

LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE
Ginkgo biloba NA OSTEOPOROSE INDUZIDA POR
GLICOCORTICÓIDE EM RATAS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Saúde Brasileira.

Orientadora: Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra

Co-orientadora: Profa. Dra. Tânia Toledo de Oliveira

**Juiz de Fora
2009**

Lucinda, Leda Marília Fonseca

Avaliação do efeito protetor do extrato de *Gingko biloba* na osteoporose induzida por glicocorticóide em ratas Wistar / Leda Marília Fonseca Lucinda. -- 2009.

131 f. :il.

Dissertação (Mestrado em Saúde)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Osteoporose. 2. Gingko biloba. 3. Ratos. I. Título

CDU 616.71-007.234

LEDA MARÍLIA FONSECA LUCINDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO EXTRATO DE *Ginkgo biloba* NA
OSTEOPOROSE INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDE EM RATAS WISTAR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovado em 30 de abril de 2009.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Neuza Maria Souza Picorelli Assis
Universidade de Juiz de Fora

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

Aos meus pais, Odaléa e José Jader, meu tio José Henrique e meu irmão Garrone,
por terem sido meus mais fiéis amigos me apoiando e fortalecendo em todos os
momentos, inclusive os mais difíceis.

Ao meu namorado Maycon, pela sua amizade, amor e extrema ajuda durante
todo o desenvolvimento desse trabalho.

Agradecimentos

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

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Martha de Oliveira Guerra, por ter me dado a grande oportunidade de ser sua aluna, pela sua paciência, 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. Rita de Cássia da Silveira e Sá por ter me admitido e sido minha primeira orientadora no Centro de Biologia da Reprodução, por ter me iniciado na pesquisa científica. Agradeço ainda a grande ajuda na revisão da língua inglesa em meus artigos científicos e por seus ensinamentos.

À minha professora de língua inglesa Cassiana Monteiro Boya pelo auxílio na tradução dos artigos científicos e também por seus ensinamentos.

À Professora Dra. Tânia Toledo de Oliveira pela oportunidade de aprender em seu centro de pesquisa, pela sua co-orientação durante o desenvolvimento desta pesquisa e por ter me dado a oportunidade de trazer a técnica de indução de osteoporose utilizada em seu laboratório na Universidade Federal de Viçosa para o Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora.

À Professora Dra. Vera Maria Peters pela colaboração durante o desenvolvimento do cronograma e planejamento deste trabalho. Agradeço ainda o

tempo dispensado, paciência e ensinamentos durante a análise das lâminas histológicas.

À Professora Dra. Beatriz Julião Vieira pela orientação, dedicação, paciência e ensinamentos durante a análise histomorfométrica deste trabalho, sem sua ajuda este trabalho não seria possível.

À radiologista Catherine Morello e ao professor José Henrique Fonseca por terem permitido o uso do sistema de radiologia digital do Centro de Odontologia Digital da clínica CROE.

Ao Jader Garrone Fonseca Lucinda pela ajuda na padronização dos exames radiográficos, agradeço sua paciência, carinho e principalmente por ter me levado tantas vezes à Viçosa com tanta boa vontade.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio do Departamento de Estatística – ICE – UFJF, pelo auxílio na análise estatística.

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

Aos professores Marcos Vinicius de Paula Queiroz e Neuza Maria Souza Picorelli Assis pelas orientações e ensinamentos durante meus projetos de iniciação científica e participação nas bancas de pré-qualificação e qualificação.

Aos meus grandes amigos da pós-graduação, Roberto Sotto Maior, Lúcia Piúma, Luciana Valente, Juliana Raso, Pedro Bellei, Sônia Brugiollo, Juliana Polisseni e aos demais colegas que caminharam junto comigo na busca de mais um grande objetivo de nossas vidas.

Aos estagiários do centro de Biologia da Reprodução que nos proporcionam condições de trabalho e auxílio durante todo o experimento, principalmente às

alunas Pollyanna Amaral Salvador e Marcella Martins por terem me auxiliado e apoiado durante todo o meu mestrado, vocês se tornaram grandes amigas.

À toda a equipe do nosso biotério e aos técnicos e secretários do CBR, Paulo Sérgio, Rosimar, Evelise, Ana Paula, Flávia, Graça 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 em experimentação animal.

À FAPEMIG e também à coordenação do curso de Pós-Graduação em Saúde pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço novamente à FAPEMIG pelo apoio financeiro durante todo o desenvolvimento deste trabalho através das redes mineiras 2824/05 e 2827/05 e projeto Demanda Universal (FAPEMIG)-CDS APQ-20.

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

*“Ainda pior que a convicção do não,
É a incerteza do talvez,
É a desilusão de um quase!*

*(...) Se a Virtude estivesse mesmo no meio termo,
O mar não teria ondas,
Os dias seriam nublados
E o arco-íris em tons de cinza.*

*(...) Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais horas realizando que sonhando...
Fazendo que planejando...
Vivendo que esperando...”*

(Quase-Luiz Fernando Veríssimo)

Resumo

Introdução: A osteoporose é caracterizada pela diminuição do volume ósseo total e entre as principais causas da doença estão a redução de estrogênio, durante a menopausa e o uso crônico de glicocorticóides. Diversos produtos são usados em seu tratamento e entre estes alguns produtos naturais tais como os fitoestrógenos. Estudos “in vitro” com o extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) demonstraram efeito estrogênico e ação protetora sobre os osteoblastos. Portanto o EGb poderia ser importante no tratamento da osteoporose. Métodos: 72 ratas foram distribuídas em 6 grupos: controle, osteoporose, controle positivo (alendronato de sódio - 0,2mg/Kg/dia), EGb1 (14 mg EGb/Kg/dia), EGb2 (28 mg EGb/Kg/dia) e EGb3 (56 mg EGb/Kg/dia). A osteoporose foi induzida através de injeções intramusculares de dexametasona na dose de 7mg/Kg, uma vez por semana, durante cinco semanas. Após a indução se iniciou o tratamento de 20 e 30 dias, exceto no grupo controle. Após a eutanásia, foram removidas as mandíbulas esquerdas para análise radiográfica digital, seguiu-se posteriormente a avaliação da cortical mandibular e do suporte ósseo periodontal (SOP) na superfície mesial e distal do primeiro molar mandibular. Para a análise histomorfométrica foram removidos as mandíbulas direitas e os fêmures direitos, para avaliação do percentual ósseo trabecular do fêmur (POT) e do percentual ósseo alveolar (POA) do segundo molar mandibular. Os grupos controles foram comparados aos grupos osteoporose (teste “t” Student). Os demais grupos, exceto os controles, foram analisados através do teste de

ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey ou Dunnett ($p < 0,05$). Resultados: Foi observado através da análise radiográfica mandibular que o glicocorticóide causou diminuição do SOP, o alendronato de sódio apresentou recuperação do percentual do SOP, da mesma forma que o EGb nos tratamentos de 20 e 30 dias nas doses de 28mg/kg/dia e 56mg/kg/dia. O grupo EGb3 apresentou maior espessura cortical mandibular nos tratamentos de 20 e 30 dias. Através da histomorfometria dos animais tratados por 20 e 30 dias foi observado que o glicocorticóide causou diminuição no POT da epífise do fêmur e do POA mandibular ($p < 0,05$). O grupo controle positivo apresentou aumento significativo do POT do fêmur (30 dias) quando comparado ao grupo osteoporose. O POA mandibular do grupo controle positivo apresentou aumento não significativo em relação ao grupo osteoporose (20 e 30 dias). Os grupos EGb 1 e EGb 2 apresentaram um aumento ($p < 0,05$) do POT do fêmur quando comparados aos animais do grupo osteoporose (20 e 30 dias). Da mesma forma os grupos EGb 2 e EGb 3 (20 dias) e os grupos EGb1, EGb2 e EGb3 (30 dias) apresentaram aumento significativo do POA mandibular quando comparado ao grupo osteoporose. Conclusão: O EGb recuperou a osteoporose induzida por glicocorticóide nos parâmetros avaliados neste estudo, sugerindo que o EGb possa ser efetivo no tratamento da osteoporose.

Palavras-chave: Osteoporose. Glicocorticóide. *Ginkgo biloba*..

