

## Suplementação com uma dose baixa de cálcio como estratégia para melhorar o benefício / risco no controlo da fragilidade óssea - estudo em ratos ovariectomizados

*Using supplementation with a low calcium dose as a strategy to improve the benefit / risk in the control of bone frailty - a study in ovariectomized rats*

Mello-Sampayo C.<sup>1,#</sup>, Agripino A.A.<sup>1,2,#</sup>, Stilwell D.<sup>3</sup>, Vaz, M.F.<sup>4</sup>, Fernandes A.L.<sup>2</sup>, Santos H.<sup>5</sup>, Silva-Lima B.<sup>1</sup>, Canhão H.<sup>6</sup>, Marques M.C.<sup>1,2,#</sup>

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

### RESUMO

**Introdução:** Por motivos de segurança a suplementação com cálcio em adultos humanos nas doses recomendadas (1-1.2 g), ainda gera controvérsia. Analisámos por isso a potencial eficácia de uma dose baixa de suplemento de cálcio (concha-de-ostrea) nas alterações do osso femoral associadas à deficiência estrogénica, num modelo animal.

**Materiais e métodos:** Ratos *Wistarfêmeas* (n=15) aleatorizados em 3 grupos: *sham*, ovariectomizado (OVX), ovariectomizado-suplementado (OVX+S) com cálcio (43.6 mg/Kg) e goma Guar (43 mg/Kg) durante 53-dias (dose equivalente humana de 420 mg/dia de cálcio e 414.5 mg/dia de Guar). No dia-60 pesámos os animais e avaliámos pós-sacrifício: histologia, depósitos de cálcio (VonKossa) vascular, cálcio femoral e calciúria, biomecânica do fémur, e biomarcadores séricos. Utilizámos teste não-paramétrico ( $p < 0.05$ ) para comparação.

**Resultados:** O peso corporal dos animais ovariectomizados com e sem terapêutica aumentou 22% e 33% sem alteração da glicemia e perfil lipídico. A remodelação óssea aumentou ( $p < 0.05$ ) nos OVX e OVX+S. A calciúria aumentou nos OVX (107%,  $p < 0.05$ ) e OVX+S (76%). O suplemento atenuou a hipocalcemia ( $p < 0.01$ ) e redução de cálcio femoral ( $p < 0.05$ ) sem depósitos na aorta, e aumentou a rigidez ( $p < 0.05$ ), tensão de cedência e de fratura ( $p < 0.05$ ) dos ossos femurais comparativamente aos OVX.

**Discussão:** Doses baixas de suplemento (concha-de-ostrea+Guar) atenuam, nos animais ovariectomizados, o peso corporal, a calciúria, a hipocalcemia e a desmineralização femoral, conferindo-lhe maior rigidez e resistência à fractura, sem ocorrência de depósitos vasculares de cálcio.

**Conclusão:** A suplementação com cálcio em doses baixas reduz a fragilidade do osso osteoporótico, sem risco aparente de formação de depósitos vasculares.

**Palavras-Chave:** Suplemento de cálcio, osteoporose, ovariectomia, testes mecânicos de flexão, concha de ostra

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Farmacológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal;

<sup>2</sup> Unidade de Biotecnologia Ambiental (UBiA), Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Portugal;

<sup>3</sup> Clínica Veterinária de Colares, Sintra, Portugal;

<sup>4</sup> IDMEC, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal;

<sup>5</sup> Serviço de Anatomia Patológica, Hospital de Stª Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Portugal;

<sup>6</sup> Rheumatology Research Unit, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Portugal;

# Os autores contribuíram de igual forma para este trabalho

*Autor para correspondência:* M. Cristina Marques; Morada: Av. Prof. Gama Pinto, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal; e-mail: cristinamarques@gmail.com.

Submetido/Submitted: 20 setembro 2016 | Aceite/Accepted: 30 de setembro 2016

## ABSTRACT

**Introduction:** Calcium supplementation in adult humans in the recommended doses (1-1.2 g) still generates controversy for safety reasons. In an attempt to circumvent the risks, we have studied, in an animal model, the potential efficacy posed by calcium (oyster-shell) low dose supplementation in preventing the femoral bone changes associated with estrogen deficiency.

**Methods:** Female *Wistar* rats (n=15) randomized into 3 groups: sham, ovariectomized (OVX), ovariectomized-supplemented (OVX+S) with calcium (43.6 mg/kg) and Guar gum (43 mg/kg) for 53-days (human equivalent dose of 420 mg/day calcium and 414.5 mg/day Guar). By study day-60 animals were weighted before sacrifice. Parameters collected were: vascular histology and calcium deposits (Von Kossa staining), femoral and urinary calcium content, femur biomechanics, and serum biomarkers. Non-parametric test ( $p < 0.05$ ) were applied in data analysis.

**Results:** The body-weight of supplemented and non-supplemented animals increased 22% and 33% with no change in glycaemia and lipid profile. Bone remodeling increased ( $p < 0.05$ ) in the OVX and OVX+S. The urinary calcium increased in the OVX (107%,  $p < 0.05$ ) and OVX+S (76%). The supplementation mitigated the hypocalcaemia ( $p < 0.01$ ) and the femoral calcium reduction ( $p < 0.05$ ) without aorta deposition of calcium, and increased the stiffness ( $p < 0.05$ ), yield-stress and ultimate-stress ( $p < 0.05$ ) of the femurs compared to OVX.

