



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**Efeito da suplementação alimentar com hidrolisado de colágeno nos  
marcadores bioquímicos e nas características composicionais,  
biomecânicas e histológicas ósseas de ratas osteopênicas**

Elisa de Almeida Jackix

Mestranda

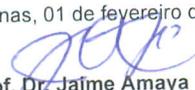
Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

Orientador

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por **Elisa de Almeida Jackix** aprovado pela Comissão Julgadora em 01 de fevereiro de 2008.

Campinas, 01 de fevereiro de 2008

  
Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán  
Presidente da Banca

Departamento de Alimentos e Nutrição - DEPAN

Campinas – SP

2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

**Efeito da suplementação alimentar com hidrolisado de colágeno nos  
marcadores bioquímicos e nas características composicionais,  
biomecânicas e histológicas ósseas de ratas osteopênicas**

Elisa de Almeida Jackix

Mestranda

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán

Orientador

Dissertação apresentada a Faculdade de  
Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de mestre em  
Alimentos e Nutrição

Campinas - SP  
2008

UNIDADE FEA  
Nº CHAMADA  
UNICAMP J129e  
V. EX  
TOMBO BC DL 76640  
PROC 16P-129-08  
C D X  
PREÇO 4,00  
DATA 01-05-08  
BIB-ID 433632  
7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

J129e Jackix, Elisa de Almeida  
Efeito da suplementação alimentar com hidrolisado de colágeno nos marcadores bioquímicos e nas características composicionais, biomecânicas e histológicas ósseas de ratas osteopênicas / Elisa de Almeida Jackix. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.  
  
Orientador: Jaime Amaya-Farfán  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
  
1. Colágeno. 2. Hidrolisados protéicos. 3. Osteoporose. 4. Ovariectomia. I. Amaya-Farfán, Jaime. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em ingles: Effects of consumption of collagen hydrolyzate as food supplement on the biochemical markets and on the compositional, biodynamic and histological characteristics of the bone of osteopenic rats

Palavras-chave em inglês (Keywords): Collagen, Protein hydrolyzate, Osteoporosis, Ovariectomy.

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentação e Nutrição

Banca examinadora: Jaime Amaya-Farfán

Célio Kenji Miyasaka

Semíramis Martins Álvares Domene

Lúcia Helena Simões da Costa Paiva

Data de defesa: 22-01-2008

Programa de Pós-Graduação: Programa em Alimentação e Nutrição

## BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP  
Orientador

---

Prof. Dr. Célio Kenji Miyasaka  
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP  
Membro



---

Profª. Drª. Semíramis Martins Álvares Domene  
Pontifícia Universidade Católica de Campinas - PUC  
Membro



---

Profª. Drª. Lúcia Helena Simões da Costa Paiva  
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por toda paciência, apoio e incentivo durante o decorrer deste trabalho e, em especial à Camila, pela ajuda durante o projeto. Aos meus pais pelo amor e por toda a formação dada até minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este mestrado.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente o departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade profissional.

À empresa Gelita South América pela colaboração com este projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, coordenado pelo prof. Dr. Jaime Amaya-Farfán.

Ao professor Dr. Jaime Farfán pela orientação, paciência, ensinamentos e carinho em todos os momentos.

Aos colegas do Instituto de Biologia, do Departamento de histologia, em especial o Prof.

Dr. Áureo Tatsumi Yamada, por disponibilizar o laboratório para execução das lâminas histológicas, e ao Juvani, pela ajuda, amizade, paciência e ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Ana Cláudia, Éder, Carla, Cinthia, Elisvânia, Maria Inês, Pablo, Telma e, especialmente, às “supers”, Adriana, Giovana, Helena, Lílian e Mônica, pelos ensinamentos, companheirismo e amizade durante todo o projeto.

Aos colegas da PUC-CAMPINAS: querida professora e amiga Dr<sup>a</sup>. Semíramis Domene, da PUC-CAMPINAS, por toda ajuda, carinho e incentivo. À Marlene pela amizade, respeito e companheirismo. Ao Juvenal pelos ensinamentos ajuda durante o projeto. Sem vocês não estaria aqui hoje.

Às queridas amigas Juliana e Iza, pela paciência, ajuda e amor.

À todos da Secretaria de Pós-graduação e do Departamento de Alimentos e Nutrição.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Meus sinceros agradecimentos*

**Elisa**

# ÍNDICE

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE FIGURAS

1. Introdução geral.....	1
1.1. Referências bibliográficas.....	4
2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1. O osso.....	5
2.2. Remodelação óssea.....	6
2.3. Pico de massa óssea.....	9
2.4. Perda de massa óssea.....	10
2.5. Osteoporose.....	11
2.5.1. Definição.....	11
2.5.2. Epidemiologia e aspectos sócio-econômicos.....	12
2.5.3. Diagnóstico.....	13
2.5.4. Tratamento.....	17
2.5.5. Modelo experimental de osteoporose.....	18
2.6. Colágeno.....	19
2.7. Hidrolisado de colágeno.....	22
2.8. Referências bibliográficas.....	29
3. Objetivos.....	37
3.1. Objetivo geral.....	38

3.2. Objetivos específicos.....	38
4. Artigo 1.....	39
4.1. Resumo.....	40
4.2. Summary.....	41
4.3. Introdução.....	42
4.4. Material e métodos.....	44
4.4.1. Animais.....	44
4.4.2. Dietas.....	45
4.4.3. Composição química dos fêmures e vértebras.....	46
4.4.4. Parâmetros físicos dos fêmures e vértebras.....	46
4.4.5. Parâmetros biomecânicos.....	46
4.4.6. Análise histológica do tecido ósseo.....	47
4.4.7. Marcadores bioquímicos de formação óssea.....	47
4.4.8. Tratamento estatístico dos dados.....	48
4.5. Resultados e discussão.....	48
4.6. Conclusão.....	64
4.7. Referências bibliográficas.....	65
Anexos.....	
Anexo 1.....	69
Anexo 2.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo dietético.....	46
Tabela 2: Valores médios de peso (g) e erro padrão (fêmures e vértebras) dos diferentes grupos, obtidos após 8 semanas de suplementação.....	52
Tabela 3: Valores médios e erro padrão de osteocalcina sérica (ng/mL), analisados após 8 semanas de suplementação.....	55
Tabela 4: Valores médios e erro padrão do conteúdo mineral ósseo de fêmures.....	58
Tabela 5: Valores médios e erro padrão do conteúdo mineral ósseo de vértebras.....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figuras da revisão bibliográfica:

Figura 1: Citocinas envolvidas na regulação da função dos osteoclastos.....8

Figura 2: Biosíntese de colágeno tipo I.....21

Figuras do artigo 1:

Figura 1: Evolução ponderal das ratas dos diferentes grupos experimentais registrada durante as 11 semanas após ovariectomia.....49

Figura 2: Valores médios e erro padrão dos teores protéicos das vértebras, obtidos após 8 semanas de suplementação, nos diferentes grupos.....50

Figura 3: Carga máxima para vértebras (valores médios e erro padrão), obtida por meio do ensaio de compressão, após 8 semanas de suplementação, nos diferentes grupos.....53

Figura 4: Valores de Fosfatase Alcalina Total (FAT) e Óssea (FAO) (valores médios e erro padrão, obtidos após 8 semanas de suplementação, nos diferentes grupos.....57

Figura 5: Microscopia da epífise de fêmur de ratas ovariectomizadas que receberam dieta suplementada com gelatina.....61

Figura 6: Microscopia da epífise de fêmur de ratas ovariectomizadas que receberam dieta suplementada com hidrolisado de colágeno.....61

Figura 7: Microscopia da vértebra de ratas ovariectomizadas que receberam dieta suplementada com gelatina.....62

Figura 8: Microscopia da epífise de fêmur de ratas ovariectomizadas que receberam dieta suplementada com hidrolisado de colágeno.....62

# **INTRODUÇÃO GERAL**

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

O sistema ósseo desempenha diversas funções além da proteção de órgãos internos e sustentação do corpo, apresentando bioquímica e metabolismo bastante complexos. O colágeno, além de outras proteínas não-colagenosas e células, constituem a porção orgânica do osso; os minerais cálcio, fósforo, magnésio e flúor perfazem cerca de 65% do peso do osso e constituem a porção inorgânica do tecido ósseo (FARFÁN, 1994).

O osso é um órgão metabolicamente ativo que sofre um processo contínuo de remodelação, caracterizado por formação e reabsorção óssea. Em condições normais a taxa de reabsorção é semelhante à taxa de formação óssea. O balanço entre estes dois processos é regulado por meio da ação de hormônios (estrogênio, vitamina D e hormônios esteróides) e mediadores locais (como por exemplo, as citocinas). A idade, gênero, presença de doenças metabólicas, consumo de alguns medicamentos, entre muitos outros, são fatores que podem causar um desbalanço no processo de remodelação óssea, resultando em alterações na estrutura, resistência e massa óssea (SEIBEL, 2005).

A redução da massa óssea é um fenômeno fisiológico natural e não patológico, mas se constitui no substrato para o desenvolvimento da osteoporose. A osteoporose e a osteopenia são diferentes estágios de doença do sistema ósseo que resultam maior fragilidade do osso e consequente aumento da susceptibilidade à fraturas (WHO, 2003). Na mulher menopausada, a perda óssea está associada à redução nos níveis do hormônio estrógeno, o qual age sobre receptores localizados nas células ósseas.

No Brasil e no mundo, a incidência de osteopenia e osteoporose vêm aumentando, acompanhando a maior expectativa de vida populacional.

A alimentação e em particular alguns nutrientes como os minerais cálcio e magnésio, possuem estreita relação com a saúde óssea. Recentemente, porém, hidrolisados protéicos têm sido utilizados com finalidades clínica e nutricional, como também para melhoria de propriedades funcionais de proteínas e alimentos de base protéica (PACHECO, 2005).

O colágeno é a principal proteína dos ossos sendo que as fibras de colágeno ainda são parcialmente responsáveis pelas propriedades biomecânicas do osso e também, por dar suporte aos músculos e à pele. Os hidrolisados enzimáticos de colágeno (HC) são produtos obtidos industrialmente a partir da hidrólise da gelatina e têm recebido atenção pelas suas possíveis propriedades no tratamento de doenças osteoarticulares (OASSER, 1999).

## **1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

FARFÁN, J.A. Fatores nutricionais que influem na formação e manutenção do osso. **Rev. Nutrição Puccamp**. Campinas, v. 7, n. 2, p. 148-172, jul./dez. 1994.

OESSER, S. et al. Oral administration of <sup>14</sup>C-labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). **Journal of Nutrition**. Eberbach, v. 129, p. 1891-95, mar. 1999.

PACHECO, M.T.B. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, v. 25, n. 2, p. 333-8, abr./jun. 2005.

SEIBEL, M.J. Biochemical markers of bone turnover part I: Biochemistry and variability. **Clin Biochem Rev**. Sydney, v. 26, p. 97-105, nov. 2005.

WHO (World Health Organization). **Prevention and Management of Osteoporosis. Report of a WHO Scientific Group**. WHO Technical Report Series. Geneva. 2003. 201 p.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. O osso**

O osso é um tecido extremamente ativo e apresenta metabolismo bastante complexo por desempenhar diversas funções no organismo como a proteção aos órgãos internos, fornecimento de apoio estrutural e físico aos tendões e músculos, além de atuar como reservatório de íons<sup>1,2</sup>. Consiste de uma matriz orgânica (células e matriz) e inorgânica (minerais)<sup>3</sup>. O componente inorgânico é constituído principalmente por cristais de hidroxiapatita (depositado inicialmente na matriz orgânica como sais de fosfato e cálcio), além de outros minerais como o magnésio, flúor, potássio e sódio. A matriz orgânica é composta por colágeno tipo I, que compreende cerca de 98% dessa fase, outras proteínas não colágenas, como os proteoglicanos, osteocalcina e integrinas, e células<sup>1,4</sup>. Água e lipídeos perfazem 5-8% da matriz óssea. Existem dois tipos celulares principais, os osteoblastos e os osteoclastos<sup>5</sup>. Os osteoblastos são as células que sintetizam a porção orgânica da matriz óssea responsáveis, portanto, pela formação do osso; já os osteoclastos secretam algumas enzimas e ácidos (H+) que destroem a matriz e liberam o cálcio<sup>6</sup>.

Cerca de 80% do esqueleto é constituído de tecido cortical (ou compacto) e 20%, tecido trabecular (ou esponjoso). Com a idade, ocorre uma redução da massa óssea, que é diferente para o osso trabecular e cortical<sup>7</sup>. Isso ocorre, pois o tecido trabecular está mais exposto aos fluidos circulantes, além de possuir maior número de células ósseas, sendo por isso, mais responsivo ao estrógeno, ou à falta dele<sup>8,9</sup>. O osso trabecular está presente principalmente nas vértebras, crânio, pélvis e epífise de ossos longos; já o osso cortical é predominante na porção medial de ossos longos<sup>10</sup>.

## 2.2. Remodelação óssea

O osso sofre de forma contínua o processo de remodelação<sup>11</sup>, que compreende na deposição e reabsorção de material na estrutura óssea, em taxas relativamente baixas. No caso de haver metabolismo positivo do osso, a constante de deposição ( $k_1$ ) estará aumentada, com relação à constante de reabsorção ( $k_2$ ), resultando em deposição líquida de componentes no estado sólido<sup>4</sup>. Sob condições normais, a quantidade de material reabsorvido é igual à quantidade de osso formado<sup>11</sup>.

O processo de remodelação ocorre normalmente de forma localizada, em focos chamados de unidades multicelulares básicas de remodelação<sup>2</sup>, com ciclos estimados de 8 a 12 semanas, em humanos. É por essa razão que o fornecimento adequado de nutrientes pode ter um papel importante no processo de formação e reabsorção de massa óssea ao longo da vida<sup>4</sup>.

O ciclo de remodelação óssea parece ser regulado por diferentes fatores, incluindo diversas citocinas e hormônios. O primeiro estágio da remodelação envolve o recrutamento de precursores de osteoclastos: IL-1 (interleucina-1), IL-6 (interleucina-6) e monócitos, os quais estão presentes nos tecidos hematopoiéticos como a medula óssea, e respondem a sinais físicos e hormonais. Estes fatores aumentam a reabsorção óssea e são regulados por diversos hormônios, incluindo o estrogênio<sup>12</sup>.

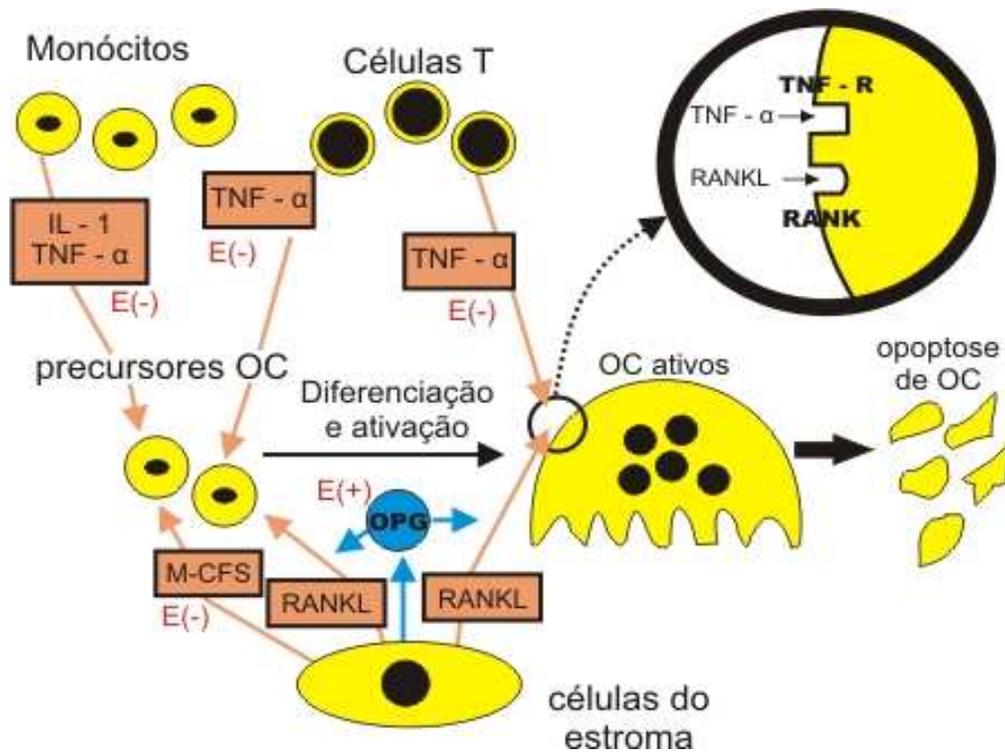
Nas mulheres pós-menopausadas, a probabilidade de desenvolver osteoporose é maior pelo fato de que a redução nos níveis séricos de estrógeno pode resultar em aumento do *turnover* ósseo, ou seja, ocorre um aumento da atividade de remodelação óssea, com a reabsorção excedendo a formação. Desta forma, a falta de estrógeno gera um aumento na diferenciação e atividade osteoclástica, que resulta em redução de massa óssea<sup>4</sup>.