Abstract

Introduction: Osteoporosis is a disease characterized by the reduction of bone volume. Among the main causes of osteoporosis is the reduction of the levels of estrogen and the chronic use of glucocorticoids. Several products are used on the osteoporosis treatment, including natural products, among them some promising alternatives as the phytoestrogens. *In vitro* studies showed that the extract of *Ginkgo biloba* (EGb) has a estrogenic effect and a protect action on the osteoblasts cell. Therefore the EGb may be important in the treatment of osteoporosis. Methods: 72 female rats were divided into six groups: control, osteoporosis, positive control (sodium alendronate-0.2mg/Kg/day), EGb1 (14mg/Kg/day), EGb2 (28mg/Kg/day) and (56mg/Kg/day). Osteoporosis induction was done trough intramuscular injection of dexamethasone in a dose of 7mg/Kg, once a week, during five weeks. Treatments were conducted after osteoporosis induction for 20 and 30 days. Following euthanazia, the left mandibles were removed for the digital radiographic analysis. The cortical and the periodontal bone support (PBS) at the mesial and distal surfaces of the first molar were analyzed. For the histomorphometric analysis the right femurs and mandibles were removed to evaluate the percentage of the trabecular bone (PTB) of the femur epiphysis and the percentage of the alveolar bone (PAB) of the interradicular septum of the second molar.

The control groups were compared with the osteoporosis group (Student's t-test). The others groups, except the control groups, were analyzed by ANOVA test followed by Tukey or Dunnett's post-hoc test ($p < 0.05$). Results: It was observed trough the mandibular radiographic analysis that the glucocorticoid caused the PBS

reduction, the sodium alendronate recovered the percentage of PBS in the same way that EGb in the 28mg/kg/day and 56mg/kg/day doses in the treatments of 20 and 30 days. The EGb3 showed increase in the cortical mandibular thickness in the treatments of 20 and 30 days. Through the histomorphometric analysis of the animals treated for 30 and 20 days, it was observed that glucocorticoids reduced the PTB of the femur and the PAB of the mandible ($p < 0,05$). The positive control group (30 days) showed a statistical significant increase of the PTB of the femur when compared to the osteoporosis group (30 days). The PAB of the mandible in the positive control group showed no significant increase when compared to the osteoporosis group (20 and 30 days). The groups EGb1 and EGb2 groups showed an increase of the PTB of the femur when compared to the osteoporosis group (20 and 30 days), in the same way the EGb2 and EGb3 groups (20 days) and the EGb1, EGb2, and EGB3 groups (30 days) showed a statically significant increase of the PAB when compared to the osteoporosis group. Conclusion: The EGb recovered the effects oft glucocorticoid-induced-osteoporosis in the evaluated parameters of this study, it suggests that the extract of *Ginkgo biloba* may be effective in the treatment of osteoporosis.

Key words: Osteoporosis, glucocorticoids, *Ginkgo biloba*, sodium alendronate, radiography, histomorphometry, rats.

Lista de figuras

Figura 1 - Aspecto histológico normal do tecido ósseo trabecular (trabéculas ósseas alongadas e espaços medulares)	20
Figura 2 - Aspecto histológico normal do tecido ósseo compacto	20
Figura 3 - Imagem histológica da região de osso alveolar.....	24
Figura 4 - Osso com aspecto normal (A) e osteoporótico (B)	25
Figura 5 - Programa Axiovision [®] (Versão 4.5 para Windows), para morfometria semi-automática de fotomicrografias.....	55
Figura 6 - (A) Desenho esquemático da epífise proximal do fêmur, onde A, B e C foram as regiões determinadas para a análise histomorfométrica do tecido ósseo trabecular. (B) Desenho esquemático da região interradicular selecionada para a análise do tecido ósseo alveolar mandibular.....	55
Figura 7 - Equipamento utilizado na realização do exame radiográfico	56
Figura 8 - Medida da cortical mandibular, onde A foi o ponto mais anterior na cortical, C o ponto mais posterior e B o ponto médio entre eles. Medida do suporte ósseo periodontal, onde D corresponde ao ápice radicular, E à crista óssea e F à ponta da cúspide do molar.....	58

Lista de abreviaturas

DMO - densidade mineral óssea

EGb - extrato de *Ginkgo biloba*

TRH - Terapia de reposição hormonal

SOP - Suporte ósseo periodontal

SOPM - Suporte ósseo periodontal mesial

SOPD - Suporte ósseo periodontal distal

POT- Percentual ósseo trabecular

POA - Percentual ósseo alveolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 TECIDO ÓSSEO.....	18
2.1.1 Osso alveolar.....	23
2.2 OSTEOPOROSE: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO	23
2.3 EPIDEMIOLOGIA E FRATURAS NA OSTEOPOROSE.....	28
2.4 FATORES DE RISCO PARA OSTEOPOROSE.....	30
2.5 OSTEOPOROSE E ODONTOLOGIA.....	30
2.6 MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DE OSTEOPOROSE	33
2.7 PREVENÇÃO E TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE	35
3 HIPÓTESE	48
4 OBJETIVOS	49
4.1 OBJETIVO GERAL	49
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
5 MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 ANIMAIS	50
5.1.1 Condições de alojamento	50
5.2 EXTRATO DE GINKGO BILOBA	50
5.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	51
5.3.1 Indução de osteoporose	51
5.3.2 Grupo controle.....	51
5.3.3 Coleta de material para análises	52
5.3.4 Histomorfometria	52
5.3.5 Análise radiográfica	54
5.3.5.1 Análise da espessura cortical óssea mandibular	55
5.3.5.2 Análise radiográfica do suporte ósseo alveolar	56
5.4 ANÁLISE ESTÁTISTICA	57
6 ASPECTOS ÉTICOS	58
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59

7.1 Resumo artigo I - Radiographic evidences of mandibular osteoporosis improvement in Wistar rats treated with <i>Ginkgo biloba biloba</i>	60
7.2 Resumo artigo II - Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with <i>Ginkgo biloba</i> extract: a histomorphometric study.....	62
7.3 Resumo artigo III - Efeito do extrato de <i>Ginkgo biloba</i> na osteoporose induzida em ratas Wistar.....	64
8 COMENTÁRIOS FINAIS	66
9 CONCLUSÃO	68
10 REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE	78

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 e mulheres na pós-menopausa (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).

O conhecimento do metabolismo ósseo, e suas patologias são imprescindíveis ao cirurgião-dentista. Doenças como a osteoporose constitui-se em um desafio, principalmente nas áreas de periodontia, cirurgia bucomaxilofacial, prótese, ortodontia e implantodontia (LANDIM; JUNQUEIRA; ROCHA, 2002).

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 usados e 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 isorhamnetina (OH; CHUNG, 2004). A quercetina e o kaempferol foram efetivos em inibir *in vitro* a atividade de reabsorção dos osteoclastos (WATTEL et al., 2003). 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).

Diante do exposto e na busca de métodos novos e alternativos ao tratamento da osteoporose, este trabalho se propõe a avaliar os efeitos do EGb sobre a osteoporose mandibular e femural induzida por glicocorticóides em ratas Wistar.

2 Revisão da literatura

2.1 Tecido ósseo

A descrição do tecido ósseo que se segue está baseada em Lemos et al. (1994) e Szejnfeld (2000).

O tecido ósseo apresenta dois tipos macroscópicos, o tecido ósseo compacto e o tecido ósseo trabecular. O primeiro, também chamado osso cortical, se encontra na periferia dos ossos e corresponde a aproximadamente 80% de toda massa esquelética. Já o tecido ósseo trabecular ou esponjoso possui uma rede de trabéculas e espaços intercomunicantes, de localização mais central, denominada cavidade medular, que abriga a medula óssea 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 externa e interna dos ossos são revestidas respectivamente pelo endóstio e perióstio. Este último 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

periósteo responde com neoformação óssea subperiosteal de formas diferentes, configurando a reação periosteal.



