-  $\alpha$  e receptor de estrogênio do subtipo-  $\beta$ ,

demonstrando seu efeito agonista estrogênico. A maior afinidade de ligação do EGb foi pelo receptor de estrogênio do subtipo-  $\beta$ . Este receptor desempenha importante papel sobre o sistema nervoso central, sistema cardiovascular e sobre o tecido ósseo. Além dos efeitos agonistas citados, o receptor do subtipo-  $\beta$  contribui para o mecanismo de defesa celular contra hiperproliferação celular, iniciação e progressão de neoplasias (DENG et al., 2011).

Essa dupla ação do EGb sobre os receptores de estrogênio do subtipo- $\alpha$  e subtipo- $\beta$ , sugere que este extrato possa apresentar efeitos agonistas ou antagonistas, dependendo do órgãos alvo, assim como acontece com os moduladores seletivos dos receptores estrogênicos (OH; CHUNG, 2004). O desenvolvimento de medicamentos que tenham efeitos distintos sobre esses dois receptores pode ser de fundamental importância no tratamento de várias doenças, uma vez que eles se expressam de maneiras diferentes nos diversos tecidos.

Ainda em relação ao efeito estrogênico do EGb, Pinto et al. (2007) constataram diminuição do peso corporal dos fetos, cujas mães foram tratadas com EGb 7 e 14 mg/Kg/dia, o que poderia ser devido ao efeito estrogênico do extrato, uma vez que o estrogênio age sobre células ósseas, inibindo a reabsorção e promovendo a osteogênese. O EGb, além dos flavonóides, possui antioxidativos, que podem prevenir a perda óssea e o risco de fraturas. Brayboy et al. (2001) estudaram o efeito do EGb *in vitro* contra a atividade de radicais livres, baseado na hipótese de que o aumento da atividade oxidativa sobre os osteoclastos possa contribuir para a alteração de suas funções. Os autores observaram que as propriedades oxidativas do EGb protegem os osteoclastos de danos celulares e morte quando expostos atividade de radicais livres. Desta forma, o EGb pode se tornar uma boa alternativa para a osteoporose já que poderia atuar inibindo a reabsorção óssea e promovendo a osteogênese (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994).

Diante do exposto e na busca de tratamentos novos e alternativos para a osteoporose estabelecida, o presente estudo foi idealizado na tentativa de tratar através da combinação do extrato de *G. Biloba* (EGb 761) e um programa de exercício físico a osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é uma variedade do conjuntivo com propriedades especiais, no qual a matriz extracelular foi impregnada com sais de cálcio e fosfato por um processo chamado mineralização (MONOLAGAS, 2000). O osso sofre mudanças constantes ao longo da vida em resposta a condições anormais ou fisiológicas, exerce função metabólica, por ser fonte de cálcio, mantendo o nível adequado deste mineral no sangue, é um tecido em constante renovação.

Constituído por três tipos celulares: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. O primeiro tipo deriva das células osteoprogenitoras da medula óssea e se localiza na superfície das trabéculas, no canal de Havers e no periósteo, e tem a função principal de sintetizar matriz óssea não mineralizada (aposição óssea) constituída por colágeno tipo I, por proteínas não colagênicas (fibronectina, tenascina e osteopontina), por proteínas  $\lambda$ -carboxiladas (osteocalcina ou proteína Gla) e por proteoglicanos (sulfato de condroitina) (LERNER, 2000). Cerca de 70% da matriz óssea são mineralizados logo após a sua síntese e o restante sofre mineralização gradual (NUNES; NUNES, 1988).

À medida que a matriz óssea é sintetizada, os osteoblastos ficam envolvidos por ela e passam a ser chamados osteócitos. Essas células têm como função manter a viabilidade do tecido ósseo (TATE et al., 2004) e reabsorver a matriz e os minerais do osso pela osteólise osteocítica, mecanismo de reabsorção profunda, essencial para manter constantes os níveis de cálcio extracelulares (CILLINAME, 2002; TAZAWA et al., 2004). Os osteócitos se alojam em lacunas no interior do tecido ósseo mineralizado e se comunicam com outros osteócitos e osteoblastos através de projeções intercanaliculares, as junções gap (TATE et al., 2004). Essas junções são canais intramembranosos formados por proteínas conhecidas como conexinas e que promovem a comunicação entre o citoplasma de duas células vizinhas, permitindo a passagem de metabólitos, íons e moléculas sinalizadoras intracelulares, tais como o cálcio e o AMPc (CHERIAN et al., 2003).

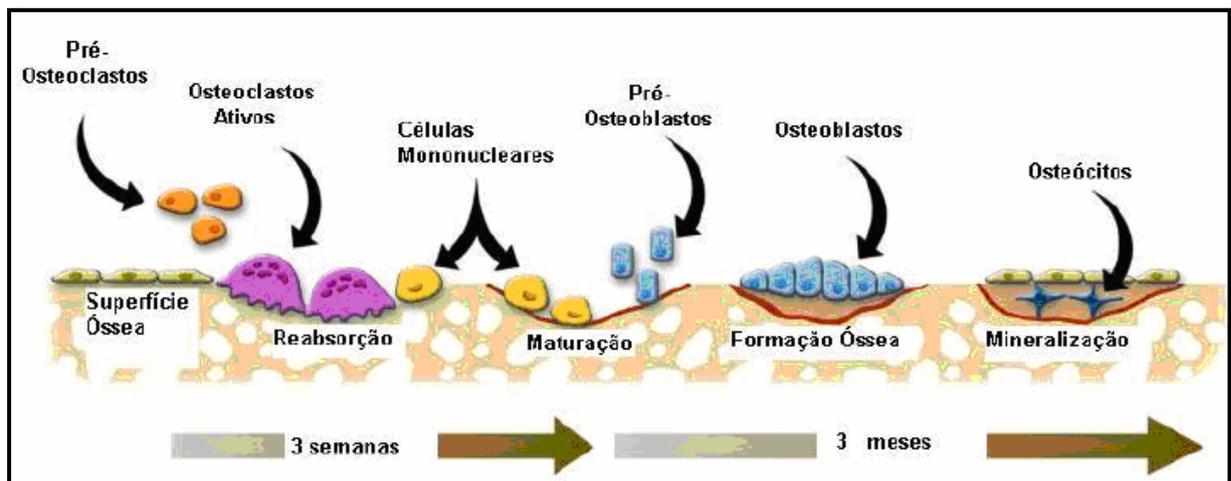
Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas da fusão dos precursores das células mononucleares hematopoiéticas com diferenciação dependente dos fatores liberados pelas células da linhagem osteoblástica

(MONOLAGAS, 2000). Os osteoclastos localizam-se na superfície das trabéculas e dos canais de Havers e no periósteo, alojados nas lacunas de Howship. Sua função principal, quando ativado, é promover a reabsorção óssea por osteoclasia (BOYLE, SIMONET, LACEY, 2003). Por ser um tecido multifuncional, o osso é responsivo a uma variedade de estímulos, dentre eles, os biológicos, bioquímicos e biomecânicos (BECK; SHOEMAKER, 2000).

A remodelação óssea é constante na vida do indivíduo (LERNER, 2006) e inicia-se na vida fetal (RAISZ, 1999). Enquanto jovem, o indivíduo necessita deste processo para manter a forma durante o crescimento e, enquanto adulto, apesar de tornar-se um processo fisiológico e lento, é essencial para manutenção da integridade estrutural (QUINN; GILLESPIE, 2005; VÄÄNÄNEN, 2005) e para o metabolismo do tecido ósseo. A remodelação óssea é regulada por fatores locais (citocinas, prostaglandinas e proteínas) e sistêmicos (hormônios como estrógeno e PTH - hormônio da paratireoide) (SIMON, 2005; SOUZA et al., 2010).

A reabsorção do osso compreende a remoção simultânea da matriz óssea e dos minerais. Ocorre através de dois mecanismos diferentes: a osteoclasia e a osteólise osteócítica. A osteólise osteócítica é uma reabsorção mais profunda, derivada dos osteócitos (MATSU; NANGO, 2012). O conceito de que os osteócitos reabsorvem osso através de um processo chamado de osteólise osteocítica é recente e surgiu de modo a explicar a liberação de cálcio a partir da matriz óssea (KLEIN-NULEND, 2003; TAZAWA et al., 2004).

A remodelação óssea por osteoclasia se dá por etapas reguladas e que tem a seguinte sequência: ativação, reabsorção e formação (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006). A etapa inicial envolve a interação de células precursoras de osteoblastos e osteoclastos, que induz à diferenciação, migração e fusão de um grupo de pré-osteoclastos, promovendo a ativação destas células. Estes osteoclastos, recém diferenciados, iniciam a reabsorção de uma área da superfície óssea. Entretanto, antes de começar a etapa de formação, existe uma fase de “inversão”, ainda não totalmente compreendida (LERNER, 2000). Durante esta fase, ocorre a degradação de colágeno e deposição de proteoglicanas, formando uma “linha cimentante”. Ocorre também a liberação de fatores de crescimento para iniciar a fase de formação. Em seguida, pré-osteoblastos são ativados, proliferam-se, diferenciam-se em osteoblastos e começam a formar matriz óssea na área previamente reabsorvida (RAISZ, 1999; SOUZA et al., 2010).



**Figura 1:** Ciclo de remodelação óssea por osteoclasia. (Fonte: Aquino, 2005)

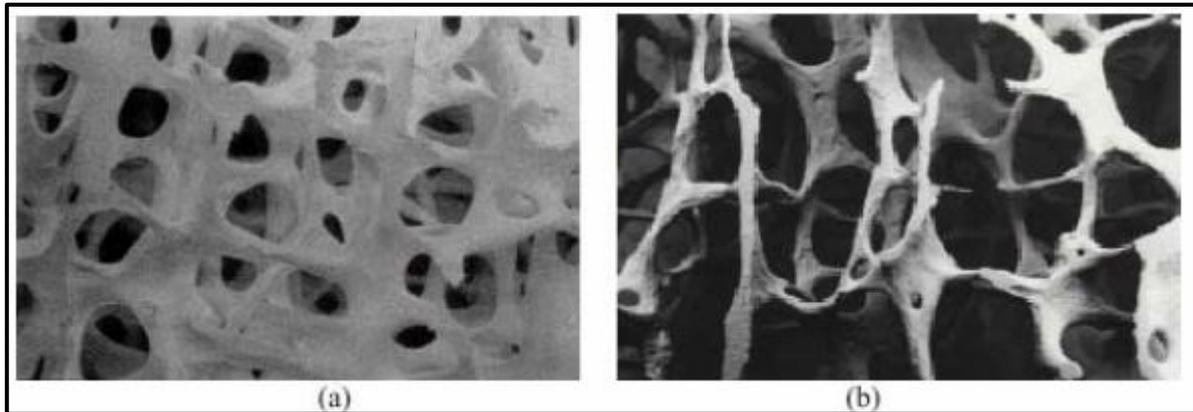
Fatores locais e hormônios sistêmicos controlam o recrutamento, replicação e atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Os hormônios agem direta ou indiretamente nestas células alterando síntese, atividade e ativação de receptores de fatores locais ou ativação de proteínas específicas que modulam os efeitos destes fatores (LIMA et al., 2001). Fatores de crescimento, citocinas, prostaglandinas e leucotrienos, por sua vez, fazem parte dos fatores produzidos localmente que regulam estas células (PARFITT, 2002; SIMON, 2005).

## 2.2. Osteoporose

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define osteoporose como uma “doença esquelética sistêmica caracterizada por massa óssea baixa e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura”(PINTO et al., 2006).

Estimativas alarmantes sugerem que uma de cada duas mulheres apresentará uma fratura osteoporótica em algum momento de sua vida (ZANETTE et al., 2003), tornando a osteoporose um problema de saúde pública. Prevê-se para o ano de 2050 um total de 6,26 milhões de fraturas de colo de fêmur decorrentes da osteoporose em todo o mundo (ZANETTE et al., 2003; LOCATIVA, FARIAS, 2010).

Quando a diminuição de massa óssea ainda não é acentuada, a osteoporose pode ser assintomática. À medida que a perda óssea aumenta, surgem sinais e sintomas como: perda de altura, deformidade vertebral (principalmente cifose) e fraturas de vértebra, quadril, punhos e de outros ossos. O sintoma mais característico é dor nas costas por compressão vertebral (PEREIRA, 2000).



**Figura 2:** Microfotografias do osso trabecular normal (a) e osteoporótico (b).

(MARQUES NETO et al., 1995)

A OMS declarou a osteoporose como uma “Epidemia Inaceitável” e está convocando médicos, pacientes, imprensas e governos a reconhecer a osteoporose como o segundo maior problema de saúde pública, depois das doenças do coração e que mais limita a qualidade de vida da mulher (PEREIRA, 2000; ZANETTE et al., 2003).

O objetivo da prevenção e tratamento é impedir a ocorrência de futuras fraturas e estabilizar a massa óssea. Isso inclui uma dieta saudável e adequada (que proporcione ingestão de cálcio e vitamina D), atividade física regular, evitar o tabagismo, o consumo excessivo de álcool e cafeína (CHRISTODOULOU; COOPER, 2003; MAZZIOTTI et al., 2007).

As medidas farmacológicas no tratamento da osteoporose envolvem a utilização de bifosfanatos, calcitonina, terapia de reposição de PTH (CHRISTODOULOU; COOPER, 2003; GOURLAY; FRANCESCHINI; SHEYN, 2007; CAPLAN; SAAG, 2009) e exercícios físicos.

A osteoporose tem sido classicamente dividida em osteoporose primária, quando os pacientes apresentam osteoporose isolada e osteoporose secundária,

naqueles com uma patologia associada. A primeira afeta mulheres na pós-menopausa. Nesse período a reabsorção óssea é maior que a formação, isto leva a um desequilíbrio do metabolismo ósseo causando a osteoporose. Na menopausa há perda de osso trabecular em ritmo três vezes maior do que o normal, sendo assim os ossos com maior teor de tecido trabecular, como os corpos vertebrais, antebraço distal e mandíbula são mais comprometidos, o que explica a maior incidência de fraturas e colapso das vértebras, fratura de Colles (extremidade distal do rádio) e perda de dentes (CARRENO; BARBSA; PEREIRA, 2002). A osteoporose primária é devido à maior atividade osteoclástica e também devido ao decréscimo no nível de estrógeno (RIGSS, 2000; MONOLAGAS, 2000; QUINN; GILLESPIE, 2005; LIANG et al., 2008). A osteoporose secundária refere-se a vários distúrbios e condições clínicas como o uso de fármacos, hipertireoidismo, imobilizações, quimioterapia, entre outros, que resultem em perda óssea (ZANETTE et al., 2003; SOUZA et al., 2010).

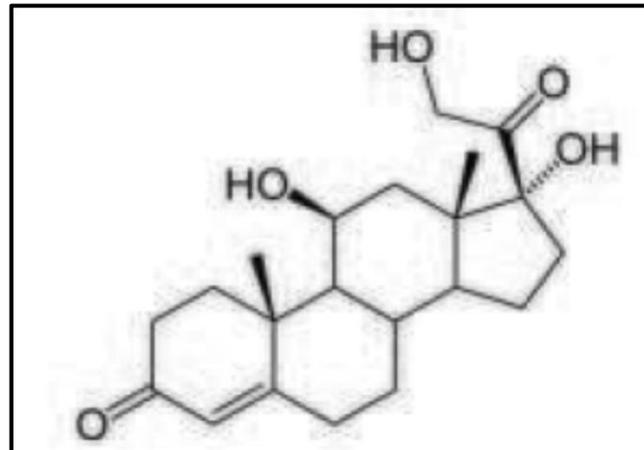
### **2.3. Glicocorticoides**

Os glicocorticoides (GCs) pertencem à classe dos hormônios esteroides. Eles possuem um núcleo básico derivado do colesterol-ciclopentano perhidrofenantreno, e o seu representante natural é o cortisol ou hidrocortisona, um composto formado por 21 átomos de carbono (Figura 3). Existem muitos GCs produzidos no córtex adrenal que foram sintetizados e introduzidos como medicamentos pela indústria farmacêutica (BUTTGEREIT; BRAND; BRUTMESTER, 1999; CAPLAN; SAAG, 2009) e amplamente utilizados na medicina.

A razão desse uso tão difundido é a capacidade anti-inflamatória e imunossupressora dos glicocorticoides. Dentre estes medicamentos, podemos citar a Hidrocortisona, Betametasona, Cortisona, Prednisona, Metilprednisona e Dexametasona (BUTTGEREIT; BRAND; BRUTMESTER, 1999; CAPLAN; SAAG, 2009).

A osteoporose é a complicação iatrogênica mais frequentemente observada no tratamento crônico com doses farmacológicas desses esteroides. A gravidade da perda óssea é maior nos primeiros seis meses de tratamento, podendo persistir caso

o paciente esteja em uso de doses mais elevadas de glicocorticoides (LANNA; JR; PAULA, 2003).



**Figura 3:** Desenho esquemático representando a estrutura química do cortisol (Glicocorticoide). (Fonte: BUTTGEREIT; BRAND; BRUTMESTER, 1999)

A osteoporose induzida por glicocorticoides constitui a causa mais frequente de osteoporose secundária, correspondendo a cerca de 25%. Metade dos doentes que realizam corticoterapia, por mais de seis meses, têm osteoporose e cerca de 1/3 desenvolvem fraturas, caso tratamento se prolongar por um ano (GUTIÉRREZ - POLO, 2003). As fraturas osteoporóticas vertebrais e dos ossos longos são causa de mobilidade e associam-se a diminuição da esperança média de vida em idades avançadas.

Os efeitos adversos dos GCs sobre o tecido ósseo foram descritos há mais de meio século atrás por Harvey Cushing. Atualmente, o problema atinge uma dimensão maior pelo diagnóstico de osteoporose ser mais frequente e pelo amplo uso, muitas vezes indiscriminado, dos análogos dos GCs para o controle de diversas doenças. Isto levou ao aparecimento marcante das fraturas, principalmente no esqueleto axial (BARACHO et al., 2011). O grau de perda óssea é mais acentuado em áreas com predominância de osso trabecular, tais como a coluna vertebral e costelas. (CUSHING, 1932).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a ocorrência de osteoporose nessa condição, como a ação direta dos glicocorticoides nas paratireoides e nas células ósseas, alterações na produção de prostaglandinas, citocinas, interleucinas, alterações na secreção do hormônio do crescimento (GH),

do fator semelhante a insulina - I (IGF-I) e esteroides gonadais (ZANETTE et al., 2003; SOUZA et al., 2010).

