

LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA

**EFEITO ANTI-OSTEOPORÓTICO DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba*
EM RATAS WISTAR COM OSTEOPOROSE INDUZIDA POR
GLICOCORTICOIDES**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde - área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra

Co-orientadora: Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup

**Juiz de Fora
2012**

LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA

**EFEITO ANTI-OSTEOPORÓTICO DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba*
EM RATAS WISTAR COM OSTEOPOROSE INDUZIDA POR
GLICOCORTICOIDES**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde - área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde.

Aprovado em 21 de maio de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Maria Christina M. Nogueira Castanon
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Mário Jefferson Q. Louzada
Universidade Estadual Paulista

Profa. Dra. Tânia Toledo de Oliveira
Universidade Federal de Viçosa

Ao meu amado esposo Maycon, pela compreensão, apoio e por acreditar em mim
quando nem eu mesma acreditava.

Aos meus queridos pais, Odaléa e Jader por terem sido meus maiores
incentivadores, por sempre confiarem no meu trabalho e pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão, Garrone que mesmo longe foi fundamental na minha jornada.

Aos meus tios Antônio e José Henrique por estarem ao meu lado durante todos
estes anos em Juiz de Fora.

Agradecimentos

À Deus, que me deu forças para prosseguir em minha vida sem pensar em desistir, que me deu meios e coragem nos momentos mais difíceis, e que me iluminou durante toda essa caminhada.

Agradeço de forma muito especial à minha orientadora professora Dra. Martha Guerra, pelos ensinamentos, dedicação, compreensão e competência na orientação deste trabalho. Agradeço sua dedicação à pesquisa e docência, com certeza seu exemplo seguirá comigo por todo o caminho que irei trilhar na minha vida.

À professora Dra. Beatriz Aarestrup pela co-orientação, dedicação, paciência e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho e durante o tempo que trabalhamos juntas, sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

À professora Dra. Vera Peters por ter me admitido no Centro de Biologia da Reprodução por todos estes anos, por ter incentivado todos os alunos a serem responsáveis e éticos no procedimento científico e na conduta de animais de laboratório.

À minha querida professora de língua inglesa Cassiana Monteiro Boya pela correção de meus artigos científicos e também por seus ensinamentos durante estes anos.

À professora Dra. Tânia Toledo de Oliveira por sempre me receber em seu laboratório de pesquisa, por toda a dedicação e ensinamentos, sua ajuda sempre foi muito importante.

Ao professor Dr. Mário Jefferson Louzada por compartilhar seu conhecimento e laboratório de forma incondicional. Toda a sua colaboração foi muito importante no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Fortes de Oliveira por ter sido um grande incentivador e por ter me auxiliado na captura das imagens radiográficas e posterior análise.

.À professora Dra. Taiza Stumpp e professor Dr. Fernando Aarestrup pelos ensinamentos no desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica realizada no presente trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde pelos ensinamentos importantes para a minha formação acadêmica.

Aos amigos de pós-graduação Leonardo, Laila, Hussien e Renato pela amizade. À todos os estagiários do Centro de Biologia da Reprodução que nos proporcionam condições de trabalho e auxílio durante todo o experimento. Agradeço especialmente aos amigos Marcella e Pedro por sempre estarem ao meu lado e pelo grande carinho.

À toda a equipe do nosso biotério e aos técnicos e secretários do CBR, Paulo Sérgio, Paulo, Evelise, Ana Paula, Flávia, Julieta que foram meus amigos e companheiros durante todos esses anos no CBR, são eles que nos dão condições de realizar nossos projetos através da disponibilidade, ensinamentos e grande experiência. Agradeço especialmente aos grandes amigos Lorena, Leonardo e Dayana por terem me acompanhado sempre durante as dificuldades, e sempre estarem disponíveis na resolução dos meus problemas, obrigada por seus conselhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e também à coordenação do curso de Pós-Graduação em Saúde pela concessão da bolsa de doutorado e especialmente a professora Dra. Darcília Maria Nagen da Costa pelo apoio e dedicação durante todo o curso de mestrado e doutorado.

Agradeço ao CBR e à FAPEMIG pelo apoio financeiro durante todo o desenvolvimento deste trabalho através das redes mineiras 173/08 e 172/08 e projeto Demanda Universal (FAPEMIG) APQ-00154-11.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

Resumo

Introdução: Dentre os principais mecanismos que causam a osteoporose está o uso de glicocorticóides. Os glicocorticóides induzem a apoptose nos osteoblastos e levar a diminuição do volume ósseo total. Diversos produtos são usados no tratamento da osteoporose e entre estes, alguns produtos naturais, tais como os fitoestrógenos. Estudos com o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) demonstraram efeitos promissores no tratamento da osteoporose. Este trabalho se propõe avaliar os efeitos do EGb sobre a apoptose de osteoblastos, densidade mineral óssea e na estrutura óssea de ratas Wistar com osteoporose induzida por glicocorticóide. **Métodos:** 60 ratas foram distribuídas em 5 grupos: controle, osteoporose, alendronato (alendronato de sódio - 0,2mg/Kg/dia), EGb1 (28 mg EGb/Kg/dia) e EGb2 (56 mg EGb/Kg/dia). A osteoporose foi induzida através de injeções intramusculares de dexametasona. A fosfatase alcalina óssea foi avaliada no soro e a análise imunohistoquímica das proteínas Bcl-2 e Bax foram avaliadas nos cortes histológicos de mandíbula e fêmur. Na tíbia foram avaliadas a densidade mineral óssea, densidade radiográfica, densidade mineral cortical e parâmetros biomecânicos. O grupo controle foi comparado ao grupo osteoporose (teste “t” Student/Mann Whitney). Os demais grupos, exceto o controle, foram analisados através do teste de ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey ou Dunnett T3 ($p < 0,05$). **Resultados:** No grupo osteoporose houve redução dos níveis de fosfatase alcalina óssea e da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 ($p < 0,05$). Redução de DMO, densidade mineral cortical da diáfise distal, rigidez, resiliência e carga máxima da tíbia ($p < 0,05$). Aumento da densidade radiográfica da epífise distal da tíbia e da expressão da proteína pró-apoptica Bax ($p < 0,05$). No grupo alendronato houve redução da expressão de Bax (20 dias) ($p < 0,05$), aumento da expressão de Bcl-2 (30 dias) e da DMO da tíbia (20 e 30 dias) ($p < 0,05$). EGb 1 e EGb2 (30 dias) aumentaram os níveis de fosfatase alcalina óssea ($p < 0,05$). EGb2 aumentou a DMO (20 e 30 dias). EGb1 e EGb2 aumentaram a expressão de Bcl-2 (20 e 30 dias) ($p < 0,05$). EGb2 (20 dias), EGb1 e EGb2 (30 dias) reduziram significativamente a expressão de Bax ($p < 0,05$). EGb1 e EGb2 (20 e 30 dias) reduziram a densidade radiográfica ($p < 0,05$). Entretanto os tratamentos com o alendronato de sódio e o EGb não alteraram de forma significativa os parâmetros biomecânicos. **Conclusão:** O EGb aumentou a DMO, a expressão de proteínas anti-apoptóticas e os níveis de fosfatase alcalina óssea. E ainda reduziu a densidade radiográfica e a expressão de proteínas pró-apoptóticas. Este estudo sugere que o EGb reduz a apoptose de células osteoblásticas e aumenta a formação de tecido ósseo, podendo ser um tratamento efetivo para a osteoporose induzida por glicocorticóides.

Palavras-chave: Osteoporose. Apoptose. Densidade Mineral óssea. Glicocorticóide.

Ginkgo biloba.

Abstract

Introduction: Among the major mechanisms that lead to osteoporosis is the use of glucocorticoids. Glucocorticoids induce apoptosis in osteoblasts and reduce the total bone volume. Several products are used in the treatment of osteoporosis and among them, some natural products such as phytoestrogens. Studies with Ginkgo biloba extract (EGb) showed promising effects in the treatment of osteoporosis. This study aims to evaluate the effects of EGb on the apoptosis of osteoblasts, bone mineral density and bone structure of Wistar rats with glucocorticoid-induced osteoporosis.

Methods: 60 rats were divided into 5 groups: control, osteoporosis, alendronate (alendronate sodium - 0.2 mg/kg/day), EGb1 (EGb 28mg/kg/day) and EGb2 (EGb 56mg/kg/day). Osteoporosis was induced by injections of dexamethasone. The bone alkaline phosphatase was measured in serum and immunohistochemical analysis of the proteins Bcl-2 and Bax were evaluated in histological sections of the mandible and femur. In the tibia were evaluated the bone mineral density (BMD), the radiographic density, the cortical mineral density and the biomechanical parameters. The control group was compared to the osteoporosis group ("t" test/ Mann Whitney). The other groups, except the controls, were analyzed by ANOVA followed by Tukey or Dunnett's T3 post hoc test ($p < 0.05$).

Results: In the osteoporosis group the levels of bone alkaline phosphatase and the anti-apoptotic protein Bcl-2 expression were significantly reduced. The BMD, cortical mineral density of the distal diaphysis, stiffness, resilience and load of the tibia reduced ($p < 0.05$). The radiographic density of the distal tibial epiphysis and the expression of the pro-apoptotic protein Bax increased ($p < 0.05$). Alendronate group decreased the expression of Bax (20 days), and increased the expression of the Bcl-2 (30 days) and the BMD of the tibia (20 and 30 days) ($p < 0.05$). EGb1 and EGb2 (30 days) increased the levels of bone alkaline phosphatase ($p < 0.05$). EGb2 increased BMD (20 and 30 days) ($p < 0.05$). EGb1 and EGb2 increased the expression of Bcl-2 (20 and 30 days) ($p < 0.05$). EGb2 (20 days), EGb1 and EGb2 (30 days) reduced the expression of Bax ($p < 0.05$). EGb1 and EGb2 (20 and 30 days) reduced radiographic density ($p < 0.05$). However treatment with alendronate sodium and EGb did not increase significantly the biomechanical parameters.

Conclusion: EGb increased BMD, the expression of anti-apoptotic proteins and bone alkaline phosphatase. The EGb reduced the radiographic density and the expression of pro-apoptotic proteins. This study suggests that EGb reduces apoptosis of osteoblastic cells and increases the formation of bone tissue. It suggests that the EGb may be effective in the treatment of osteoporosis

Key-Words: osteoporosis. Apoptosis. Bone mineral density. Glucocorticoids, *Ginkgo biloba*.

Lista de figuras

Figura 1: Duas maiores vias de apoptose em células de mamíferos	26
Figura 2: Osso com aspecto normal (A) e osteoporótico (B)	30
Figura 3: Imagem histológica da epífise femoral de ratas Wistar do grupo controle e grupo osteoporose induzido por GCs	38
Figura 4: (A) Desenho esquemático da epífise proximal do fêmur, onde B foi a região determinada para a análise imunohistoquímica (Bax) do tecido ósseo trabecular. (B) Desenho esquemático da região interradicular selecionada para a análise imunohistoquímica do tecido ósseo alveolar mandibular (Bax e Bcl-2)	64
Figura 5: Expressão de Bax nos osteoblastos da mandíbula	65
Figura 6: Expressão de Bcl-2 nos osteoblastos da mandíbula	65
Figura 7: Expressão de Bax nos osteoblastos do fêmur	66
Figura 8: Máquina universal EMIC, modelo DL 3000	67
Figura 9: Desenho esquemático da curva característica. Força X Deslocamento obtida no ensaio de flexão de três pontos na máquina universal de ensaios EMIC	67
Figura 10: Densidade radiográfica da epífise proximal e densidade óssea da diáfise distal da tíbia	69
Figura 11: Densitômetro DPX-Alpha Lunar	70

Lista de abreviaturas

AIF - “Apoptosis-inducing factor”/ fator indutor de apoptose

APAF1 - “Apoptotic protease activating factor 1”/ fator de ativação de proteases pró-apoptóticas 1

ATP - Adenosina trifosfato

BMP – “Bone morphogenetic protein”/ proteína morfogenética do osso

DMO - Densidade mineral óssea

DISC - “death-inducing signaling complex”/ complexo de sinalização indutor de morte

EGb - Extrato de *Ginkgo biloba*

FADD - “Fas-associated protein with death domain”/ domínio de morte associado ao Fas

FasL - “Fas ligand”/Fas ligante

G-CSF-“Granulocyte-colony stimulating factor”/ fator estimulador de colônias granulocitárias

GCs - Glicocorticóides

IAPs - “ Inhibitor of apoptosis proteins”/ proteínas inibidoras da apoptose

IGF- “Insulin-like growth factor”/ fator de crescimento semelhante a insulina

IL-6 - Interleucina- 6

IL-1 - Interleucina- 1

MO - Medula óssea

PBS- “Phosphate Buffered Saline”/ solução tampão fosfato

PPAR- γ 2-“Peroxisome-proliferator-activated receptor γ 2”/ receptores ativadores de proliferação do peroxissomo γ 2

Smac/DIABLO - “Second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI” - segundo ativador mitocôndrial de caspase/ proteína de ligação-IAP direta com baixo pI

TNF - “Tumor necrosis factor”/ fator de necrose tumoral

TNFR - “Tumor necrosis factor receptor”/ receptor de fator de necrose tumoral.

TO - Trabécula óssea

TRH - Terapia de reposição hormonal.

RANKL-“Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/ receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante.

ROI - “Region of interest”/ Região de interesse

DXA - “Dual-energy x-ray absorptiometry”/ absormetria radiológica de dupla energia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 TECIDO ÓSSEO	16
2.2 REMODELAÇÃO ÓSSEA	20
2.2.1 Marcadores bioquímicos de remodelação óssea	22
2.2.2 Apoptose e seu papel na regulação da homeostase óssea	23
2.3 PROPRIEDADE BIOMECÂNICA DOS OSSOS	27
2.4 OSTEOPOROSE	29
2.5 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO NA OSTEOPOROSE	32
2.6 OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDES	34
2.7 ESTROGÊNIO CAUSA INIBIÇÃO DA APOPTOSE DE CÉLULAS ÓSSEAS INDUZIDA PELOS GLICOCORTICÓIDES	38
2.8 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE	40
3 HIPÓTESE	56
4 OBJETIVOS	57
4.1 OBJETIVO GERAL	57
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
5 MATERIAIS E MÉTODOS	58
5.1 ANIMAIS	58
5.1.1 Condições de alojamento	58
5.2 EXTRATO DE GINKGO BILOBA	58
5.3 ALENDRONATO DE SÓDIO	59
5.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	59
5.4.1 Indução de osteoporose	59
5.4.2 Coleta do material para análises	60
5.4.3 Silanização das lâminas	61
5.4.4 Imunohistoquímica	62
5.4.5 Análise imunohistoquímica	64
5.4.6 Ensaio mecânico de flexão a três pontos	66
5.4.7 Densidade radiográfica	68
5.4.8 Densidade óssea	68
5.4.9 Densidade mineral óssea	69

5.5 ANÁLISE ESTÁTISTICA	70
5.6 ASPECTOS ÉTICOS	71
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
6.1 RESUMO ARTIGO I	73
6.2 RESUMO ARTIGO II	75
7 COMENTÁRIOS FINAIS	77
8 CONCLUSÃO	79
9 REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	92
ANEXO	111

1 Introdução

A osteoporose é caracterizada por um distúrbio osteometabólico, que causa diminuição de massa óssea, levando à fragilidade óssea e aumentando o risco de fraturas (HARA et al., 2001; DERVIS, 2005). Além das fraturas, a osteoporose causa complicações secundárias que afetam a qualidade de vida principalmente de indivíduos idosos, mulheres na pós-menopausa e pacientes que fazem uso crônico de corticoesteróides (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

No Brasil, esta doença afeta mais de 10 milhões de pessoas, sendo que apenas uma em cada três é diagnosticada e somente 20% desses pacientes diagnosticados recebem o tratamento (RODRIGUES, 2004).

Devido à alta morbidade e mortalidade acarretadas pela osteoporose, faz-se necessário o seu tratamento e, principalmente, sua prevenção. Já existem vários fármacos disponíveis no mercado, porém agentes com menores efeitos tóxicos estão sendo estudados para o tratamento desta doença. Dentre eles estão os fitoestrógenos, os quais englobam vários grupos de estrógenos não-esteroidais. Estes agentes têm apresentado benefícios múltiplos como prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes e obesidade, sintomas da menopausa, doença renal e vários tipos de câncer (DANG; LOWIK, 2005; DAS et al., 2005).

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) possui 24% de fitoestrógenos em sua composição, sendo os principais o kaempferol, quercetina e ishorhamnetina (OH;

CHUNG, 2004). A quercetina e o kaempferol foram efetivos em inibir *in vitro* a atividade de reabsorção dos osteoclastos (WATTEL et al., 2003). Trivedi et al. (2009) sugeriram que o kaempferol e a quercetina são os principais compostos do EGb responsáveis pelos benefícios encontrados no tratamento da osteoporose em estudos pré-clínicos. Além dos fitoestrógenos, o EGb possui em sua composição polifenóis antioxidativos, que podem prevenir a perda óssea e o risco de fraturas (BRAYBOY et al., 2001). Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* avaliaram este extrato em diferentes modelos experimentais de osteoporose e demonstraram que o EGb aumentou a massa óssea e foi capaz de combater a osteoporose (OH; KIM; CHUNG, 2008; TRIVEDI et al., 2009; LUCINDA et al., 2010a,b).

Diante do exposto e na busca de métodos novos e alternativos ao tratamento da osteoporose, este trabalho se propõe a avaliar os prováveis mecanismos pelos quais o EGb atua sobre a osteoporose induzida por glicocorticóides (GCs) em ratas Wistar.

2 Revisão da literatura

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo apresenta dois tipos macroscópicos, osso compacto e o osso trabecular ou esponjoso. O primeiro, também chamado osso cortical, se encontra na periferia dos ossos e corresponde a aproximadamente 80% de toda massa esquelética. Por sua vez o tecido ósseo trabecular possui uma rede de trabéculas e espaços intercomunicantes, de localização mais central, denominada cavidade medular, que abriga a medula óssea (MO) e corresponde a 20% da massa esquelética. A proporção do osso cortical e trabecular varia nos diferentes ossos do esqueleto. O colo do fêmur tem 75% de osso cortical, o terço proximal do rádio 95% e a coluna lombar 34%. As superfícies externas e internas dos ossos são revestidas respectivamente pelo perióstio e endóstio. O perióstio constitui uma membrana de grande importância para a integridade dos ossos e apresenta região periférica de tecido fibroso denso e, internamente, o câmbio, que é vascularizado e contém fibroblastos e osteoblastos com função de nutrição e produção óssea. Em diversos processos patológicos, nos quais há enfraquecimento ou perda óssea cortical, o perióstio responde com neoformação óssea subperiosteal de formas diferentes, configurando a reação periosteal. O endóstio reveste internamente o osso compacto e se confronta com a cavidade medular e as trabéculas do osso esponjoso, é apenas uma camada unicelular espessa e consiste em células osteoprogenitoras, que podem se diferenciar em células produtoras de matriz óssea, osteoblastos e células de revestimento ósseo (LEMOS et al., 1994; SZEJNFELD, 2000).

O tecido ósseo contém três tipos de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos originam-se de células tronco mesenquimais que são células osteoprogenitoras com capacidade de diferenciação, produção de tecido ósseo, cartilaginoso, fibroso. Os osteoblastos têm diâmetro de 15 a 20 μm e secretam fatores de crescimento locais e fosfatase alcalina óssea, relacionadas com o processo de mineralização óssea. A concentração de fosfatase alcalina óssea é usada como um importante marcador bioquímico de formação óssea (LEMOS et al., 1994; SZEJNFELD, 2000).

Os osteoblastos podem permanecer como células ativas, ou serem circundadas por matriz e se tornar osteócitos ou ainda estarem relativamente inativas e formar células de superfície (*lining cells*) ou células de revestimento ósseo (DOWNEY; SIEGEL, 2006). Os osteócitos são células em forma de estrela aprisionadas dentro da rede de lacunas e canaliculos do tecido ósseo. Já as células de superfície são achatadas e possuem poucas organelas. Acredita-se que os osteoblastos se tornem células de superfície, ao término da formação óssea. A função mais importante dessas células é assegurar o contato entre as células incorporadas à matriz, os osteócitos e o meio externo extra-ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os osteoclastos se originam de células hematopoiéticas pluripotentes, são células gigantes multinucleadas, que medem de 20 a 100 μm e possuem de 2 a 100 núcleos, formando-se principalmente pela fusão sincicial de monócitos circulantes especializados. Estas células são encontradas em contato com a superfície da

matriz óssea calcificada, em cavidades chamadas lacunas de Howship, também conhecidas como lacunas de reabsorção. Eles são as células responsáveis pela degradação da matriz óssea, tanto dos componentes minerais como os orgânicos. Os osteoclastos se aderem à superfície óssea principalmente através da expressão de proteínas de membrana denominadas integrinas. Após a adesão, os osteoclastos acidificam o compartimento extracelular secretando prótons através da borda em escova. Através do pH ácido ocorrerá a dissolução dos cristais de hidroxiapatita da matriz óssea, o que possibilitará a exposição da matriz. Após a exposição da matriz às enzimas (colagenases e catepsinas), iniciam o processo de degradação dos seus componentes. Os resíduos dessa digestão extracelular são transportados para dentro dos osteoclastos. Esses eventos no processo de reabsorção ajudam a manter os níveis séricos de cálcio e fósforo (SZEJNFELD, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A principal enzima produzida pelo osteoclasto é a fosfatase ácida tartarato resistente, que é um marcador bioquímico de reabsorção óssea. Além dela, a piridinolina e a hidroxiprolina são marcadores de degradação do colágeno que ocorrem durante o processo de reabsorção e podem estar presentes no plasma e urina. Através desses marcadores obtém-se a estimativa da proporção de reabsorção óssea (DOWNEY; SIEGEL, 2006).