A diferenciação osteoclástica é um fenômeno bastante complexo e inicia-se pela ativação de monócitos à osteoclastos maduros. As células estromais também contribuem para a osteoclastogênese por meio da produção de citocinas que estimulam a proliferação e/ou diferenciação de precursores hematopoiéticos dos osteoclastos<sup>13</sup>.

Os monócitos atingem o osso através da circulação sanguínea e se diferenciam em osteoclastos por meio da fusão com outras células<sup>14</sup>. Após aderir a matriz óssea, os osteoclastos solubilizam os cristais de hidroxiapatita, por meio da acidificação do meio extracelular, e degradam a matriz orgânica através de enzimas (colagenases e hidrolases), resultando em perda óssea<sup>12, 15</sup>.

Para ocorrer a diferenciação dos osteoclastos é necessário a interação com osteoblastos (Figura 1). Os receptores RANK e M-CSF (*fator estimulador de colônia de macrófago*) presentes na membrana dos monócitos, são essenciais para a diferenciação em osteoclastos. O M-CSF é necessário para a sobrevivência e proliferação dos precursores de osteoclastos. O RANKL é um ligante encontrado na superfície dos osteoblastos, que se liga ao receptor RANK dos osteoclastos estabelecendo um contato osteoblastos-osteoclastos. Após o desacoplamento entre RANK-RANKL ocorre a maturação dos osteoclastos que, neste momento, poderão degradar os componentes minerais e orgânicos da matriz óssea, por meio da secreção de enzimas e ácido. Em resposta aos sinais de RANKL, a diferenciação e atividade dos osteoclastos aumenta, e a apoptose osteoclástica diminui, resultando em maior reabsorção óssea. As células “T” da medula óssea também parecem ativar a reabsorção óssea, por meio de citocinas TNF- $\alpha$ <sup>2,12, 14,16, 17</sup>.

Os osteoblastos também secretam a osteoprotegerina (OPG), que pode se ligar ao RANKL ou ao RANK, agindo como uma citocina antiosteoclastogênica. O estrogênio aumenta a secreção de OPG, e reduz a atividade de M-CSF e RANK através da ativação de citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>12,16</sup>. O estrogênio é o principal hormônio associado ao metabolismo ósseo, sendo que a redução nos níveis deste hormônio pode causar aumento no número e atividade de osteoclastos, além de redução da apoptose osteoclastica.



**Figura 1.** Adaptado de RIGGS, 2000<sup>12</sup>. OC: osteoclasto; OPG: osteoprotegerina.

Citocinas envolvidas na regulação da função dos osteoclastos. Fatores estimulatórios da atividade osteoclastica estão demonstrados na cor laranja e fatores inibitórios, em azul. Efeitos positivos (+) ou negativos (-) do estrogênio sobre os fatores regulatórios estão na cor vermelha. O círculo maior mostra que o TNF- $\alpha$  e o RANKL agem sobre diferentes receptores, mas ambos ativam sinais intracelulares que irão desencadear na diferenciação dos osteoclastos, e conseqüentemente na reabsorção óssea.

### **2.3. Pico de massa óssea**

Na infância e adolescência a formação óssea é dominante, ocorrendo aumento do comprimento ósseo, que termina quando o pico de massa óssea é atingido, por volta das primeiras duas ou três décadas de vida<sup>15,18</sup>. O aumento do conteúdo e da densidade mineral óssea são as mudanças mais marcantes observadas entre os adolescentes, de ambos os sexos<sup>19</sup>. Quanto maior a quantidade de massa óssea que se atingir até a maturidade, maior é o pico de massa óssea e o risco de fraturas na idade adulta torna-se reduzido.

O fator genético explica aproximadamente 70% do pico de massa óssea obtido por um indivíduo<sup>20</sup>, embora existam outros fatores que influenciam no desenvolvimento da massa óssea. Do ponto de vista nutricional, o cálcio parece ser o nutriente mais importante associado ao pico de massa óssea<sup>21</sup>. No entanto, diversos estudos já evidenciaram a importância de outros nutrientes e alimentos sobre a manutenção da massa óssea, como o potássio, magnésio, vitamina K, vitamina C, frutas, vegetais, gorduras e proteínas, além do aporte energético<sup>9</sup>.

A prática de exercícios físicos, o status hormonal, consumo excessivo de álcool, tabagismo, além do uso de alguns medicamentos (principalmente corticóides), também influenciam no pico de massa óssea<sup>4</sup>. Isto explica porque mulheres menopausadas diferem tanto nos graus de perda da massa óssea.

Indivíduos que atingem um baixo pico de massa óssea na juventude têm maior risco de desenvolver osteoporose ao longo da vida<sup>7</sup>.

#### 2.4. Perda de massa óssea

A perda de massa óssea na mulher, antes da menopausa, provavelmente é semelhante à observada nos homens. Após os 20 anos de idade, nos homens, a reabsorção torna-se mais predominante e o conteúdo mineral reduz em 4% por década. Já nas mulheres menopausadas, ocorre um declínio da massa óssea de aproximadamente 15% por década<sup>18</sup>. Isso ocorre basicamente em função do aumento do *turnover* ósseo, promovido pela deficiência estrogênica, superposta à perda óssea associada à idade.

Existem algumas distinções entre a osteoporose causada pela idade, e aquela causada pela deficiência de estrógeno. Com a idade, tanto nos homens quanto nas mulheres, o volume de tecido ósseo é reduzido devido, principalmente, à redução no número e atividade de osteoblastos, o que resulta na diminuição da espessura de trabéculas ósseas. No entanto, a redução nos níveis séricos de estrógeno (que ocorre nas mulheres após a menopausa) resulta em aumento da atividade de remodelação óssea, com a reabsorção excedendo a formação<sup>22</sup>.

O resultado do desbalanço entre a formação e reabsorção óssea são geralmente mudanças na estrutura, resistência e no conteúdo mineral do osso<sup>11</sup>. Assim sendo, a deficiência de estrogênio amplifica o processo de perda óssea relativo ao envelhecimento natural, explicando a maior incidência de fraturas nas mulheres idosas do que nos homens da mesma idade<sup>23</sup>.

Já é bem estabelecido que o estrogênio pode regular o processo de remodelação óssea por meio de efeitos sobre o sistema imune e células ósseas<sup>17</sup>. Já foi identificada a presença de receptores de estrógeno nos osteoblastos<sup>24</sup> e em células do estroma da medula óssea<sup>25</sup>. Desta forma, a queda dos níveis séricos de estrogênio parece induzir a um aumento

da secreção de fatores que estimulam a atividade osteoclástica de forma indireta (por meio dos osteoblastos) levando a perda de massa óssea; o tratamento com este hormônio parece inibir a estimulação destes fatores.

## **2.5. Osteoporose**

### **2.5.1. Definição**

A redução da massa óssea com a idade é um processo natural, não patológico, mas se constitui no substrato para o desenvolvimento da osteoporose<sup>7</sup>. Geralmente, o tecido ósseo na osteoporose apresenta um conteúdo mineral diferente de indivíduos saudáveis<sup>26</sup>; além disso, o osso torna-se mais fino e frágil, mais propenso ao desenvolvimento de fraturas<sup>16</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a osteoporose e a osteopenia são estágios diferentes de doença do sistema ósseo, caracterizadas por redução da massa óssea e deterioração da estrutura do tecido ósseo, levando a maior fragilidade do osso, com aumento da susceptibilidade a fraturas, especialmente de quadril, coluna e punho<sup>18,27</sup>. A osteoporose ocorre com mais frequência em populações idosas, mas pode ser resultado do desenvolvimento inadequado do pico de massa óssea, ou à excessiva perda óssea durante a idade adulta, devido à deficiência de estrogênio em mulheres, desnutrição ou uso de corticosteróides<sup>18, 28</sup>.

Valendo-se da relação entre densidade mineral óssea e risco de fratura, a Organização mundial de Saúde<sup>18</sup> propôs a definição de osteoporose: “densidade mineral óssea igual ou menor à 2,5 desvios-padrão da densidade mineral óssea média para mulheres adultas saudáveis”. A osteopenia pode ser diagnosticada quando a densidade mineral óssea

estiver entre 1 e 2,5 desvios-padrão abaixo da média para mulheres adultas saudáveis. No entanto, a Organização Mundial de Saúde recomenda a utilização de outros indicadores para o monitoramento da osteoporose e da osteopenia, além da densidade mineral óssea, como os parâmetros bioquímicos séricos e urinários. Em estudos com animais, destaca-se a importância da realização de análises histomorfométricas do osso e resistência óssea, por meio de ensaios biomecânicos<sup>29</sup>. A biópsia permite uma análise direta da microarquitetura óssea, no entanto, por ser de caráter invasivo, o uso desta técnica em humanos é limitado<sup>30</sup>.

### **2.5.2. Epidemiologia e aspectos sócio-econômicos**

No mundo inteiro a incidência de osteoporose vem aumentando consideravelmente devido, em grande parte, ao aumento da expectativa de vida da população, que eleva o número de idosos e de fraturas osteoporóticas<sup>31</sup>. Atualmente, estima-se que nos Estados Unidos cerca de 25 milhões de pessoas possuem osteoporose e 1,5 milhões de indivíduos sofram fraturas anualmente<sup>32</sup>. As fraturas de coluna vertebral são as mais comuns, atingindo aproximadamente 700.000 indivíduos, seguidas das fraturas de quadril, que ocorrem em cerca de 300.000 pessoas por ano<sup>16</sup>. O tratamento de fraturas por osteoporose acarreta custos bastante altos para o serviço de saúde pública no Brasil e no mundo<sup>33</sup>.

Segundo a Organização Mundial de Saúde<sup>18</sup>, em 1990 1,7 milhões de pessoas no mundo sofreram fraturas de quadril; devido às mudanças na pirâmide demográfica, no ano 2050 este número chegará a 6 milhões. As fraturas de quadril estão fortemente associadas à morbidade, sendo que 50% dos pacientes tornam-se incapazes de andar sozinhos, 25% necessitam de cuidado domiciliar por longo período de tempo e 10-20% morrem dentro de 6 meses<sup>16</sup>. No entanto, dados recentes demonstram que as fraturas de coluna vertebral são

grandes responsáveis por piora na qualidade de vida, que parece ser maior do que nos casos de fratura de quadril<sup>34</sup>.

No Brasil, estudos sobre densidade óssea e prevalência de osteoporose são escassos, embora seja a doença osteometabólica mais comum<sup>35</sup>. Adicionalmente, existem poucos dados relacionados à utilização de recursos e custos decorrentes da osteoporose pós-menopausa. Kowalski<sup>33</sup>, avaliando a dimensão de recursos utilizados e custos por pacientes com osteoporose pós-menopausa, selecionados do ambulatório de doenças osteometabólicas da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), concluiu que os custos médios totais para o Sistema Público de São Paulo foram de, aproximadamente, R\$ 900,00/paciente/ano, e que os gastos com o tratamento da osteoporose pagos pelas pacientes representam cerca de 11% da renda familiar mensal.

Nesse sentido, propostas de intervenções para o tratamento e prevenção da osteoporose, que atinjam o maior número possível de pessoas e que tenham baixos custos, devem ser implementadas.

### **2.5.3. Diagnóstico**

A avaliação da densidade mineral óssea (DMO) é utilizada para diagnosticar osteoporose e osteopenia. Os métodos para medir a densidade óssea dependem da absorção de radiação pelo esqueleto e a absorciometria de Energia Dupla de Raios X (DEXA) é a técnica de densitometria mais utilizada atualmente no mundo<sup>28</sup>.

No entanto, a utilização da densidade mineral óssea como instrumento único de avaliação do risco de fratura não é adequada, sendo indicado utilizar outros parâmetros, além da DMO, como a qualidade óssea e propriedades estruturais do osso<sup>36</sup>. O termo

“qualidade óssea” é bastante vago, mas tem sido utilizado para referir características do osso que incluem a microarquitetura óssea, número e volume de trabéculas, espessura do tecido cortical e composição mineral<sup>37</sup>. Essas características podem ser avaliadas por meio da análise histomorfológica do osso e da densidade mineral óssea.

A análise histomorfométrica do osso é um instrumento fundamental para estudos ósseos, principalmente para elucidar o mecanismo de ação de novos agentes terapêuticos sobre o processo de remodelação óssea e para avaliar a importância de certos componentes sobre a qualidade óssea em animais expostos a algum tipo de tratamento<sup>29</sup>.

O risco de fratura é determinado pela resistência óssea, a qual depende das propriedades geométricas (como tipo e tamanho do osso), das atividades celulares, e das propriedades materiais do osso, que incluem conteúdo e composição mineral, composição e conteúdo de material na matriz, além do tamanho dos cristais de hidroxiapatita<sup>26</sup>.

Testes biomecânicos podem ser utilizados para avaliar as propriedades estruturais de ossos provenientes de animais de pequeno ou grande porte. Os testes mais utilizados são: *flexão em três pontos*, teste de *compressão* e teste de *torção*. Ainda não está claro qual destes ensaios representa melhor o risco de fratura<sup>37</sup>.

Os ensaios biomecânicos relacionam uma carga a qual os ossos são submetidos e a deformação apresentada pelos mesmos. O resultado pode ser graficamente demonstrado na forma de uma curva da carga em função da deformação, e está relacionado com a rigidez do osso, que é uma medida de resistência à força aplicada. À medida que a carga aumenta, a carga e a deformação aumentam de maneira linear.

Através do gráfico de carga *versus* deformação é possível analisar algumas propriedades mecânicas do osso, como por exemplo, a carga máxima. A carga máxima é o

maior valor de carga necessário para alcançar a resistência final do osso, o que provoca a falência óssea<sup>38</sup>. No entanto, apenas a utilização da carga máxima para predizer risco de fratura não é suficiente. Estudos com animais comprovaram que a combinação dos dados de densidade mineral óssea e carga máxima têm boa correlação com o risco de fratura<sup>37</sup>.

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo podem refletir os processos de formação e reabsorção óssea, auxiliando no diagnóstico e monitoramento de doenças osteometabólicas, assim como na avaliação dos possíveis efeitos de uma intervenção<sup>5,18</sup>. Além disso, esses marcadores têm trazido contribuições científicas importantes sobre a fisiologia e a fisiopatologia do tecido ósseo<sup>38</sup>. Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo são diversos, entretanto o número de marcadores utilizados na prática real é bem menor. A fosfatase alcalina óssea e/ou total, a osteocalcina e os propeptídeos do colágeno tipo I, são os principais marcadores de formação, sendo todos medidos em soro<sup>39</sup>.

A interpretação correta dos valores dos marcadores bioquímicos requer o conhecimento dos diversos fatores que podem interferir nos níveis dos mesmos. O horário em que a amostra foi colhida e o tempo de meia vida podem ser responsáveis por grandes variabilidades de resultados quando aplicados à mesma amostra<sup>40</sup>.

Os marcadores de formação óssea medem a concentração dos produtos decorrentes da síntese osteoblástica, uma vez que a formação é dependente da ação dos osteoblastos; da mesma maneira, os marcadores de reabsorção são resultantes da atuação do osteoclasto sobre a matriz óssea<sup>39</sup>.

As doenças ósseas alteram o padrão de produção dos marcadores bioquímicos. Após a menopausa, os marcadores tendem a se elevar quando comparados à idade adulta, com um incremento maior dos marcadores de reabsorção. No entanto, na osteoporose pós-

menopausa é possível encontrar valores iguais, elevados ou reduzidos em relação aos controles normais<sup>40</sup>.

A osteocalcina é considerada um marcador sensível do *turnover* ósseo e reflete especificamente a atividade osteoblástica<sup>41</sup>. Representa aproximadamente 15% das proteínas não-colágenas presentes na matriz óssea<sup>39</sup>.

