



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

**DANIEL DE SIQUEIRA**

**OSTEOPOROSE: UMA ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO  
TECIDO ÓSSEO EM CAMUNDONGOS C57 e ApoEKO  
OVARIOTECTOMIZADOS.**

VITÓRIA

2014

DANIEL DE SIQUEIRA

**OSTEOPOROSE: UMA ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO  
TECIDO ÓSSEO EM CAMUNDONGOS C57 e ApoEKO  
OVARIOTECTOMIZADOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia da RENORBIO - Ponto Focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Victor Silva.

Co-orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Leticia Batista Azevedo Rangel.

VITÓRIA

2014



**OSTEOPOROSE: UMA ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO TECIDO ÓSSEO EM  
CAMUNDONGOS C57 e ApoEKO OVARIOTECTOMIZADOS.**

DANIEL DE SIQUEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia da RENORBIO - Ponto Focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Ian Victor Silva - Orientador  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

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

---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Marcos da Silva Pacheco  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

“O coração alegre é bom remédio, mas  
o espírito abatido faz secar os ossos”.

(Prov. 17:22)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecemos a Deus, nosso criador, mantenedor e salvador. “Sem Ele nada temos, nada somos e nada podemos fazer”.

Ao pensar na família, quero agradecer ao meu pai pela educação e exemplo a mim dispensados. De forma bem próxima agradeço à minha esposa, companheira de tantos anos que sempre me apoiou na minha vida acadêmica, sobretudo. Meus queridos filhos, Ezer, Denis e Daniel representam troféus ganhos ao longo da vida. São presentes preciosos concedidos por Deus a nós. A eles meu muito obrigado pela nossa união como família. Ainda pensando na família, quero agradecer às minhas noras Georgina e Fabiane, e a Isabelle; vocês são muito queridas. De forma carinhosa agradeço à minha neta Beatriz; você veio trazer juventude ao seu avô.

Agradeço ao Prof. Dr. Ian Victor Silva pela oportunidade, incentivo e paciência.

À Prof. Dr. Letícia Batista Azevedo Rangel, pela dedicação e apoio.

Aos meus colegas do Departamento de Morfologia, em especial àqueles que foram meus alunos: Professor Rogério Azeredo, Professor William Bautz, Professor Ricardo Eustáquio. Professora Letícia Nogueira, Professora Karla Loureiro e Professora Mônica Leal Alcure; de alguma forma vocês contribuíram.

Ao Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira, Prof. Dr. Marcos da Silva Pacheco, Prof. Dr. Marcos Cunegundes, Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira Profa. Dra. Letícia Batista Azevedo Rangel pela contribuição, apoio, compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel pela orientação nos meus primeiros passos no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR).

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Redins pelo conhecimento e experiência a mim dispensados.

Ao doutorando Jairo Pinto de Oliveira. Sua entrega, disponibilidade e boa vontade me impressionaram.

A Larissa Bastos Martinelli pelo preparo e prestatividade conosco partilhados.

Aos colegas dos Laboratórios de Biologia Celular e do Envelhecimento (LBCE) e do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, LUCCAR da UFES.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) e ao Laboratório de Ultraestrutura da Universidade de São Paulo (USP).

## RESUMO

Observa-se atualmente um aumento na incidência de doenças osteometabólicas, particularmente a osteoporose. Esta doença decorre de uma alteração do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, intimamente ligada ao avançar da idade. Na osteoporose, observa-se que o predomínio da reabsorção óssea acaba levando a redução da densidade mineral óssea (DMO). Acredita-se que a diminuição da DMO seja o principal fator de risco para a maior casuística de fraturas observada nestes pacientes. Ainda que a osteoporose apresente a queda na DMO como um fator de risco muito bem definido, esta doença é de caráter multifatorial. Outra característica marcante na osteoporose é sua prevalência em mulheres pós-menopausadas. Sabe-se hoje que o estrogênio é um dos principais fatores responsáveis pela formação de tecido ósseo e sua mineralização. Portanto, sua deficiência na menopausa resulta numa maior incidência da doença nesta população. Embora os estudos em seres humanos possam contribuir imensamente para o entendimento da doença, as limitações impostas pelas técnicas a serem utilizadas impede a investigação de alguns mecanismos associados à osteoporose. Para determinar alguns mecanismos intrínsecos a doença, portanto, são utilizados modelos animais que mimetizam a osteoporose pós-menopausa. Neste trabalho, utilizamos camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX) como modelo para osteoporose pós-menopausa, visando estudar fenômenos associados à ultraestrutura do tecido ósseo em condições que podem ser de grande importância para o tratamento da doença. Para tanto foram utilizados uma combinação de análises histológicas, bioquímicas e microscopia eletrônica além do padrão ouro no diagnóstico de osteoporose: A Absorciometria dupla de raio-X (DXA). A queda do estrogênio circulante levou a profundas alterações em diferentes marcadores de reabsorção e formação óssea, queda da DMO e presença de microfraturas no tecido ósseo. Partindo desta caracterização, foram realizados dois estudos paralelos, porém complementares, sobre o papel da vitamina K – um agente que se acredita ser fundamental para mineralização óssea – e a apolipoproteína E, molécula que se acredita estar associada também ao risco de osteoporose. Resultados obtidos ao longo deste trabalho demonstraram que a suplementação com vitamina K em

animais OVX alterou a ultraestrutura do tecido ósseo (determinado por análises de microscopia eletrônica de varredura). Contudo, a suplementação com vitamina K não levou a alterações tão marcantes em biomarcadores da doença. Em contrapartida, a perda da ApoE em animais geneticamente modificados (APOEKO) alterou tanto os biomarcadores séricos utilizados no diagnóstico da osteoporose quanto a ultraestrutura do tecido em camundongos OVX. Tomados conjuntamente, nossos resultados indicam – através da combinação de análises ultraestruturais no tecido ósseo e mensuração de biomarcadores - que a vitamina K afeta majoritariamente as microfraturas em camundongos OVX enquanto que a ausência do gene ApoE levou à uma queda na DMO. Portanto, mesmo que o eixo estrogênio-ApoE-vitamina K seja bem definido no contexto da patogênese da osteoporose, nossos resultados apontaram para efeitos distintos destas moléculas no metabolismo ósseo.

**Palavras Chave:** Osteoporose, vitamina K, Apolipoproteína E, Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Eletrônica de Transmissão.



## ABSTRACT

It is currently observed an increase in the incidence of osteometabolic diseases, particularly osteoporosis. This disease is caused by an imbalance between bone formation and bone resorption, closely linked to aging. In osteoporosis, it is observed that the predominance of bone resorption leads to a lower bone mineral density (BMD). It is believed that decrease in BMD is the main risk factor for bone breaking observed in these patients. Although low BMD represents the main risk factor for osteoporosis, this disease is multifactorial. Another remarkable feature in osteoporosis is its prevalence in postmenopausal women. It is now known that estrogen is one of the major factors responsible for the formation of bone tissue and its mineralization. Therefore, its deficiency at menopause results in a higher incidence of the disease in this population. Nevertheless studies in humans have contributed immensely to the understanding of the disease, the limitations imposed by the techniques to be used prevents the investigation of some mechanisms associated with osteoporosis. To determine some intrinsic mechanisms of the disease, therefore, animal models that mimic the postmenopausal osteoporosis are commonly used. In this study, we used ovariectomized female mice (OVX) as a model for postmenopausal osteoporosis, aiming to study phenomena associated with the bone tissue ultrastructure under conditions that can be of great importance for the treatment of the disease. For this purpose, were used a combination of histological and biochemical analyses as well as electronic microscopy, besides the gold standard in the diagnosis of osteoporosis: Dual X-ray Absorptiometry (DXA). The drop in circulating estrogen led to profound changes in different markers of bone formation and bone resorption, decreased BMD, and the presence of microfractures in bone tissue. From this characterization, were conducted two parallel studies, despite complementary, on the role of vitamin K - molecule believed to be essential for bone mineralization - and apolipoprotein E, a molecule that is also associated to increased risk of osteoporosis. Results obtained throughout this study demonstrated that supplementation with vitamin K in OVX animals led to profound changes in the ultrastructure of bone tissue (determined by analysis of scanning electronic microscopy). However, supplementation with vitamin K did not lead to such deep changes in biomarkers of the disease. In contrast, the loss of ApoE in genetically modified animals (APOEKO) significantly changed several serum biomarkers for the

diagnosis of osteoporosis and the ultrastructure of tissue in OVX mice. Taken together, our results indicate - through a combination of ultrastructural analyses on bone tissue and measurement of biomarkers - that vitamin K affects mainly microfractures in OVX mice while the absence of the ApoE gene led to a decrease in BMD. Therefore, even if the axis estrogen-ApoE-vitamin K is well defined in the context of the pathogenesis of osteoporosis, our results pointed to different effects of these molecules on bone metabolism.

**Key Words:** Osteoporosis, Vitamin K, Apolipoprotein E, Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso cortical e o osso esponjoso.....	25
Figura 2 - Representação de um osso normal e de um osso osteoporótico respectivamente.....	30
Figura 3 - Mecanismo da osteoclastogênese e de reabsorção óssea.....	32
Figura 4 - Estruturas químicas das vitaminas K1, K2 e K3.....	38
Figura 5 - Ciclo metabólico da vitamina K.....	39
Figura 6 - Linha do tempo que apresenta as principais atividades realizadas, desde a primeira densitometria (dia 0) até o sacrifício (dia 116).....	45
Figura 7 – Distribuição dos grupos C57.....	46
Figura 8 - Análise da densidade mineral óssea de camundongos por absorciometria por dupla emissão de raio X (Dual-energy X-ray Absorptiometry - DXA).....	48
Figura 9 - Avaliação do peso úmido dos úteros de animais SHAM e OVX.....	55
Figura 10 - Avaliação da atrofia do útero por meio da medida do endométrio dos camundongos C57 fêmeas SHAM e OVX (n=10, por grupo).....	56
Figura 11 - Resultado de exame de DXA realizado no CEDOES.....	57
Figura 12 - Painel representativo dos resultados de densitometria óssea de cada grupo experimental.....	57
Figura 13 - Comparação da DMO nos diferentes grupos experimentais (n=5, por grupo).....	58

Figura 14 - Fotomicrografias mostrando cortes longitudinais de fêmures dos quatro grupos experimentais.....	59
Figura 15 - Espessura do osso compacto (n=5, por grupo).....	59
Figura 16 - Avaliação da excreção urinária de deoxipiridinolina (DPD) (n=3 animais por grupo).....	60
Figura 17 - Avaliação da fosfatase alcalina total (FAT) do soro (n=5 animais por grupo).....	61
Figura 18 – Avaliação da Osteocalcina total no soro dos diferentes grupos experimentais.....	62
Figura 19 – Avaliação da Osteocalcina Hipercarboxilada total no soro dos diferentes grupos experimentais.....	63
Figura 20 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (escala 10µm).....	64
Figura 21 - Gráficos referentes às microanálises feitas de presenças de cálcio e fósforo.....	65
Figura 22 – Curso temporal do crescimento dos animais WT e ApoEKO.....	66
Figura 23 - Análise por absorciometria por dupla emissão de raio X (DXA, medida em g/cm <sup>2</sup> ).....	67
Figura 24 - Imagens representativas da Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fêmures de camundongos WT/SHAM (A), APOEKO/SHAM (B), WT/OVX (C), e APOEKO/OVX (D).....	70

Figura 25 - Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão mostrando células osteoprogenitoras.....	73
Figura 26 - Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão, mostrando fibras colágenas Tipo I em corte transversal, apresentando ligações cruzadas pirimidínicas entre elas (setas).....	73
Figura 27 - Área em nm <sup>2</sup> entre as fibras colágenas tipo I em um animal ApoEKO/SHAM e em um animal ApoEKO/OVX.....	74
Figura 28 - Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão mostrando um Osteoblasto e um Osteócito.....	74
Figura 29 - Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão de cortes longitudinais de fibras colágenas tipo I.....	75
Figura 30 – Modelo preliminar propondo que a deficiência da ApoE levaria à ossos mais frágeis.....	86

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios Densitométricos da Organização Mundial de Saúde.....	35
Tabela 2 – Resultados de alguns parâmetros associados aos grupos experimentais.....	55
Tabela 3 - Efeitos da ovariectomia (OVX) e da vitamina K3 na excreção urinária de cálcio e fósforo.....	60
Tabela 4 - Efeitos da ovariectomia (OVX) e da vitamina K3 na presença de cálcio e do fósforo no soro.....	61
Tabela 5 - Perfil metabólico de todos os grupos experimentais no momento do sacrifício (camundongos de 8 meses de envelhecimento).....	68
Tabela 6 – Perfil metabólico de todos grupos experimentais no momento do sacrifício.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATPases - Adenosina Trifosfatase

CEDOES - Centro de Diagnóstico e Pesquisa de Osteoporose do Espírito Santo

CTRL - Controle

DMO - Densidade Mineral Óssea

DPD - Deoxipiridinolina

DXA - Dual X-ray Absorptiometry Scan (Absorciometria por dupla emissão de raio X)

EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Teste Imunoenzimático)

EP - Erro Padrão

FA - Fosfatase Alcalina

FAT - Fosfatase Alcalina Total

HE - Hematoxilina e Eosina

IL - Interleucina

LTCC - Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular

LUCAR - Laboratório de ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins

M-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos

MGP - Proteína GLA da Matrix

MK - Menaquinona

NF-KB - Fator Nuclear Kappa B

OC - Osteocalcina

OMS - Organização Mundial da Saúde

OVX - Ovariectomia

PTH - Paratormônio

RANK - Receptor para Ativação do Fator Nuclear Kappa B

RANKL - Ligante do receptor para Ativação do Fator Nuclear Kappa B

SHAM - Falsa Ovariectomia

TGF- $\beta$  - Fator de Crescimento Transformante beta

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

VK - Vitamina K



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>23</b>
2.1	Objetivos Específicos .....	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
3.1	Estrutura e Função do Tecido Ósseo.....	24
3.2	Remodelamento Ósseo .....	29
3.3	Osteoporose .....	32
3.4	Estrogênio e Metabolismo Ósseo.....	35
3.5	Vitamina K.....	37
3.6	Apolipoproteína E .....	41
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1	Aprovação do projeto .....	44
4.2	Delineamento do estudo.....	44
4.2.1	Estudo da interação dos hormônios sexuais e da vitamina K no metabolismo osteomineral .....	44
4.2.2	Estudo da interação dos hormônios sexuais e com a ApoE no metabolismo osteomineral .....	47
4.3	Análise da Densidade Mineral Óssea (DMO) .....	48
4.4	Análises Bioquímicas .....	49
4.5	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) .....	49
4.6	Histomorfometria .....	50
4.7	Análise Ultraestrutural: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	51
4.8	Análise estatística .....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
5.1	Estudo 1 - Avaliação do crescimento e do peso corporal dos animais ao longo do experimento .....	53
5.2	Validação da ovariectomia (OVX).....	54
5.3	Resultados de Densitometria Óssea .....	57
5.4	Morfometria óssea .....	58
5.5	Resultados sorológicos, urinários e imunoenzimático de marcadores do metabolismo ósseo .....	59

<b>5.6</b>	<b>Análise ultraestrutural .....</b>	<b>63</b>
<b>5.7</b>	<b>Estudo 2 - Avaliação do crescimento e do peso corporal dos animais ao longo do experimento .....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
	<b>ANEXO 1.....</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXO 2.....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo está em constante renovação, através de um mecanismo chamado de remodelamento ósseo. O remodelamento ósseo depende do equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea, realizados pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. A remoção de osso mineralizado pelos osteoclastos, e a formação da matriz óssea pelos osteoblastos são importantes para adaptar a microarquitetura óssea às necessidades mecânicas do organismo. A manutenção da homeostase mineral, por sua vez, é fundamental na reparação de microlesões na matriz óssea, possibilitando a renovação tecidual (RAISZ, 1999; HADJIDAKIS; ANDROULARIS; 2006). Vários fatores afetam o remodelamento ósseo, tais como hormônios, medicamentos, atividade física e envelhecimento (AVIOLI, 2003). No caso do envelhecimento, observa-se uma alteração do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, associada a maior ocorrência de doenças osteometabólicas, dentre elas a osteoporose.

A osteoporose é uma doença crônico-degenerativa que afeta cerca de 200 milhões de pessoas no mundo. No Brasil, estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas sofram com a osteoporose. Dentre os principais agravos da osteoporose ressaltamos a ocorrência de dores incapacitantes, resultado das várias microfraturas encontradas nos ossos destes pacientes, e, também por consequência da diminuição da DMO, uma maior incidência de fraturas ósseas. Estas fraturas ósseas são, muitas vezes, responsáveis pela alta morbimortalidade associada a osteoporose. Estimativas da Fundação Internacional de Osteoporose (FIO) apontam para um aumento de 400% no número de fraturas em homens e mulheres com idade entre 50 e 64 anos na América Latina entre os anos de 1990 e 2050. Já para os indivíduos acima de 65 anos este percentual aumentará até 700% (ARAUJO; OLIVEIRA; BRACCO, 2005). A diminuição da mobilidade individual, muitas vezes associadas a dores em determinados ossos afligidos pela doença, é o principal fator de morbidade da osteoporose. Esta incapacitação individual (agravada ao máximo quando em fraturas de difícil cicatrização) tem causado um altíssimo impacto econômico ao sistema de saúde pública e privada, da ordem de 6 bilhões de dólares, chegando até 13 bilhões de dólares em 2050. O elevado ônus sócio-

econômico tem suscitado pesquisas na área clínica e na área básica visando novas formas de diagnóstico e tratamento da osteoporose.

Não obstante, seus sinais patognomônicos bem determinados, a osteoporose é uma doença multifatorial, onde fatores ambientais e fisiológicos exercem papéis importantes no estabelecimento, desenvolvimento e, possivelmente, no tratamento desta mazela (BOSKEY, 1981). Apenas recentemente os mecanismos genéticos associados à osteoporose têm sido esclarecidos (LISCUM, 1992). Alguns destes mecanismos têm importantes implicações para a fisiopatologia e o tratamento da osteoporose. Ademais, uma importância ímpar está sendo atribuída aos fatores genéticos de baixa penetrância, como os polimorfismos genéticos, encontrados em alguns genes associados ao metabolismo ósseo e mineral, como potenciais preditores prognósticos e possíveis novos alvos terapêuticos na osteoporose (KELLY & HARRIS, 1995). Mutações e polimorfismos em genes como os que codificam os receptores de vitamina D (RVD), o fator de crescimento insulina símile tipo 1 (IGF-1), a interleucina 6 (IL-6), a apolipoproteína E (APOE) e os receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$  ( $RE\alpha$  e  $\beta$ ), mostram alta correlação com a baixa DMO durante a senescência (para revisão ver LIU et al., 2003). No entanto, nenhuma destas alterações genéticas já estudadas se mostraram fortemente correlacionadas à osteoporose quando em ausência dos principais fatores de risco associados à doença, primariamente a idade avançada e deficiência de hormônios sexuais.

É sabido que as mulheres menopausadas são o grupo populacional mais afligido pela osteoporose (WHO, 2010). Em particular, o estrogênio é o hormônio feminino com maior ação na formação e na mineralização óssea conhecido (HILLARD & STEVENSON, 1991). Portanto, a mimetização da deficiência estrogênica - pela ovariectomia (OVX) - em modelos animais tem sido amplamente utilizada no estudo da osteoporose pós menopausa. Em particular, modelos murinos (ratos e camundongos) apresentam mecanismos de reabsorção óssea semelhantes aos observados em seres humanos, fazendo destes modelos os mais amplamente utilizados na pesquisa em osteoporose (KOBAYASHI; HARA; AKIYAMA, 2002; TANAKA et al., 2001; BINKLEY et al., 2002; ONOE et al., 2000; ERBEN et al., 2002). É importante mencionar que os estudos em animais não visam a substituir as pesquisas em seres humanos, mas complementá-las, principalmente devidos as

limitações de técnicas que podem ser usadas em pessoas. Por essa e outras razões, modelos animais são essenciais para possibilitar o entendimento de doenças humanas (BEDELL; JENKINS; COPELAND, 1997). Em adição, ratos e camundongos apresentam muitas similaridades com humanos no funcionamento de órgãos e sistemas, possibilitando comparações entre as espécies.

Tanto seres humanos quanto murinos apresentam um sistema gastrointestinal muito semelhante no contexto da absorção de nutrientes. Ademais, a muito tempo é sabido que nutrientes como cálcio, fosfato, magnésio e vitaminas, como a vitamina K e D, são importantíssimas para o remodelamento ósseo satisfatório (LANHAM-NEW, 2008). Na última década a vitamina K tem recebido bastante atenção como potencial agente adjuvante na terapêutica da osteoporose pós menopausa (SHEARER, 2000; OZURU et al., 2002; IWAMOTO et al, 2009; SHIRAKI & ITTABASHI, 2009). Estudos com modelos animais sobre o papel da vitamina K no metabolismo ósseo também tem sido realizados em abundância (MATSUNAGA et al., 1999; MAWATARI et al., 2000; KOBAYASHI, HARA & AKYAIMA, 2002; KANEKI et al, 2006). A vitamina K possui importante função fisiológica como fator na gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico da proteína osteocalcina (OC). A carboxilação confere à osteocalcina a capacidade de se ligar ao cálcio, mineral que se encontra no osso sob a forma de cristais de hidroxiapatita. (BINKLEY et. al., 2009; LANHAN-NEW, 2008). Existem evidências de que a ingestão de VK possa aumentar a DMO, reduzir o risco de fraturas, (HEISS et al., 2008), prevenir a perda óssea precoce através da inibição da reabsorção óssea e proteger contra a perda e conectividade do osso trabecular (HARRIS et al., 2009; ADAMI, 2007). Assim como outras vitaminas lipossolúveis a VK, é absorvida no intestino delgado e levada aos diferentes tecidos através de sua incorporação a proteínas carreadoras, tais como a apolipoproteína E presente nos quilomícrons (SHEARER, BACH & KOHLMEIER, 1996; SHEARER, 2000; STAFFORD, 2005). Portanto pode-se concluir que o efeito da VK no metabolismo ósseo é dependente de outros fatores intrínsecos ao indivíduo.

A ApoE é uma proteína sintetizada em diferentes tecidos, tais como intestinos, fígado, e rins e participa do metabolismo lipídico desempenhando funções específicas em cada órgão. É bem caracterizado que a ApoE está intimamente ligada à aterosclerose (GREENOW et al., 2005; MARTINS et al., 2006; CARTER, 2007; WEINER et al., 2008). Contudo estudos mais recentes têm também associado

esta proteína à doenças como câncer, mal de Alzheimer e osteoporose (PLUIJM, 2002; OJOPI et al, 2004; PETER et al, 2011; BAO et al, 2013; KIM et al, 2014; POIRER et al, 2014). Em humanos existem três isoformas de ApoE codificadas por três genes independentes no cromossomo 12 denominados APOE2, APOE3, e APOE4. Portanto, combinações de ApoE2/2, 2/3, 2/4, 3/3, 3/4 e 4/4 são encontradas com diferentes distribuições na população humana (VILLENEUVE et al, 2013). Contudo, o alelo ApoE4 é o único fator de risco genético já identificado para desenvolvimento da osteoporose (PLUIJM, 2002; ZAJICKOVA et al, 2003; SHOFS et al, 2004; SINGH et al., 2010; PETER et al, 2011; HOU & WU, 2102). Acredita-se que esta associação da APOE4 com a osteoporose se deva ao fato desta proteína apresentar menor afinidade ao receptor de LDL, diminuindo a eficiência na liberação do conteúdo lipídico para as células alvo, no caso os osteoblastos (PARHAMI, GARFINKEL & DEMER, 2000; NEWMAN et al, 2002). Contudo, os dados relacionados ao papel da ApoE4 na osteoporose são ainda pouco conclusivos.

É sabido que a expressão da ApoE é regulada por diferentes fatores, tais como hormônio sexuais (COLTON, BROWN, VITEK, 2005). Em particular o estrogênio é capaz de aumentar a expressão da ApoE em vários modelos experimentais e tecidos de mamíferos (SRIVASTAVA et al, 1997; LAMBERT, COYLE & LENDON, 2004; SRIVASTAVA, AVERNA & SRIVASTAVA, 2008). Sabe-se também que o estrogênio é o principal modulador da formação de matriz óssea e mineralização (AVIOLI, 1993; DECHERNEY, 1993; FONTANA & DELMAS, 1998; COMPSTON, 2001; AMADEI et al, 2006; FITZPATRUCHE, 2006; FRAZÃO & NAVEIRA, 2006). Portanto, neste trabalho, objetivou-se investigar a interrelação da vitamina K, ApoE e estrogênio no metabolismo ósseo através de modelos animais onde tais condições foram manipuladas por castração (ou ovariectomia, que mimetiza a menopausa), perda da ApoE circulante (utilizando-se animais ApoE *knock-out*) e suplementação de VK em condições exclusivas.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Estudar alguns fatores possivelmente envolvidos com o metabolismo ósseo e mineral que podem ser úteis em futuras estratégias terapêuticas para osteoporose. Utilizar técnicas diversas para validar estas estratégias no contexto de diagnósticos sorológico e de imagem da osteoporose.

### **2.1 Objetivos Específicos**

Através de dois modelos animais de estudo, analisar aspectos bioquímicos, estruturais e ultraestruturais no tecido ósseo, em camundongos tratados com vitamina K e na ausência da ApoE (ApoEKO) em relação a osteoporose pós menopausa.

2.1.1 Verificar a ação da vitamina K na densidade mineral óssea (DMO) e na ultraestrutura do tecido ósseo em camundongos C57Bl6 ovariectomizados e não ovariectomizados.

2.1.2 Verificar a influência do gene ApoE na densidade mineral óssea (DMO) e na ultraestrutura do tecido ósseo em camundongos C57 ovariectomizados e não ovariectomizados.

2.1.3 Determinar parâmetros relativos ao metabolismo osteomineral no soro e urina dos diferentes modelos animais.

2.1.4 Analisar a ultraestrutura do tecido ósseo nos modelos animais acima descritos, através de imagens obtidas na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Verificar a semiquantificação de fibras colágenas tipo I no tecido ósseo de animais ovariectomizados e não ovariectomizados em imagens obtidas na MET.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

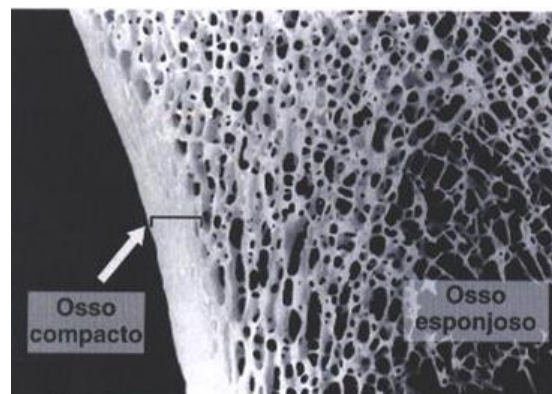
#### 3.1 Estrutura e Função do Tecido Ósseo

O tecido ósseo, ao contrario da visão geral, é um tecido altamente dinâmico. Os ossos estão continuamente em processos de formação e destruição, num mecanismo chamado de remodelamento. O remodelamento ósseo serve a dois propósitos: reparação tecidual e manutenção das concentrações séricas de íons como cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fosfato (Pi) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), essenciais para diferentes funções do organismo (TORTORA, 2010). Além de ser essencial para homeostasia mineral do corpo, o tecido ósseo fornece suporte e proteção a diferentes órgãos do organismo além de ser essencial para o sistema locomotor. O osso é composto de diversos tecidos diferentes trabalhando em conjunto: o tecido ósseo propriamente dito, a cartilagem, tecidos conjuntivos densos, epitélio, tecido adiposo e tecido nervoso associado (TORTORA, 2010). O tecido ósseo propriamente dito consiste em células de duas diferentes origens embrionárias, em diferentes graus de diferenciação, embebidas numa matriz intercelular impregnada de minerais (sais de cálcio, magnésio e fósforo na forma de hidroxiapatita majoritariamente). A mineralização da matriz óssea é realizada sobre um molde de substâncias orgânicas cuja composição é principalmente de proteínas e glicoproteínas. Dentre estas proteínas, destaca-se o colágeno (WILLIAMS et. al., 1995). Por consequência a matriz óssea adquire propriedades biomecânicas únicas, dentre elas uma dureza característica, que propicia a execução do papel deste tecido no sistema locomotor.