Bioquimicamente, o tecido ósseo é definido por uma mistura especial de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%). A matriz orgânica, também conhecida como matriz osteóide, é constituída principalmente por colágeno tipo I e, em menor quantidade pelo colágeno tipo V. Esta matriz apresenta também

substância fundamental amorfa com outras proteínas como: proteoglicanos, fosfoproteínas, proteína morfogenética óssea, glicoproteínas multiadesivas (osteonectina, sialoproteína como osteopontinas e sialoproteínas I e II), glicoproteína ácida óssea, trombospondina, proteolípídeo ósseo, proteínas vitamina k-dependentes específicas do osso (osteocalcina, proteína S e a proteína Gla da matriz), fatores de crescimento e citocinas incluindo fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator β transformador de crescimento (TGF- β), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) e ainda enzimas (colagenases, elastases, fosfatase alcalina óssea, fosfatase ácida), hormônios (hormônio da paratireóide, calcitriol, calcitonina) assim como outros metabólitos necessários ao metabolismo ósseo (ROSS; PAWLINA, 2008). A matriz orgânica fornece suporte estrutural para o esqueleto e, por meio de ação coordenada dos osteoblastos e osteoclastos, serve como reservatório de íons e fatores de crescimento que podem ser liberados conforme a demanda metabólica (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A fase inorgânica da matriz óssea, também conhecida como fase mineral do osso, é composta principalmente por cálcio, fosfato e, em menor quantidade, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. O cálcio e o fósforo são encontrados na forma de cristais de hidroxiapatita, que têm forma alongada e hexagonal e são ligados às fibras colágenas, estando distribuídos na substância fundamental amorfa. A dureza do tecido ósseo resulta do arranjo peculiar entre hidroxiapatita e colágeno. Em virtude do seu conteúdo mineral, o osso serve como local de armazenamento para cálcio e fosfato. Estes podem ser mobilizados da matriz óssea e captados pelo sangue, quando há necessidade, para manter os

níveis apropriados em todo o organismo. Dessa maneira, além de ter como função suporte e proteção, o osso desempenha um importante papel secundário na regulação homeostática de níveis sanguíneos de cálcio (ROSS; PAWLINA, 2008; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; SZEJNFELD, 2000).

2.2 Remodelação óssea

Para manter adequadamente a homeostasia mineral do osso, o esqueleto é continuamente destruído e reconstruído, por um processo denominado remodelação ou remanejamento ósseo, que acontece durante toda a vida. Este mecanismo é responsável pela reposição do osso imaturo, danificado ou velho por novo osso lamelar (MANOLOGAS, 2000).

Através da remodelação do tecido ósseo é controlada a homeostase mineral, juntamente com órgãos como os rins e o intestino (LEMOS et al., 1994; JOHNELL, 1996; MUNDY, 1999; SZEJNFELD, 2000).

O crescimento e a remodelação são obtidos através de reabsorção e neoformação, processos esses mais evidentes e intensos durante o crescimento. A remodelação é regulada por fatores locais e sistêmicos, incluindo forças mecânicas, paratormônio, hormônios da tireóide, vitamina D, estrógeno, andrógenos, cortisol, calcitonina, fatores de crescimento (IGF-1) e citocinas (WATTS, 1999).

Esse processo de remodelação atinge seu auge entre 30 e 40 anos, quando se estabelece o equilíbrio entre as taxas de reabsorção e neoformação óssea,

observando-se a partir daí, predomínio progressivo de reabsorção óssea (LEMOS et al., 1994; JOHNELL, 1996; MUNDY, 1999; SZEJNFELD, 2000).

A seqüência de eventos dentro do processo de remodelação parece envolver quatro fases distintas:

1- Ativação: As células precursoras presentes na medula óssea, respondem a sinais físicos e hormonais e se concentram sobre determinada região que será reabsorvida, fundem-se e se transformam em osteoclastos multinucleados.

2- Reabsorção: Os osteoclastos ativados escavam uma cavidade na superfície óssea.

3- Reversão: No momento em que a reabsorção está completa, os osteoclastos desaparecem da unidade de reabsorção. Durante sete a 14 dias, uma espessa linha de “cimento” é depositada, essa região consiste de fibras de colágeno organizadas ao acaso, ao contrário do osso normal, no qual a deposição de colágeno é lamelar. Essa linha demarca o limite da cavidade de reabsorção e liga o osso novo depositado ao velho.

4- Formação: começa quando os pré-osteoblastos são atraídos para a cavidade de reabsorção, os osteoblastos derivados destes pré-osteoblastos sintetizam o novo colágeno e proteínas da matriz, preenchendo a cavidade de reabsorção com osteóide lamelar, posteriormente segue-se a deposição mineral calcificando completamente a nova unidade de osso (SZEJNFELD, 2000).

O aumento acentuado da reabsorção óssea desencadeia a osteoporose, com perda de resistência e integridade do osso, resultando em fraturas após mínimos traumas.

2.2.1 Marcadores bioquímicos de remodelação óssea

Os marcadores bioquímicos de remodelação óssea são divididos em três categorias: enzimas ou proteínas, que são secretadas pelas células envolvidas na remodelação; produtos de quebra do colágeno; produtos oriundos da síntese de novo osso. Por se tratar de um processo conjugado, esses marcadores refletem o estado geral da remodelação, mas são em geral, classificados de acordo com uma das situações nas quais estão agudamente elevados. Uma vez que o processo de reabsorção é mais curto que o de formação, os marcadores de reabsorção respondem às mudanças mais rápido que os de formação (WATTS, 1999).

- a) Marcadores de reabsorção: Incluem uma enzima, a fosfatase ácida tartarato-resistente e produtos de degradação da matriz óssea como hidroxiprolina, piridinolina, deoxipiridinolina e telopeptídeos (SZULC, 2011). A fosfatase ácida é uma enzima lisossomal encontrada no osso, baço, plaquetas, eritrócitos, próstata. Existem ensaios para determinação da fosfatase tartarato-resistente no plasma e soro, sendo os níveis séricos mais altos que os plasmáticos (BROWN et al., 2009).
- b) Marcadores de formação óssea: incluem a enzima fosfatase alcalina óssea, e três produtos derivados da síntese de matriz óssea (osteocalcina, fragmentos amino e carboxi-terminais do pró-colágeno) (SZULC, 2011). A fosfatase alcalina total se origina de diversos tecidos, incluindo ossos, fígado, rins, intestino e placenta. Já a isoforma óssea se localiza na membrana plasmática dos osteoblastos onde está envolvida no processo de formação e mineralização dos ossos. Apesar da grande semelhança estrutural entre as isoformas de fosfatase alcalina, imunoenaios específicos foram desenvolvidos para a isoforma óssea,

diminuindo muito a reação cruzada com a isoforma hepática. Sua determinação apresenta vantagens sobre a osteocalcina por ter meia vida maior (um a dois dias) e não ser afetada por variações diurnas (RAUCH et al., 1997; BROWN et al., 2009).

2.2.2 Apoptose e seu papel na regulação da homeostase óssea

A apoptose é definida como uma série de eventos celulares, envolvendo a perda da membrana mitocondrial, condensação de cromatina, fragmentação do DNA e geração de corpos apoptóticos. Mediada por caspases, esse processo culmina em um desarranjo orquestrado da célula e fagocitose da célula morta (HENGARGTNER, 2000). A apoptose desempenha um importante papel na manutenção da homeostase pela eliminação das células desnecessárias, danificadas ou velhas (GALLUZI et al., 2007).

A ativação de morte celular programada pode ocorrer através de duas vias principais. A via extrínseca, mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática. O FasL (“Fas ligand”/Fas ligante) e o TNF (“tumor necrosis factor”/ fator de necrose tumoral) se ligam ao Fas e ao TNFR (“tumor necrosis factor receptor”/ receptor de fator de necrose tumoral) respectivamente, induzindo a formação do DISC (“death-inducing signaling complex”/ complexo de sinalização indutor de morte), o DISC recruta a Caspase-8 e ativa a cascata de ativação das procaspases (BUDIHardjo et al., 1999). A via intrínseca é ativada por estresse extracelular e intracelular, como fatores de crescimento, hipóxia, dano ao DNA e indução de oncogene. Sinais que são

transferidos em resposta a este estresse convergem diretamente para a mitocôndria, uma série de eventos bioquímicos é induzida e resulta na permeabilização da membrana mitocondrial, onde há liberação de apoptogênicos como citocromo *c*, AIF (“apoptosis-inducing factor”/ fator indutor de apoptose), ATP (adenosina trifosfato) e proteínas de choque térmico. Ocorre a formação do apoptossoma, uma proteína complexa que contém o citocromo *c*, APAF1 (“apoptotic protease activating factor 1”/ fator de ativação de proteases pró-apoptóticas 1) e caspase-9 e caspase de ativação, uma vez que a citocromo *c* é liberada, a cascata de ativação da caspase é irreversível (GESKE; GERSCHENSON, 2001; BUDIHardjo et al., 1999). Portanto como resultado final de ambas as vias ocorre a ativação das caspases, proteases, que quebram proteínas celulares específicas e estão associadas à degradação do DNA (figura 1) (FISHER, 2001).

Em relação ao controle genético da apoptose existem genes que estão envolvidos no processo apoptótico inibindo ou estimulando a apoptose, de acordo com a situação em que a célula ou tecido se encontram, em decorrência disto eles são denominados anti-apoptóticos e pró-apoptóticos respectivamente (LEE et al., 1999).

Os membros da família Bcl-2 são fatores cruciais na regulação da apoptose. De acordo com critérios funcionais e estruturais, são divididos em dois grupos, os membros anti-apoptóticos e os membros pró-apoptóticos.

a) Membros anti-apoptóticos: Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL.

b) Membros pró-apoptóticos: Bad, Bak, Bax, Bid, Bim, Bcl-xS.

A proteína Bcl-2 bloqueia a liberação de citocromo *c* pela mitocôndria após estímulo apoptogênico, impedindo a ativação de caspases. Mas o principal mecanismo de ação destas moléculas é através da ligação e inibição das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2. Um dos mecanismos pelos quais estas proteínas pró-apoptóticas controlam a apoptose é através da formação de poros na membrana mitocondrial, permitindo a interação de várias proteínas envolvidas na regulação da apoptose (REED; JURGENSMEIER; MATSUYAMA, 1998).

Bax e Bcl-2, originalmente localizadas no citoplasma, são translocadas para a membrana mitocondrial externa após o início do processo apoptótico. Na membrana elas sofrem alterações conformacionais que elevam a permeabilidade do poro mitocondrial, levando a liberação de moléculas pró-apoptóticas, tais como citocromo *c*, AIF e Smac/DIABLO (“second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI” - segundo ativador mitocôndrial de caspase/proteína de ligação-IAPS direta com baixo pI) (FAN et al., 2005).

As proteínas do grupo anti-apoptótico podem se ligar seletivamente à conformação ativa de Bax e prevenir sua inserção na membrana mitocondrial externa, mantendo a permeabilidade normal do poro, e prevenindo assim, a liberação dos fatores pró-apoptóticos (ANTONSSON; MARTINOU, 2000).

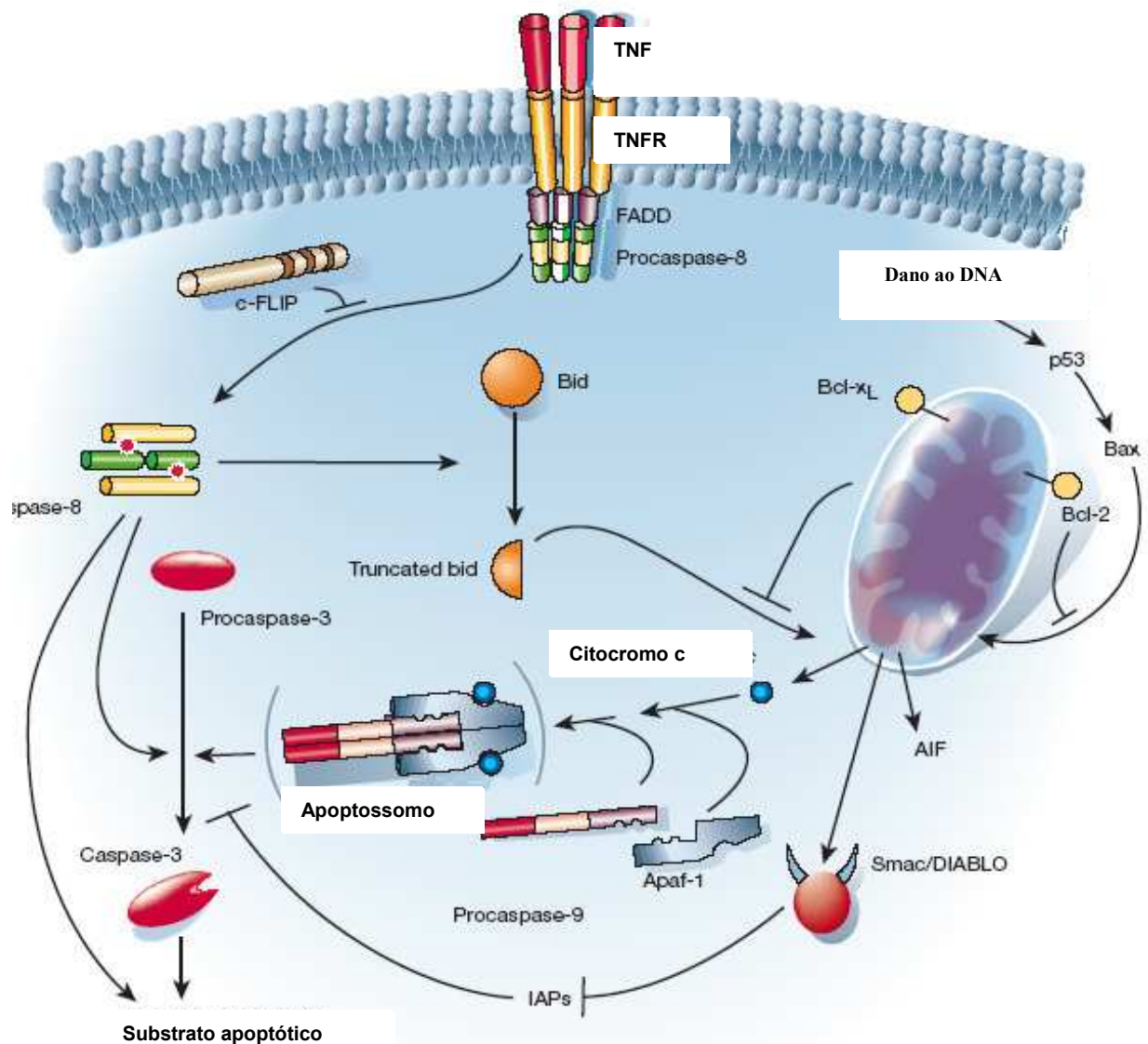


Figura 1: Duas maiores vias de apoptose em células de mamíferos adaptado de HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. Nature, v. 407, n. 1, p. 685-687, 2000. A ligação do TNF ao TNFR induz a formação do complexo de sinalização indutor de morte DISC, o complexo recruta via FADD, moléculas múltiplas de procaspases-8, induzindo a ativação da caspase-8, que pode ser bloqueada pelo recrutamento de c-FLIP. O mecanismo mitocondrial ocorre através da ativação de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2. Proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas competem para regular a saída de citocromo c. se as pró-apoptóticas vencem, ocorre a liberação de uma série de moléculas do compartimento mitocondrial, principalmente citocromo c, que se associa ao APAF-1 e a procaspase-9 para formar o apoptossomo. O mecanismo de receptor de morte e o mecanismo mitocondrial convergem para a ativação da caspase-3. A ativação da caspase-3 é antagonizada pelas IAPs, que são antagonizadas pela proteína Smac/DIABLO liberada pela mitocôndria. A ativação da caspase-3 leva a apoptose da célula e sua eliminação. A sinalização e integração entre o receptor de morte e a via mitocondrial é feita através do Bid, um membro da família de moléculas pró-apoptóticas Bcl-2, a caspase-8 faz a mediação da clivagem da Bid, aumentando a atividade de morte celular, resultando na sua translocação para a mitocôndria, onde irá promover a liberação do citocromo c. Na maior parte das vezes, esta integração é mínima, e os dois mecanismos ocorrem independentemente um do outro.

A renovação celular e morte celular podem parecer opostas, porém estão inexoravelmente ligados ao tecido ósseo, acoplados e balanceados tão fortemente como a reabsorção e formação óssea. Depois que os osteoclastos param a reabsorção óssea, eles morrem por apoptose e são realmente removidos por fagócitos (HUGHES; BOYCE, 1997).

Durante o longo período de vida dos osteoblastos ocorrem muitas mudanças, quando completam sua síntese óssea e se movem para a linha cementária, eles gradualmente se achatam. Alguns osteoblastos se tornam células de superfície e algumas se tornam osteócitos. Mas 65% dos osteoblastos originalmente agregados no sítio de remodelação não podem realizar nenhum dos dois caminhos, existem indícios de que estes osteoblastos morrem por apoptose durante seu exercício de preencher a cavidade deixada pelo processo de reabsorção. Este balanço entre a proliferação celular e apoptose determina a prevalência de osteoblastos e osteoclastos. A apoptose de osteócitos aumenta com a idade, entretanto os mecanismos pelos quais a apoptose de osteócitos afeta o processo de remodelação óssea ainda não é claro (WEINSTEIN; MANOLAGAS, 2000). Aparentemente pequenas mudanças na apoptose de osteoblastos pode resultar em maiores mudanças na formação óssea (JILKA et al., 1998).

2.3 Propriedade biomecânica dos ossos

O esqueleto tem funções mecânicas e dinâmicas fundamentais no corpo. Estas funções são responsáveis pela sustentação da massa corporal, proteção das solicitações externas, locomoção, além de repositores de cálcio e de células. Pode-se

considerar o esqueleto com um sistema mecânico que suporta cargas e é submetido a um conjunto complexo de forças que causam deformações em suas partes. Algumas características ósseas como densidade e resistência mecânica são importantes para avaliação do tecido ósseo (LIND et al., 2001). Na avaliação da qualidade óssea deverá ser considerada não somente densidade óssea e marcadores bioquímicos de *turnover* ósseo, mas também as propriedades mecânicas.

Vários fatores, incluindo o *turnover* ósseo, microarquitetura óssea, mineralização, pequenos danos ao tecido ósseo, estrutura colagenosa e mineral contribuem para a força do osso, demonstrando a natureza multifatorial da força óssea (FRIEDMAN, 2006).

Ossos osteoporóticos têm menor capacidade de suportar estresse e são mais suscetíveis a fraturas traumáticas e não traumáticas. Inúmeras condições clínicas resultam na redução de força óssea e aumento de fraturas, por exemplo, a deficiência de estrogênio na mulher na pós-menopausa e a terapia com uso de GCs (FRIEDMAN, 2006). Os GCs determinam atrofia e diminuição de força muscular, o que seria um estímulo a menos para a formação óssea, comprometendo as funções mecânicas fundamentais à manutenção do tecido ósseo (SAMBROOK; LANE, 2001).

O melhor ensaio a ser realizado é aquele em que se pode simular principalmente a maior força a ser solicitada quando em atividades normais. Por exemplo, na tíbia e fêmur, os esforços principais atuantes são os de compressão e

de flexão; portanto, deve-se procurar realizar os ensaios utilizando estes tipos de esforços, o ensaio de flexão a três pontos tem a vantagem de ser simples, facilitar a medida de deformação causada pela carga. Os ensaios de flexão são importantes na biomecânica, pois fornecem parâmetros fundamentais das propriedades mecânicas dos ossos como a rigidez e a resiliência (BARBOSA, 2009).

2.4 Osteoporose

A osteoporose é caracterizada por um distúrbio osteometabólico, que causa diminuição de massa óssea e deteriorização da sua microarquitetura, levando a fragilidade óssea e aumentando o risco de fraturas (figura 2) (HARA et al., 2001; DERVIS, 2005). Hirai et al. (1993) e Li; Nishimura (1994) ressaltaram que na osteoporose existe diminuição da massa óssea, porém sem alteração da composição química do osso. Não há evidências na literatura de que a perda de massa óssea, isoladamente, cause qualquer sintoma, geralmente a morbidade da osteoporose surge quando os pacientes apresentam fraturas. Por isso é denominada “epidemia silenciosa” ou “ladra silenciosa” (SZEJNFELD, 2000).