Estudos recentes têm sugerido que a osteocalcina está envolvida no processo de mineralização do osteóide (matriz óssea recém-formada). Entretanto, embora tenha sido descoberta há mais de 20 anos, sua função ainda não foi completamente elucidada. Pesquisas realizadas com animais transgênicos, cujo gene para osteocalcina não foi expresso, mostram que essa proteína possui uma importante função na regulação do *turnover* ósseo<sup>11,42</sup>.

Pelo fato de que a osteocalcina é incorporada pela matriz óssea, alguns estudos têm sugerido que fragmentos dessa proteína são liberados durante o processo de reabsorção do osso<sup>11</sup>.

A fosfatase alcalina é uma enzima localizada na membrana externa das células, onde exerce suas atividades. A fosfatase alcalina total corresponde à soma das diversas isoformas presentes no soro: óssea, hepática, intestinal, placentária e renal, no entanto, mais de 90% do seu valor consiste das isoformas hepática e óssea.

A isoforma óssea da fosfatase alcalina localiza-se na membrana externa dos osteoblastos. Embora sua função não tenha sido completamente elucidada, sabe-se que no tecido ósseo ela possui uma importante ação sobre a mineralização e formação do osteóide<sup>11</sup>, por meio da atuação no controle da concentração dos inibidores da mineralização, através de um aumento dos níveis locais de íons fosfato removendo o fosfato de outras proteínas. Estudos indicam que a atividade da fosfatase alcalina óssea é

proporcional à formação de colágeno, enquanto que a mineralização coincide com uma maior produção de osteocalcina<sup>43</sup>.

#### **2.5.4. Tratamento**

As condições normais do osso não são recuperadas quando um quadro de osteoporose já estiver instalado, no entanto, a prevenção e o diagnóstico precoce da osteoporose são fundamentais para um tratamento mais efetivo. Estudos relatam que a osteoporose é mais efetivamente prevenida do que tratada<sup>19</sup>. O tratamento para osteoporose tem o objetivo de restaurar a massa óssea a um nível em que o risco de fratura seja substancialmente reduzido<sup>38</sup>.

Os medicamentos mais utilizados atualmente para tratamento da osteoporose pós-menopausa incluem os estrógenos<sup>44</sup>, os moduladores seletivos de receptores de estrogênios (SERMs) e os bisfosfanatos<sup>45</sup>, que são agentes que reduzem a atividade osteoclástica. Entretanto, existem outros medicamentos como os fluoretos, GH, e PTH<sup>44,46</sup>, que parecem agir aumentando a deposição de matriz osteóide pelos osteoblastos. A vitamina D e o cálcio são indicados como substâncias complementares no tratamento da osteoporose, independente do tratamento instituído, já que ambos são essenciais para a formação de massa óssea<sup>47</sup>.

Mesmo reduzindo a susceptibilidade a fraturas, os tratamentos para osteoporose não são capazes de impedir sua ocorrência<sup>48</sup>.

O uso terapêutico de estrógeno após a menopausa para redução dos sintomas (ondas de calor, irritabilidade, distúrbios de sono, dores de cabeça e irritação vaginal) e como agente de prevenção para perda de massa óssea é bastante comum<sup>49</sup>. Jiang *et al*<sup>21</sup> observaram que o tratamento com estrógeno em ratas adultas ovariectomizadas preservou a

densidade mineral óssea assim como as propriedades biomecânicas do osso. Shen *et al*<sup>44</sup>, estudando o efeito da administração de estrógeno em ratas castradas, também encontraram resultados semelhantes.

Estudo realizado por Hughes *et al*<sup>50</sup> em camundongos sugeriu que os estrógenos podem prevenir perda óssea pela indução de apoptose nos osteoclastos. Steeve *et al*<sup>51</sup>, também observaram que o estrógeno promoveu apoptose nos osteoclastos.

Analisando os diversos estudos, o tratamento com estrógenos parece reduzir a perda óssea tanto por meio da inibição dos fatores estimuladores de osteoclastos, como pelo aumento da apoptose osteoclástica.

Embora a terapia hormonal com estrógenos seja amplamente utilizada por mulheres menopausadas, e reduza o risco de fraturas, ela possui algumas restrições em função do aumento no risco de trombose, doenças coronarianas, câncer de mama, entre outras<sup>52</sup>.

Neste contexto, observa-se a necessidade da realização de estudos que avaliem a segurança e efetividade de tratamentos alternativos. Diversas pesquisas têm estudado o efeito da ingestão de alguns nutrientes e alimentos funcionais, como alternativa ao tratamento farmacológico, para prevenir ou melhorar o quadro de osteoporose, evitando assim os efeitos colaterais dos medicamentos e os riscos da terapia de reposição hormonal<sup>53,54</sup>. Proteínas do soro do leite, isoflavonas da soja e colágeno hidrolisado são componentes que têm sido estudados para melhora da qualidade óssea.

#### **2.5.5. Modelo experimental de osteoporose**

A rata ovariectomizada é um modelo experimental aceito e amplamente utilizado para simular a perda óssea em mulheres menopausadas<sup>55</sup>. Dempster *et al*<sup>22</sup>, avaliando as

mudanças ocorridas no osso de ratas castradas, observaram que a ovariectomia induziu um rápido aumento do *turnover* ósseo, evidenciado pelo aumento da superfície de osteoclastos, redução do volume trabecular e número de trabéculas, concluindo que a rata ovariectomizada pode ser usada como um modelo experimental de osteoporose e que a perda óssea nessas ratas é induzida pela deficiência de estrógeno.

No entanto, diversos estudos com ratas ovariectomizadas mostram que a perda óssea não é uniforme nos diferentes tipos de osso. O osso trabecular responde mais rapidamente à queda dos níveis de estrógeno<sup>56</sup>, enquanto o tecido cortical parece não ser afetado pelo status hormonal<sup>57</sup>. Por exemplo, a perda óssea nas vértebras é maior e mais rápida, comparando com a diáfise de fêmures ou tíbias.

A ovariectomia resulta em perda óssea tanto nas ratas quanto nas mulheres em função das diversas semelhanças entre os mecanismos patofisiológicos das duas espécies. Em ambas, a perda óssea ocorre mais rapidamente após a deficiência de estrogênio e é caracterizada pelo aumento do *turnover* ósseo, com a reabsorção excedendo a formação. Nas duas espécies a perda óssea é maior no tecido trabecular que no cortical, a absorção intestinal de cálcio é reduzida e a resposta óssea às intervenções é semelhante. Adicionalmente, as alterações na microarquitetura óssea também são similares, caracterizadas por danos à arquitetura do tecido trabecular, com conseqüente perda de minerais. Estas alterações levam ao enfraquecimento e diminuição da resistência do osso<sup>15,29</sup>.

## **2.6. Colágeno**

O colágeno é a proteína mais abundante nos ossos, pele e tendões. Cada molécula de colágeno é um bastão formado pelo entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias

polipeptídicas. As fibras de colágeno são parcialmente responsáveis pelas propriedades biomecânicas do osso, como resistência à pressão sob o mesmo, e também, por dar suporte aos músculos e à pele. São conhecidos 20 tipos diferentes de colágeno, os quais variam em relação ao comprimento de sua hélice triplíce e sua função, mas o tipo I é o mais abundante no tecido ósseo. Os aminoácidos glicina (33%), prolina (12,2%), hidroxiprolina (9,4%), e alanina (10,7%), perfazem 65% dos aminoácidos do colágeno<sup>58,59</sup>.

Em nível celular, no retículo endoplasmático rugoso (RER), os colágenos são sintetizados como procolágeno (Figura 2), que consiste de três cadeias polipeptídicas esquerdas, formando uma tripla-hélice direita. Ainda no RER, ocorre a hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina. Este processo requer o ácido ascórbico, ferro e oxigênio como fatores<sup>14,60</sup>, além de cobre.

Um fato interessante é que a hidroxiprolina é produto da modificação enzimática ocorrida após biossíntese da molécula do procolágeno, ou seja, de evento pós-tradução.

As moléculas de procolágeno são secretadas para o meio extracelular, onde sofrem a remoção enzimática de suas extremidades não helicoidais (por meio da ação de colagenases), dando origem a molécula de tropocolágeno as quais são então liberadas para a corrente sanguínea. Estas moléculas adquirem ligações cruzadas, formando as fibrilas colágenas as que, por sua vez, se agregam para constituir as fibras de colágeno maduras<sup>14,60</sup>.

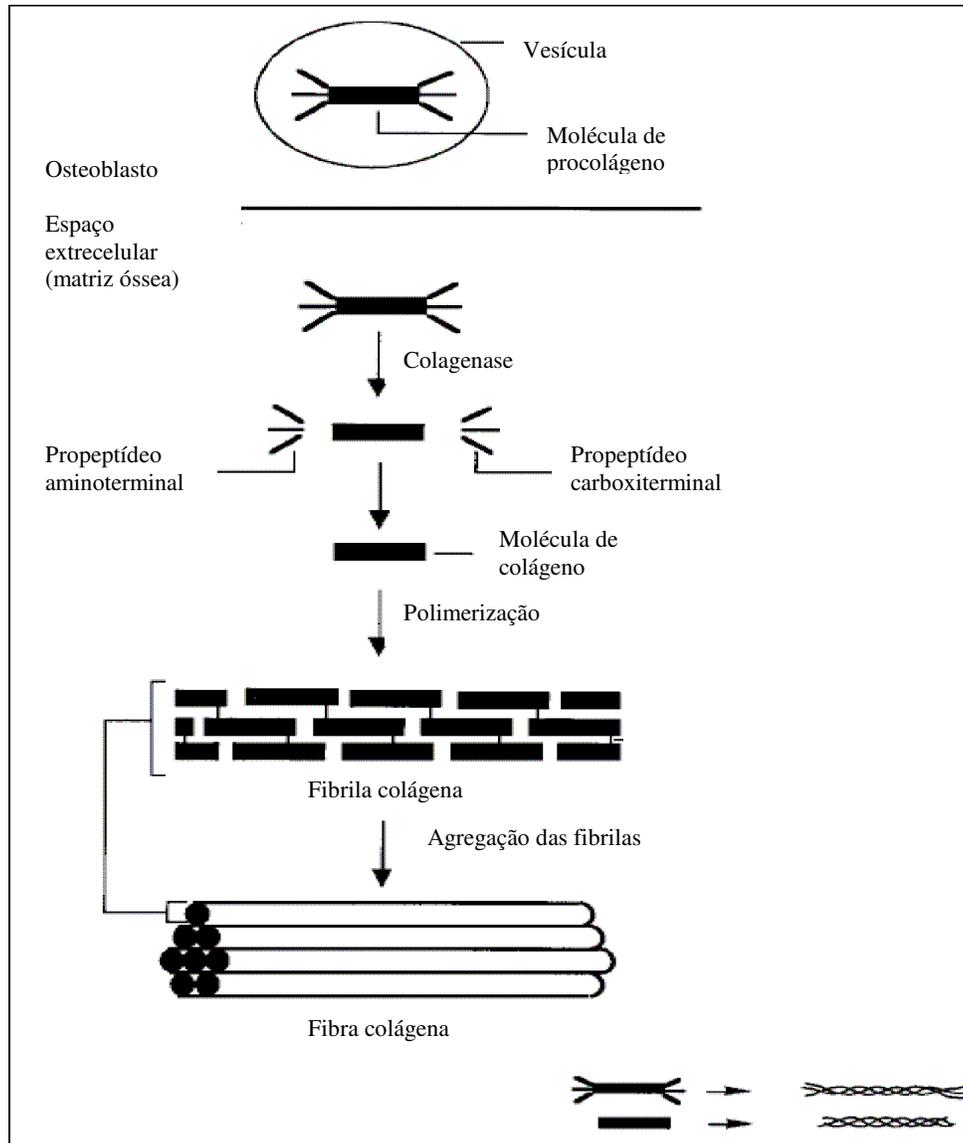


Figura 2. Adaptado de VARGAS, 1997<sup>60</sup>. Biosíntese de colágeno tipo I.

Há evidências de que a quantidade e composição do colágeno ósseo encontram-se alterados nos tecidos osteoporóticos. Paschalis *et al*<sup>61</sup>, avaliando a distribuição de colágeno no osso de mulheres menopausadas que já haviam tido fraturas, observaram características diferentes do colágeno nas superfícies trabeculares dos ossos, comparando com mulheres saudáveis. Os autores sugerem que a má qualidade do colágeno ósseo pode contribuir para uma maior fragilidade do osso e, conseqüentemente, para um maior risco de fraturas.

Tendo em vista a importância do colágeno sobre a estrutura óssea, algumas pesquisas têm investigado o efeito do consumo de hidrolisado de colágeno (HC) sobre o metabolismo ósseo de indivíduos com osteoartrite e osteoporose.

## **2.7. Hidrolisado de colágeno**

A qualidade nutricional de uma proteína depende da composição de aminoácidos que ela possui e da utilização fisiológica desses aminoácidos após a digestão e absorção<sup>62</sup>. Os hidrolisados protéicos têm sido amplamente utilizados devido às suas propriedades funcionais (em função da presença de peptídeos bioativos) e tecnológicas (em possuir alta solubilidade, devido ao processo de hidrólise sob condições ácidas, e produzir soluções de baixa viscosidade mesmo em altas concentrações). Essas duas propriedades básicas, combinadas à melhora da tecnologia, tornaram o hidrolisado protéico um ingrediente amplamente utilizado em diversos produtos alimentícios<sup>63</sup> para melhorar características físicas, químicas e funcionais dos alimentos, sem prejudicar seu valor nutritivo<sup>64</sup>.

Hidrolisados protéicos são indicados no caso de algumas doenças ou condições clínicas como, por exemplo, na doença de Crohn, colite ulcerativa e alergias alimentares. A hidrólise extensiva dos peptídeos pode resultar em produtos menos alergênicos<sup>64</sup>.

Adicionalmente, a possibilidade de liberar peptídeos biologicamente ativos tem gerado bastante interesse<sup>62</sup>. Estudos já puderam evidenciar diversos efeitos dos hidrolisados, incluindo redução da pressão sanguínea<sup>62</sup>, diminuição dos níveis de colesterol sérico, aumento da absorção mineral e efeitos imunomodulatórios<sup>65</sup>. Postlethwaite *et al*<sup>66</sup>, em 1976, já relatava a relação entre peptídeos de colágeno e resposta imune, e concluía que a atividade quimioestática do colágeno estaria relacionada aos peptídeos, e não à composição aminoacídica da proteína.

Os hidrolisados possuem uma propriedade fisiológica bastante importante, que é a de uma absorção gastrointestinal mais efetiva, quando comparada às proteínas intactas, ou mesmo à ingestão de aminoácidos livres<sup>63</sup>.

Desde 1914, estudos já haviam observado que oligopeptídeos “desapareciam” do lúmen intestinal mais rapidamente que aminoácidos, sugerindo que algumas proteínas poderiam ser absorvidas sob a forma de peptídeos. No entanto, estas pesquisas foram sumariamente ignoradas e, apenas em 1935, em estudo realizado por Heath e Fullerton, esta teoria foi comprovada<sup>67</sup>. Diversas pesquisas foram realizadas ao longo dos anos e atualmente sabe-se que a absorção de proteínas ocorre tanto na forma de aminoácidos como de pequenos peptídeos, por mecanismos independentes. A absorção dos aminoácidos é mediada por transportadores e é um mecanismo de absorção saturável; os pequenos peptídeos (di e tri-peptídeos) são absorvidos intactos e podem ou não sofrer hidrólise intracelular. Já os oligopeptídeos (com quatro ou mais aminoácidos) são hidrolisados pelas peptidases da borda em escova e são absorvidos sob a forma de aminoácidos ou como di ou tri-peptídeos<sup>67,68</sup>. Desta forma, os hidrolisados protéicos disponíveis comercialmente se diferenciam em relação à composição de di, tri e oligopeptídeos<sup>69</sup>.

O hidrolisado de colágeno (HC) é um produto da indústria de gelatina, atualmente comercializado para o público em geral pelo mercado farmacêutico, como produto de venda livre. A sua inocuidade à saúde humana é testemunhada pelo status concedido pela FDA americano, como um produto seguro - *GRAS* (generally recognized as safe)<sup>70</sup>.

O HC é obtido pela hidrólise limitada do colágeno de pele suína ou bovina, constituído por peptídeos de PM entre 2,5 e 10kDa, sobre o qual existem estudos mostrando a sua maior biodisponibilidade, efeitos provavelmente estimulatórios da regeneração das

fibras colagenosas do rato e do homem, quando comparado com o colágeno intacto ou a gelatina<sup>71</sup>. A gelatina possui um peso molecular da ordem dos 100kDa.