**Discussion:** Low doses of supplement (oyster-shell+Guar) attenuated the body-weight gain, the calciuria, the hypocalcaemia and the femoral demineralization, giving greater femoral stiffness and toughness without generating vascular calcium deposits in ovariectomized animals.

**Conclusion:** Supplementation with low doses of calcium reduces the osteoporotic bone fragility, without apparent risk of vascular deposits formation.

**Keywords:** Calcium supplement, osteoporosis, rat ovariectomy, mechanical bending tests, oyster-shell

## INTRODUÇÃO

A suplementação com cálcio, apesar de recomendada na prevenção da fratura óssea em indivíduos saudáveis bem como na osteoporose associada ao envelhecimento e à menopausa<sup>1</sup> é assunto controverso, sobretudo por motivos de segurança decorrentes da deposição de cálcio extra-ósseo, nomeadamente na parede vascular e no rim. A Osteoporose tem uma prevalência estimada de 200 milhões de pessoas a nível mundial<sup>2</sup>, sendo que uma em cada 3 mulheres e um em cada 5 homens com mais de 50 anos sofrerá fratura devido à osteoporose<sup>3-5</sup>. Na Europa, em 2010 a osteoporose atingia mais de 27 milhões de pessoas e estima-se que aumente 23% até 2025 atingindo perto de 34 milhões<sup>6</sup>. O estudo EpiReumaPT (2014)<sup>7</sup> revelou uma prevalência de osteoporose em 10.2% da população portuguesa e a nível europeu, Portugal é o quinto país com menor incidência de fratura da extremidade proximal do fémur<sup>6</sup> com uma ocorrência anual de 9500 destas fraturas por fragilidade óssea<sup>8</sup>. O elevado número de fraturas e morbilidades associadas à osteoporose tem um grande impacto não só nos gastos em saúde, com estimativa de custos superiores a 35 biliões na Europa<sup>6</sup>, como também na produtividade desta população profissionalmente ativa e dos seus familiares-cuidadores. Em Portugal, em 2006, os gastos apenas com os cuidados hospitalares decorrentes destas fraturas já rondavam os 52 milhões<sup>9</sup>.

As doses diárias recomendadas de ingestão de cálcio variam consoante a idade, estado fisiológico e a dieta. Nos EUA é recomendada a ingestão de 1.2 g/dia de cálcio (o que corresponde

a 3 g/dia de carbonato de cálcio) a mulheres a partir dos 51 anos e homens septuagenários enquanto que no Reino Unido e países nórdicos europeus as doses recomendadas são da ordem dos 0.8 g<sup>10,11</sup>. Em Portugal é recomendado o consumo diário de pelo menos 0.9 g de cálcio<sup>12</sup>. O limite máximo de ingestão diária de cálcio para esta faixa etária é de 2 g cálcio. Uma dose diária de 0.8 g obtém-se facilmente numa dieta equilibrada, já uma dose de 1.2 g é mais difícil ser atingida requerendo para tal a adição de suplemento de cálcio<sup>10,11</sup>. No entanto há que ter em conta que há vários fatores que condicionam a biodisponibilidade do cálcio. A absorção intestinal de cálcio diminui durante a terapêutica com corticosteroides e com antagonistas da bomba de prótons, com a idade e na ausência de estrogénios<sup>13-15</sup>. Como o efeito dos sais de cálcio na osteoporose depende em grande parte da sua biodisponibilidade<sup>15</sup>, a solução para este problema tem passado pelo aumento das doses e pela associação à vitamina D, sendo prática terapêutica a suplementação com doses de 1000 a 1200 mg de cálcio por dia<sup>9</sup>.

Vários ensaios clínicos apontam para os benefícios ósseos da suplementação com cálcio, associado ou não à vitamina D<sup>1,16</sup>. Contudo, várias revisões sistemáticas e meta-análises levadas a cabo desde 2010<sup>17-20</sup> levantam variadas preocupações de segurança incluindo risco de acidentes trombóticos (coronários e cerebrovasculares) para doses de cálcio superiores a 0.805 g/dia sugerindo uma relação risco/benefício desfavorável à suplementação de cálcio. Um estudo elaborado, em 2013, no sul de Espanha<sup>21</sup> demonstrou que a

prescrição de suplementos de cálcio não tem habitualmente em conta a quantidade de cálcio ingerida na dieta, realçando que a suplementação com cálcio é inapropriada na maioria dos casos pecando, principalmente, por excesso.

Face ao exposto, a formulação dos suplementos de cálcio bem como a dose a utilizar para obter benefícios ao nível do esqueleto sem causar efeitos adversos é um assunto importante. Problemas de segurança nas doses recomendadas (1-1.2 g) de suplemento de cálcio justificam a avaliação da sua eficácia em doses mais baixas. Nesse sentido, os autores testaram o efeito, no osso femoral de ratos fêmeas deficientes em estrogénios, de uma dose de cálcio equivalente a um quinto do limite máximo diário recomendado na mulher pós-menopausa, um terço da dose de suplementação praticada atualmente (1.2 g/dia). Como fonte de cálcio recorreu-se à concha-de-ostra com base em estudos que demonstram que o  $\text{CaCO}_3$  destas conchas (900 mg/dia de cálcio) aumenta a densidade mineral óssea (DMO) em animais e em mulheres com osteoporose<sup>22,23</sup>. E como adjuvante da absorção de cálcio associou-se goma Guar com base em evidências que sugerem que esta fibra solúvel favorece a absorção de cálcio em ratos gastroesterectomizados<sup>24</sup>. Os efeitos da suplementação ou não, durante 53 dias, com esta formulação de pó de concha-de-ostra associado a goma Guar na dose de 420 mg/dia e 414.5 mg/dia respetivamente, 1 semana após ovariectomia de ratos fêmeas, são apresentados e discutidos neste estudo bem como a avaliação do risco potencial