Os ossos podem ser classificados de diferentes formas. A principal forma de classificação do tecido ósseo é quanto às suas características macroscópicas, a saber: o osso compacto contendo poucos espaços, que é a forma de tecido ósseo mais resistente e o osso esponjoso (Figura 1) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). O osso compacto é encontrado abaixo do perióstio de todos os ossos e formando a maior parte da diáfise do osso longo. O osso compacto fornece proteção e suporte e resiste às forças produzidas pelo peso e movimento. Vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos provenientes do perióstio (camada celular composta de células pouco diferenciadas que cobrem o tecido mineralizado) penetram no osso compacto



por meio dos canais perfurantes transversais – chamados de canais de Volkmann. Os vasos sanguíneos e nervos dos canais perfurantes conectam-se com aqueles da cavidade medular óssea, do periósteo e dos canais centrais (ou canais de Havers) em direção a unidade formadora de tecido. Os componentes do tecido ósseo compacto estão dispostos em unidades repetidas, chamadas de ósteons ou sistema de Havers. Cada ósteon consiste em um canal central (de Havers), com suas lamelas, lacunas, osteócitos e canaliculos dispostos concentricamente. Os ósteons no tecido ósseo compacto estão alinhados na mesma direção, ao longo das linhas de tensão. Na diáfise (região mediana do osso, entre as regiões de borda), por exemplo, encontram-se paralelos ao eixo do osso. Como resultado, o corpo de um osso longo resiste ao encurvamento ou fratura, mesmo quando uma força considerável é aplicada em qualquer uma de suas extremidades. As linhas de tensão em um osso alteram-se em resposta à atividade física vigorosa e repetida (TORTORA, 2010). Também se alteram em resposta às fraturas ou à deformidade física. Assim, a organização dos ósteons não é estática, se altera com o tempo e em resposta à pressão e/ou estresse a que é submetida o esqueleto.



**Figura 1** - Corte grosso de um osso seco, ilustrando o osso cortical e o osso esponjoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Ao contrário do tecido ósseo compacto, o osso esponjoso não contém ósteons. O termo “esponjoso” não se refere à textura do osso, apenas à sua aparência. O osso esponjoso consiste em lamelas dispostas em uma treliça irregular de finas colunas de ossos, chamadas de trabéculas. Os espaços macroscópicos entre as trabéculas ajudam a tornar os ossos mais leves e, algumas vezes, são preenchidos com

medula óssea vermelha, que contém numerosos vasos sanguíneos pequenos. Dentro de cada trabécula estão as lacunas, que contém osteócitos (células formadoras de osso, plenamente diferenciadas). Os canalículos irradiam-se para fora a partir das lacunas. Os osteócitos recebem nutrientes do sangue circulante por meio dos vasos sanguíneos presentes nos espaços entre as trabéculas. O tecido ósseo esponjoso constitui a maior parte do tecido ósseo dos ossos curtos, planos, irregulares e a maioria das epífises dos ossos longos. O osso esponjoso é sempre recoberto por uma camada de osso compacto para proteção. À primeira vista, as estruturas dos osteons do tecido ósseo compacto parecem ser muito organizadas e as trabéculas do tecido ósseo esponjoso parecem dispostas aleatoriamente. Contudo, as trabéculas do tecido ósseo esponjoso estão precisamente orientadas ao longo das linhas de tensão, uma característica que ajuda os ossos a resistir às forças de tensão e transferir essa força sem se quebrar. O tecido ósseo esponjoso tende a se localizar onde os ossos não são submetidos a forças muito grandes, ou em locais em que as forças são aplicadas a partir de muitas direções (ABRAHAM, 2004). O tecido ósseo esponjoso se diferencia do tecido ósseo compacto em dois aspectos. Primeiro, o tecido ósseo esponjoso é leve, o que reduz o peso total do osso, de modo que ele se movimenta mais facilmente quando traçado pelo músculo esquelético. Segundo, as trabéculas do tecido ósseo esponjoso suportam e protegem a medula óssea vermelha. O osso do quadril, costelas, esterno, ossos da coluna vertebral, e epífises dos ossos longos, representam locais em que a medula óssea vermelha está armazenada (ABRAHAM, 2004). Portanto, mesmo o tecido ósseo apresentando uma aparência homogênea, apenas uma visualização mais atenta leva a verificação que o tecido apresenta funções diversas.

Além da matriz mineralizada abundante no tecido, o osso é composto também de células que desempenham um papel fundamental na manutenção do tecido. O tecido ósseo é formado por duas diferentes linhagens celulares: a linhagem osteoblástica, que inclui células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos; a linhagem monocítica-macrofágica, de onde derivam os osteoclastos. As células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos por um mecanismo regulador que envolve uma série fatores de crescimento e de transcrição, e estão presentes na camada interna do perióstio e do endóstio (revestimento da cavidade medular dos ossos longos). Os osteoblastos se diferenciam em osteócitos quando são

aprisionados na matriz mineralizada que produziram. As células osteoprogenitoras persistem na vida adulta e são reativas durante o reparo de fraturas ósseas e outras lesões. Os osteoblastos, por sua vez, formam uma monocamada que recobre todos os locais ativos de formação óssea. São células altamente polarizadas que depositam matriz orgânica não mineralizada do osso. Os osteoblastos iniciam e controlam a mineralização do osso (GRAY, 1995). Portanto, as células osteoblásticas desempenham um papel fundamental na síntese de tecido ósseo.

Por desempenhar um papel importante na síntese do tecido ósseo, os osteoblastos exibem as características típicas de células ativamente engajadas na síntese de proteína, na glicosilação e na secreção (para revisão ver SIMS & VRAHNAS, 2013). As principais proteínas sintetizadas pelos osteoblastos são o colágeno tipo I, a osteocalcina, a osteopontina e a sialoproteína óssea. Os osteoblastos produzem também forte reação citoquímica para a fosfatase alcalina que desaparece quando as células estão embebidas na matriz, diferenciando-se em osteócitos (LEBLOND, 1981). Os osteócitos são células plenamente diferenciadas da linhagem osteoblástica, e mantêm a matriz extracelular do osso (TORTORA, 2010). Estas células são, no entanto, passíveis de desdiferenciação, podendo retornar ao estágio de alta atividade metabólica, os blastos. Visualizadas em micrografias de alta resolução, os osteócitos são células altamente ramificadas com seu corpo ocupando pequenos espaços entre as lamelas. As lacunas se interconectam através de pequenos canais, os canalículos. Processos celulares dos osteócitos encontrados no interior dos canalículos se conectam através de junções comunicantes (COHEN, 1958). Os nutrientes se difundem a partir de vasos sanguíneos capilares, situados no interior do canal Haversiano, através dos canalículos e para as lacunas. A vitalidade do osteócito e da matriz óssea depende do fornecimento vascular e da distância deste em relação aos canalículos. Se o fornecimento vascular for contínuo, os osteócitos podem permanecer vivos durante anos

É sabido que os osteoblastos/osteócitos são essenciais também para sinalização do processo de reabsorção óssea à distância. Duas proteínas sintetizadas pelos osteoblastos são essenciais na formação dos osteoclastos: o fator de estimulação de colônias derivado de macrófago (do inglês *Macrophage Colony Stimulating Factor*, ou M-CSF), que induz a diferenciação dos macrófagos em precursores proliferativos osteoclásticos no tecido circunjacente ao osso (para revisão ver

CHARLES & ALIPRANTIS, 2013). As células precursoras de osteoclastos são monócitos que atingem o osso através da circulação sanguínea e se fusionam em células de até 30 núcleos, formando osteoclastos por um processo regulado pelos osteoblastos e pelas células do estroma da medula óssea (ABRAHAM, 2004). Além do M-CSF, destaca-se a proteína denominada RANKL (do inglês *Receptor Activated NF $\kappa$ B Ligant*), que estimula as células induzidas por M-CSF a se diferenciar em osteoclastos funcionais. Após aderir a matriz óssea, os osteoclastos geram um ambiente ácido segregado e necessário para a reabsorção óssea. Primeiro há a dissolução dos componentes inorgânicos do osso (desmineralização) mediada pela enzima próton adenosina trifosfatase ( $H^+$  - ATPase) (CHARLES & ALIPRANTIS, 2013) seguida da degradação enzimática do componente orgânico pela protease lisossomal catepsina K (CURREY, 1984). Portanto, a interação entre os osteoblastos e os osteoclastos é essencial na remodelação e renovação óssea.

Morfologicamente, o osteoclasto é uma célula grande (até 100 $\mu$ m de diâmetro) e altamente polarizada, multinucleada, ocupando uma concavidade rasa chamada lacuna de Howship ou compartimento subosteoclástico. O citoplasma do osteoclasto é rico em mitocôndrias fonte de adenosina trifosfato (ATP), que energiza a bomba de  $H^+$  na acidificação do compartimento subosteoclástico. Em adição, o ATP gera outros substratos energéticos essenciais para a fusão dos lisossomos e liberação das enzimas lisossomais. Os osteoclastos são ativos em resposta à demanda metabólica de cálcio do osso para o sangue, em processos que envolvem hormônios como o paratormônio e a vitamina D (para revisão ver ESBRIT & ALCARAZ, 2014). A atividade osteoclástica também é regulada diretamente pela calcitonina (sintetizada pelas células parafoliculares, derivadas da crista neural, as células C do folículo tireóideo) e por moléculas reguladoras produzidas pelos osteoblastos e células do estroma da medula óssea (prostaglandinas e leucotrienos, para revisão ver FELSENFELD, RODRIGUEZ & LEVINE, 2014). Conclui-se, portanto que o tecido ósseo interage com o sistema endócrino, tanto na manutenção de seu conteúdo mineral quanto na comunicação entre suas células.

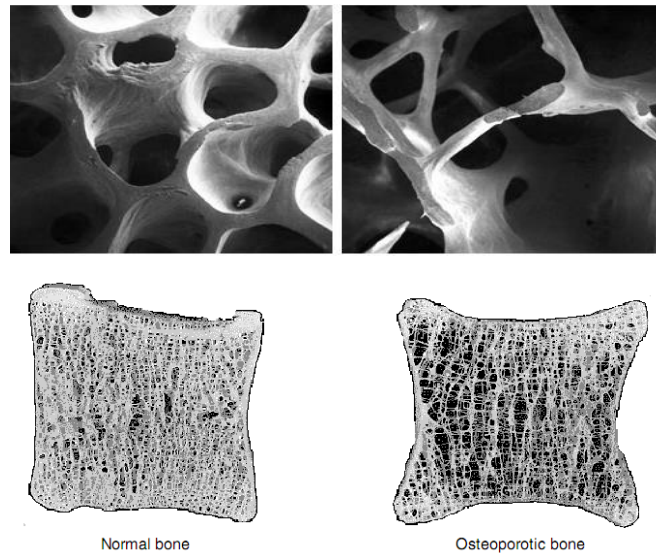
Estas populações de células encontram-se embebidas numa matriz extracelular altamente especializada, a matriz óssea. A matriz óssea consiste de componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). O componente inorgânico do osso é

representado predominantemente por depósitos de fosfato de cálcio com características cristalinas da hidroxiapatita. Esses cristais estão distribuídos ao longo do comprimento das fibras colágenas. Além dos íons cálcio, fosfato, hidroxiapatita e carbonato; íons menos numerosos e em quantidades baixas, estão presentes no conteúdo inorgânico do osso; por exemplo: sais citrato, magnésio, sódio, potássio, fluoreto, cloreto, ferro, zinco, cobre, alumínio, chumbo, estrôncio, silício e boro (TERMINE et al., 1981). A matriz óssea orgânica contém fibras colágenas tipo I (90%), proteoglicanos ricos em condroitinsulfato, queratansulfato e ácido hialurônico; e proteínas não colagenosas (BOSKEY, 2014). O colágeno tipo I é a proteína predominante da matriz óssea. No osso lamelar maduro, as fibras colágenas têm um arranjo altamente ordenado com alternância de sua orientação de acordo com o eixo do canal haversiano nas lamelas concêntricas sucessivas. Vasos sanguíneos circundam este sistema de canais. O osso pode ser penetrado por feixes de fibras colágenas provenientes de estruturas superficiais, incluindo tendões e ligamentos (FRASCA et al., 1981). As proteínas não colagenosas incluem osteocalcina, osteopontina e osteonectina, sintetizadas pelos osteoblastos e com propriedades específicas na mineralização do osso (CANCELA, LAIZÉ & CONCEIÇÃO, 2014). Em termos de regulação, a síntese de osteocalcina e da osteopontina é estimulada pelo metabólico ativo da vitamina D,  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  colecalciferol. Já a osteonectina, por não ser um produto exclusivo dos osteoblastos, é regulada por vários sinalizadores (WAI & KUO, 2008), apresentando um papel importante nos tecidos que sofrem remodelação e morfogênese. Outras proteínas sinalizadoras como a osteoprotegerina, o RANKL e o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) são minoritárias no tecido ósseo, mas desempenham papéis fundamentais nos processos de remodelamento como discutido anteriormente.

### **3.2 Remodelamento Ósseo**

O remodelamento ósseo é, portanto, a substituição contínua de tecido ósseo velho por tecido ósseo novo. O remodelamento é importante na manutenção da massa óssea (LERNER, 2006). Esse processo compreende a reabsorção óssea - a remoção de minerais e de fibras colágenas do osso pelos osteoclastos - e a deposição óssea, a adição de minerais e fibras colágenas ao osso pelos

osteoblastos. Estima-se que em cada momento, aproximadamente 5% de massa óssea total do corpo está sendo remodelada (LISCUM, 1992). Um remodelamento desbalanceado pode levar à perda de massa óssea, levando a osteopenia ou mesmo à osteoporose. (Figura 2) (LANHAM-NEW, 2008).



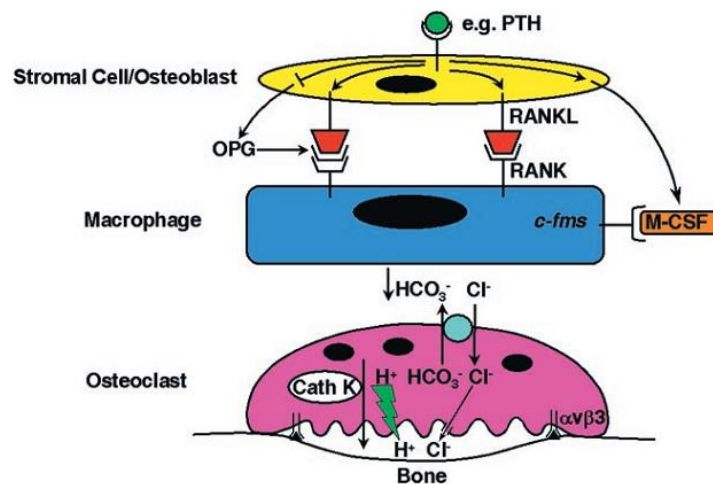
**Figura 2** - Representação de um osso normal e de um osso osteoporótico respectivamente (LANHAM-NEW, 2008).

O remodelamento contínuo possui diversas vantagens. Se o osso recém-formado é submetido a cargas intensas, crescerá mais espesso, será mais resistente do que o osso velho. A forma de um osso pode ser alterada para suporte apropriado, com base em padrões de tensão experimentados durante o processo de remodelamento (CASANOVA et al, 2014). Assim, o osso novo é mais resistente à fratura do que o osso velho. O remodelamento ósseo do calo acaba sendo a fase final do reparo das fraturas. Além da manutenção da massa óssea, o remodelamento ósseo atua no reparo de microlesões ósseas (LERNER, 2006). O processo de remodelamento inicia-se pela reabsorção óssea. Como a formação e a ativação dos osteoclastos são controladas pelos osteoblastos, a fase inicial do remodelamento consiste na ativação dos osteoblastos (ERIKSEN; MELSEN; MOSEKILDE, 1984; LERNER, 2006).

O fator estimulador da colônia de macrófago (M-CSF), secretado pelos osteoblastos, é considerado como o agente inicial no processo de remodelamento ósseo.

O M-CSF é necessário para a sobrevivência e proliferação dos precursores de osteoclastos, o monócito-macrófago. Os osteoblastos e as células do estroma da medula óssea produzem o ligante (RANKL) do fator nuclear de ativação kappa B (NF-KB) com afinidade de ligação para o receptor RANK. O NF-KB é uma proteína heterodimérico fundamental no processo de transcrição gênica, ativado em resposta à sinalização inflamatória e/ou imunológica (TEITELBAUM, 2000; BOYLE et al., 2003). A interação do receptor RANK, das células precursoras de osteoclastos, com o RANKL exposto na superfície dos osteoblastos determina o contato célula-célula necessária para futura maturação do precursor de osteoclasto. Os osteoblastos sintetizam também osteoprotegerina, uma proteína com alta afinidade de ligação por RANKL. Assim, a osteoprotegerina é uma proteína "armadilha" solúvel que se liga ao RANKL e impede a interação RANK-RANKL (TU, 2014). Consequentemente, a osteoprotegerina modula o processo osteoclastogênico. Portanto, duas proteínas são essenciais na osteoclastogênese. O M-CSF, que induz a diferenciação dos macrófagos em precursores proliferativos osteoclastóticos, e RANKL, que estimula as células induzidas por M-CSF a se diferenciar em osteoclastos funcionais.

Os osteoclastos diferenciados, então, polarizam a superfície óssea, gerando um microambiente ácido isolado entre eles e a superfície óssea. A reabsorção óssea envolve primeiramente a dissolução dos componentes inorgânicos da matriz óssea (desmineralização óssea) mediada pela enzima adenosina trifosfatase (ATPase); seguida pela reabsorção enzimática dos componentes orgânicos da matriz óssea, mediada pela protease catepsina K. (Figura 3) (TEITELBAUM, 2000).



**Figura 3** - Mecanismo da osteoclastogênese e de reabsorção óssea (TEITELBAUM, 2000).

Ao se completar o ciclo da reabsorção, os osteoclastos secretam proteínas que servirão de substrato para a fixação de osteoblasto (MCKEE, 1993) e sofrem apoptose. A morte dos osteoclastos é induzida, possivelmente, pelo fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ ), responsável também pelo bloqueio da reabsorção e pela atração dos osteoblastos (HUGHES, 1996). Os osteoblastos proliferam durante o processo de reabsorção, sintetizam novo colágeno e outras proteínas da matriz, preenchendo a cavidade de reabsorção com osteóide novo, segue-se a deposição mineral, que se prolonga por vários dias. Apenas poucos osteoblastos permanecem presos à matriz em mineralização, transformando-se em osteócitos, enquanto a maioria sofre apoptose (AMADEI et al., 2006). Desbalanços nos mecanismos associados ao remodelamento podem gerar doenças graves, acometendo o tecido ósseo. Dentre as principais doenças osteometabólicas da atualidade destacamos a osteoporose.

### 3.3 Osteoporose

Com o aumento da expectativa de vida no último século, observado em países desenvolvidos e em desenvolvimento, a incidência e a prevalência da osteoporose e seu custo para a sociedade estão crescendo consideravelmente (KOWALSKI; SJENZFELD; FERRAZ, 2001). Estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas



idosas em todo o mundo possuem osteoporose (REGINSTER; BURLET, 2006). Essa doença afeta mais de 75 milhões de pessoas na Europa, Japão e Estados Unidos (EUA), e causa mais de 2,3 milhões de fraturas anualmente na Europa e no Japão, sendo, por isso, a principal causa de fratura por fragilidade esquelética (WHO, 2000; WHO, 2010). A osteoporose é a doença mais comum do metabolismo ósseo e a principal causa de fraturas por fragilidade esquelética, devido a repercussões individuais (mortalidade, morbidade, incapacidade funcional) e sociais (diminuição da força de trabalho, ônus econômico) (FULLER, 2000; CUMMINGS; MELTON, 2002). Sua prevalência tem aumentado em função do crescimento da população idosa e das mudanças no comportamento humano, tais como baixa ingestão de cálcio e vitamina D, sedentarismo, baixa exposição ao sol, alcoolismo e tabagismo (WANNMACHER, 2004). Portanto, a WHO encara a osteoporose hoje como um problema de saúde pública.

No Brasil, o número de estudos sobre sua prevalência é pequeno, embora seja a doença osteometabólica mais comum (FRAZÃO; NAVEIRA, 2006). Segundo a Fundação Internacional da Osteoporose (IOF), essa doença atinge cerca de 10 milhões de pessoas no Brasil (aproximadamente 1 em cada 17 pessoas tem osteoporose). Estima-se que 1 a cada 3 pacientes com fratura de quadril é diagnosticado com osteoporose e desses, somente 1 em 5 recebem algum tipo de tratamento (ZABAGLIA et al., 2001). Acredita-se que em 2050, na América Latina, o número de fraturas de quadril para mulheres e homens entre 50 e 64 anos aumente 400%. Para grupos com idade acima dos 65 anos, o aumento desse tipo de fratura será de 700% (COOPER; CAMPION; MELTON, 1992). Por isso, é estimado que latinos americanos sofram por volta de 650 mil fraturas de quadril em 2050, o que pode gerar um custo estimado de 13 bilhões de dólares (IOF, 2010). A osteoporose é uma desordem esquelética caracterizada primordialmente pela redução da densidade mineral óssea (DMO) e por alterações da microarquitetura do tecido ósseo, resultando, conseqüentemente, na diminuição da resistência óssea e no aumento da suscetibilidade a fraturas (WHO, 1994). O prejuízo a microarquitetura óssea gerado pela instauração da doença, o diagnóstico diferencial se baseia unicamente na mensuração da DMO.

Baseado nos resultados de DMO, a osteoporose é classificada em dois tipos (MELTON; RIGGS, 1988): Osteoporose primária (tipo I ou pós-menopausa) ocorre

nos primeiros 10 anos após a menopausa em consequência da deficiência de estrogênio, e caracteriza-se por uma perda óssea mais acelerada que predomina sobre o osso trabecular. Já a osteoporose secundária (tipo II ou senil), mais comum em pessoas de idade avançada, afeta ossos compactos como o fêmur e quadril. Apesar deste tipo de osteoporose ser denominada “senil” ela pode ser observada também em jovens como consequência do uso de medicamentos (como corticoides) ou de doenças associadas à osteoporose. Nesse caso a perda é mais lenta. O principal problema da osteoporose é que ela é uma doença silenciosa, muitas vezes assintomática e indetectável até o aparecimento de fraturas ósseas.

Na prática clínica, a osteoporose é eficazmente diagnosticada pela Absorciometria por dupla emissão de raios X (*Dual-energy X-ray Absorptiometry Scan – DXA*), o método mais comumente utilizado para determinar a densidade mineral óssea (DMO). O diagnóstico é estabelecido através de um T-escore, calculado em desvios-padrão (DP), tomando como referência a densidade mineral óssea média do pico da massa óssea em jovens saudáveis (Tabela 1). As regiões mais importantes para a avaliação da DMO são o colo do fêmur, a coluna vertebral baixa (região lombar) e os ossos do punho; pois são as regiões mais suscetíveis às fraturas. A avaliação da DMO total do corpo pode ser utilizada para decidir sobre a prescrição do tratamento, prever o risco de fraturas (prognóstico), monitorar o progresso da perda óssea e analisar os efeitos da terapia adotada (WHO, 2003). No entanto, somente a avaliação da DMO não é determinante para o risco de fraturas, visto que existem outros fatores de risco que são consistentemente associados à ocorrência de fraturas, como a idade, o sexo, o uso de corticosteroide. Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo indicam certas doenças associadas à osteoporose (KANIS et al., 2002), mas não são considerados “padrão ouro” no diagnóstico.

**Tabela 1** - Critérios Densitométricos da Organização Mundial de Saúde\*:  
\*Critérios estabelecidos para: coluna lombar, colo do fêmur e 1/3 médio do rádio.

<b>Categoria</b>	<b>T-escore</b>
Normal	$DMO \geq -1$
Osteopenia	$DMO > -2,5$ e $< -1,0$
Osteoporose	$DMO \leq -2,5$
Osteoporose estabelecida	$DMO \leq -2,5$ com histórico de fratura por fragilidade

Fonte: Organização Mundial de Saúde – OMS, 1994.

Assim, o principal objetivo da prevenção e do tratamento da osteoporose é evitar fraturas. Entretanto, as fraturas não são o único inconveniente da osteoporose, já que complicações secundárias como dores crônicas e dificuldades para locomoção podem deixar os pacientes muito debilitados, podendo levar à morte. Por isso, a prevenção da osteoporose e das fraturas associadas e essa doença é essencial para a manutenção da saúde, da qualidade de vida, e da independência durante o envelhecimento (SBEM, 2010). Assim, devido a alta incidência de osteoporose na pós menopausa, o acompanhamento das mulheres através de medidas sequencias da DMO é de suma importância para a prevenção da perda óssea advinda da queda dos hormônios sexuais circulantes nestas mulheres.

### 3.4 Estrogênio e Metabolismo Ósseo

Embora o efeito direto dos agentes reguladores do metabolismo mineral no osso é sabido também que o tecido ósseo é alvo de regulação de vários hormônios, dentre eles os hormônios da tireóide (T3 e T4), glicocorticoides e hormônios sexuais. Dentre os hormônios sexuais, destacam-se os estrogênios (produzidos pelos ovários) e os androgênios, como a testosterona (produzida pelos testículos). As glândulas suprarrenais, em ambos os sexos, produzem também androgênios, e outros tecidos como, por exemplo, o tecido adiposo, pode converter androgênio em estrogênio, podendo estes tecidos atuar como importantes fontes de regulação em situações de insuficiência gonadal (VELDHUIS, SHARMA & ROELFSEMA, 2014). Resumidamente, os hormônios sexuais são responsáveis pelo aumento na atividade dos osteoblastos e síntese da matriz extracelular do osso, portanto de efeito

anabólico. Contudo, muito do conhecimento acerca dos efeitos dos hormônios sexuais advém do estudo com estrogênio.

Os estrogênios promovem profundas alterações no esqueleto feminino, por exemplo, o alargamento da pelve. Os hormônios sexuais, especialmente os estrogênios, em ambos os sexos, desligam o crescimento nas cartilagens epifisiais, fazendo com que o alongamento dos ossos pare. Esse crescimento longitudinal, normalmente, termina mais cedo nas mulheres do que nos homens, em decorrência dos níveis mais altos de estrogênio (TORTORA, 2010). Durante a maturidade, os hormônios sexuais contribuem para a remodelagem do osso, diminuindo a reabsorção do osso antigo e estimulando a deposição do osso novo. Uma forma de os estrogênios reduzirem a absorção é estimulando a apoptose dos osteoclastos (HUGHES, 1996). A deficiência dos hormônios sexuais tem como um dos fatores principais, o aparecimento da osteoporose pós-menopausa. Uma vez cessada a produção dos hormônios sexuais, devido à perda da função ovariana, a massa óssea feminina diminui rapidamente nos primeiros 10 anos e lentamente nos anos subsequentes (ISHIDA et al., 1996 revisado por COMPSTON, 2001). Menor quantidade de osso formado em relação ao osso reabsorvido leva a um desequilíbrio na remodelação óssea, aumentando o risco de fraturas (RIGGS, 1987; STEVENSON, 1991; ISHIDA et al., 1996).

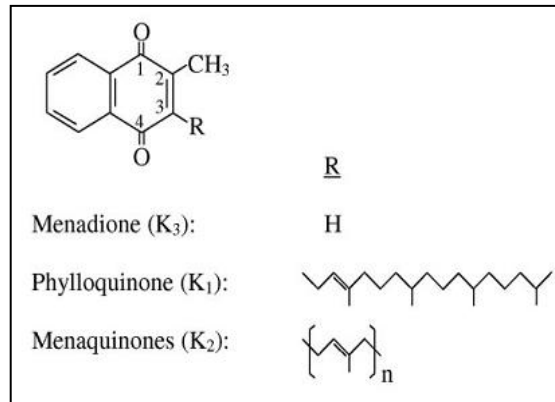
Os estrógenos estradiol ( $17\beta$  estradiol), estrona e estriol são os principais hormônios sexuais femininos. Durante a menopausa a principal fonte de produção de estrogênios é extragonadal sendo produzidos principalmente pelo tecido adiposo que expressa as enzimas aromatases e 17 beta-hidroxiesteroide ( $17\beta$ HSD). Em mulheres pós-menopausa o estrogênio predominante é estrona, que é 50 – 70% menos ativo que o  $17\beta$  estradiol. A produção extragonadal de estrógenos é influenciada pela idade e pelo peso (SALTIKI & ALEVIZAKI, 2007). Albright (1940) foi quem destacou os efeitos adversos da deficiência de hormônios sexuais no osso. Ele mostrou que o balanço negativo de cálcio característico de mulheres pós-menopausadas com osteoporose foi revertido pela administração de estrogênio (ALBRIGHT, et al., 1940; ALBRIGHT; REIFENSTEIN, 1947).