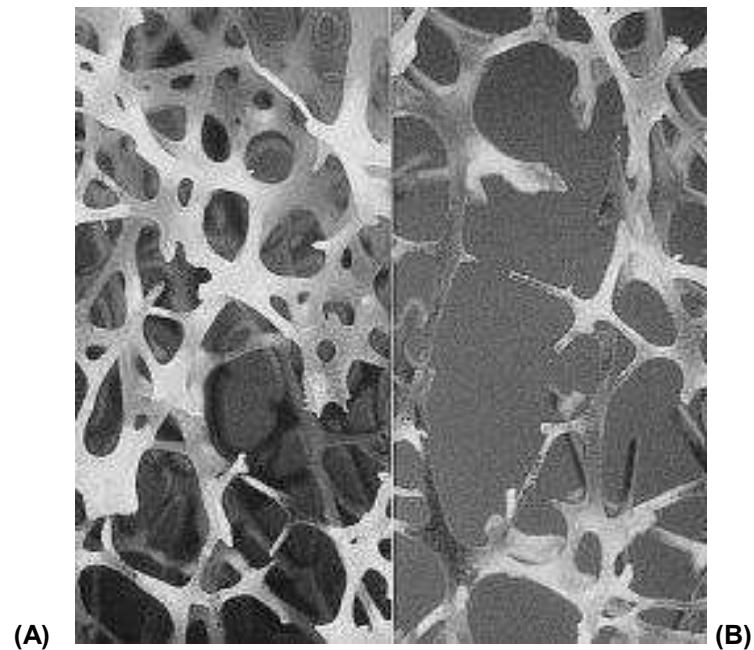


Figura 2: Osso com aspecto normal (A) e osteoporótico (B). Fonte: IOF - International Osteoporosis Foundation: <http://www.iofbonehealth.org>

Com intuito de obter uma definição quantitativa para diagnóstico clínico, a partir de 1994, a Organização Mundial de Saúde definiu osteoporose e osteopenia pela avaliação densitométrica, considerando o grau de perda da massa óssea em desvios padrão abaixo da média dos adultos jovens. Os indivíduos que possuem valores de densidade mineral óssea (DMO) entre 1 a 2,5 desvios padrões inferiores ao valor médio de adultos jovens normais apresentam osteopenia. Já os indivíduos em que a DMO é maior que 2,5 desvios padrões abaixo desta média devem ser considerados com osteoporose, e naqueles cujo valor for maior que 2,5 desvios padrões abaixo da média e for acompanhado de uma ou mais fraturas apresentam um quadro de osteoporose grave ou estabelecida (NETO et al., 2002).

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. Já a osteoporose secundária é atribuída a várias condições clínicas e ou medicamentosas (PEREIRA, 2000).

A osteoporose primária tipo I 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 fratura e colapso das vértebras, fratura de Colles (extremidade distal do rádio) e perda de dentes (CARRENO; BARBOSA; PEREIRA, 2002). A perda óssea pós-menopausa ocorre devido à maior atividade osteoclástica e também devido ao decréscimo da concentração plasmática de estrógeno. Há ainda perda óssea associada com a idade em ambos os sexos, o que resulta em osteoporose senil, esta ocorre devido ao decréscimo na atividade osteoblástica (JOHNELL, 1996).

A osteoporose primária tipo II (senil) é vista em mulheres e homens idosos, aos 75 anos ou mais, predominando a osteopenia cortical e resultando primeiramente em fraturas do colo do fêmur, úmero, tíbia e pelve. Ambas as formas geralmente apresentam longos períodos de latência antes dos sintomas e complicações, apresentando algumas vezes como manifestação inicial dor aguda no dorso, devido à fratura por compressão de uma vértebra torácica ou lombar, podendo ser precipitada por atividades rotineiras (SZEJNFELD, 2000).

A osteoporose secundária refere-se à osteopenia associada a vários distúrbios e condições clínicas como uso de fármacos, hipertireoidismo, imobilizações, quimioterapia, entre outros, que resultam em perda óssea (CARRENO; BARBOSA; PEREIRA, 2002). Dentre os medicamentos que quando usados por períodos prolongados, podem causar perda de massa óssea, podem-se citar os GCs, anticonvulsivantes, heparina, ciclosporina A, etanol e outros (SZEJNFELD, 2000; NETO et al., 2002).

2.5 Epidemiologia e fatores de risco na osteoporose

Existe uma grande dificuldade em estabelecer a incidência e a prevalência da osteoporose no mundo, principalmente pelos problemas encontrados com a definição e o diagnóstico da doença. Entretanto, estima-se que a osteoporose afete 75 milhões de pessoas na Europa, Estados Unidos e Japão. Somente nos Estados Unidos e Europa ocorrem 2,3 milhões de fraturas osteoporóticas a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Nos Estados Unidos os custos com esta doença ultrapassam 15 bilhões de dólares anualmente. A fratura mais séria associada à osteoporose é a de quadril. Ocorrem 300.000 fraturas de quadril anualmente neste país, destes 25% dos pacientes morrem antes de um ano, 50% nunca se recuperam totalmente e 25% precisam de cuidados médicos especiais em casa. As conseqüências das fraturas para o paciente são o aumento da morbidade, dor, redução da expectativa de vida independente e redução de qualidade de vida (BAYLINK, 2000; BLACK et al., 2002, BRIXEN; ABRAHAMSEN; KASSEM, 2005).

A osteoporose é três vezes mais comum em mulheres que em homens, parcialmente porque o homem tem maior pico de massa óssea, e também devido às mudanças hormonais advindas da menopausa que ocorrem na mulher. Além disso, as mulheres vivem mais que os homens, e têm grande perda de massa óssea durante a vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Estima-se que 40-47% das mulheres, entre 45 e 50 anos, têm chance de sofrer uma fratura osteoporótica durante o restante da sua vida (BRIXEN; ABRAHAMSEN; KASSEM, 2005).

Felsenberg et al. (2005) afirmaram que existe aumento significativo do risco de fraturas na osteoporose, principalmente as das vértebras, que são geralmente as que ocorrem primeiro. Dependendo da sua gravidade pode apresentar dor substancial nas costas, cifose, perda de peso e redução da qualidade de vida. Mulheres que têm fratura vertebral apresentam maior risco de morte prematura. Nos pacientes mais velhos, ocorre perda significativa de altura e cifose torácica, que são sinais clássicos de osteoporose vertebral (CARVALHO, 2006).

Os fatores de risco que influenciam a manifestação da osteoporose podem ser relativos à pessoa (individual) ou ao ambiente que ela vive (ambientais). Os fatores de risco individuais são aqueles relacionados com a história familiar de osteoporose, mulheres brancas e asiáticas, menopausa precoce, baixo peso e indivíduos acima dos 50 anos (NETO, 2002; MELLO, 2003).

Já os fatores ambientais são representados pelo tabagismo, alcoolismo, sedentarismo, imobilização prolongada, dieta pobre em cálcio e a presença de algumas doenças como: hipercortisolismo, hiperparatireoidismo, hipertireoidismo,

acromegalia, neoplasias do sistema hematopoético, homocistenúria; hemocromatose e doenças reumáticas inflamatórias (NETO, 2002).

2.6 Osteoporose induzida por glicocorticóides

Os GCs são antiinflamatórios esteroidais amplamente utilizados para diversas finalidades médicas, tais como doenças auto-imunes, asma, doenças do colágeno e doença renal crônica. Foi demonstrado que drogas antiinflamatórias como os GCs são capazes de suprimir a proliferação celular e induzir a apoptose em diferentes tipos de células, afetando principalmente o ciclo celular e os fatores pró-apoptóticos (WEINSTEIN et al., 1998; ZHANG et al., 2000; CORROYER et al., 2002), e dessa forma, diminuem a formação óssea podendo causar a osteoporose. Um dos mecanismos responsáveis pela indução de osteoporose pelos GCs seria a indução prematura de apoptose das células osteoblásticas e de osteócitos (WEINSTEIN, 1998). Trinta a 50% dos pacientes expostos a excessos de GCs podem sofrer fraturas devido à osteoporose secundária ao uso deste medicamento (SHAKER; LUKERT, 2005).

A fisiopatologia da osteoporose induzida por GCs, ainda não está bem estabelecida, dependendo de múltiplas ações, locais e sistêmicas, que determinam o aumento da reabsorção e diminuição da formação óssea. A proporção de formação e reabsorção óssea é determinada pelo número de células formadoras de osso (osteoblastos) e células de reabsorção óssea (osteoclastos) responsáveis pela regeneração do tecido ósseo adulto (MANOLAGAS, 2000). A longa exposição aos GCs ou as altas doses deste medicamento causam apoptose dos osteoblastos e

osteócitos, diminuição da proliferação e diferenciação osteoblástica, conseqüentemente decréscimo significativo na formação óssea (LECLERC et al., 2004, OLKKU et al., 2004).

Já foi demonstrado que após o uso de GCs, a histomorfometria é capaz de mostrar diminuição do volume ósseo total com afinamento das trabéculas ósseas, redução de proliferação e função osteoblástica (SZEJNFELD, 2000; LUCINDA et al., 2010b).

As células ósseas apresentam receptores para GCs e estes esteróides endógenos são importantes para diferenciação e função destas células. Porém em doses farmacológicas e por longo prazo, os GCs podem alterar a atividade das células ósseas, favorecendo a perda de massa óssea (LANNA; MONTENEGRO Jr.; PAULA, 2003).

Entretanto, alguns pacientes tratados com GCs apresentam a densidade mineral óssea normal, o que indica que alguns indivíduos podem ser resistentes aos efeitos osteopênicos dos GCs. Teoricamente isto é possível porque há polimorfismo no receptor de glicocorticóide, o que poderia resultar em diferentes graus de sensibilidade a esses hormônios. Mas há pouca evidência clínica de que isso tenha alguma importância prática (REID, 2000).

Sabe-se que a osteoporose induzida por glicocorticóide ocorre em duas fases: uma rápida, mais precoce, na qual há reabsorção excessiva de osso: e uma mais

lenta, fase progressiva na qual a densidade mineral óssea declina pela diminuição na formação óssea (MAZZIOTI et al., 2006).

O efeito inicial causado pelos GCs é a rápida perda óssea devido diretamente a ativação dos osteoclastos. Os GCs podem modular a atividade dos osteoclastos: a curta exposição aos GCs induz aumento no número e na atividade dos osteoclastos, assim como o declínio na apoptose dessas células e aumento de sua vida média (WEINSTEIN, 2001; BUXTON; YAO; LANE, 2004). Esses medicamentos atuam também sobre a atividade e diferenciação do osteoblasto estimulando a síntese de RANKL (“receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand”/ receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante) e G-CSF (“granulocyte-colony stimulating factor”/ fator estimulador de colônias granulocitárias), diminuindo a expressão de osteoprotegerina, aumentando, assim, a atividade absorptiva. Os GCs diminuem os níveis séricos de osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e pró-colágeno I, alterando os mecanismos responsáveis pela regulação da reparação óssea (CANALIS; AVIOLI, 1992; BUXTON; YAO; LANE, 2004; GREGÓRIO, 2005).

A partir dos relatos anteriores torna-se claro que o tratamento com os GCs têm um efeito profundo nos osteoblastos promovendo a apoptose dessas células. Entretanto, não é raro que a redução na osteoblastogênese seja acompanhada de decréscimo na produção de osteoclastos e aumento no tecido adiposo presente na medula óssea, considerando que existe uma interligação entre osteoblastogênese e osteoclastogênese (KARSDAL; HENRIKSEN, 2007) e também uma origem comum das células tronco pluripotentes de osteoblastos e adipócitos. Os GCs são capazes de aumentar a expressão de PPAR- γ 2 (“peroxisome-proliferator-activated receptor

γ_2 receptores ativadores de proliferação do peroxissomo γ_2), que é o fator transcricional para diferenciação de adipócitos, levando ao aumento da adipogênese. Além de os Gcs causarem também diminuição da expressão de Cbfa-1, que é o fator transcricional essencial para a diferenciação osteoblástica (SHI et al., 1999; TAMURA; OKINAGA; TAKAMI, 2004). Demonstrado mais um mecanismo pelo qual os GCs reduzem os osteoblastos e aumentam a adipogênese.

De acordo com os autores citados, nosso estudo prévio com indução de osteoporose através do uso de GCs mostrou diminuição do percentual ósseo trabecular do fêmur, do percentual ósseo alveolar mandibular e aumento de células adiposas na medula óssea (figura 3) (LUCINDA et al., 2010b).

Além desses efeitos relatados anteriormente sobre as células ósseas, os GCs também aumentam a excreção de cálcio renal e diminuem sua reabsorção intestinal. No intestino o transporte transcelular do cálcio e a síntese de suas proteínas ligantes ficam diminuídos (PATSCHAND; LODDENKEMPER; BUTTGEREIT, 2001) e nos rins eles diminuem a reabsorção renal do cálcio filtrado no glomérulo (MANELLI; GIUSTINA, 2000).

O balanço negativo de cálcio devido às mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal é responsável pelo hiperparatireoidismo secundário em pacientes tratados com GCs (REID, 2000).

Em relação aos hormônios sexuais, os GCs são capazes de inibir a secreção de gonadotrofinas pela hipófise, bem como de estrogênios e testosterona pelas

gônadas. Como esses hormônios diminuem a reabsorção óssea, a sua falta pode representar mais um fator que leva ao desequilíbrio do processo de reabsorção e formação, desencadeando a osteoporose (SZEJNFELD, 2000; MANELLI; GIUSTINA, 2000).

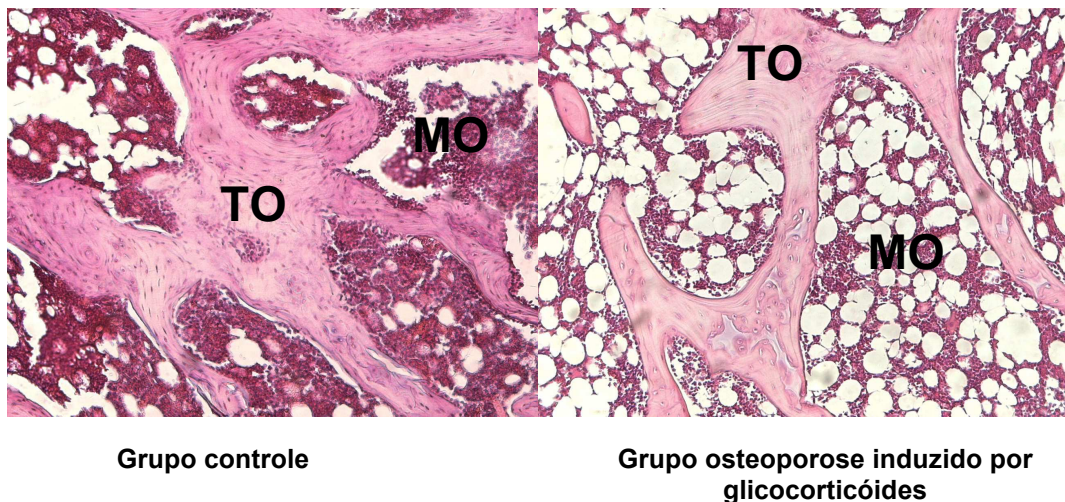


Figura 3: Imagem histológica da epífise femoral de ratos Wistar do grupo controle e grupos osteoporose induzido por GCs (H&E; 25X aumento original). TO= trabécula óssea; MO= medula óssea. Houve redução significativa de percentual ósseo trabecular, aumento da região da MO acompanhada de aumento de tecido adiposo nos animais osteoporóticos. Fonte: Lucinda et al. Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with Ginkgo biloba extract: A histomorphometric study of mandible and femur. *Fitoterapia*, v. 81, n. 8, p. 982-987, 2010.

2.7 Estrogênio causa inibição da apoptose de células ósseas induzida pelos glicocorticóides

A maioria dos efeitos dos hormônios esteroidais sobre a apoptose de osteoblastos indica que o estrogênio pode ser importante em inibir a apoptose e aumentar a vida média dos osteoblastos (PLOTKIN et al., 2005).

A deficiência de estrogênio que ocorre na mulher pós-menopausa leva ao descontrole das citocinas regulatórias locais da medula óssea, levando ao aumento indesejável na remodelação óssea (IMAI et al., 2009). O aumento IL-1, IL-6 e TNF,

depois da deficiência de estrogênio, leva ao aumento do número de osteoblastos e osteoclastos, causando aumento do *turnover* ósseo. Conseqüentemente ocorrem mudanças na qualidade do tecido ósseo: osteoclastos produzem cavidades erosivas maiores do que o normal, que resultam em perda da densidade mineral óssea, devido à reabsorção óssea rápida. Este aumento no processo erosivo é feito pela deficiência de estrogênio, que leva a maior sobrevivência de osteoclastos (WEINSTEIN. MANOLAGAS, 2000). O estrogênio facilita a expressão do gene FasL em osteoclastos via receptor α de estrogênio controlando a morte celular através da apoptose (NAKAMURA et al., 2007).

Glicocorticóide e estrogênio parecem ter efeitos opostos sobre a sobrevivência celular, osteoblastos têm receptores de estrogênio e GCs que podem diretamente modular a genética osteoblástica, o estrogênio pode ser capaz de inibir a apoptose induzida por GCs no osso. Já os GCs reduzem os níveis de Bcl-2 e aumentam os níveis da Bax em cultura de células osteoblásticas, levando ao decréscimo na proporção de Bcl-2 e Bax, o que está envolvido na regulação da apoptose (GOHEL; McCARTHY; GRONOWICZ, 1999). A Bcl-2 protege as células da apoptose se ligando às proteínas pró-apoptóticas como a Bax. Quando os níveis de Bcl-2 são baixos e ou os níveis de Bax são altos, a célula entra em apoptose (REED; JURGENSMEIER; MATSUYAMA, 1998).

A administração de 17β estradiol foi capaz de reduzir a expressão de Bax e a apoptose de osteoblastos na osteoporose induzida por glicocorticoides (GOHEL; McCARTHY; GRONOWICZ, 1999). Pode-se sugerir, portanto que compostos como os fitoestrógenos possam ser importantes na prevenção da apoptose de

osteoblastos induzida pelos glicocorticoides, uma vez que são componentes não-esteroidais derivados de plantas, com estrutura química extremamente similar ao estrógeno dos mamíferos, e que se ligam aos receptores de estrogênio.

2.8 Prevenção e tratamento da osteoporose

O principal tratamento da osteoporose é a prevenção. Elementos importantes para o pico de massa óssea e a diminuição da reabsorção são necessários para o controle desta doença. O pico de massa óssea é dependente do aporte calórico, da ingestão de cálcio e vitamina D, da função menstrual normal e da atividade física. A maioria dos agentes terapêuticos atua na reabsorção óssea, como os antireabsortivos (MELLO, 2003).

Nos países em que os habitantes têm alta incidência de fraturas, o aumento na dieta de vitamina D e cálcio na população idosa pode ser efetivo em diminuir o risco de fraturas. Há evidências de que algumas recomendações sobre estilo de vida podem auxiliar na redução do risco de fraturas. Dentre elas o aumento da atividade física, redução da ingestão de sódio, aumento do consumo de frutas e vegetais; manutenção do peso corporal, evitar o tabagismo e limitar o consumo de álcool (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Em relação ao tratamento medicamentoso da osteoporose, vários medicamentos são utilizados no seu controle e prevenção:

a) Moduladores seletivos dos receptores de estrógeno

Os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno são agentes farmacológicos não hormonais que se ligam aos receptores de estrógeno resultando em efeito agonista estrogênico sobre o osso e o sistema cardiovascular, e efeito estrogênico antagonista sobre o endométrio e tecido mamário. Dessa forma constituem alternativa para a estrogenoterapia em pacientes com câncer ou de alto risco para neoplasia maligna da mama. Essas drogas apresentam importante papel na expressão de fatores de crescimento e de citocinas sintetizadas e secretadas pelos osteoblastos e osteoclastos. Esses mediadores celulares possuem grande influência sobre o equilíbrio funcional das células ósseas, determinando um controle autócrino e parácrino da remodelação óssea (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994).

As drogas mais usadas são o raloxifeno e tamoxifeno. O raloxifeno, o mais moderno entre os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno, se liga ao receptor de estrógeno, provocando alteração conformacional na sua estrutura, sua dimerização e associação com elementos de resposta do DNA, sendo inclusive descritos sítios de ligação do DNA e receptores para o Raloxifeno, distintos dos estrógenos. Este produto, por apresentar conformação específica em receptores alfa de estrogênio, tem propriedade agonista sobre a massa óssea e antogonista sobre útero e mama (RUSSO, 2001). Ele ainda ativa o gene que codifica o fator de crescimento beta, o qual junto com outras citocinas induz a diferenciação de osteoblastos e inibe e encurta a vida média dos osteoclastos. Dessa forma o raloxifeno suprime o *turnover* ósseo e preserva a densidade óssea (DELMAS et al., 1997).

Os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno são contra-indicados em poucas situações. Dentre estas contra-indicações está a tromboflebite em fase aguda (RUSSO, 2001).

b) Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos, análogos sintéticos do pirofosfato, são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos, e ainda podem aumentar a formação óssea. Hoje em dia, muitos agentes estão disponíveis para o tratamento da osteoporose, mas os mais prescritos são os bisfosfonatos. O primeiro bisfosfonato usado clinicamente foi o etidronato (ROSEN; KESSENICH, 1997).