Figura 1: Aspecto histológico normal do tecido ósseo trabecular (trabéculas ósseas alongadas e espaços medulares)
 Fonte: Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp: <http://www.fcm.unicamp.br/deptos/anatomia/lamossol.html>

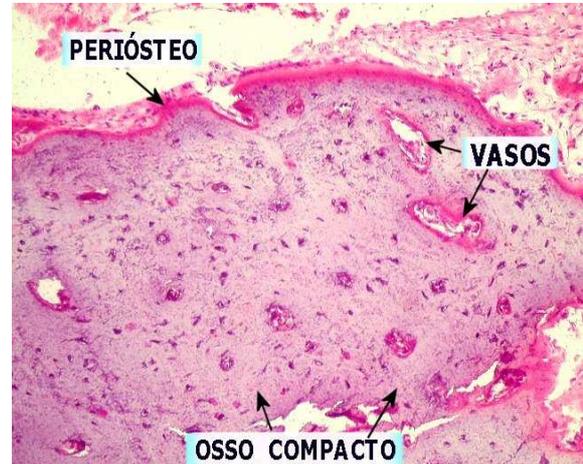


Figura 2: Aspecto histológico normal do tecido ósseo compacto
 Fonte: Faculdades de Ciências Médicas – Unicamp: <http://www.fcm.unicamp.br/deptos/anatomia/lamossol.html>

O tecido ósseo contém três tipos de células: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos. Os osteoblastos originam-se de células primitivas mesenquimais que são células osteoprogenitoras com capacidade de diferenciação, produção de tecido ósseo, cartilaginoso, fibroso e tipos intermediários: osteocondróide, fibrocondróide e osteofibrocondróide. 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 no plasma é usada como um marcador bioquímico de formação óssea.

Estas células podem permanecer como osteoblastos ativos, ou serem circundadas por matriz e se tornar osteócitos ou ainda estarem relativamente

inativas e formar células de superfície (*lining cells*) (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.

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, que resultam da sua atividade reabsortiva. Eles são as células responsáveis pela degradação da matriz óssea, tanto dos componentes minerais como os orgânicos. Os osteoclastos quando aderidos à superfície óssea, acidificam o compartimento extracelular. 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), inicia-se o processo de degradação dos seus componentes.

A principal enzima produzida pelo osteoclasto é a fosfatase ácida tartato resistente, que é um marcador bioquímico de reabsorção óssea. Além dela a piridinolina e a hidroxiprolina, são marcadores de degradação do colágeno 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%) (COTRAN, KUMAR; COLLINS, 2000).

A matriz orgânica, também conhecida como matriz osteóide, é constituída principalmente por colágeno tipo I e, em menor quantidade pelo colágeno tipo IV. Esta matriz apresenta também substância fundamental amorfa com outras proteínas como proteoglicanos, fosfoproteínas, proteína morfogenética do osso, sialoproteína, glicoproteína ácida óssea, trombospondina, proteolípídeo ósseo, osteonectina, osteocalcina, enzimas (colagenases, elastases, fosfatase alcalina óssea, fosfatase ácida), hormônios (hormônio da paratireóide, calcitriol, calcitonina) e outros metabólitos necessários ao metabolismo ósseo. 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.

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 da hidroxiapatita e colágeno.

O tecido ósseo possui também capacidade de crescimento e remodelação através de reabsorção e neoformação, processos esses mais evidentes e intensos durante o crescimento. Para manter adequadamente a homeostasia mineral do osso, o esqueleto é continuamente destruído e reconstruído, por um processo denominado remodelação ou remanejamento ósseo, remodelando-se, portanto, durante toda a vida.

A comunicação que ocorre entre osteoclastos e osteoblastos sobre a superfície trabecular e no sistema harvesiano, é conhecida como acoplamento. A ativação da seqüência de eventos celulares responsáveis pela remodelação é controlada localmente pelo microambiente do osso. A seqüência é a mesma: reabsorção óssea mediada por osteoclastos, seguida de formação óssea pelos osteoblastos, com finalidade de reparo ao dano ósseo. Esse processo 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. 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 aumento acentuado da reabsorção óssea desencadeia a osteoporose, com perda de resistência e integridade do osso, resultando em fraturas após mínimos traumas.

2.1.1 Osso Alveolar

O processo alveolar se forma cedo durante a vida fetal, com deposição de mineral em pequenos focos da matriz mesenquimatosa, que circunda os germes dentários. Essas pequenas regiões calcificadas aumentam de tamanho, unem-se são reabsorvidas e remodelam-se até que se forme uma massa contínua de osso em torno dos dentes completamente erupcionados. Esse processo alveolar desenvolve-se em conjunto com a erupção dentária, e é gradualmente reabsorvido com a perda dos dentes. As paredes dos alvéolos são revestidas por osso compacto, que se relaciona na região interproximal com o osso esponjoso (FIGUEIREDO; PARRA, 2002).

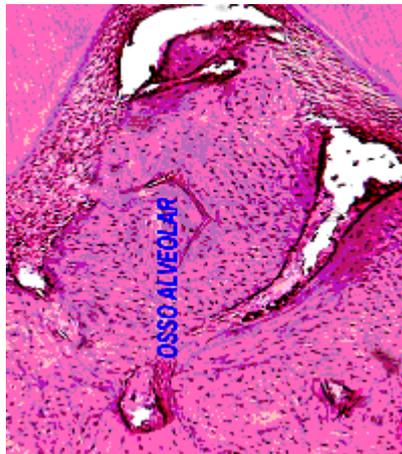


Figura 3: Imagem histológica da região de osso alveolar.

2.2 Osteoporose: conceito e classificação

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 (HARA et al., 2001; DERVIS, 2005). Hiraí 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).

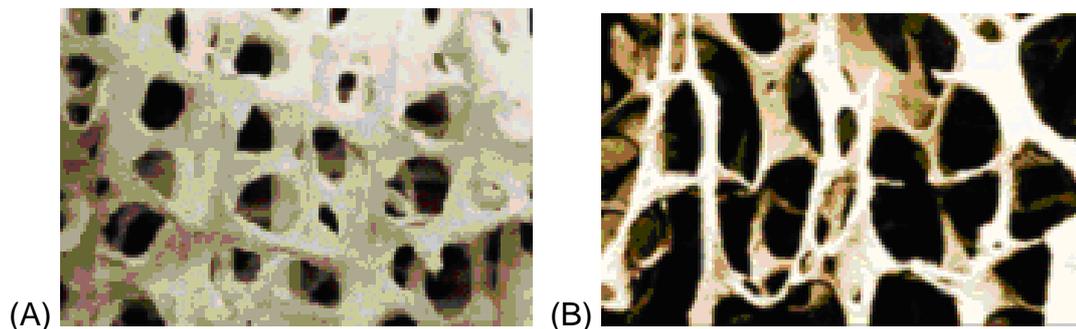


Figura 4: Osso com aspecto normal (A) e osteoporótico (B)

Fonte: Dráuzio Varella-entrevistas

http://www.drauziovarella.ig.com.br/entrevistas/osteoporose_zerbini.asp

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 padrão inferior ao valor médio de adultos jovens normais apresentam osteopenia. Já os indivíduos em que a DMO é maior que 2,5 desvios padrão abaixo desta média devem ser considerados como tendo osteoporose, e naqueles cujo valor for maior que 2,5 desvios padrão 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 no nível 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 glicocorticóides, anticonvulsivantes, heparina, ciclosporina A, etanol e outros (SZEJNFELD, 2000; NETO et al., 2002).

Os glicocorticóides são antiinflamatórios esteroidais amplamente utilizados para diversas finalidades médicas, tais como doenças auto-imunes, asma, doenças do colágeno e doença renal crônica. Talvez, sua maior limitação seja o impacto negativo sobre a massa óssea (GREGÓRIO, 2005). Fraturas ocorrem em 30-50% dos pacientes expostos a excessos de glicocorticóides (SHAKER; LUKERT, 2005).

A fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóides, ainda não está bem estabelecida, dependendo de múltiplas ações, locais e sistêmicas, que determinam o aumento da reabsorção e diminuição da formação óssea. A histomorfometria mostra diminuição do volume ósseo total com afinamento das trabéculas ósseas, redução de proliferação e função osteoblástica (SZEJNFELD, 2000).

A osteoporose induzida por glicocorticóide ocorre em duas fases: uma rápida, mais precoce, na qual ocorre a reabsorção excessiva de osso: e uma mais lenta, fase progressiva na qual a densidade mineral óssea declina pelo prejuízo na formação óssea (MAZZIOTI et al., 2006).