de formação de depósitos vasculares de cálcio decorrentes da suplementação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Ratos *Wistar* fêmeas, provenientes da Harlan (Barcelona, Espanha), foram mantidos a uma temperatura média de 21 °C e ciclos de luz de 12 horas. A experimentação animal foi conduzida de acordo com as regras Comunitárias e Nacionais relativas à proteção dos animais utilizados em experimentação ou com outros fins científicos (Diretivas comunitárias (86/609/EEC), leis nacionais (DL nº 129/92, Portaria nº. 1005/92) e toda a legislação precedente).

### Preparação do pó de concha-de-ostra

As ostras foram colhidas entre novembro 2003 e junho 2004 no estuário do rio Sado (Sapalsado, Setúbal, Portugal). Após remoção da parte edível dos bivalves, lavámos e desinfetámos com hipoclorito de sódio a 1% as conchas e de seguida secámos a  $103 \pm 2$  °C durante 8h em estufa com recirculação de ar. As conchas secas foram partidas e pulverizadas em moinho (Fritschpulverisette, Alemanha) e o tamanho das partículas uniformizado para granulometria de 59.3-66.7  $\mu\text{m}$  por mesh 250.

### Desenho do estudo

Quinze animais com 3 meses de idade foram aleatoriamente distribuídos por 3 grupos experimentais (n=5 por grupo): controlo (grupo Sham); ovariectomizado (grupo OVX); ovariectomizado suplementado (grupo OVX+S). No dia zero (D0), todos os animais foram



ovariectomizados por laparotomia sob anestesia de isoflurano, excepto os do grupo controlo sujeitos apenas a laparotomia. Também foi administrada como pré-anestesia medetomidina 50 µg/kg, ip, e dose única de amoxicilina (100 mg/kg, sc), e cetoprofeno (1 mg/kg, sc), pré- e post-laparotomia enquanto que o atipamezol (250 µg/kg, sc) foi utilizado para reverter a sedação. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o ensaio. Todos os animais foram alimentados com ração de manutenção (4RF21 LPG, MucedolaSrl, Milão, Itália) e água desionizada *ad libitum*. Adicionalmente, o grupo OVX+S foi suplementado por 53 dias, a partir do dia 7, com 105 mg/Kg de pó de concha-de-ostra e 43 mg/Kg de goma Guar (Solegraells, Barcelona, Espanha). Este suplemento foi administrado com a ração, na forma de peletes (previamente moldados e secos a 65 °C). Dois meses (D60) após ovariectomia, os animais foram colocados em jejum durante a noite e a urina (12h) e amostras de sangue foram recolhidas antes do sacrifício. A necropsia incluiu o exame da superfície externa, olhos e compartimentos craniano, torácico, abdominal e pélvico, incluindo vísceras. O coração e a croça da aorta foram armazenados em tampão formol/fosfato para análise histopatológica. Os fêmures foram pesados limpos e armazenados a -20 °C para análises posteriores.

### **Análises de hormonas e marcadores bioquímicos**

As determinações de hormonas e marcadores bioquímicos foram efetuadas em amostras de soro e incluíram:

- determinação dos níveis de 17-beta-estradiol (E2) por ensaio de quimioluminescência (eE2) realizado de acordo com as *guidelines* do fabricante (ADVIA Centaur CP system, Siemens HealthCare, Alemanha) com sensibilidade de 11.8 pg/ml;
- determinação de biomarcadores metabólicos, como glucose, triglicéridos, HDL, LDL e colesterol total, por doseamento enzimático com recurso a analisador automático (Olympus AU2700, Hamburg, Alemanha) de acordo com as *guidelines* dos fabricantes (método da hexoquinase, sistema GPO/POD, sistema CHO/PAP e colesterol oxidase, respetivamente);
- determinação do cálcio sérico, no analisador automático acima mencionado pelo método colorimétrico de Arsenazo III com sensibilidade de 0.013mg/L e limite de quantificação (LoQ) de 0.4mg/L.

### **Avaliação Histológica**

Para as análises histológicas, secções com 3 µm de espessura nominal dos tecidos parafinados (croça da aorta) montadas em lâminas de microscópio, foram coradas com Hematoxilina-Eosina (para avaliação morfológica do tecido) e com VonKossa (para revelação de depósitos de cálcio).<sup>25</sup> Imediatamente antes da observação, as lâminas foram montadas em Entellan ®. As imagens obtidas a 40x de ampliação com recurso a um microscópio Nikon eclipse 50 i equipado com uma câmara a cores Nikon Digital-Sight, foram analisadas por um perito, em ensaio cego. As análises histológicas foram efetuadas em 3 animais de cada grupo, selecionados aleatoriamente.

### **Quantificação dos biomarcadores de remodelação óssea**

No final do estudo analisaram-se também os marcadores bioquímicos de remodelação óssea, telopeptídeo C-terminal do colagénio tipo 1 (CTX) como medida da reabsorção do osso e propeptídeos N-terminal do procologénio tipo 1 (PINP) como medida da formação óssea, por testes imunoenzimáticos (ELISA). As concentrações de ambas as proteínas foram determinadas de acordo com as guidelines do fabricante (Immunodiagnostic Systems, Boldon, Tyne and Wear, UK) com sensibilidades de 2.0 e 0.7 ng/mL, respetivamente.