A partir dessas vias, os GCs desempenham sua ação podendo ser tanto antiinflamatória quanto imunossupressora, promovendo apoptose das células linfoides; inibindo a síntese de determinadas citocinas; modulam direta e indiretamente a função das células B; inibem a proliferação e diferenciação de monócitos e atividade de macrófagos; inibem o movimento de células e fluidos a partir do compartimento intravascular; inibem a ação da histamina, a síntese das prostaglandinas e a ação dos ativadores do plasminogênio. Os GCs interferem na circulação de células imunes, diminuindo o número de linfócitos periféricos, principalmente linfócitos T, e inibem o acúmulo de neutrófilos no local da inflamação (BAXTER, 1990; BAMBERGER; SCHULTE; CHROUSOS, 1996).

Atualmente, não está completamente esclarecido se existe uma dose mínima de glicocorticoide que seja simultaneamente eficaz e segura para o tecido ósseo (GUTIÉRREZ- POLO, 2003). Alguns autores determinaram uma dose de 5mg de prednisolona por dia (ou equivalente) como limite inferior de dose deletéria para a homeostasia metabólica normal da remodelação óssea (GUTIÉRREZ- POLO, 2003). No entanto, num estudo retrospectivo, Van Staa et al. (2002) documentaram um aumento do risco relativo de fratura vertebral para doses inferiores a 2,5 mg por dia de prednisona (VAN STAA et al., 2000) e do risco relativo de fratura do colo do fêmur para doses superiores a 2,5 mg por dia.

#### **2.4. Exercícios Físicos e Metabolismo Ósseo**

A influência da atividade física sobre o tecido ósseo tem sido amplamente discutida na literatura. Diversas linhas de evidência, incluindo trabalhos sobre as consequências da imobilização e a relação entre exercício físico e massa óssea, defendem o papel benéfico da atividade na gênese e na mineralização dos ossos (KANNUS et al., 1992; HART et al., 2001).

Os benefícios que as atividades físicas promovem nos sistemas do corpo humano são bem conhecidos; por sua vez, a prática de exercícios por usuários crônicos de GC serviria de meio de prevenção ou tratamento das consequências da síndrome metabólica gerada, resultando em hipertensão arterial, diabetes mellitus,

aumento da gordura corporal em regiões específicas (rosto, região centrípeta abdominal e dorso) e diminuição drástica da massa muscular estriada esquelética (ZAMAN et al., 2000).

A quantidade máxima de massa óssea acumulada por um indivíduo é denominada pico de massa óssea. Os ganhos de massa óssea são muito rápidos na adolescência, sendo que 90% são adquiridos até os 18 anos de idade. O pico de massa óssea é determinado por fatores genéticos e hormonais, mas pode ser significativamente influenciado pelo peso corporal, hábitos alimentares, tabagismo, álcool, exposição ao sol e pelos níveis de atividade física (HONIG, 2008).

A tensão mecânica gerada pelo exercício constitui um dos estímulos mais importantes para a formação óssea e desempenha um papel importante para minimizar a perda óssea em mulheres pós-menopausa (OCARINO; SERAKIDES, 2006) e em ratas ovariectomizadas (HONDA et al., 2003). A tensão de cisalhamento que ocorre pelo estresse gerado no osso inicia uma cascata de eventos, incluindo a elevação de cálcio intracelular, a secreção autócrina e parácrina, a expressão de fatores de crescimento e a produção de proteínas na matriz óssea (TURNER; ROBLING, 2003). A carga imposta pelo exercício produz grandes taxas de deformação na matriz óssea estimulando a osteogênese.

Estudos com humanos (CHIEN et al., 2000; BERGSTROM et al., 2008) e com animais (HONDA et al., 2003; HUANG et al., 2008) têm demonstrado que o exercício aumenta a densidade mineral óssea (DMO) e a força óssea (HART et al., 2001). Acredita-se que o estresse mecânico gerado pelo exercício desempenhe um papel importante na resposta osteogênica.

O exercício tem sido considerado positivo para o sistema ósseo, e, por isso, tem sido utilizado como prevenção e tratamento da osteoporose (MELTON et al., 2004; IWAMOTO; TAKEDA; SATO, 2005). A massa óssea pode ser aumentada por alguns programas de exercício para adultos e idosos e atenuar a sua perda associada ao envelhecimento (GUADALUPE-GRAU et al., 2009).

Vários tipos de programas de exercício são utilizados para investigar sua resposta no tecido ósseo. Alguns autores utilizaram a caminhada e a corrida (BORER et al., 2007; HUANG et al., 2008), outros a natação (HUANG et al., 2003), exercícios resistidos (NOTOMI et al., 2000), saltos verticais (HONDA et al., 2003; UMEMURA et al., 2008) e a escalada (NOTOMI et al., 2000).

Fatores como intensidade, duração e nível de aptidão física influenciam estas adaptações fisiológicas, além disso, muitas destas adaptações provocadas pelo treinamento só se manifestam após oito semanas de exercícios graduais (MANETTA et al., 2002).

#### *2.4.1. Natação*

Embora a natação seja considerada uma atividade em que não há suporte do peso corporal, o aumento da densidade óssea em resposta à natação pode estar relacionado com a intensidade da atividade muscular (NAGASAWA et al., 2008).

A influência da força muscular sobre a massa óssea tem sido destacada (BAYRAMOGLU et al., 2005). A contração muscular atua direta ou indiretamente sobre os ossos produzindo um estímulo osteogênico. Mais de 70% da tensão sofrida pelo osso são transmitidas pela força muscular e não pelo peso corporal (IWAMOTO; TAKEDA; SATO, 2005). Embora a influência da contração muscular sobre o metabolismo ósseo tenha sido estudada, os resultados ainda são controversos (HONDA et al., 2003).

Alguns estudos têm demonstrado uma relação positiva entre a força muscular e a massa óssea (RENNO et al., 2007). Em contrapartida, outros autores não encontraram nenhuma relação significativa (DALY et al., 2004). Snyder et al. (1992) compararam o exercício de natação com o de corrida em ratas Wistar, e observaram que o grupo que treinou natação apresentou um úmero mais pesado e maior conteúdo mineral ósseo (CMO) quando comparado ao grupo corrida, indicando que a força muscular produzida durante o exercício de natação provoca adaptações no osso. Em outro estudo semelhante, pesquisadores observaram que ambos os exercícios (corrida e natação) provocaram aumento no peso e na força da tíbia e do fêmur de ratos (HUANG et al., 2003).

### **2.5. Tomografia Computadorizada Quantitativa (TCQ)**

Vários métodos têm sido empregados no estudo quantitativo do esqueleto em pacientes com osteoporose. Os métodos iniciais que foram desenvolvidos foram a morfometria cortical radiográfica, geralmente do segundo metacarpo da mão não-

dominante (índice metacarpo) (DEQUEKER, 1976), a Single Photon Absorptiometry (SPA) medição da atenuação de um feixe de fótons com um único nível de energia e Dual Photon Absorptiometry (DPA) análise da atenuação de um feixe puntiforme de radiação de uma fonte externa de gadolínio ( $^{153}\text{Gd}$ ), com dois níveis de energia (CAMERON; SORENSON, 1963). Na década de 1980 Com o objetivo de superar as limitações da DPA, a fonte de  $^{153}\text{Gd}$  foi substituída por uma fonte de raios-X, que possui um aumento substancial na intensidade da saída do fluxo de radiação, o que possibilita um exame mais rápido (4-6 min), com menor erro de precisão (~1%), menor dose de radiação para o paciente e melhor resolução das imagens (ADAM, 2009).

No entanto, em 1970 foi introduzida a TCQ, inicialmente para avaliação intracraniana em 1973 (HOUNSFIELD, 1973), e alguns anos mais tarde, o corpo inteiro através de scanners estavam disponíveis (KREEL, 1976). Logo após isso a capacidade quantitativa da tomografia foi aplicada ao esqueleto (ISHERWOOD et al., 1976; RUEGSEGGER et al., 1976).



**Figura 4.** Exame de tomografia computadorizada quantitativa em animais experimentais .

Este método utiliza raios X, e fornece uma imagem que é baseada nos coeficientes de absorção de raios-X lineares dos tecidos através do qual ele passa. Todos corpo clínicos scanners CT são calibrados de forma semelhante para a atenuação de raios-X de água, resultando em números CT, medido em unidades Hounsfield (HU), em relação à água, sendo 0HU. Áreas de materiais de alto número

atômico, como os ossos, absorvem mais raios-X, tem um número alto HU e aparecem em branco na imagem (ADAM, 2009). A geração da imagem tomográfica é um processo de dois passos de aquisição inicial de verificação de dados e, em seguida, a reconstrução tomográfica por um processo de cálculo da imagem a partir dos dados adquiridos. O operador pode selecionar uma variedade de parâmetros para adquirir e reconstruir a imagem que têm impacto sobre a qualidade de imagem e exposição à radiação (ENGELKE et al., 2008).

Nos últimos anos, com a evolução da técnica e do reconhecimento das vantagens da TCQ em comparação a DPA (medidas separadas de densidade mineral óssea cortical e trabecular, informações sobre a morfometria óssea a partir de parâmetros biomecânicos que podem ser extraídos) seu uso em estudos nos músculo-esquelético tem aumentado (GUGLIELMI; LANG, 2002).

## 2.6. *Ginkgo biloba*

*G. biloba* L. 1771, é membro da família Ginkgoaceae, nativa do sudeste da China é uma árvore ornamental popular em muitas partes do mundo. O extrato das suas folhas vem sendo utilizado na medicina chinesa por milhares de anos no tratamento de inúmeras condições patológicas, incluindo doenças neurológicas, doenças inflamatórias e disfunções do coração e dos pulmões. Hoje em dia, extratos padronizados de composições bem definidas foram desenvolvidos e são mundialmente consumidos como medicamentos fitoterápicos e suplementos alimentares (HE et al., 2008).



**Figura 5.** Folhas de *Ginkgo biloba* L. (Fonte: Singh et al., 2008).

A árvore de *G. biloba* também é conhecida por sua grande resistência genética, apresentando defesa contra insetos, microorganismos e toxinas ambientais (TESCH, 2003; SMITH; LUO, 2004), fato comprovado na cidade japonesa de Hiroshima, já que foi a primeira planta a crescer na região após a explosão da bomba atômica (TESCH, 2003).

Os principais grupos de substâncias do extrato de *G. biloba* são os flavonóides, os terpenóides e as protoantocianidinas. O EGb 761 é uma mistura complexa padronizada com teor de 24% de glicosídeos flavonóides e 6% de lactonas terpênicas. A fração flavonóide é composta principalmente pela quercetina, kaempferol, isoramnetina e seus glicosídeos. A fração terpenóide inclui os ginkgolídeos A, B, C e J, assim como a bilobalida (He et al., 2008).

### 2.6.1. Utilização Clínica do *G. biloba*

Há séculos o *G. biloba* tem sido utilizado com funções medicinais. Os primeiros relatos do uso clínico remota mais de 5000 anos, na China antiga (SMITH; LUO, 2004). As indicações incluíam tratamentos para doenças do coração e pulmão através da inalação de vapores ou ingestão do chá (DIAMOND et al., 2000). Nos dias de hoje, o extrato obtido a partir das folhas da árvore de *G. biloba* tem sido utilizado largamente pela população para o tratamento de diversas patologias. Suas principais indicações são na “insuficiência cerebral” (confusão, redução da memória, distração, vertigem, zumbido, cefaleia), doença de Alzheimer, doenças vasculares (BLUMENTHAL et al., 2003); neuropatias diabética, oclusão venosa retiniana, degeneração macular senil, doença de Raynaud (DUBEY et al., 2004).

O emprego do extrato do *G. biloba* (EGb) nos casos descritos acima é devido, principalmente, à ação na inibição do fator de ativação plaquetária e na importante atuação como antioxidante. Na primeira, ele impede a agregação plaquetária e causa aumento da fluidez sanguínea. Já como antioxidante, o extrato age na diminuição de espécies reativas de oxigênio, além de atenuar a peroxidação lipídica da membrana (SMITH; LUO, 2004). Além disso, foram comprovadas diversas ações atribuídas ao EGb que poderiam estar relacionadas com os efeitos observados clinicamente tais como: inibição da enzima 3'5' – GMPc fosfodiesterase, provocando relaxamento endotelial (SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003) através da estimulação de óxido nítrico, promovendo aumento da circulação em

artérias, veias e capilares; aumento da liberação e receptação de serotonina; inibição da redução senil dos receptores muscarínicos colinérgicos e dos receptores  $\alpha$  – adrenérgicos; estimulação da receptação de colina do hipocampo; inibição da deposição de  $\beta$  – amiloides (SIERPINA; WOLLSCHLAEGER; BLUMENTHAL, 2003); aumento da plasticidade neuronal; aumento da captação e o consumo de glicose pelo cérebro (SMITH; LUO, 2004).

Os efeitos adversos relatados após o uso do extrato são distúrbios do trato gastrointestinal como diarreia, náuseas e vômitos (DUBEY et al., 2004) e distúrbios vasculares como cefaleia, reação cutânea alérgica, vertigem e palpitação. Vale ressaltar que o uso do EGb é uma alternativa segura, uma vez que apresenta boa tolerabilidade e não há evidências de efeitos tóxicos deste extrato em doses farmacologicamente ativas. Em estudos toxicológicos este extrato não apresentou efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (BILIA, 2002). Ainda em relação à toxicidade, a DL50 do EGb em camundongos foi maior que 9600 mg/kg, o que representa 2100 vezes a mais que a dose diária recomendada, sendo indicativo de segurança do seu uso (BILIA, 2002).

### 2.6.2 Propriedades Estrogênicas do *Ginkgo biloba*

Recentemente aventou-se a possibilidade do EGb ser utilizado como um fitoestrogênio no tratamento dos sintomas da menopausa (OH; CHUNG, 2004), porém pouco se sabe sobre o uso deste fitoterápico durante esta fase.

Um estudo *in vitro*, comprovou a ação estrogênica do extrato e seus compostos flavonoides (quercetina, kaempferol e isorhamnetina). As substâncias presentes no extrato se ligaram diretamente ao receptor de estrogênio mostrando afinidade maior para o receptor  $\beta$  de estrogênio em comparação com o  $\alpha$  e promovendo inibição da ligação do estradiol em ambos os receptores, indicando uma possível competição com o mesmo receptor. O extrato causou ainda efeito estrogênico visto através da proliferação em modelos de células de tumor de mama e da expressão do gene pS2, regulado pela resposta ao estrógeno (OH; CHUNG, 2004).

Sabe-se também que a quercetina e o kaempferol alteram a fisiologia do metabolismo ósseo, provavelmente mediados pela ação estrogênica intrínseca destas substâncias, podendo ser utilizadas para a prevenção e tratamento da osteoporose causada pela menopausa. Em estudos realizados por Pang et al.

(2006), o kaempferol impediu a produção de citocinas osteoclastogênicas pelos osteoblastos e ambas substâncias alteraram a diferenciação celular dos osteoclastos. A quercetina e o kaempferol também mostram inibir a reabsorção óssea pelos osteoclastos bem como induzir a apoptose dessa célula, provavelmente via efeito estrogênico, assim como induziram o aumento da ação da fosfatase alcalina em osteoblastos, promovendo aumento da atividade do osteoblasto (WATTEL et al., 2003).

Apesar dos indícios do efeito estrogênico do extrato de *G. biloba*, não existem estudos conclusivos que comprovem a sua ação estrogênica.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, J. E. Quantitative computed tomography. **Eur. J Radiol.**, v. 71, p. 415-424, 2009.
- BALASCH, J. Sex steroids and bone: current perspectives. **Hum. Reprod. Updat.**, v. 9, n. 3, p. 207-222, 2003.
- BAMBERGER, C. M.; SCHULTE, H. M.; CHROUSOS, G. P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Endocr. Vet.**, v. 17, n. 3, p. 245-261, 1996.
- BARACHO, N. C. V.; PAULA, A. M.; FRANZINI – JÚNIOR, R.; SILVA, R. M. B.; APPOLARI, B.; IRULEGUI, R. S. C. Avaliação da eficácia de administração de dexametasona ou metilprednisolona para produzir osteoporose em ratas. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde**, v. 1, p. 1-7, 2011.
- BAXTER, J. D. Minimizing the side effects of glucocorticoids therapy. **Adv. Intern. Med.**, v. 35, p. 173-194, 1990.
- BAYRAMOGLU, M.; SOZAY, S.; KARATAS, M.; KILINC, S. Relationships between muscle strength and bone mineral density of three body regions in sedentary postmenopausal women. **Rheumatol. Int.**, v. 25, n. 7, p. 513-517, 2005.
- BECK, B. R.; SHOEMAKER, R. M. Osteoporosis: understanding key risk factors and therapeutic options. **Phys. Sportsmed.**, v. 28, n. 2, p. 69-84, 2000.
- BEMBEN, D. A.; FETTERS, N. L.; BEMBEN, M. G.; NABAVI, N.; KOH, E. T. Musculoskeletal responses to high- and low-intensity resistance training in early postmenopausal women. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 32, p. 1949-1957, 2000.
- BERGSTROM, I.; LANDGREN, B.; BRINCK, J.; FREYSCHUSS, B. Physical training preserves bone mineral density in postmenopausal women with forearm fractures and low bone mineral density. **Osteoporos. Int.**, v. 19, n. 2, p.177-183, 2008.
- BILIA, A. R. *Ginkgo biloba* L. **Fisiot.**, v. 73, n. 3, p. 276-279, 2002.
- BLUMENTHAL, M.; BRINCKMANN, J.; WOLLSCHLAEGER, B. *Ginkgo*. **The ABC clinical guide to herbs.**, v. 1, p. 185-200, 2003.

BORER, K. T.; FOGLEMAN, K.; GROSS, M.; LA NEW, J. M.; DENGEL, D. Walking intensity for postmenopausal bone mineral preservation and accrual. **Bone**, v. 41, n. 4, p. 713-21, 2007.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337-342, 2003.

BRAYBOY, J. R.; CHEN, X. W.; LEE, Y. S.; ANDERSON, J. J. B. The protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) against free radical damage to osteoblast-like bone cells (MC3T3- E1) and the proliferative effects of EGb 761 on these cells. **Nutri. Res.**, v. 21, n. 9, p. 1275-1285, 2001.

BUTTGEREIT, F.; BRAND, M. D.; BRUTMESTER, G. R. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, n. 2, p. 363-368, 1999.

CAMERON, J. R.; SORENSON, J. A. Measurement of bone mineral in vivo: a new improved method. **Science**, v. 142, p. 230-232, 1963.

CAPLAN, L.; SAAG, K. G. Glucocorticoids and the risk of osteoporosis. **Expert. Opin. Drug Saf.**, v. 8, n. 1, p. 33-47, 2009.