As células ósseas apresentam receptores para glicocorticóides, estes esteróides em concentrações fisiológicas são importantes para diferenciação e função das células ósseas. Porém em doses farmacológicas, os glicocorticóides podem alterar a atividade dessas células, favorecendo a perda de massa óssea (LANNA; MONTENEGRO Jr.; PAULA, 2003). Esses medicamentos atuam sobre a atividade e diferenciação do osteoblasto via osteoprotegerina/ proteína RANKL (receptor do ativador do fator nuclear ligante Kappa B), aumentando a atividade absorptiva, e ainda atuam sobre a apoptose dos osteócitos. Eles são responsáveis, também, pela diminuição dos níveis séricos de osteocalcina, fosfatase alcalina e pró-colágeno I, alterando os mecanismos responsáveis pela regulação da reparação óssea (CANALIS; AVIOLI, 1992; GREGÓRIO, 2005).

Os dados sobre os efeitos dos glicocorticóides nos osteoclastos são contraditórios. Existem evidências que os glicocorticóides aumentam a formação de osteoclastos a partir das células precursoras na medula óssea. Entretanto, os glicocorticóides também aumentam a apoptose dessas células quando maduras. Na osteoporose induzida por glicocorticóides, ocorre aumento da erosão na superfície do tecido ósseo, porém com número reduzido de osteoclastos. Esses achados podem sugerir uma redução no recrutamento de osteoblastos para os locais onde o

osso está sendo reabsorvido, não havendo preenchimento completo das lacunas de reabsorção por um período maior que o normal (SZEJNFELD, 2000).

Além desses efeitos sobre as células ósseas, os glicocorticóides aumentam a excreção de cálcio renal e diminuem a reabsorção intestinal de cálcio. O balanço negativo de cálcio devido às mudanças no transporte de cálcio renal e intestinal é responsável pelo hiperparatireoidismo secundário em pacientes tratados com glicocorticóides. Em relação aos hormônios sexuais, ele inibe 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 no desencadeamento da osteoporose (SZEJNFELD, 2000; MANELLI; GIUSTINA, 2000).

2.3 Epidemiologia e fraturas na osteoporose

A osteoporose afeta 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 um maior pico de massa óssea, e também devido às mudanças hormonais advindas da osteoporose. 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).

Em estudo realizado por Johnell et al. (2004) foram identificados 2.847 pacientes, com fraturas no antebraço, quadril, ombros e coluna. A mortalidade foi calculada em idades específicas depois da fratura e comparada com a mortalidade da população geral na mesma idade e sexo. Houve alta mortalidade imediatamente após as fraturas. Pacientes com fraturas de ombro e antebraço tiveram maior índice de sobrevivência (64% e 74% respectivamente) do que fraturas de quadril (41%), o índice de sobrevivência foi menor para fraturas de vértebras (28%). Estas fraturas

tiveram um alto índice de mortalidade comparado com a população geral, sendo mais pronunciado logo após da fratura.

2.4 Fatores de risco para a osteoporose

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).

2.5 Osteoporose e a odontologia

Na menopausa a privação de estrogênio, associada com fatores relacionados à idade, aumenta o risco para o desenvolvimento de osteoporose e doenças orais. Os achados clínicos bucais mais comuns na mulher pós-menopausa incluem: redução do fluxo salivar, maior propensão às cáries, alterações do paladar, gengivite, periodontite e osteoporose maxilar, o que torna a maxila imprópria para tratamentos protéticos convencionais e implantes dentários (LI; NISHIMURA, 1994; FRIEDLANDER, 2002). Carreno; Barbosa; Pereira (2002) relataram que na mandíbula as áreas mais acometidas pela osteoporose são o corpo e o côndilo da

mandíbula, tornando-se importante que pacientes de risco para osteoporose evitem traumatismos nessa região da face.

Hirai et al. (1993) estudaram em pacientes edêntulos idosos a relação entre altura do rebordo alveolar residual da mandíbula e a severidade da osteoporose. Nestes pacientes a altura do rebordo alveolar residual estava diminuída e com a osteoporose o problema se agravou, pois houve rápida redução deste rebordo comparado com os pacientes não osteoporóticos.

A reabsorção do rebordo alveolar já é esperada quando existe perda de dentes, no estudo citado anteriormente foi demonstrado que a osteoporose acelera este processo de reabsorção do rebordo alveolar, prejudicando a reabilitação protética dos pacientes. O dentista então deve estar atento aos pacientes com história de osteoporose, para que haja um correto encaminhamento médico e tratamento da doença.

Alguns estudos obtiveram uma correlação positiva entre a densidade mineral óssea da mandíbula e a da coluna lombar, fêmur e antebraço. Estes ossos são diretamente comprometidos pela osteoporose, sugerindo então que a mandíbula pode ser também comprometida por esta doença (JIANG; MATSUMOTO; FUJII 2003; DERVIS, 2005). Devido a esta relação da densidade mandibular com os outros ossos do esqueleto, tem se especulado que a osteoporose poderia afetar a morfologia da cortical mandibular. Bollen et al. (2000) avaliaram as mudanças morfológicas na cortical mandibular (erosão com aumento da porosidade, e diminuição da espessura) em radiografias panorâmicas de pacientes idosos com

presença de fraturas osteoporóticas. Seus resultados demonstraram que pacientes com história de fraturas por osteoporose tendem a ter aumento da reabsorção e diminuição da espessura cortical mandibular.

Taguchi et al. (1995) relacionaram alguns sinais orais à osteoporose, para avaliar a possibilidade de usá-los como indicador da osteoporose na pós-menopausa. Com esse intuito foram avaliadas 64 mulheres, entre 50 e 70 anos, e foi estabelecido como sinal indicativo de osteoporose a presença de fratura vertebral torácica, avaliada por radiografias. Os sinais orais avaliados foram número de dentes presentes, espessura cortical mandibular, reabsorção óssea alveolar e classificação morfológica do córtex mandibular inferior em radiografias panorâmicas. A relação entre cada sinal oral e a presença de fratura vertebral torácica foi avaliada. As mulheres com fratura apresentaram menor número de dentes, sendo essa diferença significativa em relação às mulheres que não apresentaram fratura, sugerindo uma relação entre perda dentária e fratura vertebral torácica em mulheres pós-menopausa. Esse resultado demonstra que mulheres com osteoporose podem ter maior perda de dentes.

A partir do exposto torna-se claro que a osteoporose afeta o complexo crânio-facial e as estruturas orais, entretanto o mecanismo de ação da osteoporose na doença periodontal, perda de dentes e reabsorção do rebordo alveolar, ainda não estão claros. A relação da osteoporose sistêmica e a osteoporose oral é um problema complexo sendo motivo de um grande número de pesquisas experimentais e clínicas atualmente. O cirurgião-dentista pode a partir de dados colhidos em seu consultório, identificar indivíduos de risco e encaminhá-los adequadamente para

diagnóstico e tratamento, quando necessário. Radiografias panorâmicas têm sido usadas com essa finalidade, podendo ser utilizada para detectar uma possível diminuição de massa óssea em pacientes não diagnosticados, através da mensuração da reabsorção da cortical mandibular e do rebordo ósseo alveolar (WHITE et al., 2005).

2.6 Modelos animais para estudo de osteoporose

A utilização de modelos animais para o estudo da osteoporose tem sido popularizada nas últimas décadas. No campo da osteoporose, a experimentação animal é a principal opção quando novos agentes terapêuticos são analisados. A correta escolha do modelo animal é fundamental e deve ser direcionada para o uso de animais relevantes, próximos das condições fisiológicas vistas na prática diária. Os roedores estão entre os modelos mais utilizados, sendo o rato, certamente o mais popular. Entretanto outros animais como os primatas, cães, aves e coelhos também são utilizados (SZEJNFELD, 2000). Além desses, os camundongos apontam para uma perspectiva promissora neste tipo de pesquisa (WATANABE; HISHIYA, 2005).

O emprego de modelos animais tem viabilizado a análise de alguns aspectos das estruturas de suporte do dente, que dificilmente seriam estudados em humanos. A similaridade anatômica do periodonto é importante, visto que, em ratos, os molares apresentam tecido periodontal e osso alveolar com estrutura e organização semelhantes ao dos humanos (PAGE; SCHROEDER, 1982).