### **Quantificação dos conteúdos em cálcio**

As amostras de ração (1 g), foram mineralizadas por via seca (incineração em mufla a  $550 \pm 50$  °C) e dissolução das cinzas com ácido nítrico 65% PA26. As amostras de pó de concha-de-ostra seca (1 g), e a totalidade do osso femoral seco e da urina, foram digeridas com ácido nítrico 65% (PA, Merck, Alemanha) a 120 °C durante 4h e seguidamente filtradas e diluídas em 100 ml de água desionizada conforme o protocolo adaptado de AOAC 985.01<sup>27</sup>. Para a quantificação do cálcio as leituras foram efetuadas por espectrofotometria de absorção atômica (AAS) (SOLAAR AA Spectrometer M series, ThermoElectron Corporation) com chama de acetileno/protóxido de azoto.

### **Testes biomecânicos do osso**

Os ossos femorais isolados foram sujeitos a testes biomecânicos de flexão em três pontos, numa

máquina eletromecânica universal (Instron 5566™, Instron Corporation, Canton, USA). A distância entre os pontos de carga exteriores foi de 5 mm, tendo sido aplicada uma carga de 500 kN no centro do eixo femoral a uma velocidade constante de 0.01 mm/s até ocorrência de fratura. As curvas de tensão-extensão foram obtidas conforme descrito previamente<sup>28</sup>. Na Fig. 1 exemplificamos uma curva de tensão-extensão obtida a partir do osso femoral. Os parâmetros analisados a partir das curvas de tensão-extensão obtidas foram os descritos previamente<sup>28,29</sup> nomeadamente, módulo elástico (Young's modulus), tensão máxima de fratura ( $\sigma_{ultimate}$ ) e tensão de cedência ( $\sigma_{yield}$ ), assumindo para os cálculos que os fêmures são semelhantes a cilindros.

### **Análise estatística**

Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para comparar variáveis contínuas e estabelecido um nível de significância de 0.05. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o programa GraphPad Prism.

## **RESULTADOS**

### **Doses diárias de cálcio ingeridas por cada grupo de animais**

As determinações analíticas do cálcio revelaram teores de cálcio elementar presente na ração da ordem dos 0.62 g Ca/100 g e ligeiramente superiores no caso da ração seca 0.72 g Ca/100 g. Já no pó de concha-de-ostra estes teores foram da ordem dos 41.5g Ca/100g

correspondendo a teores de cálcio orgânico da ordem dos 96 g/100g. Com base nestes teores de cálcio do pó de concha-de-ostra foram calculadas as doses correspondentes deste pó a incluir na formulação a administrar diariamente ao grupo de animais ovariectomizado que foi suplementado (0.105 g de pó/Kg peso corporal).

### **Características fisiológicas e bioquímicas dos ratos fêmeas ovariectomizados e ovariectomizados suplementados**

Na tabela 1 apresentamos as características das populações estudadas, nomeadamente o peso corporal e os teores dos biomarcadores analisados de cada grupo animal estudado. O peso corporal dos animais, sem diferenças significativas no dia zero (D0), aumentou respetivamente 11%, 33% e 22% no grupo controlo, ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado suplementado (OVX+S) após dois meses de estudo (D60). Os níveis séricos de E2 de ambos os grupos ovariectomizados encontravam-se abaixo do limite de deteção (11.8 µg/ml). Os níveis séricos de glucose, triglicéridos, colesterol total, LDL e HDL não mostraram diferenças significativas entre os grupos de animais no final do estudo, mas a calcemia diminuiu 6% nos animais ovariectomizados ( $p < 0.05$ ) enquanto que nos animais ovariectomizados suplementados apenas diminuiu 3% comparativamente aos animais saudáveis. O aumento da diurese observado nos animais ovariectomizados não foi estatisticamente diferente entre os grupos, mas hipercalcúria registada em ambos os grupos ovariectomizados

foi apenas significativa ( $p < 0.01$ ) nos animais ovariectomizados não-suplementados. O rácio calciúria/calcemia confirma a maior excreção de cálcio em ambos os grupos ovariectomizados, cerca do dobro da observada nos animais saudáveis (sham), e novamente apenas significativo ( $p < 0.01$ ) no grupo ovariectomizado não-suplementado.

### **Biomarcadores da remodelação óssea**

O marcador sérico de reabsorção óssea, CTX, aumentou cerca de 70% em ambos os grupos de animais ovariectomizados (OVX e OVX+S ( $p < 0.05$ )) comparativamente aos animais saudáveis (sham) (Tabela 1). O marcador sérico de formação óssea, PINP, também aumentou em média 47% em ambos os grupos ovariectomizados ( $p < 0.05$ ) comparativamente aos animais saudáveis. Os diferentes valores de rácio PINP/CTX obtidos para cada um dos grupos, revelam uma diminuição de 12.5% e 19% nos grupos ovariectomizado suplementado ou não comparativamente aos animais saudáveis (sham), respetivamente, mas sem significado estatístico.

### **Propriedades biomecânicas e teor de cálcio dos ossos fémur**

O doseamento do teor de cálcio por espectrofotometria de absorção atómica revelou uma redução de 21% do conteúdo em cálcio dos fémures dos animais ovariectomizados ( $p < 0.05$ ) comparativamente aos animais saudáveis (Tabela 2). Nos animais ovariectomizados suplementados a tendência de redução do conteúdo

em cálcio do osso femoral foi menor (14%) e sem significado estatístico comparativamente ao teor de cálcio dos fêmures dos animais saudáveis.