CARRENO, U. F. R.; BARBOSA, S.; PEREIRA, A. A. C. Osteoporose e Odontologia. **Arq. For. Clín. Ciênt. Odont.**, v. 1, p. 10-15, 2002.

CHERIAN, P. P.; CHENG, B.; GU, S.; SPRAGUE, E.; BONEWALD, L. F.; JIANG, J. X. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. **The J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 43146- 43156, 2003.

CHIEN, M. Y.; WU, Y. T.; HSU, A. T.; YANG, R. S.; LAI, J. S. Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. **Calcif. Tissue Int.**, v. 67, n. 6, p. 443-8, 2000.

CHRISTODOULOU, C.; COOPER, C. What is osteoporosis. **Postgraduate Med. J.**, v. 79, n. 929, p. 133-8, 2003.

CILLINAME, D. M. The role of osteocytes in bone regulation: mineral homeostasis versus mechanoreception. **J. Musc. Neuronal Interact.**, v. 2, p. 242-244, 2002.

COOPER, M. S. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase: a regulator of glucocorticoid response in osteoporosis. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 31, p. 16-21, 2008.

CUSHING, H. The basophilic adenomas of the pituitary body and their clinical manifestation. **Bull. Johns Hopkins Hosp.**, v. 50, p. 137-195, 1932.

DALY, R. M.; SAXON, L.; TURNER, C. H.; ROBLING, A. G.; BASS, S. L. The relationship between muscle size and bone geometry during growth and in response to exercise. **Bone**, v. 34, n. 2, p. 281-287, 2004.

DANG, G. Z. C.; LOWIK, C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. **Endocrinol. Metab.**, v. 16, p. 207-211, 2005.

DAS, A. S.; DAS, D.; MUKHERJEE, M.; MUKHERJEE, S.; MITRA, C. Phytoestrogenic effects of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (*Rattus norvegicus*) model of osteoporosis. **Life Sci.**, v. 77, p. 3049-3057, 2005.

DENG, Q.; WANG, L.; WEI, F.; XIE, B.; HUANG, F.; HUANG, W.; SHI, J.; HUANG, Q.; TIAN, B.; XUE, S. Functional properties of protein isolates, globulin and extracted from *Ginkgo biloba* seeds. **Food Chem.**, v. 124, p. 1458-1465, 2011.

DEQUEKER, J. Quantitative radiology: radiogrammetry of cortical bone. **Br. J. Radiol.**, v. 48, n. 587, p. 912-920, 1976.

DIAMOND, B. J.; SHIFLETT, S. C.; FEIWEL, N. *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, v 81, n 5, p. 668-678, 2000.

DONFRACESCO, R.; DELL'UOMO, A. *Ginkgo biloba* in Down Syndrome. **Phytomedicine**, v. 11, n. 6, p. 469- 474, 2004.

DUBEY, A. K.; SHANKAR, P. R.; UPADHYAYA, D. *Ginkgo biloba* – an appraisal. **Kathmandu Univ. Med. J.**, v. 2, n. 3, p. 225-229, 2004.

ENGELKE, K.; ADAM, J. E. ARMBRECHT, G. Clinical use of quantitative computed tomography and peripheral quantitative computed tomography in the management of osteoporosis in adults: the 2007 ISCD Official Position. **J. Clin. Densitom.**, v. 11, n. 1, p. 123-162, 2008.

GERALDES, A. A. R. Exercício como estratégia de prevenção e tratamento da osteoporose: Potencial e limitações. **Rev. Bras. Fis. Exerc.**, v. 2, n. 1, p. 1-28, 2003.

GOURLAY, M.; FRANCESCHINI, N.; SHEYN, Y. Prevention and treatment strategies for glucocorticoid-induced osteoporotic fractures. **Clin. Rheumatol.**, v. 26, n. 2, p. 144-153, 2007.

GUADALUPE-GRAU, A.; FUENTES, T.; GUERRA, B.; CALBET, J. A. Exercise and bone mass in adults. **Sports Med.**, v. 39, n. 6, p. 439-468, 2009.

GUGLIELMI, G.; LANG, T. F. Quantitative computed tomography. **Semin. Musculoskelet Radiol.**, v. 6, n. 3, p. 219-227, 2002.

GUTIÉRREZ-POLO, R. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Na. Sist. Navar.**, v. 26, p. 63-80, 2003.

HARLEY, D. E.; HEINKE, L.; ELSABAGH, S.; FILE, S. E. Effects on cognition and mood in postmenopausal women of 1-week treatment with *Ginkgo biloba*. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, n. 3, p. 711-720, 2003.

HART, K. J.; SHAW, J. M.; VAJDA, E.; HEGSTED, M.; MILLER, S. C. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, n. 4, p. 1663-1668, 2001.

HE, J. LIN, J.; LI, J.; ZHANG, J. H.; SUN, X. M.; ZENG, C. M. Dual effects of *Ginkgo biloba* leaf extract on human red blood cells. **Nordic. Pharm. Society.** v. 104, p. 138-144, 2008.

HONDA, A.; SOGO, N.; NAGASAWA, S.; SHIMIZU, T.; UMEMURA, Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. **J. Appl. Phys.**, v. 95, n. 3, p. 1032-1037, 2003.

HONIG, S. Treatment strategies for patients with low bone mass: the younger postmenopausal female. **Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis.**, v. 66, n. 3, p. 240-243, 2008.

HOUNSFIELD, G. N. Computerized transverse axial scanning (tomography).1. Description of system. **Br. J. Radiol.**, v. 46, n. 552, p. 1016-1022, 1973.

HUANG, T. H.; CHANG, F. L.; LIN, S. C.; LIU, S. H.; HSIEH, S. S.; YANG, R. S. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in rowing male Wistar rats. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26, n. 4, p. 350-357, 2008.

HUANG, T. H.; LIN, S. C.; CHANG, F. L.; HSIEH, S. S.; LIU, S. H.; YANG, R. S. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, n. 1, p. 300-307, 2003.

HUMPHRIES, B; NEWTON, R. U; BRONKS, R; MARSHALL, S; MCBRIDE, J; MCBRIDE, T. T.; KAKKINEN, K; KRAEMER, W. J.; HUMPHRIES, N. Effect of exercise intensity on bone density, strength, and calcium turnover in older women. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 32, p. 1043-1050, 2000.

ISHERWOOD, I.; RUTHERFORD, R. A.; PULLAN, B. R.; ADAM, P. H. Bone-mineral estimation by computed-assisted transverse axial tomography. **Lancet**, v. 2, n. 7988, p. 712-715, 1976.

IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; SATO, Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. **Exp. Anim.**, v. 54, n. 1, p. 1-6, 2005.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; RENSTRÖM, P.; JÄRVINEN, M.; KVIIST, M.; LEHTO, M.; OJA, P.; VUORT, I. The effects of training, immobilization and remobilization on musculoskeletal tissue. **Scand. J. Med. Sci. Spor.**, v. 2, p. 100-118, 1992.

KEMMLER, W.; ENGELKE, K.; LAUBER, D; WEINECK, J.; HENSEN, J.; KALENDER, W. A. Exercise effects on fitness and bone mineral density in early postmenopausal women: 1-year EFOPS results. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 34, n. 12, p. 2115-2123, 2002.

KLEIN-NULED, J.; NIJIWEIDE, P.; BURGUER, E. H. Osteocyte and bone structure. **Curr. Osteoporos.Rep.**, v. 1, p. 5-10, 2003.

KREEL, L. The EMI whole body scanner in the demonstration of lymph node enlargement. **Clin. Radiol.**, v. 27, n. 4, p. 421-429, 1976.

LANNA, A. M. M; MONTENEGRO JR, R. M.; PAULA, F.J.A. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticoides. **Arq. Bras. Endoc. Metab.**, v. 47, n. 1, p. 9-18, 2003.

LERNER, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 7, p. 584-595, 2006.

LERNER, U. H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biol.**, v. 19, p. 107- 120, 2000.

LIANG, L.; YU, J. F.; WANG, Y.; DING, Y. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 9, p. 1745-1751, 2008.

LIU, L. ; MARUNO, R.; MASHIMO, T.; SANKA, K.; HIGUCHI, T.; HAYASHI, K.; SHIRASAKI, Y.; MUKAI, N.; SAITOH, S.; TOKUYAMA, K. Effects of physical training on cortical bone at midtibia assessed by peripheral QCT. **J. Appl. Physiol.**, v. 95, p. 219-224, 2003.

LOCATIVA, P. G. S.; FARIAS, M. L. F. Osteoporosis and inflammation. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 54, p. 123-132, 2010.

LUCINDA, L. M. F.;VIEIRA, A. B. J.; OLIVEIRA, A. T. T.; SÁ, R. C. S.; PETERS, V. M.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with *Ginkgo biloba* extract: A histomorphometric study of mandible and femur. **Fitoterapia**, v, 81, p. 982–987, 2010.

MANETTA, J.; BRUN, J. F.; MAIMOUN, L.; CALLIS, A.; PREFAUT, C.; MERCIER, J. Effect of training on the GH/IGF-laxis during exercise in middle-aged men: relationship to glucose homeostasis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v 283, n 5, p. E929- E936, 2002

MATSUO, K.; NANGO, N. Osteocytic osteolysis : measurements of the volume of osteocytic lacunae. **Clin. Calcium**, v. 22, p. 677-683, 2012.

MAZZIOTTI, G.; GIUSTINA, A.; CANALIS, E.; BILEZIKIAN, J. P. Glucocorticoid-induced osteoporosis: clinical and therapeutic aspects. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 8, p.1404-1412, 2007.

MELTON, S. A.; HEGSTED, M.; KEENAN, M. J.; MORRIS, G. S.; O'NEIL, C. E; ZABLAH-PIMENTEL, E. M. Water exercise prevents femur density loss associated with ovariectomy in the retired breeder rat. **J. Strength Cond. Res.**, v. 18, n. 3, p. 508-512, 2004.

MONOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v.21, n.2, p. 115-137, 2000.

NAGASAWA, S.; HONDA, A.; SOGO, N.; UMEMURA, Y. Effects of low-repetition jump exercise on osteogenic response in rats. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26, n. 3, p. 226-230, 2008.

NAKAMURA, T.; IMAI, Y.; MATSUMOTO, T.; SATO, S.; TAKEUCHI, K.; IGARASHI, K.; HARADA, Y.; AZUMA, Y.; KRUST, A.; YAMAMOTO, Y.; NISHINA, H.; TAKEDA, S.; TAKAYANAGI, H.; METZGER, D.; KANNO, J.; TAKAOKA, K.; MARTIN, T. J.; CHAMBON, P.; KATO, S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of fas ligand in osteoclasts. **Cell.**, v. 130, n. 5, p. 811-823, 2007.

NETO, A. M. P.; SOARES, A.; URBANETZ, A. A.; SOUZA, A. C. A.; FERRARI, A. E. M.; AMARAL, B.; MOREIRA, C.; FERNANDES, C. E.; ZERBINI, C. A. F.; BARACAT, E.; FREITAS, E. C.; MEIRELLES, E. S.; BANDEIRA, F.; GONÇALVES, H. T.; LEMGRUBER, I.; NETO, J. F. M.; BORGES, J. L. C. B.; CASTRO, J. A. S.; FIAT, J. C.; MENDONÇA, L. M. C.; OLIVEIRA, L.; RUSSO, A. L. T.; GREGÓRIO, L. H.; MARONE, M.; CASTRO, M. L.; HAIDAR, M. A.; SANTOS, P. R. D.; PLAPLER, P.; CARNEIRO, R.; GUARNIERO, R.; MACHADO, R. B.; PEREIRA, R. M. R.; LEDERMAN, R.; RADOMINSKI, S.; EIS, S. R.; MENDES, S. R. M.; SZJENFELD, V.; CHAHADE, W. Consenso Brasileiro de Osteoporose. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 42, n. 6, p. 344-354, 2002.

NOTOMI, T.; OKAZAKI, Y.; OKIMOTO, N.; SAITOH, S.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, M. A comparison of resistance and aerobic training for mass, strength and turnover of bone in growing rats. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 83, n. 6, p. 469-474, 2000.

NUNES, I. J.; NUNES, A. A. Doenças metabólicas do osso. **Cad. Tec. Esc. Vet.**, v. 3, p. 1-66, 1988.

OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. **Rev. Bras. Med. Esp.**, v. 12, n. 3, p. 164-168, 2006.

OH, S. M.; CHUNG, K. H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sci.**, v. 74, n. 11, p. 1325-1335, 2004.

OURSLER, M. J.; KEMMLER, L. B.; LAUBER, V. C.; VON, S. S.; ENGELKE, A. T. Estrogen regulation on of gene expression in osteoblast e osteoclasts. **Crit. Rev. Enkaryol. Gene. Expr.**, v. 8, p. 125-140, 1998.

PANG J. L.; RICUPERO, D. A.; HUANG, S. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. **Biochem. Pharm.**, v. 71, n. 6, p. 818-826, 2006.

PARFITT, A. M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 5-7, 2002.

PEREIRA, R. M. R. Manifestações clínicas. In: SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose: Diagnóstico e tratamento**, Ed. Sarvier Editora de Livros, São Paulo, cap. 10, p. 90-96, 2000.

PHAN, T. C.; XU, J.; ZHENG, M. H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. **Histol. Histopathol.**, v.19, n.4, p.1325-1344, 2004.

PINTO, A.; OLIVEIRA, T. T.; DEL CARLO, R. J.; NAGEM, T. J.; FONSECA, C. C.; MORAES, G. H. K.; JÚNIOR, D. B. F.; CARDOSO, C. A. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio; atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, p. 99-107, 2006.

PINTO, R. M.; FERNANDES, E. S.; REIS, J. E. P. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* to rats. **Reprod. Toxicol.**, v. 23, n. 4, p. 480-485, 2007.

POZZI, S.; MARCHESELLI, R.; SACCHI, S.; BALDINI, L.; ANGRILLI, F.; PENNESE, E.; QUARTA, G.; STELITANO, C.; CAPAROTTI, G.; LUMINARI, S.; MUSTO, P.; NATALE, D.; BROGLIA, C.; CUOGHI, A.; DINI, D.; DI TONNO, P.; LEONARDI, G.; PIANEZZE, G.; PITINI, V.; POLIMENO, G.; PONCHIO, L.; MASINI, L.; MUSSO, M.; SPRIANO, M.; POLLASTRI, G. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients. **Leuk. Lymphoma**, v. 48, p. 1852-1854, 2007.

QUINN, J. M.; GILLESPIE, M. T. Modulation of osteoclast formation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 328, n. 3, p. 739-745, 2005.

RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clin. Chem.**, v. 45, n. 8B, p. 1353-1358, 1999.

RENNO, A. C.; SILVEIRA, G. A. R.; NASCIMENTO, R. B.; SALVINI, T.; PARIZOTO, N. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 6, p. 517-522, 2007.

RIGSS, B. L. The mechanism of estrogen regulation of bone resorption. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 10, p. 1203-1204, 2000.

ROBLING, A. G.; CASTILLO, B.; TURNER, C. H.; Designing exercise regimens to increase bone strength. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v.31, n.1, p.45-50. 2006.

ROUX, S. The genetics of osteoporosis. **Joint. Bone Soine.**, v. 68, n. 6, p. 482-486, 2001.

RUEGSEGGER, P.; ELSASSER, U.; ANLIKER, M.; GNEHM, H.; PRADER, A. Quantification of bone mineralization using computed tomography. **Radiology**, v. 121, p. 93-97, 1976.

RYAN, A. S.; NICKLAS, B. J.; DENNIS, K. E. Aerobic exercise maintains regional bone mineral density during weight loss in postmenopausal women. **J. Appl. Physiol.**, v. 84, n. 4, p. 1305-1310, 1998.

SIERPINA, V. S.; WOLLSCHLAEGER, B.; BLUMENTHAL, M. *Ginkgo biloba*. **Am. Fam. Physician.**, v.68, n 5, p. 932-936, 2003.

SIMON, L. Osteoporosis. **Clin. Geriatr. Med.**, v. 21, p. 603-629, 2005.

SMITH, J.; LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, n.4, p 465 -472, 2004.

SNYDER, A.; ZIERATH, J. R.; HAWLEY, J. A.; SLEEPER, M. D.; CRAIG, B. W. The effects of exercise mode, swimming vs. running, upon bone growth in the rapidly growing female rat. **Mech. Ageing Dev.**, v. 66, n. 1, p. 59-69, 1992.

SOUZA, M. C.; ASSEMANY, F. S.; LIMA, A. T. C.; SOUZA, R. F. Glicocorticoides e osteoporose – Artigo de revisão. **Rev. Ciênc. Med. Biol.**, v. 9, supl. 1, p. 57-64, 2010.

TATE, M. K.; ADAMSON, J. R.; TAMI, A. E. BAUER, T. W. The osteocytes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, p. 1-8, 2004.

TAZAWA, K.; HOSHI, K.; KAWAMOTO, S.; TANAKA, M.; EJIRI, S.; OZAWA, H. Osteocytic osteolysis observed in rats to which parathyroid hormone was continuously administered. **J. Bone Min. Metab.**, v. 22, p. 524-529, 2004.

TESCH, B. J. Herbs commonly used by women: an evidence-based review. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v 188, n. 5, p. S44-S55, 2003.

TURNER, C. H.; ROBLING, A. G. Designing exercise regimens to increase bone strength. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 31, n. 1, p. 45-50, 2003.

TURNER, R. T.; RIGGS, L.; SPELSBERG, T. C. Skeletal effects of estrogen. **Endocr. Rev.**, v. 15, p. 275-299, 1994.

UMEMURA, Y.; NAGASAWA, S.; HONDA, A.; SINGH, R. High-impact exercise frequency per week or day for osteogenic response in rats. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 26, n. 5, p. 456-460, 2008.

VÄÄNÄNEN, K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption – rationale for the design of new therapeutics. **Adv. Drug Deliv.**,v. 57, n. 7, p. 959-971,2005.

VAN STAA, T. P.; LEUFKENS, H. G. M.; COOPER, C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. **Osteoporos. Int.**, v. 13, p. 777-787, 2002.

VAN STAA, T.P.; LEUFKENS, H. G. M.; ABENHAIM, L.; ZHANG, B.; COOPER, C. Oral corticosteroids and fractures risk: relationship to daily and cumulative doses. **Rheumatol.**, n. 39, p. 1383-1389, 2000.

VINCENT, K. R.; BRAITH, R. W. Resistance exercise and bone turnover in elderly men and women. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 34, n. 1, p. 17-23, 2002.

WATTEL, A.; KAMEL, S.; MENTAVERRI, R. Potential inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. **Biochem. Pharmacol.**, v 65, n. 1, p. 35-42, 2003.