A identificação de receptores de estrogênio em osteoblastos ou em células de linhagem osteoblástica sugere que o estrogênio possa ter um efeito direto no osso e não indireto via hormônios sistêmicos como calcitonina e PTH (DECHERNEY, 1993; RIGGS et al., 2002). Embora os receptores de estrogênio estejam predominantemente nos osteoblastos, sugerindo um efeito positivo na formação óssea, o que mais se aceita é que a principal ação desse hormônio seja na reabsorção óssea (ERIKSEN et al., 1988; KOMM et al. 1988). Hughes e colaboradores (1996) investigam a capacidade do estrogênio de afetar a função osteoclástica pela indução da apoptose. O 17beta-estradiol promove apoptose osteoclástica de ratos *in vitro* e *in vivo*. Assim, o estrogênio pode prevenir perda óssea excessiva antes e após a menopausa pela indução da apoptose osteoclástica.

O estrogênio parece ser o principal regulador do remodelamento ósseo, por evitar perda óssea através de seus efeitos na atividade dos osteoblastos (MCCORMICK, 2007). O estrogênio aumenta a diferenciação dos osteoblastos e estimula a síntese e a mineralização da matriz óssea, regulando a expressão de genes que codificam o colágeno tipo I e as proteínas não colagenosas como osteopontina, osteocalcina e osteonectina (LIEL et al., 1999; BLAND, 2000).

### **3.5 Vitamina K**

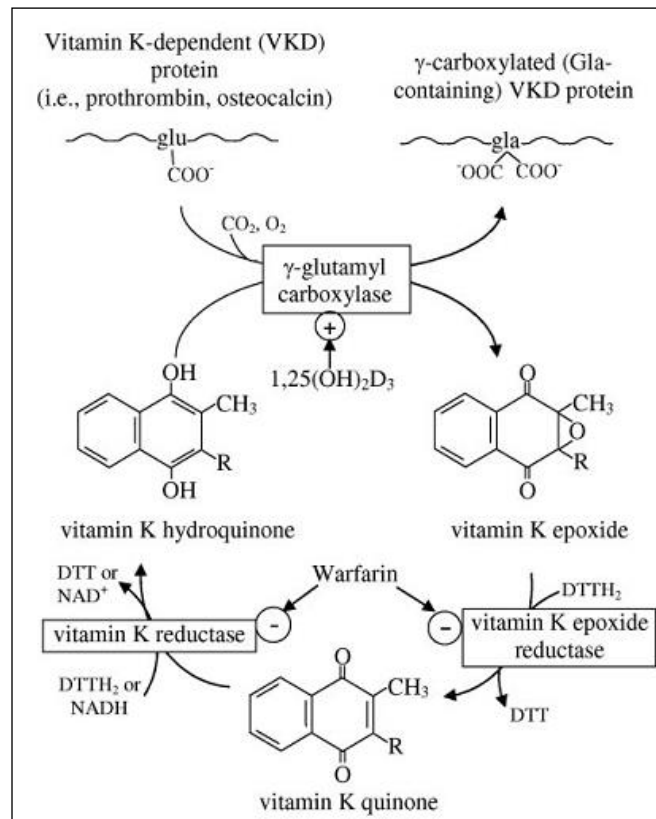
Em adição aos hormônios supracitados, uma ampla gama de moléculas atuam no metabolismo ósseo como agentes adjuvantes ora na formação da matriz ora no processo reabsortivo. Dentre estas moléculas podemos mencionar a vitamina K. A vitamina K consiste em um grupo de componentes estruturalmente relacionados em que todos possuem um anel de 2-metil-1,4-naftoquinona. Esses componentes diferem na estrutura química da cadeia lateral, um isoprenoide presente na terceira posição do anel. (SHEARER; BACH; KOHLNEIER, 1996). (Figura 4) (PEARSON, 2007).



**Figura 4** - Estruturas químicas das vitaminas K1, K2 e K3 (PERSON, 2007).

Dessas isoformas de vitamina K ocorrem naturalmente: a filoquinona (K1) e as menaquinonas (K2), ambas lipossolúveis. A K1 é sintetizada por plantas e algas; encontradas em vegetais verdes e folhosos. A VK2 é produzida por bactérias, incluindo aquelas encontradas no intestino dos vertebrados; presente em carnes, ovos, coalhadas, queijos e soja fermentada (KANEKI et al., 2006). Existem duas formas comerciais de VK disponíveis: A fitonadiona, semelhante a VK1, e a menadiona, vitamina K3; hidrossolúveis, diferente das VK1 e VK2, por não possuir o isoprenoide como sua cadeia lateral; e que é usada comumente em dietas animais (STAFFORD, 2005; TAGGART; MATSSECHINER, 1969). A vitamina K tem um efeito fundamental na formação de modificações pós transcricionais em proteínas. Em particular, a modificação de carboxilação é altamente dependente de vitamina K.

A VK age como um cofator da  $\gamma$ -glutamil-carboxilase, uma enzima que carboxila três resíduos de glutamato (GLU) em resíduos de  $\gamma$ -carboxiglutamato (GLA) em proteínas específicas como alguns fatores de coagulação sanguínea, como a protrombina e o fator VI. No tecido ósseo, a  $\gamma$ -carboxilação de algumas proteínas não colágenas como a osteocalcina (OC, proteína GLA do osso) e a proteína GLA da matriz (MGP) é fundamental para que as mesmas exerçam seus papéis de nucleadores da mineralização da matriz orgânica. A reação de carboxilação é um evento intracelular pós-traducional, por isso, uma vez secretada a osteocalcina não pode mais ser carboxilada. (MORRIS et al., 1993; BUITENHUIS; SOUTE; VERMEER, 1990; IWAMOTO et al., 2009). (Figura 5) (PEARSON, 2007). Esta modificação da osteocalcina ocorre em apenas três resíduos  $\gamma$ -carboxilados na proteína que, contudo, são suficientes para promover a adsorção do  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz.



**Figura 5** - Ciclo metabólico da vitamina K (PEARSON, 2007).

Uma vez que as proteínas dependentes de vitamina K são  $\gamma$ -carboxiladas, os resíduos de  $\gamma$ -carboxiglutamato (GLA) resultantes conferem às proteínas a capacidade de se ligarem ao cálcio, formando quelatos. A fração de osteocalcina (OC) que sofreu uma  $\gamma$ -carboxilação imperfeita ou não foi  $\gamma$ -carboxilada é denominada osteocalcina hypocarboxilada (HYP-OC), e apresenta afinidade ao cálcio fortemente diminuída. Em adição a HYP-OC não pode ser deslocada dos vasos sanguíneos para a matriz óssea devido à diminuição da afinidade pelo cálcio, perdendo, assim, sua integridade estrutural e a capacidade de funcionar como nucleador (HAUSCHKA et al., 1989; IWAMOTO, 2009). Cumpre ressaltar que a expressão da OC é regulada por vários hormônios, como a  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  colecalciferol e o próprio estrogênio (HAUSSLER et al, 2013; WANG & WANG, 2013; LIAOU et al, 2014; VAN DE PEPPEL & VAN LEEUWEN, 2014). Portanto, moléculas que atuam na manutenção da DMO tendem estimular a produção de osteocalcina também.

Conclui-se, então que a osteocalcina possa servir como biomarcador indireto para estimar a integridade do tecido ósseo.

Há alguns anos a vitamina K tem sido apontada como um possível agente adjuvante no tratamento da osteoporose pós menopausa (FLORE et al., 2013). Em trabalho pioneiro, Veermer e colaboradores (1996) apontaram para o uso da vitamina K como agente estimulador da carboxilação das proteínas GLA ósseas e consequente agente adjuvante no tratamento da osteoporose pós menopausa. Da década de 1990 até o momento, vários artigos científicos tem se proposto a analisar a real importância da vitamina K na doença, seja em pacientes quanto em modelos animais (AKIYAMA et al, 1999; BINKLEY et al , 2002; KOBAYASHI, HARA & AKIYAMA, 2002; KANEKI et al, 2006; HEISS, 2008; LANHAM-NEW, 2008; IWAMOTO et al, 2009; BINKLEY et al, 2009). Contudo, os resultados são controversos. Uma possível causa de resultados controversos sobre o papel da vitamina K, principalmente no contexto de suplementação dietética, pode ser a interação das vias de vitamina K com outros elementos genéticos intrínsecos da espécie analisada ou mesmo do indivíduo. Em estudo pioneiro em Dvornyk, Recker, Deng (2006) mostraram que centenas de genes apresentam alteração de expressão genética na osteoporose. Dentre eles podemos ressaltar a apolipoproteína E (PETER et al, 2014). Em adição, estudo conduzido por McDonald e colaboradores (2008) mostrou que a ingestão de vitamina K que apresenta benefícios para osteoporose pós menopausa em mulheres é dependente da presença da ApoE, porém não tem associação direta com as isoformas da mesma. Pode-se concluir, portanto, que a ingestão de vitamina K é fundamental a integridade do tecido ósseo, sua biodistribuição é necessária para a síntese e mineralização da matriz orgânica mas, não há uma alteração significativa quando se analisa o principal carreador de vitamina K para os ossos, o LDL.



### 3.6 Apolipoproteína E

A apolipoproteína E (ApoE) foi primeiramente descrita por SHORE e SHORE em 1973 como uma parte da partícula de VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) sintetizadas principalmente no fígado (BLUE et al., 1983) e em macrófagos (MAZZONE, 1996) e que atuam no transporte de triglicerídeos do fígado para os tecidos periféricos. A ApoE possui um papel importante também na distribuição e no metabolismo de colesterol e triglicerídeos entre muitos organismos e tipos celulares no corpo humano, inclusive o tecido ósseo (MAHLEY et al., 2006). No contexto da patogênese no tecido ósseo, alguns estudos sugerem que o polimorfismo no gene está relacionado à osteoporose pós-menopausa e ao aumento do risco de fraturas de punho, vértebras, cabeça do fêmur e quadril, e baixa DMO em diferentes estudos (PLUIJIN et al., 2002; LONG et al., 2004; SCHOFFS et al., 2004; SALAMONE et al., 2000; SHIRAKI et al., 1997; CAULEY et al., 1999; KOHLMEIER et al., 1998; JOHNSTON, 1999). Contudo, em estudo amplo realizado em mais de 5 mil pacientes conduzido por Schoofs e colaboradores (2004) não foram encontradas relações como os polimorfismos de ApoE na osteoporose pós menopausa. Acredita-se que os efeitos da ApoE sejam, portanto, co-dependentes de outros co-fatores também associados à osteoporose e não exclusivos da molécula (PETER et al., 2011).

A ApoE é uma proteína com peso molecular de 34 kDa composta de 299 aminoácidos (UTERMANN et al., 1979). Também se integra a uma subclasse de lipoproteínas de alta densidade (HDL) que atua no transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. A ApoE possui um papel chave no metabolismo desses lipídios e lipoproteínas (TAVINTHARAN et al., 2007) mantendo a integridade estrutural das mesmas, bem como a mediação do transporte lipídico através da interação com receptores lipoproteicos (CHAN, 2006). Baseado em dados de cristalografia de raios X, a ApoE apresenta-se em duas bandas circulares do tipo “ferradura” em torno de uma partícula esférica de fosfolípido. Há interação com as cabeças polares do fosfolípido destes grupos e não com o núcleo de ácido graxo. Desta maneira, a ApoE nesta partícula possui a capacidade única de facilitar a expansão do núcleo e acomodar o conteúdo aumentado de colesterol livre seguido da atividade da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) (CURTISS, L.K., 2000).

Não obstante a ApoE ser produzida principalmente pelo fígado e macrófagos, níveis baixos de expressão gênica são encontrados em outros tecidos, como o epitélio intestinal (HUSSAIN et al, 1996; SRIVASTAVA, BHASIN, SRIVASTAVA, 1996). No enterócito a ApoE participa da montagem dos quilo microns e, na estrutura deste proteolípídeo, auxilia a internalização destes complexos no fígado. Portanto, a principal função da ApoE é transportar lipoproteínas solúveis em gordura, vitaminas e colesterol do sistema linfático para o sangue. A ApoE foi inicialmente reconhecida pela sua importância no metabolismo de lipoproteínas e em doenças cardiovasculares, em particular a aterosclerose (PANZA et al, 2007; WOJTCZAK & SKRETKOWICZ, 2008; ROHN, 2014). Mais recentemente tem sido estudada em relação ao seu papel em muitos processos biológicos que não estão diretamente relacionados com o transporte de lipoproteínas, incluindo a doença de Alzheimer, a imunorregulação e a cognição (OJOPI et al., 2004). Em seres humanos, entretanto, os resultados são também ainda contraditórios e inconclusivos para outras doenças.

O gene ApoE possui três principais isoformas em humanos: ApoE2, ApoE3 e o ApoE4; que são formas alélicas que se diferem entre si por um ou dois aminoácidos nas posições 112 e 158; diferenças essas que alteram suas estruturas e funções; com consequências fisiológicas. O ApoE2 está associado a um aumento ou diminuição do risco de aterosclerose. O ApoE3, encontrado em 79% da população é considerado um genótipo “neutro”. O ApoE4 é encontrado em cerca de 14% da população, estando relacionado com a aterosclerose, doença de Alzheimer, prejudicando a função cognitiva, reduzindo o volume do hipocampo, fazendo progredir a esclerose múltipla, prejudicando lesões pós traumáticas do cérebro, provocando isquemia cerebrovascular, etc (KIM et al, 2014; POIRIERE et al, 2014; VILLENEUVE et al, 2014). O alelo ApoE4 aumentado e a acumulação lipídica oxidada no espaço subendotelial do osso pode levar à inibição de diferenciação dos osteoblastos (PARHAMI et al., 2000; LIAO et al, 2014). No que tange a osteoporose, contudo, a associação da osteoporose é ainda controversa. A maior parte dos dados obtidos da literatura, apontam a isoforma ApoE4 como fortemente associada a osteoporose pós menopausa (PETER et al, 2011). Alguns artigos inclusive associam esta isoforma com maior risco de fraturas (SHIRAKI et al, 1997; PUIJIM et al, 2002). Contudo, em extenso estudo da coorte de Rotterdam (SCHOFFS et al, 2014) foi

incapaz de promover esta associação. O gene da ApoE é um dos principais genes que controlam os níveis de lipídios no plasma de humanos e camundongos (HOFKER et al., 1998). A densidade mineral óssea (DMO) e a renovação do tecido ósseo são afetadas por fatores genéticos como os genes dos receptores de estrogênio e da apolipoproteína E (ZMUDA et al., 1999). Estima-se que 50-80% da variabilidade da DMO seja explicada por fatores genéticos (KANIS et al., 1994; KELLY et al., 1995; POCOCK et al., 1987; GUEGUEN et al., 1995). Assim, o gene que apresenta forte correlação com a baixa DMO na mulher é o gene ApoE (SOUZA et al., artigo submetido). Acredita-se que a ApoE seja, portanto, mais um co-fator na instauração da doença e não um agente causador *per se* da osteoporose.

Estudos em modelos animais tem sido de grande valia para análise da miríade de fatores de risco que podem estar ligados a uma doença multifatorial como a osteoporose. Camundongos geneticamente modificados que perdem a expressão da ApoE (chamados camundongos *knock out*) tem sido amplamente usados para o estudo da aterosclerose e dos agravos ao sistema cardiovascular que a ela se associam (IMAIZUMI, 2011). Ratos e camundongos são extensamente usados também quando submetidos a castração (ovariotectomia ou OVX) como modelos de osteoporose pós menopausa (para revisão ver KOMORI, 2014). Neste trabalho, objetivou-se estudar a interação da vitamina K, do estrogênio e da ApoE no metabolismo osteomineral. Para tanto, delineou-se dois estudos paralelos onde a interação vitamina K/estrogênio e ApoE/estrogênio foi escrutinada no âmbito da análise de biomarcadores sorológicos da osteoporose, marcadores do metabolismo mineral e análise da ultraestrutura óssea. Resultados aqui obtidos provavelmente auxiliarão no melhor entendimento dos efeitos destas moléculas no metabolismo ósseo.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aprovação do projeto**

O Comitê de Ética em Pesquisa com Animais, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, avaliou, aprovou (no dia 14 de julho de 2008) e acompanhou o referido estudo. Protocolo nº 002/2008 (Anexo 1).

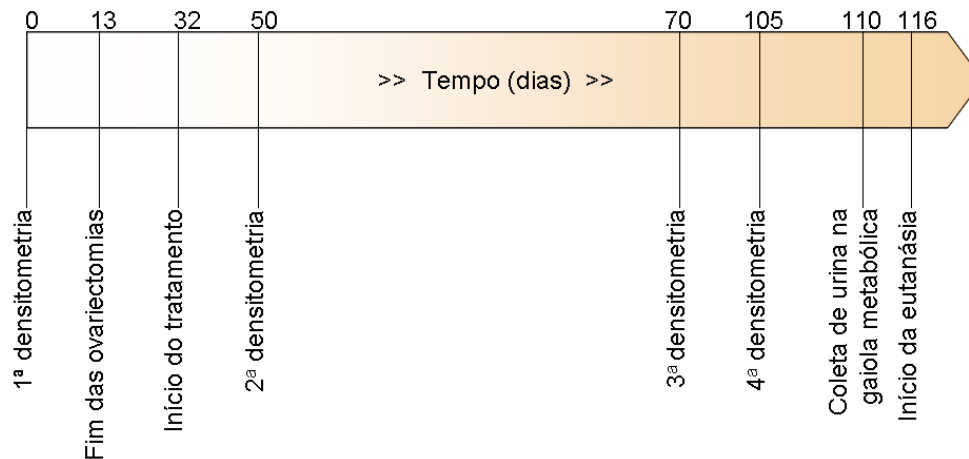
### **4.2 Delineamento do estudo**

Devido a complexidade e ao grande número de fatores que se objetivou analisar neste trabalho, entendemos que para uma melhor compreensão deste, o estudo deva ser dividido em dois sub projetos: Estudo da interação dos hormônios sexuais e da vitamina K no metabolismo osteomineral (Estudo 1 – item 5.1); Estudo da interação da ApoE e dos hormônios sexuais no metabolismo osteomineral (Estudo 2 – item 5.7).

#### **4.2.1 Estudo da interação dos hormônios sexuais e da vitamina K no metabolismo osteomineral**

Alguns estudos têm mostrado a relação entre a suplementação de vitamina K e o estado hormonal de pacientes acometidos pela osteoporose (KANEKI et al., 2006; HEISS et al, 2008; LANHAM-NEW, 2008; BINKLEY et al, 2009; IWAMOTO et al., 2009). Contudo, muito do entendimento desta interação se deve ao uso de modelos animais, principalmente ratas ovariectomizadas (AKIYAMA et al, 1993; HARA et al., 1994; AKIYAMA et al., 1999; BINKLEY et al., 2002; KOBAYASHI, HARA & AKIYAMA, 2002). Portanto, neste trabalho utilizamos protocolos semelhantes àqueles descritos na literatura. Segue abaixo um esquema do curso temporal com os pontos de intervenção (Figura 6) das atividades realizadas desde a ovariectomia e suplementação com vitamina K, até o sacrifício dos animais. Esta organização deve auxiliar no entendimento das datas em que foram realizadas as

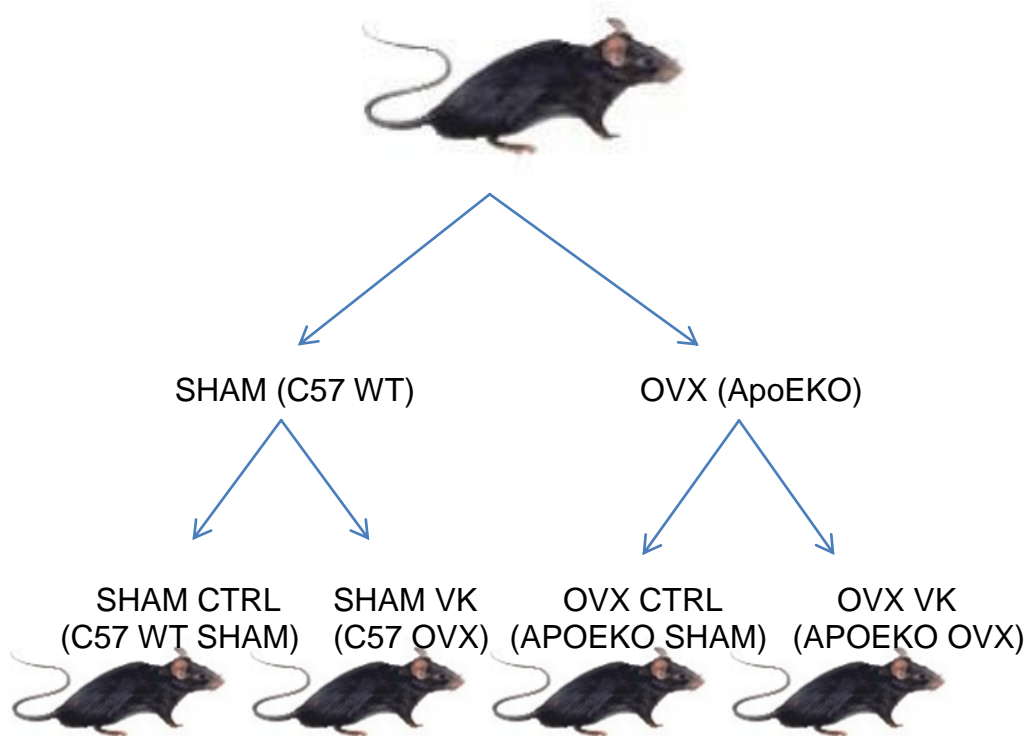
atividades de ovariectomia, densitometria, início dos tratamentos, coleta de urina e sacrifício.



**Figura 6** - Linha do tempo que apresenta as principais atividades realizadas, desde a primeira densitometria (dia 0) até o sacrifício (dia 116)

Foram utilizados vinte camundongos fêmeas C57 Black 6 (*Mus musculus*) com seis meses de vida, mantidos em gaiolas em temperatura controlada e alimentados com ração e água/água e vitamina K3 (VK3) *ad libitum*, fornecidos pelo biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular (LTCC) – responsabilidade da Dr.<sup>a</sup> Silvana dos Santos Meyrelles. O esquema inicia-se com a primeira densitometria (dia 0 – para estabelecer a DMO basal). No 13<sup>o</sup> dia após a primeira DMO foram concluídas as OVX. Cumpre ressaltar que entre os dias 0 e 12, realizaram-se outras duas outras densitometrias para estabelecimento da linha basal (não mostrado). Após 32 dias da OVX, foi iniciado tratamento com 100 mg/dia/kg de vitamina K do animal, através da ingestão na água de beber. O acompanhamento da DMO foi feita através de análise densitométrica nos dia 50<sup>o</sup>, 70<sup>o</sup>, 105<sup>o</sup> e sacrifício no dia 116. Ao sacrifício, sangue, urina, órgãos e tecidos foram retirados e estocados de acordo com o objetivo experimental a ser alcançado. Foram então utilizados quatro grupos, a saber: C57BI6 SHAM operado (também chamado de selvagem ou *wild type* (WT) ou controle; C57BI6 ovariectomizado (OVX) – ambos sem

suplementação de vitamina K; C57SHAM e C57OVX, ambos com suplementação de vitamina K. Ao final do tratamento, três camundongos de cada grupo foram alocados separadamente em gaiolas metabólicas (Instrulab. Brasil), para coleta de urina de 24 horas. Posteriormente os animais foram sacrificados por injeção de tiopental 40 mg/Kg (Thiopentax – Crisália – Brasil). Foram retirados o útero e os fêmures, além do sangue, através de punção cardíaca. Todos os animais foram pesados em balança digital imediatamente antes do procedimento cirúrgico para quantificação correta da dosagem anestésica. Também foram separados: o fígado, o coração o cérebro, o baço e os pulmões; todos colocados em solução de glutaraldeído. Para visualizarmos alguma alteração ultraestrutural no tecido ósseo retiramos amostras dos fêmures dos diferentes grupos experimentais para submetermos ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Para melhor compreensão do desenho experimental ver Figura 7.



**Figura 7** – Esquema do experimento envolvendo a ovariectomia nos camundongos C57Bl6 e APOEKO.

#### 4.2.2 Estudo da interação dos hormônios sexuais e com a ApoE no metabolismo osteomineral

Como dito anteriormente, a ApoE tem sido apontada como agente regulador da DMO. Outros relatos apontam que outros fatores podem modular o efeito da ApoE no metabolismo ósseo (ZMUDA et al., 1999). No intuito de melhor elucidar esta interação, foram utilizados dez (10) camundongos fêmeas C57 Black 6 (*Mus musculus*) e dez (10) camundongos de mesmo *background* genético, mas cujo o gene APOE foi silenciado por recombinação somática (BEDELL, JENKINS & COPELAND, 1997), doravante chamados de APOE *knock out* (ou APOEKO). Findo o 6º mês, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos com cinco animais cada. Metade dos animais foi submetida à ovariectomia bilateral (grupo OVX). A outra metade foi falsamente ovariectomizada, constituindo o grupo SHAM. Cumpre ressaltar que os mesmos procedimentos cirúrgicos foram também executados nos animais C57Bl6 controle. Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com a associação de 100 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina. Foi feita a tricotomia da região abdominal. A pele e a musculatura foram incisadas longitudinalmente e os ovários foram identificados e expostos. No caso do grupo OVX, foi feita a excisão dos ovários com sua gordura circundante, das tubas uterinas e de uma pequena porção do útero. A hemostasia foi feita através da ligação, com fio de nylon (Shalon Fios Cirúrgicos – Brasil), na porção superior da tuba uterina. Suturou-se a pele e a camada muscular com fio de sutura absorvível, categute (Shalon Fios Cirúrgicos – Brasil). No grupo SHAM, após a exposição dos ovários, procedeu-se a manipulação e recolocação na cavidade abdominal dos mesmos, tudo objetivando a simulação de um estresse cirúrgico; foi feita a sutura da cavidade abdominal. Ao fim das cirurgias, os camundongos foram mantidos por 60 dias em gaiolas individuais. Cada um dos camundongos foi então alocado em gaiolas metabólicas (Instrulab, Brasil) Um esquema da estratégia experimental é mostrado na FIGURA 7. Determinamos então os seguintes grupos: C57Bl6 SHAM operado (também chamado de selvagem ou *wild type* (WT) ou controle; C57Bl6 ovariectomizado (OVX); APOEKO SHAM; APOEKO OVX. Após dois meses, cada animal de cada grupo foi alocado em gaiolas metabólicas (Instrulab, Brasil) para coleta de urina de 24h. No dia seguinte, os animais foram sacrificados por overdose de tiopental (Thiopentax – Crisália – Brasil). O sangue foi coletado por punção cardíaca e os órgãos e tecidos de interesse foram retirados processados de acordo

com o objetivo a ser alcançado. Para análises histoquímicas os tecidos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5%. Foram retirados pequenos fragmentos de fêmures dos grupos ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX para visualização no MEV e MET.

### 4.3 Análise da Densidade Mineral Óssea (DMO)

A análise da densidade mineral óssea dos camundongos realizadas em todos os grupos experimentais descritos acima foi determinada nos tempos indicados e realizada pela análise de absorciometria por dupla emissão de raio X (*Dual-energy X-ray Absorptiometry – DXA*) (Discovery 4500A, Hologic) realizado em uma sala específica de exames do Centro de Diagnóstico e Pesquisa de Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES) (Figura 8). Os esqueletos eram visualizados tridimensionalmente através de *software* Discovery 12.4 e analisados com o programa APEX 13.0 pelo Dr. Sérgio Ragi Eis (*in memoriam*) (Anexo 2). Os resultados de DMO são expressos em g/cm<sup>2</sup>, através do cálculo da média  $\pm$  erro padrão da média.





#### 4.4 Análises Bioquímicas

O sangue coletado foi centrifugado a 6.000 x g a 4°C por 20 minutos. O soro foi separado e imediatamente congelado a -80°C até o uso. As análises de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina total (FAT), fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e creatinina no soro foram determinadas espectrofotometricamente (Biospectro SP-220 – Brasil) utilizando kits bioquímicos BIOCLIN (Quibasa Química Básica). A urina de 24 horas foi coletada e imediatamente congelada a -80°C até o uso. As análises de excreção urinária de creatinina, cálcio, fósforo foram determinadas espectrofotometricamente com os kits bioquímicos BIOCLIN (Quibasa Química Básica) e tabeladas como média  $\pm$  erro padrão da média. Todas as análises procederam conforme as especificações do fabricante. A dosagem de vitamina K nos soros foi realizada em *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC, Shimadzu, Brasil) através do fracionamento do soro em coluna Sepharose 18C. Com o uso de menadiona (Sigma Aldrich, EUA) como padrão, foi possível calcular através da curva de calibração a concentração desta vitamina no soro.