A primeira geração de bisfosfonatos inclui o etidronato e o clodronato, que são inibidores fracos da reabsorção óssea. Os compostos de segunda geração incluem pamidronato, alendronato, e ibandronato, sendo que o nitrogênio contido nestes bisfosfonatos de segunda geração é o responsável pela sua maior potência em relação aos de primeira geração.

O mecanismo de ação dos bisfosfonatos pode estar relacionado à sua capacidade de se fixarem na matriz óssea, pois apresentam uma alta afinidade na ligação aos cristais de hidroxiapatita. Os bisfosfonatos são internalizados pelos osteoclastos, alterando a permeabilidade dos osteoclastos ao cálcio. É possível que as alterações de permeabilidade da membrana acarretem as mudanças estruturais que são observadas na borda em escova e no citoesqueleto dos osteoclastos,

diminuindo sua atividade reabsortiva. Os bisfosfonatos também parecem aumentar a morte celular dos osteoclastos (HUGHES et al., 1995; ROGERS; RUSSEL; WATTS, 2002). Independente do mecanismo de ação, o resultado final é a redução da atividade osteoclástica e diminuição da profundidade das lacunas de reabsorção.

A meia-vida dos bisfosfonatos de uso oral ou injetável é pequena (20 a 120 minutos), sendo relacionado em parte, à sua retenção esquelética, que varia entre 20 e 60%. Embora sua meia-vida seja pequena, o tempo de permanência no organismo e nos ossos é longo, podendo durar 10 ou mais anos, dependendo do tempo de remodelação óssea. A sua longa meia-vida no esqueleto acarreta efeito terapêutico mais prolongado em pacientes com osteoporose (ÅKESSON, 2003).

O uso de ibandronato oral, um bisfosfonato de segunda geração, diariamente demonstrou redução significativa do risco relativo de fraturas vertebrais de grande severidade em menos de um ano do início do tratamento (FELSENBERG et al., 2005).

Altundag et al. (2005) propuseram que o uso do bisfosfonato em mulheres pós-menopausa além de tratar a osteoporose, pode inibir a ocorrência de microcalcificações que se formam no tecido mamário.

O alendronato de sódio é um bisfosfonato de segunda geração muito prescrito atualmente, os benefícios adquiridos com o alendronato persistem por tempo prolongado. Tonino et al. (2000) realizaram um estudo prospectivo por sete anos, no qual foram acompanhadas mulheres osteoporóticas na pós-menopausa que faziam

uso de alendronato de sódio, na dose de 10mg ou 5mg diariamente. Após os primeiros 18 meses de tratamento a densidade mineral óssea dessas mulheres aumentou na proporção de 0,8% ao ano para a dose de 10mg e 0,6% ao ano para a dose de 5mg. Neste estudo foi observado também que após algum tempo de uso, os pacientes que interromperam a medicação não perderam massa óssea de forma mais acelerada, enquanto que o tratamento prolongado nestas pacientes trouxe mais benefícios para a massa óssea do que o tratamento de curta duração.

Poucos efeitos colaterais com o uso dos bisfosfonatos têm sido relatados, o mais frequente é a intolerância gastrointestinal que ocorre em cerca de 10% dos pacientes após tratamento por via oral com etinodrato ou clodronato em doses de 800mg/dia, e úlceras esofagianas (SZEJNFELD, 2000; ÅKESSON, 2003). Devido a dificuldade em relação a intolerância gastrointestinal e ao fato da baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral, a administração dos bisfosfonatos por via intravenosa tem se tornado mais frequente (ÅKESSON, 2003). Entretanto recentemente tem sido relatado a associação entre bisfosfonatos e osteonecrose na mandíbula, principalmente por via intravenosa. A incidência ainda não está clara, os dados sugerem que 6-10% dos pacientes em terapia intravenosa com bisfosfonatos para tratamento de câncer desenvolveram osteonecrose na mandíbula (SOMERMAN; MCCAULEY, 2006).

c) Cálcio e vitamina D

Com o avançar da idade ocorre declínio na absorção de cálcio por deficiência da vitamina D e ou redução renal da atividade da 1- α hidroxilase (BRIXEN; ABRAHAMSEN; KASSEM, 2005).

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel, que tem como função principal à manutenção da homeostase do cálcio e fósforo no organismo. Tanto o cálcio quanto o fósforo são minerais essenciais ao metabolismo ósseo. A deficiência de vitamina D acarreta redução da absorção de cálcio e conseqüentemente aumenta os níveis de paratormônio, determinando aumento da reabsorção óssea (CARVALHO et al., 2002).

Tanto a vitamina D quanto o cálcio são tratamentos bem tolerados e de baixo custo, o que justifica que a metade dos profissionais prescreva para mulheres com densidade mineral óssea normal, que não fazem uso da terapia hormonal e para pacientes com osteoporose e osteopenia (ROZENBERG et al., 2006).

A suplementação de cálcio e vitamina D geralmente é indicada em situações clínicas específicas, que incluem baixa ingestão ou déficit de absorção pelo trato gastrointestinal. Os análogos da vitamina D representam terapia coadjuvante no tratamento da osteoporose, particularmente em pacientes idosos (NETO et al., 2002).

d) Calcitonina

A calcitonina é um hormônio que consiste de 32 aminoácidos residuais produzido pelas células C da glândula tireóide e está relacionada à manutenção dos níveis normais de cálcio plasmático e à proteção do osso contra desmineralização. A calcitonina inibe a reabsorção óssea pelos osteoclastos e diminui o transporte de cálcio do osso para o sangue e também diminui a reabsorção de cálcio no túbulo renal (BRIXEN; ABRAHAMSEN; KASSEM, 2005). Colpan et al. (2005) relataram que o mecanismo de ação desta medicação sobre o tecido ósseo não está claro, mas ela tem sido usada no tratamento da osteoporose em mulheres pós-menopausa, sendo mais efetiva no tecido ósseo trabecular que no cortical.

Os efeitos colaterais associados ao uso da calcitonina são leves, porém podem causar desconforto suficiente para interromper o tratamento. Náuseas, vômitos, calor e vermelhidão facial são os sinais citados com mais frequência, em aproximadamente 10% dos pacientes (SZEJNFELD, 2000).

e) Terapia de reposição hormonal (TRH)

O uso da TRH tem um papel importante na prevenção da osteoporose em mulheres pós-menopausa. A terapia aumenta a densidade da massa óssea mineral, reduzindo, assim, a proporção do risco de fraturas (ROZENBERG et al., 2006). O tratamento efetivo reduz a morbidade e mortalidade além de aliviar os sintomas do climatério (STEVENSON, 2005).

Apesar dos benefícios da TRH, Brixen; Abrahamssen; Kassem (2005) relataram como seus possíveis efeitos colaterais o aumento no risco de câncer de

mama, eventos tromboembolíticos e doenças cardiovasculares. Portanto a TRH é contra-indicada para mulheres com desordens tromboembolíticas, câncer de mama, uterino ou sangramento sem causa definida na pós-menopausa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

f) Fitoestrógenos

Os fitoestrógenos são componentes não-esteroidais derivados de plantas, com estrutura química extremamente similar ao estrógeno dos mamíferos, e que se ligam aos receptores de estrógeno. As primeiras evidências do efeito benéfico dos fitoestrógenos nos ossos vêm da observação de que populações que ingeriam altos teores de soja em sua dieta natural apresentavam menores índices de fraturas do colo de fêmur que outras populações que não tinham esse hábito (SOMEKAWA et al., 2001; MEI; YEUNG; KUNG, 2001).

Entre os fitoestrógenos encontram-se os flavonóides. Eles têm atraído muita atenção dos pacientes e da comunidade médica, por seus benefícios como prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes e obesidade, sintomas da menopausa, doença renal e vários cânceres (HOLLMAN; KATAN, 1999; GELEIJNSE et al., 2002; DANG; LOWIK, 2005; DAS et al., 2005).

Muitas das ações biológicas dos flavonóides são atribuídas às suas propriedades antioxidativas (WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004). Uma das formas pelas quais os flavonóides protegem as células é reduzindo o fenômeno de

peroxidação das membranas lipídicas das células, diminuindo assim os radicais livres disponíveis para oxidação (CALVÁRIO, 2003).

Evidências indicam que os flavonóides se ligam aos receptores beta de estrogênio, estimulam *in vitro* a síntese protéica de células da linhagem osteoblástica e seu uso por mulheres na pós-menopausa aumenta a concentração de osteocalcina, refletindo aumento da atividade osteoblástica (MOREIRA, 2004).

Das et al. (2005) estudaram o potencial fitoestrogênico do extrato aquoso de chá preto (*Camellia sinensis*), em ratas ovariectomizadas, como modelo de osteoporose e observaram aumento dos níveis de estradiol no soro destas ratas. O estudo propôs que o extrato aquoso do chá pode ter um componente fitoestrogênico para prevenção da deficiência de estrógeno relacionada com os danos da osteoporose. Do mesmo modo, Dantas et al. (2006) usaram o extrato aquoso de *Onobrychis ebenoides* cujos componentes têm afinidade para se ligar com os receptores de estrógeno. Os resultados mostraram efeito protetor na densidade óssea mineral das tíbias dos animais tratados por três e seis meses, comparados aos animais não tratados. Os dados apresentados demonstraram que os fitoestrógenos podem melhorar a densidade óssea.

A ipriflavona é um flavonóide sintético obtido da daidzeína, que possui efeitos promissores no tratamento da osteoporose (ARJIMANDI et al., 2000), a ipriflavona inibe a perda rápida de massa óssea na menopausa, reduzindo o ritmo do *turnover* ósseo (GENNARI et al., 1998).

g) *Ginkgo biloba*

O *Ginkgo biloba* é uma das mais antigas árvores da terra, com 200 milhões de anos, sendo o único sobrevivente da família Ginkgoaceae, classe Ginkgoatae, nativa da China que tem sido difundida, com finalidade ornamental, para outros países, e é conhecida por sua grande resistência genética, sendo altamente resistente a insetos, microorganismos e toxinas do ambiente (NAKANISHI, 2005). Esta resistência foi provada na cidade japonesa de Hiroshima, uma vez que esta árvore foi a primeira planta a crescer depois da explosão atômica (TESCH, 2003).

As sementes desta planta têm sido usadas na medicina chinesa por mais de 5000 anos para o tratamento da asma, tosse, enurese e leucorréia. As folhas começaram a serem usadas mais tarde, em 1436, para tratar problemas da pele. O uso interno da folha data de 1505 para o tratamento da diarreia (BILIA, 2002).

Atualmente, o *Ginkgo biloba* tem sido muito utilizado na prevenção do envelhecimento, na preservação da memória, na prevenção de doença 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; DONFRACESCO; DELL' UOMO, 2004; HAN, 2005; DEKOSKY et al., 2006; ZHOU et al., 2006). Walesiuk; Trofmiuk; Braszko (2006) relataram que o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) foi efetivo em reduzir os prejuízos causados pelo estresse na função cognitiva. O estresse foi induzido nos ratos pela contenção dos animais e pela injeção de corticoesteróides intramuscular.

Os autores sugerem que o EGb pode se tornar uma alternativa segura e barata para prevenção dos danos causados pelo estresse na função cognitiva.

Existem relatos do uso popular de *Ginkgo biloba* para uma série de doenças, seu uso popular inclui o tratamento da inflamação, alergia (BLUMENTHAL, 2003), e problemas cognitivos (PAGANELLI, BENETOLI, MILANI, 2006).

Portanto, os principais efeitos farmacológicos do EGb são de proteção vascular, tecidual, e melhora na função cognitiva (DIAMOND et al., 2000; DI RENZO, 2000), sendo indicado clinicamente na insuficiência cerebral, doença de Alzheimer e doenças vasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; BLUMENTHAL, 2003; CHAN; XIA; FU, 2007).

O EGb 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. 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 da segurança do seu uso (BILIA, 2002). Entretanto é contra-indicado para pacientes que apresentem alergia a este fitoterápico, bem como para pacientes em uso de anticoagulantes ou a qualquer indivíduo que será submetido a cirurgia, para se evitar hemorragias. O *Ginkgo biloba* pode potencializar a ação de agentes antiplaquetários (aspirina) e anti-coagulantes (warfarina) (BLUMENTHAL, 2003).

O EGb extraído das folhas da árvore de *Ginkgo biloba* tem como composição padrão 24% de flavonóides (kaempferol, quercetina e ishorhamnetina), 6% de terpenóides (ginkgolídeos e bilobalídeos) e menos de 5 ppm de ácido ginkgólicos (BILIA, 2002; OH; CHUNG, 2004; JI et al., 2006).

Os flavonóides presentes no EGb contribuem para sua ação antioxidante, pois reduzem os níveis de radicais livres. Com relação aos terpenóides, os bilobalídeos foram identificados como os responsáveis pelos efeitos protetores em células nervosas e tecido nervoso (CALVÁRIO, 2003). Os ginkgolídeos atuam como antagonistas do fator ativador de plaquetas. Este fator é importante em muitos processos biológicos, entre eles inflamatórios e vasculares (HILLEBRAND; OLIVEIRA, 2004).

Kuribara et al. (2003) estudaram o efeito ansiolítico do EGb e seus componentes terpenóides em camundongos. Neste estudo o EGb demonstrou efeito ansiolítico significativo e, dentre os terpenóides, o ginkgolídeo – A foi o maior responsável por este efeito, o que pode ser alternativa ao tratamento da ansiedade e do estresse. Considerando que o estresse aumenta os níveis de cortisol que, por sua vez, causa danos ao tecido ósseo, o efeito ansiolítico do EGb também poderia ser coadjuvante no tratamento da osteoporose (DENNISON et al., 1999).

Recentemente, Oh; Chung (2004) estudaram a ação estrogênica do EGb e seus componentes *in vitro*, e observaram que este extrato apresentou ação sobre o receptor de estrogênio do subtipo- α e receptor de estrogênio do subtipo- β , demonstrando seu efeito agonista estrogênico. A maior afinidade de ligação do EGb

foi pelo receptor de estrogênio do subtipo- β . O receptor de estrogênio do subtipo- β desempenha importante papel sobre o sistema nervoso central, sistema cardiovascular e sobre o tecido ósseo (ENMARK et al., 1997). A maioria dos efeitos dos hormônios esteroidais sobre a apoptose de osteoblastos indica que estrogênio pode ser importante em inibir a apoptose e aumentar a vida média dos osteoblastos (PLOTKIN et al., 2005). Além dos efeitos agonistas citados, o receptor do subtipo- β contribui para o mecanismo de defesa celular contra a hiperproliferação celular, iniciação e progressão de neoplasias (GUSTAFSSON, 1999).

Essa dupla ação do EGb sobre os receptores de estrogênio do subtipo- α e subtipo- β , sugere que este extrato possa apresentar efeitos agonistas ou antagonistas, dependente do órgão alvo, assim como acontece com os moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (OH; CHUNG, 2004). Assim, inibindo a reabsorção e promovendo a osteogênese, o EGb pode ser uma alternativa ao tratamento da osteoporose (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994).

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 baixo peso corporal desses fetos pode ser devido a um provável efeito estrogênico do extrato.

A quercetina e o kaempferol, que fazem parte da composição do EGb, inibiram a atividade de reabsorção dos osteoclastos e induziram a apoptose dos osteoclastos maduros, quando estudadas *in vitro*. Os osteoclastos tratados com 50 microM de quercetina e kaempferol, tiveram os níveis intracelulares de oxigênio

reativo significativamente diminuídos para 75% e para 25%, respectivamente, indicando que essas moléculas mantêm suas características antioxidativas nesta concentração. Entretanto em concentrações menores que 50 microM, a quercetina e o kaempferol não apresentaram atividade antiradical livre, sugerindo que as propriedades antioxidantes não podem explicar inteiramente o efeito inibitório da reabsorção óssea, já que o kaempferol demonstrou efeitos inibitórios de reabsorção óssea em doses baixas como 0,1 microM. Portanto, outro mecanismo além da atividade antioxidante deve estar envolvido na inibição da reabsorção óssea (WATTEL et al., 2003).

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 flavonóide que apresentou aumento significativo do cálcio na cultura de tecido da diáfise de fêmur de ratos Wistar. O paratormônio aumentou a osteoclastogênese na cultura de células da medula óssea, mas foi significativamente reduzido na presença de quercetina, kaempferol, ishoramnetina, myricetina e curcumina, sugerindo que esses flavonóides podem ser uma alternativa importante na inibição de reabsorção óssea, uma vez que diminuem a formação dos osteoclastos.

O EGb, além dos flavonóides, possui polifenóis 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 osteoblastos possa contribuir para a

alteração de suas funções, por exemplo, diminuindo a efetividade da formação de novo osso, aumentando a perda de massa óssea e levando a necrose dos osteoblastos. Os autores observaram que as propriedades antioxidativas do EGb protegeram os osteoblastos de danos celulares e morte quando expostos a atividade de radicais livres. O mecanismo envolvido pode ser a partir da facilitação do aumento de glicose e concentração de piruvato, os quais levam ao aumento da energia, proliferação e sobrevivência celular. Estes resultados podem ser benéficos na prevenção de doenças como a osteoporose.

Oh; Kim; Chung (2008) estudaram os efeitos estrogênicos do EGb *in vitro* e *in vivo* em ratas ovariectomizadas, uma vez que o estrogênio é importante no processo de osteoblastogênese, entretanto no presente estudo o EGb não foi capaz de restaurar a densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas, mas *in vitro* foi capaz de estimular a diferenciação de células osteoblásticas Saos-2 e atividade antiosteoclástica. Trivedi et al. (2009) avaliaram os efeitos do EGb 761 em ratas ovariectomizadas, foi administrado aos animais $100\text{mg kg}^{-1}\text{ dia}^{-1}$ de EGb através de gavagem durante 5 semanas. Os animais tratados apresentaram aumento significativo da densidade mineral óssea, porém não apresentaram efeito estrogênico agonista no útero. Os níveis de kaempferol e quercetina no soro e na medula óssea, após a administração oral de EGb sugerem que estes flavonóides estejam envolvidos nos efeitos benéficos do EGb sobre o tecido ósseo.

Da mesma forma que os estudos anteriores, nós avaliamos os efeitos do EGb na osteoporose *in vivo*, entretanto o modelo utilizado foi de indução de osteoporose por GCs. Este trabalho foi o primeiro a mostrar os efeitos do EGb na osteoporose

induzida por GCs e ainda seus efeitos na tecido ósseo mandibular. Foram avaliadas através de radiografias digitais que animais do grupo osteoporose apresentaram redução de suporte ósseo e o EGb causou aumento significativo do suporte ósseo periodontal mandibular nestes animais (LUCINDA et al., 2010a), além disso, observou-se aumento do percentual ósseo trabecular do fêmur e do tecido ósseo alveolar mandibular nos animais tratados com EGb (LUCINDA et al., 2010b).

A partir dos efeitos positivos do EGb relatado nos trabalhos anteriores, deve-se buscar os mecanismos que elucidem a atuação deste extrato no tecido ósseo.

3 Hipótese

A administração do EGb inibe a apoptose de células osteoblásticas, aumenta a densidade mineral óssea e a resistência óssea em ratas Wistar com osteoporose induzida por GCs.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do EGb sobre o processo de apoptose de células osteoblásticas, densidade mineral óssea e resistência óssea de ratas Wistar com osteoporose induzida por glicocorticóide.

4.2 Objetivos específicos

Em ratas com osteoporose induzida por GCs e tratadas com EGb, realizar:

- a) Avaliação de fatores pró-apoptóticos Bax e anti-apoptóticos Bcl-2.
- b) Avaliação de marcador sorológico fosfatase alcalina óssea.
- c) Avaliação da densidade mineral e radiográfica da tíbia.
- d) Avaliação biomecânica da tíbia.

5 Material e métodos

5.1 Animais

Foram utilizadas 60 ratas Wistar, com 50 dias de idade, pesando entre 100 - 150g, obtidas na colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução - Universidade Federal de Juiz de Fora.

5.1.1 Condições de alojamento

Todos os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, cobertas com camas de maravalha selecionadas (não esterilizada), dotadas de cocho para ração do tipo peletizada e local para mamadeira com água filtrada. Cada gaiola continha três animais, que foram mantidos em armários climatizados (ALESCO), localizados em alojamento com regime de luz de 12h claro / 12h escuro, controlado automaticamente.

5.2 Extrato de *Ginkgo biloba* (EGb)

O EGb foi adquirido da China (lote nº 20091112) pela empresa JR Pharma, localizada na cidade de Juiz de Fora, MG. O EGb tinha em sua composição química: 28,2% de ginkgoflavanoglicosídeos, 8,3% de terpenolactonas, 15% de glicosídeos quercetina, 10,9% de glicosídeos Kaempferol, 2,3% de glicosídeos isorhamenitina e menos de 5 ppm de ácidos Ginkgólicos. A diluição do extrato aquoso de *Ginkgo*

biloba foi preparada pelo Prof. Dr. João Evangelista de Paula Reis, de modo a conter em 1ml de água destilada a dose do fitoterápico a ser administrado a cada animal por dia (Pinto et al., 2007; LUCINDA et al., 2010a,b).