As estruturas periodontais e de osso alveolar dos ratos podem ser modificadas de forma patológica, pela indução de doença periodontal ou pelos processos fisiológicos que sempre remodelam o osso alveolar com o passar do tempo. Essas alterações podem ser mensuradas pelos métodos histométrico, radiográfico e morfométrico. Esses métodos possibilitam quantificar as alterações teciduais nos animais (SOUZA et al., 2005).

Em alguns estudos, ratas com osteoporose induzida por ovariectomia, demonstraram diminuição do volume ósseo mandibular, diminuição do número de trabéculas na região do primeiro molar e também diminuição da espessura da cortical mandibular (HARA et al., 2001; TANAKA et al., 2002; DUARTE et al., 2004; YANG et al., 2005). Jiang; Matsumoto; Fujii (2003) demonstraram também mudança na cortical óssea e no osso trabecular da mandíbula próximo ao primeiro molar, usando um modelo em que associava ovariectomia e baixa ingestão de cálcio.

Além dos modelos experimentais de osteoporose induzida por ovariectomia, outros autores induziram a osteoporose através do uso de glicocorticóides. Pinto et al. (2006) e Silva (2006) obtiveram sucesso na utilização desse modelo. Esses autores utilizaram ratas com idade de aproximadamente de 50 dias, e a indução foi feita por injeção intramuscular de dexametasona na concentração 7mg/Kg uma vez por semana, durante cinco semanas. A osteoporose foi confirmada pela análise histomorfométrica do fêmur. Hulley et al. (2002) observaram que em ratos, após a administração de glicocorticóides na dose 3,5 mg/Kg por dia, durante cinco dias por semana, totalizando nove semanas de tratamento, houve redução na proliferação e

na função dos osteoblastos, demonstrando diminuição de formação óssea nesses animais.

2.7 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 com 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 estrogénoterapia 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 elementos resposta específicos 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) Bifosfonatos

Os bifosfonatos, 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 bifosfonatos. O primeiro bifosfonato usado clinicamente foi o etidronato (ROSEN; KESSENICH, 1997).

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

O mecanismo de ação dos bifosfonatos pode estar relacionado à sua capacidade de se fixarem na matriz óssea, pois apresentam uma alta afinidade na ligação aos cristais de hidroxiapatita. Os bifosfonatos 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 bifosfonatos 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 bifosfonatos 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 dez 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 (SZEJNFELD, 2000).

O uso de ibandronato oral, um bifosfonato 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 bifosfonato 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 bifosfonato 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 bifosfonatos têm sido relatados, o mais freqüente 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 (SZEJNFELD, 2000). Estudo recente relataram associação entre bifosfonatos e osteonecrose na mandíbula. A incidência ainda não está clara, os dados sugerem que 6-10% dos pacientes em terapia intravenosa com bifosfonatos 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 tromboembólicos e doenças cardiovasculares. Portanto a TRH é contra-indicada para mulheres com desordens tromboembólicas, 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.

Entre os fitoestrógenos encontram-se os flavonóides. Existem mais de 6000 flavonóides descritos, estimando-se que os seres humanos ingerem mais de um grama de flavonóides por dia. Eles têm atraído muita atenção do público 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 dessas 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).

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. Tais informações sugerem que, outros fitoestrógenos poderiam ser úteis para o tratamento da osteoporose.

O extrato 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 ginkgólico (BILIA, 2002; OH; CHUNG, 2004; JI et al, 2006). Os principais efeitos farmacológicos do EGb são de proteção vascular e tecidual, e melhora na função cognitiva (DIAMOND et al., 2000; DI RENZO, 2000). Cumpre ressaltar que o uso do EGb é uma alternativa segura, uma vez que apresenta boa tolerabilidade e não há evidências de efeitos tóxicos deste extrato em doses farmacologicamente ativas. Em estudos toxicológicos este extrato não apresentou efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos. 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).

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, além disso estimula a conversão dos fosfolípideos em ácido aracdônico, que é metabolizado em prostaglandinas e leucotrienos, associados à indução da inflamação. Desta forma pode se explicar o efeito farmacológico antiinflamatório deste extrato (HILLEBRAND; OLIVEIRA, 2004).

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. 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 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.

Ainda relacionado aos efeitos do EGb na função cognitiva Kuribara et al. (2003) estudaram o efeito ansiolítico deste extrato 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 cortisol também poderia ser coadjuvante no tratamento da osteoporose (DENNISON et al., 1999).

Recentemente, Oh e 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). 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 estrógeno (OH; CHUNG, 2004). O desenvolvimento de medicamentos que tenham efeitos distintos sobre esses dois receptores pode ser de fundamental importância no tratamento de várias doenças, uma vez que eles se expressam de maneiras diferentes nos diversos tecidos.

Ainda em relação ao efeito estrogênico do EGb, Pinto et al. (2007) constataram diminuição do peso corporal dos fetos, cujas mães foram tratadas com EGb 7 e 14 mg/Kg/dia, o que poderia se dever ao efeito estrogênico do extrato. Desta forma, o EGb pode se tornar uma boa alternativa para a osteoporose uma vez que o estrogênio age sobre as células ósseas, inibindo a reabsorção e promovendo a osteogênese (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994).

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 extrato de *Ginkgo biloba 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.

Desta forma, o EGb pode se tornar uma boa alternativa para a osteoporose já que poderia atuar inibindo a reabsorção óssea e promovendo a osteogênese (TURNER; RIGGS; SPELSBERG, 1994)

3 Hipótese

A administração do extrato de *Ginkgo biloba* modificará a massa óssea de fêmures e mandíbulas de ratas Wistar após a indução da osteoporose por glicocorticóide.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* sobre a histomorfometria de fêmures e mandíbulas de ratas Wistar com osteoporose induzida por glicocorticóide.

4.2 Objetivos específicos

Em ratas com osteoporose induzida por glicocorticóides e tratadas com extrato de *Ginkgo biloba*, realizar:

- a) Análise histopatológica e morfométrica de fêmur e mandíbula.
- b) Análise radiográfica da morfometria da mandíbula.
- c) Comparar entre grupos controle e tratados com extrato de *Ginkgo biloba* os dados obtidos em a e b.

5 Material e métodos

5.1 Animais

Foram utilizadas 72 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*

O extrato de *Ginkgo biloba* padrão foi preparado e fornecido pelo Prof. Dr. João Evangelista de Paula Reis (J R Farma) a partir de material adquirido através da empresa Galena.

5.3 Procedimento experimental

5.3.1 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, compreendendo:

- 1- Osteoporose
- 2- Controle positivo (alendronato de sódio - fármaco de referência do mercado 0,2mg/animal/dia por via intragástrica)
- 3- EGb 1 (*Ginkgo biloba* L. 14mg/Kg/dia por via intragástrica)
- 4- EGb 2 (*Ginkgo biloba* L. 28mg/Kg/dia por via intragástrica)
- 5- EGb 3 (*Ginkgo biloba* L. 56mg/kg/dia por via intragástrica)

5.3.2 Grupo controle

Um grupo, com 12 animais, não submetido a qualquer tratamento, mas da mesma idade que os demais, foi agregado para fins de comparação com o grupo controle negativo.

A partir da data de início do tratamento, aos 20 e 30 dias, seis animais de cada grupo foram eutanasiados, por excesso de anestesia - Ketamina (via intraperitoneal) e Xilazina (via intramuscular) nas doses de 180 mg/kg e 10mg/Kg.

5.3.3 Coleta do material para análises

As análises histopatológicas foram realizadas no laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Após a eutanásia foram removidos o fêmur direito e a mandíbula. A mandíbula foi desarticulada na região de sínfise. O fêmur direito e a hemimandíbula direita foram encaminhados para análise histopatológica. A hemimandíbula esquerda foi radiografada.

5.3.4 Histomorfometria

Logo após a eutanásia dos animais, foi realizada a dissecação do fêmur direito, tomando cuidado de se manter a região epifisária, e da hemimandíbula direita. Os ossos foram fixados em formol tamponado à 10%, durante 72 horas para fixação e posteriormente, foram descalcificados em solução de ácido fórmico/citrato de sódio, incluído em parafina e processado rotineiramente para estudo histológico em microscopia de luz.