#### 4.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A excreção de deoxipiridinolina (DPD) na urina foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) em leitor multiplacas (Bioclin MR-96 – Quibasa – Brasil) utilizando o kit da Metra Biosystems (EUA). Os resultados obtidos foram corrigidos para as variações na concentração urinária dividindo o valor de DPD (nmol/L) pelo valor da creatina (mmol/L) de cada amostra. Os resultados finais do ensaio foram expressos como nmol DPD/mmol creatina. Osteocalcina total também foi determinada por ELISA com kit próprio também da Metra Biosystems (EUA). Dados também foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A determinação do percentual de osteocalcina tri carboxilada vs. di e monocarboxilada foi obtido através do fracionamento do soro em coluna de hidroxapatita (Sigma Aldrich, EUA) em *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC, Shimadzu, Brasil) e posterior análise por ELISA (Metra Biosystems, EUA).

#### 4.6 Histomorfometria

Após o sacrifício, o útero e um fêmur de cada animal foram coletados para realização da histomorfometria. Os úteros foram limpos e pesados para a determinação do peso úmido, e em seguida colocados em paraformaldeído 4% tamponado para fixação. Depois de fixados, os úteros foram desidratados em álcool com concentração crescente de 50% a 100%. Em seguida, os órgãos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina quente (56°C) para confecção dos blocos. A microtomia foi realizada para a obtenção de cortes transversais de 10µm de espessura. Os cortes foram capturados em lâminas de vidro e corados em Hematoxilina Férrica de Weigert e Eosina (Sigma Aldrich, EUA). Os fêmures foram desarticulados e limpos, sendo colocado um fêmur de cada animal no formol 4% tamponado para fixação. Posteriormente, os fêmures foram mergulhados em EDTA 10% para descalcificação. Em seguida, os ossos passaram por um processo de desidratação e inclusão em parafina de acordo com o protocolo utilizado para os úteros. A microtomia foi realizada para a obtenção de cortes longitudinais de 10µm de espessura. Os cortes foram capturados em lâminas de vidro, corados em Hematoxilina Férrica de Weigert e Safranina O (Sigma Aldrich, EUA).

A avaliação morfométrica dos úteros foi realizada por captura de imagens do útero com microscópio de luz (BEL Photonics – Brasil) utilizando aumento final de 100x para determinar a espessura do endométrio (distância entre a borda superficial do epitélio luminal e a porção mais interna do miométrio). Já a avaliação morfométrica dos fêmures foi realizada por captura de imagens do fêmur com microscópio de luz (BEL Photonics – Brasil) usando aumento final de 40X para determinar a área da linha epifisária (LE) e a espessura do osso compacto (distância entre a superfície periosteal e a superfície endosteal). O microscópio de luz foi acoplado a uma videocâmera, sendo as imagens capturadas por meio do software de captura de imagem Honestech TVR 2.5 e analisadas em programa Axion Vision 4.8 (Carl Zeiss – Alemanha). Para tanto, foram preparadas lâminas contendo cortes sequenciais de útero e de fêmur de cada animal. Para análise dos úteros, foram utilizados três campos representativos de cada lâmina, os quais foram divididos em quatro quadrantes, de tal maneira que foram obtidos doze medições para cada variável. Para a análise de fêmures, foram utilizados três campos representativos de cada

lâmina, a partir dos quais obtivemos as medidas da área da linha epifisária e da espessura do osso compacto. Para as medidas de osso compacto foram realizadas duas medidas equidistantes de cada lado do osso. O resultado final para cada animal foi determinado através da média dos valores obtidos, expresso em micrômetros.

#### **4.7 Análise Ultraestrutural: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Os fragmentos ósseos de fêmures já fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, formaldeído 4,0% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M dos camundongos C57 e ApoEKO foram pós-fixados por duas horas em solução contendo tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M em pH 7,2 à temperatura ambiente. Após três lavagens de 45 minutos no mesmo tampão, as amostras foram submetidas a uma série de desidratação em acetona. Para a MEV, o material foi fixado, desidratado e seco pelo método do ponto crítico (Bal – tec - CPDO30).

Em seguida, os fragmentos foram montados em suportes adequados (stub) e metalizados com ouro (Bal - tec - SCDO50). A observação e as imagens foram feitas no MEV (EVO 040 e DSEM962 – ZEISS), à uma aceleração de voltagem variando até 25kV. Etapa realizada no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Com vistas ao processamento para o MET, foram retirados pequenos fragmentos das epífises proximais de fêmures dos animais ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX, medindo de 1 a 2 mm. Essas amostras de osso, já fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, foram submetidas à descalcificação com ácido etilenodiaminotretacético (EDTA) durante sessenta dias. Após a descalcificação as amostras foram lavadas por 45 minutos em solução tampão de cacodilato de sódio 0,05 M. Após a lavagem foi feita a pós-fixação com tetróxido de ósmio (OSO<sub>4</sub>) a 2% por um período de duas horas à temperatura de 4°C. Após este período iniciou-se a desidratação, passando por uma série crescente de etanol: 50°, 70°, 95°, em banhos de 20 a 30 minutos, e, etanol absoluto (100°) com 2 banhos de 30 minutos cada. Após esses banhos iniciou-se a infiltração de resina com uma mistura de etanol na proporção 1:2 (spurr: etanol) por um período de 3 horas. Trocamos a proporção para 1:1 e deixamos por 12 horas. Passamos então à proporção 3:1 por mais um período de 3 horas e de resina pura por 12

horas, sempre no misturador rotatório. Após este período, trocamos a resina, repetindo a resina pura, deixando na estufa a 37°C por 1 hora. Ao término desse processo foi feita a inclusão das amostras, ficando na estufa por 24 horas a 60° - 70°C. Passado esse período, preparou-se os blocos para a trimagem, realizamos cortes semifinos para observação em microscópio óptico; e em seguida, os cortes ultrafinos foram analisados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão. As observações e imagens foram feitas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET – JEOL JEM – 1400 Electron Microscope) do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, do departamento de morfologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

#### **4.8 Análise estatística**

O programa *GraphPad Prism*®, versão 5.0 para Windows 2007, foi empregado para a realização dos testes estatísticos e apresentação gráfica. Para avaliação dos resultados entre os diferentes grupos foi utilizado o teste de Análise de Variância Simples (ANOVA *one way*) seguido do pós-teste de *Tukey* para comparação múltipla, enquanto para comparação de apenas dois grupos foi realizado o teste t Student. O nível de significância adotado para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% do desvio padrão. Os resultados foram expressos como média e erro-padrão ( $x \pm EP$ ). Para análise semiquantitativa utilizamos o programa Cell “Profiller”, versão 2.1.0.

## 5 RESULTADOS

Como descrito anteriormente, com o objetivo de esclarecer melhor as interações entre a ApoE, os hormônios sexuais femininos (em particular o estrógeno) e a vitamina K, utilizamos modelos animais de osteoporose pós menopausa para estudar os efeitos destas moléculas sobre vários parâmetros do metabolismo osteomineral bem como sobre a ultraestrutura óssea. Não obstante vários experimentos realizados aqui serem os mesmos executados no Estudo 1 (**Estudo da interação dos hormônios sexuais e da vitamina K no metabolismo osteomineral**) e Estudo 2 (**Estudo da interação dos hormônios sexuais com a ApoE no metabolismo osteomineral**) optou-se por descrever os resultados obtidos de forma separada para favorecer a compreensão do leitor.

### 5.1 Estudo 1 - Avaliação do crescimento e do peso corporal dos animais ao longo do experimento

No decorrer do período experimental, antes de cada densitometria e do sacrifício, os animais foram pesados e tiveram as caudas medidas para avaliação do ganho de peso e do crescimento. Esta análise foi realizada para que tivéssemos os dados que nos permitissem separar a somatopausa (queda na produção do hormônio do crescimento – *Growth Hormone* ou GH, agente fundamental para o crescimento e mineralização óssea) da menopausa (queda na produção dos hormônios sexuais femininos) (para revisão ver LOCATELLI & BIANCHI, 2014). Estas medidas foram realizadas através da avaliação do peso corporal ao de todo o curso temporal do experimento. Em adição para se avaliar se houve alteração no crescimento endocondral (alongamento dos ossos, sabido efeito do GH) o comprimento da cauda dos animais foi sequencialmente aferido. Em paralelo foram realizadas três densitometrias ósseas (DXA) sequenciais antes da cirurgia de ovariectomia, e quatro outras DXA depois da ovariectomia (OVX). Nos gráficos mostrados neste trabalho, contudo, optou-se por apresentar o dia ZERO (0) de análise apenas por que esta medida não desviou significativamente das anteriores. Estes dados podem ser obtidos de (O.R SOARES, 2010 - Dissertação de Mestrado). Resumidamente, não foi observado em nenhum grupo experimental significativo aumento do

comprimento da cauda, mostrando que todos os animais estavam em sua fase estacionária de crescimento. No que tange o peso corporal, foi verificado que há um aumento progressivo do peso nos animais, sendo que nos animais SHAM ovariectomizados este aumento é significativo quando comparados aos outros grupos ( $p < 0.05$ ). Surpreendentemente o tratamento com VK levou a um peso corporal normal nos animais OVX (O.R. SOARES, 2010).

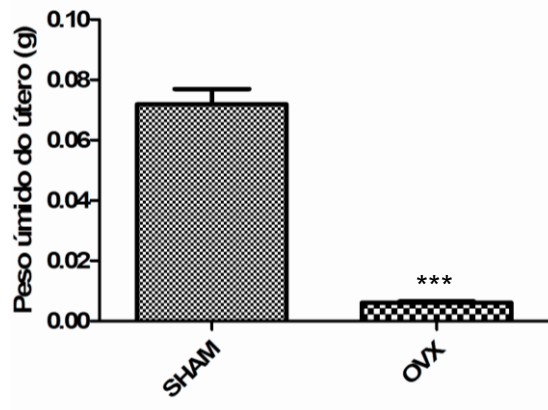
## 5.2 Validação da ovariectomia (OVX)

A remoção cirúrgica dos ovários em murinos tem sido extensamente utilizada para mimetizar a menopausa que acontece em seres humanos e produzir um modelo animal mais próximo da diminuição dos hormônios sexuais circulantes decorrentes da insuficiência ovariana (KALU, 1991; COMPSTON, 2001). Contudo, por se tratar de um procedimento complexo, OVX sempre precisa ser validada. Dois meses após a cirurgia de ovariectomia (OVX) os animais foram sacrificados. A análise dos hormônios estrogênio e progesterona presentes no soro mostrou uma redução significativa destas moléculas nos animais OVX quando comparados aos SHAM operados (Tabela 2). Em adição, houve também um aumento na massa de gordura dos animais OVX, corroborando o aumento de peso observado (Tabela 2). No dia anterior ao sacrifício, todos os animais foram submetidos a análise de densitometria óssea, onde foi constatado uma considerável diminuição da DMO nos grupos OVX.

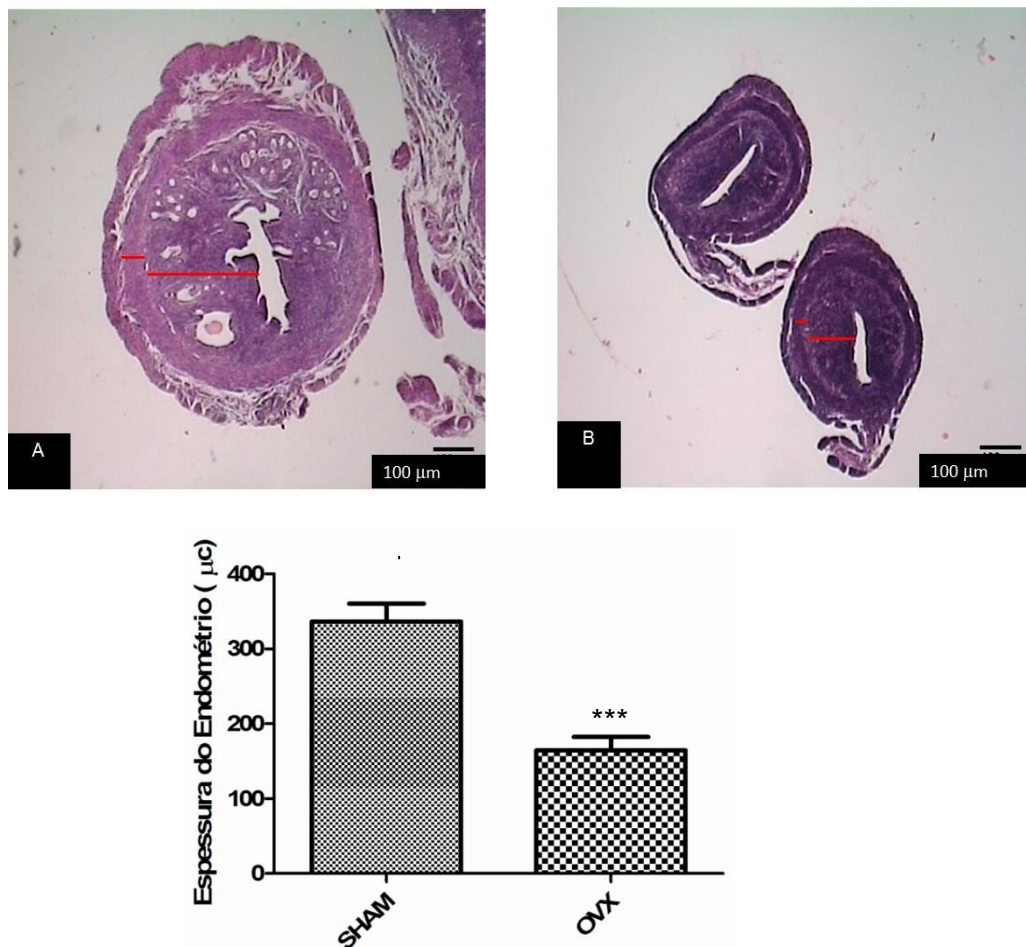
Dentre os tecidos retirados das carcaças dos animais, foi dada atenção aos tecidos onde efeitos biológicos da carência de estrogênio e/ou progesterona podem ser observados (KALU et al, 1989). Os úteros dos animais SHAM e OVX foram limpos e pesados para determinação do peso úmido. Foi observado que a OVX promoveu uma redução significativa do peso úmido do útero dos animais OVX ( $0,006 \pm 0,0004$  g) em relação aos camundongos SHAM ( $0,071 \pm 0,005$  g) sugerindo que a queda de estrogênio promoveu efeito biológico pertinente. A média do peso uterino entre esses dois grupos foi diferente ( $p < 0,0001$ ) (Figura 9).

**Tabela 2** – Resultados de alguns parâmetros associados aos grupos experimentais estudados.

	SHAM Não tratado	SHAM Tratado com vitamina k	OVX Não tratado	OVX Tratado com vitamina K
Peso corporal (g)	31 ± 2	32 ± 4	39 ± 2**	34 ± 3
Massa de gordura (%)	19.4	21.1	39.8**	36.4**
Vitamina K sérica (pg/mL)	98 ± 20	179 ± 28*	86 ± 15	191 ± 34*
Estrogênio sérico (pg/mL)	90 ± 2	106 ± 8	23 ± 9**	27 ± 4**
Progesterona sérica (pg/mL)	17 ± 2	20 ± 1*	2 ± 1*	3 ± 2*

**Figura 9** - Avaliação do peso úmido dos úteros de animais SHAM e OVX. Peso úmido do útero dos camundongos (n=10, por grupo). \*\*\*p<0,0001 vs SHAM.

Em complemento a análise do peso úmido dos úteros apenas, realizou-se a análise morfométrica dos órgãos no intuito de visualizar a involução do endométrio que é característica da insuficiência ovariana (ALBRIGHT, 1947). A análise histomorfométrica dos úteros mostrou que houve uma involução do útero OVX em relação ao SHAM caracterizada pela redução do endométrio (SHAM,  $336,04 \pm 24,04$ ; OVX,  $164,60 \pm 17,78$ ). A média da espessura do endométrio entre esses dois grupos foi diferente ( $p < 0,0001$ ) (Figura 10 A-C).



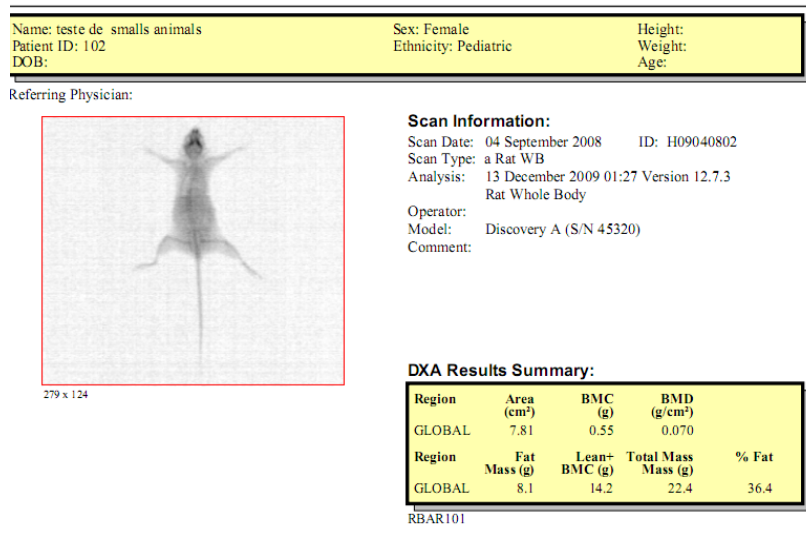
**Figura 10** - Avaliação da atrofia do útero por meio da medida do endométrio dos camundongos C57 fêmeas SHAM e OVX (n=10, por grupo). A e B) Fotomicrografias mostrando cortes transversais do útero dos animais SHAM e OVX, respectivamente. C) Observa-se uma diferença significativa da espessura do endométrio entre os grupos relacionados. \*\*\* $p < 0,0001$  vs OVX. Coloração com H/E e aumento de 40X.



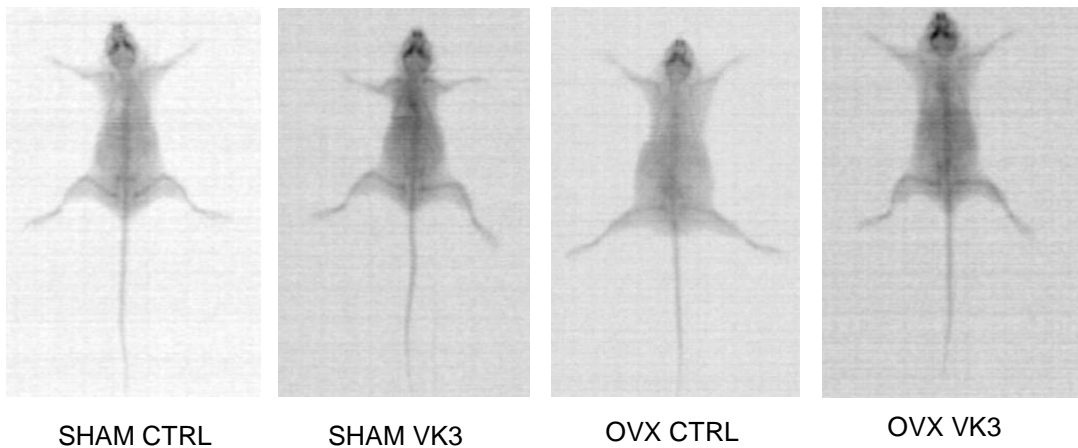
Esses resultados demonstram o sucesso do processo de esterilização dos animais e confirmam que os camundongos dos grupos OVX realmente representavam um modelo animal de deficiência dos hormônios ovarianos em mulheres pós-menopausa (KALU, 1991; WRONSKI et al., 1985).

### 5.3 Resultados de Densitometria Óssea

Foram realizadas quatro densitometrias óssea durante o experimento com a finalidade de acompanhar a densidade mineral óssea (DMO) dos animais (Figuras 11 e 12).



**Figura 11** - Resultado de exame de DXA realizado no CEDOES.  
 Fonte: CEDOES – arquivo interno (2008).

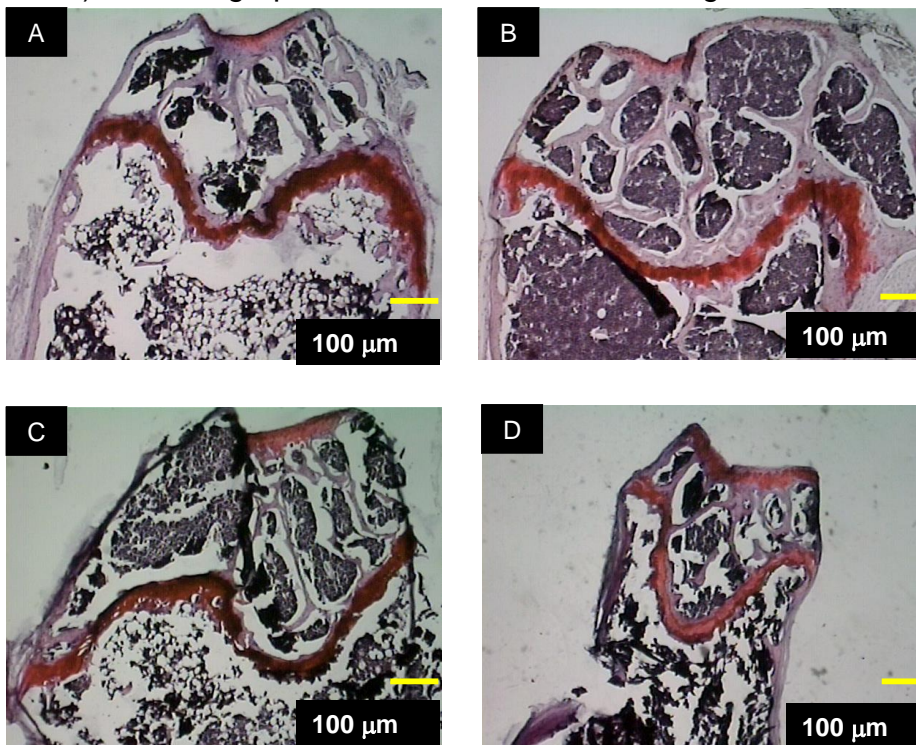


**Figura 12** - Paineis representativos dos resultados de densitometria óssea de cada grupo experimental. Percebemos que a vitamina K recuperou a DMO do grupo OVX/VK3 em relação ao grupo OVX/CTRL.

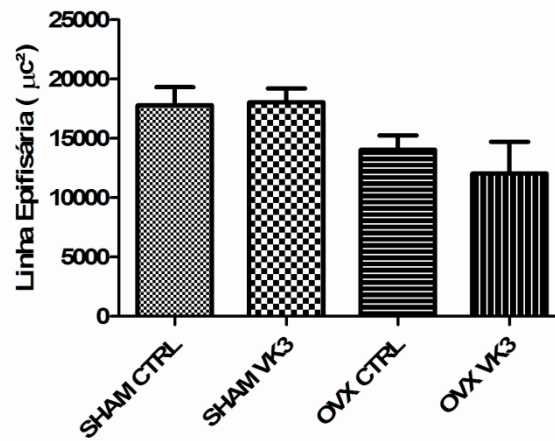
A análise dos dados da primeira densitometria realizada após a ovariectomia mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (não mostrado). Contudo, a última densitometria realizada mostrou que a DMO do grupo OVX CTRL foi menor que a do grupo SHAM CTRL (SHAM CTRL  $0,0738 \pm 0,001$  vs. OVX CTRL  $0,0684 \pm 0,001$   $n=5$ ,  $p<0,05$ ), enquanto que no grupo OVX VK3, a DMO foi maior em relação ao grupo OVX CTRL. Ao compararmos o grupo SHAM/CTRL ao grupo OVX/VK3 esse dado não foi estatisticamente significativo ( $p=0,87$ ).

#### 5.4 Morfometria óssea

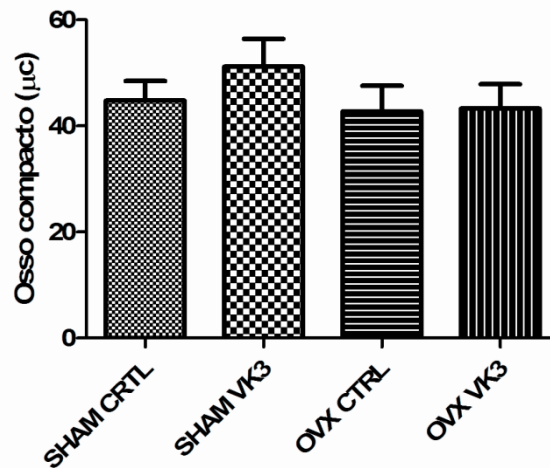
Para a avaliação da estrutura óssea foi realizada a histologia (Figura 13 A-D) e, posteriormente a morfometria dos fêmures dos animais dos diferentes grupos. A análise morfométrica dos fêmures mostrou que a comparação das medidas da área da linha epifisária ( $p=0,08$ ) (Figura 14) e da espessura do osso compacto ( $p=0,56$ ) (Figura 15) entre os grupos não foi estatisticamente significativa.



**Figura 13** - Fotomicrografias mostrando cortes longitudinais de fêmures dos quatro grupos experimentais. A) SHAM CTRL. B) SHAM VK3. C) OVX CTRL. D) OVX VK3. Coloração com hematoxilina/safranina e aumento final de 40X.



**Figura 14** - Área da linha epifisária (n=5, por grupo). Não há diferenças significativas entre os grupos.



**Figura 15** - Espessura do osso compacto (n=5, por grupo). Não há diferenças significativas entre os grupos.

### 5.5 Resultados sorológicos, urinários e imunoenzimático de marcadores do metabolismo ósseo

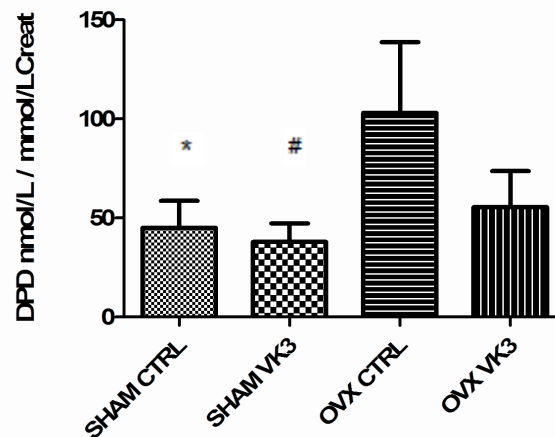
Como mostrado na Tabela 3, a ovariectomia e a administração de vitamina K3 não provocaram alterações significativas na excreção urinária de cálcio e fósforo entre os grupos estudados.

**Tabela 3** - Efeitos da ovariectomia (OVX) e da vitamina K3 na excreção urinária de cálcio e fósforo.

Urina de 24 h		
	Cálcio/Creatinina (mg/dL)	Fósforo/Creatinina (mg/dL)
<b>SHAM</b>		
controle	0,077 ± 0,031	0,382 ± 0,045
Vitamina K3	0,061 ± 0,004	0,398 ± 0,108
<b>OVX</b>		
controle	0,065 ± 0,022	0,465 ± 0,111
Vitamina K3	0,068 ± 0,009	0,490 ± 0,109

Cada valor representa à média ± EP de 3 animais por grupo.

Contudo a fração de excreção da deoxipiridinolina (DPD/Creatinina), um marcador de reabsorção óssea, foi maior no grupo OVX CTRL que nos grupos SHAM CTRL e SHAM VK3. A média da excreção de DPD entre os grupos foi estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ) (Figura 16).



**Figura 16** - Avaliação da excreção urinária de deoxipiridinolina (DPD) (n=3 animais por grupo). \* $p < 0,05$  vs. OVX CTRL; # $p < 0,05$  vs. OVX CTRL.

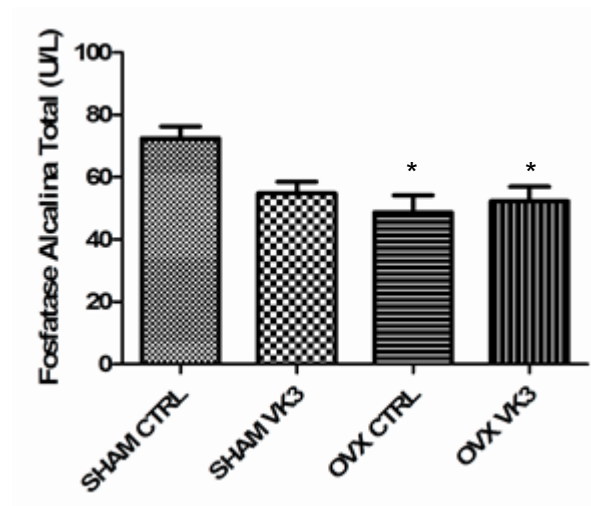
Em relação à concentração sérica de fósforo nenhum resultado significativo foi encontrado, no entanto a concentração de cálcio foi maior nos grupos OVX que nos grupos SHAM (Tabela 4).