Dados recentes indicam que fragmentos de colágeno com peso molecular menor que 10kDa são absorvidos pelo intestino e, preferencialmente, acumulam na cartilagem e nos ossos. Oesser<sup>71</sup>, investigando o tempo de absorção de um hidrolisado de colágeno e sua subsequente distribuição nos diversos tecidos de ratos, observou que 95% do hidrolisado foi absorvido nas primeiras 12 horas após a ingestão, indicando que mesmo os peptídeos de maior peso molecular (10kDa) foram absorvidos; a distribuição do hidrolisado nos diferentes tecidos foi semelhante ao grupo controle (que recebeu apenas o aminoácido prolina), exceto para os ossos e cartilagens. Esses resultados sugerem que ocorre a absorção intestinal de peptídeos, mesmo de alto peso molecular, provenientes do hidrolisado de colágeno, e mostram que o hidrolisado é preferencialmente utilizado para ser incorporação aos ossos e cartilagens, sugerindo que a administração oral de HC pode resultar em efeitos benéficos sobre esses tecidos.

Estudos realizados com pacientes portadores de osteoartrose que foram tratados com HC oral relataram uma diminuição significativa na sintomatologia da doença, mostrando a sua utilidade no tratamento de osteoartrose.

Adam *et al*<sup>72</sup> avaliaram por meio de um ensaio duplo cego aleatorizado, em 52 pacientes com osteoartrose em pulso e joelho, o efeito da suplementação com 3 diferentes produtos a base de HC (10g/dia, durante 2 meses): colágeno hidrolisado, produzido por meio da hidrólise enzimática da gelatina; gelatina; gelatina + glicina + fosfato de cálcio em relação ao consumo de albumina de ovo, como grupo controle, sobre a dor e consumo de analgésicos. No final do estudo os pacientes que consumiram a gelatina hidrolisada

apresentaram maiores reduções de dor, em relação aos outros tratamentos. Além disso, esses pacientes tinham reduzido o consumo de analgésicos em relação ao consumo relatado antes de iniciar o tratamento. Os autores sugeriram que o HC teria efeito analgésico e que o “pool” de aminoácidos fornecido ao organismo pelos produtos melhorou significativamente a matriz estrutural das articulações. Este estudo demonstrou efeitos benéficos da suplementação com colágeno hidrolisado sobre a dor de pacientes com osteoartrose além de ter evidenciado que a gelatina, embora tenha a mesma composição aminoacídica que o HC, não acarretou os mesmos efeitos sobre a dor nestes pacientes.

Beuker *et al*<sup>73</sup> observaram, em 100 pacientes tratados com 10g/dia de HC, durante 6 meses, um aumento significativo nos níveis sanguíneos de hidroxiprolina, o principal aminoácido constituinte tanto do colágeno ósseo como do HC, e uma redução da dor de joelhos e pulsos. Os pesquisadores postularam que o efeito benéfico do HC estaria relacionado ao aumento da síntese de colágeno articular e cartilagem.

Adam *et al*<sup>74</sup> avaliaram clinicamente o efeito do HC no metabolismo ósseo de pessoas com osteoporose. Para tanto, conduziram um ensaio tipo duplo-cego em 94 mulheres menopáusicas (com menos de 80% da densidade mineral óssea normal), 47 foram tratadas com calcitonina (100 unidades/3 vezes por semana) mais uma dieta rica em HC (10g/dia) e as outras 47 receberam o tratamento com calcitonina mais placebo de lactose durante 6 meses. Observaram que os níveis de piridinolinas urinárias (marcadores de resorção óssea) estavam elevados nas mulheres no início do estudo, em relação a mulheres normais. Ao final do tratamento, os níveis desses mesmos marcadores diminuíram significativamente ( $p=0,05$ ). Ainda, as pacientes que foram tratadas com calcitonina mais HC na dieta, mostraram decréscimos significativamente maiores às tratadas com calcitonina mais

placebo. Houve nas mulheres que receberam HC uma maior inibição da ressorção óssea, que melhorou a resposta ao tratamento com calcitonina.

Os estudos comentados, além de demonstrarem efeitos positivos do HC ósseo-articulares em humanos, provam a segurança do uso de HC por períodos de até 6 meses, em concentrações de 10g/dia já que não se apresentaram efeitos adversos importantes<sup>70,73,74</sup>.

Um estudo realizado no Japão, por Wu *et al*<sup>75</sup>, teve como objetivo avaliar a efetividade da administração oral de peptídeo de colágeno sobre o metabolismo ósseo, em ratos adultos e em crescimento. A quantidade do peptídeo oferecido aos animais foi proporcional ao recomendado como suplemento para humanos (10g/dia para um adulto de 60 kg; grupo “Coll-1”); avaliou-se também o efeito de uma quantidade 10 vezes maior (grupo “Coll-10”), e cem vezes maior (grupo “Coll-100”). Nos ratos em crescimento, a densidade mineral óssea do grupo “Coll-100”, nos fêmures, foi significativamente maior que os outros grupos após 1 mês de intervenção, entretanto observou-se uma hipertrofia renal nesses animais. Já nos ratos adultos, o grupo “Coll-10” apresentou um aumento da densidade mineral óssea nos fêmures e vértebras, após 8 semanas de intervenção. Concluiu-se que a administração oral de peptídeos de colágeno em uma quantidade 10 vezes maior que o recomendado para humanos, trouxe efeitos benéficos para os ossos de animais adultos, sugerindo que a ingestão de HC pode contribuir para uma melhora na qualidade óssea também em humanos.

Contudo, este trabalho não observou o efeito da administração de HC sobre outros parâmetros químicos dos ossos, como teor de proteínas, peso ósseo, além das características biomecânicas. Por isso, há necessidade de mais estudos que analisem diversos parâmetros

ósseos principalmente para elucidar o mecanismo de ação do HC sob o metabolismo do osso.

Nomura *et al*<sup>76</sup> estudaram o efeito da ingestão de um colágeno hidrolisado de origem marinha (pele de tubarão) sobre características ósseas de ratas ovariectomizadas como a densidade mineral óssea (DMO), teor de colágeno e glicosaminoglicanos, além de alterações na histomorfologia. A densidade mineral óssea nos fêmures dos grupos que receberam o hidrolisado foi maior que nas ratas *sham-operated* que não receberam o suplemento. Isto foi verificado por maiores valores na DMO, além de uma densidade óssea maior entre estes grupos. Adicionalmente, o conteúdo de colágeno tipo I e de glicosaminoglicanos aumentou, em relação ao grupo controle com albumina. Concluiu-se que a ingestão do hidrolisado promoveu aumento da densidade mineral óssea pelo aumento na síntese de fibrilas de colágeno e de glicosaminoglicanos na matriz óssea, sugerindo que o consumo de HC pode ser útil como suplemento dietético no tratamento da osteoporose.

Embora este estudo tenha analisado características histomorfológicas e químicas do osso, não foi verificado se a melhora da DMO e o aumento do teor de colágeno promoveram alterações nas características biomecânicas do osso, o que seria de fundamental importância já que a resistência óssea está fortemente associada ao risco de fraturas.

Esses resultados sobre a utilização do hidrolisado de colágeno no tratamento de osteoporose parecem encorajadores, entretanto são ainda escassos e, portanto, novas pesquisas em humanos e em animais, são justificáveis para se estabelecer o verdadeiro potencial do HC, assim como seu mecanismo de ação sobre a fisiologia óssea, quando consumido via oral como ingrediente ou suplemento alimentar.

Propõe-se a suplementação da dieta com HC no tratamento da osteoporose e osteopenia, como uma possível terapia alternativa para pacientes com restrições para as terapias medicamentosas clássicas, ou como coadjuvante alimentar para os casos em que não há restrição. A proposta está fundamentada no fato de que a sua administração é segura, pois se trata de um derivado da gelatina, produto alimentício já utilizado há muito tempo. O HC pode ser incorporado à dieta de diversas maneiras, com características sensoriais aceitas pela população e com baixo custo.

## **2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. FARFÁN, J.A. Fatores nutricionais que influem na formação e manutenção do osso. **Rev. Nutrição Puccamp**. Campinas, v. 7, n. 2, p. 148-172, jul./dez. 1994.
2. AMADEI, S.U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**. São José dos Campos, v. 42, p. 5-12, fev. 2006.
3. YAN, J.; MECHOLSKY, J.J.; CLIFTON, K.B. How tough is bone? Application of elastic-plastic fracture mechanics to bone. **Bone**. Florida, v. 40, p. 479-84, oct. 2007.
4. SZEJNFELD, V. L. **Osteoporose: Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Sarvier. 2000, 319 p.
5. VIEIRA, J.G.H. Exames e métodos laboratoriais relacionados com o metabolismo ósseo. **Manual de Doenças Ósteo-Metabólicas**. Disponível em [www.fleury.com.br/htmls/cdrom/index.htm](http://www.fleury.com.br/htmls/cdrom/index.htm) atualizado em abril/2003, acesso em: 17 março 2005.
6. JUNQUEIRA, LC & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 512 p.
7. RAMALHO, R.C.A.; CASTRO, M.L. Fisiopatologia da osteoporose involutiva. **Arq Bras Endocrinol Metab**. São Paulo, v. 43, n.6, p. 409-414, dez. 1999.
8. ANDERSON, J.J.B. Nutrição para a saúde óssea. In: MAHAN, L.K.; STUMP, S.E. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. São Paulo, 2003. p.591-611.
9. TUCKER, L.K. et al. Bone mineral density and dietary patterns in older adults: the Framingham Osteoporosis Study. **Am J Clin Nutr**. Boston, v. 76, p. 245-252, Jul. 2002.
10. CAMPOS, L.M.A. et al. Osteoporose na infância e na adolescência. **J Pediatr**. Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 481-8, mar, 2003.

11. SEIBEL, M.J. Biochemical markers of bone turnover part I: Biochemistry and variability. **Clin Biochem Rev.** Sydney, v. 26, p. 97-105, nov. 2005.
12. RIGGS, B.L. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. **J Clin Invest.** Minnesota, v. 106, n.10, p. 1203-04, nov. 2000.
13. RAMALHO, R.C.A. et al. Por que estrógeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea? Mecanismo de ação do estrógeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. **Arq Bras Endocrinol Metab.** São Paulo, v. 44, n. 6, p. 471-81, nov. 2000.
14. KIERSZEMBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
15. MATTILA, P. **Dietary xylitol in the prevention of experimental osteoporosis.** 1999. 65 f. Tese de mestrado – Universidade de Oulu, Oulu, 1999.
16. HAZEMBERG, J.G.; TAYLOR, D.; LEE, T.C. The role of osteocytes and bone microstructure in preventing osteoporotic fractures. **Osteoporosis Int.** Ireland, v. 18, p. 1-8, sep. 2007.
17. WAITZMANN, M.N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **J Clin Invest.** Atlanta, v. 116, n.5, p. 1186-1194, may. 2006.
18. WHO (World Health Organization). **Prevention and Management of Osteoporosis. Report of a WHO Scientific Group.** WHO Technical Report Series. Geneva. 2003. 201 p.
19. DRAKE, A.J.; ARMSTRONG, D.W.; SHAKIR, K.M.M. Bone mineral density and total body bone mineral content in 18-22-year-old women. **Bone.** Bethesda, v.34, p. 1037-43, jan. 2005.
20. DIMAI, H.P. et al. Alkaline phosphatase levels and osteoprogenitor cell numbers suggest bone formation may contribute to peak bone density differences between two inbred strains of mice. **Bone.** California, v. 22, n. 3, p. 211-16, mar. 1998.

21. JIANG, Y. Long-term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen-replaced rats. **J Bone Miner Metab.** California, v. 12, n. 97, p. 820-830. 1997.
22. DEMPSTER, D.W. et al. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. **Bone.** New York, v. 16, n. 1, p. 157-61, jan. 1995.
23. MARINHO, RM. **Climatério.** 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, Ltda, 1995.
24. COLLIER F.M. et al. Osteoclast from human giant cell tumors of bone lack estrogen receptors. **Endocrinology.** Melbourne, v. 139, p. 1258-66, mar. 1996.
25. ZHANG R.W. et al. Expression of selected osteogenic markers in the fibroblast-like cells of rat marrow stroma. **Calcif Tissue Int.** Galveston, v. 56, p. 283-91, apr. 1995.
26. FAIBISH, D.; OTT, M.S.; BOSKEY, A.L. Mineral changes in osteoporosis: a review. **Clin Orthop Relat Res.** New York, v. 443, p. 28-38, feb. 2006.
27. NETO, A.M.P. et al. Consenso Brasileiro de Osteoporose. **Revista Brasileira de Reumatologia.** v. 42, n. 6, p. 343-354. 2002.
28. SILVA, L.K. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós menopausa. **Cad. Saúde Pública.** Rio de Janeiro, v. 19, n.4, p. 987-1003. jul./ago. 2003.
29. WHO (World Health Organization). **Guidelines for preclinical avaluation and clinical trials in osteoporosis.** WHO Library Cataloguing in Publication Data. Geneva, 1998. 68 p.
30. CHAPPARD, D. et al. Texture analysis of X-ray radiographs is correlated with bone histomorphometry. **J Bone Miner Metab.** v. 23, p. 24-29, jun. 2005.
31. MONTILLA, R.N.G.; ALDRIGHI, J.M.; MARUCCI, M.F.N. Relação cálcio/proteína da dieta de mulheres no climatério. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v. 50, n. 1, p. 52-54, out. 2004.

32. ROHR, C.I. *et al.* Prevalence of prevention and treatment modalities used in populations at risk of osteoporosis. **The Journal of the American Osteopathic Association**. Philadelphia, v. 104, n.7, p. 281-286, nov. 2004.
33. KOWALSKI, S.C.; SJENZFELD, V.L.; FERRAZ, M.B.; Utilização de recursos em osteoporose. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v. 47, n. 4, p. 352-357, out./dez. 2001.
34. ZETHRAEUS, N. *et al.* Cost-effectiveness of the treatment and prevention of osteoporosis – a review of the literature and a reference model. **Osteoporosis Int.** v. 18, p. 9-23. nov. 2007.
35. FRAZÃO, P.; NAVEIRA, M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica. **Rev Bras Epidemiol.** Santos, v. 9, n. 2, p. 206-14, mai. 2006.
36. DEVAREDDY, L. *et al.* Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **Bone.** Oklahoma, v. 38, p. 686-93. oct. 2006.
37. HERNANDEZ, C.J.; KEAVENY, T.M. A biomechanical perspective on bone quality. **Bone.** Califórnia, v. 39, p. 1173-1181, jun. 2006.
38. CARVALHO, D.C.L. **Ação do ultra-som de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas.** 2001. 69 f. Tese de mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
39. VIEIRA, J.G.H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab.** São Paulo, v. 43, n. 6, p. 415-22, dez. 1999.
40. SARAIVA, G.L.; CASTRO, M.L. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** São Paulo, v. 46, n. 1, p. 72-78, fev. 2002.
41. SZULC, P.; CHAPUY, M.C.; MEUNIER, P.J.; DELMAS, P.D. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly woman. **J Clin Invest.** Florence, v. 91, p. 1769-1774, apr. 1993.

42. GUNDBERG, C.M. **Biochemical markers of bone formation**. Clin Lab Med. v. 20, n. 3, p. 489-501, sep. 2000.
43. MARCHESANO, L.H. **Comportamento de marcadores séricos de formação e reabsorção óssea após enxerto autógeno em fissura alveolar congênita: sem e com plasma rico em plaquetas**. 2005. 120 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2005.
44. SHEN, V. et al. Effects of reciprocal treatment with estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. **J Clin Invest**. New York, v. 96, p. 2331-2338, nov. 1995.
45. CANAVERO, E. et al. Avaliação histométrica da ação local da calcitonina de salmão no processo de reparo ósseo: estudos em ratos. **Pesq Odont Bras**. Campinas, v. 14, n. 2, p. 183-87, abr./jun. 2000.
46. LI, M. et al. Parathyroid hormone monotherapy and cotherapy with antiresorptive agents restore vertebral bone mass and strength in aged ovariectomized rats. **Bone**. Florida, v. 16, n. 6, p. 629-35, jun. 1995.
47. RUSSO, L.A.T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab**. Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 401-6, fev. 2001.
48. McNAMARA, L.M. et al. Strength of cancellous bone trabecular tissue from normal, ovariectomized and drug-treated rats over the course of ageing. **Bone**. New York, v. 39, p. 392-400, feb. 2006.
49. FONSECA, D.; WARD, W.E.; Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. **Bone**. Toronto, v. 35, p. 489-97, mar. 2004.
50. HUGHES D.E. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . **Nat Med**. V. 2, p. 1132-6, oct. 1996.
51. STEEVE K.T. et al. IL-6, RANK, TNF- $\alpha$ /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Citokine Growth Factor Rev**. v. 5, p. 49-60, feb. 2004.