5.3 Alendronato de sódio

A solução de alendronato de sódio (Índia - lote nº AS/004/08/2008-050309 A) foi adquirida pela JR Pharma, localizada na cidade de Juiz de Fora, MG. A solução foi preparada pelo Prof. Dr. João Evangelista de Paula Reis, de modo a conter em 1ml de água destilada a dose do medicamento a ser administrado a cada animal por dia (LUCINDA et al., 2010a,b).

5.4 Procedimento experimental

5.4.1 Indução de osteoporose

A indução da osteoporose consistiu na administração de dexametasona (fosfato dissódico de dexametasona – 4mg/ml, ampola 2,5 ml), por via intramuscular, na dose de 7mg/Kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas. Após a indução de osteoporose as ratas foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos de 12 animais cada, seis animais de cada grupo foram tratados por 20 dias e os seis restantes foram tratados por 30 dias. Os grupos experimentais foram:

1- Osteoporose

2- Alendronato (alendronato de sódio - fármaco de referência do mercado 0,2mg/animal/dia por via intragástrica)

- 3- EGb 1 (*Ginkgo biloba* L. 28mg/Kg/dia por via intragástrica)
- 4- EGb 2 (*Ginkgo biloba* L. 56mg/kg/dia por via intragástrica)
- 5- Controle (não submetido a qualquer tratamento ou indução)

Após o término do tratamento, ao 21^o e 31^o dia, seis animais de cada grupo foram eutanasiados por exsanguinação total sob anestesia - Ketamina e Xilazina (via intra-peritoneal) nas doses de 180 mg/kg e 10mg/Kg, respectivamente.

5.4.2 Coleta do material para análises

Foram coletados 5ml de sangue através de punção cardíaca, para avaliação da fosfatase alcalina óssea, utilizando o ensaio Access Ostase (Beckman access, Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA).

Logo após a eutanásia dos animais, foi realizada a dissecação do fêmur, tomando cuidado de se manter a região epifisária, tíbia e mandíbula.

A mandíbula e o fêmur direitos foram utilizados para a análise imunohistquímica, e a tíbia direita foi reservada para avaliação de densidade mineral óssea e radiográfica, assim como para o teste biomecânico.

A mandíbula e o fêmur foram fixados em formaldeído tamponado à 4%, durante 24 horas para fixação e em seguida foram descalcificados em solução aquosa a 5% de ácido nítrico por dois dias. Após a descalcificação os ossos foram lavados em água corrente por 24 horas. Posteriormente os ossos foram

desidratados em uma série crescente de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%) e diafanizados em xilol para posterior impregnação em parafina.

Foram obtidos cortes longitudinais de cada fêmur, de cinco micrômetros de espessura, e cortes frontais de cada mandíbula, com a mesma espessura, em micrótomo histológico rotativo Microm HM 340E (Walldorf, Germany) dotado de navalha descartável. Logo após, os cortes foram montados sobre lâmina de vidro silanizadas.

Nas tíbias foram removidos o tecido mole, em seguida foram pesadas, identificadas e envolvidas em gaze umedecida em solução fisiológica e conservadas em freezer a -20° C. Para avaliação da densidade mineral óssea, densidade radiográfica e ensaio mecânico as tíbias foram retiradas do freezer e mantidas em refrigerador comum por 24 horas. Em seguida permaneceram em temperatura ambiente, até atingir o equilíbrio térmico quando foram analisadas.

5.4.3 Silanização das lâminas

No procedimento de silanização foram utilizados acetona (99,5%) e silano [Tris(trimethylsilyl)silane 97%]-Sigma-Aldrich. O silano foi diluído em acetona (99,5%) para a obtenção de uma solução final de silano na concentração de 6%.

Durante o processo de silanização, as lâminas novas foram imersas em acetona (cuba 1) por dois minutos, o excesso foi removido, posteriormente foram imersas em solução de silano a 6% por dois minutos (cuba 2) e finalmente foram

mergulhadas quatro vezes em solução de acetona (cuba 3). Em seguida foram levadas para secagem em estufa a 37^o C por 24 horas e guardadas em caixas vedadas.

5.4.4 Imunohistoquímica

O método imunohistoquímico realizado utilizou o anticorpo monoclonal de camundongo IgG_{2b} Bax (B-9) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) que detecta aminoácidos 1-71 de Bax α de camundongos e anticorpo monoclonal de camundongo Bcl-2 (C-2) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) que detecta aminoácidos 1-205 de Bcl-2 de origem humana. Os cortes foram montados em lâminas silanizadas e levados a estufa a 60^o C por um período de 10 a 15 minutos, em seguida os cortes foram submetidos à desparafinização em xilol, com três banhos de três minutos cada, e passagens sucessivas pelo etanol (100%, 90% e 70% por aproximadamente três minutos em cada) e três banhos em água destilada.

As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato 0,05 M, pH 6,0 em banho-maria na temperatura de aproximadamente 96^o C por 40 minutos, seguiu-se um período de aproximadamente 20 minutos para o resfriamento das lâminas. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em PBS ("Phosphate Buffered Saline"/solução tampão fosfato) com três trocas de cinco minutos cada.

Posteriormente foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% durante 10 minutos, seguida de três lavagens em

PBS por cinco minutos cada. Seguiu-se a incubação com o anticorpo primário monoclonal Bax na diluição de 1:500 (a diluição foi feita em 1,5% de soro de bloqueio) e da mesma forma as amostras foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal Bcl-2 na diluição de 1:50 (a diluição foi feita em 1,5% de soro de bloqueio) na temperatura 4° C *overnight*. As lâminas foram lavadas em PBS com três trocas em intervalos de cinco minutos.

O sistema de detecção utilizado foi o complexo avidina-biotina-peroxidase ABC (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Em seguida foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado, aproximadamente 1µg/ml, por 30 minutos em temperatura ambiente, logo foram lavadas em PBS com três trocas de cinco minutos cada. A seguir foram incubadas com o complexo enzimático avidina-biotina por 30 minutos em temperatura ambiente. Lavadas em PBS em três trocas de cinco minutos cada. E finalmente incubadas com o substrato peroxidase, de cinco a 10 minutos em temperatura ambiente, posteriormente foram lavadas em água deionizada por cinco minutos. Foram contra coradas com hematoxilina de Mayer por dois minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos, desidratadas em etanol (100%, 90%, 70%), passadas em três banhos de xilol e montadas para leitura.

A especificidade da reação foi checada nas células hematopoiéticas da medula óssea. O controle negativo da reação imunohistoquímica foi realizado omitindo-se, em alguns cortes, a etapa de incubação com o anticorpo primário.

Foram obtidas imagens dos campos analisados através do sistema computadorizado de análise de imagens, AxioVision (Zeiss, Berlim, Alemanha).

5.4.5 Análise imunohistoquímica

Análises preliminares das amostras de fêmur e mandíbula foram realizadas em microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Germany). Todas as lâminas foram analisadas em aumentos de 250X e 400X por um patologista.

Após a análise preliminar, a região de tecido ósseo trabecular da epífise proximal do fêmur e de tecido ósseo alveolar interradicular do segundo molar mandibular foram fotografadas utilizando o programa Axiovision (versão 4.5 semi-automático) em aumento de 40X e arquivadas, determinando-se visualmente uma área medial (B) no fêmur e uma área de tecido ósseo interradicular voltada para a face do ligamento periodontal na mandíbula, como demonstrado na Figura 4.

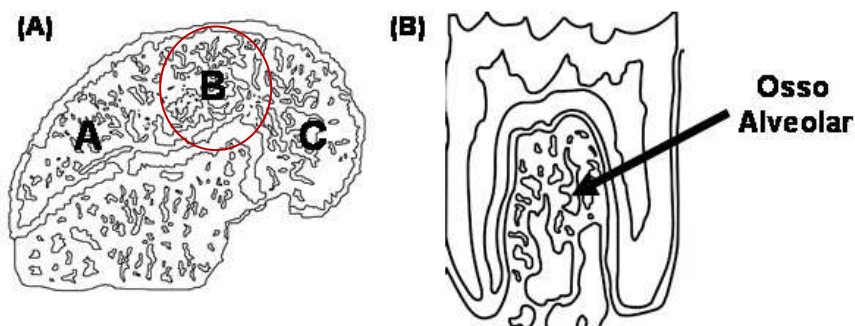


Figura 4: (A) Desenho esquemático da epífise proximal do fêmur, onde B foi a região determinada para a análise imunohistoquímica (Bax) do tecido ósseo trabecular. (B) Desenho esquemático da região interradicular selecionada para a análise imunohistoquímica do tecido ósseo alveolar mandibular (Bax e Bcl-2).

As células foram contadas por um único avaliador, que não possuía conhecimento dos grupos experimentais. A expressão de Bax e Bcl-2 foi avaliada nas células osteoblásticas presentes na região periférica do osso alveolar mandibular. O percentual de células positivas para Bax e Bcl-2 foi obtido pela

fórmula: % de células positivas Bax ou Bcl-2 = osteoblastos positivos/número total de osteoblastos (figuras 5 e 6). No fêmur a mesma fórmula foi utilizada para a expressão de Bax, entretanto, foram avaliados os osteoblastos na periferia do tecido ósseo trabecular da epífise femoral (figura 7).

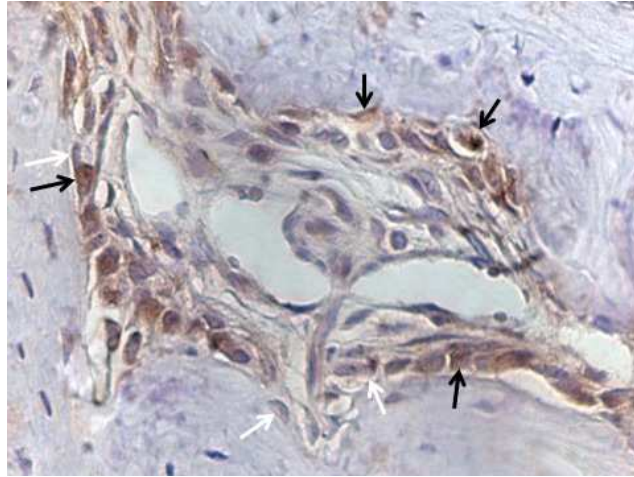


Figura 5: Expressão de Bax nos osteoblastos da mandíbula. As setas brancas mostram os osteoblastos negativos e as setas pretas os osteoblastos positivos. Aumento original 400X.



Figura 6: Expressão de Bcl-2 nos osteoblastos da mandíbula. As setas brancas mostram os osteoblastos negativos e as setas pretas os osteoblastos positivos. Aumento original 400X.

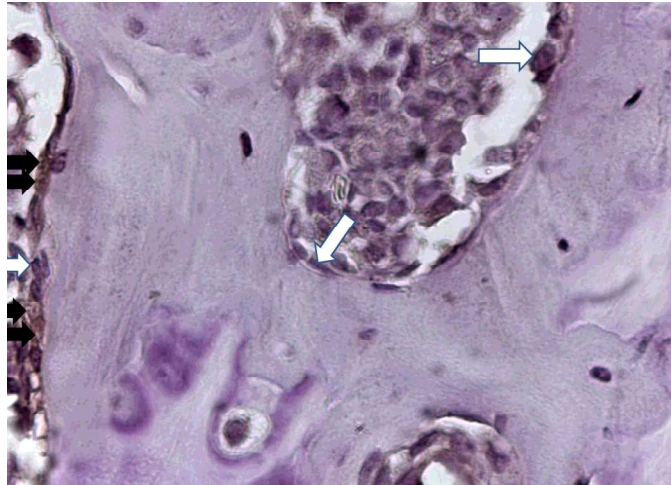


Figura 7: Expressão de Bax nos osteoblastos do fêmur. As setas brancas mostram os osteoblastos negativos e as setas pretas os osteoblastos positivos. Aumento original 400X.

5.4.6 Ensaio mecânico de flexão a três pontos

As tíbias direitas foram utilizadas para o teste de flexão a três pontos usando a máquina universal EMIC, modelo DL 3000 da faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp-Araçatuba). A máquina foi calibrada uma célula de carga de 2000N de capacidade com uma proporção de velocidade de 5 mm/min. A cada incremento de carga aplicada ao material foi registrada a deformação correspondente para a construção do gráfico: carga X deformação. O registro da força e deformação foi realizado pelo sistema computacional acoplado à máquina. O gráfico obtido registra o ensaio de acordo com os parâmetros e unidades previamente definidas.

O ensaio consistiu em apoiar o espécime sob dois suportes distanciados entre si a uma distância L , sendo a carga de flexão ou dobramento aplicada no centro do espécime (a uma distância $L/2$ de cada apoio). Os testes foram realizados considerando as propriedades mecânicas e estruturais: resiliência (mJ) foi definida

como a energia que o espécime admite na fase elástica; carga máxima (N) (maior carga aplicada durante o ensaio); rigidez (10^3N/m) foi definida como a relação entre a carga e a deformação (BARBOSA, 2009; MELLO; GOMIDE, 2005; ESTANISLAU at al., 2010).

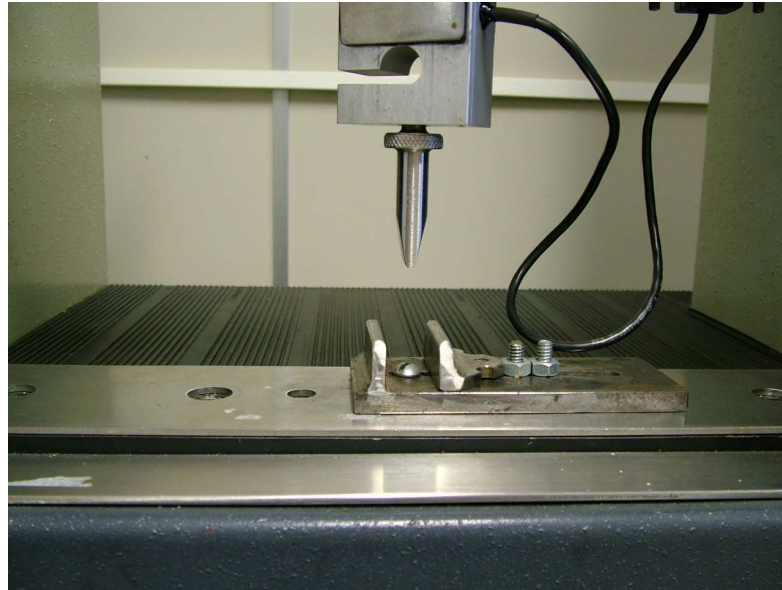


Figura 8: Máquina universal EMIC, modelo DL 3000.

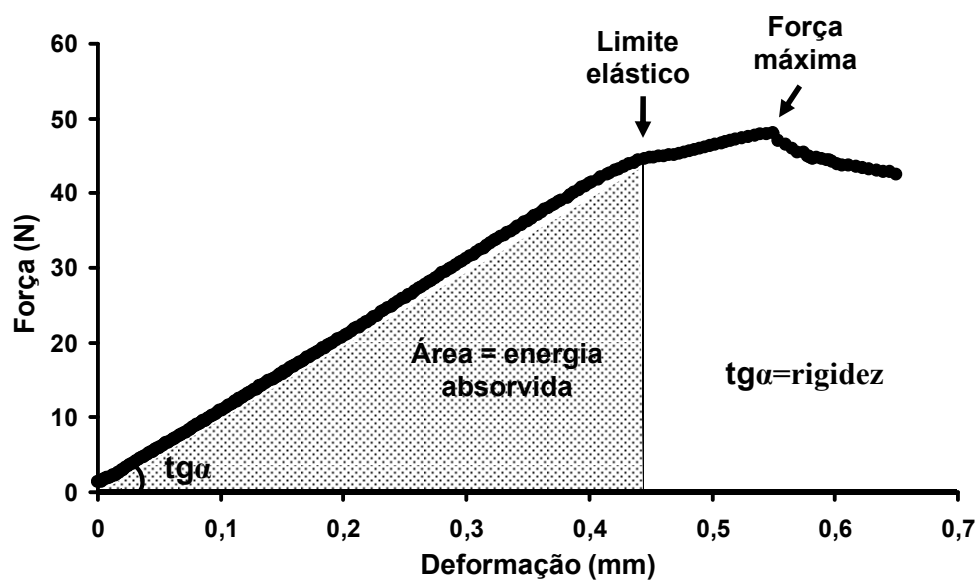


Figura 9: Desenho esquemático da curva característica. Força X deslocamento obtida no ensaio de flexão de três pontos na máquina universal de ensaios EMIC.

5.4.7 Densidade radiográfica

As tíbias direitas foram descongeladas e 24 horas após seguiu-se o procedimento de obtenção das imagens radiográficas. Dessa forma todas as tíbias foram posicionadas individualmente na mesma posição no aparelho *Careastream In Vivo FX Pro* (Careastream Molecular Imaging, New Haven, CT, USA). As imagens foram obtidas utilizando o mesmo nível energético (35 KVP, Filtro de alumínio de 0.8mm; *f stop* de 2.8 e tempo de exposição de 10 segundos), e foram automaticamente convertidas para unidade de densidade de raio X (XD) pelo programa.

Para a obtenção da densidade radiográfica, foi criada na imagem uma região de interesse denominada ROI, que foi delineada na região de epífise proximal da tíbia, sempre pelo mesmo avaliador (figura 6). Foi utilizada para o delineamento a ferramenta *manual ROIs panel guide* presente no *Carestream Molecular Imaging Software*; versão 5.02 (Careastream Molecular Imaging, New Haven, CT, USA).

5.4.8 Densidade óssea

Todas as imagens obtidas para a análise de densidade radiográfica (item 5.3.6) foram também utilizadas para a análise da densidade óssea. Entretanto, a ROI foi criada na diáfise distal da tíbia e foi delimitada por um quadrado (figura 6). Na análise de densidade óssea foi utilizado o programa *careastream bone density* (Careastream Molecular Imaging, New Haven, CT, USA), o qual mede a densidade óssea de ossos cilíndricos no ROI automaticamente.

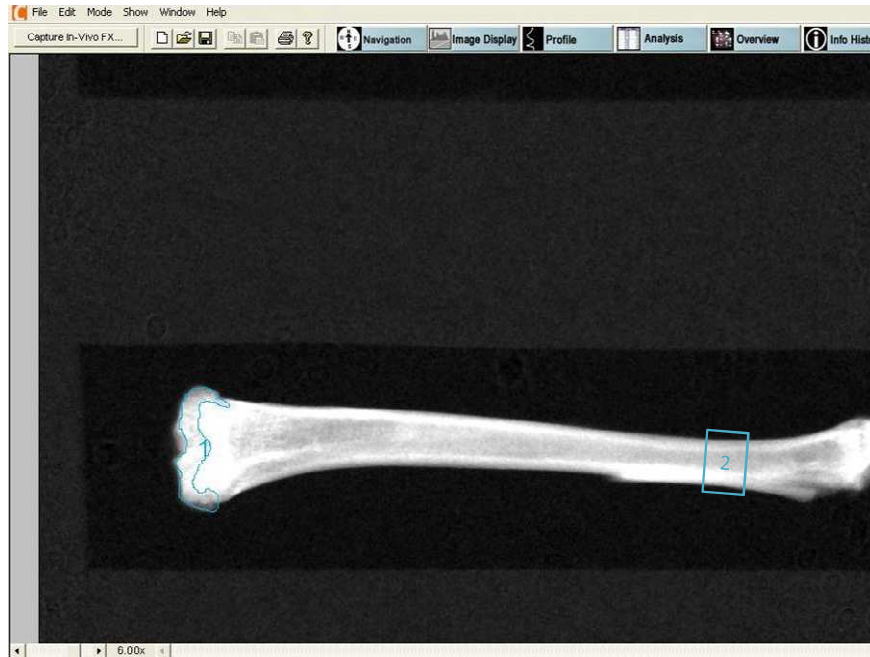


Figura 10: Densidade radiográfica da epífise proximal e densidade óssea da diáfise distal da tíbia. A linha azul delineada na região de epífise proximal mostra a região de interesse (ROI) onde foi realizada a densidade radiográfica, composta predominantemente por osso trabecular. O quadrado delimitado (ROI) mostra a região de diáfise distal onde foi mensurada a densidade óssea composta predominantemente de osso cortical. Carestream Molecular Imaging Software (version 5.02).