**Tabela 4** - Efeitos da ovariectomia (OVX) e da vitamina K3 na presença de cálcio total e do fósforo no soro.

		Soro	
		Cálcio (mg/dL)	Fósforo (mg/dL)
<b>SHAM</b>	controle	8,952 ± 0,409 <sup>a/b</sup>	8,943 ± 0,727
	Vitamina K3	9,400 ± 0,735 <sup>c/d</sup>	6,493 ± 0,610
<b>OVX</b>	controle	13,250 ± 0,036 <sup>a/c</sup>	8,533 ± 0,901
	vitamina K3	13,771 ± 0,125 <sup>b/d</sup>	5,725 ± 1,553

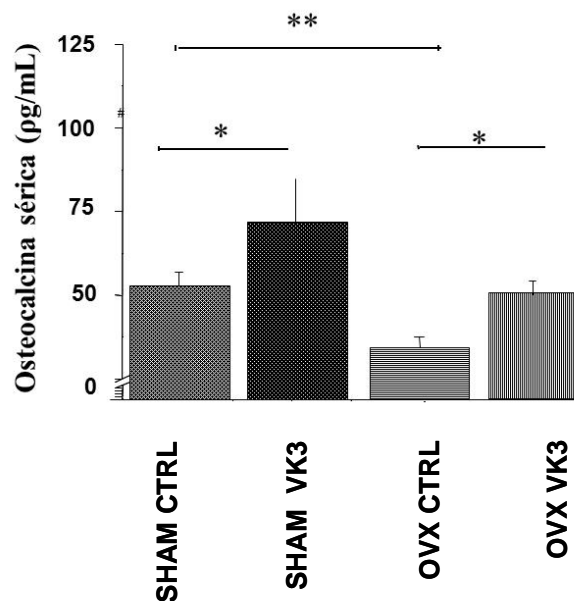
Cada valor representa a média ± EP de 5 animais por grupo. <sup>a/b</sup>Significante quando comparados SHAM controle vs OVX controle/OVX vitamina K3 ( $p < 0,0001$ ); <sup>c/d</sup> Significante quando comparados SHAM vitamina K3 vs OVX controle/OVX vitamina K3 ( $p < 0,0001$ ).

A concentração da fosfatase alcalina total (FAT) no soro foi significativamente maior nos animais do grupo SHAM CTRL (14,499 ± 0,758 UI) que nos grupos OVX CTRL (9,749 ± 1,412 UI) e OVX VK3 (10,465 ± 0,927 UI) (Figura 17). A medida da concentração de FAT no soro entre os grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

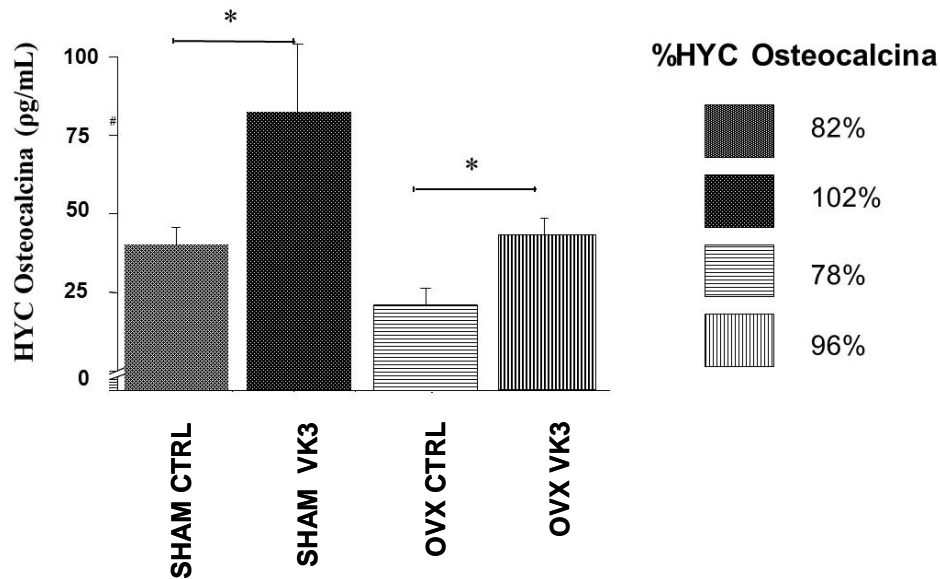


**Figura 17** - Avaliação da fosfatase alcalina total (FAT) do soro (onde \* é estatisticamente significativa,  $p < 0,008$  e  $n=5$  animais por grupo). Observa-se que a OVX reduziu significativamente a FAT sérica e a vitamina K não restaurou a concentração sérica da enzima ao nível dos controles.

Outro marcador de absorção óssea analisado foi a osteocalcina sérica (WANG & WANG, 2013). Foi observado que a concentração da osteocalcina sérica é significativamente maior nos animais SHAM tratados com VK que nos camundongos que só receberam o veículo ( $69 \pm 9$  pg/mL vs.  $52 \pm 4$  pg/mL,  $p < 0,05$ ). É sabido que a VK aumenta, por mecanismos ainda desconhecidos a osteocalcina circulante (SHEARER, 2000). Já OVX levou a uma queda significativa da osteocalcina circulante nos animais não tratados (FIGURA 18) que foi revertida com o tratamento com vitamina K nos animais OVX ( $46 \pm 3$  pg/mL para OVX tratado com VK vs.  $25 \pm 3$  pg/mL para OVX não tratado,  $p < 0,05$ ). Contudo, é sabido que a osteocalcina funcional é aquela que apresenta alto grau de g – carboxilação, fenômeno este dependente de vitamina K (PRICE, 1993). Na Figura 19 observa-se a medida da concentração sérica de osteocalcina hipercarboxilada (HYP osteocalcina) nos diferentes grupos experimentais.



**Figura 18** - Avaliação da osteocalcina total no soro dos diferentes grupos experimentais. Observa-se que a OVX reduziu significativamente a osteocalcina sérica neste grupo quando comparado ao controle. Entretanto, o tratamento com vitamina K restaurou a concentração sérica de osteocalcina aos níveis do controle não ovariectomizado. Surpreendentemente, o tratamento apenas com vitamina K nos animais SHAM operados levou a um aumento significativo de osteocalcina circulante nestes animais (\*estatisticamente significante,  $p < 0,008$  e  $n=5$  animais por grupo).



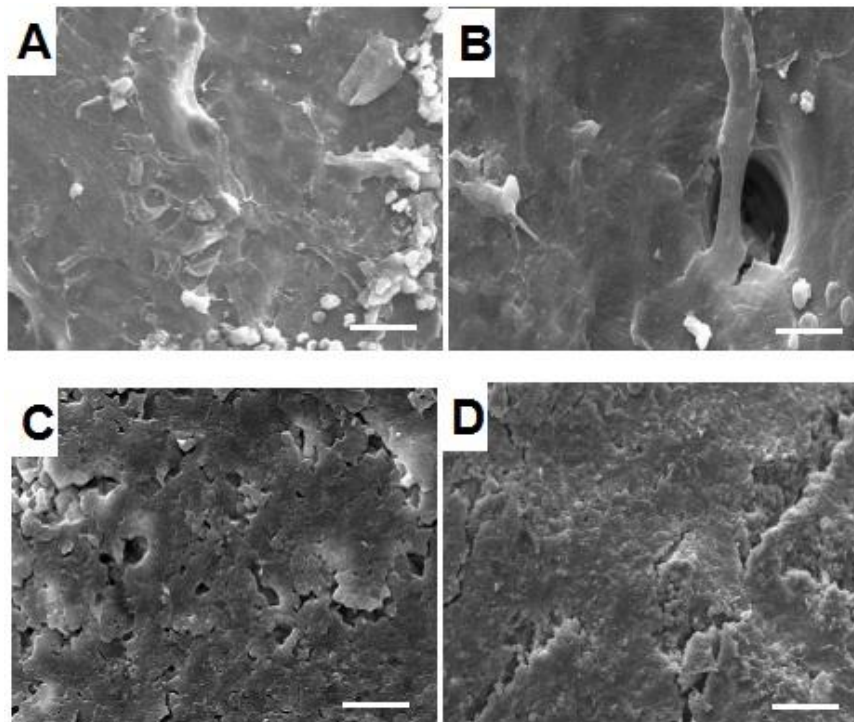
**Figura 19** - Avaliação da osteocalcina hipercarboxilada (HYC) total no soro dos diferentes grupos experimentais e análise comparativa da osteocalcina como osteocalcina total (expressa em percentagem – medida da HYC – OC dividida pela OC total). Observa-se que a osteocalcina HYC segue o mesmo padrão da osteocalcina total mostrada na FIGURA 18. Contudo, os tratamentos com vitamina K elevam o percentual da HYC nos grupos experimentais tratados (\*estatisticamente significante  $p < 0,008$  e  $n=5$  animais por grupo).

Como esperado, os grupos tratados com vitamina K apresentam um percentual de osteocalcina HYC significativamente elevado quando comparados com seus controles não tratados (FIGURA 19). Estes dados indicam que o tratamento com VK promoveu aumento tanto da produção da proteína quanto aumento da sua forma funcional, com alto grau de  $\gamma$ -carboxilação.

## 5.6 Análise ultraestrutural

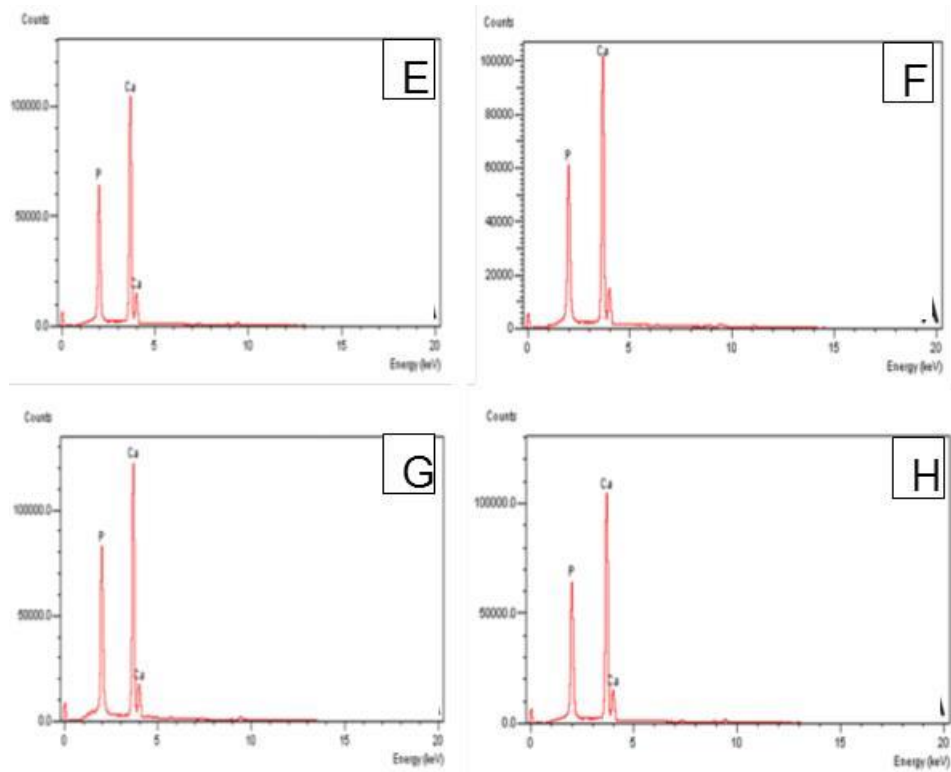
A presença de proteínas nucleadoras na mineralização óssea como a osteocalcina é essencial para manter a microestrutura dos ossos, tornando possível o mecanismos de remodelamento e cicatrização de microfraturas de estresse (OZURU et al, 2002; PEARSON, 2007). Para esclarecermos se o tratamento com vitamina K apresenta também efeito na elucidação de microfraturas no tecido ósseo utilizamos a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A MEV é essencial para a observação efetiva de componentes da organização matricial óssea devido a sua alta capacidade de resolução de superfícies (LEE & HONG, 2003). Na MEV observamos que as imagens referentes aos animais OVX não tratados e tratados com vitamina

K, apresentam microfraturas, sendo que estas lesões parecem reduzir nos animais tratados (Figura 20). Os gráficos E, F, G e H são referentes às microanálises feitas de presenças de cálcio e fósforo no tecido visualizado por MEV por difração de raios X. (E) SHAM não tratado, (F) SHAM tratado, (G) OVX não tratado e (H) OVX tratado. O que observamos é que não há diferença entre as presenças de cálcio e fósforo no tecido, corroborando os dados das análises sistêmicas de cálcio e fósforo (Figura 21).



**Figura 20** - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (escala 10 $\mu$ m). A e B referentes aos animais SHAM CTRL e SHAM VK3. C e D, animais OVX CTRL e OVX VK3.



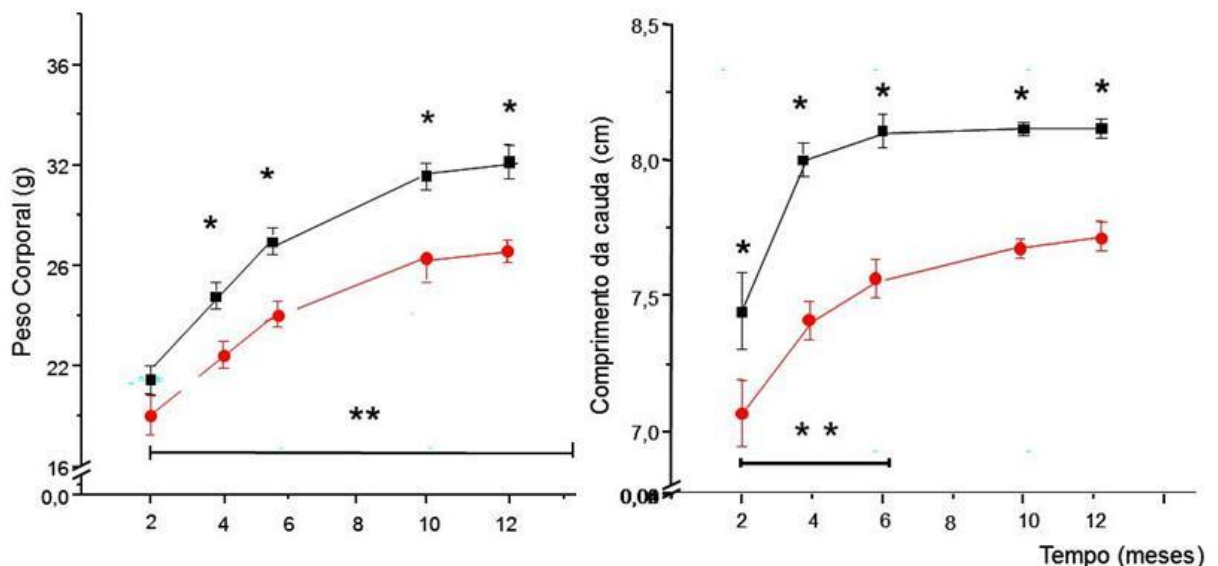


**Figura 21** – Microanálises de raios X, tomadas para detecção de cálcio e fósforo no sítio da análise de MEV. (E) SHAM não tratado, (F) SHAM tratado vitamina K, (G) OVX não tratado e (H) OVX tratado com vitamina K. Ambos os íons foram detectados na área analisada por MEV. A técnica, contudo, não permite quantificação, impossibilitando a conclusão de alteração do conteúdo mineral mas permitindo a exclusão de alteração dramática no conteúdo mineral da região óssea afetada.

## 5.7 Estudo 2 - Avaliação do crescimento e do peso corporal dos animais ao longo do experimento

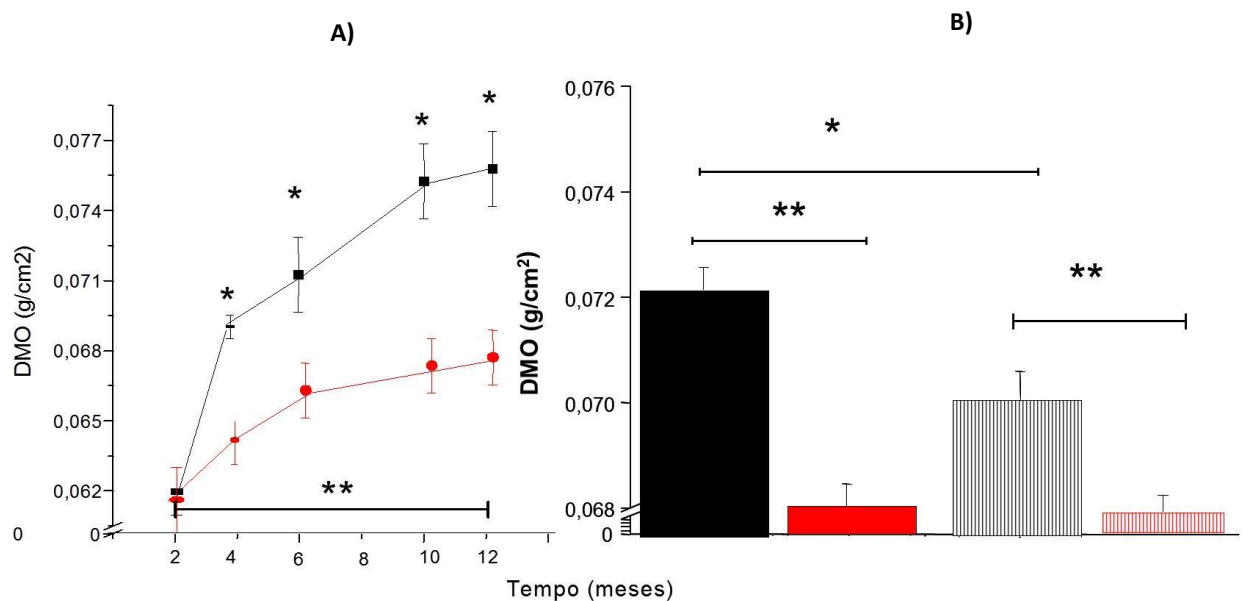
Na tentativa de esclarecer melhor a interação entre ApoE e estrogênio na osteoporose, foi estudado o metabolismo osteomineral de camundongos fêmea ApoE *Knock-out* (ApoEKO) no Estudo 2 do nosso trabalho. Por se tratar de um camundongo geneticamente modificado, alguns estudos preliminares foram necessários para validação do modelo experimental. Dentre estas análises utilizamos a avaliação do curso temporal do crescimento tanto quanto ao ganho de peso quanto ao crescimento da cauda (explicado anteriormente no Estudo 1). Para compreender melhor o papel da APOE no metabolismo ósseo, foram realizadas uma série de medidas, desde o desmame das camundongas APOEKO e seus controles

WT. O crescimento ósseo é um dos principais parâmetros para avaliação da homeostase óssea em indivíduos jovens (OTSUKI et al., 2004). O crescimento ósseo pode ser dividido em dois componentes: crescimento endocondral (em comprimento) e diametral (em espessura). A curva de crescimento dos animais APOEKO (quanto analisado o peso corporal – g) mostrou-se linear e com a mesma taxa de crescimento apresentada pelos animais WT ( $r = 0,95$ ,  $n = 6$ ) até 8 meses de idade, estabilizando após este período até o primeiro ano de vida. Contudo os animais APOEKO são significativamente mais leves que os respectivos controles em todos os pontos da curva ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ). Quando analisado o crescimento endocondral dos animais - tomado o comprimento da cauda (em cm) pode-se traçar o mesmo perfil observado pela análise do peso corporal, observando-se também por este método que os animais APOEKO - de idades semelhantes - são menores (cerca de 15% em média). Contudo, a análise do coeficiente angular das curvas ( $r^2$ ) mostrou que as camundongas APOEKO apresentam uma taxa de crescimento maior que os animais WT entre os meses de 3 – 7 de vida ( $r^2 = 0,91$  para APOEKO vs.  $r^2 = 0,50$  para WT), indicando que estes animais podem estar crescendo num velocidade maior e por mais tempo que as camundongas WT. Estes dados estão representados nas FIGURAS 22A e 22B.



**Figura 22** – Curso temporal do crescimento dos animais WT (preto) e APOEKO (vermelho) ao longo de 12 meses, expressos em peso corporal (g) e comprimento da cauda (cm). Entretanto, os camundongos APOEKO sejam significativamente menores que seus controles singênicos, a curva de crescimento não apresentou coeficiente angular significativamente diferente entre os grupos ( $r^2 = 0,95$ ).

O crescimento diametral pode ser medido através do DXA, método de grande sensibilidade que permite acuradas medições mesmo em pequenos animais. Neste projeto, foi analisada a densidade mineral óssea (DMO, medida em  $\text{g}/\text{cm}^2$ ) das camundongas APOEKO e WT. O curso temporal da DMO mostrou que nos meses 1 e 2 tanto as camundongas APOEKO e WT apresentam menor DMO. Já aos 4 meses de vida, se mantém esta diferença significativa na DMO até os 12 meses de idade (FIGURA 23A). Tomados conjuntamente os dados das FIGURAS 22 e 23, pode-se concluir que ao sexto mês de vida ocorre uma estabilização do crescimento endocondral e diametral dos ossos. Esta conclusão propiciou a escolha da idade de seis meses para realização da ovariectomia (OVX) visto que esta idade é o tempo mais curto onde se pode separar a somatopausa da “menopausa” obtida pela cirurgia.



**Figura 23** - Análise por absorciometria por dupla emissão de raio X (DXA, medida em  $\text{g}/\text{cm}^2$ ). **A)** Curso temporal da Densidade Mineral Óssea (DMO) do WT SHAM (preto) e APOEKO (vermelho). APOEKO mostrou diminuição da DMO comparado ao WT desde o quarto mês de vida. **B)** Densidade Mineral Óssea (DMO) do WT/SHAM (preto), APOEKO/SHAM (preto listrado), WT/OVX (vermelho), e APOEKO/OVX (vermelho listrado). O camundongo APOEKO mostrou baixa DMO comparado aos animais WT ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ). Também a OVX levou a uma diminuição na DMO em ambos os camundongos APOEKO e WT. Entretanto, não foram observadas mudanças quando comparados os camundongos APOEKO OVX e WT OVX.

Na Figura 23B, podemos observar o efeito da OVX em ambos os animais WT e APOEKO. É observado que nos animais OVX C57Bl6/WT há uma diminuição significativa da DMO ( $0,068 \pm 0,01 \text{ g}/\text{cm}^2$  vs.  $0,072 \pm 0,01 \text{ g}/\text{cm}^2$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). Em

adição, a OVX também promoveu uma diminuição significativa da DMO nos animais APOEKO quando comparados aos APOEKO SHAM operados (FIGURA 23B). Não houve, contudo, diminuição significativa na DMO entre os animais WT/OVX e os animais APOEKO/OVX, sugerindo que os hormônios sexuais e a ApoE possam atuar pelo mesmo mecanismo na redução da DMO.

De posse destes resultados, objetivamos determinar vários parâmetros do metabolismo ósteomineral nestas condições experimentais. Os parâmetros utilizados e os resultados obtidos são expressos na TABELA 5.

Através dos dados obtidos no estudo 1 nos camundongos C57 controle (WT), utilizamos os animais WT/SHAM e WT/OVX para compará-los com os dados obtidos no estudo 2 nos camundongos ApoE. As validações metabólicas experimentais de ambos os grupos são apresentadas nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** - Perfil metabólico de todos os grupos experimentais no momento do sacrifício (camundongos de 8 meses de envelhecimento). \*Estatisticamente significativo quando comparado ao C57/WT SHAM ( $p < 0.01$ ); \*\* Estatisticamente significativo quando comparado ao C57/WT SHAM ( $p < 0.01$ ); \*\*\* Estatisticamente significativo quando comparado ao C57/WT OVX ( $p < 0.05$ ); # Estatisticamente significativo quando comparado ao APOEKO SHAM ( $p < 0.05$ ).

<b>Perfil metabólico (n=8)</b>	<b>WT SHAM</b>	<b>WT OVX</b>	<b>APOEKO SHAM</b>	<b>APOEKO OVX</b>
<b>Peso do corpo (g)</b>	29 ± 2	37 ± 4*	24 ± 3	34 ± 3**
<b>Cálcio total sérico (mg/dL)</b>	8 ± 2	16 ± 3*	15 ± 1**	20 ± 3#
<b>Fósforo total sérico (mg/dL)</b>	14 ± 2	18 ± 2*	16 ± 2	19 ± 1***
<b>Excreção urinária de cálcio (mg/24h)</b>	210 ± 50	478 ± 35*	489 ± 59**	521 ± 102
<b>Excreção urinária de fósforo (mg/24h)</b>	234 ± 14	391 ± 56*	434 ± 76*	987 ± 96***
<b>DPD/creatinina urinária</b>	47 ± 8	98 ± 12*	112 ± 32*	131 ± 19**#
<b>Estrogênio sérico (pg/mL)</b>	90 ± 2	6 ± 1*	84 ± 6	7 ± 2#
<b>Progesterona sérica (pg/mL)</b>	17 ± 2	2 ± 1*	22 ± 4	14 ± 2
<b>Diâmetro do Endométrio (µm)</b>	330 ± 29	130 ± 22*	360 ± 23*	120 ± 8**

**Tabela 6** - Perfil metabólico de todos os grupos experimentais no momento do sacrifício (camundongos de 8 meses de envelhecimento). \*Estatisticamente significativo quando comparado ao C57/WT SHAM ( $p < 0.01$ ); \*\* Estatisticamente significativo quando comparado ao C57/WT SHAM ( $p < 0.01$ ); \*\*\* Estatisticamente significativo quando comparado ao C57/WT OVX ( $p < 0.05$ ); # Estatisticamente significativo quando comparado ao APOEKO SHAM ( $p < 0.05$ ).

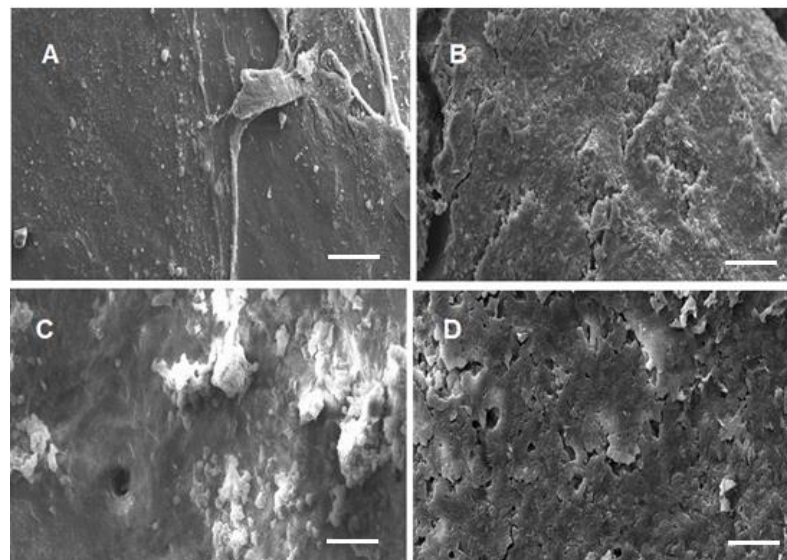
N =4	WT SHAM	WT OVX	APOEKO SHAM	APOEKO OVX
Fosfatase Alcalina sérica (FA, UI)	187 ± 69	131 ± 40	290 ± 10*	256 ± 16**
Osteocalcina (pg/mL)	123 ± 34	287 ± 23*	187 ± 40*	100 ± 10*
Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP, UI)	27 ± 19	107 ± 30***	7 ± 3	128 ± 40***

Tomados conjuntamente, os dados dos marcadores do metabolismo osteomineral descrevem que OVX promove uma queda significativa dos hormônios sexuais circulantes em ambos as cepas de camundongos (ver dados da quantificação de estrogênio e progesterona na Tabela 5). De modo semelhante, ocorre uma simultânea diminuição do endométrio e queda na DMO (ver Tabela 5 e Figura 23B) corroborando um efeito sistêmico da carência destes hormônios. Em adição há um aumento significativo da excreção urinária de fósforo em ambos os grupos (ver Tabela 5). Outros parâmetros, contudo apresentam efeitos muito diferentes quando compara-se os animais WT e APOEKO. O cálcio urinário (medido em carga excretada, mg/24h) é significativamente elevado nos animais APOEKO SHAM quando comparados com seus controles. Em sendo assim, mesmo a OVX promovendo um aumento da carga de cálcio excretada na urina, não há diferença significativa entre os animais APOEKO SHAM e OVX visto que a condição basal de perda de cálcio urinário já é elevada nestes animais (Tabela 5). Esta elevação da carga urinária de cálcio explica, em parte, a baixa DMO apresentada nos animais APOEKO.