ZAMAN, G.; CHENG, M. Z.; JESSOP, H. L.; WHITE, R.; LANYON, L. E. Mechanical strain activates estrogen response elements in bone cells. **Bone** , v. 27, n. 2, p. 233-239, 2000.

ZANETTE, E.; STRINGARI, F.; MACHADO, F.; MARRONI, B. J.; NG, D. P. K.; CANANI, L. H. Avaliação de diagnóstico densitométrico de Osteoporose/Osteopenia conforme o sítio ósseo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, n. 1, p. 30-36, 2003.

ZAZULA, F.; PEREIRA, M. A. S. Fisiopatologia da osteoporose e o exercício físico como medida preventiva. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 7, n. 3, p. 269-275, 2003.

ZEHRA, U.; TAHIR, M.; JAFFERY, F. H.; LONE, K. P. *Ginkgo biloba* effects on mice fetal liver. **Int. J. Morphol.**, v.28, n.3, p.765-770, 2010.

ZHOU, W.; CHAI, H.; COURSON, A.; LIN, P. H.; LUMSDEN, A. B.; YAO, Q.; CHEN, C. Ginkgolide A attenuates homocysteine- induce endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. **J. Vasc. Surg.**, v. 44, n. 4, p. 853-862, 2006.

## CAPÍTULO II

Extrato de *Ginkgo biloba* (EGb761) auxilia no tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas.

Hilda Michelly Paiva dosSantos<sup>1</sup>; Valéria Wanderley-Teixeira<sup>1</sup>; Álvaro Aguiar C. Teixeira<sup>1</sup>, Fabiano Séllos Costa<sup>2</sup>, Frederico Celso Lyra Maia<sup>2</sup>, Ismaela Maria Ferreira de Melo<sup>1</sup>, Veruska Cintia Alexandrino de Souza<sup>1</sup>.

1 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil.

2 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil.

E-mail: [valeria@dmfa.ufpe.br](mailto:valeria@dmfa.ufpe.br)

## Resumo

Este trabalho avaliou o efeito protetor do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) sobre a osteoporose induzida pelo glicocorticoide dexametasona (Decadron® - 4 mg/mL), através da análise histopatológica, histoquímica (detecção de cálcio pelo Von Kossa), bioquímica (níveis séricos de cálcio e fosfatase alcalina e concentração molar de hidroxiprolina) e pela tomografia computadorizada quantitativa. Foram utilizados 30 ratas divididas em seis grupos: Grupo I - Controle; Grupo II – Osteoporose; Grupo III – Alendronato de sódio 0,2mg/Kg/dia (Controle positivo); Grupo IV – EGb1 (14mg/Kg/dia); Grupo V – EGb2 (28mg/Kg/dia) e Grupo VI – EGb3 (56mg/Kg/dia). Os animais foram avaliados no 1°, 25° e 50° dia de tratamento. O estabelecimento da osteoporose foi detectada após o final da indução pela tomografia computadorizada e confirmada pelas análises histopatológica, histoquímica e bioquímica já no 1° dia de tratamento. Nossos resultados demonstram que o EGb 761 nas dosagens de 14 e 28 mg/Kg mostram desempenho similares ao alendronato de sódio ao final do tratamento, restabelecendo a arquitetura óssea e os níveis séricos de cálcio e fosfatase alcalina semelhantemente aos animais do grupo controle, enquanto que a dosagem de 56 mg/Kg, embora tenha revertido o quadro de osteopose promoveu um quadro de hipercalcemia no 25° e 50° dia de tratamento. Desta forma conclui-se que as dosagens de 14 e 28 mg/Kg mostraram reverter a osteoporose, no entanto sugere-se maiores estudos com a finalidade de melhor compreender o efeito dose/tempo desse extrato na patologia da osteoporose e suas possíveis consequências na fisiologia de outros sistemas.

Palavras-chave: Osteoporose, bioquímica, histoquímica, *Ginkgo biloba* (EGb 761), densitometria óssea.

## 1. Introdução

A osteoporose é uma doença metabólica generalizada, caracterizada por menor aposição óssea devido à insuficiência osteoblástica [1], com redução da massa óssea por unidade de volume e de etiologia multifatorial. Entre as principais causas da osteoporose encontram-se: queda dos níveis hormonais de estrógeno e o uso de alguns medicamentos, como os glicocorticoides, sendo denominada osteoporose secundária [2].

O hipercortisolismo é considerado atualmente como a causa mais frequente de osteoporose secundária [3]. Tem sido demonstrada nessa situação uma rápida perda óssea que acomete principalmente o osso trabecular. Aproximadamente 30 a 35% dos pacientes com hipercortisolismo crônico apresentam fraturas ósseas [4]. Os glicocorticoides inibem a produção, proliferação, maturação e atividade dos osteoblastos além de incrementarem a apoptose de osteoblastos maduros e osteócitos. Também interferem na formação da matriz óssea ao inibirem a expressão do gene do colágeno tipo I e estimularem a expressão de colagenase 3 pelos osteoblastos e condrócitos [5].

Entre os fármacos mais utilizados no tratamento da osteoporose, destacam-se os bifosfatos, droga muito eficiente, porém alguns efeitos adversos são relatados tais como: intolerância gastrointestinal [6] e osteonecrose mandibular [7]. Dessa forma é interessante buscar novas alternativas para o tratamento da osteoporose.

O extrato padrão de *Ginkgo biloba* L. (EGb 761) possui 24% de fitoestrógenos em sua composição, sendo os principais o kaempferol, quercetina e isohamnetina [8]. Destes componentes a quercetina e o kaempferol foram efetivos em inibir *in vitro* a atividade de reabsorção dos osteoclastos [9]. Além dos fitoestrógenos, o extrato de *G. biloba* (EGb 761) possui em sua composição polifenóis antioxidativos que podem prevenir a perda óssea e o risco de fraturas [10].

Estudo com administração oral do EGb 761(100mg/kg) demonstrou aumento da massa óssea de ratas com osteoporose induzida por ovariectomia [11]. O extrato causou ainda efeito estrogênico visto através da proliferação em modelos de células de tumor de mama e da expressão do gene pS2, regulado pela resposta ao estrógeno [8].

Sabe-se que o estrógeno atua na remodelação óssea, porém por mecanismos ainda não totalmente elucidados. A presença de receptores para estrógeno em osteoblastos e osteócitos sugere efeito direto desse hormônio sobre o tecido ósseo [8]. Em relação aos osteoblastos, o estrógeno aumenta a diferenciação dessas células e estimula a síntese e a mineralização da matriz óssea, regulando a expressão de genes que codificam o colágeno tipo I e as proteínas

não colagênicas como osteopontina, osteocalcina, osteonectina, etc [12,13]. Em síntese os resultados encontrados sugerem que o uso do EGb pode ser uma alternativa para o tratamento da osteoporose, particularmente aquelas induzidas por uso prolongado de corticoides.

A carência de trabalhos que avaliem os efeitos dos glicocorticoides e extrato de *G. biloba* sobre o metabolismo ósseo durante períodos prolongados é considerada um dos motivos para não elucidação de muitos aspectos envolvidos na fisiopatologia da osteoporose induzida pelo medicamento. Desta forma, este trabalho avaliou o efeito protetor do extrato de *G. biloba* (EGb 761) sobre a osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas adultas, através da análise histopatológica, histoquímica, bioquímica e pela tomografia computadorizada quantitativa.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Animais e grupos experimentais*

O trabalho foi realizado no Laboratório de Histologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, para isso utilizaram-se 30 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, com 90 dias de idade, virgens, pesando  $200\text{g} \pm 30\text{g}$ , da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os animais foram confinados em gaiolas e mantidos com alimentação e água *ad libitum*, em temperatura ambiente de aproximadamente  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com iluminação artificial produzida por lâmpadas fluorescentes (marca Phillips, modelo luz do dia, 40 W), que estabeleceu o foto período de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 6:00 às 18:00 horas. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal sob a licença 044/2012 – CEUA, UFRPE.

Após um período de adaptação, foram coletados esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. Os animais que apresentarem três ciclos estrais regulares foram divididos, ao acaso, em seis grupos constituídos por 5 animais, a saber:

**Grupo I** – ratas sem tratamento (CONTROLE);

**Grupo II** - ratas induzidas à osteoporose (OSTEOPOROSE);

**Grupo III** - ratas induzidas à indução de osteoporose e tratadas com alendronato de sódio – fármaco de referência no mercado -  $0,2\text{mg/Kg/dia}$  por via intragástrica (CONTROLE POSITIVO);

**Grupo IV** - ratas induzidas à indução de osteoporose e tratadas com extrato de *G. biloba* 14mg/Kg/dia por via intragástrica (EGb1);

**Grupo V** - ratas induzidas à indução de osteoporose e tratadas com extrato de *G. biloba* 28mg/Kg/dia por via intragástrica (EGb2);

**Grupo VI** - ratas induzidas à indução de osteoporose e tratadas com extrato de *G. biloba* 56mg/Kg/dia por via intragástrica (EGb3).

## 2.2 Indução da osteoporose

A osteoporose foi induzida nos animais de todos os grupos experimentais, exceto nos do grupo controle, através da injeção do glicocorticoide dexametasona (Decadron® - 4 mg/mL) por via intramuscular, na dose de 7 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas [14].

## 2.3 Administração do alendronato de sódio

Os animais do grupo III foram submetidos ao tratamento de alendronato de sódio na dosagem de 0,2mg/Kg/dia por via intragástrica, durante 50 dias [14].

## 2.4 Administração do extrato de *Ginkgo biloba*

O EGb (761), ginkomed (Grupo CIMED®) foi administrado, após a confirmação da osteoporose, diariamente por via intragástrica durante 50 dias. A escolha da dose doEGb foi baseada em estudo anterior [15], que sugeriu um efeito estrogênico do EGb na dose de 14 mg/kg/dia em ratas prenhes. Além dessa dosagem foram testadas as dosagens de 28 e 56 mg/kg/dia.

## 2.5 Coleta de sangue

Em cada grupo foram realizadas três coletas no 1º, 25º e 50º dia de tratamento. De cada coleta após contenção mecânica, foi retirado 1 mL de sangue de cada animal por meio da punção na veia caudal lateral com uso de cateter (24G). O sangue obtido foi acondicionado em microtubos com anticoagulante (heparina sódica - 20 µL), homogeneizado com delicadeza e mantido à temperatura ambiente. Para subsequente obtenção do plasma as amostras foram

submetidas à centrifugação a uma temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  com a velocidade de 3.000rpm durante 10 minutos. O plasma obtido foi acondicionado à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior dosagem de cálcio e fosfatase alcalina.

### *2.6 Dosagem de fosfatase alcalina e cálcio*

A dosagem da fosfatase foi feita por sistema colorimétrico utilizando-se a metodologia modificada de Bessey-Lowry [16]. Para tal finalidade utilizou-se o Kit Fosfatases da Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda<sup>®</sup>. O cálcio foi determinado por sistema colorimétrico através de um complexo corado com cresolftaleína em meio alcalino, para tal foi utilizado o Kit Cálcio da Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.

Para a leitura das absorvâncias das reações utilizou-se o Espectrofotômetro SP 2000UV Bel Photonics<sup>®</sup>, na faixa de 410 e 570nm para fosfatase alcalina e cálcio, respectivamente.

A calibração do espectrofotômetro foi feita no intervalo entre cada grupo experimental. Esta calibração baseou-se no zero de absorvância (0% de absorção do feixe de luz) que é a reação utilizada no preparo da amostra, mas sem a presença do plasma (branco) e no zero de transmitância (100% de absorção do feixe de luz) que é a parede negra do aparelho. Foram feitas três reações e um branco para cada amostra.

### *2.7 Dosagem hidroxiprolina*

Ao final do tratamento (50<sup>o</sup> dia) amostras de fêmur obtidas da região da diáfise, pesando entre 100 e 200 mg, foram usadas para determinação de hidroxiprolina como marcador de reabsorção óssea. As amostras foram colocadas em tubos de vidros com 5mL de ácido clorídrico por 4h, após esse período foram maceradas e colocadas em estufa por 18h a  $110^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foram neutralizadas e analisadas segundo a metodologia de Bergman, Loxley [17], utilizando-se espectrofotômetro (SP 2000UV Bel Photonics<sup>®</sup>), em densidade óptica de 558 nm, para a obtenção dos valores da concentração molar de cada amostra (nMolar).

### *2.8 Tomografia computadorizada quantitativa- TCQ*

Para análise e confirmação da osteoporose os animais foram submetidos à tomografia computadorizada, durante o período de tratamento. Para tal, foram anestesiados com Hidrocloridrato de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular.

Posicionados em decúbito ventral, procedeu-se os exames em aparelho GE Hi-Speed FXI e protocolo com 120 KVp e auto-mA, na velocidade de 1 rotação/s. A aquisição das imagens foi obtida em cortes transversais de 1mm de espessura da região do corpo da segunda vértebra lombar em cada animal. Anteriormente ao exame o aparelho foi devidamente calibrado para melhor padronização dos resultados.

### *2.9 Coleta dos fêmures para análise histopatológica e histoquímica*

Ao quinquagésimo dia, os animais de todos os grupos experimentais foram sacrificados; para isso foram anestesiados com Hidrocloridrato de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular. A seguir, foi realizada a dissecação e coleta do fêmur de cada animal que foram fixados em formol tamponado a 10%, durante 48 horas. Após a fixação o osso foi descalcificado em solução de EDTA a 10%, durante três meses. Posteriormente, o material foi processado de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em parafina, e corados pela hematoxilina - eosina (H. E.), Von Kossa (detecção de Cálcio) e analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

### *2.10 Análise estatística*

Os dados da densitometria óssea, níveis de cálcio, fosfatase alcalina e hidroxiprolina foram submetidos à análise de variância (ANOVA- two way), para dois fatores (período e tratamento), e a comparação das médias foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

## **3. Resultados**

### *3.1. Tomografia Computadorizada (TC)*

Análise pela TC demonstrou que no primeiro dia de avaliação houve uma redução significativa da densidade mineral óssea (DMO) nos fêmures dos animais dos grupos induzidos a osteoporose em relação ao grupo controle. No 25º dia verificou-se um aumento significativo da densidade mineral óssea (DMO) nos fêmures dos animais dos grupos experimentais tratados com alendronato de sódio e EGb3(56 mg/kg/dia) atingindo valores similares aos do grupo controle. No entanto, nos fêmures dos animais dos grupos que

receberam 14 e 28 mg/kg/dia (EGb1 e EGb2, respectivamente), embora tenham apresentado valores inferiores aos grupos descritos acima mostraram aumento significativo da DMO em relação aos fêmures dos animais do grupo induzido a osteoporose e não tratado (Grupo II). Ao 50 °dia os fêmures dos animais dos grupos experimentais tratados com alendronato de sódio e EGb tiveram valores similares ao grupo controle (Tabela 1).

### *3.2. Dosagem de Cálcio*

Na análise dos níveis séricos de cálcio observou-se também redução significativa nos animais dos grupos induzidos a osteoporose no 1º dia de avaliação em relação aos animais do grupo controle. Contudo, 25º e 50º dia de tratamento os animais dos grupos que receberam alendronato de sódio e o EGb 761 nas dosagens de 14 e 28 mg/kg/dia atingiram valores semelhantes aos encontrados nos animais do grupo controle, enquanto na maior dosagem evidenciou-se um quadro de hipercalcemia (Tabela 2).

### *3.3. Dosagem da Fosfatase Alcalina*

Na análise da fosfatase alcalina observou-se que no 1º dia de avaliação houve redução significativa dos seus níveis nos animais induzidos a osteoporose, em relação aos animais do grupo controle. No entanto, no 25º e 50º dia evidenciou-se aumento significativo nos animais dos grupos tratados com alendronato de sódio e em todas as dosagens do EGb 761, sendo mais expressivos nas maiores dosagens (28 e 56mg/Kg) (Tabela 3).

### *3.4. Dosagem Hidroxiprolina*

Na quantificação de hidroxidoprolina presente no fêmur dos animais, verificou-se aumento significativo no grupo induzido a osteoporose e não tratado (II) quando comparados aos demais grupos experimentais (Tabela 4). Os demais grupos não diferiram estatisticamente entre si.

### *3.5. Análise Histopatológica e Histoquímica dos fêmures*

Na análise histológica dos fêmures dos animais de todos os grupos experimentais observou-se desorganização e inativação do disco epifisário (Figuras 1A, C e E e 2A, C e E).

Nos fêmures dos animais do grupo I as características histológicas ósseas apresentaram-se normais (Figura 1A) principalmente referentes à conformação do osso esponjoso, o qual não mostrou perda de conectividade trabecular, com presença de osteoblastos e osteócitos (Figura 1B).

No fêmures dos animais do grupo II, induzido à osteoporose e não tratado, constatou-se perda da microarquitetura óssea (Figura 1C), notada pela diminuição da conectividade entre as trabéculas tanto na epífise quanto na diáfise. As trabéculas apresentavam-se mais delgadas e espaçadas em relação aos fêmures dos animais do grupo I e com osteoblastos inativos (Figura 1D). Na diáfise observou-se regiões com matriz óssea alterada, demonstrando o processo de osteólise osteocítica (Figura 1D).

No grupo III (Controle Positivo), constatou-se áreas de reparação em todo o tecido ósseo. As trabéculas apresentaram-se delgadas e com melhor conectividade quando comparadas ao grupo II (Figura 1E), porém observou-se áreas de matriz óssea alterada (Figura 1F).

Nos fêmures dos animais que receberam as dosagens de EGb 761, também evidenciou-se recuperação da conectividade trabecular (Figuras 2A, C e E), além da presença de áreas de matriz óssea alterada, com osteoblastos em sua maioria ativos (Figuras 2B, D e F). O grupo que recebeu a maior dosagem de EGb 761 (56mg/Kg) expressou ainda trabéculas mais espessa assemelhando-se ao grupo controle (Figura 2E), aspecto este observado na tomografia computadorizada.

Na análise histoquímica observou-se marcação cálcio positiva em todos os fêmures dos animais dos grupos, próximos ao disco epífisário, entretanto nos fêmures dos animais do grupo II houve fraca marcação para cálcio (Figura 3B). Nos fêmures dos animais dos grupos I e VI demonstrou marcação mais expressiva, corroborando os resultados da dosagem dos níveis séricos de  $Ca^{2+}$  (Figuras 3A e F).

#### **4. Discussão**

Os resultados do presente estudo comprovou que o glicocorticoide dexametasona induz a osteoporose, observada pelas análises histopatológica, histoquímica e tomografia computadorizada. A análise quantitativa da densidade mineral óssea por TCQ mostrou diminuição significativa da DMO no primeiro dia de avaliação. É citado que humanos apresentam uma perda de massa óssea aproximadamente 12% após alguns meses de terapia com corticoide [18]. Costa e colaboradores [19], verificaram que o uso do glicocorticoide

prednisona na dose diária de 2 mg/kg de peso foi capaz de promover desmineralização precoce do osso trabecular em cães.