52. WHI (Women's Health Initiative). Questions and answers about the WHI postmenopausal hormone therapy trials. Disponível em [http://www.nhlbi.nih.gov/whi/whi\\_faq.htm](http://www.nhlbi.nih.gov/whi/whi_faq.htm), atualizado em abril/2004, acesso em: 10 de janeiro de 2008.
53. TAKADA, Y. et al. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. **Nutrition Research**. Saitama, v. 17, n. 11/12, p. 1709-1720, nov. 1997.
54. KHALIL, D.A. et al. Soy isoflavones may protect against orchidectomy-induced bone loss in aged male rats. **Calcif Tissue Int**. Oklahoma, v. 76, p. 56-62, jul. 2005.
55. TEÓFILO, J.M. *et al.* Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxila and proximal tibia of female rats. **Pesqui Odontol Bras**. Ribeirão Preto, v. 17, n. 4, p. 302-306, out./dez. 2003.
56. WESTERLIND, K.C. et al. Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. **Proc Natl Acad Sci USA**. New York, v. 94, p. 4199-204, jan. 1997.
57. JOCHEMS, C. et al. Osteoporosis in experimental postmenopausal polyarthritis: the relative contributions of estrogen deficiency and inflammation. **Arthritis Research & Therapy**. Swedwn, v. 7, p. 837-43, apr. 2005.
58. MARK, K.V.D. Structure, biosynthesis, and gene regulation of collagens in cartilage. *In*: SEIBEL, M.J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. London, Academi Press, 1999. p. 3-7.
59. BOSKEY, A.L. Mineralization, Structure, and Function of bone. *In*: SEIBEL, M.J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. London, Academi Press, 1999. p. 153-162.
60. VARGAS, D.M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Rev Ass Med Bras**. Barcelona, v. 43, n. 4, p. 367-70. 1997.

61. PASCHALIS, E.P. et al. Bone fragility and collagen cross-links. **J Bone Res.** V. 19, n. 2, p. 2000-4, dec. 2004.
62. VERCRUYSSSE, L.; CAMP, J.V.; SMAGGHE, G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. **J Agric Food Chem.** V. 53, p. 8106-15, sep. 2005.
63. FROKJAER, S. Use of hydrolysates for protein supplementation. **Food technology.** Chicago, v. 3, p. 86-8, oct. 1994.
64. PACHECO, M.T.B. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 25, n. 2, p. 333-8, abr./jun. 2005.
65. RUTHERFURD M.K.J.; MOUGHAN, P.J. Bioactive peptides derived from food. **J AOAC Int.** New Zealand, v. 88, n. 3, p. 955-66, may./jun. 2005.
66. POSTLETHWAITE, A.E.; KANGS, A.H. Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. **The Journal of Experimental Medicine.** Tennessee, v. 143, p. 1299-308. 1976.
67. MATTHEWS, D.M. Protein absorption. **J Clin Path.** London, v. 24, n. 5, p. 29-40, 1973.
68. FREITAS, O. et al. Bases bioquímicas do suporte nutricional enteral. **Arch Latinoam Nutr.** V. 45, n. 2, p. 84-9, jun. 1995.
69. FRENHANI, P.B.; BURINI, R.C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídeos. Controle e implicações na dietoterapia humana. **Arq Gastroenterol.** São Paulo, v. 36, n. 4, p. 227-37, out./dez.1999.
70. MOSKOWITZ, RW. Role of Collagen Hydrolysate in Bone and Joint Disease, **Seminars in Arthritis and Rheumatism.** Cleveland, v. 30, n. 2, p. 87-99, oct. 2000.

71. OESSER, S. et al. Oral administration of <sup>14</sup>C-labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). **Journal of Nutrition**. Eberbach, v. 129, p. 1891-95, mar. 1999.
72. ADAM, M. Therapie Der Osteoarthrose \_ Welche Wirkung Habe Gelatineparaprate? **Therapiewoche**. Prague, v. 41, n. 38, p. 2456-61. 1991.
73. BEUKER, F; ECK T; ROSENFELD, J. Biochemical and clinical examinations on the effects of regular applications of gelatine on degenerative damages of the motor system. **International Journal of Sports Medicine**. V. 17, n. 1, p. 68. 1996.
74. ADAM, M et al. Postmenopausal osteoporosis. Treatment with calcitonin and a diet rich in cartilage proteins. **Cas Lek ces**. V. 135, p. 74-8, jan. 1996.
75. WU, J. et al. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. Tokyo, v. 22, p. 547-553, apr. 2004.
76. NOMURA, Y. et al. Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. **Nutrition**. Tokyo, v. 21, p. 1120-26, mar. 2005.

## **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar o efeito fisiológico-metabólico da administração oral de hidrolisado de colágeno (HC) sobre os marcadores bioquímicos, características composicionais, biomecânicas e histológicas de ratas ovariectomizadas, modelo experimental de osteoporose.

#### **3.2. Específicos**

- Avaliar o efeito do consumo de HC suplementar, em comparação ao consumo de gelatina, sobre os marcadores bioquímicos de formação óssea (osteocalcina e fosfatase alcalina séricas).

- Avaliar o efeito da ingestão de HC suplementar, em comparação ao consumo de gelatina, sobre características histomorfológicas de fêmures e vértebras.

- Avaliar o efeito do consumo de HC suplementar, em comparação ao consumo de gelatina, sobre a resistência óssea, em fêmures e vértebras, utilizando dados de carga máxima.

- Avaliar o efeito da ingestão de HC suplementar, em comparação ao consumo de gelatina, sobre a composição química óssea, por meio da análise do teor protéico, de minerais, umidade e cinzas.

# **ARTIGO I**

**Efeito da suplementação alimentar com hidrolisado de colágeno nos marcadores bioquímicos e nas características composicionais, biomecânicas e histológicas ósseas de ratas osteopênicas**

**Elisa Jackix, Florência Cúneo, Jaime Amaya-Farfan**

**RESUMO**

A osteoporose constitui a enfermidade do esqueleto de maior incidência mundial e é caracterizada por redução da massa óssea levando ao aumento da susceptibilidade a fraturas. Nas mulheres, a osteoporose está associada à queda dos níveis de estrogênio, que acompanha a menopausa. O colágeno compreende cerca de 95% das proteínas dos ossos, e é parcialmente responsável pelas propriedades biomecânicas do osso. Os hidrolisados enzimáticos de colágeno (HC) são produtos obtidos a partir da hidrólise da gelatina e têm recebido atenção por suas propriedades no tratamento de doenças osteoarticulares. **Objetivo:** avaliar o efeito de um HC sobre características ósseas em modelo osteopênico com ratas. **Métodos:** 48 ratas adultas foram divididas em 6 grupos: 3 ovariectomizados, 1 *sham-operated* e 2 intactos, tratados com dieta AIN-93 M, suplementada com HC ou gelatina (controle), em dois níveis: (1) quantidade equivalente a 5X ao recomendado para humanos (10g/D), e outro (2) com nível 10X maior. Após 8 semanas, os ossos do fêmur e da coluna vertebral foram extirpados, e o sangue coletado; determinaram-se osteocalcina e fosfatase alcalina sérica, e no osso, determinou-se peso, teor protéico, conteúdo mineral (Ca, Na, Zn, Fe, K, P, Mg, Mn, Pb e Cu). Realizou-se também a análise de cortes histológicos dos diferentes grupos. Avaliou-se a resistência biomecânica por meio dos testes de flexão em três pontos nos fêmures e compressão nas vértebras. **Resultados:** As vértebras do grupo que recebeu a maior dosagem de HC suportaram uma carga 4X maior, e tiveram percentuais de proteína óssea e valores de osteocalcina maiores, do que aquelas que não tiveram suplementação ou receberam gelatina ( $p \leq 0,05$ ). A análise histológica mostrou maior espessura das trabéculas ósseas nos fêmures e vértebras das ratas que receberam HC. **Conclusão:** O HC contribuiu para uma maior conservação, composição e resistência óssea, quando comparado à gelatina.

**Palavras-chave:** colágeno; hidrolisado protéico; osteoporose; ovariectomia.

**Effect of consumption of collagen hydrolyzate as food supplement on the biochemical markers and on the compositional, biodynamic and histological characteristics of the bone of osteopenic rats**

**Elisa Jackix, Florência Cúneo, Jaime Amaya-Farfan**

**SUMMARY**

Osteoporosis, the skeletal disease of highest incidence in the world is characterized by the reduction of bone mass and commonly leads to increased susceptibility of fractures. In women, osteoporosis is associated to the cessation of estrogen secretion and menopause. Collagen accounts for approximately 95% of the bone proteins and is to a large extent responsible for its biomechanical properties. Collagen hydrolyzates (CH) consist of mixtures of peptides obtained by a partial hydrolysis of gelatins, which have received considerable scientific attention as potential repositories of osteoarticular tissues. **Objective:** to evaluate the effect of supplementing the diets of ovariectomized rats with a commercial CH upon the compositional, biomechanical and histological characteristics of the bone. **Methods:** 48 adult female rats were divided into 6 groups: 3 of them ovariectomized, 1 sham-operated and 2 intact, fed the AIN 93-M diet, supplemented with either CH or gelatin (Control), in two levels: (1) a dose equivalent to 5x the amount suggested for humans (10g/D) and (2) a dose 10x greater. After eight weeks of treatment, the bones of femurs and vertebrae were excised the blood collected and serum osteocalcin and serum alkaline phosphatase determined. For the bone, gross weight, protein and mineral content (Ca, Na, Zn, Fe, K, P, Mg, Mn, Pb and Cu) were determined. Histological analysis of bone tissue sections was also performed to compare the different treatments. Biomechanical strength was assessed by means of 3-point flexion and compression tests of the femurs and vertebrae, respectively. **Results:** the vertebrae of the ovariectomized group that received the higher dosage of CH withstood a load 4x greater and exhibited higher levels of protein and osteocalcin content than those that received the gelatin or no supplementation at all. Histological analysis of the femurs and vertebrae of castrated rats that received the CH showed greater thickness than those receiving the gelatin supplementation. **Conclusion:** CH consumption as a diet supplement by the ovariectomized rat had an unequivocal contribution in the conservation or preservation of bone mass not seen when gelatin was used as a supplement.

**keywords:** collagen; protein hydrolyzate; bone; osteoporosis; ovariectomy; gelatin.

## **1. INTRODUÇÃO**

A osteoporose constitui a enfermidade do esqueleto de maior incidência mundial, sendo responsável por 1,5 milhões de fraturas por ano nos EUA<sup>1</sup>. O tratamento de fraturas por osteoporose acarreta custos bastante elevados para o serviço de saúde pública no Brasil e no mundo<sup>2</sup>.

A osteopenia e a osteoporose são diferentes estágios da doença óssea, caracterizadas pela redução da massa óssea e deterioração da estrutura do tecido ósseo, levando à maior fragilidade do osso, com aumento da susceptibilidade a fraturas. A osteoporose ocorre com mais frequência em populações idosas, mas pode ser resultado do desenvolvimento inadequado do pico de massa óssea, ou à excessiva perda óssea durante a idade adulta<sup>3,4</sup>. Nas mulheres, a osteoporose está intimamente associada à queda dos níveis de estrogênio, que acompanha a menopausa<sup>5</sup>.

Diversos estudos têm utilizado a rata castrada como modelo experimental para simular a osteopenia ou osteoporose em mulheres menopáusicas, em função das semelhanças entre os mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea<sup>6-11</sup>. A perda de massa óssea que ocorre na mulher após a menopausa, assim como na rata castrada é decorrente, principalmente, da redução nos níveis séricos de estrogênio<sup>12</sup>.

Geralmente, o tratamento da osteoporose inclui o uso de bifosfanatos, raloxifeno, derivados de paratormônio, ou a terapia hormonal (TH) que, quando associados a exercícios físicos, suplementação de vitamina D e cálcio promove uma melhora na massa óssea e redução do risco de fraturas. No entanto, a TH aumenta os riscos do desenvolvimento de câncer e os medicamentos utilizados podem acarretar efeitos colaterais

indesejáveis<sup>13</sup>. Neste contexto, observa-se a necessidade da realização de estudos que avaliem a segurança e efetividade de tratamentos alternativos.

O colágeno compreende cerca de 95% das proteínas dos ossos, e é abundante também na pele e tendões<sup>14</sup>. São conhecidos 20 tipos diferentes de colágeno, os quais variam em relação ao comprimento de sua tripla-hélice, os resíduos glicídicos e a sua função, mas o tipo I é predominante no tecido ósseo. As fibras de colágeno são parcialmente responsáveis pelas propriedades biomecânicas do osso, como resistência à pressão sob o mesmo, e também, por dar suporte aos músculos e à pele<sup>15,16</sup>.

A alimentação e alguns nutrientes específicos possuem uma estreita relação com a saúde óssea. Hidrolisados protéicos têm sido utilizados tanto com finalidades clínica e nutricional como para melhoria de propriedades funcionais de proteínas e alimentos de base protéica<sup>17</sup>. Sabe-se que os di e tripeptídeos são absorvidos mais rapidamente, quando comparados aos aminoácidos livres ou à proteína intacta. Adicionalmente, algumas pesquisas evidenciaram efeitos dos hidrolisados relacionados à ação bioativa dos peptídeos, como redução da pressão sanguínea<sup>18,19</sup>, aumento da absorção mineral e efeitos imunomodulatórios<sup>20</sup>.

Os hidrolisados enzimáticos de colágeno (HC) são produtos obtidos a partir da hidrólise da gelatina e já são comercializados para o público em geral pelo mercado farmacêutico, como produto de venda livre. A sua inocuidade à saúde humana é testemunhada pelo status concedido pela FDA americana de *GRAS* (*generally recognized as safe*)<sup>13</sup>. Esse produto tem recebido atenção pelas suas possíveis propriedades no tratamento de doenças osteoarticulares. No entanto, são poucos os estudos que buscaram estudar o efeito fisiológico da administração oral de hidrolisado de colágeno sobre o osso osteoporótico.

Diante dessas considerações, este estudo teve como objetivo principal investigar o efeito da administração oral de hidrolisado de colágeno, como suplemento protéico, sobre os marcadores bioquímicos de formação óssea, resistência biomecânica, e composição óssea e características histológicas de ratas ovariectomizadas, utilizadas como modelo experimental de osteoporose.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais**

Quarenta e oito ratas da linhagem Wistar, provenientes do Centro Multidisciplinar para investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP foram mantidas em gaiolas individuais, em ambiente com controle de temperatura  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ciclos de luz-escuro alternados a cada 12h. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética, do Instituto de Biologia da UNICAMP (anexo 1).

Aos três meses de idade os animais foram divididos em 6 grupos: 3 ovariectomizados (“OVX”), 2 intactos (“I”), os quais não sofreram qualquer procedimento cirúrgico, e um grupo *sham-operated*, submetido apenas a uma cirurgia simulando a ovariectomia. Embora não haja um consenso no tempo para que a osteopenia ou osteoporose se desenvolva nas ratas, alguns estudos referem que a osteopenia se manifesta um mês após a ovariectomia<sup>21,22</sup>. Neste estudo a ovariectomia foi realizada segundo técnica descrita por CARVALHO<sup>22</sup> em ratas com 3 meses de idade. O controle de ganho de peso e consumo alimentar das ratas foi feito três vezes por semana.

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com cetamina, 80 mg/kg, e xilazina, 8 mg/kg<sup>23</sup>. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e as vértebras e fêmures, extirpados.

## **2.2. Dietas**

Água e ração comercial (Nuvital, Curitiba) foram oferecidas *ad libitum* até os 4 meses de idade. Ao iniciar o tratamento com HC (após a instalação de um quadro de osteopenia), a alimentação passou a ser controlada utilizando-se como referência o consumo dos grupos intactos, a fim de minimizar o aumento do peso corpóreo das ratas associado à ovariectomia<sup>24</sup>. O tratamento teve oito semanas de duração (até o momento em que as ratas completaram 6 meses de idade).