Ao analisar algumas moléculas preditoras da formação e da reabsorção óssea, pode-se observar que a OVX aumentou significativamente as concentrações de Fosfatase ácida Tartarato Resistente (TRAP) no soro e a fração de excreção urinária de deoxipiridinolinas (DPD), marcadores de reabsorção óssea (Tabelas 5 e 6). É sabido que o DPD é gerado pela quebra de colágeno realizada pelos osteoclastos durante sua ativação (DELMAS et al, 1991; DELMAS, 2004; McCORMICK, 2007; HU

et al, 2003). Portanto, pode-se concluir que OVX leva a uma maior reabsorção óssea nestes animais. Surpreendentemente, mas ainda corroborando os dados de DMO e excreção de cálcio e fósforo na urina, a fração de excreção de DPD também é significativamente elevada nos animais APOEKO independente da OVX ( $112 \pm 32$  para os APOEKO SHAM vs.  $47 \pm 8$  para os WT SHAM,  $p < 0.05$ ). Não há efeito aditivo neste parâmetro, contudo, quando comparados os animais APOEKO OVX com seus controles SHAM (ver Tabela 4). Os biomarcadores de formação óssea Fosfatase Alcalina (FA) e osteocalcina apresentam aumento significativo de suas concentrações nos soro dos animais APOEKO quando comparados as seus controles não operados. A OVX, contudo, promove efeitos opostos nestes parâmetros.

No intuito de visualizar se as alterações metabólicas observadas nos parâmetros descritos anteriormente refletem na ultraestrutura do tecido ósseo, foram analisados os fêmures ( $n = 3$  cada grupo) pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foi observado que os camundongos ApoEKO apresentam muitas microfraturas nos seus ossos quando comparado ao camundongo WT (Figuras 24B – 24A). Os animais WT/OVX parecem recrutar mais células de reabsorção óssea em relação aos animais ApoEKO/OVX (Figuras 24D – 24C). Em adição, a OVX em animais APOEKO parece agravar as microfraturas observadas no fêmur destes animais.



**Figura 24** - Imagens representativas da Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fêmures de camundongos WT/SHAM (A), APOEKO/SHAM (B), WT/OVX (C), e APOEKO/OVX (D). Todos os camundongos APOEKO mostraram diversas micro-fraturas nos seus ossos quando comparados aos camundongos WT ( $n = 3$ , escala  $10 \mu\text{m}$ ).

Tomados juntos estes dados indicam que a deficiência da ApoE leva a uma profunda mudança na ultraestrutura óssea, com a presença de microfraturas em adição a baixa DMO observada. Estes efeitos são aumentados pela deficiência de estrogênio nos camundongos ApoEKO/OVX. Estes dados sugerem também que a deficiência de ApoE leva a uma profunda mudança na estrutura e densidade ósseas. Também nossos dados sugerem que a ApoE e o estrogênio têm modo de ação diferentes no metabolismo ósseo em camundongos.

Após considerar as validações ultraestruturais da superfície óssea observadas à Microscopia Eletrônica de Varredura nos animais ApoEKO, passamos a analisar os fragmentos das epífises proximais de fêmures dos animais ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX na Microscopia Eletrônica de Transmissão. Depois de processadas nossas amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL - JEM - 1400) do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR). Foram feitas 76 imagens sendo 36 em animais ApoEKO/SHAM e 40 em animais ApoEKO/OVX. As análises ultraestruturais do tecido ósseo dos animais ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX mostraram imagens onde podemos identificar a presença de células ósseas, matriz extracelular, bem como organelas relacionadas às atividades destas células. Nas Figuras das imagens selecionadas dos animais ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX, podemos identificar quantidades de fibras colágenas tipo I, características do tecido ósseo, retículo endoplasmático rugoso, responsável pela síntese e secreção de colágeno, ribossomos, mitocôndrias, lisossomas, vacúolos, dentre outras organelas. De posse destas imagens, procedemos análises qualitativas das mesmas, como segue:

Na figura 25A temos a imagem sugestiva de uma célula osteoprogenitora em atividade de síntese, com núcleo eucromático de contorno regular, quantidades de retículo endoplasmático rugoso no citoplasma e fibras colágenas do tipo I no meio extracelular em um animal ApoEKO/SHAM. Na figura 25B, visualizamos uma imagem sugestiva de uma célula osteoprogenitora apresentando vacuolização citoplasmática com perda de continuidade do envoltório nuclear em um animal ApoEKO/OVX. Na figura 26A e B, mostramos cortes transversais de fibras colágenas tipo I, apresentando ligações cruzadas pirimidínicas entre elas. Em A observamos a imagem referente a um animal ApoEKO/SHAM, mostrando grande quantidade de

fibras colágenas tipo I, com menor espaço entre elas e maior uniformidade entre seus diâmetros, se compararmos ao animal ApoEKO/OVX, em B, onde observamos menor quantidade de fibras colágenas tipo I, maior espaço entre elas e diâmetros não uniformes.

Na figura 27, podemos observar a comparação entre as imagens (n=10) de animais ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX, no que diz respeito as áreas em nanômetros quadrados (nm<sup>2</sup>) dos espaços entre as fibras colágenas tipo I e a variação de diâmetros entre as fibras em ambos os animais, expressos no desvio padrão (DP).

Nas figuras 28A e B evidenciamos imagens de células ósseas de um animal ApoEKO/OVX. Em A, temos a imagem de um osteoblasto em fase de maturação de topografia lacunar evidenciando matriz calcificada e fibras colágenas tipo I no meio extracelular. Em B, mostramos um osteócito em lacuna osteocítica com canaliculos e prolongamentos citoplasmáticos, além de matriz calcificada formando osteóide. Fibras colágenas tipo I também são visualizadas no meio extracelular.

Nas figuras 29A e B apresentamos imagens de fibras colágenas tipo I em corte longitudinal, feitas em animais ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX, respectivamente; evidenciando padrão estriado destas fibras colágenas, gerado pelo arranjo escalonado das moléculas de tropocolágeno.

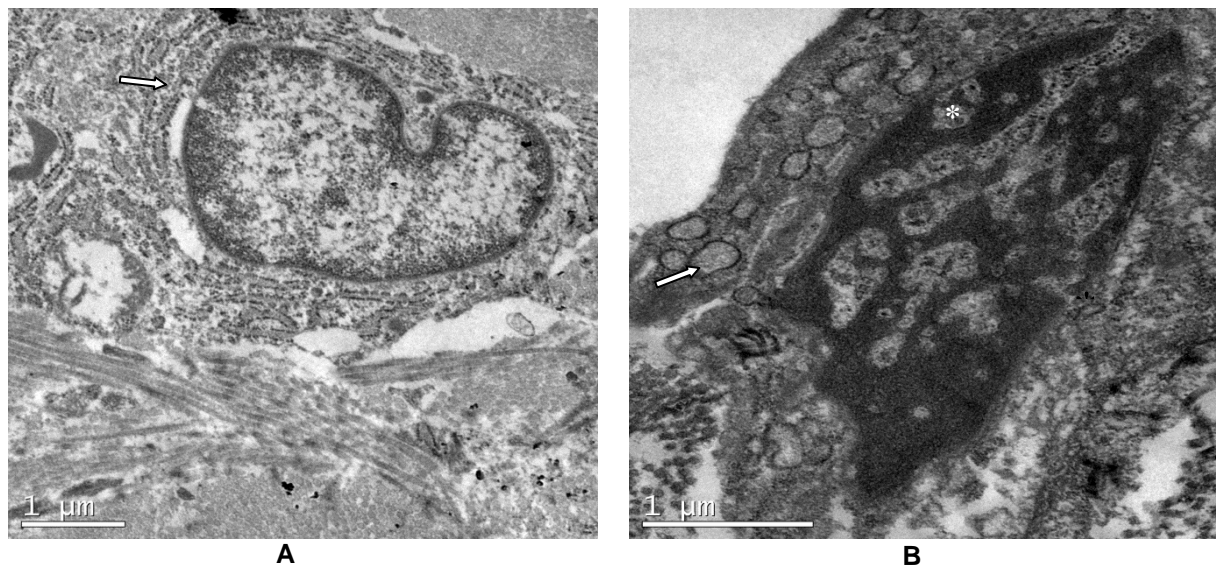
Nas imagens mostradas nas figuras 25A e B de um animal ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX respectivamente, podemos observar a diminuição da atividade de síntese no animal ApoEKO/OVX (fig. 25B), evidenciada pela apoptose celular com descontinuidade de membrana nuclear, pouca quantidade de retículo endoplasmático e vacuolização citoplasmática, levando-nos a crer que tais características podem validar ultraestruturalmente o modelo ApoEKO/OVX como mimetizante da osteoporose pós-menopáusia.

A observação de quantidade de matriz orgânica no tecido ósseo, cerca de 90% de fibras colágenas tipo I, ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), levou-nos ao estabelecimento de critérios semi-quantitativos de análise. Utilizamos 10 (dez) imagens (n=10) em corte transversal de cada animal, ApoEKO/SHAM e ApoEKO/OVX e submetemos ao programa Cell "Profiller", versão 2.1.0.

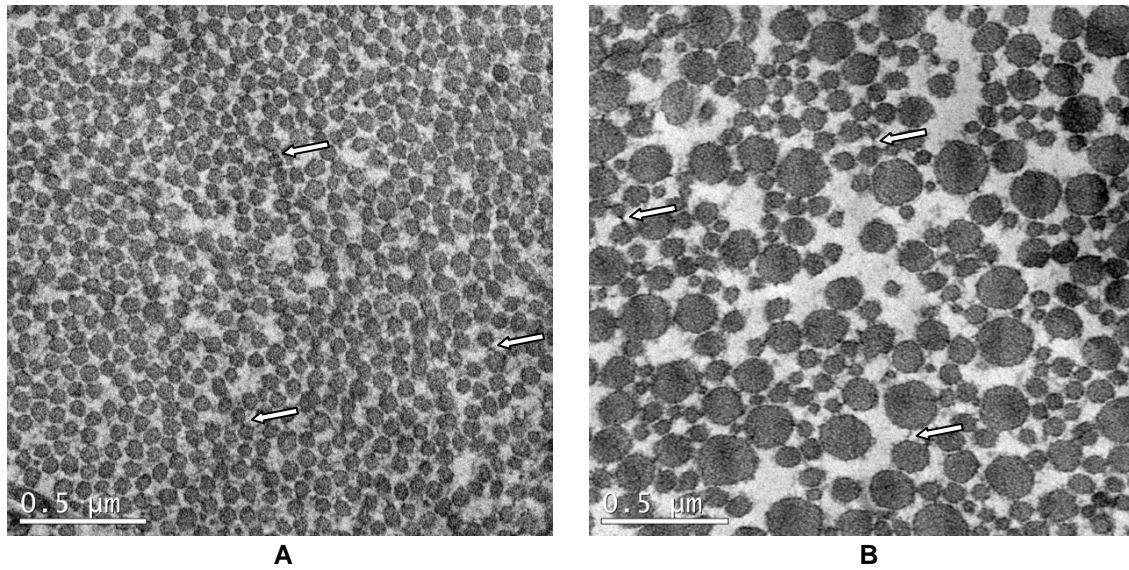


Nossos resultados mostraram uma maior uniformidade entre os diâmetros das fibras colágenas tipo I, menor área em nanômetros quadrados (nm<sup>2</sup>) entre elas e provável maior quantidade destas fibras no animal ApoEKO/SHAM em relação ao ApoEKO/OVX; que apresentou não uniformidade entre os diâmetros das fibras colágenas tipo I, maior área em nm<sup>2</sup> entre elas e provável menor quantidade dessas fibras (Figura 27).

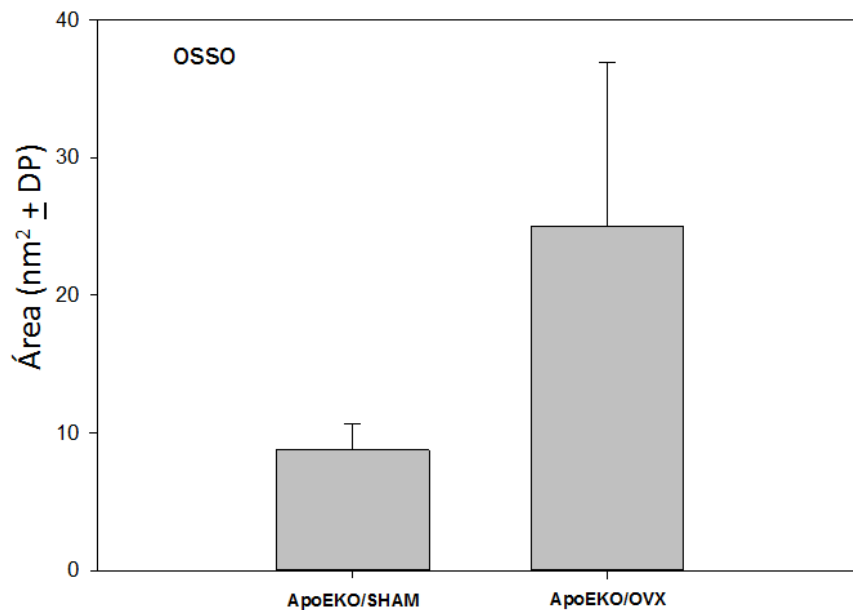
Dados que corroborariam com a literatura ao mencionar que na osteoporose essas fibras colágenas estariam alinhadas frouxa e irregularmente com espaços alargados entre elas (YUN SHEN et al., 2009).



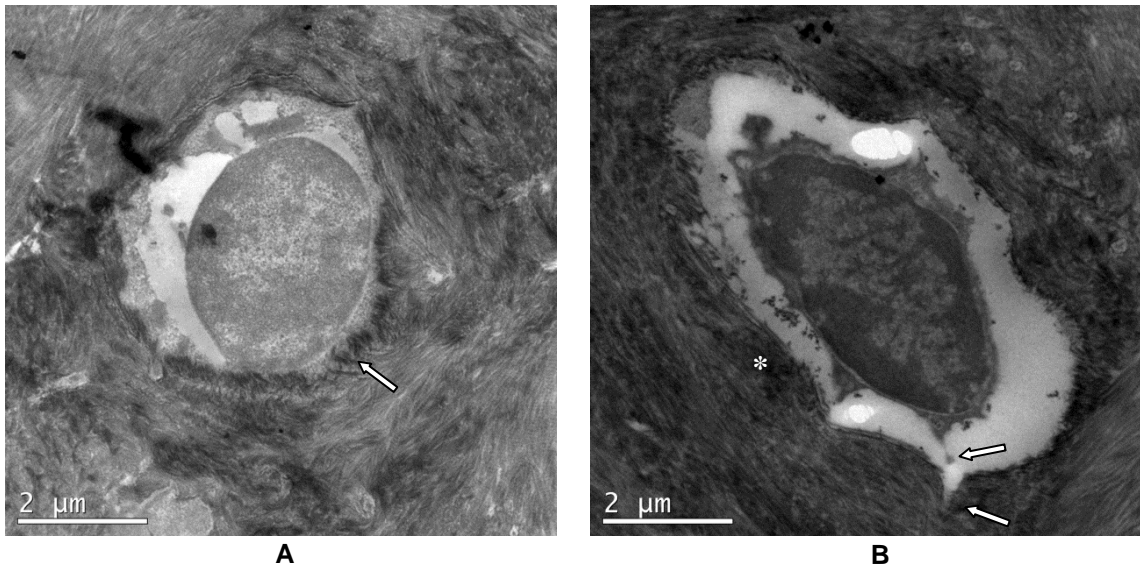
**Figura 25** - Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão que sugere uma célula osteoprogenitora apresentando grande atividade de síntese, podendo ser comprovada por núcleo eucromático de contorno regular, com quantidades de retículo endoplasmático rugoso (seta) em seu citoplasma, além de fibras colágenas no meio extracelular em cortes diversos, em um animal ApoEKO/SHAM **(A)**. E uma Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão que sugere uma célula em apoptose apresentando vacuolização citoplasmática (seta) e perda do envoltório nuclear (\*) em um animal ApoEKO/OVX **(B)**.



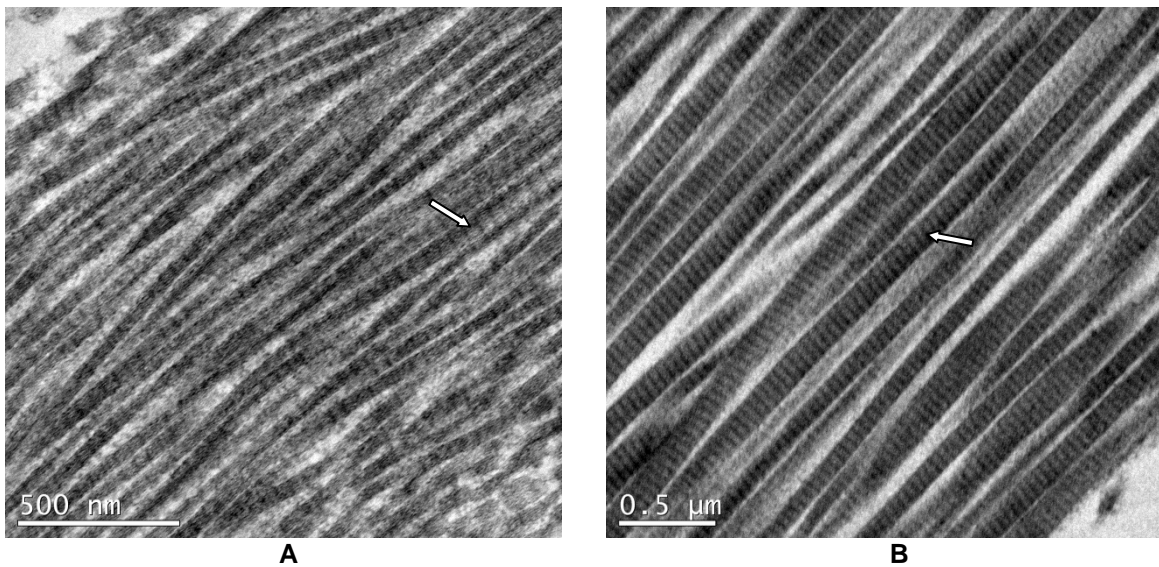
**Figura 26** - Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão, mostrando fibras colágenas Tipo I em corte transversal, apresentando ligações cruzadas pirimidínicas entre elas (setas). Em **(A)** observamos este corte em um animal ApoEKO/SHAM, com grande quantidade destas fibras colágenas tipo I, menor área em nanômetros quadrados ( $\text{nm}^2$ ) entre elas e maior uniformidade entre os diâmetros destas fibras. Em **(B)**, um animal ApoEKO/OVX mostrando menor quantidade de fibras colágenas tipo I, maior área em  $\text{nm}^2$  entre elas e diâmetros não uniformes.



**Figura 27** - Observamos menor área em  $\text{nm}^2$  entre as fibras colágenas tipo I e menor desvio padrão (DP), expresso pela uniformidade dos diâmetros entre estas fibras colágenas tipo I, em um animal ApoEKO/SHAM; e maior área em  $\text{nm}^2$  entre as fibras colágenas tipo I e maior DP, expresso pela não uniformidade dos diâmetros entre as fibras colágenas tipo I, em um animal ApoEKO/OVX.



**Figura 28** - Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão mostrando em **(A)** um Osteoblasto em fase de maturação, de topografia lacunar evidenciando início de matriz calcificada (seta) e fibras colágenas tipo I no meio extracelular em um animal ApoEKO/OVX. Em **(B)**, Fotomicrografia eletrônica de Transmissão mostrando um Osteócito em lacuna osteocítica com presença de canaliculos e prolongamentos citoplasmáticos (setas). Matriz calcificada elétron densa formando osteóide (\*) e fibras colágenas tipo I no meio extracelular, também em um animal ApoEKO/OVX .



**Figura 29** - Fotomicrografia Eletrônica de Transmissão de cortes longitudinais de fibras colágenas tipo I, evidenciando padrão estriado gerada pelo arranjo escalonado das moléculas de tropocolágeno (setas) em um animal ApoEKO/SHAM **(A)** e ApoEKO/OVX **(B)**.

## 6 DISCUSSÃO

A osteoporose é uma doença do metabolismo ósseo de maior incidência no mundo. A osteoporose apresenta caráter multifatorial, que envolve aspectos hormonais, genéticos e nutricionais na sua etiologia (HEISS et al., 2008). A osteoporose causada por deficiência de estrogênio é a forma mais comum da doença, e acomete principalmente mulheres na pós-menopausa. Estudos sugerem que a perda óssea é proeminente nestas mulheres, pois a reabsorção excede a formação óssea alterando profundamente o balanço osteomineral (ISHIDA et al., 1996; revisado por COMPSTON, 2001; LERNER, 2006). Como consequência, existe um alto risco de fraturas para os pacientes, subsequente imobilidade, e alta mortalidade especialmente entre os nestas pacientes (HEISS et al., 2008). Portanto, devido a sua prevalência na população mundial a osteoporose tem recebido grande atenção como grande problema de saúde pública.

Tem sido sugerido que a insuficiência de ingestão de vitamina K (VK) possa contribuir negativamente para a saúde do esqueleto levando ao desenvolvimento de fraturas osteoporóticas (PRICE, 1993; SZULC et al., 1993; WEBER, 1997). Além disso, estudos apontam que o tratamento com altas doses de menatetrenona (menaquinona-4 ou MK4) preserva a massa óssea e reduz o risco de fraturas em mulheres pós-menopausa (ORIMO et al., 1992; SHIRAKI et al., 2000). Como a única função fisiológica conhecida da vitamina K até o presente é facilitar a gama carboxilação de resíduos de ácido glutâmico em um limitado número de proteínas, pode-se assumir que os efeitos de todas as formas de vitamina K são mediados pela  $\gamma$ -carboxilação (BINKLEY et al., 2002). Neste contexto, algumas das proteínas da matriz óssea que apresentam este tipo de modificação covalente podem caracterizar a razão pela qual a vitamina K apresenta este efeito positivo no metabolismo osteomineral.

Na tentativa de esclarecer os potenciais efeitos da vitamina K (em particular a vitamina K3 ou menadiona) no metabolismo ósseo na patogênese da osteoporose pós-menopausa, foram utilizados camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX) representando um modelo animal de deficiência dos hormônios ovarianos. É sabido que mulheres pós-menopausadas apresentam perda de massa óssea acelerada devido, principalmente, à diminuição da concentração circulante de estrogênio

(KALU, 1991; WRONSKI et al., 1985). Além da perda de massa óssea decorrente da carência de estrogênio, observa-se também uma deterioração da microarquitetura tecidual óssea que se acredita aumentar a susceptibilidade à fraturas nestas mulheres (DECHENEY, 1993; ERIKSEN, COLVARD & BERG, 1988; FRAZÃO & NAVEIRA, 2006). Portanto, este trabalho objetivou verificar o papel da vitamina K neste modelo animal dando ênfase não apenas aos parâmetros clássicos do metabolismo osteomineral, mas também à ultraestrutura tecidual óssea através de técnicas de microscopia eletrônica.

Neste estudo, a deficiência de estrogênio foi devidamente corroborada através de uma série de determinações que se estendem desde a mensuração dos hormônios circulantes até aos efeitos fisiológicos induzidos pela insuficiência dos mesmos. Em todos os animais OVX por meio do peso úmido do útero, o qual reduziu após a cirurgia de esterilização ( $p < 0,0001$ ). Além disso, análises histológicas ratificaram a atrofia do útero nos animais OVX quando comparados com os SHAM por meio da avaliação da redução do endométrio ( $p < 0,0001$ ). Para avaliar o ganho de peso e o crescimento dos animais durante o experimento foram realizadas, periodicamente, a pesagem e a medida do comprimento da cauda. Essas medições foram efetuadas sempre antes de cada densitometria e, também, antes do sacrifício. Verificou-se, então, que todos os animais ganharam peso devido ao crescimento e que os animais do grupo OVX CTRL foram os que apresentaram maior aumento no peso (KALU et al., 1989). Portanto, de posse do modelo validado analisamos o metabolismo mineral neste modelo. Pode-se observar que o tratamento com vitamina K levou a uma alteração significativa na reabsorção óssea, que promoveu ganho de DMO nos animais OVX. Como era de se esperar, o aumento das concentrações séricas circulantes de vitamina K levou a uma significativa alteração na  $\gamma$ -carboxilação da osteocalcina, proteína de grande importância na nucleação da mineralização da matriz óssea (HASCHKA et al, 1989; HADJIDAKIS & ANDROLAKIS, 2006). Paralelamente, observamos um aumento de microfraturas nos ossos dos animais OVX que aparentemente são reduzidas pela suplementação com vitamina K.

Nas extremidades dos ossos longos do esqueleto em crescimento, entre a metáfise e a epífise, existe a cartilagem epifisária, responsável pelo crescimento longitudinal do osso por um processo de ossificação endocondral. A ossificação endocondral

ocorre por dois processos. O primeiro consiste na modificação da cartilagem hialina, ocorrendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, sua mineralização e a morte dos condrócitos. O segundo é caracterizado pela invasão de capilares sanguíneos e células osteogênicas vindas dos tecidos adjacentes, nas cavidades previamente ocupadas pelos condrócitos. Essas células diferenciam-se em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada. Dessa forma, aparece tecido ósseo onde antes havia tecido cartilaginoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Em alguns mamíferos, incluindo humanos, a linha epifisária (LE) é reabsorvida durante a maturação sexual em resposta aos hormônios sexuais. Esse processo, conhecido como fechamento da linha epifisária, encerra o crescimento longitudinal do osso (FAUSTINI-FUSTINI; ROCHIRA; CARANI, 1999). No entanto, em roedores, o fechamento da linha epifisária não ocorre, uma vez que o receptor de estrogênio-( $\alpha$ )-alfa está presente somente nos condrócitos de animais imaturos (BLAND, 2000; KENNEDY et al., 1999). Já foi verificado que o estrogênio diminui o recrutamento, a proliferação e a atividade de síntese dos condrócitos, levando à redução da placa de crescimento. Dessa forma, o crescimento longitudinal dos ossos é inibido (BÖRJESSON et al., 2010). Kimmel (1991) sugeriu que ratas utilizadas como modelo animal de humanos fossem ovariectomizada após os 7 meses de idade a fim de excluir as complicações associadas com a ossificação endocondral. Nesse sentido, foi medida a área da linha epifisária de cada grupo estudado para avaliar o alongamento longitudinal. Foi observado, então, que não houve diferença estatisticamente significativa da área da linha epifisária entre os grupos. Apesar disso, percebe-se que houve uma diminuição da área da LE nos animais OVX CTRL e OVX VK quando comparados aos SHAM, o que pode sugerir que naqueles grupos de animais a deficiência de estrogênio não estimulou o crescimento longitudinal dos ossos.

Os resultados de densidade mineral óssea (DMO) mostraram que ao longo do experimento houve um aumento de DMO entre os grupos SHAM CTRL e OVX CTRL ( $p < 0,05$ ), enquanto que no grupo OVX VK3, a DMO aumentou em relação ao grupo OVX CTRL. De acordo com Shiraki e colaboradores (2000) a administração de MK4 previne fraturas e sustenta a DMO da coluna lombar em mulheres pós-menopausa. Ademais, AKIYAMA e colaboradores (1999) mostraram que a vitamina K previne a

perda óssea induzida por ovariectomia em ratas, pois dentre outras análises, observaram que a DMO de animais OVX é significativamente menor que a dos animais SHAM, e que em animais OVX suplementados com VK2 ocorre um aumento da DMO quando comparados aos OVX CTRL. Por outro lado, Binkley e colaboradores (2002), trabalhando com ratas, não observaram nenhuma diferença na OVX induzindo perda óssea no fêmur *in vivo* e *ex vivo* entre o grupo controle e os grupos suplementados com vitamina K1 ou MK4. Em outro estudo do mesmo grupo, desenvolvido com mulheres norte americanas saudáveis pós-menopausadas, nenhum efeito da VK1 e da MK4 na DMO da espinha lombar ou no fêmur foi observado (BINKLEY et al., 2009). Por fim, Shiraki e Itabashi (2009) também não encontraram nenhuma diferença significativa na DMO de mulheres na pós-menopausa, com diagnóstico de osteoporose, após 6 meses de tratamento com MK4.