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 (Spencer, modelo 820) dotado de navalha descartável. Logo após, os cortes foram montados sobre lâmina de vidro e corados

com hematoxilina e eosina, conforme procedimento de rotina do laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras obtidas foram analisadas em sistema óptico microscópico Zeiss para captura digital de fotomicrografias. Todas as lâminas do experimento foram analisadas em aumentos de 250X e 400X para avaliação histopatológica.

Após a análise preliminar, a região de tecido ósseo trabecular da epífise proximal do fêmur foi fotografada com aumento de 25X, determinando-se visualmente três áreas, duas laterais e uma medial (A,B e C), como demonstrado na figura 6. Cada uma dessas regiões (A, B e C) tinha a medida de sua área, correspondente a $16.000\mu^2$.

Através de ferramenta auxiliar presente no software Axiovision[®] (version 4.5 for Windows semi-automático) utilizado neste estudo (figura 5), seguiu-se a circundação e a mensuração do tecido ósseo trabecular, com auxílio de uma caneta cursor digital. A área de tecido ósseo obtida foi convertida em proporção de tecido ósseo através da formula: % de tecido ósseo= área obtida na mensuração X 100/ $16.000\mu^2$. Após serem estabelecidas as proporções de tecido ósseo das três regiões, foi feita a média da proporção de A, B e C correspondentes à epífise proximal do fêmur (figura 6). Essa média foi posteriormente utilizada para o processamento estatístico.

A análise histomorfométrica do osso alveolar da mandíbula foi realizada em uma única região, na região do septo interradicular do segundo molar (figura 6). O

procedimento para mensuração foi o mesmo utilizado anteriormente no fêmur, exceto que somente a região de tecido ósseo limitada ao septo interradicular foi mensurada.

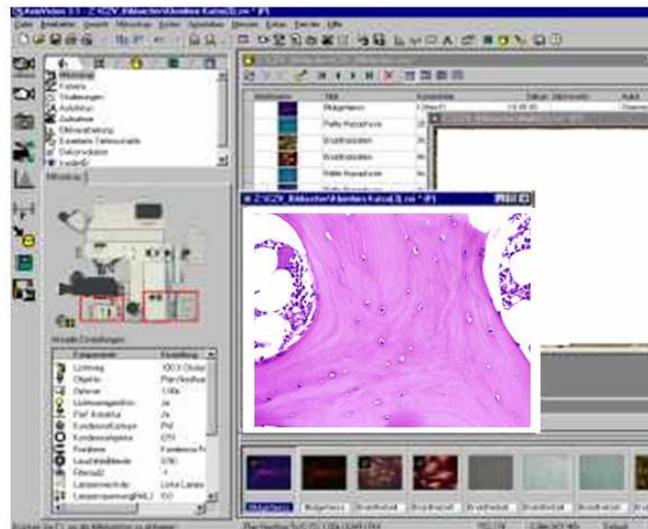


Figura 5: Programa Axiovision[®] (Versão 4.5 para Windows), para morfometria semi-automática de fotomicrografias.

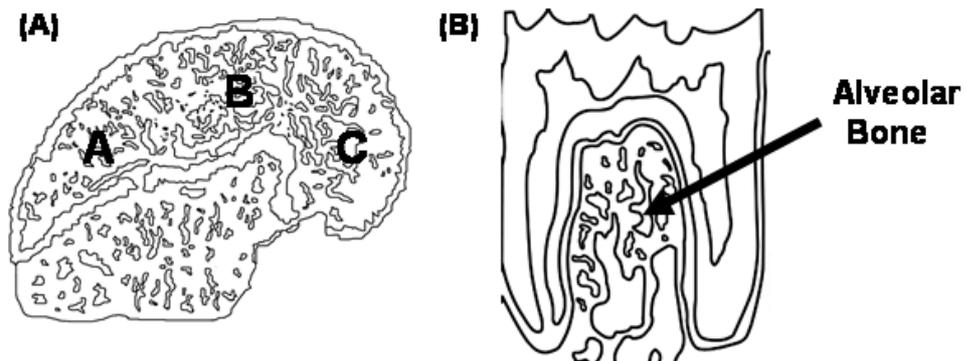


Figura 6: (A) Desenho esquemático da epífise proximal do fêmur, onde A, B e C foram as regiões determinadas para a análise histomorfométrica do tecido ósseo trabecular. (B) Desenho esquemático da região interradicular selecionada para a análise do tecido ósseo alveolar mandibular

5.3.5 Análise radiográfica

A hemi-mandíbula esquerda foi fixada em formol a 10% e radiografada, utilizando aparelho de raios-X Dabi Atlante (modelo Spectro 70X, classe I, tipo B comum) com fatores energéticos, 70Kvp, 7 mA e o sistema de imagem radiográfica intra-oral digital Schick Technologies para obtenção da espessura da cortical mandibular e do suporte ósseo periodontal (SOP) (SOUZA et al., 2005; YANG et al., 2005). Os espécimes foram posicionados com o lado lingual sobre a face ativa do sensor digital de maneira que as faces proximais dos molares ficassem paralelas ao feixe central de radiação, que incidiu perpendicularmente ao sensor. Com o tempo de exposição de 0,1 segundo e distância focal de 40 centímetros. Todas as radiografias foram realizadas seguindo o mesmo padrão por um radiologista oral, e foram armazenadas, sem nenhuma manipulação em pastas próprias do *software* Schick Technologies, para análise posterior.

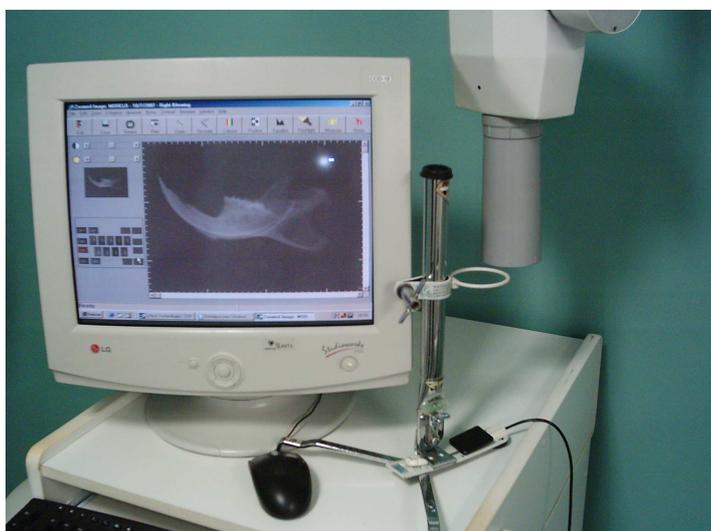


Figura 7: Equipamento utilizado na realização do exame radiográfico.

5.3.5.1 Análise da espessura cortical óssea mandibular (figura 8)

A espessura da cortical mandibular foi mensurada por um avaliador, que não tinha conhecimento dos grupos experimentais. A região de interesse foi aumentada para melhor visualização da cortical. A cortical foi medida em três pontos; na região anterior (A) (na interseção entre o incisivo e a cortical mandibular), no ponto mais posterior no ângulo da mandíbula (C), e no terceiro ponto localizado no ponto médio entre os outros dois (B) (YANG et al., 2005). As mensurações foram realizadas da borda inferior à superior da cortical, utilizando o software Auto Cad 2002. O valor médio da espessura cortical de cada mandíbula foi obtido dessas três mensurações A, B e C.

5.3.5.2 Análise radiográfica do suporte ósseo periodontal (SOP) (figura 8)

As mensurações foram realizadas por um avaliador, que não teve conhecimento sobre os grupos experimentais, as imagens foram avaliadas em uma escala de cinza, para que os pontos avaliados fossem melhor visualizados. A mensuração foi realizada através do software Auto Cad 2002 na raiz distal e mesial do primeiro molar inferior. Nas radiografias digitais foram considerados três pontos: Ápice da raiz distal/mesial (D), crista óssea na distal/mesial do dente (E) e ponta da cúspide distal/mesial (F). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos DE e DF, para cálculo do SOP junto à raiz mesial e distal, por meio da fórmula matemática: $DE/DF \times 100$ (SOUZA et al., 2005).



Figura 8: Medida da cortical mandibular, onde A foi o ponto mais anterior na cortical, C o ponto mais posterior e B o ponto médio entre eles. Medida do suporte ósseo periodontal, onde D corresponde ao ápice radicular, E à crista óssea e F à ponta da cúspide do molar.