Para a formulação das dietas experimentais utilizaram-se os ingredientes recomendados pelo *American Institute of Nutrition* para ratos adultos<sup>25</sup>. Na dieta tratamento, suplementou-se HC (GELITA South America), adicionado na forma de pó às dietas experimentais. A dieta controle foi suplementada de gelatina, grau farmacêutico, também na forma de pó, de acordo com a quantidade de HC adicionado às experimentais. A composição centesimal das dietas utilizadas encontra-se no anexo 2 e o protocolo dietético para os diferentes grupos experimentais, na tabela 1.

A quantidade de HC suplementada foi em dois níveis: HC5, proporcional a 5 vezes a quantidade recomendada como suplemento para humanos (10g/dia para um adulto de 60kg), e HC10, ou duas vezes o nível 5.

Tabela 1. Protocolo dietético

Grupos	Tratamentos	Dosagens (g/D)	Dosagens
OVX-HC5	Hidrolisado de colágeno	0,207	equivalente a 5x a dose (10g/D) para humanos
OVX-HC10	Hidrolisado de colágeno	0,415	equivalente a 10x a dose (10g/D) para humanos
OVX-G	Gelatina	0,415	equivalente a 10x a dose (10g/D) para humanos
I-G	Gelatina	0,415	equivalente a 10x a dose (10g/D) para humanos
I-HC	Hidrolisado de colágeno	0,415	equivalente a 10x a dose (10g/D) para humanos
SHAM-HC	Hidrolisado de colágeno	0,415	equivalente a 10x a dose (10g/D) para humanos

### 2.3. Composição química dos fêmures e vértebras

Determinou-se o teor de Ca, Na, Zn, Fe, K, P, Mg, Mn, Pb e Cu por meio de espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) em equipamento BAIARD ICP 2000, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL; cinzas (A.A.C.C., 1990)<sup>26</sup> e proteínas totais pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1975)<sup>27</sup>, utilizando como fator de conversão de proteínas: 6,25.

### 2.4. Parâmetros físicos dos fêmures e vértebras

Os ossos foram limpos por meio da retirada dos tecidos moles com a utilização de tesoura e bisturi. Realizou-se a medição do peso de todos os ossos e diâmetros menor e maior das epífises dos fêmures.

### 2.5. Parâmetros biomecânicos

Após extirpação, os ossos foram armazenados individualmente, envoltos em gases umedecidas com solução salina (0,9% de NaCl) e, congelados à -20°C durante um mês. Para o ensaio, fêmures e vértebras foram descongelados por 12 horas e mergulhados em

solução salina (0,9% de NaCl), onde permaneceram por mais aproximadamente 4 horas, segundo técnica descrita por MELLO<sup>28</sup>.

Realizou-se o teste de flexão em três pontos para os fêmures, e o teste de compressão nas vértebras. No teste de flexão em três pontos os fêmures foram apoiados em suas extremidades, sobre dois suportes distanciados 18 mm. Foi então aplicada uma força na porção medial do osso. No teste de compressão as vértebras foram apoiadas sobre uma superfície plana. Para ambos os testes a velocidade da força aplicada foi de 2mm/min. A cada incremento de carga registrou-se a deformação correspondente para construção do gráfico carga vs deformação, por meio do *software* acoplado ao equipamento MTS modelo TestStar II, da Faculdade de Engenharia Mecânica/UNICAMP. A partir desse gráfico calculou-se a carga máxima, que corresponde a maior carga aplicada durante o ensaio, até o momento de ruptura do osso<sup>28</sup>.

## **2.6. Análise histológica do tecido ósseo**

Com o objetivo de observar alterações nas características das trabéculas ósseas, cortes histológicos coletados de animais submetidos aos diferentes tratamentos foram descalcificados, corados e fotografados em microscópio de luz. As imagens foram capturadas em câmera digital, e processadas no programa Image Pro-Plus do Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia da UNICAMP.

## **2.7. Marcadores bioquímicos de formação óssea**

Fosfatase Alcalina Total e Óssea: foi realizada pelo laboratório LAB&VET (SP)<sup>29</sup> em soro. A fração óssea (termolábil) foi determinada por diferença entre a fração total e a termoestável (hepática, intestinal, placentária, Nagao, Regan e Kasahara).

Osteocalcina: determinada em soro, por meio de imunoenensaio enzimático (Metra Osteocalcin - Quidel).

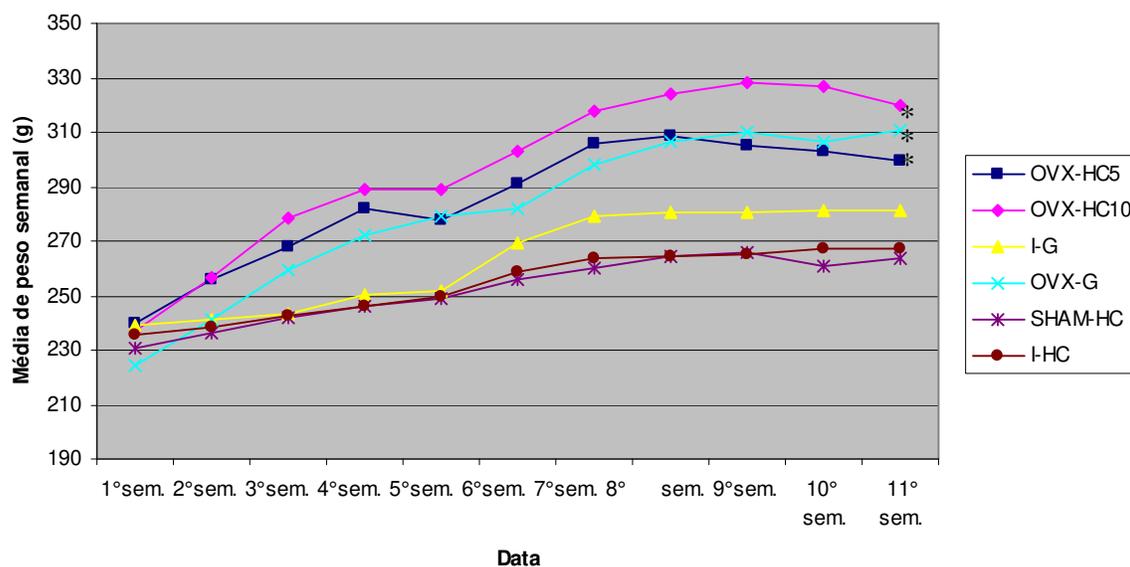
## 2.8. Tratamento estatístico dos dados

A análise dos dados foi feita pela ANOVA multivariada do software GraphPad Instat 3, utilizando-se o teste de Tukey para verificar as diferenças entre os tratamentos, no nível mínimo de significância convencional de 5%.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modelos de osteoporose experimental geralmente são representados pela rata ovariectomizada. O tratamento da osteoporose com proteína do soro do leite, isoflavonas da soja e estradiol, por exemplo, tem sido utilizado em ratas ovariectomizadas para suprimir os efeitos da redução dos níveis de estrogênio, ocasionados pela ovariectomia. Este estudo utilizou a rata castrada para avaliação do efeito do HC sobre algumas características ósseas.

Analisando a evolução de peso após a cirurgia, observou-se que as ratas ovariectomizadas tiveram maior ganho de peso comparado com as intactas e *sham-operated* (Figura 1), embora sem diferenças significativas na ingestão alimentar entre esses grupos ( $p=0,1198$ ).



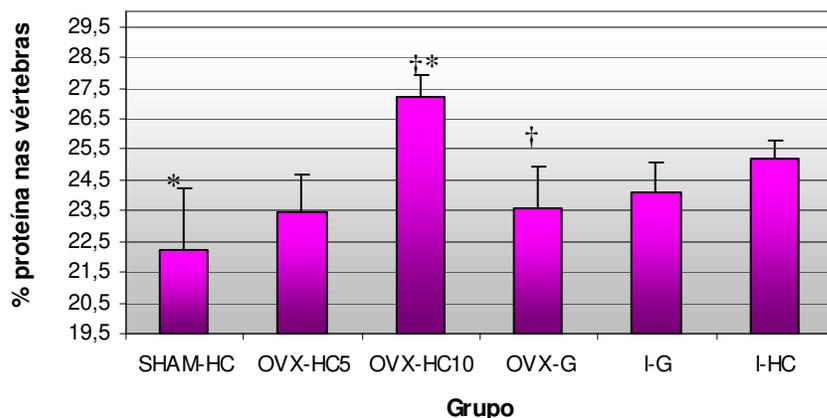
**Figura 1.** Evolução ponderal das ratas dos diferentes grupos experimentais registrada durante as 11 semanas após ovariectomia.

n = 8 ratas por grupo;  $p < 0,05$  (teste Tukey): \* vs intactos (I-G e I-HC) e Sham-operated (SHAM-HC).

Apesar do maior ganho de peso nos animais castrados em relação aos intactos, não foram encontradas diferenças nos diâmetros das diáfises dos fêmures entre os grupos.

Tais resultados se mostram coerentes com os encontrados na literatura<sup>27, 21,28</sup>. O maior ganho de peso nas ratas castradas parece estar associado à falta do efeito regulatório do estrogênio sobre a gordura corporal. Segundo HIDAKA<sup>11</sup>, as ratas ovariectomizadas consomem maior quantidade de alimento e o utilizam mais eficientemente, o qual é consistente com o fato de que os grupos ovariectomizados ganharam mais peso, mesmo na condição de consumo pareado. Entende-se que a ausência do estrogênio precipita o acúmulo da gordura corporal e o desenvolvimento da osteoporose.

O sucesso da ovariectomia também pode ser verificado no momento do sacrifício dos animais, uma vez que o tecido uterino encontrava-se atrofiado.



**Figura 2.** Valores médios e erro padrão dos teores protéicos das vértebras, obtidos após 8 semanas de suplementação, nos diferentes grupos.

n= 6 ratas por grupo;

\*  $p < 0,05$  (teste Tukey): OVX-HC10 vs OVX-G;

†  $p < 0,05$  (teste Tukey): OVX-HC10 vs SHAM-HC

O conteúdo protéico das vértebras nas ratas castradas que receberam HC na maior proporção foi maior quando comparado às ratas que consumiram gelatina, indicando que o hidrolisado pode contribuir para um maior teor de proteínas no osso de ratas osteopênicas. Quanto aos fêmures, embora os resultados não tenham apresentado diferença estatística no teor protéico entre os grupos experimentais ( $p=0,1914$ ), as ratas castradas que receberam HC apresentaram fêmures com maior teor protéico em relação às castradas, com gelatina (22,3% e 21,3%, respectivamente).

O HC e a gelatina possuem a mesma composição aminoacídica, entretanto, a gelatina não acarretou em aumento no teor protéico nas vértebras ou fêmures. Os resultados encontrados sugerem que o maior teor de proteínas, encontrado nas vértebras, pode ser decorrente de uma absorção mais efetiva do hidrolisado em relação à gelatina.

OESSER *et al*<sup>30</sup>, ao investigar o tempo de absorção de um HC e sua distribuição nos diversos tecidos de ratos observou que, 95% do hidrolisado foi absorvido nas primeiras 12

horas após a ingestão, o que indica que mesmo peptídeos de maior PM (10 kDa) podem ser absorvidos. Adicionalmente, observou-se uma maior deposição de colágeno nos ossos e cartilagens nos grupos que consumiram HC. Em estudo *in vitro*, realizado mais recentemente pelo mesmo autor, observou-se uma maior estimulação de condrocitos (principais células encontradas nas cartilagens) após a adição de HC, indicando que o HC pode estimular a síntese de colágeno tipo II<sup>31</sup>. A maior síntese e deposição de colágeno nos ossos contribui para um aumento no teor protéico do osso.

NOMURA *et al*<sup>32</sup>, observaram maior teor de colágeno tipo I em ratas ovariectomizadas que consumiram HC, em relação ao grupo controle (com albumina). Nesse estudo, os autores relatam que a metodologia utilizada para quantificar o colágeno extrai apenas o colágeno novo, ou seja, apenas o colágeno que ainda não está preso aos *cross-linkings* da matriz óssea. Dessa forma, o colágeno analisado tinha sido sintetizado recentemente, demonstrando que a suplementação com HC foi capaz de induzir a produção de colágeno tipo I.

Portanto, o maior teor protéico encontrado nas vértebras das ratas que receberam o HC na maior proporção, pode ser justificado pela maior absorção de peptídeos provenientes do HC, além de uma maior deposição desses peptídeos nos ossos. Além disso, pode ter ocorrido um estímulo da síntese de colágeno tipo I pelos osteoblastos, pela possível presença de peptídeos bioativos na proteína hidrolisada, mas não na intacta.

**Tabela 2.** Valores médios de peso (g) e erro padrão (fêmures e vértebras) dos diferentes grupos, obtidos após 8 semanas de suplementação.

Grupos	Peso médio dos fêmures (g)	Peso médio das vértebras (g)
I-G	0,71 ± 0,013	0,15 ± 0,003
I-HC	0,62 ± 0,025	0,08 ± 0,005#
SHAM-HC	0,62 ± 0,015	0,12 ± 0,005
OVX-HC5	0,76 ± 0,021*†	0,12 ± 0,013
OVX-HC10	0,73 ± 0,022*†	0,14 ± 0,005*
OVX-G	0,66 ± 0,029	0,13 ± 0,010

n = 8

Para fêmures: p&lt;0,05 (teste Tukey):

\* vs I-HC

† vs SHAM-HC

Para vértebras: p&lt;0,05 (teste Tukey):

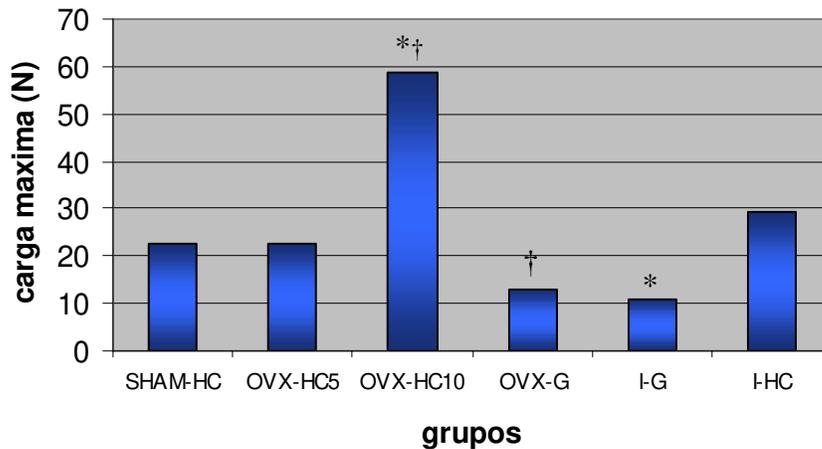
\* vs I-HC

# vs I-G

Comparando o peso dos fêmures, entre os grupos que receberam HC, observou-se que os ossos dos animais ovariectomizados pesavam mais do que os intactos e *sham operated* (Tabela 2). Esse resultado demonstra que o tratamento com HC foi capaz de elevar o peso ósseo das ratas com osteoporose, mas não dos animais saudáveis, sugerindo que a ação dos peptídeos bioativos de colágeno são efetivas apenas quando a massa óssea estiver comprometida. Adicionalmente, embora sem diferença estatística, o peso médio dos fêmures foi menor para o grupo ovariectomizado que recebeu gelatina, comprovando que o tratamento com HC pode ter acarretado um aumento de peso nos fêmures desses animais. Isso pode ser reflexo de uma maior deposição protéica nos ossos, observado pelo maior teor de proteína óssea encontrado nos fêmures, embora não tenha sido significativo estatisticamente.

No caso das vértebras, entre os grupos intactos, aquele que recebeu gelatina teve maior peso (Tabela 2), sugerindo que para as ratas não osteopênicas a gelatina pareceu

exercer um efeito aditivo sobre o peso ósseo. Ainda com relação às vértebras, o grupo intacto tratado com HC apresentou menor média de peso em relação ao grupo ovariectomizado que recebeu o mesmo tratamento. Esse resultado se mostra coerente com aqueles encontrados nos fêmures, o que reforça a hipótese de que a suplementação com HC tem efeito apenas nos ossos osteopênicos.



**Figura 3.** Carga máxima para vértebras (valores médios e erro padrão), obtida por meio do ensaio de compressão, após 8 semanas de suplementação, nos diferentes grupos.

n= 4 por grupo;

\*  $p < 0,05$  (teste Tukey): OVX-HC10 vs OVX-G;

†  $p < 0,05$  (teste Tukey): OVX-HC10 vs I-G.

O desempenho mecânico do osso pode ser estudado por meio da realização de testes biomecânicos. A caracterização funcional do osso, como uma estrutura dinâmica pode fornecer dados fundamentais sobre a resistência óssea e conseqüentemente, sobre a qualidade do osso.