Apesar da redução do diâmetro dos fêmures dos animais ovariectomizados (2.5%) comparativamente aos dos animais saudáveis não ser significativa (dados não apresentados), quando o mesmo é normalizado pelo peso corpo-

ral esta redução (28%) torna-se significativa (Tabela 2) e é acompanhada de uma redução de 4% na massa femoral normalizada. Nos animais ovariectomizados suplementados a redução do diâmetro normalizado do fêmur, atenuada para 20%, não é significativa e ocorreu sem alteração da massa femoral normalizada comparativamente aos animais saudáveis.

**Tabela 1.** Características fisiológicas e marcadores bioquímicos dos grupos estudados

	Sham	OVX	OVX+S
Peso corporal (g) no D0	203.0 ± 8.0	205.4 ± 9.4	218.4 ± 14.2
Peso corporal (g) no D60	220.3 ± 7.0	<b>274.0 ± 13.5<sup>a</sup></b>	<b>266.8 ± 8.5<sup>a</sup></b>
E2 (pg/mL)	17.2 ± 3.1	< DL	< DL
Glicemia (mg/dL)	66.0 ± 18.6	86.2 ± 12.7	81.0 ± 16.9
Triglicéridos (mg/dL)	30.8 ± 3.3	34.2 ± 5.3	36.8 ± 4.6
Colesterol (mg/dL)	84.4 ± 4.7	97.0 ± 5.9	97.6 ± 6.8
HDL (mg/dL)	39.8 ± 3.0	45.6 ± 3.5	44.2 ± 1.3
LDL (mg/dL)	38.6 ± 3.9	49.6 ± 7.8	46.4 ± 4.9
Calcemia (mg/dL)	10.3 ± 0.2	<b>9.7 ± 0.1<sup>a</sup></b>	10.0 ± 0.1
Urine vol. (ml/12h)	3.9 ± 0.7	4.3 ± 0.5	5.9 ± 0.9
Calciúria (mg/dl)	31.5 ± 5.8	<b>65.3 ± 4.2<sup>a</sup></b>	56.3 ± 11.4
Calciúria / Calcemia	3.0 ± 0.5	<b>6.7 ± 0.5<sup>aa</sup></b>	5.7 ± 1.2
CTX (ng/mL)	9.1 ± 0.8	<b>16.3 ± 2.3<sup>a</sup></b>	<b>16.0 ± 1.5<sup>a</sup></b>
PINP (ng/mL)	14.6 ± 1.2	<b>21.4 ± 0.6<sup>a</sup></b>	<b>22.4 ± 2.1<sup>a</sup></b>
PINP/CTX		1.6 ± 0.0	1.3 ± 0.2

Grupos de animais estudados: Controlo saudável (sham), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado-suplementado (OVX+S). Resultado médio ± erro padrão; n=5/grupo; a p<0.05, aa p<0.01 comparativamente ao controlo; DL – Limite de deteção = 11.8 pg/mL



**Tabela 2.** Características dos ossos femorais dos grupos de animais estudados

	Sham	OVX	OVX+S
Teor de Cálcio Femoral (%)	14.2 ± 1.1	11.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	12.2 ± 0.6
Diâmetro Femoral / Peso corporal (mm/g)	0.0128 ± 0.0011	0.0092 ± 0.0005 <sup>aa</sup>	0.0101 ± 0.0006
Massa Femoral / Peso corporal	0.0027 ± 0.0001	0.0026 ± 0.0001	0.0027 ± 0.0001
Tensão de Cedência (MPa)	190.7 ± 15.1	176.7 ± 4.2	183.6 ± 7.9
Tensão Máxima de Fratura (MPa)	269.1 ± 19.3	219.3 ± 6.4	263.8 ± 10.5 <sup>b</sup>
Módulo Elástico (GPa)	14.8 ± 1.5	11.9 ± 0.3	14.5 ± 0.5 <sup>bb</sup>

Grupos de animais estudados: Controlo saudável (sham), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado-suplementado (OVX+S). Resultado médio ± erro padrão; n=5/grupo; a p<0.05, aa p<0.01 comparativamente ao controlo; DL – Limite de deteção = 11.8 pg/mL

### Propriedades mecânicas dos ossos fémur

As curvas de tensão-extensão obtidas nos testes biomecânicos de flexão em 3 pontos, exemplificada na Fig. 1, foram utilizadas para calcular os parâmetros que caracterizam as propriedades biomecânicas do osso fémur (Tabela 2), nomeadamente tensão de cedência (Yield stress), tensão máxima de fratura (ultimate stress) e rigidez traduzida pelo módulo elástico (Young's modulus). Os fémures dos animais ovariectomizados mostraram uma tendência para valores menores das propriedades biomecânicas avaliadas comparativamente às dos fémures dos animais saudáveis. Os fémures dos animais ovariectomizados-suplementados apresentam propriedades mecânicas significativamente superiores comparativamente às dos fémures

dos animais ovariectomizados não-suplementados, nomeadamente: módulo elástico refletindo maior rigidez (p<0.05); e tensão máxima de fratura (p<0.05) refletindo maior resistência máxima do osso à fratura; a força/resistência mecânica avaliada pela tensão de cedência também aumentou, mas não significativamente.