5.4 Análise estatística

Os ensaios biológicos foram organizados segundo delineamento inteiramente casualizado.

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

A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de p foi menor do que 0,05.

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 n.º. 058/2006 – CEA.

7 Resultados e discussão

Os resultados e a discussão serão apresentados sob a forma de artigos. O artigo I, intitulado “Radiographic evidences of mandibular osteoporosis improvement in Wistar rats treated with *Ginkgo biloba*” foi submetido ao periódico *Phytotherapy Research*.

O artigo II, intitulado “Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with *Ginkgo biloba* extract: a histomorphometric study”, será submetido ao periódico *Toxicology and Applied Pharmacology* .

O artigo III, intitulado Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* na osteoporose induzida em ratas Wistar que será submetido à *Revista Brasileira de Farmacognosia*.

7.1 Resumo artigo I

Radiographic evidences of mandibular osteoporosis improvement in Wistar rats treated with *Ginkgo biloba*

Running title: *Ginkgo biloba* in mandibular osteoporosis

Leda Marília Fonseca Lucinda^{1,*}, Tânia Toledo de Oliveira², Pollyanna Amaral Salvador¹, Vera Maria Peters¹, João Evangelista de Paula Reis¹, Martha de Oliveira Guerra¹.

¹Centro de Biologia da Reprodução – Federal University of Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970. Juiz de Fora, MG, Brazil.

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Federal University of Viçosa, Vila Gianetti, casa 26, CEP 36570-000. Viçosa, MG, Brazil.

*Corresponding author:

Address: Santos Dumont 510/ 202. Granbery. CEP: 36010-510, 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) on the mandibular glucocorticoid-induced-osteoporosis. **Methods:** 36 female rats were divided into six groups (n=6): control, osteoporosis, positive control (sodium alendronate-0.2mg/Kg/day) and treated with 14, 28 and 56 mg EGb/Kg/day for 30 days. Treatments were conducted after

osteoporosis induction (7mg/Kg dexamethasone, once a week, during five weeks). The animals were euthanized on the 31st day and their left mandibles were removed and radiographed with an oral digital system to evaluate the cortical and the periodontal bone support (PBS) at the mesial and distal surfaces. The control group was compared with the osteoporosis group (Student's t-test). The other groups were analyzed by ANOVA test followed by Tukey post-hoc test ($p < 0.05$). **Results:** There was a significant reduction in the mesial and distal PBS in the osteoporosis group. The positive control group showed a significant increase in the mesial PBS, as well as the EGb group treated with 28 and 56 mg/Kg, which showed a significant increase in the mesial and distal PBS. The mean thickness of the mandibular cortical was not affected by osteoporosis; however, the group treated with EGb using 56 mg/Kg showed a significant increase in the mean thickness of the mandibular cortical. **Conclusions:** Osteoporosis reduced the PBS; however, it did not affect the mandibular cortical thickness. EGb recovered the PBS and increased the mandibular cortical thickness, thus EGb may be effective in the treatment of osteoporosis.

Keywords: *Ginkgo biloba*, osteoporosis, mandible, rats.

7.2 Resumo artigo II

Evidences of osteoporosis improvement in Wistar rats treated with *Ginkgo biloba* extract: a histomorphometric study.

Short title: Ginkgo biloba improvement of osteoporosis

Leda Marília Fonseca Lucinda¹, Beatriz Julião Vieira¹, Rita de Cássia da Silveira e Sá¹, Tânia Toledo de Oliveira², Vera Maria Peters¹, Pollyanna Amaral Salvador¹, João Evangelista de Paula Reis¹, Martha de Oliveira Guerra¹.

¹Centro de Biologia da Reprodução – Federal University of Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970. Juiz de Fora, MG, Brazil.

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Federal University of Viçosa, Vila Gianetti, casa 26, CEP 36570-000. Viçosa, MG, Brazil.

*Corresponding author:

Address: Santos Dumont 510/ 202. Granbery. CEP: 36010-510, 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: This study was aimed at investigating the anti-osteoporotic effects of the extract of *Ginkgo biloba* (EGb) in glucocorticoid-induced-osteoporosis. **Methods:** 36 female rats were

divided into six groups (n=6): control, osteoporosis (dexamethasone), positive control (sodium alendronate-0.2mg/Kg/day), EGb1 (14 mg EGb/Kg/day), EGb2 (28 mg EGb/Kg/day) and EGb3 (56 mg EGb/Kg/day) for 30 days. Treatments were conducted after osteoporosis induction (7mg/Kg dexamethasone, once a week, during five weeks). The animals were euthanized on the 31st day and their right femur and right mandible were removed. The histomorphometric analysis was performed by the semi-automatic technique Axiovision[®] program. The control group was compared with the osteoporosis group (Student's t-test). The other groups were analyzed by ANOVA test followed by Dunnett post-hoc test (p<0.05).**Results:** A significant reduction was observed in the percentage of the bone of the osteoporosis group in both mandible and femur. The positive control group as well as the EGb group treated with 28 and 56 mg/Kg showed a significant increase in the percentage of trabecular bone (PTB) of the femur. The increase in the percentage of the alveolar bone (PAB) of the mandible in the positive control group was not statistically significant, whereas the PAB of the mandible had a significant increase with all doses of EGb. **Conclusions:** The subchronic treatment with EGb significantly reversed the loss of the PAB of the mandible and of the PTB of the femur after induction of osteoporosis by glucocorticoid administration in rats.

Keywords: *Ginkgo biloba*, osteoporosis, histomorphometry, sodium alendronate, rats.

7.3 Resumo artigo III

Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* na osteoporose induzida em ratas Wistar

Efeito do extrato de *Ginkgo biloba* na osteoporose.

Leda M F Lucinda^{1,*}, Beatriz J Vieira¹, Pollyanna A Salvador¹, Tânia T de Oliveira², Vera M Peters¹, João E de P Reis¹, Martha de O Guerra¹.

¹ *Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora, Caixa Postal 328, CEP 36001-970. Juiz de Fora, MG, Brasil.*

² *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal de Viçosa, Vila Gianetti, casa 26, CEP 36570-000. Viçosa, MG, Brasil.*

*Autor para correspondência: Rua Santos Dumont 510/ 202. CEP: 36010-510, Juiz de Fora, MG, Brasil.

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

Tel: 32 21023251 ou 32 32180734; *fax:* 32 21023251

RESUMO

Objetivo: Este trabalho investigou os efeitos do tratamento de 20 dias do extrato de *Ginkgo biloba* (EGb) na osteoporose induzida por glicocorticóides. **Métodos:** 36 ratas foram divididas em seis grupos (n=6): Controle, osteoporose, controle positivo, EGb1 (14 mg EGb/mg/Kg/dia), EGb2 (28 mg EGb/Kg/dia) e EGb3 (56 mg EGb/Kg/dia). Os tratamentos

foram realizados por 20 dias, após a indução da osteoporose. Após a eutanásia o fêmur e a mandíbula foram removidos. A mandíbula esquerda foi radiografada para avaliação da cortical e do suporte ósseo periodontal (SOP). A análise histomorfométrica foi realizada no fêmur e mandíbula direitos. O grupo controle foi comparado ao osteoporose (Teste t de student) e os demais grupos foram submetidos a ANOVA, seguido do teste *post-hoc* de Dunnett. **Resultados:** Houve redução significativa do SOP mesial, percentual ósseo alveolar (POA) mandibular, percentual ósseo trabecular (POT) do fêmur no grupo osteoporose. Houve aumento do SOP mesial no grupo controle positivo, EGb2 e EGb3. O POA da mandíbula e o POT do fêmur aumentaram nos grupos EGb2 e EGb3. **Conclusão:** O EGb nas doses de 28 mg/Kg e 56 mg/Kg recuperou de forma significativa o SOP mesial, o POA da mandíbula e o POT do fêmur.

Palavras-chave: *Ginkgo biloba*, osteoporose, radiografia, histomorfometria, alendronato de sódio, ratos.

8 Comentários Finais

No presente estudo avaliamos o efeito protetor do extrato de *Ginkgo biloba* na osteoporose induzida por glicocorticóides em mandíbulas e fêmures de ratas Wistar, através de radiografias digitais da mandíbula esquerda e histomorfometria da mandíbula e fêmur direitos.