Os resultados do ensaio mecânico (Figura 3) mostram que as vértebras das ratas que receberam suplementação com HC na maior proporção suportaram maior carga, em relação

às que receberam gelatina, indicando que o HC pode contribuir para uma maior resistência do osso ao esforço e à pressão na rata osteopênica.

Em relação à carga máxima nos fêmures (dados não mostrados graficamente) observou-se que não houve diferença estatística entre os grupos tratados com HC e os tratados com gelatina ( $p=0,3521$ ). Tudo parece indicar que nos fêmures, a resposta ao tratamento com HC foi diferente ao das vértebras, já que possuem maior quantidade de osso cortical, diferentemente das vértebras, onde o osso trabecular é predominante, metabolicamente mais ativo e mais sensível às alterações metabólicas. Desta maneira, a perda de massa óssea no tecido trabecular resulta ser maior do que no cortical. Sendo assim, os dados sugerem que a perda óssea no tecido cortical, causada pela ovariectomia, não tenha sido suficiente para ocasionar uma alteração na resistência mecânica dos fêmures.

Assim, a carga máxima aumentada observada nas vértebras dos grupos ovariectomizados tratados com HC pode ser o reflexo da melhora da estrutura, ou aumento da robustez, do tecido trabecular.

Os efeitos do HC sobre a biomecânica do osso ainda não foram observados. No entanto, este estudo mostrou que o HC parece contribuir para a preservação da resistência máxima das vértebras.

**Tabela 3.** Valores médios e erro padrão de osteocalcina sérica (ng/mL), analisados após 8 semanas de suplementação, nos diferentes grupos.

Grupos	Osteocalcina (ng/mL)
I-G	7,2 ± 0,17*
I-HC	6,32 ± 0,33
SHAM-HC	7,38 ± 0,13*
OVX-HC5	6,39 ± 0,4
OVX-HC10	5,26 ± 0,43
OVX-G	7,69 ± 0,32*

n= 4; \*  $p < 0,05$  (teste Tukey): vs OVX-HC5.

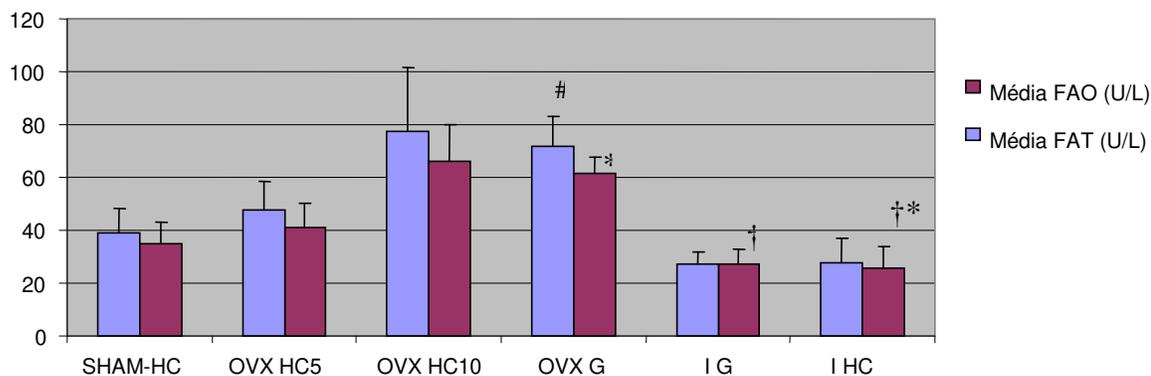
A osteocalcina reflete especificamente a atividade osteoblástica, sendo que após liberação pelo osteoblasto, a maior parte desta proteína é incorporada pela matriz extracelular uma vez que possui forte interação com o cálcio e com cristais de hidroxiapatita<sup>33</sup>. Uma pequena fração do total é liberada para a circulação, onde pode ser detectada por meio de imunoenaios.

Os níveis séricos de osteocalcina foram maiores no grupo ovariectomizado que recebeu gelatina, em comparação ao grupo tratado com HC (Tabela 3). Isso indica que a concentração de osteocalcina liberada na circulação sanguínea foi menor nas ratas que receberam o hidrolisado na maior dosagem porque mais moléculas de osteocalcina foram retidas no osso, restando apenas uma pequena fração para ser liberada na corrente sanguínea.

Outros estudos envolvendo a administração de fatores promotores da deposição de massa óssea (PTH e estrogênio) em ratas castradas também demonstraram uma menor concentração sérica de osteocalcina nos grupos tratados<sup>34</sup>. A conclusão dos autores foi que a combinação destes fatores deve contribuir no tratamento da osteoporose pós-

menopausica. SZULC e cols<sup>35</sup>, em estudo realizado com 195 mulheres idosas, por sua vez, observaram que os níveis séricos de osteocalcina nos grupos tratados com cálcio e vitamina D foram menores do que naqueles que receberam o placebo, sugerindo que esses nutrientes têm uma ação indireta sobre o *turnover* ósseo e podem contribuir para a manutenção da massa óssea.

Na Figura 4 estão expressos os resultados de fosfatase alcalina total e óssea, obtidos ao final do ensaio para os diferentes grupos experimentais. Comparando, tanto os valores de FAT, como os de FAO dos grupos ovariectomizados (OVX), os intactos (I), foi constatado que as ratas ovariectomizadas que receberam HC na maior proporção, apresentaram valores estatisticamente maiores de FAT e FAO ( $p=0,025$  e  $0,0081$ , respectivamente). Esse resultado não era esperado, pois demonstrou que a ovariectomia, por si só, pode ter uma influência na massa óssea, contrária ao aumento da atividade enzimática, sugerindo que a maior atividade da fosfatase alcalina é apenas compatível com a tentativa compensatória do organismo, mas não necessariamente com um aumento na massa óssea.



**Figura 4.** Valores de Fosfatase Alcalina Total (FAT) e Óssea (FAO) (valores médios e erro padrão), obtidos após 8 semanas de suplementação, nos diferentes grupos.

n = 4 por grupo;

FAT:

# p<0,05 (teste de Tukey): OVX-G vs I-G

FAO:

\* p<0,05 (teste de Tukey): OVX-HC10 vs I-G e I-HC

† p<0,05 (teste de Tukey): OVX-G vs I-HC

**Tabela 4.** Valores médios e erro padrão do conteúdo mineral ósseo (mg/kg) de fêmures.

Elemento (mg/kg)	Grupos					
	OVX-HC10	I-G	OVX-HC5	OVX-G	SHAM-HC	I-HC
Cálcio	193569 ± 3063	200822 ± 9550	189200 ± 6984	173010 ± 21149	198447 ± 330	<b>159295 ± 11673*</b>
Cobre	26 ± 1	27 ± 1	26 ± 1	20 ± 3	25 ± 2	<b>19 ± 2 *</b>
Ferro	62 ± 6	76 ± 14	72 ± 8	62 ± 22	65 ± 12	42 ± 12
Potássio	2120 ± 88	1852 ± 106	1875 ± 206	<b>1784 ± 120 †</b>	17801 ± 196	<b>1502 ± 180 †</b>
Manganês	0,86 ± 0,26	0,65 ± 0,08	0,84 ± 0,15	0,69 ± 0,08	2,02 ± 1,32	0,65 ± 0,21
Sódio	5044 ± 91	5256 ± 249	4948 ± 125	5077 ± 174	5106 ± 35	4681 ± 181
Fósforo	93286 ± 1706	86199 ± 4107	82012 ± 3403	68721 ± 14876	86407 ± 562	<b>62505,9 ± 8996,44 †</b>
Chumbo	0	0	0	0	0	0
Zinco	185 ± 10	211 ± 12	180 ± 7	155 ± 25	177 ± 5	<b>135 ± 8 *</b>
Magnésio	3187 ± 44	3449 ± 124	3246 ± 91	2737 ± 374	3157 ± 87	<b>2338 ± 122*†#</b>

n = 4; p < 0,05 (teste de Tukey):

\* vs I-G

† vs OVX-HC10

# vs OVX-HC5

**Tabela 5.** Valores médios e erro padrão do conteúdo mineral ósseo (mg/kg) de vértebras.

Elemento (mg/kg)	Grupos					
	OVX-HC10	I-G	OVX-HC5	OVX-G	SHAM-HC	I-HC
Cálcio	157190 ± 9393	189792 ± 6943	194675 ± 4889	181225 ± 9487	178198 ± 1945	204678 ± 2377
Cobre	9,27 ± 7,82	7,62 ± 7,28	3,12 ± 2,63	10,78 ± 4,82	18,08 ± 1,66	<b>4,54 ± 2,65 #</b>
Ferro	231 ± 54	206 ± 67	183 ± 21	106 ± 19	106 ± 17	473 ± 29
Potássio	2441 ± 179	3205 ± 333	2486 ± 251	<b>1083 ± 194 †*</b>	<b>1088 ± 344 †*</b>	<b>520 ± 195 †</b>
Manganês	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sódio	4623 ± 162	5491 ± 193	5812 ± 281	4276 ± 377	4391 ± 399	4238 ± 257
Fósforo	74915 ± 3930	91804 ± 3915	93333 ± 3372	83874 ± 4708	82977 ± 2719	94722 ± 1064
Chumbo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zinco	239 ± 45	256 ± 5	275 ± 18	244 ± 2	254 ± 11	284 ± 10
Magnésio	2746 ± 156	3498 ± 116	3387 ± 91	ND	3410 ± 107	ND

n = 4; p < 0,05 (teste de Tukey):

\* vs I-G

† vs OVX-HC10

# vs SHAM-HC

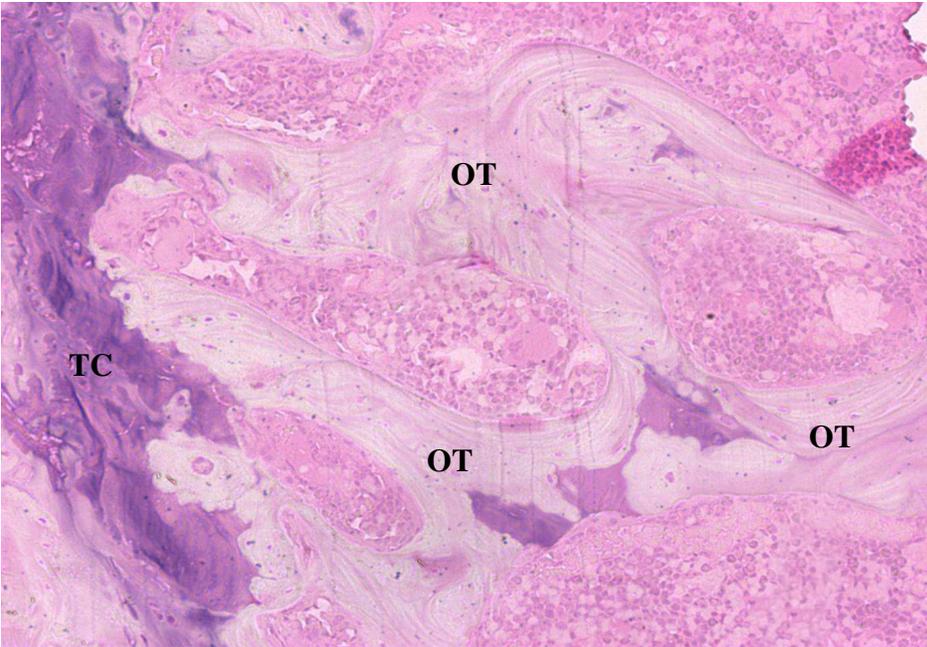
O conteúdo mineral ósseo encontrado está descrito nas Tabelas 4 e 5. Os valores de massa óssea devem ser considerados válidos quando forem menores nas ratas ovariectomizadas do que as do grupo basal<sup>28</sup>. Este estudo não utilizou um grupo sem suplementação nenhuma, já que o objetivo era comparar o efeito da suplementação de hidrolisado de colágeno com a gelatina. Por isso, compararam-se as médias entre o grupo ovariectomizado consumindo o HC e a gelatina. Embora sem diferença estatística, observou-se uma maior concentração de minerais (cálcio, cobre, potássio, manganês, fósforo, zinco e magnésio) nos fêmures e vértebras das ratas que receberam o hidrolisado de colágeno, quando comparado às que receberam gelatina. Ou seja, os animais castrados que foram suplementados com gelatina (grupo controle) apresentaram quantidades menores de minerais ósseos.

Este resultado evidencia que a ingestão de HC contribuiu para um aumento do conteúdo mineral ósseo, o que não foi visto nos animais osteopênicos suplementados com gelatina. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos realizados por Wu *et al*<sup>14</sup> e Nomura *et al*<sup>21</sup>. Em ambos observou-se um aumento da densidade mineral óssea nos grupos que receberam tratamento com HC, embora não tenham qualificado os minerais ósseos.

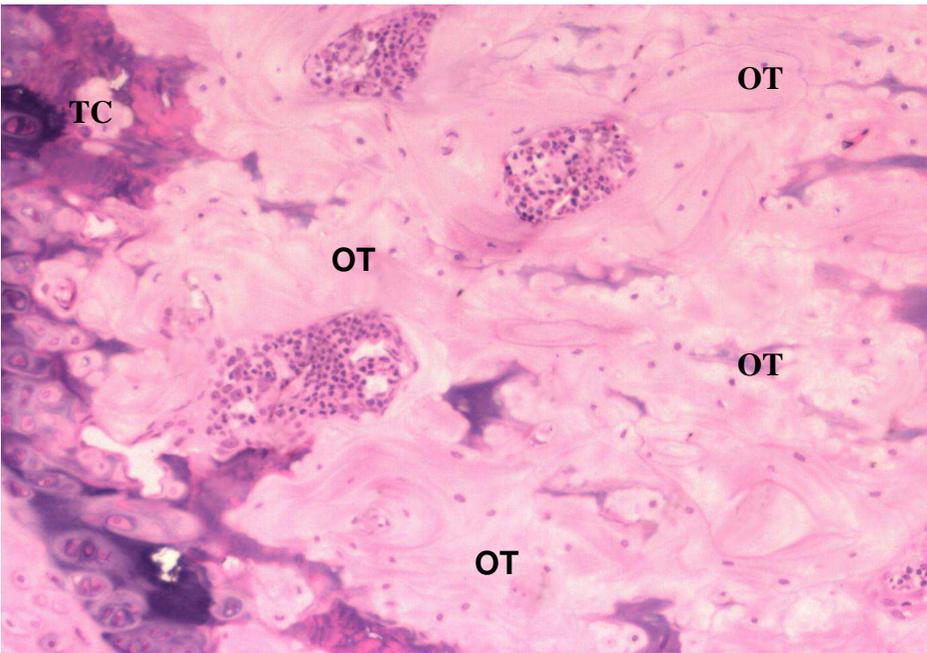
Observa-se que, tanto nas vértebras como nos fêmures, houve uma maior concentração de potássio entre os grupos castrados que receberam o hidrolisado de colágeno comparado com o castrado, com gelatina ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, entre os grupos intactos, aquele que recebeu gelatina teve uma concentração óssea de cálcio, cobre, fósforo e magnésio significativamente maior nos fêmures, sugerindo que o hidrolisado não tem efeito benéfico sobre o osso de ratas saudáveis e que, nestes casos, a gelatina parece aumentar mais o conteúdo mineral ósseo do que o hidrolisado. Ainda com relação aos

fêmures, o grupo intacto que recebeu hidrolisado teve a menor concentração de minerais em relação a todos os outros grupos.