5.4.9 Densidade Mineral Óssea (DMO)

A DMO da tíbia foi mensurada através do equipamento *DPX-ALPHA LUNAR* (figura 7) utilizando absorptometria radiológica de dupla energia (DXA). Todos os ossos foram escaneados de forma padronizada e em grupos de seis. Posteriormente as análises para obtenção da DMO (g/cm^2) foram feitas individualmente em cada tíbia através de um programa computacional para pequenos animais (ESTANISLAU et al., 2010)

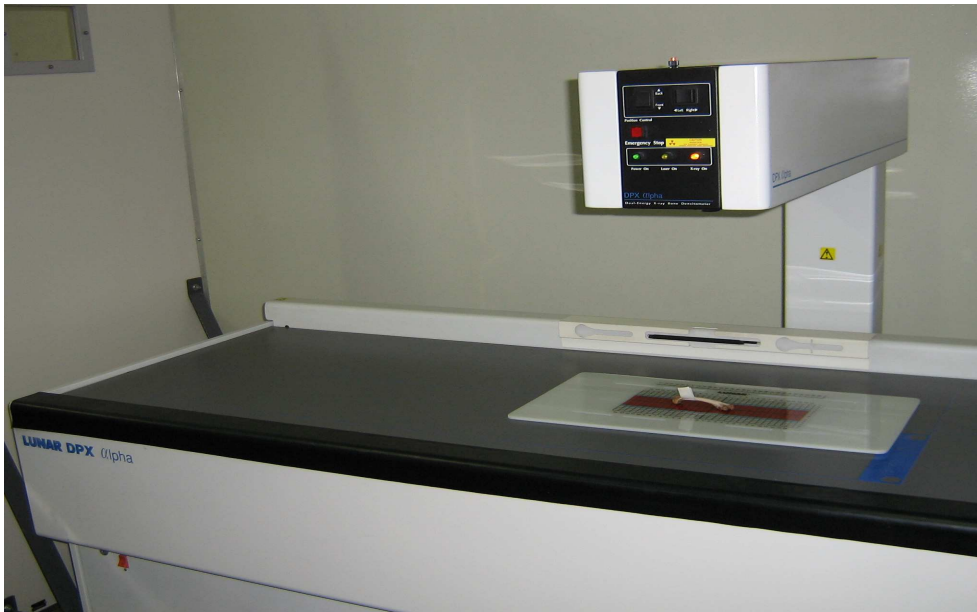


Figura 11: Densitômetro *DPX-ALPHA* LUNAR.

5.5 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para verificar se os dados apresentaram padrão de normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk.

O grupo controle foi comparado ao grupo osteoporose através do teste “t” Student/Mann-Whitney. Posteriormente todos os grupos exceto o controle, foram submetidos à análise de variância e teste *post hoc* de Tukey ou Dunnett T3.

A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago, EUA).

5.6 Aspectos éticos

O protocolo experimental foi submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, recebendo aprovação, certificada no Protocolo nº 026/2009 – CEA.

6 Resultados e discussão

Os resultados e discussão serão apresentados em forma de artigos.

O artigo I “Effect of the *Ginkgo biloba* extract in the expression of Bax, Bcl-2 and bone mineral content of Wistar rats with Glucocorticoids-induced-osteoporosis” foi aceito para publicação no periodico Phytotherapy Research.

O artigo II “Anti-osteoporotic effect of *Ginkgo biloba* L in Wistar rats with glucocorticoid-induced-osteoporosis” foi submetido ao periódico Natural Products Communication (NPC).

6.1 Resumo artigo 1

Effect of the *Ginkgo biloba* extract in the expression of Bax, Bcl-2 and bone mineral content of Wistar rats with glucocorticoids-induced-osteoporosis.

Running title: Ginkgo biloba in the glucocorticoid-induced-osteoporosis.

Leda Marilia Fonseca Lucinda^{a,*}, Beatriz Juliao Vieira Aarestrup^a, Vera Maria Peters^a, Joao Evangelista de Paula Reis^a, Roberto Sotto Maior Fortes de Oliveira^a, Martha de Oliveira Guerra^a.

^a *Centro de Biologia da Reprodução – Federal University of Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970. Juiz de Fora, MG, Brazil.*

**Corresponding author: Rua Dr. Pedro de Aquino Ramos 106/503. CEP: 36010-440, Juiz de Fora, MG, Brazil. Email address: ledamarilia@yahoo.com.br (L M F Lucinda). Tel: +55 32 21023251 or +55 32 32180734; fax: +55 32 21023251*

Abstract

Objective: Evaluate the effects of the extract of *Ginkgo biloba* (EGb) in the glucocorticoid-induced-osteoporosis (GIO) through the Bax and Bcl-2 expression by osteoblasts cells, the x-ray and bone density of the tibia. **Methods:** Rats were divided into five groups: osteoporosis; EGb1 (28mg/Kg); EGb2 (56mg/Kg); alendronate (0.2mg/animal) and control. The treatments were conducted for 20 (n=30) and 30 days (n=30). The Bax and Bcl-2 expression was evaluated in osteoblasts of the mandibular alveolar bone. The tibias were radiographed to evaluate the x-ray and bone density. The control group was compared with the osteoporosis's (Student's t-test). The other groups were analyzed by ANOVA test followed by Dunnett/Dunnett T3 (p<0.05). **Results:** When compared the osteoporosis to the control group

($p < 0.05$): Bax and x-ray density increased; Bcl-2 and the bone density reduced. When compared to the osteoporosis group ($p < 0.05$): alendronate (30 days), EGb1 and EGb2 (20/30 days) increased the Bcl-2 expression; EGb2 and alendronate (20 days); EGb1 and EGb2 (30 days) reduced the Bax expression; EGb1 and EGb2 (20/30 days) reduced the x-ray density. **Conclusions:** The EGb improved the Bcl-2 and reduced the Bax expression by osteoblasts in the mandibular alveolar bone, recovered the mineral content in the tibia of rats with GIO.

Key-words: *Ginkgo biloba*, osteoporosis, glucocorticoids, Bax expression, Bcl-2 expression, x-ray density.

6.2 Resumo artigo 2

Anti-Osteoporotic Effect of *Ginkgo biloba* L in Wistar Rats with Glucocorticoid-Induced-Osteoporosis

Leda Marília F. Lucinda^{a,*}, Mário Jefferson Q. Louzada^b, Beatriz J.V. Aarestrup^a, Joanna S. Brandão^a, Vera Maria Peters^a, João Evangelista de P. Reis^a, Tânia T. de Oliveira^c, Martha de O. Guerra^a.

^a *Centro de Biologia da Reprodução – Federal University of Juiz de Fora-UFJF, Caixa Postal 328, Zip Code 36001-970. Juiz de Fora, MG, Brazil.*

^b *Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Univ Estadual Paulista-UNESP, Clovis Pestana, 793, Zip Code 16050-680, Araçatuba, SP, Brazil.*

^c *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Federal University of Viçosa, Vila Gianetti, casa 26, CEP 36570-000. Viçosa, MG, Brazil.*

**Corresponding author: Rua Dr. Pedro de Aquino Ramos 106/503, Granbery Zip Code 36010-440, Juiz de Fora, MG, Brazil. Email*

address: ledamarilia@yahoo.com.br (L M F Lucinda)

Tel: +55 32 21023251 or +55 32 32180734; fax: +55 32 21023251

Abstract

Objective: Evaluate the effect of the extract of *Ginkgo biloba* (EGb) in the bone alkaline phosphatase (BAP), bone mineral density (BMD), in the mechanical properties of the tibia, and in the Bax expression by osteoblast cells in the femur trabecular bone of Wistar rats with glucocorticoid-induced-osteoporosis. **Methods:**

After osteoporosis induction, the rats were divided into five groups (n=6): Osteoporosis; EGb1 (28mg/Kg); EGb2 (56mg/Kg); alendronate (0.2 mg/animal) and control. The animals were treated during 20 (n=30) and 30 days (n=30). The BAP was evaluated in the serum, the Bax expression was evaluated in osteoblasts of trabecular bone tissue of the proximal epiphysis of the femur. The BMD was measured using dual-energy x-ray absorptiometry and the three-point-bending was performed in the right tibias for the assessment of the bone stiffness, maximum load and resilience. The control group was compared with the osteoporosis's (Student's t-test). The other groups (except the control) were analyzed by ANOVA test followed by Tukey/Dunnett'T3 ($p < 0.05$). **Results:** In the osteoporosis group the percentage of Bax expression in osteoblasts increased while the BAP, BMD, the bone stiffness, the maximum load and the resilience were reduced. The BAP values increased in the EGb1 and EGb2 groups (30 days). The Bax expression was reduced in the EGb2 and alendronate groups (20 days) as well in the EGb1 and EGb2 groups (30 days). In addition, in the EGb2 and alendronate groups (20 and 30 days) the BMD increased. However, no significant impairment of the bone biomechanical properties was observed. **Conclusions:** The EGb restored BAP and BMD and reduced the expression of the pro-apoptotic proteins (Bax), suggesting decrease in osteoblast apoptosis.

Keywords: *Ginkgo biloba*, osteoporosis, glucocorticoids, Bax expression, bone mineral density, three-point-bending test.

7 Comentários Finais

No presente estudo avaliamos os efeitos do EGb na osteoporose induzida por glicocorticoides pelos seguintes parâmetros: nível sérico de fosfatase alcalina óssea, avaliado no soro, densidade mineral óssea, densidade radiográfica e análise biomecânica foram avaliadas na tíbia e as proteínas relacionadas à apoptose foram avaliadas em cortes histológicos do fêmur e mandíbula de ratas Wistar.

Foi demonstrado que no grupo osteoporose houve redução significativa dos níveis de fosfatase alcalina óssea e da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Redução de DMO avaliada por DXA, densidade mineral cortical da diáfise distal, rigidez, resiliência e carga máxima da tíbia. Aumento significativo da densidade radiográfica da epífise distal da tíbia e da expressão da proteína pró-apoptica Bax.

O alendronato de sódio reduziu significativamente a expressão de Bax (20 dias de tratamento) nos cortes histológicos de mandíbula e fêmur e aumentou significativamente a expressão de Bcl-2 (30 dias) nos cortes histológicos da mandíbula e a DMO da tíbia (20 e 30 dias).

O EGb (28mg/Kg e 56mg/Kg 30 dias) aumentou significativamente os níveis de fosfatase alcalina óssea, DMO (56mg/Kg 20 e 30 dias), expressão Bcl-2 (28mg/Kg; 56mg/Kg 20 e 30 dias). O EGb também reduziu significativamente a expressão de Bax (56mg/Kg 20 dias; 28mg/Kg, 56mg/Kg 30 dias) nos cortes histológicos de mandíbula e fêmur e a densidade radiográfica (28mg/Kg; 56mg/Kg 20 e 30 dias).

Entretanto, o alendronato de sódio e o EGb não alteraram de forma significativa os parâmetros biomecânicos: carga máxima, rigidez e resiliência.

8 Conclusão

O EGb aumentou a DMO, a expressão de proteínas anti-apóptóticas Bcl-2 e os níveis de fosfatase alcalina óssea; reduziu a densidade radiográfica e a expressão de proteínas pró-apoptóticas Bax. Este estudo sugere que o EGb reduz a apoptose de células osteoblásticas e aumenta a formação de tecido ósseo, podendo ser um tratamento efetivo para a osteoporose induzida por glicocorticoides.

9 Referências

- ÅKESSON, K. New approaches to pharmacological treatment of Osteoporosis. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 81, n. 9, p. 657-664, 2003.
- ALTUNDAG, K. et al. Bisphosphonate use for osteoporosis in postmenopausal women may inhibit occurrence of malignant microcalcification in breast tissue. **Medical Hypotheses**, Edinburgh, v. 67, n. 1, p. 202-203, 2005.
- ANTONSSON, B.; MARTINOU, J. C. The Bcl-2 protein family. **Experimental Cell Research**, New York, v. 256, n. 1, p. 50-57, 2000.
- ARJMANDI, B. H. et al. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevent bone loss by different mechanisms. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 66, n. 1, p. 61-65, 2000.
- BARBOSA, Adelson Aparecido Andrade. **Densidade Mineral óssea e propriedades mecânicas de fêmur de ratos submetidos à hipocinesia dos membros pélvicos e a diferentes programas de reabilitação**. 2009. 44.f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)-Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- BAYLINK, D. J. The diagnosis and management of osteoporosis. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, Darmstadt, v. 59, n. 1, p. 22-28, 2000.
- BILIA, A. R. *Ginkgo biloba* L. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 3, p. 276-279, 2002.
- BLACK, D. M. et al. Meeting Report from the 24th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2002. **BoneKey-osteovision**. Disponível em: <<http://www.bone-key-ibms.org/cgi/content/full/ibmske;2002065v1>> Acesso em 05 de maio de 2009.
- BLUMENTHAL, M. *Ginkgo*. In: The ABC clinical guide to herbs. **Thieme**, New York, p.185-200, 2003.
- BRAYBOY, J. R. et al. The protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) against free radical damage osteoblast-like bone cells (MC3T3-E1) and the proliferative effects of EGb 761 on these cells. **Nutrition Research**, New York, v. 21, n. 9, p. 1275-1285, 2001.

- BRIXEN, K.; ABRAHAMSEN, B.; KASSEM, M. Prevention and treatment of osteoporosis in women. **Current Obstetrics & Gynaecology**, Edinburgh, v. 15, n. 4, p. 251-254, 2005.
- BROWN, J. P. et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 42, n. 10-11, p. 929-942, 2009.
- BUDIARDJO, I. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 15, n. 7, p. 269-290, 1999.
- BUXTON, E. C.; YAO, W.; LANE, N. E. Changes in serum receptor activator of nuclear factor-kappa β ligand, osteoprotegerin, and interleukin-6 levels in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with human parathyroid hormone. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Philadelphia, v. 89, n. 7, p. 3332-3336, 2004.
- CALVÁRIO, A. M. R. *Ginkgo biloba* – A importância dos ginkgolídeos. **Química Aplicada. Faculdade de Ciências e Tecnologia-UNL**, 2003. Disponível em: <<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos2003%20PDF/Ana%20margaridaGinkgo.PDF/>> Acesso em 01 de julho de 2009.
- CARRENO, U. F. R.; BARBOSA, S.; PEREIRA, A. A. C. Osteoporose e a Odontologia. **V Fórum Clínico e Científico da Odontologia**, 2002. Disponível em: <<http://www.Vforumclinicoecientificodeodontologia.unifenas.htm/>> Acesso em 06 de julho de 2009.
- CARVALHO, D. C. L. et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Revista de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, p. 647-654, 2002.
- CARVALHO, M. I. Osteoporose visão do ortopedista. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 91-97, 2006.
- CHAN, P. C.; XIA, Q.; FU, P. P. Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects. **Journal of Environmental Science and Health**, New York, v. 25, n. 3, p. 211-244, 2007.
- COLPAN, L. et al. The effect of calcitonin on biochemical markers and zinc excretion in postmenopausal osteoporosis. **Maturitas. The European Menopause Journal**, Limerick, v. 51, n. 3, p. 246-253, 2005.

CORROYER, S. et al. Impairment of rat postnatal lung alveolar development by glucocorticoids: involvement of the p21CIP1 and p27KIP1 cyclin-dependent kinase inhibitors. **Pediatric Research**, Baltimores, v. 51, n. 2, p. 169-76, 2002.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6°. ed. Rio de Janeiro, RJ: Ed Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

DANG, G. Z. C.; LOWIK, C. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. **Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 16, n. 5, p. 207-211, 2005.

DAS, A. S. et al. Phytoestrogenic effects of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (*Rattus norvegicus*) model of osteoporosis. **Life Sciences**, Oxford, v. 77, n. 24, p. 3049-3057, 2005.

DEKOSKY, S. T. et al. The Ginkgo evaluation of memory (GEM) study: Design and baseline data of a randomized trial of *Ginkgo biloba* extract in prevention of dementia. **Contemporary Clinical Trials**, New York, v. 27, n. 3, p. 238-253, 2006.

DELMAS, P. D. et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in post-menopausal women. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 337, n. 23, p. 1641–1647, 1997.

DENNISON, E. et al. Profiles of endogenous circulating cortisol and bone mineral density in healthy elderly men. **The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Philadelphia, v. 84, n. 9, p. 3058-3063, 1999.

DERVIS, E. Oral implications of osteoporosis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St. Louis, v. 100, n. 3, p. 349-356, 2005.

DI RENZO, G. *Ginkgo biloba* and the central nervous system. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, p. 43-47, 2000.

DIAMOND, B. J. et al. *Ginkgo biloba* extract: Mechanisms and clinical indications. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, Chicago, v. 81, n. 5, p. 668-678, 2000.

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

DONTAS, I. et al. Protective effect of plant extract from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. **Maturitas. The European Menopause Journal**, Limerick, v. 53, n. 2, p. 234-242, 2006.

DOWNEY, P. A.; SIEGEL, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. **Physical Therapy**, New York, v. 86, n. 1, p. 77-91, 2006.

ENMARK, E. et al. Human estrogen receptor β - gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Philadelphia, v. 82, n. 12, p. 4258-4265, 1997.

ETANISLAU, C. A. et al. Evaluation of femur of orchietomized guinea pigs by bone densitometry using dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) and mechanical testing. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 104-112, 2010.

FAN, T. J. et al. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 37, n. 11, p. 719-727, 2005.

FELSENBERG, D. et al. Oral ibandronate significantly reduces the risk of vertebral fractures of greater severity after 1, 2, and 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. **Bone**, New York, v. 37, n. 5, p. 651- 654, 2005.

FISHER, D. E. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. **Hematology/ Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 931-956, 2001.

FRIEDMAN, A. W. Important determinants of bone strength. Beyond bone mineral density. **Journal of Clinical Rheumatology**, Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 70-77, 2006.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, Oxford, v. 14, n. 7, p. 1237-1243, 2007.

GELEIJNSE, J. M. et al. Inverse association of tea and flavanoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 75, n. 6, p. 880-886, 2002.

GENNARI, C. et al. Effect of ipriflavone--a synthetic derivative of natural isoflavones--on bone mass loss in the early years after menopause. **Menopause**, New York, v. 5, n. 1, p. 9-15, 1998.

GESKE, F. J.; GERSCHENSON, L. E. The biology of apoptosis. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 32, n. 10, p. 1029-1038, 2001.

GOHEL, A.; MCCARTHY, M-B., GRONOWICZ, G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts *in vivo* and *in vitro*. **Endocrinology**, Baltimore, v. 140, n. 11, p. 5339-5347, 1999.

GREGÓRIO, L. H. Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose. **Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo**. Disponível <http://www.endocrino.org.br/artigos_osteoporose_016.php/> Acesso em 20 de abril de 2009.

GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. **Journal of Endocrinology**, London, v. 163, n. 3, p. 379-383, 1999.

HAN, Y. *Ginkgo* terpene component has an anti-inflammatory effect on *Candida albicans* - caused arthritic inflammation. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 5, n. 6, p. 1049-1056, 2005.

HARA, T. et al. Effects of ovariectomy and/or dietary calcium deficiency on bone dynamics in the rat hard palate, mandible and proximal tibia. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 443-451, 2001.

HARLEY, D. E. et al. Effects on cognition and mood in postmenopausal women of 1 - week treatment with *Ginkgo biloba*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 711-720, 2003.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, London, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HIRAI, T. et al. Osteoporosis and reduction of residual ridge in edentulous patients. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 69, n. 1, p. 49-56, 1993.

HILLEBRAND, M. D.; OLIVEIRA, W. F. Estudo do efeito do uso do EGB 761 (Extrato do *Ginkgo biloba*) sobre a qualidade de vida em pacientes asmáticos submetidos a

tratamento de manutenção. **Revista Espaço para Saúde**, v. 5, n. 2, p. 28-34, 2004. Disponível em <<http://www.ccs.uel.br/espacoparasaude>> Acesso em: 01 de julho de 2007.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary Flavonoids: Intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 9-10, p. 937-942, 1999.

HUGGES, D. E. et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 10, n. 10, p. 1478-1487, 1995.

HUGGES, D. E.; BOYCE, B. F. Apoptosis in bone physiology and disease. **Molecular Pathology**, London, v. 50, n. 3, p. 132-137, 1997.

IMAI, Y. et al. Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism, **The Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 27, n. 2, p. 127-130, 2009.

JI, Y. B. et al. Sequential uniform designs for fingerprints development of *Ginkgo biloba* extract by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1128, n. 1-2, p. 273-281, 2006.

JILKA, R. L. et al. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. **The Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 13, n. 5, p. 793-802, 1998.

JOHNEEL, O. Advances in osteoporosis: better identification of risk factors can reduce morbidity and mortality. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 239, n. 4, p. 299-304, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: **Histologia Básica**. 11^o ed. Rio de Janeiro, RJ: Ed Guanabara Koogan, cap. 8, p. 135-149, 2008.

KARSDAL, M. A., HENRIKSEN, K. Osteoclast control osteoblast activity. **BoneKey-Osteovision**, New York, v. 4, n. 2, p. 19-24, 2007.

KURIBARA, H. et al. An anxiolytic-like effect of Ginkgo biloba extract and its constituent, ginkgolide-A, in mice. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 66, n. 10, p. 1333-1337, 2003.

- LANNA, C. M. M.; MONTENEGRO Jr., R. M.; PAULA, F. J. A. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 9-18, 2003.
- LECLERC, N. et al. Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. **Journal of Molecular Endocrinology**, New York, v. 33, n. 1, p. 175-193, 2004.
- LEE, J. et al. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up regulated in sertoli cells versus germ cell injury of the testis. **Endocrinology**, Baltimore, v. 140, n. 2, p. 852-858, 1999.
- LEMOS, C. et al. Sistema ósteo-articular. In: **BOGLIOLO. Patologia**. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan, Cap. 26, p. 873-875, 1994.
- LIND, P. M. et al. Torsional testing and peripheral quantitative computed tomography in rat humerus. **Bone**, New York, v. 29, n. 3, p. 263-270, 2001.
- LUCINDA, L. M. F. et al. Radiographic evidence of mandibular osteoporosis improvement in Wistar rats treated with Ginkgo biloba. **Phytotherapy Research**, London, v. 24, n. 2, p. 264-267, 2010a.
- LUCINDA, L. M. F. et al. Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with Ginkgo biloba extract: a histomorphometric study of mandible and femur. **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 8, p. 982-987, 2010b.
- MANELLI, F.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Trends in Endocrinology and metabolism**, Bethesda, v. 11, n. 3, p. 79-85, 2000.
- MANOLAGAS, S. C; JILKA, R. L. Mechanisms of disease: bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 332, n. 5, p. 305-311, 1995.
- MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 21, n. 2, p. 115-137, 2000.
- MAZZIOTI, G. et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. **Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 17, n. 4, p. 144-149, 2006.