A medida da espessura do osso compacto não revelou nenhum resultado significativo ( $p=0,56$ ) entre os grupos estudados. Akiyama e colaboradores (1993) observaram que a OVX e o tratamento com a MK4 afeta a metafise femoral ao invés do osso inteiro, indicando que a perda óssea ocorre particularmente em porções do osso que possuem bastante osso trabecular. Mawatari e colaboradores (2000), trabalhando com ratas, não encontraram diferença significativa na análise do volume do osso cortical entre os grupos OVX e SHAM tratados ou não com vitamina K. Esses resultados, no entanto, não são compatíveis com um estudo realizado com ratas em que a área cortical foi significativamente menor no grupo OVX controle que no grupo SHAM controle e que, após o tratamento, a vitamina K2 inibiu essa diminuição induzida pela ovariectomia (KOBAYASHI; HARA; AKIYAMA, 2002). Entretanto, é sabido que a porção cortical óssea dos ratos perde o sistema Haversiano e, por isso, esses animais possuem pouca remodelação de osso intracortical (MOSEKILDE et al., 1995). Além disso, Riggs (1991) afirma que a perda óssea pós-menopausa devido à deficiência de estrogênio leva a uma perda desproporcional entre o osso cortical e o trabecular, sendo maior neste último.

O cálcio é o mais abundante mineral no organismo. Aproximadamente 1-2 kg está contido dentro do corpo humano, sendo que 99% compõem os ossos e os dentes. Suas principais funções são manter a integridade estrutural e regular as funções metabólicas. A absorção do cálcio ocorre no intestino e é um evento estimulado

principalmente pela vitamina D (1,25-dihidroxicolecalciferol), a qual induz a produção de proteínas ligadoras de cálcio, como a osteocalcina (revisado em LANHAM-NEW, 2008). Em contrapartida, a perda desse mineral se dá por meio da excreção renal, mecanismo esse também regulados por uma série de hormônios (KALU et al, 1989; KELLY & HARRIS, 1995; KOBAYASHI, HARA, AKIYAMA, 2002; LAHAM-NEW, 2008). Assim, em média, 97% do cálcio filtrado é reabsorvido pelos túbulos renais e os 3% restante são excretados na urina. O equilíbrio entre a absorção e a excreção mantém a concentração plasmática de cálcio entre 90-105 mg/L, sendo que aproximadamente 50% encontra-se livre. Dentro do osso, o cálcio está na forma de cristais de hidroxapatita, os quais também contêm fósforo e magnésio, o que contribui para resistência óssea (revisado em LANHAM-NEW, 2008). O aumento da excreção de cálcio por mulheres na pós-menopausa reflete um aumento da reabsorção óssea devido à deficiência de estrogênio (revisado por ABRAMS, 2005). Os resultados obtidos ao longo deste trabalho mostraram que a OVX e o tratamento com VK3 não provocaram alterações significativas tanto nos níveis séricos de fósforo quanto na excreção urinária de cálcio e fósforo entre os grupos estudados. No entanto, a concentração sérica de cálcio foi significativamente maior nos grupos OVX que nos grupos SHAM.

O principal fator que predispõe para o desenvolvimento da osteoporose em mulheres é a menopausa, a qual induz uma perda óssea acelerada devido à deficiência de estrogênio. Espera-se que a análise de marcadores de reabsorção e formação óssea possa refletir essas mudanças, uma vez que a menopausa parece aumentar os índices urinários e séricos desses marcadores (TOHME et al., 1991; SEIBEL et al., 1993). Durante a formação do osso, a produção da matriz colágena precede a mineralização. A fase de produção de matriz colágena coincide com uma maior produção de fosfatase alcalina (FA), enquanto a mineralização coincide com uma maior produção de osteocalcina (STEIN, 1993). A fosfatase alcalina é uma enzima de superfície celular expressa em vários órgãos e tecidos. Assim, o nível sérico de FA é a medida de todas as isoenzimas que podem estar circulando. Em adultos saudáveis, a contribuição dos níveis séricos das isoenzimas derivadas do fígado e dos ossos é aproximadamente equivalente, e 15% ou menos é proveniente de isoenzimas intestinais (PRICE, 1993). Assim, a falta de especificidade da FA é um fator que limita o seu uso em distúrbios caracterizados por um desequilíbrio na



remodelação óssea como a osteoporose pós-menopausa (WATTS et al., 2001). Os resultados aqui apresentados mostraram que a concentração da fosfatase alcalina no soro foi significativamente maior nos animais do grupo SHAM controle que nos dois grupos de animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. Esses resultados não são esperados uma vez que a literatura nos mostra que após a OVX ocorre um aumento da atividade da FA indicando um processo ativo de formação e de reabsorção óssea. É sabido ainda, que em humanos a atividade da fosfatase alcalina aumenta após a menopausa, refletindo um aumento da remodelação óssea, e que a administração da vitamina K em mulheres pós-menopausa não altera a concentração da FA, enquanto que os níveis séricos de osteocalcina aumentam significativamente. Isso indica que a VK aumenta a formação óssea ao invés de suprimir a reabsorção (KALU et al., 1989; AKIYAMA et al., 1993; MAWATARI et al., 2000). Contudo, os mecanismos pelos quais ocorre este efeito necessitam de mais dados para serem plenamente esclarecidos.

Aproximadamente 90% da matriz orgânica do osso é constituída por colágeno tipo I, uma proteína em hélice tripla. O colágeno tipo I do osso tem ligações cruzadas com moléculas específicas que proporcionam rigidez e resistência. As ligações cruzadas do colágeno tipo I maduro no osso são as ligações cruzadas pirimídicas, a piridinolina e a deoxipiridinolina (DPD) (SEYEDIN; ROSEN, 1990; DELMAS, 1995). A DPD é formada pela ação de lisil oxidase sobre o aminoácido lisina. É liberada para circulação durante o processo de reabsorção óssea (DELMAS, 1995; SEIBEL; ROBINS; BILEZIKIAN, 1992; DELMAS et al., 1991; EASTELL et al., 1997). A DPD é excretada não-metabolizada na urina e não é afetada pela dieta (COLWELL; RUSSEL; EASTELL, 1993), o que a torna adequada para avaliação da reabsorção. Neste estudo foi observado que a excreção da DPD foi significativamente maior no grupo OVX controle que nos grupos SHAM controle e SHAM tratado com VK3. Além disso, percebe-se que após o tratamento com VK3 houve uma diminuição da excreção de DPD pelos animais do grupo OVX (dado não significativo). Esses resultados concordam com dados encontrados na literatura que mostram um aumento da excreção de DPD tanto em mulheres pós-menopausadas em comparação com mulheres saudáveis quanto em animais OVX comparados com o grupo SHAM (SEIBEL et al., 1993; IKEDA et al., 2001; HU et al., 2003). As imagens de cortes transversais de fibras colágenas tipo I, feitas no MET, mostraram essas

ligações pirimidínicas, provavelmente diminuídas, no animal ApoEKO/OVX em relação ao ApoEKO/SHAM. Áreas alargadas entre as fibras colágenas tipo I, em tese, justificaria o aumento da DPD urinária nos animais ApoEKO/OVX em relação aos animais WT/SHAM e WT/OVX, tipificando presença de reabsorção óssea. Ainda, de acordo com Ozuro e colaboradores (2002), a DPD diminui gradativamente após o tratamento com vitamina K2. Portanto, o aumento da concentração urinária de DPD pode ser causado pelo aumento da remodelação óssea devido à deficiência de estrogênio nos animais OVX e a suplementação com VK3 parece diminuir a excreção desse metabólito.

Deve ser enfatizado que a concentração de vitamina K3 utilizada neste estudo foi farmacológica, não fisiológica. Apesar dessa alta concentração de VK3, nenhum efeito consistente na ovariectomia induzindo perda óssea foi demonstrado. Uma possível explicação para isso pode ser o fato da vitamina K ter efeitos vantajosos para o metabolismo ósseo somente em populações com insuficiência de cálcio e/ou vitamina D. Estudos têm demonstrado uma melhoria dos efeitos da OVX na massa ou resistência óssea em ratos utilizando dietas contendo cálcio (AKIYAMA et al., 1999; MAWATARI et al., 2000). Além disso, outros estudos com ratos ovariectomizados sugerem que a suplementação com vitamina D pode ser requerida para gerar efeitos benéficos da suplementação com vitamina K (HARA et al., 1994; MATSUNAGA; ITO; SAKOU, 1999).

Na avaliação do tecido ósseo realizada pelo Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) podemos analisar a matriz calcificada e não calcificada, a estrutura dos osteoblastos e osteoclastos, e aspectos de células ósseas não diretamente envolvidas no remodelamento ósseo; como os osteócitos. A matriz orgânica do tecido ósseo compõe-se de 90% de fibras colágenas tipo I e outras proteínas que representam 10%. Essas fibras colágenas apresentam diâmetro entre 50 e 70 nanômetros (nm). Na osteoporose as fibras colágenas foram observadas alinhadas frouxa e irregularmente com espaços alargados, algumas delas começando a evidenciar diferentes graus de defeitos entre elas. Osteoblastos em inatividade de formato irregular, núcleo eucromático, com pouco citoplasma, vesículas espalhadas, com pouco retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi (YUN SHEN et al., 2009).

A ultraestrutura da substância mineral óssea não é constante, depende da textura da estrutura e do grau de mineralização óssea. Os osteoblastos são células pequenas, mononucleadas, vindas de células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea (FRIEDENSTEIN, 1976; OWEN, 1985; MARKS AND POPOFF, 1988). Os osteoblastos estão envolvidos na função de formação óssea (HOLTROP, 1975; MARKS AND POPOFF, 1988). Eles sintetizam matriz óssea constituindo o tecido osteóide, e controlam a calcificação da matriz orgânica. Os osteoblastos são muito ativos, e estão arranjados perpendicularmente à superfície óssea. Seus núcleos estão dispostos na parte oposta da superfície óssea. Seu citoplasma apresenta todas as características de células sintetizadoras de proteínas para exportar, apresentando um abundante e frequente retículo endoplasmático granular e um bem desenvolvido aparelho de Golgi. Os aspectos ultraestruturais dos osteoblastos têm sido observados (BOIVIN et al., 1989). Mitocôndrias são numerosas no citoplasma dos osteoblastos. A presença de depósitos minerais em mitocôndrias como grânulos intramitocondriais tem sido extensivamente encontrada em vários tecidos (BOSKEY, 1981). Na superfície óssea em formação, os osteoblastos não estão isolados, mas arranjadas lado a lado, constituindo um alinhamento osteoformativo. Estes osteoblastos se organizam em rede, comunicando-se entre si. São diferentes tipos de junções descritas (JEANSONNE et al., 1979; WEINGER AND HOLTROP, 1974; STANKA, 1975; MARQUART, 1977; DOTY, 1981). Todo osteoblasto secreta matriz óssea calcificada durante sua fase ativa. Alguns osteoblastos secretam também matriz orgânica; assim eles são cercados por matriz calcificada.

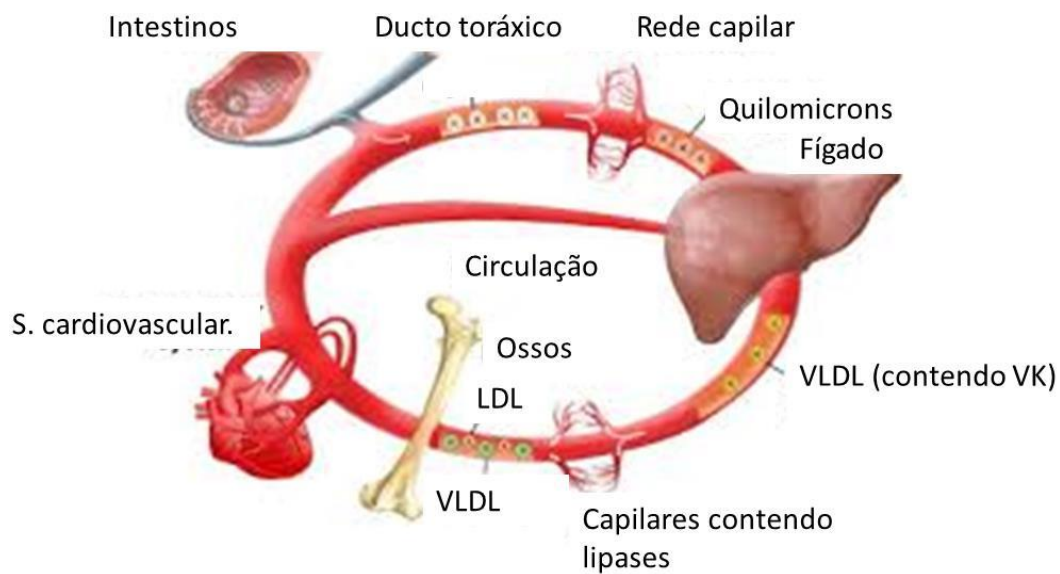
Este estágio de célula óssea é chamado de osteócito e está localizado numa lacuna osteocítica. Estas lacunas contendo osteócitos, rodeadas por matriz ainda não calcificada são chamadas osteóide-osteocítico (PALUMBO, 1986). Os osteócitos são comunicados entre si por prolongamentos citoplasmáticos localizadas em canálculos através do tecido ósseo calcificado. Esses processos são ricos em microfilamentos e conectam-se entre as junções celulares (FURSETH, 1973; WEINGER AND HOLTROP, 1974; HOLTROP, 1975; DOTY, 1981). Os osteócitos aparecem em maior quantidade e maiores em osso compacto em relação ao esponjoso. Os osteócitos são derivados dos osteoblastos, mas geralmente seus núcleos são proeminentes e estão situados no centro destas células. Tem citoplasma menos abundante que os osteoblastos, e ocupado principalmente por

mitocôndrias, vacúolos, algum retículo endoplasmático rugoso e raros aparelhos de Golgi. Os aspectos ultraestruturais e a formação de osteócitos têm sido descritos por JANDE, 1971; TONNA, 1973; LUK et al., 1974; SCHULZ et al., 1974; HOLTROP, 1975). A forma e a ultraestrutura dos osteócitos não são constantes, porém variam conforme suas atividades. Por fim isquemias podem causar a morte dos osteócitos em sua lacuna periosteocítica (JAMES and STEIJN-MYAGKAYA, 1886).

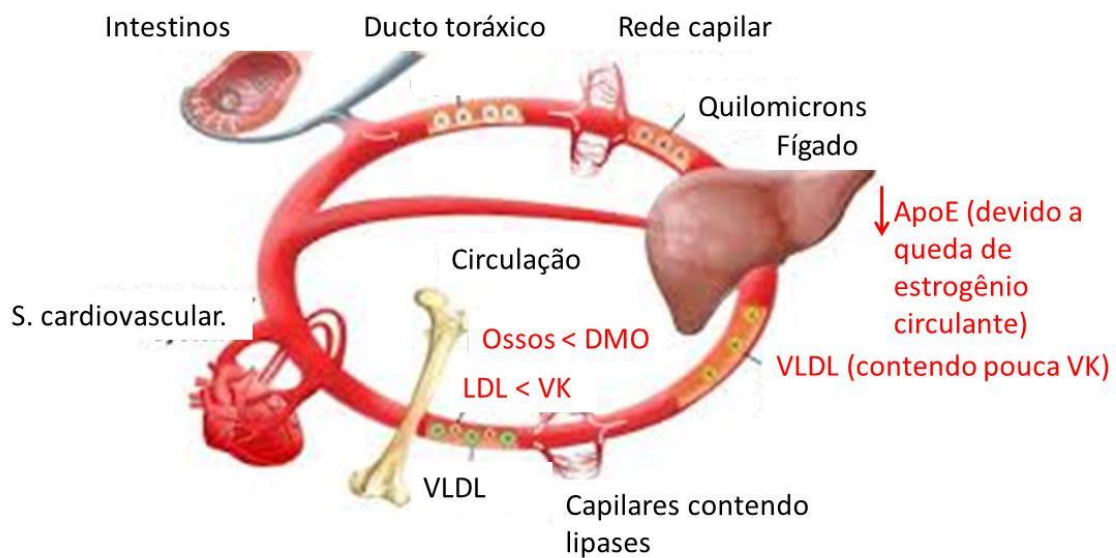
O exame do tecido ósseo pela Microscopia Eletrônica, do ponto de vista clínico, não tem grande importância ainda; entretanto a microscopia eletrônica, separada ou associada a técnicas complementares, como autoradiografias, imunocitoquímica, microanálises e cultura de células, serão valorizadas e totalmente necessárias para precisar e descrever patologias ósseas. Osteoporose, osteogênese imperfeita, doença de Paget's, são algumas mencionadas. A Microscopia Eletrônica será muito usada para obter informações precisas sobre mudanças teciduais e celulares (BOIVIN et al., 1989). Com o aumento da expectativa de vida e a incidência de fraturas devido à fragilidade óssea é necessário não só identificar patologias grosseiras, mas também pequenas mudanças na composição mineral e estrutural, avaliada por microanálise e difração de Raio-X (OBRANT and ODSELIUS, 1984, 1985; ARSENAUT & GRYPAS, 1988). Portanto, o uso da Microscopia Eletrônica no estudo da osteoporose pós-menopausa ainda se restringe a experimentos com modelos animais. No entanto, estudos com modelos animais são de extrema valia para ensaios pré-clínicos de novos medicamentos e/ou novas interações medicamentosas antes destas serem usadas em seres humanos. A limitação da técnica para uso em seres humanos, então, pode ser encarada como um caso de uso em pesquisa básica. E em alguns centros que possuem tais aparelhos, pode ser substituída por tomografia computadorizada em 3 dimensões (CAT-SCAN 3D).

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados mostram que duas moléculas suspeitas de participar do interactoma das vias associadas ao efeito do estrogênio no tecido ósseo apresentam efeitos semelhantes sobre o metabolismo osteomineral. Tanto a vitamina K quanto a ApoE aparentemente levam a uma melhora em vários aspectos do metabolismo osteomineral pertinente a osteoporose (diminuição da DMO, acompanhada de deterioração da microarquitetura tecidual). Foi observado que o tratamento com vitamina K em camundongos ovariectomizados reduz a incidência de microfraturas observadas nos animais ovariectomizados em relação aos não tratados. Em adição, estes animais mesmo ligeiramente hipercalcémicos, conseguem manter sua DMO paralelamente aumentando a síntese de osteocalcina altamente carboxilada e diminuindo a degradação de colágeno. A queda do estrogênio pela OVX em camundongos APOEKO, por sua vez, não restaura a DMO destes animais. Estes resultados, portanto, indicam que a ApoE é necessária porém não suficiente para manutenção do metabolismo osteomineral normal. Em adição, nossos resultados sugerem que a falta de hormônio e que a ação da ApoE através de mecanismos distintos. Os animais ApoEKO apresentam hipercalcúria e hiperfosfatúria semelhante aos animais OVX. A baixa mineralização resulta em microfraturas no camundongo ApoEKO/SHAM assim como no ApoEKO/OVX observada na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A queda na atividade celular observada ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) no animal ApoEKO/OVX pode validá-lo ultraestruturalmente, como modelo que mimetiza a osteoporose pós menopausa.. A análise morfométrica das imagens em cortes transversais de MET, nos animais ApoEKO/OVX, mostrou aumento de área em nanômetros quadrados (nm<sup>2</sup>) entre as fibras colágenas tipo I, em relação ao modelo ApoEKO/SHAM; validando-o ultraestruturalmente como modelo mimetizante de osteoporose pós menopausa. Para compreensão deste modelo de interação, ainda existe a necessidade de comprovação através de outro modelo, onde avaliar-se-á a interação entre a vitamina K e a ApoE. Neste ponto, contudo, propõe-se o modelo preliminar observado na Figura 30.



### Situação normal = DMO normal



### Situação com baixa ApoE = menos oferta VK para os ossos = baixa DMO

**Figura 30** – O modelo preliminar proposto sugere que a deficiência de ApoE levaria à ossos mais frágeis devido a menor oferta da vitamina K aos ossos. De forma análoga, a insuficiência ovariana também contribuiria para este mecanismo, pois os estrogênios, entre outros efeitos, são capazes de aumentar a expressão de ApoE no fígado. Conseqüentemente, um efeito em cascata de menor oferta de vitaminas lipossolúveis que, somado as ações diretas no estrogênio no tecido ósseo, repercutem numa progressiva degeneração óssea.

## 8 REFERÊNCIAS

- 1 ABRAHAM, L.K. *Histologia e Biologia Celular Uma Introdução à Patologia*, 1ª ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2004.
- 2 ABRAMS, S.A. Calcium supplementation during childhood: long-term effects on bone mineralization. **Nutrition Reviews**, v. 63, p. 251-55, 2005.
- 3 ADAMI, S. Bisphosphonate antifracture efficacy. **Bone**, v. 41, p. 8-15, 2007.
- 4 AKIYAMA, Y.; HARA, K.; KOBAYASHI, M. et al. Inhibitory effect of vitamin K2 (menatetrenone) on bone resorption in ovariectomized rats: a histomorphometric and dual energy X-ray absorptiometric study. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 80, p. 67-74, 1999.
- 5 AKIYAMA, Y., HARA, K., OHKAWA, I. et al. Effects of menatetrenone on bone loss induced by ovariectomy in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 62, p. 145-53, 1993.
- 6 ALBRIGHT, F. The effect of hormones on osteogenesis in man. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 1, p. 293-353, 1947.
- 7 ALBRIGHT, F.; REIFENSTEIN, E.C. Metabolic bone disease: osteoporosis. In: Albright, F.; Reifenstein, E.C. (eds). *The Parathyroid Glands and Metabolic Bone Disease*. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 145-204, 1940.
- 8 AMADEI, S.U.; SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42(1), p. 5-12, 2006.
- 9 ANDERSON, J.J.B.; GARNER, S.C.; MAR, M. et al. The ovariectomized, lactating rat as an experimental model for osteopenia: calcium metabolism and bone changes. **Bone and Mineral**, v. 11, p. 43-53, 1990.

- 10 ARAUJO, D.V.; OLIVEIRA, J.H.; BRACCO, O.L. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no Sistema Suplementar de Saúde Brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49(6), p. 897-901, 2005.
- 11 ARSENAUT, A.L.; GRYNPAS, M.D. Crystals in calcified epiphy seal cartilage and cortical bone of the rat. **Calcif Tissue Int**, v. 43(4), p. 219-25, 1988.
- 12 AVIOLI, L.V. The osteoporotic syndrome: detection, prevention, and treatment, ed. 3, New York, Wiley-Liss, 1993.
- 13 BAO, O. et al. Aging and age-related diseases - From endocrine therapy to target therapy. **Mol Cell Endocrinol**, v. 394, p. 115-118, 2014
- 14 BAUD, C.A.; BOIVIN, G. Effects of hormones on osteocyte function and perilacunar wall structure. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 136, p. 270-81, 1978.
- 15 BEDELL, M.A.; JENKINS, N.A.; COPELAND, N.G. Mouse models of human disease. Part I: techniques and resources for genetic analysis in mice. **Genes Development**, v. 11(1), p. 1-10, 1997.
- 16 BINKLEY, N.; HARKE, J.; KRUEGER, D. et al. Vitamin K treatment reduces undercarboxylated osteocalcin but does not alter bone turnover, density, or geometry in healthy postmenopausal north american women. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 24(6), p. 983-91, 2009.
- 17 BINKLEY, N.; KRUEGER, D.; ENGELKE, J. et al. Vitamin K Supplementation Does Not Affect Ovariectomy-induced Bone Loss in Rats. **Bone**, v. 30(6), p. 897-9000, 2002.
- 18 BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clinical Science**, v. 98, p. 217-40, 2000.
- 19 BOIVIN, G.; CHAVASSIEUX, P.; CHAPUY, M.C.; BAUD, C.A.; MEUNIER, P.J. Skeletal fluorosis: histomorphometric analysis of bone changes and bone fluoride content in 29 patients. **Bone**, v. 10(2), p. 89-99, 1989.



- 20 BÖRJESSON, A.; LAGERQUIST, M.; LIU, C. et al. The role of estrogen receptor-alpha in growth plate cartilage for longitudinal bone growth. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2010.
- 21 BOSKEY, A.L. Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. **Clin Orthop**, v. 157, p. 225-57, 1981.
- 22 BOSKEY, A.L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. **Bonekey Rep**, p. 447, 2013.
- 23 BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337-42, 2003.
- 24 BRESLOW, J.L. **Isr. J. Med. Sci**, v. 32(6), p. 486-0, 1996.
- 25 BUITENHUIS, H.C.; SOUTE, B.A.; VERMEER, C. Comparison of the vitamins K1, K2 and K3 as cofactors for the hepatic vitamin K-dependent carboxylase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1034, p. 170-5, 1990.
- 26 CANCELA, M.L.; LAIZÉ, V.; CONCEIÇÃO, N. Matrix Gla protein and osteocalcin: From gene duplication to neofunctionalization. **Arch Biochem Biophys**, p. 9861, 2014.
- 27 CASANOVA, M. et al., Quantitative phenotyping of bone fracture repair: a review. **Bonekey Rep**, p.550, 2014.
- 28 CHARLES, J.F.; ALIPRANTIS, A.O. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. **Trends Mol Med**, p. 449-459, 2014.
- 29 CHEN, F.P.; WANG, K.C.; HUANG, J.D. Effect of estrogen on the activity and growth of human osteoclasto in vitro. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 48(4), p. 350-55, 2009.
- 30 COHEN, J.; HARRIS, W.H. The three dimensional anatomy of Haversian systems. **J Bone Jt, Surg** 40A: 419-434.

- 31 COLTON, C.A.; BROWN, C.M.; VITEK, M.P. Sex steroids, APOE genotype and the innate immune system. **Neurobiol Aging**, v. 26, p. 363-72, 2005.
- 32 COLWELL, A.; RUSSEL, R.G.; EASTELL, R. Factors affecting the assay of urinary 3 hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 23, p. 341-49. 1993.
- 33 COMPSTON, J.E. Sex steroids and bone. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 419-47, 2001.
- 34 COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON, L.J. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. **Osteoporosis Intinternational**, v. 2, p. 285-89, 1992.
- 35 CUMMINGS, S.R.; MELTON, L.J. III. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. **Lancet**, v.359, p. 1761-67, 2002.
- 36 CURREY, J.D. What should bones be designed to do? **Calcif Tissue Int** 36: (Suppl 1) 7-10.
- 37 DATTA, H.K.; WALKER, J.A.; TUCK, S.P. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, p. 577-87, 2008.
- 38 DE ROBERTIS (Jr.) - HIB - PONZIO. *Biologia Celular e Molecular*, 12<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003.
- 39 DECHERNEY, A. Physiologic and pharmacologic effects of estrogen and progestins on bone. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 38, p. 1007-14, 1993.
- 40 DELMAS, P.D. Biochemical markers for the assessment of bone turnover. In: Riggs, B.L.; Melton, L.J. III. (eds): *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. p. 319-33. 1995.
- 41 DELMAS, P.D.; SCHLEMMER, A.; GINEYTS, E. et al. Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest

- biopsy in patients with vertebral osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**. v. 6, p. 639-44. 1991.
- 42 DIALAMEH, G.H., TAGGART, W.V., MATSCHINER, J.T. et al. Isolation and characterization of menaquinone-4 as a product of menadione metabolism in chicks and rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.41, p. 391-400, 1971.
- 43 DOTY, S.B. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. **Calcif Tissue Int**, v. 33(5), p. 509-12, 1981.
- 44 DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The Osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289. p. 1501-04. 2000.
- 45 DVORNYK, V.; RECKER, R.R.; DENG, H.W. Gene expression studies of osteoporosis: implications for microarray research. **Osteoporos Int.**, v. 14, p. 451-61, 2003.
- 46 EASTELL, R.; COLWELL, A.; HAMPTON, L. et al. Biochemical markers of bone resorption compared with estimates of bone resorption from radiotracer kinetic studies in osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 59-65, 1997.
- 47 EISMAN, J.A.; CIVITELLI, R.; ADAMI, S.; CZERWINSKI, E.; RECKNOR, C.; PRINCE, R.; REGINSTER, J.Y.; ZAIDI, M.; FELSEMBERG, D.; HUFHES, C.; MAIRON, N.; MASANAUSKAITE, D.; REID, D.M.; DELMAS, P.D.; RECKER, R. Efficacy and tolerability of intravenous ibandronate injections in postmenopausal osteoporosis: 2-year results from the DIVA study. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, p. 488-497, 2008
- 48 ERBEN, R.G.; MOSEKILDE, L.; THOMSEN, J.S.; WEBER, K.; STAHR, K.; LEYSHON, A.; SMITH, S.Y.; PHIPPS, R. Prevention of bone loss in ovariectomized rats by combined treatment with risedronate and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. **The Journal of Bone Mineral Resarch**, v. 17(8), p. 1497-511, 2002.