Foi demonstrado que o glicocorticóide causou osteoporose mandibular, demonstrada por radiografia e histomorfometria, assim como osteoporose femural, visualizada pela histopatologia.

As doses de 28mg/kg/dia e 56mg/kg/dia do EGb, administradas por 20 e 30 dias, recuperaram percentual do SOP do primeiro molar mandibular de maneira tão efetiva quanto o grupo que foi tratado com o alendronato de sódio, medicamento já preconizado no tratamento da osteoporose.

O POA da mandíbular do grupo controle positivo, nos tratamentos correspondentes a 20 e 30 dias, apresentou aumento não significativo em relação

aos animais do grupo osteoporose. Entretanto os grupos tratados com EGb por 30 dias em todas as doses administradas apresentaram aumento estatisticamente significativo do POA da mandíbula em relação ao grupo osteoporose. Esse aumento também foi observado no tratamento de 20 dias, porém nas maiores doses de EGb (28 mg/kg/dia e 56 mg/kg/dia).

Houve aumento significativo do POT do fêmur nos animais tratados com alendronato de sódio durante 30 dias. Já em relação ao tratamento de 20 dias observou-se aumento não significativo dos valores numéricos do POT do fêmur quando comparados aos animais do grupo osteoporose.

No tratamento com EGb correspondente a 20 e 30 dias, nas doses de 28 mg/kg/dia e 56 mg/kg/dia, houve aumento estatisticamente significativo do POT do fêmur quando comparados aos animais com osteoporose.

9 Conclusão

O EGb foi efetivo na recuperação do suporte ósseo periodontal mandibular e do percentual ósseo do fêmur e da mandíbula nos animais com osteoporose. Dessa forma, o EGb pode se tornar uma alternativa promissora para o tratamento da osteoporose induzida por glicocorticóides.

10 Referências

AFARENSIS ANTHROPOLOGY. Disponível em: <http://scienceblogs.com/afarensis/2006.htm>. Acesso em 25 de outubro de 2007.

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.

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 2005.

BOLLEN, A. et al. Case-control study on self-reported osteoporotic fractures and mandibular cortical bone. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St. Louis, v. 90, n. 4, p. 518-524, 2000.

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**, Edinburg, v. 15, n. 4, p. 251-254, 2005.

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 2007.

CANALIS, E.; AVIOLI L. Effects of deflazacort on aspects of bone formation in cultures of intact calvariae and osteoblast-enriched cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.7, n. 9, p. 1085-1092, 1992.

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 dezembro de 2003.

CARVALHO, M. I. Osteoporose visão do ortopedista. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 91-97, 2006.

CARVALHO, D. C. L. et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.5, p. 647-654, 2002.

COLPAN, L. et al. The effect of calcitonin on biochemical markers and zinc excretion in postmenopausal osteoporosis. **The European Menopause Journal**, Limerick, v. 51, n. 3, p. 246-253, 2005.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro. 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, 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 ebeoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. **Maturitas. The European Menopause Journal** , v. 53, Limerick, 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.

DRAÚZIO VARELLA – ENTREVISTAS. Disponível em:
<http://www.drauziovarella.ig.com.br/entrevistas/osteoporose_zerbini.asp/> Acesso em 22 de março de 2007.

DUARTE, P. M. et al. Effect of estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 39, n. 2, p. 107-110, 2004.

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

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 (N.Y)** New York, v. 37, n. 5, p. 651- 654, 2005.

FIGUEIREDO, M. C.; PARRA, S. L. N. Aspectos normais da membrana periodontal e osso alveolar. **Medcenter: Brasil: Odontologia**. Disponível em : <<http://www.odontologia.com.br/artigos/>> Acesso em 31 de maio de 2007.

FRIEDLANDER, A. H. The physiology, medical management and oral implications of menopause. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v.33, n.1, p.73-81, 2002.

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.

GREGÓRIO, L.H. Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose. **Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo**. Disponível <http://www.endocrino.org.br/artigos_osteo_016.php/> Acesso em 20 de abril de 2005.

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.

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

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.

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*. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v.10, p.1487, 1995

HULLEY, P. A. et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis in the rat is prevented by the tyrosine phosphatase inhibitor, sodium orthovanadate. **Bone (NY)**, New York, v. 31, n. 1, p. 220-229, 2002.

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

JIANG, G.; MATSUMOTO, H.; FUJII, A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Tokyo, v. 21, n. 6, p. 388-395, 2003.

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.

JOHNELL, O. et al. Mortality after osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, London, v. 15, n. 1, p. 38-42, 2004.

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.

LANDIM, K. T.; JUNQUEIRA, J. C.; ROCHA, R. S. Influência da sinvastatina na reparação óssea de mandíbulas de ratas. **Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**, São José dos Campos, v. 5, n. 1, p. 78-83, 2002.

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.

LEMOS, C. et al. Sistema ósteo-articular. In: **BOGLIOLO**. Patologia. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan, Cap, 26, p. 873-875, 1994.

LI, X.; NISHIMURA, I. Altered bone remodeling pattern of the residual ridge in ovariectomized rats. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 72, n. 3, p. 324-328, 1994.

MANELLI, F.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Trends in Endocrinology and metabolism**, Bethesda, v.11, n. 3, p. 79-85, 2000.

MAZZIOTI, G. et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. **Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 17, n. 4, p. 144-149, 2006.

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.

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

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.

PAGE, R. C.; SCHROEDER H. E. Periodontitis in man and other animals: a comparative review: **New York: Karger**, New York, v. 15, p. 71-106, 1982.

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

PINTO, A. S. et al. Efeitos do tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 99-107, 2006.

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.

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 2007.

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.bonekey-ibms.org/cgi/content/full/ibmske;200204v1>> . Acesso em 15 de agosto de 2007.

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.

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

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.

SILVA, Rosimar Regina da. **Alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e flavonóides na osteoporose induzida por glicocorticóides**. 2006. 115 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, 2006.

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.

SOUZA, D. M. Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. **Clinica Odontológica Brasileira**, São José dos Campos, v. 8, n. 4, p. 77-84, 2005.

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.

TAGUCHI, A. et al. Oral signs as indicators of possible osteoporosis in elderly women. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, St. Louis, v. 80, n. 5, p. 612-616, 1995.

TANAKA, M. et al. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 37, n. 2, p. 161-165, 2002.

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.

UNICAMP-Faculdade de Ciências Médicas.. Disponível em:
<<http://www.fcm.unicamp.br/deptos/anatomia/lamossol.html>> Acesso em 22 de março de 2007.

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

WATANABE, K.; HISHIYA, A. Mouse models of senile osteoporosis. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford NY, v. 26, n. 3, p. 221-231, 2005.

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.

WHITE, S. C. et al. Clinical and panoramic predictors of femur bone mineral density. **Osteoporosis International**, London, v. 16, n. 3, p. 339-346, 2005.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and management of osteoporosis. **WHO Technical Report**. Geneva, 2003. (Series 921).

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.

YANG, J. et al. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. **Journal of Dentistry**, Guildford, v. 33, n. 2, p. 123-129, 2005.

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

Confirmação de submissão do artigo I ao periódico **Phytotherapy Research**

phytotherapy.research@wiley.co.uk" <phytotherapy.research@wiley.co.uk>

[Adicionar remetente à lista de contatos](#)

Para:

ledamarilia@yahoo.com.br

17-Dec-2008

Dear Ms Lucinda,

Your manuscript entitled "Radiographic evidences of mandibular osteoporosis improvement in Wistar rats treated with Ginkgo biloba" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *Phytotherapy Research*.

Your manuscript number is PTR-08-1081. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <http://mc.manuscriptcentral.com/ptr>. If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

Thank you for submitting your manuscript to *Phytotherapy Research*.

Sincerely,

Phytotherapy Research Editorial Office

Aceite do artigo I pelo periódico Phytotherapy Research

Dear Ms Lucinda,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled
"Radiographic evidences of mandibular osteoporosis
improvement in Wistar rats treated with Ginkgo biloba"
in its current form for publication in Phytotherapy
Research.

Thank you for your contribution.

Sincerely,

Rachael Bilginer

Managing Editor

Phytotherapy Research

phytotherapy.research@wiley.co.uk