As alterações histológicas observadas no fêmur dos animais do grupo II são semelhantes às aquelas descritas para a osteoporose citadas na literatura [20,21]. A alteração da microarquitetura óssea observada neste grupo, caracterizada pela perda de conectividade trabecular, pode ser explicada pelo próprio mecanismo de remodelação óssea, o qual é desequilibrado por fatores como deficiência de estrógenos e o tratamento com glicocorticóides levando conseqüentemente a redução da formação óssea e /ou aumento de reabsorção [22]. Segundo Adams [23], o osso trabecular é metabolicamente mais ativo quando comparado ao osso cortical, apresentando maior suscetibilidade à ação de fármacos do que alterações no metabolismo mineral ósseo. Isso pode ser comprovado pela dosagem bioquímica que demonstrou diminuição da taxa de formação óssea, marcada pela fosfatase alcalina e aumento sucessivo da taxa de reabsorção óssea, comprovada pelos níveis de hidroxiprolina.

Nos fêmures dos animais do grupo tratado com alendronato de sódio, observou-se áreas de reparação óssea. Estudos recentes, tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstraram que os bifosfatos, além de sua conhecida propriedade anti-reabsortiva, atuam estimulando a atividade osteoblástica e conseqüentemente, formação de tecido ósseo, o que foi observado nos animais deste grupo experimental[24, 25, 26].

Nos animais dos grupos tratados com o EGb 761 foi observado recuperação da conectividade trabecular, demonstrando que o extrato conseguiu reverter o quadro da osteoporose induzida. Os efeitos observados com o tratamento com EGb 761 podem ser devidos ao efeito estrogênico [8], que inibe a reabsorção e promove a osteogênese [23]. Além disso, o kaempferol e a quercetina, constituintes do EGb 761, estimulam a apoptose de osteoclastos maduros [9] e aumentam a densidade mineral óssea trabecular [11] e kaempferol estimula os osteoblastos à neoformação óssea [28].

As análises dos níveis séricos de cálcio revelaram que a dosagem de 14 e 28 mg/Kg do EGb apresentaram melhor resposta ao final do tratamento, conseguindo aumentar os níveis de cálcio similares aos animais do grupo controle. Devemos mencionar que os animais do grupo tratado com dosagem de 56 mg/Kg, já no 25º dia de avaliação apresentaram recuperação dos níveis séricos deste íon, igualando-se ao grupo controle, porém ao final do experimento (50º dia) desenvolveram um quadro de hipercalcemia. Esses resultados corroboram com análise histoquímica, que demonstrou maior marcação para cálcio nesse grupo.

Sabe-se que o hormônio da paratireoide (PTH) regula as concentrações séricas de cálcio por ações diretas nos ossos e nos rins e ações indiretas no intestino, aumentando a síntese de calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ). O desenvolvimento de hipercalcemia indica que provavelmente os mecanismos compensatórios fisiológicos normais, controlados pelo PTH, falharam na maior dosagem do extrato, promovendo fluxos alterados de cálcio entre ossos, o rim e o intestino. Em condições normais o PTH promove a liberação de  $\text{Ca}^{2++}$  através das citocinas sintetizadas pelos osteoblastos [29]. Desta forma, sugere que o extrato nas dosagens de 14 e 28 mg/Kg consiga ativar, via receptor, esse hormônio e contribuir para a regulação desse íon. Yamaguchi e colaboradores [30] estudaram os efeitos de diversos flavonóides sobre a quantidade de cálcio em cultura de tecido ósseo (fêmur) de ratos Wistar, além do estímulo do paratormônio sobre a osteoclastogênese em cultura de células da medula óssea de camundongos. Dentre os vários flavonóides, a quercetina, foi o único que promoveu aumento significativo do cálcio na cultura de tecido da diáfise de ratos, o que poderia justificar o aumento significativo do nível de cálcio nos animais do grupo tratado com 56mg/Kg de EGb 761.

Segundo Saraiva e Lazaretti-Castro [31], a fosfatase alcalina é medida através de sua atividade e corresponde à soma das diversas isoformas presentes no soro. Mais de 90% do seu valor corresponde às isoformas hepática e óssea. A forma óssea, secretada pelos osteoblastos, predomina na infância até o fim do crescimento longitudinal, quando então a hepática passa a ser a forma circulante mais abundante. Ainda hoje é o marcador de formação óssea mais frequentemente utilizado [32,33]. No presente estudo, os resultados indicam elevada atividade da fosfatase alcalina nos grupos tratados com o EGb 761 a partir do 25° dia de tratamento. As dosagens de 28 e 56mg/Kg do EGb761 apresentaram as maiores taxas de formação óssea ao 50° dia. Como os osteoblastos diferenciados exibem alta atividade de fosfatase alcalina [34], sugere-se que o tratamento com EGb 761 em 50 dias possa aumentar a diferenciação e maturação dos osteoblastos. Estudos *in vitro* mostraram que *G. biloba* (50-150 microg/mL) aumenta significativamente a atividade de fosfatase alcalina de osteoblastos, o que indica que EGb 761 promove a mineralização dos osteoblastos [8]. Somente com a taxa de formação óssea não se pode ter certeza do estado de equilíbrio do tecido ósseo, desta forma foi realizada a dosagem da hidroxiprolina para marcação da taxa de reabsorção óssea. A hidroxiprolina é um produto da degradação do colágeno e, como sua maior fonte é o osso, ela é comumente utilizada como marcador de reabsorção óssea pela osteólise osteocítica [35]. Nesse trabalho verificou-se nos animais induzidos a osteoporose e sem tratamento aumento significativo nos níveis de hidroxiprolina demonstrando que houve degradação do colágeno na matriz óssea,

corroborando com os resultados da fosfatase alcalina, a qual demonstrou diminuição de seus níveis nesse grupo, resultando no quadro de osteoporose.

## 5. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo revelam que o EGb 761 nas dosagens de 14 e 28 mg/Kg mostram desempenho similares ao do alendronato de sódio ao final do tratamento, restabelecendo a arquitetura óssea e os níveis séricos de cálcio e fosfatase alcalina semelhantemente aos animais do grupo controle, enquanto que a dosagem de 56 mg/Kg, embora tenha revertido o quadro de osteopose promoveu um quadro de hipercalcemia no 25 e 50º dia de tratamento. Sendo assim, são necessários maiores estudos com a finalidade de melhor compreender o efeito dose/tempo desse extrato na patologia da osteoporose e suas possíveis consequências na fisiologia de outros sistemas.

## 6. Referências

- [1] E.J. Mackie, Osteoblast: novel roles in orchestration of skeletal architecture, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35 (2003) 1301-1305.
- [2] J.L. Sharker, B.P. Lukert, Osteoporosis associated with excess glucocorticoids, *Endocrinol. Metabol. Clin. North. Am.* 34 (2005) 341-356.
- [3] M.P.G. Souza, Diagnóstico e tratamento da osteoporose – Artigo de revisão, *Rev. Bras. Ortop.* 45 (2010) 220-229.
- [4] N.C.V Baracho, A.M. Paula, R. Franzini – Júnior, R.M.B. Silva, B. Appolari, R.S.C. Irulegui, Avaliação da eficácia de administração de dexametasona ou metilprednisolona para produzir osteoporose em ratas, *Rev. Bras. Ciênc. Saúde.* 1 (2011) 1-7.
- [5] M.I.H. Mendonza, Classificación de la Osteoporosis. Factores de Riesgo. *Clinical y Diagnóstico Diferencial, Na. Sist. Sanit. Nav.* 26 (2003) 29-52.
- [6] R.P Timóteo, D.S.F.A.V. Santos, Atividade física contra redução da massa óssea induzida por glicocorticoides, *ConScient. Saúde.* 8 (2009) 139-144.
- [7] S. Pozzi, R. Marcheselli, S. Sacchi, L. Baldini, F. Angrilli, E. Pennese, G. Quarta, C. Stelitano, G. Caparotti, S. Luminari, P. Musto, D. Natale, C. Broglia, A. Cuoghi, D. Dini, P. Di Tonno, G. Leonardi, G. Pianezze, V. Pitini, G. Polimeno, L. Ponchio, L. Masini, M. Musso, M. Spriano, G. Pollastri, Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review

of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients, *Leuk. Lymphoma*. 48 (2007) 1852- 1854.

[8] S.M. Oh, K.H. Chung, Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts, *Life. Sci.* 74 (2004) 1325-1335.

[9] A. Wattel, S. Kamel, R. Mentaverri, Pent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 35-42.

[10] J.R. Brayboy, X.W. Chen, Y.S. Lee, J.J.B. Anderson, The protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) against free radical damage to osteoblast-like bone cells (MC3T3-E1) and the proliferative effects of EGb 761 on these cells, *Nutr. Res.* 219 (2001) 1275-1285.

[11] R. Trivedi, A. Kumar, V. Gupta, S. Kumar, G.K. Nagar, J.R. Romero, A.K. Dwivedi, N. Chattopadhyay, Effects of EGb 761 on bone mineral density, bone microstructure, and osteoblast function: Possible roles of quercetin and Kaempferol, *Mol. Cell. Endocrinol.* 302 (2009) 86-91.

[12] R. Bland, Steroid hormone receptor expression and action in bone, *Clin. Sci.* 98 (2000) 217-240.

[13] S.M Oh, H.R. Kim, K.H. Chung, Effects of *Ginkgo biloba* on in vitro osteoblasts cells and ovariectomized rat osteoclasts cells, *Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 216-224.

[14] A. Pinto, T.T. Oliveira, R.J. Del Carlo, T.J. Nagem, C.C. Fonseca, G.H.K. Moraes, D.B.F. Júnior, C.A. Cardoso, Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio; atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42 (2006) 99-107.

[15] R.M Pinto, E.S. Fernandes, J.E.P. Reis, Intra-uterine growthretardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* torats, *Reprod. Toxicol.* 23 (2007) 480-485.

[16] O.A. Bessey, O.H. Lowry, M.J.J.B. Brock, Methods in clinical chemistry, *Biol. Chem.* 164 (1946) 321-329.

[17] I. Bergman, R. Loxley, Two improved and simplified methods for the spectrophometric determination of hydroxyproline. *Ann. Chem.* 35 (1963) 1961-1965.

[18] S. Mononagas, R. Weinstem, New developments in the pathogenesis and treatment of steroid induced osteoporosis, *J. B. Min. Res.* 14, (1999) 1061-1066.

- [19] L.A.V.S. Costa, D.C. Oliveira, J.G. Gianotti, M.L. Cardoso, F.S. Grau de desmineralização em osso trabecular e cortical por meio da tomografia computadorizada quantitativa em cães submetidos à terapia com prednisona. *Ciênc. Rur.* 40 (2010) 2515-2520.
- [20] T. Tanizawa, A. Yamaguchi, Y. Uchiyama, C. Miyaura, T. Ikeda, S. Ejiri, Y. Nagai, H. Yamato, H. Hurayama, M.T. Sato, T. Nakamura, Reduction in bone formation and elevated bone resorption in ovariectomized rats with special reference to acute inflammation, *Bone*. 68 (2000) 43-53.
- [21] E. Zanette, F. Stringari, F. Machado, B.J. Marroni, D.P.K. Ng, L.H. Canani, Avaliação de diagnóstico densitométrico de Osteoporose/Osteopenia conforme o sítio ósseo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 47 (2003) 30-36.
- [22] S.U. Amadei, V.A.S. Silveira, A.C. Pereira, Y.R. Carvalho, R.F. Rocha, A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea, *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42 (2006) 5-12.
- [23] J.E. Adam, Quantitative computed tomography, *Eur. J. Radiol.* 71 (2009) 415-424.
- [24] K. Leem, S.Y. Park, D.H. Lee, H. Kim, Lovastatin increases longitudinal bone growth and bone morphogenetic protein-2 levels in the growth plate of Sprague – Dawley rats, *Eur. J. Pediatr.* 161 (2002) 406-407.
- [25] G. Im, S.A. Qureshi, J. Kenney, H.E. Rubash, A.S. Shanbhag, Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates, *Biomaterials*. 25 (2004) 4105-4115.
- [26] F. Knoch, C. Jaquier, M. Kowalsky, S. Schaeren, C. Alabre, I. Martin, H.E. Rubash, A.S. Shanbhag, Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 26 (2005) 6941-6949.
- [27] R.T. Turner, L. Riggs, T.C. Spelsberg, Skeletal effects of estrogen, *Endocr. Rev.* 15 (1994) 275-299.
- [28] R. Trivedi, S. Kumar, A. Kumar, J.A. Siddiqui, G. Swarnkar, V. Gupta, A. Kendurker, A.K. Dwivedi, J.R. Romero, N. Chattopadhyay, Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats, *Mol. Cell. Endocrinol.* 289 (2008) 85-93.
- [29] R. Bedani, E.A. Rossi, O consumo de cálcio e a osteoporose, *Ciênc. Biol. Saúde*. 26 (2005) 3-14.

- [30] M. Yamaguchi, R. Hamamoto, S. Uchiyama, K. Ishiyama, Effects of flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture in vitro, *Mol. Cell. Biochem.* 303 (2007) 83-88.
- [31] G.L. Saraiva, M. Lazaretti-Castro, Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica / Biochemical markers of bone remodeling in clinical practice, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46 (2002) 72-78.
- [32] K.W. Lyles , E.S. Siris, F.R. Singer, P.J. Menier, A clinical approach to diagnosis and management of Paget's disease of bone, *J. Bone. Min. J. Res.* 16 (2001) 1379-1387.
- [33] M.J.L. Cardoso, L.M.R. Muniz, T.J. Gasparini, M. Melussi, Calcium homeostasis markers of bone metabolism in feline hyperthyroidism - a review, *Arch. Vet. Sci.* 12 (2007) 17-27.
- [34] M.J. Allen, Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations, *Vet. Clin. Pathol.* 32 (2003) 101-113.
- [35] K. Matsuo, N. Nango, Osteocytic osteolysis : measurements of the volume of osteocytic lacunae. *Clin. Calcium.* 22 (2012) 677-83.

**Tabela 1.** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos resultados da densitometria óssea em unidades Hounsfield (HU) dos grupos experimentais.

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>1º</b>	<b>Dias 25º</b>	<b>50º</b>
<b>I</b>	512,33 ± 7,09 aA	515,00 ± 9,64 aA	517,33 ± 10,69 aAB
<b>II</b>	458,66 ± 4,72 aB	457,00 ± 4,00 aD	461,00 ± 2,00 aC
<b>III</b>	472,33 ± 11,59 bB	510,00 ± 4,00 aAB	515,66 ± 4,00 aAB
<b>IV</b>	474,66 ± 10,50 cB	491,00 ± 10,00 bC	506,66 ± 6,00 aB
<b>V</b>	470,66 ± 5,50 cB	493,33 ± 7,00 bBC	511,00 ± 8,00 aB
<b>VI</b>	469,66 ± 4,04 cB	510,66 ± 5,68 bAB	529,33 ± 4,00 aA

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

**Tabela 2.** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos níveis séricos de cálcio (mg/dL) dos grupos experimentais.

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>1º</b>	<b>Dias 25º</b>	<b>50º</b>
<b>I</b>	10,77 ± 1,96 aA	10,01 ± 1,01 aB	10,25 ± 0,43 aBC
<b>II</b>	5,80 ± 0,35 aB	5,41 ± 0,32 aC	5,25 ± 0,45 aD
<b>III</b>	5,30 ± 0,66 bB	9,79 ± 0,62 aB	9,79 ± 0,62 aC
<b>IV</b>	6,04 ± 0,50 bB	9,76 ± 0,61 aB	10,52 ± 0,69 aBC
<b>V</b>	5,48 ± 0,84 bB	10,18 ± 0,88 aAB	10,78 ± 1,15 aB
<b>VI</b>	5,38 ± 0,66 cB	11,04 ± 1,34 bA	14,25 ± 1,22 aA

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

**Tabela 3.** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos níveis séricos de fosfatase alcalina (U.I/L) dos grupos experimentais.