- 49 ERIKSEN, E.F.; COLVARD, D.S.; BERG, N.J. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, v. 241, p. 84-6, 1988.
- 50 ERIKSEN, E.F.; MELSEN, F.; MOSEKILDE, L. Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals. **Metabolic Bone Disease and Related Research**, v. 5(5), p. 235-42, 1984.
- 51 FAUSTINI-FUSTINI, M.; ROCHIRA, V.; CARANI, C. Oestrogen deficiency in men: where are we today? **European Journal of Endocrinology**, v. 140(2), p. 111-29, 1999.
- 52 FELSENFELD, A.; RODRIGUEZ, M.; LEVINE, B. New insights in regulation of calcium homeostasis. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, p. 371-6, 2013.
- 53 FITZPATRUCKE, L.A. Estrogen therapy for postmenopausal osteoporosis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, p. 705-719, 2006.
- 54 Flore, R. et al. Something more to say about calcium homeostasis: the role of vitamin K2 in vascular calcification and osteoporosis. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 17, p. 2433-40, 2013.
- 55 FONTANA, A.; DELMAS, P.D. Bone and hormones, estrogen and antiestrogen: action on osteoporosis. **Presse Medicale**. v. 28, p. 555-558.
- 56 FRASCA, P.; HARPER, R.A.; KATZ, J.L. Scanning electron microscopy studies of collagen, mineral and ground substance in human cortical bone. **Scan Electron Microsc**, v. 3, p. 339-346.
- 57 FRAZÃO, P.; NAVEIRA, M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9(2), p. 206-14, 2006.
- 58 FRIEDENSTEIN, A.J. Precursor cells of mechanocytes. **Int Rev Cytol**, v. 47, p. 327-59, 1976.

- 59 FULLER, G.F. Problem-oriented diagnosis: falls in the elderly. **American Family Physician**, v. 61, p. 2159-68, 2000.
- 60 FURSETH, R. Tight junctions between osteocyte processes. **Scand J Dent Res**, v. 81(4), p. 339-41, 1973.
- 61 GAUMET, N.; SEIBEL, M.J.; BRAILLON, P. et al. Influence of ovariectomy on bone metabolism in very old rats. **Calcified Tissue International**, v. 58, p. 256-62, 1996.
- 62 GAUMET-MEUNIER, N.; COXAM, V.; ROBINS, S. et al. Gonadal steroids and bone metabolism in young castrated male rats. **Calcified Tissue International**, v. 66, p. 470-475, 2000.
- 63 GUEGUEN, R.; JOUANNY, P.; GUILLEMIN, F.; KUNTZ, C.; POUREL, J.; SIEST, G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. **J Bone Miner Res**, v. 10, p. 2017-2022.
- 64 HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385-96, 2006.
- 65 HARA, K.; TOMIUGA, T.; KOBAYASHI, M.; NAKAMURA, T.; TAJIMA, T. Influence of vitamin D3 on inhibitory effect of vitamin K2 on bone loss in ovariectomized rats. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 104, p. 101-9, 1994.
- 66 HARRIS, S.T.; REGINSTER, J.Y.; HARLEY, C.; BLUMENTALS, W.A.; POSTON, S.A.; BARR, C.E.; SILVERMAN, S.L. Risk of fracture in women treated with monthly oral ibandronate or weekly bisphosphonates: The evaluation of ibandronate efficacy (VIBE) database fracture study. **Bone**, v. 44, p. 758-765, 2009.
- 67 HAUSCHKA, P.V.; LIAN, J.B.; COLE, D.E. et al. Osteocalcin and matrix GLA protein vitamin K-dependent proteins in bone. **Physiological Reviews**, v. 69, p. 990-1047, 1989.

- 68 HAUSSLER, M.R. et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. **Calcif Tissue Int.**, v.92, p. 77-98, 2013.
- 69 HEISS, C. et al. Diagnosis of osteoporosis with vitamin k as a new biochemical marker. **Vitamins and Hormones**, v. 78, p. 417-33, 2008.
- 70 HILLARD, T.C.; STEVENSON, J.C. Role of estrogen in the development of osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 49, p. S55-S59, 1991.
- 71 HOFKER, M.H.; VAN VLIJMEN, B.J.; HAVEKES, L.M. **Atherosclerose**, v. 137(1), p. 1-11, 1998.
- 72 HOLTROP, M.E. **Ann. Clin, Lab. Sci.**, v. 5(4), p. 264-71, 1975
- 73 HOU, J.; WU, H. The effects of ApoE gene polymorphisms on lumbar spine bone mineral density and carotid atherosclerosis. **Clin Biochem**, v. 45, p. 219-22, 2012.
- 74 HU, Y.Y.; XIA, W.B.; LIU, H.C. et al. Changes of urinary deoxypyridinoline crosslink/creatinine in rats after ovariectomy and anti-osteoporotic intervention. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v. 25(3), p. 271-4, 2003.
- 75 HUGHES, D.E.; DAI, A.; TIFTEE, J.C. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. **Nature Medicine**, v. 2(10), p. 1132-6, 1996.
- 76 HUSSAIN, M.M. et al. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. **Biochim Biophys Acta.**, p. 151-70, 1996.
- 77 IKEDA, S.; TSURUKAMI, H.; ITO, M. et al. Effect of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomy in rats. **Bone**, v. 28(6), p. 625-33, 2001.
- 78 IMAI, Y.; YOUN, M.Y.; KONDOH, S. et al. Estrogens maintain bone mass by regulating expression of genes controlling function and life span in mature osteoclasts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, Suppl 1, p. E31-9, 2009.

- 79 IMAIZUMI K,. Diet and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Biosci Biotechnol Biochem.** 2011;75(6):1023-35. Epub 2011 Jun 13.
- 80 International osteoporosis foundation – IOF. Disponível em: <[www.iofbonehealth.org](http://www.iofbonehealth.org)>. Acesso em: 30 Jun. 2010.
- 81 ISHIDA, Y.; HEERSCHE, J.N.M. Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitors cells in bone cell populations derived from adult female but not from adult male rats. **Bone**, v. 20(1), p. 17-25, 1997.
- 82 ISHIDA, Y.; TERTINEGG, I.; HEERSCHE, J.N.M. Progesterone and dexamethasone stimulate proliferation and differentiation of osteoprogenitors and progenitors for adipocytes and macrophages in cell populations derived from adult rat vertebrae. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 11(7), p. 921-30, 1996.
- 83 IWAMOTO, J.; SATOB, Y.; TAKEDA, T. et al. High-dose vitamin K supplementation reduces fracture incidence in postmenopausal women: a review of the literature. **Nutrition Research**, v. 29, p. 221-28, 2009.
- 84 JAMES, J.; STEIJN MYAGKAYA, G.L. Death of osteocytes. Electron microscopy after in vitro ischaemia. **J Bone Joint Surg (Br)** v. 68(4), p. 620-4, 1986.
- 85 JANDE, S.S. Fine structural study of osteocytes and their surrounding bone matrix with respect to their age in young chicks. **J Ultrastruct Res**, v. 37(3), p. 279-300, 1971.
- 86 JEANSONNE, B.G.; FEAGIN, F.F.; MCMINN, R.W.; SHOEMAKER, R.L.; REHM, W.S. Cell to cell communication of osteoblasts. **J. Dent Res**, v. 58(4), p. 1415-23,1979.
- 87 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

- 88 KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, p. 175-192, 1991.
- 89 KALU, D.N.; LIU, C.C.; HARDIN, R.R. et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, v. 124, p. 7-16, 1989.
- 90 KANEKI, M.; HOSOI, T.; OUCHI, Y. et al. Pleiotropic actions of vitamin K: protector of bone health and beyond? **Nutrition**, v. 22, p. 845-52, 2006.
- 91 KANIS, J.A.; BLACK, D.; COOPER, C. et al. A new approach to the development of assessment guidelines for osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 13(7), p. 527-36, 2002.
- 92 KANIS, J.A. et al. Ten year risk of osteoporotic fracture and the effect of risk factors on screening strategies. **Bone**, v. 30, p. 251-258, 2001.
- 93 KELLY, P.J.; HARRIS, M. Genetic regulation of peak bone mass. **Acta Paediatr**, Suppl 411, p. 24-30, 1995.
- 94 KENNEDY, J.; BARIS, C.; HOYLAND, J.A. et al. Immunofluorescent localization of estrogen receptor-alpha in growth plates of rabbits, but not in rats, at sexual maturity. **Bone**, v. 24(1), p. 9-16, 1999.
- 95 KIM, D.H. et al. Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. **Gene**, v. 545, p. 185-93, 2014.
- 96 KIMMEL, D.B. Quantitative histologic changes in the proximal tibial growth cartilage of aged female rats. **Cell Matter Supply**, v. 1, p. 11-18, 1991.
- 97 KOBAYASHI, M.; HARA, K.; AKIYAMA, Y. Effects of Vitamin K2 (Menatetrenone) on Calcium Balance in Ovariectomized Rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 88, p. 55-61, 2002.
- 98 KOMM, B.S.; TERPENING, C.M.; BENZ, D.J. et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. **Science**, v. 241(4681), p. 81-3, 1988.



- 99 KOMORI T., Mouse models for the evaluation of osteocyte functions. **J Bone Metab.** 2014 Feb;21(1):55-60. doi: 10.11005/jbm.2014.21.1.55. Epub 2014 feb.
- 100 KOWALSKI, S.C.; SJENZFELD, V.L.; FERRAZ, M.B. Utilização de recursos e custos em osteoporose. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47(4), p. 357-7, 2001.
- 101 LAMBERT, J.C.; COVLE, N.; LENDON, C. The allelic modulation of apolipoprotein E expression by oestrogen: potential relevance for Alzheimer's disease. **J Med Genet**, v. 41, p. 41-2, 2004.
- 102 LANHAM-NEW, S.A. Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, p. 163-76, 2008.
- 103 LEBLOND, P.F.; WRIGHT, G.M. Steps in the elaboration of collagen by odontoblasts and osteoblasts. **Methods Cell Biol**, v. 13, p. 167-189, 1981.
- 104 LEE, K.H.; HONG, S.I. Interfacial and twin boundary structures of nanostructured filamentary composites. **J. Mat Res**, v. 18, p. 2194-2202, 2003.
- 105 LERNER, U.H. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. **Journal of Dental Research**, v. 85(7), p. 584-95, 2006.
- 106 LIAO, M.H. et al. Genistein induces oestrogen receptor- $\alpha$  gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/NF- $\kappa$ B/activator protein-1 and promotes cell mineralization. **Br J Nutr**, p. 55-63, 2014.
- 107 LIEL, Y.; SHANY, S.; SMIRNOFF, P. et al. Estrogen increases 1,25-Dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. **Endocrinology**, v. 140(1), p. 280-84, 1999.
- 108 LINDSAY, R. Estrogen Deficiency. In: RIGGS, B. L.; MELTIN, L. J. Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management. 2.ed. Lippincott-Raven Publishers, v. 6, p. 133-160, 1995.

- 109 LISCUM, B. Osteoporosis: the silent disease. **Orthp. Nurs**, v. 11(4), p. 21, 1992.
- 110 LIU, Y.Z. et al. Review: Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. **Journal of Endocrinology**, v. 177, p. 147-196, 2003.
- 111 LOCATELLI V, BIANCHI VE, Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. **Int J Endocrinol**, 2014;2014:235060. doi: 10.1155/2014/235060. Epub 2014 Jul 23.
- 112 LUK et. al.; **Journal Ultrastruct. Res.**, Feb., v. 46(2), p. 165-83, 1974.
- 113 MAC NAMARA, P.; LOUGHREY, H.C. Progesterone receptor A and B isoform expression in human osteoblasts. **Calcified Tissue International**, v. 63, p. 39-46, 1998.
- 114 MACKIE, E.J. Osteoblast: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 1301-05, 2003.
- 115 MANZI, D.L.; PILBEAM, C.C.; RAISZ, L.G. The anabolic effects of progesterone on fetal rat calvária in tissue culture. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 1, p. 302-09, 1994.
- 116 MARKS, S.C.JR.; POPOFF, S.N. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. **Am J Ant**, v. 183(1), p. 1-44, 1988.
- 117 MARQUART, K.H. So-called annular gap junctions in bone cells of normal mice. **Experientia**, v. 33(2), p. 270-2, 1977.
- 118 MATSUNAGA, S.; ITO, H.; SAKOU, T. The effect of vitamin K and D supplementation on ovariectomy-induced bone loss. **Calcified Tissue International**, v. 65, p. 285-89, 1999.

- 119 MAWATARI, T.; MIURA, H.; HIGAKI, H. et al. Effect of vitamin k2 on three-dimensional trabecular microarchitecture in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 15(9), p. 1810-17, 2000.
- 120 MCCORMICK, R.K. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. **Alternative Medicine Review**, v. 12(2), p. 113-145, 2007.
- 121 MCKEE, M.D.; FARACH-CARSON, M.C.; BUTLER, W.T. et al. Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and alfa-2-HS-glycoprotein) proteins in rat bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8(4), p. 485-96, 1993.
- 122 MELTON, L.J.; RIGGS, B.L. Clinical spectrum. Melton, L. J.; Riggs, B. L. editors. Osteoporosis: Etiology, diagnosis and Management. Raven Press, p. 155-79, 1988.
- 123 MORRIS, D.P.; SOUTE, B.A.; VERMEER, C. et al. Characterization of the purified vitamin K-dependent glutamyl carboxylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 8735-42, 1993.
- 124 MOSEKILDE, L. Assessing bone quality-animal models in preclinical osteoporosis research. **Bone**, v. 17(Suppl4), p. 343S-352S, 1995.
- 125 MUNDY, G.R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. **Bone**, v. 24(5), p. 35-8, 1999.
- 126 NEWMAN, P. et al. The uptake of lipoprotein-borne phyloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. **J Bone Miner Res**, v. 17, p. 426-33, 2002.
- 127 OBRANT, K.J.; ODSELIUS, R. **Ultrast. Pathol.**, v. 7(2-3), p. 129-31, 1984.
- 128 OJOPI, Elida P. Benquique; BERTONCINI, Alexandre Bruno and DIAS NETO, Emmanuel. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. *Rev. psiquiatr.*

- clín.* [online]. 2004, vol.31, n.1, pp. 26-33. ISSN 0101-6083. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-60832004000100005>.
- 129 ONOE, Y.; MIYAURA, C.; ITO, M.; OHTA, H.; NOZAWA, S.; SUDA, T. Comparative effects of estrogen and raloxifene on B lymphopoiesis and bone loss induced by sex steroid deficiency in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15(3), p. 54-9, 2000.
- 130 ORIMO, H.; SHIRAKI, M.; FUJITA, T. et al. Clinical evaluation of menatetrenone in the treatment of involutional osteoporosis – a double-blind multicenter comparative study with 1 $\alpha$  hydroxyvitamin D. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, suppl., S122, 1992.
- 131 OWEN, M. Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. In: Bone and Mineral Research (Ed. Peck W. A). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, v. 3, p. 1-25, 1985.
- 132 OZURU, R.; SUGIMOTO, T.; YAMAGUCHI, T. et al. Time-dependent effects of vitamin K2 (menatetrenone) on bone metabolism in postmenopausal women. **Endocrine Journal**, v. 49(3), p. 363-70, 2002.
- 133 PALUMBO, C. A three-dimensional ultrastructural study of osteoid osteocytes in the tibia of chick embryos. **Cell Tissue Res**, v. 246(1), p. 125-31, 1986.
- 134 PARHAMI, F.; GARFINKEL, A.; DEMER, L.L. Role of lipids in osteoporosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. 2346-2348, 2000.
- 135 PEARSON, D.A. Bone Health and Osteoporosis: The Role of Vitamin K and Potential Antagonism by Anticoagulants. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 22, p. 517-44, 2007.
- 136 PETER, L. et al. Associations of APOE gene polymorphisms with bone mineral density and fracture risk: a meta-analysis. **Osteoporos int.**, v. 22, p. 1199-209, 2011.

- 137 PLUIJM, S.M.F. Effects of gender and age on the association of apolipoprotein E4 with bone mineral density, bone turnover and the risk of fracture in older people. **Osteoporosis International**, v. 13, p. 701-709, 2002.
- 138 PLUMP, A.S. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells **Celular**, v. 71(2), p. 343-53, 1992.
- 139 POCOCK, N.A.; EISMAN, J.A.; HOPPER, J.L.; YEATES, M.G.; SAMBROOK, P.N.; EBERL, S. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. **J Clin Invest**, v. 80, p. 706-710, 1987.
- 140 POIRIER, J. et al. Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 35, p. 53, 2014.
- 141 PRICE, P.A. Vitamin K nutrition and postmenopausal osteoporosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 1268, 1993.
- 142 RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 3318-25, 2005.
- 143 RAISZ, L.G. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45(8-B), P. 1353-1358, 1999.
- 144 REGINSTER, J.Y.; BURLET, N. Osteoporosis: a still increasing prevalence. **Bone**, v. 38(2 Suppl 1), p. 4-9, 2006.
- 145 RIGGS, B.L. Overview of osteoporosis. **West Journal Medicine**, v. 154, p. 63-7, 1991.
- 146 RIGGS, B.L. Pathogenesis of osteoporosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 156(5), p. 1342-46, 1987.
- 147 RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON, J. III. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 279-302, 2002.

- 148 ROBEY, P.G. The biochemistry of bone. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 18(4), p. 859-902, 1989.
- 149 RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**, v. 289, p. 1508-14, 2000.
- 150 RODEN, J.E.; THIJSEN, H.H.; VERMEER, C. Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1379, p. 16-22, 1998.
- 151 ROHN TT. Is apolipoprotein E4 an important risk factor for vascular dementia? **Int J Clin Exp Pathol**, v.15;7(7):3504-3511, 2014.
- 152 SALTIKI, K.; ALEVIZAKI, M. Coronary heart disease in postmenopausal women; the role of endogenous estrogens and their receptors. **Hormones**, v. 6, p. 9-24, 2007.
- 153 SCHILLING, A.F. et al. Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. **J Bone Miner Res**, v. 20, p. 274-82, 2005.
- 154 SCHOFS, M.W.C.J., KLIFT, M.; HOFMAN, A.; VAN DUIJIN, C.M.; STRICKER, B.H.C.H.; POLS, H.A.P.; UITTERLINDEN A.G. ApoE gene polymorphisms, BMD, and fracture risk in elderly men and women: the Rotterdam Study. **J. Bone Min. Res.**, v. 19(9), p. 1490-1499, 2004.
- 155 SCHOT, L.P.C.; SCHUURS, A.H.W.M. Sex steroids and osteoporosis: effects of deficiencies and substitutive treatments. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 167-182, 1990.
- 156 SCHULZ, A.; DONATH, K.; DELLING, G. Ultrastruktur und Entwicklung des Corticalisosteocyten. Tierexperimentelle Untersuchungen an der Rattentibia. **Virchows Arch (Pathol Anat)**, v. 364(4), p. 347-56, 1974.
- 157 SEIBEL, M.J.; COSMAN, F.; SHEN, V. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in

- postmenopausal osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 8(7), p. 881-89, 1993.
- 158 SEIBEL, M.J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. Urinary pyridinium hydroxypyridinium crosslinks of collagen. Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 3, p. 263-70, 1992.
- 159 SEYEDIN, S.M.; ROSEN, D.M. Matrix proteins of skeleton. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 2, p. 914-19, 1990.
- 160 SHEARER, M.J. Role of vitamin K and Gla proteins in the patho-physiology of osteoporosis and vascular calcification. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 3, p. 433-38, 2000.
- 161 SHEARER, M.J.; BACH, A.; KOHLMEIER, M. Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 1181-86, 1996.
- 162 SHIRAKI, M.; ITTABASHI, A. Short-term menatetrenone therapy increases gamma-carboxylation of osteocalcin with a moderate increase of bone turnover in postmenopausal osteoporosis: a randomized prospective study. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, p. 333-40, 2009.
- 163 SHIRAKI, M.; SHIRAKI, Y.; AOKI, C.; et al. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, p. 515-21, 2000.
- 164 SINGH, M. et al. A susceptible haplotype within APOE gene influences BMD and intensifies the osteoporosis risk in postmenopausal women of Northwest India. **Maturitas**, v. 67, p. 239-44, 2010.
- 165 Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Disponível em <[www.endocrino.org.br](http://www.endocrino.org.br)>. Acesso em 04 Jun. 2010.
- 166 SOUZA, L.C. *Naturitas*, in press., 2011.

- 167 SRIVASTAVA, N.; AVERNA, M.; SRIVASTAVA, R.A. Dietary cholesterol and estrogen administration elevate brain apolipoprotein E in mice by different mechanisms. **Indian J Biochem Biophys**, v. 45, p. 410-5, 2008.
- 168 SRIVASTAVA, R.A. et al. Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor alpha-mediated pathway. **J. Biol. Chem**, p. 272, 1997.
- 169 SRIVASTAVA, R.A.; BHASIN, N.; SRIVASTAVA, N. Apolipoprotein E gene expression in various tissues of mouse and regulation by estrogen. **Biochem Mol Bio Int**, v. 38, p. 91-101, 1996.
- 170 STAFFORD, D.W. The vitamin K cycle. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 1873-78, 2005.
- 171 STANKA, P. Occurrence of cell junctions and microfilaments in osteoblasts. **Cells Tissue Res**, v. 159(3), p. 413-22, 1975.
- 172 STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. **Endocrine Review**, v. 14, p. 424-42, 1993.
- 173 SUDA, T.; UDAGAWA, N.; NAKAMURA, I. et al. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. **Bone**, v. 17(2), p. 87-91, 1995.
- 174 SZULC, P.; CHAPUY, M.C.; MEUNIER, P.J. et al. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. **The Journal of Clivical Investigation**, v. 91, p. 1769-74, 1993.
- 175 TAGGART, W.V.; MATSCHINER, J.T. Metabolism of menadione-6,7-3H in the rat. **Biochemistry**, v.8, p. 141-46, 1969.
- 176 TANAKA, S.; SHIMIZU, M.; DEBARI, K.; FURUYA, R.; KAWAWA, T.; SASAKI, T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. **The Anatomical Record**, v. 262, n. 2, p. 203-12, 2001.



- 177 TATE, M.L.K.; ADAMSON, J.R.; TAMI, A.E. et al. The osteocytes. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, p. 1-8, 2004.
- 178 TEITELBAUM, S.L. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**, v. 289, p. 1504-08, 2000.
- 179 TERMINE, J.D.; KLEINMAN, H.K.; WHITSON, S.W.; CONN, K.M.; MCGARVEY, M.L.; MARTIN, G.R. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. **Cell**, v. 26, p. 99-105.
- 180 TOHME, J.F.; SEIBEL, M.J.; SILVERBERG, S.J. et al. Biochemical markers of bone metabolism. **Rheumatology**, v. 50, p. 133-141, 1991.
- 181 TONNA, E.A. **Exp. Gerontol.**, v. 8(1), p. 9-16, 1973.
- 182 TORTORA, G.I. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*, 12 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.
- 183 TU P, DUAN P, ZHANG RS, XU DB, WNAGY, WU HP, LIU YH, SI L., Polymorphisms in genes in the RANKL/RANK/OPG pathway are associated with bone mineral density at diferente skeletal sites in post-menopausal women. **Int Osteoporosis**, p.20-40. 2014.
- 184 VAN DE PEPPEL, J., VAN LEEUWEN, J.P. Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. **Front Physiol**, v.5, p. 137, 2014.
- 185 VELDHUIS, J.D. et al. Age-dependent and gender-dependent regulation of hypothalamic-adrenocorticotropic-adrenal axis. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, v. 2, p. 201-25, 2013
- 186 VERMEER, C.; BRAAM, L. Role of K vitamins in the regulation of tissue calcification. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 19, p. 201-06, 2001.

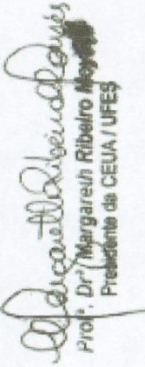
- 187 VERMEER, C.; GIJSBERS, B.L.M.; CRACIUN, A.M. et al. Effects of vitamin K on bone mass and bone metabolism. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 11878-918, 1996.
- 188 VILLENEUVE, S. et al. The potential applications of Apolipoprotein E in personalized medicine. **Front Aging Neurosci**, v. 6, p. 154, 2014.
- 189 WAI, P.Y.; KUO, P.C. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, p. 103-18, 2008.
- 190 Wang, H.; Wang, J.. Estrogen-related receptor alpha interacts cooperatively with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha to regulate osteocalcin gene expression. **Cell Biol Int**, v. 37, p. 1259-65, 2013.
- 191 WANNMACHER, L. Manejo racional da osteoporose: onde está o real benefício? **Organização Pan-Americana da Saúde**, v. 1(7), p. 1-6, 2004.
- 192 WATTS, N.B.; JENKINS, D.K.; VISOR, J.M. et al. Comparison of bone and total alkaline phosphatase and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women treated with alendronate. **Osteoporosis International**, v. 12, p. 279-88, 2001.
- 193 WEBER, P. Management of osteoporosis: Is there a role for vitamin K? **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, p. 350-6, 1997.
- 194 WEINGER, J.M.; HOLTROP, M.E. An ultrastructural study of bone cells: the occurrence of microtubules, microfilaments and tight junctions. **Calcif Tissue Res**, v. 14(1), p. 15-29, 1974.
- 195 WILLIAMS, WARWICK, DYSON, BANNISTER, Anatomia, 37<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995.
- 196 WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Assessement of fracture risk and its application to screenig for postmenopausal osteoporosis. **Technical Report Series**, 843, Geneva, 1994.

- 197 WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group. **Technical Report Series**, 921. Geneva, 2003.
- 198 WOJTCZAK A, SKRETKOWICZ J. Genetic determinants in ischemic heart disease. **Acta Pol Pharm.**;65(5):607-10, 2008.
- 199 WRONSKI, T.J.; LOWRY, P.L.; WALSH C.C.; IGNASZEWSKI, L.A. Skeletal alterations in ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**, v. 37, p. 324-28,1985.
- 200 YUN SHEN, ZI-MING ZHANG, SHENG-DAN JIANG, LEI-SHENG JIANG and LI-YANG DAI. Postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis show different ultrastructural characteristics of trabecular bone of the femoral head. **BMC Musculoskeletal Disorders**, Abril 2009.
- 201 ZABAGLIA, S.F.C.; COSTA-PAIVA, L.H.S.; PINTO-NETO, A.M.A. Ligadura tubária é fator de risco para a redução da densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 23(10), p. 621-26, 2001.
- 202 ZAJICKOVA, K. et al. Apolipoprotein E4 allele is associated with low bone density in postmenopausal women. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26(4), p. 312-315, 2003.
- 203 ZMUDA, J.M. **Apolipoprotein E polymorphism: A new genetic marker of hip fracture risk--The Study of Osteoporotic Fractures.** J Miner Res. 1999 de julho; 14 (7): 1175-1181

## ANEXO I

# CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 002/2008, relativo ao projeto de pesquisa intitulado: "**Efeitos do Estrogênio, da ApoE e da Vitamina K sobre o Metabolismo Ósseo**", que tem responsável o docente **Ian Victor Silva**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 14/07/2008. Este certificado expira-se em 30/07/2013.

  
Prof. Dr. Margareth Ribeiro Nogueira  
Presidente do CEUA / UFES

## ANEXO II




Vitória, 5 de junho de 2006

**A quem interessar possa,**

Venho por meio desta, atestar nossa colaboração nas linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento, liderado pelo Prof. Dr. Ian Victor Silva, localizado no Dept. de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Dentre estas linhas, possuo maior interação com aquelas relacionadas ao projeto **"Estudos dos efeitos do estrogênio, da vitamina K e da APOE sobre o metabolismo ósseo"** nos quais presto assistência técnico-científica tanto na parte clínica e quanto metodológica envolvendo análises de densidade mineral óssea, realizadas nas dependências do Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES), sob minha direção.

Coloco-me a disposição para quaisquer esclarecimentos,

  
Sérgio Ragi Eis, M.D., C.C.D.  
Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES)  
R. João Silva Abreu, 78  
Praia do Canto - Vitória, ES - CEP: 29055.450  
Tel: (27)2125-0202 e-mail: [sragi@cedoes.com.br](mailto:sragi@cedoes.com.br)