### Avaliação histológica

A necropsia não revelou quaisquer sinais em todos os grupos de animais estudados e a análise da massa normalizada do coração e aorta revelou ausência de diferenças significativas entre os grupos estudados: animais saudáveis (4.8±0.5), ovariectomizados suplementados (4.3±0.1) e não suplementados (4.2±0.3). Os exames histológicos de secções da croça da aorta mostram a

preservação deste tecido, sem alterações histológicas e ausência de depósitos de cálcio, revelado por coloração de VonKossa (Fig. 2), em qualquer uma das 3 preparações observadas para cada grupo de animais estudado.

## DISCUSSÃO

A ovariectomia efetuada no rato, acompanhada da consequente diminuição dos níveis séricos de estrogénios simula a deficiência em estrogénios que se verifica na pós-

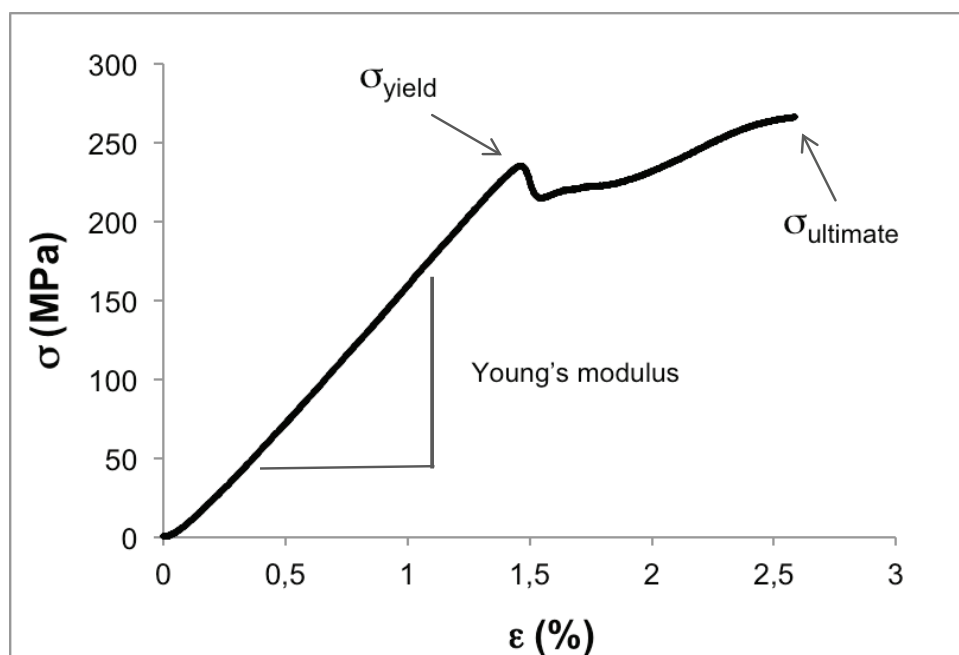


Fig.1 Curva de tensão-extensão do fêmur de um animal saudável; Parâmetros biomecânicos

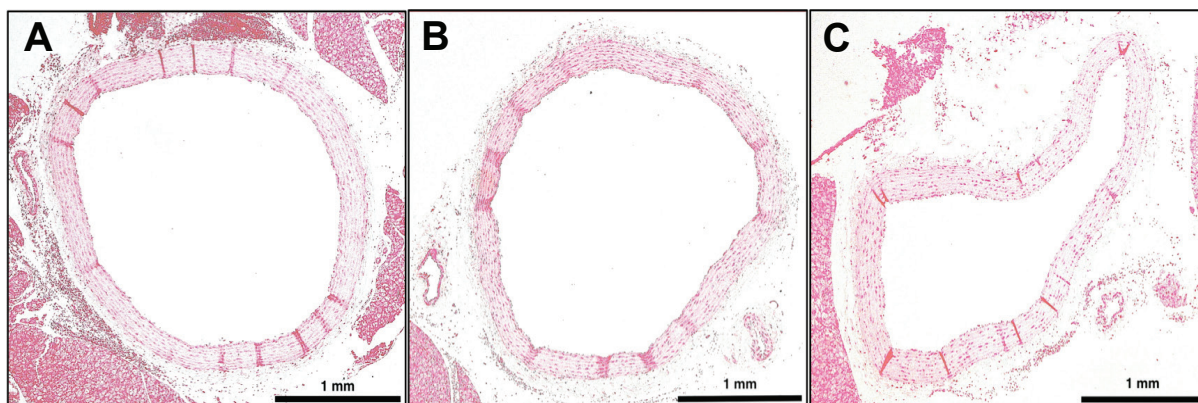


Fig.2 Cortes croça da aorta, coloração VonKossa (40x). A: Sham; B: animal OVX; C: animal OVX suplementado

menopausa na mulher. Sendo esta a principal causa da rápida perda de massa óssea e de aumento da fragilidade do osso que conduz à osteoporose pós-menopáusicas, a ovariectomia tem sido o modelo animal mais utilizado, para estudar esta patologia e o efeito de fármacos na sua terapêutica.

Vários estudos apontam para o efeito dos estrogénios sobre a absorção intestinal de cálcio. A sua administração aumenta a absorção de cálcio na mulher na pós-menopausa<sup>30,31</sup> e no rato<sup>32</sup>, contudo, o efeito da diminuição dos estrogénios na absorção intestinal de cálcio, no rato, não é coincidente nos vários estudos efetuados<sup>33,34</sup>. Alguns desses estudos indicam uma diminuição da sua absorção<sup>35,36</sup> que parece não depender dos níveis da 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sup>31</sup>.