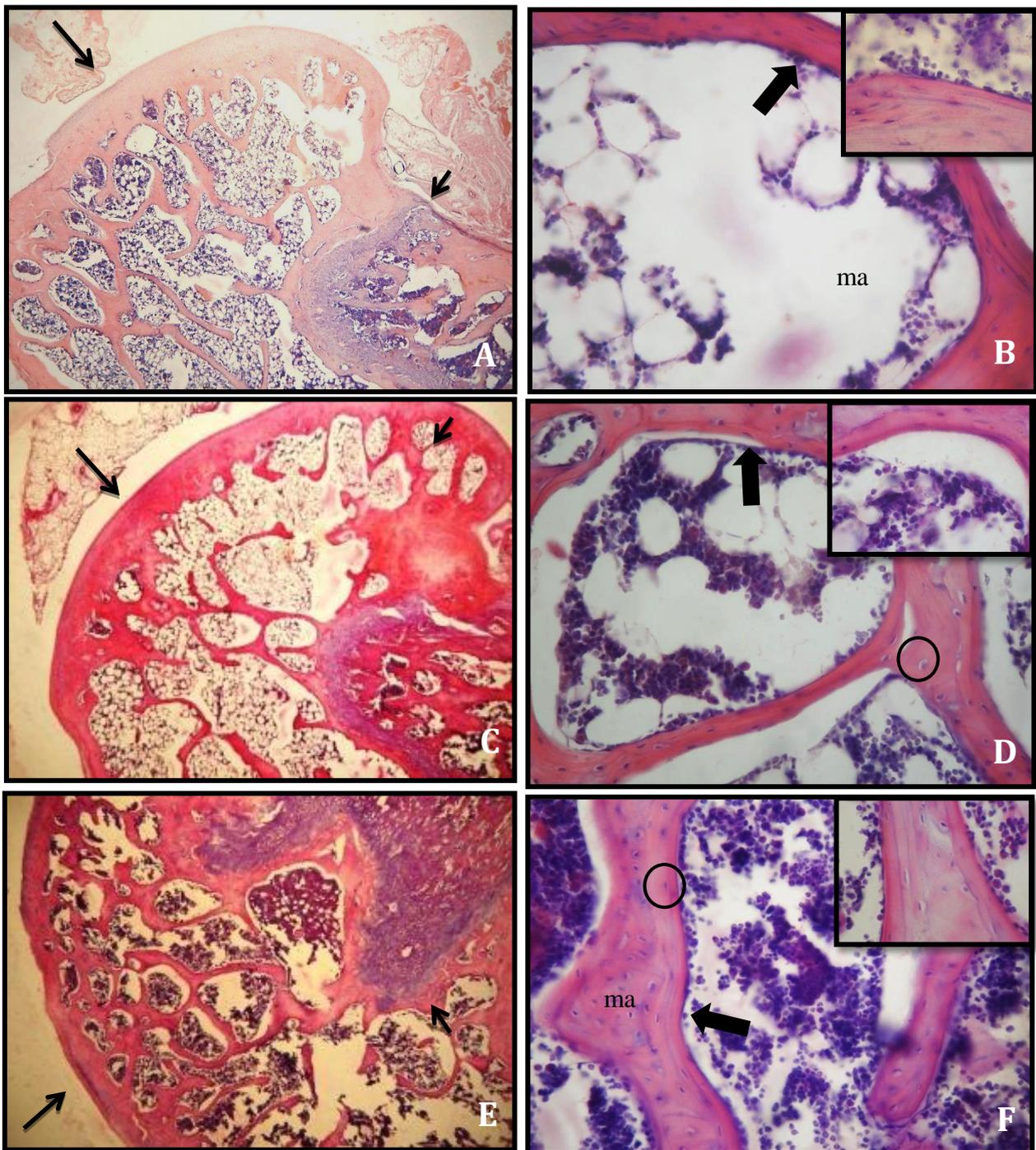
Grupos Experimentais	Dias		
	1 <sup>o</sup>	25 <sup>o</sup>	50 <sup>o</sup>
I	230,60 ± 14,54aA	210,17 ± 17,15 aB	213,92 ± 11,17 aC
II	132,73 ± 6,47 bB	153,21 ± 15,98abC	166,56 ± 5,80aD
III	139,63 ± 31,11 bB	247,91 ± 13,45 aA	268,75 ± 10,10 aB
IV	160,70 ± 45,53cB	244,13 ± 11,91 bA	293,53 ± 13,59 aAB
V	143,94 ± 45,16cB	246,64 ± 13,52 bA	306,37 ± 8,06 aA
VI	140,62 ± 23,42 cB	244,85 ± 12,79 bA	308,82 ± 27,79 aA

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

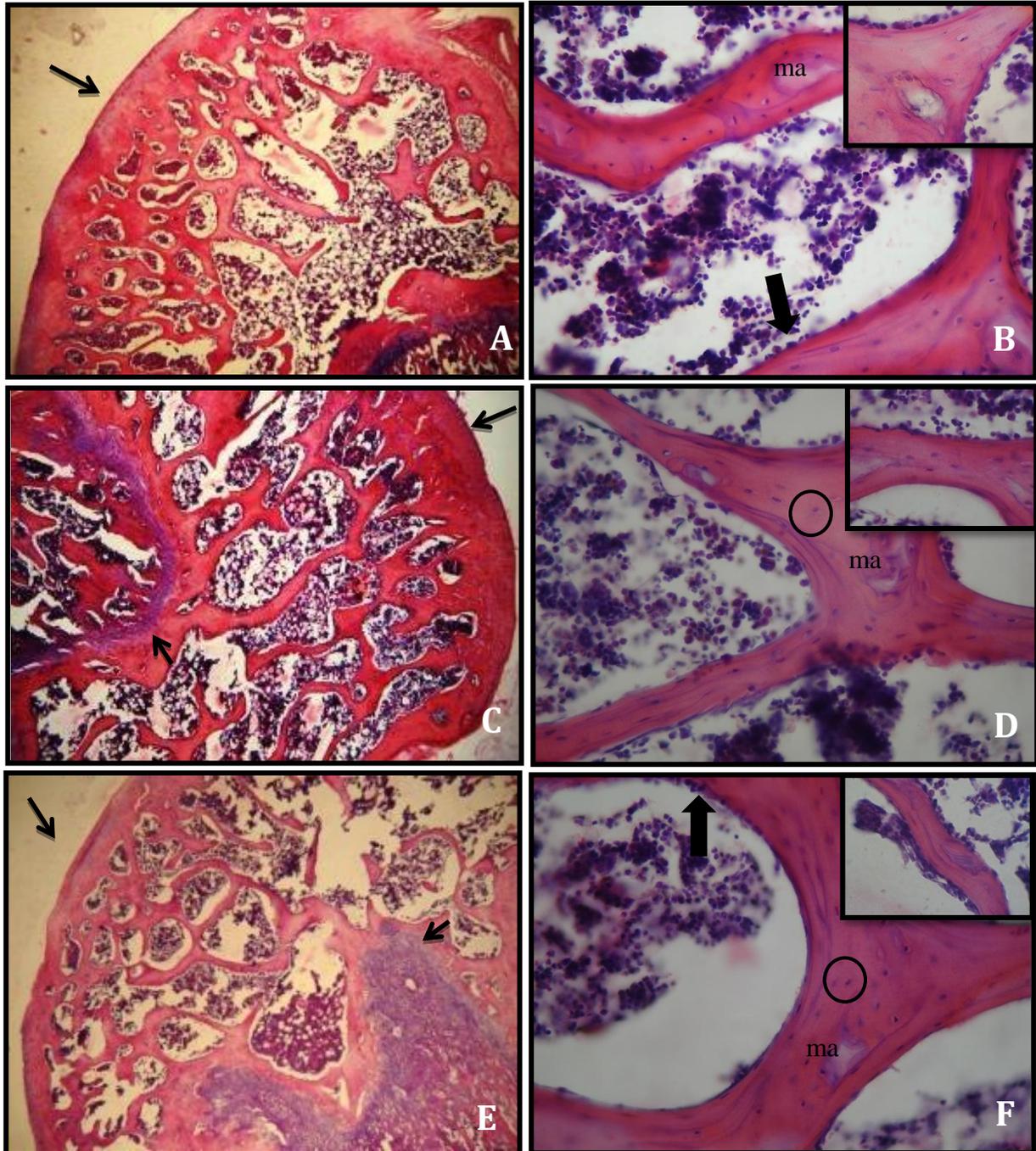
**Tabela 4.** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão do nível de hidroxiprolina (µmol/g) ao final do tratamento dos grupos experimentais.

Grupos	I	II	III	IV	V	VI
	8,70 ± 1,99ab	12,93 ± 3,88a	6,64 ± 1,14b	8,93 ± 2,19ab	8,46 ± 1,43ab	9,52 ± 2,29 ab

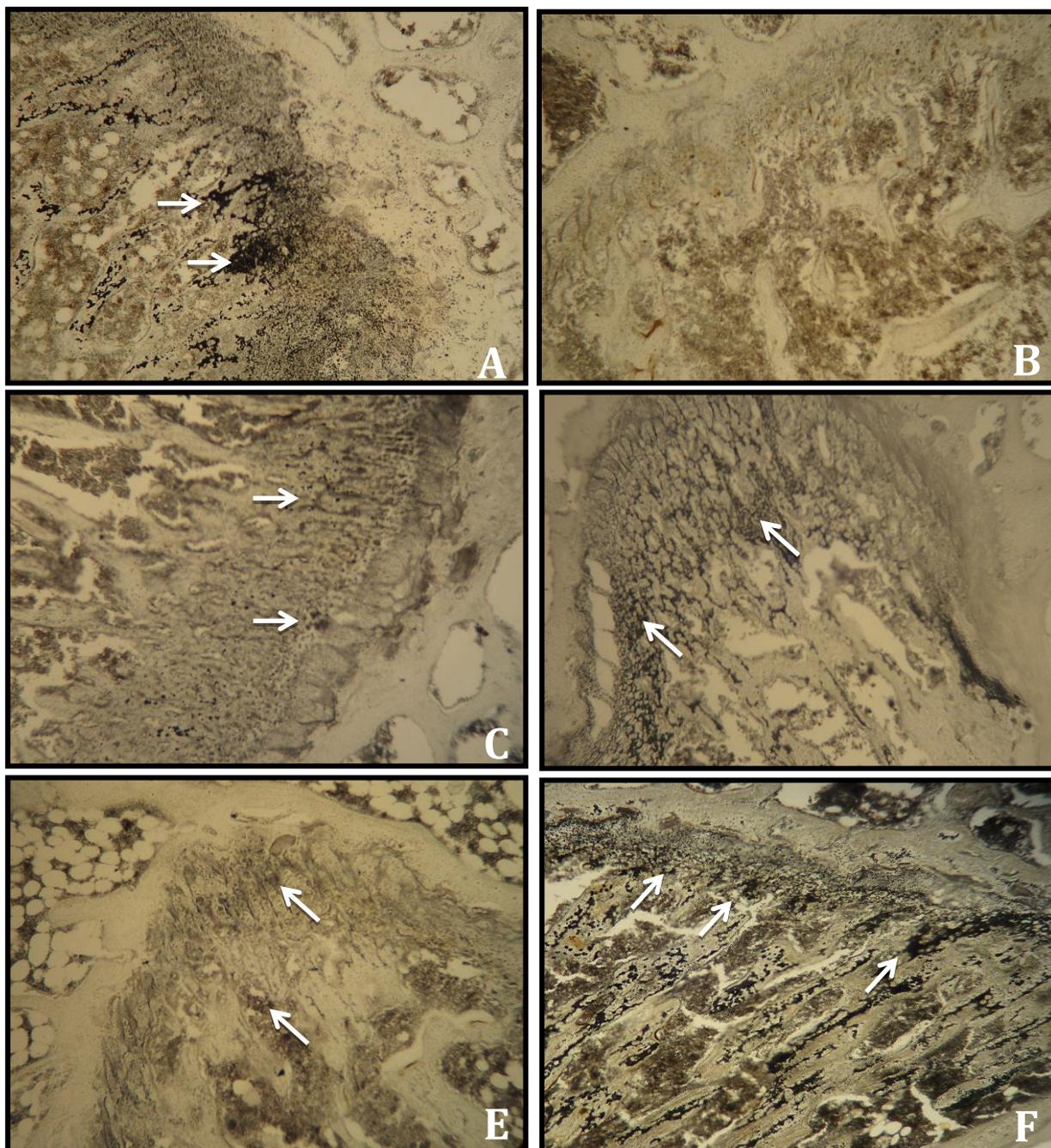
<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).



**Figura 1:** Fêmures dos animais dos grupos I, II e III. A, B – Grupo Controle (I). A - Observar arquitetura óssea preservada. B – Observar presença de osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo) ativos. Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. C e D –Grupo II (Osteoporose). C - Observar perda de microarquitetura óssea. D – Notar trabéculas epifisárias delgadas com osteoblastos inativos (Seta grossa) e áreas com matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. E e F – Grupo III (Controle Positivo). E - Observar arquitetura óssea preservada. F –Observar trabécula espessa com presença de osteoblastos (seta grossa), osteócitos (círculo) e matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. Seta longa – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário.



**Figura 2:** Fêmures dos animais dos grupos IV, V e VI. A e B – Grupo IV (EGb1 14 mg/Kg). A - Observar perda da microarquitetura óssea. B – Observar osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo). Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. C e D– Grupo EGb2 28 mg/Kg (V). C - Observar arquitetura óssea preservada. D – Observar osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo). Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. E e F – Grupo VI (EGb3 56 mg/Kg). E - Observar recuperação da microarquitetura óssea. F – Observar trabéculas espessa. Coloração H.E. Aumento 42X, 428X, respectivamente. Seta longa – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário.



**Figura 3:** Detecção de Cálcio nos fêmures dos animais dos grupos experimentais. A - Grupo controle (I). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. B – Grupo Osteoporose (II). Evidenciar fraca reação para cálcio. C – Grupo Controle Positivo (III), D – Grupo EGb1 14mg/Kg e E – Grupo EGb2 28mg/Kg. Notar moderada reação para o cálcio. F – Grupo EGb3 56mg/Kg (VI). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. Coloração Von Kossa. Aumentos 107X. Setas – Marcação positiva para cálcio.

### CAPÍTULO III

Efeito da combinada do Extrato de *Ginkgo biloba* (EGb761) e exercício de natação sobre o tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoides em ratas.

Hilda Michelly Paiva dos Santos<sup>1</sup>; Valéria Wanderley-Teixeira<sup>1</sup>; Álvaro Aguiar C. Teixeira<sup>1</sup>; Fabiano Séllos Costa<sup>2</sup>; Frederico Celso Lyra Maia<sup>2</sup>; Clovis José Cavalcanti Lapa Neto<sup>1</sup>; Mariana Bruno Carvalho Cavalcanti<sup>1</sup>.

1 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil.

2 Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil.

E-mail: [valeria@dmfa.ufrpe.br](mailto:valeria@dmfa.ufrpe.br)

## Resumo

Na busca de tratamentos novos e alternativos para a osteoporose induzida por glicocorticoides, este trabalho avaliou o efeito da associação combinada do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) e um protocolo de treinamento de natação sobre ratas induzida a esta patologia pela administração da dexametasona (i.m., na dose de 7mg/kg de peso corporal por cinco semanas), através da análise histopatológica, histoquímica, bioquímica e pela tomografia computadorizada quantitativa. Foram utilizados 30 ratas divididas em seis grupos: Grupo I - Controle; Grupo II – Osteoporose; Grupo III – Alendronato de sódio 0,2mg/Kg/dia (Controle positivo); Grupo IV – 14mg/Kg/dia EGb1 + Natação; Grupo V – 28mg/Kg/dia EGb2 + Natação; Grupo VI – 56mg/Kg/dia EGb3 + Natação. As avaliações foram realizadas no 1º, 25º e 50º dias de tratamento. O estabelecimento da osteoporose foi detectada pela tomografia computadorizada e confirmada pelas análises histopatológica, histoquímica e bioquímica no 1º dia de tratamento. Os resultados demonstram que os animais tratados com o extrato de *G. biloba* associado a prática de natação, apresentaram uma crescente recuperação da conectividade trabecular, aumento dos níveis séricos de cálcio, fosfatase alcalina e da densidade mineral óssea a partir do 25º dia de tratamento. Os níveis séricos de hidroxiprolina analisado no final do experimento mostraram elevados apenas nos animais induzidos a osteoporose e sem tratamento. No 50º dia evidenciou-se hipercalcemia apenas nos animais tratados com o extrato na maior dosagem associado ao protocolo de natação. Assim, concluiu-se que a combinação do extrato de *G. biloba* associada ao protocolo de natação é viável, pois na menor dosagem (14mg/Kg) já apresentou resultados similares aos animais do grupo controle e tratado com alendronato de sódio a partir do 25 dia de avaliação.

Palavras-chave: Osteoporose, glicocorticoide, natação, *Ginkgo biloba* (EGb 761), densitometria óssea, bioquímica, histopatologia.

## 1. Introdução

A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por massa óssea reduzida e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fraturas (Pinto et al., 2006).

Já foram desenvolvidos vários tratamentos para osteoporose objetivando a prevenção da perda óssea, entre eles encontram-se a reposição de estrogênos, o uso de compostos anti-reabsortivos (bifosfatos), prática regular de atividade física e uso de fitofármacos (Neto et al., 2002; Geraldles, 2003; Zetha et al., 2010).

O extrato de *Ginkgo biloba* L., uma das mais antigas árvores da terra, com 200 milhões de anos, sendo o único sobrevivente da família Ginkgoaceae, classe ginkgoatae, tem sido muito utilizada na prevenção do envelhecimento, na preservação da memória, na prevenção de doenças cardiovascular, na doença de Alzheimer, na demência relacionada com a idade, processos inflamatórios e também foi testado na síndrome de Down com bons resultados (Harley et al., 2003; Donfrancesco et al., 2004; Han, 2005; Dekosky et al., 2006; Zhou et al., 2006). Segundo Oh e Chung, (2004) o extrato de *G. biloba* apresenta efeito sobre os receptores de estrogênio do subtipo  $\alpha$  e  $\beta$ , sugerindo que o extrato possa ser de fundamental importância no tratamento de várias doenças, incluindo a osteoporose.

A influência da atividade física sobre o tecido ósseo tem sido amplamente discutida pela literatura. Diversas linhas de pesquisas, incluindo trabalhos sobre as consequências da imobilização e a relação entre exercício físico e massa óssea, defendem o papel benéfico da atividade física na gênese e na mineralização dos ossos (Hart et al., 2001). A atividade física tem sido defendida como possível meio de promover aumento e manutenção da densidade mineral óssea (DMO), constituído um tratamento eficiente para administrar a perda de ossos

em pacientes osteoporóticos. Entretanto, vários pontos relacionados a intensidade, frequência ideal para o exercício ainda não estão totalmente esclarecidos.

Diante deste contexto e na busca de tratamentos novos e alternativos para a osteoporose induzida, este trabalho objetiva avaliar o efeito da associação combinada do extrato de *G. biloba* (EGb 761) e um protocolo de treinamento de natação sobre fêmures de ratas, através da análise histopatológica, histoquímica, bioquímica e pela tomografia computadorizada quantitativa.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Instalação do bioensaio*

O trabalho foi realizado no Laboratório de Histologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, para isso utilizaram-se 30 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente  $200\text{g} \pm 30\text{g}$ , da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os animais foram confinados em gaiolas e mantidos com alimentação e água *ad libitum*, em temperatura ambiente de aproximadamente  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  com iluminação artificial produzida por lâmpadas fluorescentes (marca Phillips, modelo luz do dia, 40 W), que estabeleceu o foto período de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 6:00 às 18:00 horas. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal sob a licença 044/2012 – CEUA, UFRPE.

Após um período de adaptação, foram coletados esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. Os animais que apresentarem três ciclos estrais regulares foram divididos, ao acaso, em seis grupos constituídos por cinco animais, a saber:

Grupo I- ratas sem tratamento e submetidas a um protocolo de treinamento de natação (CONTROLE);

Grupo II - ratas submetidas à indução de osteoporose (OSTEOPOROSE);

Grupo III - ratas submetidas à indução de osteoporose e tratadas com alendronato de sódio – fármaco de referência no mercado - 0,2mg/Kg/dia por via intragástrica (CONTROLE POSITIVO);

Grupo IV -ratas submetidas à indução de osteoporose e tratadas com extrato de *G. biloba* 14mg/Kg/dia por via intragástrica associados a um protocolo de treinamento de natação (EGb1+NAT);

Grupo V-ratas submetidas à indução de osteoporose e tratadas com extrato de *G. biloba* 28mg/Kg/dia por via intragástrica associados a um protocolo de treinamento de natação (EGb2+NAT);

Grupo VI-ratas submetidas à indução de osteoporose e tratadas com extrato de *G. biloba* 56mg/Kg/dia por via intragástrica associados a um protocolo de treinamento de natação (EGb3+NAT).

## 2.2 Indução da osteoporose

A osteoporose foi induzida em todos os animais dos grupos experimentais, exceto os do grupo controle, através da injeção do glicocorticoide dexametasona (Decadron® - 4mg/mL) por via intramuscular, na dose de 7mg/kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas (Pinto et al., 2006).