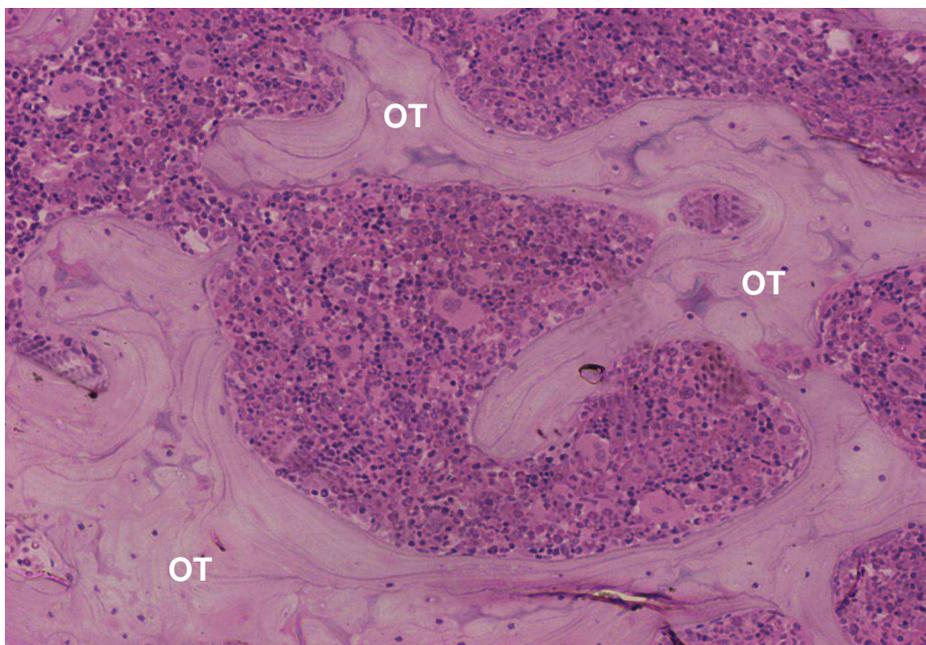
FUGITA e colaboradores (2002), estudaram o efeito da suplementação, por um período de 4 meses, de cálcio com colágeno sobre a dor nas articulações em mulheres idosas com osteoartrite. Os autores observaram que os grupos tratados tiveram redução da dor, comparando com os grupos placebo. FUGITA sugere que este fato pode estar associado a uma redução na reabsorção óssea, e que o colágeno pode agir sobre o sistema imune, impedindo ou reduzindo a liberação de citocinas que estimulem a reabsorção óssea por meio da liberação de colagenases. Portanto, os peptídeos de colágeno parecem contribuir para a preservação de massa óssea, também pela ação sobre o sistema imune. Entretanto, no atual estudo isso não foi verificado, embora sejam informações que nos auxiliam a explicar e entender os resultados encontrados.



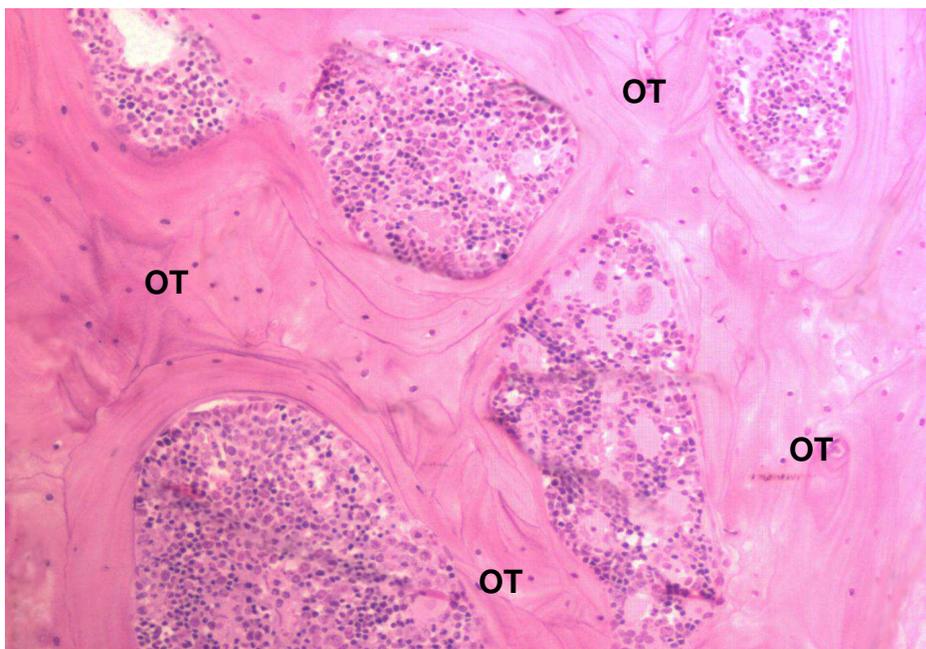
**Figura 5.** Microscopia da epífise de fêmur de ratas ovariectomizadas que receberam dieta suplementada com gelatina (**OVX-G**). Coloração com hematoxilina eosina. Aumento de 20 X. (**OT**) Tecido Ósseo Trabecular; (**TC**) Tecido cartilaginoso.



**Figura 6.** Microscopia da epífise de fêmur de ratas ovariectomizadas que receberam dieta suplementada com hidrolisado de colágeno (**OVX-HC10**). Coloração com hematoxilina eosina. Aumento de 20 X. (**OT**) Tecido Ósseo Trabecular; (**TC**) Tecido cartilaginoso.



**Figura 7.** Microscopia da vértebra de ratas ovariectomizadas que receberam dieta suplementada com gelatina (**OVX-G**). Coloração com hematoxilina eosina. Aumento de 20 X. (**T**) Trabéculas; (**OT**) Tecido Ósseo Trabecular. (**TC**) Tecido Cartilaginoso.



**Figura 8.** Microscopia da vértebra de ratas ovariectomizadas que receberam dieta suplementada com hidrolisado de colágeno (**OVX-HC10**). Coloração com hematoxilina eosina. Aumento de 20 X. (**OT**) Tecido Ósseo Trabecular. (**TC**) Tecido Cartilaginoso.

As fotografias histológicas dos fêmures das ratas ovariectomizadas podem ser observadas nas figuras 5 e 6; as vértebras podem ser observadas histologicamente nas figuras 7 e 8. As imagens obtidas pela microscopia de luz evidenciam algumas diferenças estruturais da região da cabeça femural e nas vértebras entre os grupos ovariectomizados tratados com gelatina e HC.

A presença de trabéculas e de tecido ósseo foi observada qualitativamente, não se utilizando métodos morfométricos. A formação e reabsorção óssea nos fêmures foram analisadas nas epífises, onde há maior presença de tecido esponjoso, o qual é mais susceptível à alterações, por ser mais vascularizado.

No grupo que recebeu dieta suplementada com hidrolisado de colágeno, observam-se trabéculas ósseas mais espessas quando comparado ao grupo controle (com gelatina). É possível observar no grupo tratado com o hidrolisado uma menor perda de osso trabecular do que no grupo que recebeu gelatina.

Esses resultados sugerem que no grupo ovariectomizado suplementado com gelatina houve diminuição de tecido ósseo com aumento da reabsorção óssea, observada pelo adelgaçamento das trabéculas, o que torna o osso mais susceptível a fraturas. A suplementação com gelatina não foi capaz de suprimir a perda óssea causada pela ovariectomia.

Em relação às vértebras, a análise qualitativa das fotos histológicas mostra tecido trabecular ósseo mais espesso e maior conectividade entre as trabéculas no grupo castrado que recebeu HC, comparado àquele que recebeu gelatina.

Resultados semelhantes foram observados por NOMURA *et al*<sup>32</sup>, ao comparar a administração de um hidrolisado de colágeno contra albumina (grupo controle) em ratas ovariectomizadas. Neste estudo o autor encontrou maior número de trabéculas ósseas nas

ratas castradas que receberam albumina, quando comparado com o grupo suplementado com o hidrolisado, sob as mesmas condições.

Estudos que analisem as características morfométricas são necessários para esclarecer a ação do HC sobre o número e espessura de trabéculas no osso de ratas osteopênicas.

#### **4. CONCLUSÃO**

No presente estudo demonstrou-se que a rata ovariectomizada pode ser utilizada como um modelo experimental seguro para simular a perda óssea em mulheres menopausadas. Isto pode ser evidenciado pelo aumento de peso nas ratas submetidas à castração e pela atrofia dos ovários.

Em relação à suplementação com o HC observou-se que o tratamento com esta proteína mostrou ser eficaz, quando analisamos determinados parâmetros como a osteocalcina, resistência mecânica e teor protéico.

Adicionalmente, a análise dos cortes histológicos indica diferenças estruturais entre os grupos tratados e o controle, com maior preservação de tecido trabecular ósseo no grupo ovariectomizado que recebeu HC.

Entretanto, o efeito benéfico do HC não foi igualmente verificado nas vértebras e nos fêmures, o que pode ser justificado pela diferença nos tipos de tecido presentes predominantemente em cada um desses tipos de osso.

A administração oral de HC foi capaz de aumentar a massa óssea, especialmente nas ratas ovariectomizadas, evidenciando que a ingestão de peptídeos de colágeno traz efeitos benéficos em ratas osteopênicas. Isto sugere que esses efeitos também possam ser observados em mulheres menopausadas. No entanto, mais estudos em humanos e animais

devem ser realizados para comprovar a eficácia e elucidar o real mecanismo de ação destes hidrolisados sobre o metabolismo ósseo.

**Agradecimentos.** Os autores reconhecem o auxílio financeiro do CNPq (Proc. 474573-2004-4).

#### **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. HAZEMBERG, J.G.; TAYLOR, D.; LEE, T.C. The role of osteocytes and bone microstructure in preventing osteoporotic fractures. **Osteoporosis Int.** Ireland, v. 18, p. 1-8, sep. 2007.
2. KOWALSKI, S.C.; SJENZFELD, V.L.; FERRAZ, M.B.; Utilização de recursos em osteoporose. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v. 47, n. 4, p. 352-357, out./dez. 2001.
3. SILVA, L.K. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós menopausa. **Cad. Saúde Pública.** Rio de Janeiro, v. 19, n.4, p. 987-1003. jul./ago. 2003.
4. WHO (World Health Organization). **Prevention and Management of Osteoporosis. Report of a WHO Scientific Group.** WHO Technical Report Series. Geneva. 2003. 201 p.
5. RIGGS, B.L. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. **J Clin Invest.** Minnesota, v. 106, n.10, p. 1203-04, nov. 2000.
6. CARVALHO, D.C.L. **Ação do ultra-som de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas.** 2001. 69 f. Tese de mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
7. KODAMA, I. et al. Estrogen regulates the production of VEGF for osteoclast formation and activity in op/op mice. **J Bone Miner Res.** v. 19, n. 2, p. 200-6. 2004.
8. KAVUNCU, V. et al. A comparison of estrogen and two different doses of calcitonin in ovariectomized rats. **Yonsei Medical Journal.** V. 44, n. 3, p. 508-216, jan. 2003.

9. PENG, Z. et al. Alteration in the mechanical competence and structural properties in the femoral neck and vertebrae of ovariectomized rats. **J Bone Miner Res.** v. 14, n. 4, p. 616-623. 1999.
10. GIAVARESI, G. et al. Different diagnostic techniques for the assessment of cortical bone on osteoporotic animals. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** v. 58, p. 494-499. 2004.
11. HIDAKA, S. et al. Royal Jelly Prevents Osteoporosis in Rats: Beneficial Effects in Ovariectomy Model and in Bone Tissue Culture Model. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 3, n. 3, p. 339-348. 2006.
12. WESTERLIND, K.C. et al. Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. **Proc Natl Acad Sci USA.** New York, v. 94, p. 4199-204, jan. 1997.
13. WHI (Women's Health Initiative). Questions and answers about the WHI postmenopausal hormone therapy trials. Disponível em [http://www.nhlbi.nih.gov/whi/whi\\_faq.htm](http://www.nhlbi.nih.gov/whi/whi_faq.htm), atualizado em abril/2004, acesso em: 10 de janeiro de 2008.
- MOSKOWITZ, RW. Role of Collagen Hydrolysate in Bone and Joint Disease, **Seminars in Arthritis and Rheumatism.** Cleveland, v. 30, n. 2, p. 87-99, oct. 2000.
14. WU, J. et al. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism.** Tokyo, v. 22, p. 547-553, apr. 2004.
15. MARK, K.V.D. Structure, biosynthesis, and gene regulation of collagens in cartilage. *In:* SEIBEL, M.J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism.** London, Academi Press, 1999. p. 3-7.
16. BOSKEY, A.L. Mineralization, Structure, and Function of bone. *In:* SEIBEL, M.J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism.** London, Academi Press, 1999. p. 153-162.

17. PACHECO, M.T.B. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 25, n. 2, p. 333-8, abr./jun. 2005.
18. FARIA, M. **Avaliação in vitro e in vivo da atividade anti-hipertensiva de hidrolisados comerciais de diversas fontes protéicas.** 2006. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, São Paulo.
19. VERCRUYSSSE, L.; CAMP, J.V.; SMAGGHE, G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: a review. **J Agric Food Chem.** V. 53, p. 8106-15, sep. 2005.
20. RUTHERFURD M.K.J.; MOUGHAN, P.J. Bioactive peptides derived from food. **J AOAC Int.** New Zealand, v. 88, n. 3, p. 955-66, may./jun. 2005.
21. CARDOSO, C.N. **Avaliação da biopotência dos fruttooigossacarídeos (FOS) e da terapia de reposição hormonal (TRH) no metabolismo de cálcio de ratas ovariectomizadas.** 2006. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, São Paulo.
22. CARVALHO, D.C.L. **Ação do ultra-som de baixa intensidade em ossos de ratas osteopênicas.** São Paulo, 2001. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo.
23. CÖMELEKOĞLU, U. Determining the biomechanical quality of normal and osteoporotic bones in rat femora through biomechanical test and finite element analysis. **Acta Orthop Traumatol Turc.** v. 41, n.1, p. 53-7. 2007.
24. FONSECA, D.; WARD, W.E.; Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. **Bone.** Toronto, v. 35, p. 489-97, mar. 2004.
25. REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.** v. 123, p. 193-51. 1993.
26. AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists.** Saint Paul. v. 1. 1983.

27. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, A.O.A.C. **Method 979.09. Semi-Micro-Kjeldahl**. Washington, D.C. 15<sup>a</sup> ed. 1990.
28. MELLO, L.C.P.; GOMIDE, L.B. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. **Rev Nutr.** v. 18, n. 5, p. 593-600. 2005.
29. Av. Escola Politécnica, 4445 São Paulo – SP 05350-000 Tel/Fax: (11) 819-2297 e-mail: [lab&vet@xpnet.com.br](mailto:lab&vet@xpnet.com.br).
30. OESSER, S. et al. Oral administration of <sup>14</sup>C-labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). **Journal of Nutrition**. Eberbach, v. 129, p. 1891-95, mar. 1999.
31. OESSER S. et al. **Cell & Tissue Research**. v. 311, p. 393-99. 2003.
32. NOMURA, Y. et al. Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. **Nutrition**. Tokyo, v. 21, p. 1120-26, mar. 2005.
33. INGRAM, R.T. et al. Age and gender-related changes in the distribution of osteocalcin in the extracellular matrix of normal male and female bone. Possible involvement of osteocalcin in bone remodeling. **J Clin Invest**. v. 93, n. 3, p. 989-97. 1994.
34. SHEN, V. et al. Effects of reciprocal treatment with estrogen and estrogen plus parathyroid hormone on bone structure and strength in ovariectomized rats. **J Clin Invest**. New York, v. 96, p. 2331-2338, nov. 1995.
35. SZULC, P.; CHAPUY, M.C.; MEUNIER, P.J.; DELMAS, P.D. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly woman. **J Clin Invest**. Florence, v. 91, p. 1769-1774, apr. 1993.
36. FUGITA. T. et al. The effect of active, absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**. v.20, p. 298-302. 2002.

ANEXO 1



ANEXO 2

## Composição centesimal das dietas utilizadas

Grupo experimental	% cinzas <sup>1</sup>	% umidade <sup>2</sup>	% proteínas <sup>3</sup>	% lipídeos <sup>4</sup>	% carboidratos <sup>5</sup>
OVX HC 5	2,27 ± 0,28	7,72 ± 0,28	13,12 ± 0,47	4,25 ± 0,14	72,33 ± 0,88
OVX HC 10	2,45 ± 0,66	7,77 ± 0,49	13,78 ± 0,28	4,85 ± 0,01	71,31 ± 1,66
OVX G	2,25 ± 0,92	7,37 ± 0,45	15,43 ± 1,71	4,93 ± 0,44	69,96 ± 1,42
SHAM HC	2,42 ± 0,09	8,45 ± 0,68	13,78 ± 0,6	4,04 ± 0,28	70,78 ± 0,3
I G	2,64 ± 0,01	7,8 ± 0,28	15,43 ± 0,3	4,59 ± 0,36	69,54 ± 0,46
I HC	2,1 ± 0,1	8,17 ± 0,17	13,78 ± 0,18	4,53 ± 0,09	72,30 ± 0,19

1. Obtida pelo método cinzas (A.A.C.C., 1990)<sup>26</sup>
2. Obtida pelo método Instituto Adolfo Lutz, 1985.
3. Obtidas pelo método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1975)<sup>27</sup>
4. Obtidos pelo método de Bligt & Dyer, 1959
5. Obtidos por diferença.