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

O aumento do cálcio sérico bem como do teor em cálcio do osso femoral nos animais ovariectomizados suplementados, veio comprovar que o cálcio da concha-de-ostra na presença da goma Guar é absorvido no intestino e promove uma eficaz mineralização óssea. A biodisponibilidade do cálcio (0.9 g) da

concha-de-ostra já anteriormente tinha sido verificado na mulher e no rato com deficiência estrogénica<sup>22,23</sup> através da avaliação da densidade mineral óssea e da resistência máxima à fratura do fémur, embora para mais do dobro da dose equivalente humana agora utilizada. Estudos em animais comprovaram também que a biodisponibilidade do cálcio melhora com a associação à goma Guar, mesmo em condições adversas à sua absorção<sup>24</sup>.

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

A diminuição do incremento do

peso corporal observada nos animais ovariectomizados suplementados (22%) comparativamente ao grupo ovariectomizado não suplementado (33%), foi outro efeito benéfico observado neste estudo. Num estudo preliminar (dados não publicados) a suplementação de animais saudáveis não alterou a quantidade de ração e de água ingerida relativamente ao grupo controlo, o que sugere que o menor incremento de massa corporal observada no grupo suplementado poderá ser atribuído à goma Guar, mas mais estudos serão necessários para esclarecer o efeito do suplemento na massa corporal. Não foram, contudo, observados os efeitos benéficos descritos para a goma Guar, nos níveis de colesterol e triglicéridos<sup>37</sup>. Este facto pode ser explicado pela inexistência de dislipidemia nos animais estudados e pela baixa dose de goma Guar utilizada no presente estudo.

A dose de suplemento de cálcio de concha-de-ostra diariamente administrada 43.6 mg/kg corresponde a uma dose humana equivalente de 7.0 mg/kg/dia<sup>38</sup>. Esta dose de suplemento pretendeu simular uma dose moderadamente baixa de suplemento de cálcio (420 mg/dia), um quinto da dose máxima diária recomendada na mulher pós-menopausa (2000 mg/dia) e um terço da dose superior geralmente utilizada em suplementação (1200 mg/dia). A maioria da população não ingere diariamente na dieta quantidades de cálcio acima dos limites recomendados; a ingestão em excesso provem na maioria dos casos do recurso a suplementos de cálcio. O recurso a suplementos de cálcio é comum na população idosa dos países desenvolvidos, principalmente na

mulher pós-menopausa, contudo alguns estudos têm mostrado que, tanto nos EUA como na Europa, esta população, por vezes, ingere quantidades de cálcio acima dos limites máximos recomendados principalmente por ingestão de doses de suplementos inadequadas à dieta de cada indivíduo<sup>10,21</sup>. As dificuldades de ajuste de dose são acrescidas não só por ocorrer diminuição de absorção de cálcio mas também pela terapêutica, frequente nestas idades, com fármacos que comprometem a biodisponibilidade do cálcio como por exemplo corticosteroides, inibidores da bomba de prótons<sup>13,14</sup>. Revisões sistemáticas têm mostrado que nos adultos o excesso de cálcio obtido através de suplementos e não da dieta, para além de causar obstipação e transtornos gastrointestinais por vezes graves, aumenta o risco de litíase renal e de acidentes cardiovasculares<sup>10,20</sup>. A necropsia e as análises histopatológicas efetuadas no presente estudo, comprovam a segurança da formulação e da dose de cálcio utilizada já que não foram observados quaisquer sinais de toxicidade nem alterações histológicas ou depósitos vasculares de cálcio.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Cintramédica, Laboratório de análises clínicas, Sintra, Portugal pela assistência nas análises de biomarcadores. Esta investigação foi parcialmente suportada pela bolsa UID/EMS/50022/2013 financiada pela “Fundação para a Ciência e a Tecnologia”—FCT.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Nieves JW. Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am J Clin Nutr.*



2005;81:1232S-1239S

2.Kanis JA, on behalf of the World Health Organization Scientific Group Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. Technical report University of Sheffield, UK: WHO Collaborating Centre; 2007

3.Melton LJ III, Atkinson EJ, O'connor MK, O'fallon WM, Riggs BL. Bone Density and Fracture Risk in Men. *J. Bone Miner Res.* 1998;13:1915-1923

4.Melton LJ III, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL. Perspective: How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res.* 1992;7:1005-1010.

5.Kanis JA, Johnell O, Oden A, Sembo I, Redlund-Johnell I, Dawson A, et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmo. *Osteoporos Int.* 2000;11:669-74.

6.Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos* 2013;8:136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1

7.Rodrigues AM, Gouveia N, Costa LP, Eusébio M, Ramiro S, Machado P, et al. on behalf of the EpiReumaPtstudy group. EpiReumaPt – the study of Rheumatic and Musculoskeletal diseases in Portugal: a detailed view of the methodology. *ActaReumatolPort.* 2015;40:110-124

8.Branco JC, Felicíssimo P, Monteiro J. A epidemiologia e o impacto sócio-económico das fraturas da extremidade

proximal do fémur, uma reflexão sobre o padrão atual de tratamento da osteoporose grave. *ActaReumatolPort.* 2009;34: 475-85

9.Circular Informativa da Direcção-Geral da Saúde - Orientação técnica sobre suplemento de Cálcio e Vitamina D em pessoas idosas. Nº: 13/DSCS/DPCD/DSQC, Abril de 2008.

10.Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press, 2010.

11. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for calcium. *EFSA J.* 2015;13:4101, 82 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4101

12.Tavares V, Canhão H, Gomes JAM, Simões E, Romeu JC, Coelho P et al. Recomendações para o diagnóstico e terapêutica da osteoporose. *ActaReumatolPort.* 2007;32:49-59

13.Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Use of Oral Corticosteroids and Risk of Fractures. *J Bone Miner Res.* 2000;15:993-1000. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.6.993

14. Zhou B, Huang Y, Li H, Sun W, Liu J. Proton-pump inhibitors and risk of fractures: an update meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2015; DOI 10.1007/s00198-015-3365-x

15. Smith E, Need AG, Schultz CG, Horowitz. M. Does the response of bone mass to calcium supplements depend on calcium absorption efficiency? *Eur*



J Endocrinol. 2004;151:759–763 doi: 10.1530/eje.0.1510759

16. Prentice RL, Pettinger MB, Jackson RD, Wactawski-Wende J, LaCroix AZ, Anderson GL, et al. Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women’s Health Initiative clinical trial and cohort study. *Osteoporos Int.* 2013;24:567–580. DOI 10.1007/s00198-012-2224-2

17. Bolland MJ, Avenell A, Baron JA, Grey A, MacLennan GS, Gamble GD, et al. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. *BMJ* 2010;341:c3691 doi:10.1136/bmj.c3691

18. Bolland MJ, Grey A, Avenell A, Gamble GD, Reid IR. Calcium supplements with or without vitamin D and risk of cardiovascular events: reanalysis of the Women’s Health Initiative limited access dataset and meta-analysis. *BMJ* 2011;342:d2040 doi:10.1136/bmj.d2040

19. Bolland MJ, Grey A, Reid IR. Calcium supplements and cardiovascular risk: 5 years on. *Ther Adv Drug Saf.* 2013;4:199–210 DOI: 10.1177/ 2042098613499790

20. Bolland MJ, Leung W, Tai V, Bastin S, Gamble GD, Grey A, et al. Calcium intake and risk of fracture: systematic review. *BMJ* 2015;351:h4580doi: 10.1136/bmj.h4580

21. Sanf elix-Gimeno G, Sanf elix-Genov es J, Rodr iguez-Bernal CL, Peir  S, Hurtado I. Prevalence, Determinants, and Inappropriateness of Calcium Supplementation Among Men and Women in a Spanish Mediterranean Area: Cross-Sectional Data From the ESOSVAL Cohort. *J Bone Miner Res.*

2013;28:2286–2294. DOI: 10.1002/jbmr.1977

22. Fujita T, Fujii Y, Kitagawa R, Fukase M. Calcium supplementation in Osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 1993;3:159-162.

23. Omi N, Ezawa I. The Effect of “AA Ca (Active Absorbable Calcium)” on Bone Metabolism of Ovariectomized Rats. *J. Bone Miner Met.* 1993;11:S33-S40

24. Hara H, Suzuki T, Kasai T, Aoyama Y, Ohta A. Ingestion of Guar Gum Hydrolysate, a soluble fiber, increases calcium absorption in totallygastrectomized rats. *J Nut.* 1999;129:39-45

25. Bancroft’s Theory and Practice of Histological Techniques - John D. Bancroft, Marilyn Gamble, 2012

26. Vandecasteele C, Block CB. Modern Methods for Trace Element Determination, John Wiley & Sons (1993) Chichester, Reino Unido, 330 p.

27. Peters J, Combs S, Hoskins B, Jarman J, Kovar J, Watson M, Wolf A, Wolf N. Recommended Methods of Manure Analysis (A3769), University of Wiscosin – Madison, I-2/2003

28. Caetano-Lopes J, Nery AM, Henriques R, Canh o H, Duarte J, Amaral PM, et al. Chronic arthritis directly induces quantitative and qualitative bone disturbances leading to compromised biomechanical properties. *ClinExpRheumatol.* 2009;27:475-482.

29. Caetano-Lopes J, Nery AM, Canh o H, Duarte J, Casc o R, Rodrigues A, et al. Chronic arthritis leads to disturbances in the bone collagen network. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R9. doi: 10.1186/ar2908

30. Gallagher JC, Riggs BL, DeLuca HF. Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:1359-1364
31. Gennari C, Agnusdei D, Nardi P, Civitelli R. Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in oophorectomized women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;71:1288-1293
32. Arjmandi BH, Hollis BW, Kalu DN. In vivo effect of 17  $\beta$ -estradiol on intestinal calcium absorption in rats. *Bone Miner.* 1994;26:181-189
33. Thomas ML, Hope WG, Ibarra MJ. The relationship between long bone growth rate and duodenal calcium transport in female rats. *J Bone Miner Res.* 1988;3:503-507
34. Lindgren U, DeLuca HF. Role of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the development of osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1982;34:510-514
35. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 1989;124:7-16
36. Akao M, Abe R, Sato N, Hasegawa-Tanigome A, Kumagai H, Kumagai H. Prevention of osteoporosis by oral administration of phytate-removed and deamidated soybean  $\beta$ -conglycinin. *Int J Mol Sci.* 2015;16:2117-2129 doi:10.3390/ijms16012117
37. Behall KM. Effect of soluble fibers on plasma lipids, glucose tolerance and mineral balance. *Adv Exp Med Biol.* 1990;270:7-16.
38. U.S. Department of Health and Human Services Food, Drug Administration Center for Drug Evaluation, Research (CDER), Guidance for industry; estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, *Pharmacology and Toxicology* (2005), <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default>.