### *2.3 Administração do alendronato de sódio*

Os animais do grupo III foram submetidos ao tratamento de alendronato de sódio na dosagem de 0,2mg/Kg/dia por via intragástrica, durante 50 dias (Pinto et al., 2006).

### *2.4 Administração do extrato de Ginkgo biloba*

O EGb (761), ginkomed (Grupo CIMED<sup>®</sup>) foi administrado, após a confirmação da osteoporose, diariamente por via intragástrica durante 50 dias. A escolha da dose de EGb foi baseada em estudo anterior (Pinto et al., 2006), que sugeriu um efeito estrogênico do EGb na dose de 14mg/kg/dia em ratas prenhes. Além dessa dosagem foram testadas as dosagens de 28 e 56mg/kg/dia.

### *2.5 Protocolo de natação*

O protocolo de treinamento consistiu na prática de natação, realizada em um tanque (diâmetro de 80cm e profundidade de 1m) (Figura 1), cinco vezes por semana, ao decorrer de nove semanas. A primeira semana foi de adaptação ao meio líquido por 20 minutos, durante cinco dias, nadando sem sobrecarga; após esse período de adaptação os animais passaram a utilizar uma sobrecarga equivalente a 5% de seus respectivos pesos corporais, acopladas com elástico ao seu tronco. A cada semana o tempo de treinamento foi aumentado em cinco minutos por semana, terminando na última semana com o tempo de 60 minutos. A temperatura da água foi mantida entre  $31^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , considerada tecnicamente neutra em

relação á temperatura corporal do animal, segundo metodologia adaptada de (Boaro e Anaruma, 2009).

## *2.6 Coleta de sangue*

Em cada grupo foram realizadas três coletas no 1°, 25° e 50° dia de tratamento. De cada coleta após contenção mecânica, foi retirado 1mL de sangue de cada animal por meio da punção na veia caudal lateral com uso de cateter (24G). O sangue obtido foi acondicionado em microtubos com anticoagulante (heparina sódica - 20µL), homogeneizado com delicadeza e mantido à temperatura ambiente. Para subsequente obtenção do plasma as amostras foram submetidas à centrifugação a uma temperatura de -4°C com a velocidade de 3.000rpm durante 10 minutos. O plasma obtido foi acondicionado à temperatura de -20°C, para posterior dosagem de cálcio e fosfatase alcalina.

## *2.7 Dosagem de fosfatase alcalina e cálcio*

A dosagem da fosfatase alcalina total foi feita por sistema colorimétrico utilizando-se a metodologia de Bessey et al, (1949). Para tal finalidade utilizou-se o kit Fosfatases da Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda<sup>®</sup>. O cálcio foi determinado por sistema colorimétrico através de um complexo corado com cresolftaleína em meio alcalino, para tal foi utilizado o kit Cálcio da Doles reagentes e equipamentos para Laboratórios Ltda.

Para a leitura das absorvâncias das reações utilizou-se o Espectrofotômetro SP 2000UV Bel Photonics<sup>®</sup>, na faixa de 410nm e 570nm para fosfatase alcalina e cálcio, respectivamente.

A calibração do espectrofotômetro foi feita no intervalo entre cada grupo experimental. Esta calibração baseou-se no zero de absorvância (0% de absorção do feixe de luz) que é a reação utilizada no preparo da amostra, mas sem a presença do plasma (branco) e no zero de

transmitância (100% de absorção do feixe de luz) que é a parede negra do aparelho. Foram feitas três reações e um branco para cada amostra.

### *2.8 Dosagem hidroxirolina*

Ao final do tratamento (50º dia) amostras de fêmur obtidas da região da diáfise, pesando entre 100 e 200mg, foram usadas para determinação de hidroxirolina como marcador de reabsorção óssea. As amostras foram colocadas em tubos de vidros com 5mL de ácido clorídrico por 4h, após esse período foram maceradas e colocadas em estufa por 18h a 110º C. Posteriormente foram neutralizadas e analisadas segundo a metodologia de Bergman e Loxley (1963), utilizando-se espectrofotômetro (SP 2000UV Bel Photonics®), em densidade óptica de 558 nm, para a obtenção dos valores da concentração molar de cada amostra (nMolar).

### *2.9 Tomografia computadorizada quantitativa- TC*

Para análise e confirmação da osteoporose os animais foram submetidos à tomografia computadorizada, durante o período de tratamento. Para tal, foram anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg), por via intramuscular. Posicionados em decúbito ventral, procedeu-se os exames em aparelho GE Hi-Speed FXI e protocolo com 120KVp e auto-mA, na velocidade de 1 rotação/s. A aquisição das imagens foi obtida em cortes transversais de 1mm de espessura da região do corpo vertebral da segunda vértebra lombar em cada animal. Anteriormente ao exame o aparelho foi devidamente calibrado para melhor padronização dos resultados.

### *2.10 Coleta dos fêmures para análise histopatológica e histoquímica*

Ao quinquagésimo dia, os animais de todos os grupos experimentais foram sacrificados; para isso foram anestesiados com hidrocloreto de cetamina (80mg/kg) e xilazina (20mg/kg), por via intramuscular. A seguir, foi realizada a dissecação e coleta do fêmur de cada animal que foram fixados em formol tamponado a 10%, durante 48 horas. Após a fixação o osso foi descalcificado em solução de EDTA a 10%, durante três meses. Posteriormente, o material foi processado de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, e corados pela hematoxilina - eosina (H. E.), Von Kossa (detecção de Cálcio) e analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

### *2.11 Análise estatística*

Os dados da densitometria óssea, níveis de cálcio, fosfatase alcalina e hidroxiprolina foram submetidos à análise de variância (ANOVA- two way), para dois fatores (período e tratamento), e a comparação das médias foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **3. Resultados**

O exame de tomografia computadorizada demonstrou que ao 1º dia de avaliação houve redução significativa da densidade mineral óssea nos animais dos grupos submetidos a indução, da osteoporose. A partir do 25º dia verificou-se aumento dos níveis da DMO nos animais dos grupos submetidos as dosagens do extrato associado a natação, igualando-se ao grupo controle e ao grupo tratado com alendronato de sódio (Grupo III). (Tabela 1)

Na análise dos níveis séricos de cálcio observou-se redução significativa nos animais dos grupos induzidos a osteoporose no 1º dia de tratamento em relação aos animais do grupo

controle. Contudo, ao 25º dia pode-se verificar uma melhora dos níveis deste íon nos animais dos grupos III, IV, V e VI. Ao final do tratamento (50º dia) evidenciou-se uma hipercalcemia apenas nos animais submetidos a maior dosagem do extrato (Tabela 2).

Analisando os níveis de fosfatase alcalina observou-se diminuição significativa nos animais dos grupos induzidos a osteoporose em comparação ao grupo controle. No entanto, nos animais dos grupos tratados com EGb associado a natação e o grupo III apresentaram níveis significativamente elevados a partir do 25º dia, demonstrando aumento da taxa de formação óssea nesses animais, superior ao grupo controle, fato este que foi mantido até o 50º dia (Tabela 3).

Na quantificação de hidroxidoprolina presente no fêmur dos animais, verificou-se níveis significativamente elevados nos animais do grupo induzido a osteoporose e não tratado (II) quando comparados aos animais dos outros grupos experimentais, indicando aumento da reabsorção óssea pela osteólise osteocítica. Os demais animais dos grupos não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 4).

Na análise histológica dos fêmures dos animais de todos os grupos experimentais observou-se desorganização e inativação do disco epifisário (Figs. 2A, C e E e 3A, C e E). Nos animais do grupo controle (I) as características histológicas ósseas apresentaram-se normais (Figura 2A) principalmente referentes à conformação do osso esponjoso, o qual não mostrou perda de conectividade trabecular, presença de osteócitos e osteoblastos em sua maioria ativos (Figura 2B). No fêmur dos animais que foram induzidos à osteoporose e não tratado, constatou-se perda da microarquitetura óssea (Figura 2C), notada pela diminuição da conectividade entre as trabéculas tanto na epífise quanto na diáfise. As trabéculas apresentaram mais delgadas e espaçadas em relação aos fêmures dos animais do grupo I e com osteoblastos, em sua maioria, inativos e osteócitos com núcleos compactos e intensamente corados nas trabéculas metafisárias (Figura 2D). Nos fêmures dos animais do

grupo III (Controle Positivo), constatou-se áreas de reparação óssea pela osteólise osteocítica em todo o tecido ósseo (Figura 2F). As trabéculas apresentaram-se delgadas e com melhor conectividade quando comparadas aos fêmures dos animais do grupo II (Figuras 2E e F).

No fêmur dos animais que receberam as dosagens de EGb 761 e realizaram o protocolo de natação, notou-se uma recuperação crescente da conectividade trabecular (Figuras 3A, C e E). Com trabéculas mais espessas, osteoblastos ativos e osteócitos presentes (Figuras 3B, D e F). O grupo que recebeu maior dosagem de EGb 761 (56 mg/dL) expressaram as trabéculas mais espessa assemelhando-se ao grupo controle (Figura 3E), aspecto este observado na tomografia computadorizada. Verificou-se áreas de alteração de matriz óssea em todo o tecido, sendo mais frequente nos fêmures dos animais do grupo II (Figura 2D, F, 3B, D e F).

Na análise histoquímica observou-se marcação cálcio positiva em todos os fêmures dos animais dos grupos experimentais, próximos ao disco epifisário (4A-F), entretanto os fêmures dos animais do grupo II houve fraca marcação para cálcio (Figura 4B). Os fêmures dos animais dos grupos I e VI demonstraram marcação mais expressiva para este íon, corroborando com as análises bioquímicas (Figura 4 A, F).

#### **4. Discussão**

No presente estudo pôde-se verificar que os animais submetidos a indução da osteoporose apresentaram alterações histopatológicas compatíveis com a patologia já relatada pela literatura (Lucinda et al, 2010). Sabe-se que os glicocorticoides, quando em excesso, suprimem a atividade da formação óssea dos osteoblastos, com afinamento das trabéculas ósseas, resultando na diminuição do volume ósseo (Souza, 2010). Isso foi comprovado no presente estudo através da densidade mineral óssea, pela TCQ, a qual demonstrou diminuição significativa nos níveis de DMO nos animais dos grupos induzidos a osteoporose no 1º dia de

tratamento. Além disso, houve diminuição significativa na taxa da fosfatase alcalina, e níveis elevados de hidroxiprolina apenas nos animais induzido a osteoporose e sem tratamento. Amadei et al, (2006) descreveram que o mecanismo de remodelação óssea pode ser desequilibrado por fatores como deficiência de estrógenos ou tratamento com glicocorticóides levando conseqüentemente a redução da formação óssea e /ou aumento de reabsorção.

Nos animais tratados com o extrato de *G. biloba* associada a prática de natação, observou-se crescente recuperação da conectividade trabecular, demonstrando que a associação é eficaz no tratamento da osteoporose induzida. Programas de exercícios físicos tem sido amplamente empregados como parte do tratamento e da prevenção da osteoporose (Bayramoglu et al, 2005). A atividade física induz um aumento da carga mecânica que age sobre o tecido ósseo devido a forças externas e contrações musculares. O aumento da carga mecânica gera uma força de tensão, que impede o remodelamento dos ossos e conserva/aumenta a massa óssea (Barengolts et al, 1994; Peng et al, 1994; Turner e Robling, 2005). Segundo, Turner e Robling (2005) as cargas mecânicas em ossos criam um gradiente dentro da rede lacunar-canalicular preenchida pelos fluídos ósseos que promovem uma cascata de eventos celulares, incluindo a elevação dos níveis de cálcio intracelulares, expressão de fatores de crescimentos e aumento da produção de matriz óssea. Nossos resultados estão de acordo com esses achados, pois verificou-se aumento significativos dos níveis de DMO nos animais tratados com o extrato e natação apartir do 25° dia de tratamento. Os níveis de cálcio também responderam bem ao protocolo, igualando-se ao grupo controle apartir do 25° dia e mantendo esses níveis ao final do tratamento, exceto para os animais do grupo tratado com a maior dose do extrato que apresentaram no 50° dia hipercalcemia. Quando observou-se as taxas de formação óssea e reabsorção óssea, verificou-se aumento da taxa de formação (indicada pela fosfatase alcalina) em comparação as taxas de absorção óssea (hidroxiprolina), corroborando para a homeostasia do tecido. Os efeitos observados com o tratamento com EGb

761 podem ser devidos a múltiplas atividades no tecido ósseo, causadas por seu efeito estrogênico (Oh e Chung, 2004), que inibe a reabsorção e promove a osteogênese (Trivedi et al, 2008). Além disso, o kaempferol e a quercetina, constituintes do EGb 761, estimulam a apoptose de osteoclastos maduros (Wattel, 2003) e aumentam a densidade mineral óssea trabecular (Trivedi et al, 2009).

As análises dos níveis de cálcio revelaram que os animais dos grupos III, IV, V e VI apresentaram melhor resposta a partir do 25º dia, igualando-se ao grupo controle. O grupo II mostrou níveis mais baixos deste íon. Esses resultados corroboram com análise histoquímica, que demonstraram fraca marcação para cálcio nos fêmures dos animais do grupo II e forte marcação nos demais grupos experimentais. Sabe-se que o paratormônio (PTH) regula as concentrações séricas de cálcio, causando um aumento do número de osteoclastos e reabsorção da matriz óssea, com liberação de fosfato de cálcio e aumento da calcemia. As concentrações não aumentam no sangue pois o próprio PTH acelera a excreção renal de íons fosfato. Ele atua sobre receptores localizados nos osteoblastos. Em resposta a este sinal essas células deixam de sintetizar colágeno e iniciam a secreção do fator estimulador de osteoclastos (Bedani e Rossi, 2005). Desta forma, sugere que o extrato consiga ativar, via receptor, esse hormônio e contribuir para a regulação desse íon. Yamaguchi et al, (2007) estudaram os efeitos de diversos flavonóides sobre a quantidade de cálcio em cultura de tecido do fêmur de ratos Wistar e sobre o estímulo do paratormônio sobre a osteoclastogênese em cultura de células da medula óssea de camundongos. Dentre os vários flavonóides, a quercetina, foi o único que demonstrou aumento significativo do cálcio na cultura de tecido da diáfise de ratos. O que poderia justificar os resultados encontrados no presente trabalho.

## **5. Conclusão**

Conclui-se que o extrato de *G. biloba* associado a um protocolo de natação é viável pela retomada dos níveis de DMO, regulação a níveis normais de fosfatase alcalina, hidroxiprolina, cálcio e melhora das características histopatológicas, reparando assim o quadro de osteoporose induzida.

## 6. Referência

Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influencia da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2006; 42:5-12

Barengolts EI, Lathon PV, Curry, DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. Bone Miner. 1994;26:133-40.

Bayramoglu M, Sozay S, Karatas M, Kilinc S. Relationships between muscle strength and bone mineral density of three body regions in sedentary postmenopausal women. Rheumatol. Int. 2005; 25:513-7.

Bedani R, Rossi EA. O consumo de cálcio e a osteoporose. Ciênc. Biol. Saúde. 2005;26:3-14.

Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophometric determination of hydroxyproline. Ann. Chem. 1963; 35:1961-1965.

Bessey OA, Lowry OH, Brock MJJB. Methods in clinical chemistry. Biol. Chem. 1946;164:321-329.

Boaro SN, Anaruma CA. Análise do efeito do exercício de natação sobre o osso compacto e esponjoso de ratas com osteoporose através da microscopia eletrônica de varredura. Col. Pes. Ed. Fís. 2009;8:23-30.

Dekosky ST, Fitzpatrick A, Ives DG, Saxton J, Williamson J, Lopez OL, Burke G, Fried L, Kuller LH, Robbins J, Tracy R, Woolard N, Dunn L, Kronmal R, Nahin R, Furberg C. The Ginkgo Evolution of memory (GEM) study: Design and baseline data of a randomized trial of *Ginkgo biloba* extract in prevention of dementia. *Contemp. Clin. Trials.* 2006; 27:238-253.

Donfrancesco R, Dell'uomo A. *Ginkgo biloba* in Down Syndrome. *Phytomedicine* 2004; 11:469.

Geraldes AAR. Exercício como estratégia de prevenção e tratamento da osteoporose: Potencial e limitações. *Rev. Bras. Fis. Exerc.*, 2003;2:1-28.

Han, Y. *Ginkgo biloba* terpenoid component has an anti-inflammatory effects on *Candida albicans* – caused arthritic inflammation. *Internat. Immunopharmacol.* 2005;5:1049-1056.

Harley DE, Heinze L, Elsabagh S, File SE. Effects on cognition and mood in postmenopausal women of 1-week treatment with *Ginkgo biloba*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003;75:711-120,2003.

Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J. Appl. Physiol.* 2001;91:1663-1668.

Lucinda LMF, Vieira, ABJ, Oliveira ATT, Sá RCS, Peters VM, Reis JEP, Guerra M. Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with *Ginkgo biloba* extract: A histomorphometric study of mandible and femur. *Fitoterap.* 2010;81:982–987.

Neto AMP, Soares S, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B, Moreira C, Fernandes CE, Zerbini CAF, Baracat E, Freitas EC, Meirelles ES, Bandeira F, Gonçalves HT, Lemgruber I, Neto JFM, Borges JLCB, Castro JAS, Fiat JC, Mendonça LMC, Oliveira L, Russo ALT, Gregório LH, Marone M, Castro ML, Haidar MA, Santos PRD, Plapler P, Carneiro R, Guarniero R, Machado RB, Pereira RMR, Lederman R, Radominski S, Mendes

SEM, Szejnfeld V, Chahade W. Consenso Brasileiro de Osteoporose. Rev. Bras. Reumatol., 2002;42:344-354.

Oh SM, Chung KH. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. Life Sci. 2004;74:1325-1335.

Peng Z, Tuukkanen H, Zhang H, Jamsa T. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. Bone. 1994;15:523-32.

Pinto A, Oliveira TT, Del Carlo RJ, Nagem TJ, Fonseca CC, Moraes GHK, Júnior DBF, Cardoso CA. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio; atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. Rev. Bras. Cienc. Farm. 2006;42:99-107.

Pinto R.M, Fernandes ES, Reis JEP. Intra-uterine growthretardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* torats. Reprod. Toxicol. 2007;23:480-485.

Silva, CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Marques I. O Exercício Físico potencializa ou compromete o crescimento longitudinal de crianças e adolescentes? Mito ou Verdade?. Rev. Bras. Med. Esporte. 2004;10:6-10.

Souza MC, Assemany FS, Lima ATC, Souza RF. Glicocorticoides e osteoporose – Artigo de revisão. Rev. Ciênc. Med. Biol. 2010;9:57-64.