MEI, J.; YEUNG, S; KUNG, A. W. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, Philadelphia, v. 86, n. 11, p. 5217-5221, 2001.

MELLO, Luiz Carlos de Paula. **Características físicas, químicas e biomecânicas dos ossos de ratas ovariectomizadas tratadas com fluoreto de sódio**. 2003. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

MELLO, L. C. P.; GOMIDE L. B. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 593-600, 2005.

MOREIRA, C. O. O uso de fitoestrogênios em ginecologia: evidências para o emprego clínico dos fitoestrogênios na prevenção e no tratamento da osteoporose da mulher pós-menopausada. **Boletim da Sociedade de Reumatologia do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 12, p. 9-13, 2004.

MUNDY, G. R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. **Bone**, New York, v. 21, n. 5, p. 18-35, 1999.

NAKAMURA, T. et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell**, Cambridge, v. 130, n. 5, p. 811-823, 2007.

NAKANISHI, K. Terpene trilactones from Ginkgo biloba: from ancient times to the 21st century, **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 13, n. 17, p. 4987-5000, 2005.

NETO, A. M. P. et al. Consenso Brasileiro de Osteoporose 2002. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Campinas, v. 42, n. 6, p. 343-354, 2002.

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

OH, S. M.; KIM, H. R.; CHUNG, K. H. Effects of Ginkgo biloba on *in vitro* osteoblasts cells and ovariectomized rat osteoclasts cells. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 31, n. 2, p. 216-224, 2008.

OLKKU, A. et al. Glucocorticoids induce glutamine synthetase expression in human osteoblastic cells: a novel observation in bone. **Bone**, New York, v. 34, n. 2, p. 320-329, 2004

PAGANELLI, R. A.; BENETOLI, A.; MILANI, H. Sustained neuroprotection and facilitation of behavioral recovery by the *Ginkgo biloba* extract, EGB 761, after transient forebrain ischemia in rats, **Behavioral Brain Research**, Amsterdam, v. 174, n. 1, p. 70-77, 2006.

PATSCHAND, D.; LODDENKEMPER, K.; BUTTGEREIT F. Molecular mechanism of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Bone**, New York, v. 29, n. 6, p. 498-505, 2001.

PEREIRA, R. M. R. Manifestações clínicas. In: SZEJNFELD V. L. **Osteoporose: Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: SARVIER, 2000. Cap.10, p. 90.

PINTO, R. M. et al. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of *Ginkgo biloba* to rats. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 23, n. 4, p. 480-485, 2007.

PLOTKIN, L. et al. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 280, n. 8, p. 7317-7325, 2005.

RAUCH, F. et al. Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone-specific alkaline phosphatase in childhood and adolescence. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 86, n. 6, p. 583-587, 1997.

REED, J. C.; JURGENSMEIER, J. M.; MATSUYAMA, Y. Bcl-2 family proteins and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1366, n. 1-2, p. 127-137, 1998.

REID, I.R. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism**, London, v. 14, n. 2, p. 279-298, 2000.

RODRIGUES, E. Osteoporose ameaça 30 milhões de brasileiros. **Revista Comciência**, 2004. Disponível em: <<http://www.eesc.usp.br/bioeng/resumonoticia.php?codnoticia=70/>>. Acesso em 09 de Janeiro de 2009.

ROGERS, M. J.; RUSSELL, R. G.; WATTS, N. B. Meeting report from what is new in bisphosphonates: Sixth workshop on bisphosphonates. **Bonekey-Osteovision**, 2002. Disponível em: <
<http://www.bonekeyibms.org/cgi/content/full/ibmske;200204v1>> . Acesso em 15 de agosto de 2009.

ROSEN, C.; KESSENICH, C. Comparative clinical pharmacology and therapeutic use of bisphosphonates in metabolic bone diseases. **Drugs**, New York, v. 51, n. 4, p. 537–551, 1996.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Osso. In: **Histologia. Texto e Atlas. Em correlação com biologia celular e molecular**. 5º ed. Rio de Janeiro, RJ: Ed Guanabara koogan, cap. 8, p. 203-225, 2006.

ROZENBERG, S. et al. Propensity of gynecologists towards osteoporosis management and treatment. **Maturitas. The European Journal of Menopause**, Limerick, v. 53, n. 4, p. 483-488, 2006.

RUSSO, L. A. T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 401-406, 2001.

SAMBROOK, P.; LANE, N. E. Corticosteroid Osteoporosis. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology**, London, v. 15, n. 3, p. 401-413, 2001.

SHAKER, J. L.; LUKERT, B. P. Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 341-356, 2005.

SHI, X. M. et al. Glucocorticoids induce adipogenesis of stromal cells by transcriptionally activating PPAR γ 2. **The Journal of Bone Mineral Research**, New York, v. 12, S. 454, p. 1061-1066, 1999.

SOMEKAWA, Y. et al. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipidis, and bone mineral density in postmenopausal japanese women. **Obstetrics and Gynecology**, Hargestown, v. 97, n. 1, p. 109-115, 2001.

SOMERMAN, M. J.; MCCAULEY, L. K. Bisphosphonates: Sacrificing the jaw to save the skeleton? **International Bone and Mineral Society**, Washington, v. 3, n. 9, p. 12-18, 2006.

STEVENSON, J. C. Justification for the use of HRT in the long-term prevention of osteoporosis. **Maturitas. The European Menopause Journal**, Limerick, v. 51, n. 2, p. 113-126, 2005.

SZEJNFELD, V. L. Manifestações clínicas. **Osteoporose: Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2000. 406p.

SZULC, P. Biochemical bone turnover markers and osteoporosis in older men: where are we? **Journal of Osteoporosis**, New York, v. 2011, p. 1-5, 2011.

TAMURA, Y.; OKINAGA, H.; TAKAMI, H. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Paris, v. 58, n. 99, p. 500-504, 2004.

TESCH, B. J. Herbs commonly used by women: an evidence-based-review, **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 188, S. 5, p. 44-55, 2003.

TONINO, R. P. et al. Skeletal benefits of alendronate: 7 year treatment postmenopausal osteoporotic women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Philadelphia, v. 85, n. 9, p. 3109-3115, 2000.

TURNER, R. T.; RIGGS, L.; SPELSBERG, T. C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine Review**, Baltimore, v. 15, n. 3, p. 275-299, 1994.

TRIVEDI, R. et al. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. **Molecular Cellular and Endocrinology**, Limerick, v. 289, n. 1-2, p. 85-93, 2009.

WALESIUK, A.; TROFIMIUK, E.; BRASZKO, J. J. *Ginkgo biloba* normalizes stress- and cortocosterone-induced impairment of recall in rats. **Pharmacological Research**, London, v. 53, n. 2, p. 123-128, 2006.

WATTEL, A. et al. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 35-42, 2003.

WATTS, N. B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, New York, v. 45, n. 8, p. 1359-1368, 1999.

WEINSTEIN, R. S. et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 102, n. 2, p. 274-282, 1998.

WEINSTEIN, R. S.; MANOLAGAS, S. C. Apoptosis and osteoporosis. **American Journal of Medicine**, New York, v. 108, n. 2, p. 153-164, 2000.

WEINSTEIN, R. S. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, Boston, v. 2, n. 1, p. 65-73, 2001.

WHO. Prevention and management of osteoporosis. **World Health Organization. Technical Report**. Geneva, 2003. (Series 921).

WHO. Folium Ginkgo. In: WHO monographs on selected medicinal plants. **World Health Organization**, Geneva, p.154-167, 1999.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Serial Review: Flavanoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

YAMAGUCHI, M. et al. Effects of flavanoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 303, n. 1-2, p. 83-88, 2007.

ZHANG, G. T. U. et al. Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. **Leukemia Research**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 385-392, 2000.

ZHOU, W. et al. Ginkgolide A attenuates homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. **Journal of Vascular Surgery**, St. Louis, v. 44, n. 4, p. 853-862, 2006.

Apêndice

Artigo I

Effect of the *Ginkgo biloba* extract in the expression of Bax, Bcl-2 and bone mineral content of Wistar rats with glucocorticoids-induced-osteoporosis.

Running title: *Ginkgo biloba* in the glucocorticoid-induced-osteoporosis.

Leda Marilia Fonseca Lucinda^{a,*}, Beatriz Juliao Vieira Aarestrup^a, Vera Maria Peters^a, Joao Evangelista de Paula Reis^a, Roberto Sotto Maior Fortes de Oliveira^a, Martha de Oliveira Guerra^a.

^a *Centro de Biologia da Reprodução – Federal University of Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970. Juiz de Fora, MG, Brazil.*

**Corresponding author: Rua Dr. Pedro de Aquino Ramos 106/503. CEP: 36010-440, Juiz de Fora, MG, Brazil. Email address: ledamarilia@yahoo.com.br (L M F Lucinda).*

Tel: +55 32 21023251 or +55 32 32180734; fax: +55 32 21023251

Abstract

Objective: Evaluate the effects of the extract of *Ginkgo biloba* (EGb) in the glucocorticoid-induced-osteoporosis (GIO) through the Bax and Bcl-2 expression by osteoblasts cells, the x-ray and bone density of the tibia. **Methods:** Rats were divided into five groups: osteoporosis; EGb1 (28mg/Kg); EGb2 (56mg/Kg); alendronate (0.2mg/animal) and control. The treatments were conducted for 20 (n=30) and 30 days (n=30). The Bax and Bcl-2 expression was evaluated in osteoblasts of the mandibular alveolar bone. The tibias were radiographed to evaluate the x-ray and bone density. The control group was compared with the osteoporosis's (Student's t-test). The other groups were analyzed by ANOVA test followed by Dunnett/Dunnett T3 ($p < 0.05$). **Results:** When compared the osteoporosis to the control group ($p < 0.05$): Bax and x-ray density increased; Bcl-2 and the bone density reduced. When compared to the osteoporosis group ($p < 0.05$): alendronate (30 days), EGb1 and EGb2 (20/30 days) increased the Bcl-2 expression; EGb2 and alendronate (20 days); EGb1 and EGb2 (30 days) reduced the Bax expression; EGb1 and EGb2 (20/30 days) reduced the x-ray density. **Conclusions:** The EGb improved the Bcl-2 and reduced the Bax expression by osteoblasts in the mandibular alveolar bone, recovered the mineral content in the tibia of rats with GIO. **Key-words:** *Ginkgo biloba*, osteoporosis, glucocorticoids, Bax expression, Bcl-2 expression, x-ray density.

Introduction

Glucocorticoids have been used as treatment of chronic diseases on account of their anti-inflammatory, immune-modulatory and anti-proliferative properties. The long-term use of glucocorticoids is associated with serious side effects, including osteoporosis (Henneicke *et al.*, 2011). The glucocorticoids-induced-osteoporosis (GIO) causes a rapid trabecular bone loss, microarchitectural deterioration of bone tissue, decrease of bone turnover and increase in the risk of fractures (Lafage-Proust *et al.*, 2003).

Another mechanism by which glucocorticoids affect bone is reducing osteoblasts function and as a result bone formation and bone mass through the control of cell death (Hock *et al.*, 2001). Moreover, glucocorticoids have been shown to decrease the number of osteoblasts by apoptosis (Chang *et al.*, 2009). Apoptosis is regulated by an intrinsic process involving activation of genes that can promote the death of cell (Bras *et al.*, 2005). Likewise, the Bcl-2 gene family encodes a large number of proteins, including Bax and Bcl-2, which participate in programmed cell death as a pro-apoptotic and anti-apoptotic member of *bcl-2* gene family respectively (Verborgt *et al.*, 2002). Thus, one of the best characterized mechanisms to induce cell death is the release of the pro-apoptotic proteins such as Bax that cause permeabilization of the mitochondrial membrane, freeing proapoptogenic factors such cytochrome c, which promote activation of the caspases that mediate cellular death (Tsujimoto, 1998; Willis *et al.*, 2007). However the expression of Bcl-2 protein can prevent the cell death induced by a variety of stimuli, including stress, chemotherapeutic agents and glucocorticoids (Memon *et al.*, 1995; Adams and Cory, 1998; Gohel *et al.*, 1999).

In the traditional treatment of osteoporosis, one of the most used medications are the biphosphonates, however some side effects like gastrointestinal intolerance and osteonecrosis of the jaw have been reported (Pozzi *et al.*, 2007). Therefore, the search for new therapeutic alternatives to treat osteoporosis has been under scrutiny over the years, but studies with phytoestrogens showed that they are promising alternatives to treat osteoporosis (Bawa, 2010).

One of these alternative therapies is *Ginkgo biloba* L. (family Ginkgoaceae), a plant indigenous to China, Japan, and Korea where its fruits and leaves have been used as food and medicine for centuries. The standard composition of substances in this plant comprising 24% of phytoestrogens (Kaempferol, isohorhamnetin and quercetin), 6% of terpenoids (ginkgolides and bilobilides), and less than 5 ppm of ginkgolic acid (Oh and Chung, 2004). The main pharmacological effects of the extract of *Ginkgo biloba* (EGb) are vascular and tissue protection as well as improvement in cognitive function (Diamond *et al.*, 2000). It also has been shown that EGb has antiapoptotic properties (Smith and Luo, 2004; Smith *et al.*, 2002), being effective in protecting osteoblasts from cellular damage and death when they were exposed to the action of free radicals *in vitro* (Brayboy *et al.*, 2001),

Recently, studies of *Ginkgo biloba* in osteoporosis and bone metabolism have shown promising results stimulating osteoblast differentiation (Brayboy *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2008) and showing antiosteoclastic activity *in vitro* (Brayboy *et al.*, 2001). Also, Trivedi *et al* (2009) reported that EGb improved bone mineral density in ovariectomized rats, in the same way that in our previous studies EGb improved periodontal bone support and the percentual of alveolar bone in the mandible and trabecular bone in femur of rats with GIO (Lucinda *et al.*, 2010a,b).

The findings that EGb could be a possible alternative in the treatment of osteoporosis led us to continue to search about the effect of EGb in GIO. The aim of this study was to

evaluate the effect of EGb in the x-ray density of the proximal tibial epiphysis, in the bone density of the distal tibial diaphysis and in the Bax and Bcl-2 expression by osteoblast cells of the mandibular alveolar bone.

Material and methods

The methodology of this work was approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation (protocol number 026/2009- CEEA, Federal University of Juiz de Fora, MG, Brazil), which follows the international principles in ethics for animal experimentation.

Plant material: The aqueous EGb was supplied by JR Pharma (Lot no. 20091112). The EGb used was composed of 28.2% ginkgoflavonglicosides; 8.3% of terpenolactones; 15% of quercetin glycosides; 10.9% of kaempferol glycosides; 2.3% of ishorhamnetin glycosides and less than 5 ppm of ginkgolic acids.

Sodium alendronate: The solution of sodium alendronate was supplied by JR Pharma (India-lot no AS/004/08/2008-050309A)

Animals: Female Wistar rats (50 days old and weighing approximately 100-150 g) were obtained from the vivarium of the Federal University of Juiz de Fora, where they were born and bred. Groups of three animals were housed in clear plastic cages with stainless steel wire lids and pinewood shavings as bedding and kept in an animal room with controlled environmental conditions (12-h light/12-h dark cycle, temperature 22° C) on closed ventilated shelves. The animals were fed on rat chow pellets (an average of 25g daily) and received water *ad libitum*.

Osteoporosis induction: The osteoporosis induction was done through the intramuscular administration of dexamethasone disodium phosphate (Decadron ® 4mg/ml) at the dose level of 7mg/Kg of body weight, once a week, during five weeks in all groups, except in the control group (Lucinda *et al.*, 2010a,b).

Bioassay: In this experiment, after the end of osteoporosis induction, 60 animals were selected at random and divided evenly into five groups (n=6): Osteoporosis group (dexamethasone only); EGb1 group (Extract of *Ginkgo biloba* 28mg/Kg); EGb2 group (Extract of *Ginkgo biloba* 56mg/Kg); Alendronate group (sodium alendronate 0.2mg/animal/day) and Control group. The Control group was not submitted to osteoporosis induction and any treatment. The Alendronate, EGb1 and EGb2 groups were treated intragastrically, once a day, during 20 days (n=30) and 30 days (n=30), after the osteoporosis induction. The choice of EGb doses was based on previous studies (Lucinda *et al.*, 2010a,b).

The animals were euthanized on the 21st (n=30) and 31st (n=30) days. First they were anaesthetized intraperitoneally with Xylazine and Ketamine in doses of 180mg/Kg and 10mg/kg respectively, and then they were euthanized by total exsanguination via cardiac puncture. The right mandibles were removed and fixed in 4% phosphate-buffered formaldehyde for twenty four hours, the regions of the molar teeth were decalcified in an aqueous solution with 5 percent of nitric acid for two days and then processed for paraffin embedding. The right tibias were removed and frozen until the analysis.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry staining was performed using mouse monoclonal IgG_{2b} Bax (B-9) antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) raised against amino-acids 1-71 of Bax α of mouse origin and mouse monoclonal Bcl-2 (C-2) antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) raised against amino acids 1-205 of Bcl-2 human origin. Frontal 5- μ m-thick sections of the mandible were performed. Briefly the paraffin embedded tissues were deparaffinized, put in a solution of 0.05M citrate buffer pH 6.00 to amplify the signal, placed in a water bath (96°C for 40 min), and then cooled for 20 min at room temperature. The samples were washed in PBS solution for 3 times, 5 minutes each.

After, the endogenous peroxidase activity was blocked with a 3% hydrogen peroxidase solution for 10 min and washed in 3 changes of PBS for five minutes each. The samples were incubated individually with monoclonal antibody Bax overnight at 4°C in 1:500 diluted in 1.5% blocking serum in PBS, and in the same way the samples were incubated individually with Bcl-2 overnight at 4°C in 1:50 diluted in 1.5% blocking serum in PBS, after all samples were washed in 3 changes of PBS for 5 minutes each.

The ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), an avidin- biotinylated horseradish peroxidase complex was used as a detection reagent. The slides were incubated for 30 minutes with biotin-conjugated secondary antibody, approximately 1µg/ml, washed in 3 changes of PBS for 5 minutes each. Subsequently they were incubated for 30min with avidin biotin enzyme, washed in 3 changes of PBS for 5 minutes each. Afterwards, they were incubated in peroxidase substrate for 5 minutes and washed in deionized water for 5 minutes. The specificity of the immunoreactions was checked on hematopoietic bone marrow cells (internal cells). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin for 2 minutes. The negative controls were provided by replacing the primary antibody with serum.

Immunohistochemistry analysis

The mandible samples were analyzed in an optical microscope system Zeiss (Hallbergmoos, Germany) for digital capturing photomicrographs. All slides were analyzed at 250X and 400X by a pathologist. The cell count was conducted by one evaluator, who was unaware of the experimental groups. Bax and Bcl-2 expression was evaluated in the osteoblastic cells present in the peripheric region of the alveolar bone faced to the periodontal ligament in the interradicular region of the second molar (figure 1). The percentage of Bax and Bcl-2 positive cells was obtained by counting the total number of osteoblasts and also the

positive osteoblasts: $\% \text{ of Bax/Bcl-2 positive cells} = \frac{\text{positive osteoblast}}{\text{total number of osteoblasts}}$.

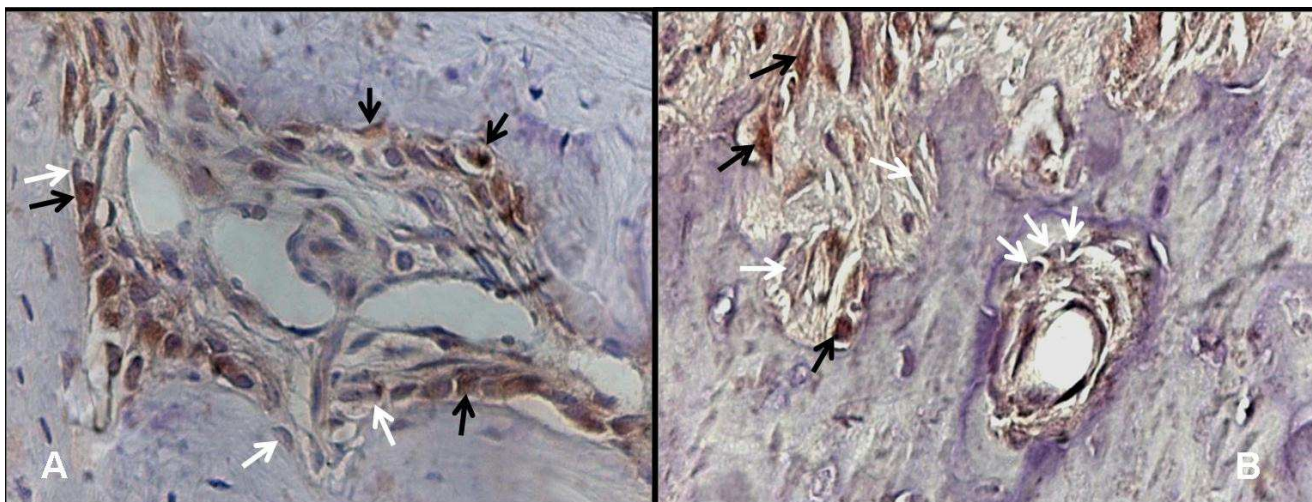


Figure 1- A: Bax expression in osteoblasts. Figure 1-B: Bcl-2 expression in osteoblasts. The white arrows shows the negative osteoblasts and the black arrows show the positive osteoblasts. Original magnification 400X.