Trivedi R, Kumar A, Gupta V, Kumar S, Nagar GK, Romero JR, Dwivedi AK, Chattopadhyay N. Effects of EGb 761 on bone mineral density, bone microstructure, and osteoblast function: Possible roles of quercetin and Kaempferol. Mol. Cell. Endocrinol. 2009; 302:86-91.

Trivedi R, Kumar S, Kumar A, Siddiqui JA, Swarnkar G, Gupta V, Kendurker A, Dwivedi AK, Romero JR, Chattopadhyay N. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. Mol. Cell. Endocrinol. 2008;289:85-93.

Turner CH, Robling AG. Exercises for improving bone strength. *Br. J. Sports Med.* 2005;39:188-9.

Wattel, A, Kamel S, Mentaverri R. Ptent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quecetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochem. Pharmacol.* 2003;65:35-42.

Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K. Effects of flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture in vitro. *Mol. Cell. Biochem* 2007;303:83-88.

Zehra U, Tahir M, Jaffery FH, Lone KP. *Ginkgo biloba* effects on mice fetal liver. *Int. J. Morphol.*, 2010;28:765-770.

Zhou W, Chai H, Courson, A, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Ginkgolide A attenuates homocysteine- induce endothelialdysfuncion in porcine coronary arteries. *J. Vasc. Surg.* 2006;44:853-862.

**Tabela 1.** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos resultados da densitometria óssea em unidades Hounsfield (HU) nos animais dos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Dias		
	1 <sup>o</sup>	25 <sup>o</sup>	50 <sup>o</sup>
I	513,00 ± 10,69 aA	519,66 ± 8,73 aA	520,00 ± 8,14 aA
II	458,66 ± 4,72 aB	457,00 ± 4,00 aB	461,00 ± 2,00 aB
III	472,33 ± 11,59 bB	510,00 ± 3,60 aA	515,66 ± 4,00 aA
IV	462,00 ± 29,20 bB	494,00 ± 4,58 aA	497,00 ± 2,64 aA
V	456,00 ± 24,55 bB	498,00 ± 3,00 aA	494,66 ± 8,50 aA
VI	457,00 ± 21,70 bB	505,66 ± 2,51 aA	499,33 ± 8,62 aA

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

**Tabela 2.** <sup>1</sup>Média ± desvio padrão dos níveis séricos de Cálcio (mg/dL) nos animais dos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Dias		
	1 <sup>o</sup>	25 <sup>o</sup>	50 <sup>o</sup>
I	10,89 ± 1,41 aA	10,55 ± 0,63 aAB	10,57 ± 0,47 aBC
II	5,80 ± 0,40 aB	5,41 ± 0,33 aC	5,25 ± 0,74 aD
III	5,30 ± 0,66 bB	9,80 ± 0,63 aB	9,79 ± 0,62 aC
IV	5,71 ± 0,31 bB	10,50 ± 0,38 aAB	10,85 ± 0,53 aAB
V	5,23 ± 0,53 bB	10,72 ± 0,47 aAB	10,78 ± 2,67 aBC
VI	5,34 ± 0,71 bB	11,04 ± 0,63 aA	11,68 ± 0,86 aA

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

**Tabela 3.** <sup>1</sup>Médias  $\pm$  desvio padrão dos níveis séricos de Fosfatase Alcalina (U.I/L) nos animais dos grupos experimentais.

Grupos Experimentais	Dias		
	1 <sup>o</sup>	25 <sup>o</sup>	50 <sup>o</sup>
I	235,47 $\pm$ 8,45 aA	210,98 $\pm$ 17,98 aB	214,01 $\pm$ 11,06 aB
II	132,73 $\pm$ 27,83 bB	153,21 $\pm$ 36,36 abC	166,56 $\pm$ 26,1 aC
III	139,63 $\pm$ 31,11 bB	247,91 $\pm$ 13,45 aA	268,75 $\pm$ 10,10 aA
IV	137,07 $\pm$ 29,35 bB	251,98 $\pm$ 20,89 aA	257,33 $\pm$ 26,33 aA
V	131,34 $\pm$ 30,98 bB	248,01 $\pm$ 14,51 aA	255,05 $\pm$ 25,10 aA
VI	145,98 $\pm$ 29,25 bB	248,14 $\pm$ 12,99 aA	256,50 $\pm$ 28,35 aA

<sup>1</sup>Médias seguidas por letras distintas maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

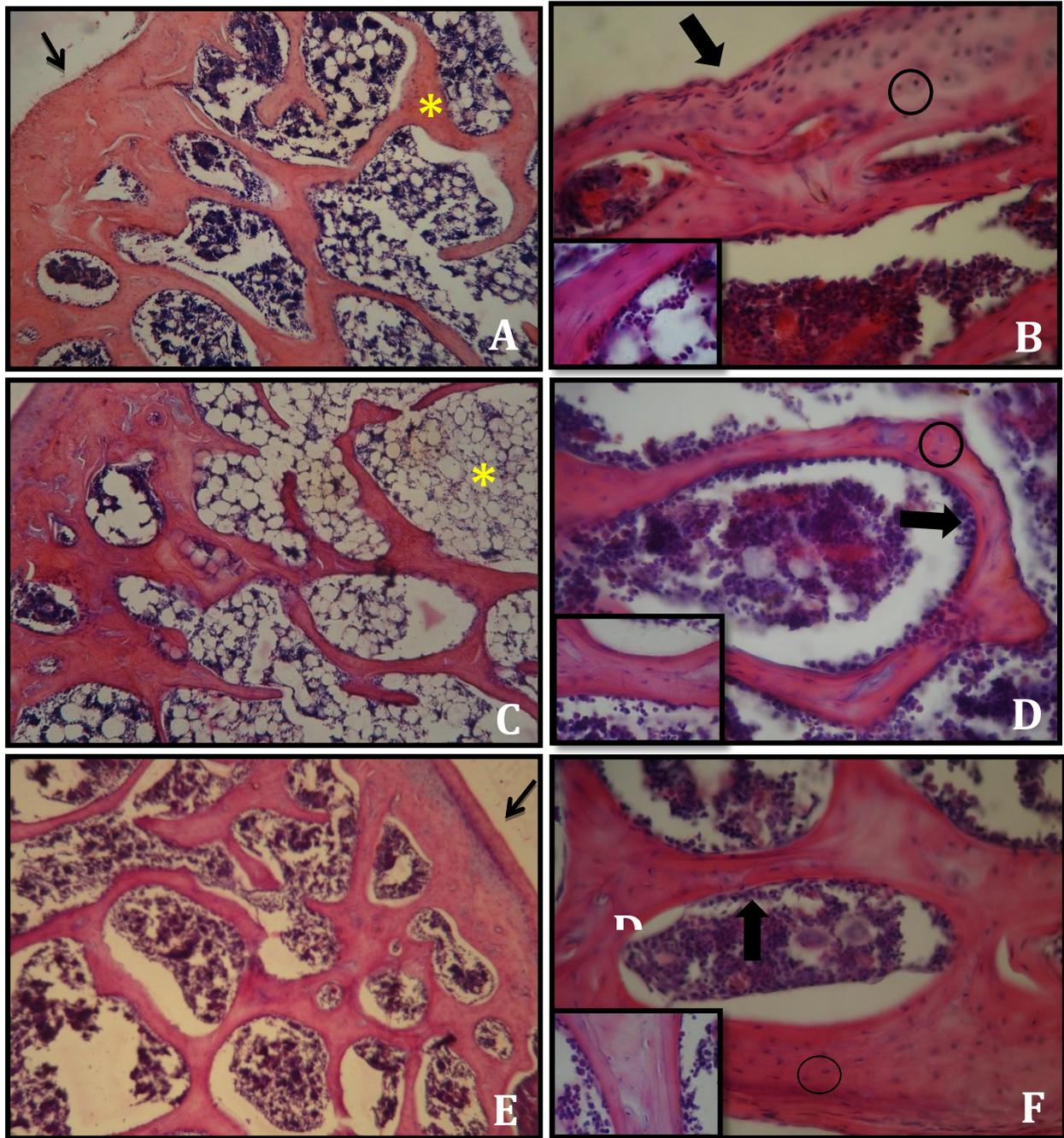
**Tabela 4.** <sup>1</sup>Média  $\pm$  desvio padrão do nível sérico de Hidroxiprolina ( $\mu\text{mol/g}$ ) nos animais dos grupos experimentais ao final do tratamento.

Grupos	I	II	III	IV	V	VI
<b>50<sup>o</sup> dia</b>	9,43 $\pm$ 1,47	12,92 $\pm$	9,64 $\pm$ 1,14	9,72 $\pm$ 0,97	9,46 $\pm$ 1,21	10,12 $\pm$ 0,44
	ab	3,88 a	ab	ab	ab	ab

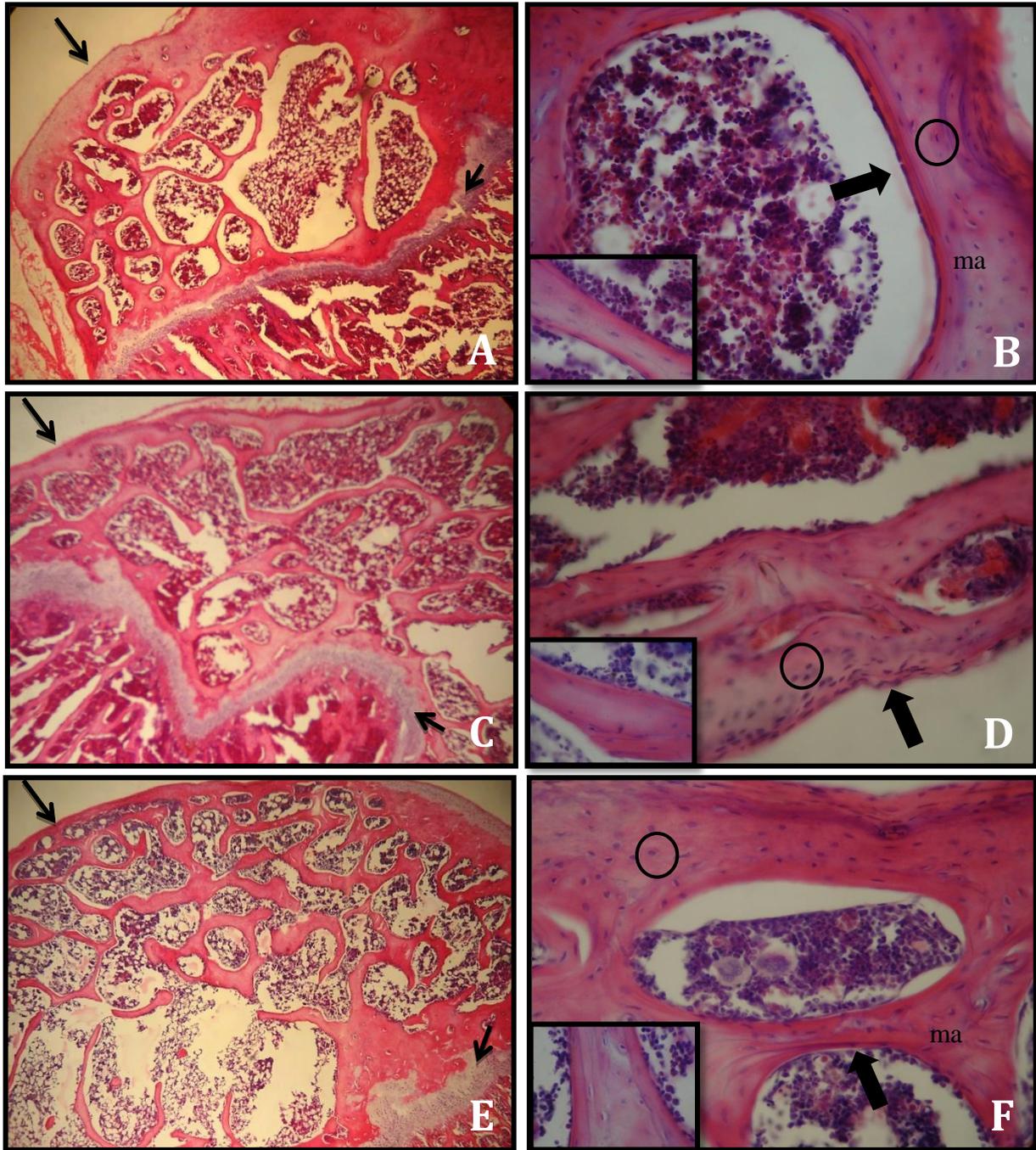
<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



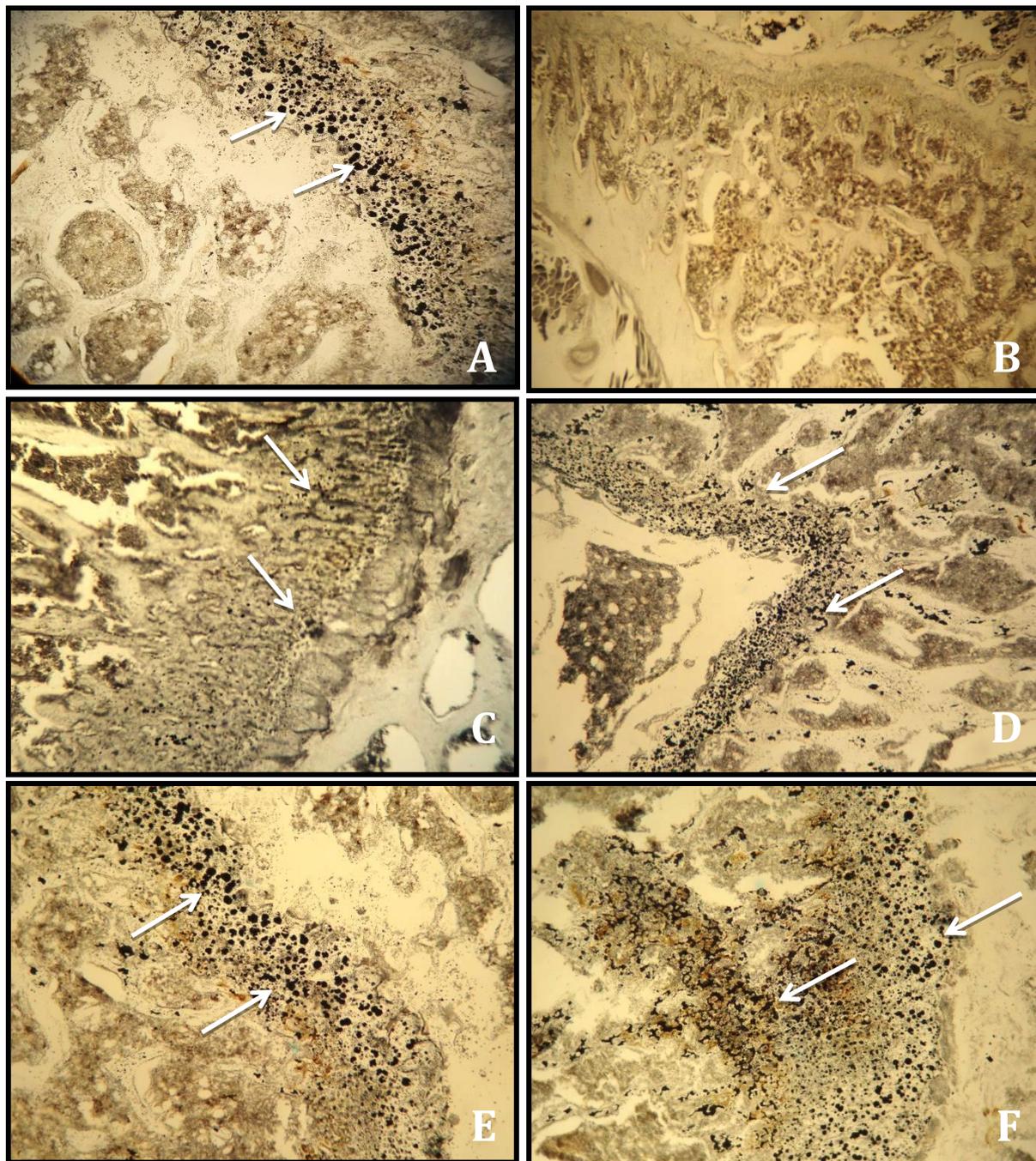
**Figura 1.** Tanque de natação utilizado no experimento.



**Figura 2.** Fêmures dos animais dos grupos I, II e III. A, B – Grupo Controle (I). A - Observar arquitetura óssea preservada (\*). B – Observar presença de osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo) ativos. Coloração H.E. Aumentos 107X, 428X, respectivamente. C e D – Grupo II (Osteoporose). C - Observar perda de microarquitetura óssea (\*). D – Notar trabécula epifisárias delgada com superfícies com osteoblastos inativos (Seta grossa) e áreas com matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumentos 107X, 428X, respectivamente. E e F – Grupo III (Alendronato de Sódio). E - Observar conectividade desejável entre as trabéculas (\*). F – Observar trabécula espessa com presença de osteoblastos (seta grossa) e osteócitos (círculo) ativos. Aumentos 107X, 428X, respectivamente. Seta longa – Cartilagem articular.



**Figura 3.** Fêmures dos animais dos grupos IV, V e VI. A e B – Grupo IV (EGb 14 mg + Natação). A - Observar recuperação da microarquitetura óssea. B – Observar osteoblastos (seta grossa), osteócitos (círculo) ativos e áreas com matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumentos 42X, 428X, respectivamente. C e D – Grupo EGb 28 mg + natação (V). C - Observar arquitetura óssea preservada. D – Observar trabécula espessa com osteoblastos (seta grossa), osteócitos (círculo) e áreas com matriz alterada (ma). Coloração H.E. Aumentos 42X, 428X, respectivamente. E e F – Grupo VI (EGb 56 mg + natação). E - Observar recuperação da microarquitetura óssea. F – Observar trabéculas espessa. Coloração H.E. Aumentos 42X, 428X, respectivamente. Seta longa – Cartilagem articular; Seta curta – Inativação do disco epifisário.



**Figura 4.** Detecção de Cálcio nos fêmures dos animais dos grupos experimentais. A - Grupo controle (I). Evidenciar grande depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. B - Grupo Osteoporose (II). Evidenciar fraca reação para cálcio. C - Grupo Controle Positivo (III), D - Grupo EGb 14mg + Natação. E - Grupo EGb 28mg + Natação. Notar intensa reação para o cálcio. F - Grupo EGb 56mg + Natação (VI). Evidenciar intenso depósito de cálcio junto ao centro de ossificação. Coloração Von Kossa. Aumentos 107X. Setas - Marcação positiva para cálcio.

## **ANEXO**