X- ray density

Twenty four hours after the analyses, tibias were thawed for the x-ray procedure. All tibias were positioned in the same way in the Carestream In Vivo FX Pro (Carestream Molecular Imaging, New Haven, CT, USA) for best capture. The x-ray images were taken with the same energy level (35 KVP, Aluminum filter 0.8mm; $f \text{ stop } 2.8$ and the exposure time of 10s), and automatically converted to x-ray density units (XD) by the software. It was created a region of interest (ROI) in the image, the same evaluator drew all ROIs in the proximal tibial epiphysis using the manual ROIs panel guide from the Carestream Molecular Imaging Software; version 5.02 (Carestream Molecular Imaging, New Haven, CT, USA) and the x-ray density was obtained from this area of trabecular bone (figure 2).

Bone density (BD)

Although the images of the tibia for BD analysis were taken in the same way that the x-ray density, it was created on the image a region of interest (ROI) on the distal tibial

diaphysis delimited by a square (figure 2) using for the BD analysis the careastream bone density software (Careastream Molecular Imaging, New Haven, CT, USA) which measures the bone density of cylinder bones in the ROI automatically.

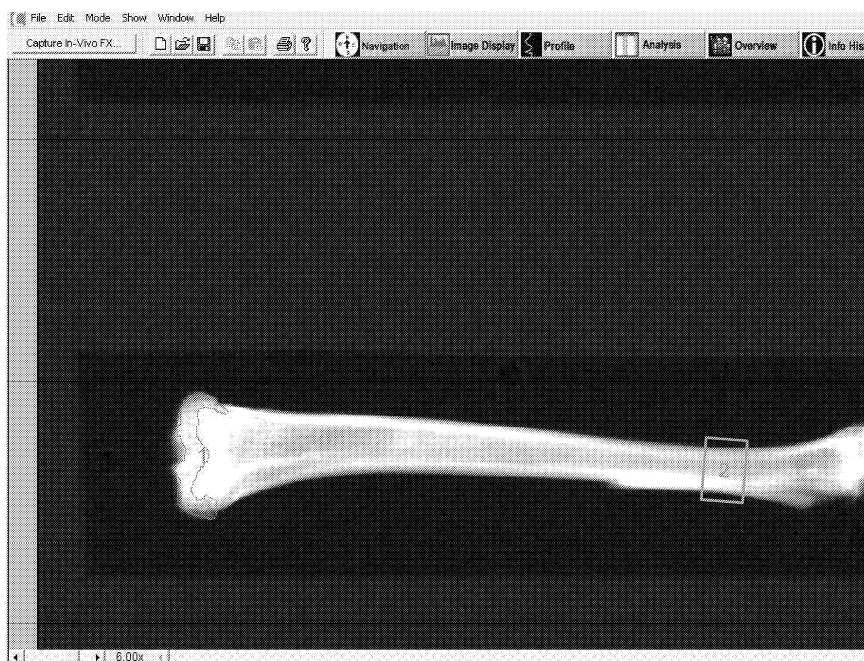


Figure 2: X-ray density of proximal tibial epiphysis and the bone density of the distal tibial diaphysis. The line in the proximal tibial epiphysis shows the trabecular region of interest (ROI) and the square shows the ROI in the distal tibial diaphysis. Carestream Molecular Imaging Software (version 5.02).

Statistical analysis

The data were expressed by (mean \pm standard deviation) and were analyzed for statistical significance using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's/ Dunnett'T3 post-hoc test. The control group was compared with the osteoporosis group using the Student's t-test or Mann-Whitney, as appropriate. $P < 0.05$ was considered significant.

Results and discussion

Glucocorticoids therapy induces osteoporosis through the decrease in calcium intestinal absorption, increase in renal calcium excretion, stimulated osteoclast activity as well

as suppression of bone formation (Lafage-Proust *et al.*, 2003). Another mechanism by which glucocorticoids affect bone is reducing the number of osteoblasts by apoptosis increasing pro-apoptotic proteins from the *bcl-2* gene family (Chang *et al.*, 2009). All those mechanisms of OIG reduce bone mass and increase the risk of fractures.

The low bone mass was seen in this study in the proximal tibial epiphysis through the significant increase in x-ray density in the osteoporosis group (figure 3) which was probably due to a lack of mineral content that allows the x-ray pass more easily through the sample, in other words, with less attenuation.

The EGb in all doses showed a significant decrease in the x-ray density (figure 3), thus the increase of x-ray opacity and of the tibia density, which led us to conclude that it was effective in restoring the low trabecular bone mass in the proximal tibial epiphysis. Likewise, Trivedi *et al* (2009) demonstrated by micro-CT analysis significant restoration of mineral bone density and microarchitectural parameters by EGb 761 in ovariectomized rats suggesting its potent bone restoring action.

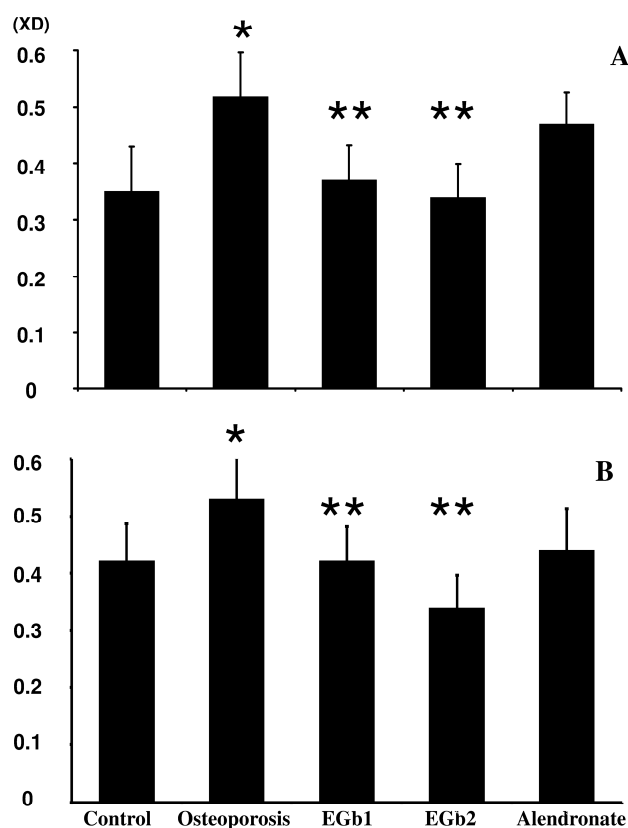


Figure 3: X ray density increased in osteoporosis group, the EGb treatment decreased the x ray density.

A: Twenty-day treatment; B: Thirty-day treatment.

Values are expressed in mean \pm S.D.

* $p < 0.05$ when comparing the osteoporosis group with the control (Student's t-test)

** $p < 0.05$ when comparing all groups, except control with the osteoporosis group (Dunnett's post-hoc test)

BD was significantly reduced in the osteoporosis group, however the treatment with alendronate and EGb did not increase significantly the BD in the tibial distal diaphysis which is composed predominantly of cortical bone (table 1). Oh *et al* (2008) calculated the bone mineral density in the femur condyle using an x-ray photograph with an image analyzer and EGb did not restore the bone mineral density in ovariectomized rats. Despite those results, Trivedi *et al* (2009) reported an increase in tibial cortical bone however they treated ovariectomized rats with 100mg/Kg of EGb during five weeks.

Table1: Bone density (BD) of the distal tibial diaphysis.

Groups (n=6)	BD 20 days (g/cm ³)	BD 30 days (g/cm ³)
Control	1.27±0.02	1.36±0.05
Osteoporosis	1.23±0.02 ^a	1.24±0.05 ^b
EGb1	1.24±0.03	1.27±0.05
EGb2	1.31±0.09	1.29±0.03
Alendronate	1.28±0.04	1.31±0.06

Values are expressed in mean±S.D.

a p<0.05 when comparing the osteoporosis group with the control (Student's t-test)

b p<0.05 when comparing the osteoporosis group with the control (Mann-Whitney test)

The *bcl-2* gene family encodes a large number of proteins that participate in programmed cell death, including the pro-apoptotic protein Bax and the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Verborgt *et al.*, 2002). In the present study, the expression of Bax was significantly higher and the expression of Bcl-2 decreased significantly in the mandibular alveolar bone in the osteoporosis group as showed in table 2, Mocetti *et al* (2001) showed an increase in the expression of Bax in osteoblast cells of animals treated with glucocorticoids, however in contrast with our findings they reported an increase in the expression of Bcl-2. Bax expression was also elevated in culture of osteoblast cells treated with glucocorticoids (Gohel *et al.*, 1999). A fall in Bcl-2 expression and a rise in Bax expression showed that the osteoblasts are responsive to the glucocorticoids treatment. These findings suggest that osteoblasts have a critical role in the mechanism of bone loss induced by glucocorticoids, thus the increase in osteoblasts apoptosis together with reduction in their replication, differentiation and bone formation can result in low bone mass (Chang *et al.*, 2009).

An important result of the present study is that the alendronate had a significant reduction in the expression of Bax (twenty-day treatment) and a significant increase in the expression of Bcl-2 (thirty-day treatment) by osteoblast cells of the mandibular alveolar bone probably reducing the apoptosis of these cells (table 2). Alendronate is an antiresorptive drug that acts directly in the osteoclast activity improving their apoptosis. However, it also impacts the osteoblasts as showed by Duque and Rivas (2007) and by us in the current study.

Furthermore, our alternative treatment with EGb was effective in decreasing the expression of the pro-apoptotic protein Bax and in increasing the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (table 2), giving credence to the hypothesis that EGb and alendronate increase the survival of osteoblasts and also may contribute to the therapy of GIO.

Table2: The percentage of Bax and Bcl-2 expression in osteoblast cells in the alveolar bone of the mandible

Groups	Bax 20 days	Bcl-2 20 days	Bax 30 days	Bcl-2 30days
(n=6)	(%)	(%)	(%)	(%)
Control	13.67±1.40	31.77±6.61	16.65±9.21	30.53±7.81
Osteoporosis	26.45±4.60 ^a	15.69±0.77 ^a	41.75±9.72 ^a	13.10±2.54 ^a
EGb1	20.43±4.91	24.50±5.63 ^c	16.08±3.00 ^b	21.41±4.44 ^c
EGb2	15.97±2.75 ^b	25.69±2.17 ^c	20.62±8.19 ^b	27.89±3.68 ^c
Alendronate	16.39±5.95 ^b	17.77±2.80	29.21±15.01	24.25±2.34 ^c

Values are expressed in mean±S.D.

^a p<0.05 when comparing the osteoporosis group with the control (Student's t-test)

^b p<0.05 when comparing all groups, except control with the osteoporosis group (Dunnett T3 post-hoc test)

^c p<0.05 when comparing all groups, except control with the osteoporosis group (Dunnett post-hoc test)

The EGb has anti-apoptotic properties, as showed in this and other studies (Smith and Luo, 2004, Smith *et al.*, 2002) and it was effective in protecting MC3T3-E1 an osteoblast-like cell from cellular damages and death when they were exposed to the action of free radicals increasing their proliferation *in vitro* (Brayboy *et al.*,2001). Mostly likely, the anti-apoptotic effect is due to the antioxidant action of flavonoids present in the constitution of the EGb that attenuate the reactive oxygen species by chelating pro-oxidant transitional metal ions (Gohil and Packer, 2002) and by promoting the expression of antioxidant proteins which in turn increase antioxidants metabolites such as glutathione (Smith and Luo, 2003).

Apart from this antioxidant action, EGb has estrogenic effect reported by Oh and Chung (2004), probably another mechanism to explain the reduction in the Bax expression by osteoblasts. Gohel *et al* (1999) showed a reduction in levels of Bax in the culture of osteoblasts exposed to glucocorticoids and treated with 17β -estradiol. The authors also showed *in vivo* and *in vitro* that 17β -estradiol reduced osteoblasts apoptosis induced by glucocorticoids.

As a result, the treatment with EGb increased the bone mineral content in the proximal tibial epiphysis, preserving not only the osteoblast cells from death but also their function in the same way that anabolic therapies improve bone formation by increasing the number or activity of mesenchimal stem cells and mature osteoblasts or by preventing their apoptosis (Marie and Kassem, 2011). To our knowledge the present study is the first one to evaluate the effect of the EGb in the expression of Bax and Bcl-2 proteins by osteoblasts of the mandibular alveolar bone after the GIO. Bcl-2 is responsible to protect cells from death by binding to pro-apoptotic proteins, such as Bax, Bcl-xs and Bad; thus it is the Bax/Bcl-2 ratio that plays an important role in the cells death (Gohel *et al.*, 2009).

Recent advances in the treatment of osteoporosis fractures have focused on the development of medications with bone formation effects (Nuttall and Gimble, 2004; Gimble

et al., 2006). *Ginkgo biloba* is a plant which is currently being used by the population for its therapeutic properties, however very little is known about its effects in osteoporosis due to lack of pre-clinical and absence of clinical studies. The pre-clinical studies suggest that EGb is a promising therapy to recover bone loss in estrogen depletion osteoporosis (Trivedi *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2008) and in the GIO (Lucinda *et al.*, 2010a, b).

In conclusion, the EGb, reduced the expression of Bax and increased the expression of Bcl-2 by osteoblasts in the mandibular alveolar bone and recovered the mineral content in the proximal tibial epiphysis. This study could form basis for further clinical trials with EGb in the GIO.

Acknowledgments

This work was financed by *Fundação Mineira de Amparo à Pesquisa* (APQ-00154-11 and 173/08). We would like to thank the doctors Fernando Monteiro Aarestrup and Taiza Stumpp Teixeira for helping us to standardize the immunohistochemical method, and finally Cassiana M Boya for the English review of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

References

- Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **258**:302-304.
- Bawa S. 2010. The significance of soy protein and soy bioactive compounds in the prophylaxis and treatment of osteoporosis. *J Osteoporos* **8**:1-8.
- Bras M, Queenan B, Susin S. 2005. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* **70**:231-9.
- Brayboy JR, Chen XW, Lee YS, Anderson JJB. 2001. The protective effects of Ginkgo

biloba extract (EGb 761) against free radical damage osteoblast-like bone cells (MC3T3-E1) and the proliferative effects of EGb 761 on these cells. *Nutr Res* **21**:1275-85.

Chang JK, Li CJ, Liao HJ, Wang CK, Wang GJ, Ho ML. 2009. Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology* **258**:148-56.

Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwei N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, Schoenberger NE. 2000. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil* **81**:668-78.

Duque G, Rivas D. 2007. Alendronate has an anabolic effect on bone through the differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* **22**:1603-11.

Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME. 2006. Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* **98**:251-66.

Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G. 1999. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology* **140**:5339-47.

Gohil K, Packer L. 2002. Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of Ginkgo biloba extract, EGb 761. *Cell Mol Biol* **48**:625-31.

Henneicke H, Herrmann M, Kalak R, Brennan-Speranza, TC, Heinevetter U, Bertollo N, Day RE, Huscher D, Buttgereit F, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H. 2011. Corticosterone selectively targets endo-cortical surfaces by an osteoblast-dependent mechanism. *Bone* **49**:733-42.

Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. 2001. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res* **16**:975-84.

Lafage-Proust MH, Boudignon B, Thomas T. 2003. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiological data and recent treatments. *Joint Bone Spine* **70**:109-18.

Lucinda LMF, Oliveira TT, Amaral PS, Peters VM, Reis JEP, Guerra MO. 2010. Radiographic evidences of mandibular osteoporosis improvement in Wistar rats treated with *Ginkgo biloba*. *Phytother Res* **24**:264-7a.

Lucinda LMF, Vieira BJ, Oliveira TT, Sá RC, Peters VM, Reis JE, Guerra MO. 2010. Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with Ginkgo biloba extract: a histomorphometric study of mandible and femur. *Fitoterapia* **81**:982-7b.

Marie PJ, Kassem M. 2011. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur J Endocrinol* **165**:1-10.

Memon SA, Moreno MB, Petrak D, Zacharchuk CM. 1995. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma. *J Immunol* **155**:4644-52.

- Mocetti P, Silvestrini G, Ballanti P, Patacchiolo FR, Di Grezia R, Angelucci L, Bonucci E. 2001. Bcl-2 and Bax expression in cartilage and bone cells after high dose of corticosterone treatment in rats. *Tissue Cell* **33**:1-7.
- Nuttall ME, Gimble JM. 2004. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* **4**:290-4.
- Oh SM, Chung KH. 2004. Estrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. *Life Sci* **74**:1325-35.
- Oh SM, Kim HR, Chung KH. 2008. Effects of Ginkgo biloba on in vitro osteoblasts cells and ovariectomized rat osteoclasts cells. *Arch Pharm Res* **31**:216-24.
- 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. 2007. Biphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: a review of 35 cases and an evaluation of its frequency in multiple myeloma patients. *Leuk Lymphoma* **48**:1852-4.
- Smith JV, Burdick AJ, Golik P, Khan I, Wallace D, Luo Y. 2002. Antiapoptotic properties of Ginkgo biloba extract EGb761 in differentiated PC12 cells. *Cell Mol Biol* **48**:699-707.
- Smith JV, Luo Y. 2003. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by Ginkgo biloba extract EGb 761. *J Alzheimers Dis* **5**:287-300.
- Smith JV, Luo Y. 2004. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:465-72.
- Trivedi R, Kumar A, Gupta V, Kumar S, Nagar GK, Romero JR, Dwivedi AK, Chattopadhyay N. 2009. Effects of Egb 761 on bone mineral density, bone microstructure, and osteoblast function: Possible roles of quercetin and kaempferol. *Mol Cell Endocrinol* **302**:86-91.
- Tsujimoto Y. 1998. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis:apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* **3**:697-707.
- Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. 2002. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: Complementary roles in bone remodeling regulation. *J Bone Miner Res* **17**:907-14.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**:856-9.

Aceite do artigo I pelo periódico *Phytotherapy Research*

30 April 2012

Dear Dr Lucinda,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Effect of the Ginkgo biloba extract in the expression of Bax, Bcl-2 and bone mineral content of Wistar rats with glucocorticoids-induced-osteoporosis." in its current form for publication in *Phytotherapy Research*.

A signed copyright transfer agreement is needed for publication. If you have not already provided us with one you can access the copyright transfer agreement at:

<http://media.wiley.com/assets/1540/86/ctaaglobal.pdf>

To enable the publisher to disseminate the author's work to the fullest extent, the author must sign a Copyright Transfer Agreement, transferring the copyright of the article from the author to the publisher.

If you have not yet uploaded a CTA, please ensure that you have identified the form with the manuscript ID number; scan your signed CTA and e-mail to ptrproofs@wiley.com stating the manuscript ID number in the subject line of the e-mail.

Please note that this does not take away your rights to reuse your own article after publication, and that if the copyright belongs to your employing institution, they should sign the form instead of you.

If you have already provided us with the signed form, you do not need to do anything at this stage. You will be contacted by our typesetters/copyeditors shortly.

Thank you for your contribution.

Sincerely,

Rachael Bilginer
Managing Editor
Phytotherapy Research
phytotherapy.research@wiley.co.uk

Phytotherapy Research is participating in the PEER project, which aims to monitor the effects of systematic self-archiving (author deposit in repositories) over time. PEER is supported by the EC eContentplus programme

(http://ec.europa.eu/information_society/activities/econtentplus/index_en.htm).

As your manuscript has been accepted for publication you may be eligible to participate in the PEER project. If you are based in the European Union, your manuscript will be archived by Wiley-Blackwell on your behalf, as part of this project. For further information please visit the PEER project website at <http://www.peerproject.eu/>.

Anexo I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal


C E R T I F I C A D O –

Certificamos que o Protocolo nº 026/2009 – CEEA sobre “Efeito do *Gingko biloba* na apoptose de células osteoblásticas e regulação do metabolismo ósseo mineral de ratas wistar com osteoporose”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Martha de Oliveira Guerra, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 04/08/2009.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 026/2009 - CEEA about “Efeito do *Gingko biloba* na apoptose de células osteoblásticas e regulação do metabolismo ósseo mineral de ratas wistar com osteoporose” – Martha de Oliveira Guerra - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 04/08/2009.

Juiz de Fora, 04 de Agosto de 2009


Presidente/CEEA


Secretário/CEEA