

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E
NUTRIÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS NUTRICIONAIS**

RENATA DESSORDI

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM BORO NO METABOLISMO ÓSSEO DE
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS NÃO OBESOS**

Araraquara

2015

RENATA DESSORDI

**Efeito da suplementação com boro no metabolismo ósseo de camundongos diabéticos não
obesos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP para a obtenção do título de Mestre em Ciências Nutricionais

Orientador: Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro.

Araraquara

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

D475e Dessordi, Renata
Efeito da suplementação com Boro no metabolismo ósseo de camundongos diabéticos não obesos / Renata Dessordi. – Araraquara, 2015
61 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Anderson Marliere Navarro

1. Diabetes. 2. Osteopenia. 3. Suplementação. 4. Metabolismo Ósseo. 5. Boro. I. Navarro, Anderson Marliere, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

DESSORDI, Renata

Efeito da suplementação com boro no metabolismo ósseo de camundongos diabéticos não obesos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do título de mestre em Alimentos em Nutrição com Ênfase em Ciências Nutricionais.

Aprovada em: 21/08/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro (Orientador) Instituição: Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP/USP

Julgamento: Aprovado

Prof^ª. Dr^ª. Thais Borges César Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual Paulista UNESP

Julgamento: Aprovado

Prof^ª. Dr^ª. Telma Maria Braga Costa Instituição: Universidade de Ribeirão Preto
(UNAERP)

Julgamento: Aprovado

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Carmem e Rogério, e avós, Renato e
Aparecida, por todo o apoio e ajuda.
AMO VOCÊS!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda minha força e esperança, por sempre estar ao meu lado iluminando meu caminho e minhas escolhas e por ter me dado força e coragem para completar mais uma etapa. Seu amparo diário se revela em todos os momentos da minha vida.

*Ao meu orientador **Anderson Marliere Navarro** por ter me concedido a oportunidade de ser sua aluna e por ter contribuído para a realização da minha meta profissional, ser docente. Obrigada por todas as lições, pelo apoio, paciência, compreensão, tolerância e amizade! Serei eternamente grata!!*

*Ao meu namorado **Mauricio**, pelo apoio, carinho e tolerância em mais uma etapa da minha vida que concluo. Sua presença alegria o meu coração e me traz tranquilidade! Você é muito especial pra mim!*

*Aos meus amigos da pós-graduação, por todos os momentos compartilhados e por toda a ajuda que me proporcionaram. Em especial à **Erika, Lígia e Jessika**. Jamais me esquecerei de vocês! Obrigada!*

*As minhas amigas de longa data, por todo o apoio, carinho e incentivo! A energia vibrante dessa torcida sincera ilumina minha vida! Em especial a **Aline, Kaynara, Susana, Marcela e Maria Isabel**. AMO VOCÊS!*

Aos técnicos do Biotério pela paciência e por toda a ajuda dedicada à realização desse trabalho. MUITO OBRIGADA!

*Aos amigos, **Adriano e Ariane**, que dedicaram o seu tempo para a realização desse estudo, que com toda a paciência e humildade me ensinaram técnicas importantes e me ajudaram nas etapas principais para a conclusão desse trabalho. Sou infinitamente grata!!*

*A todos os professores da FCFAR-UNESP e da FMRP-USP, pelo auxílio e atenção dispensados. Em especial a professora **Thais Borges César**, por toda ajuda e contribuição para minha formação como docente.*

Aos animais que doaram e doam suas vidas para a realização desse e tantos outros estudos que visam o bem estar e a saúde dos seres humanos. Que suas vidas seja sempre lembradas por todos os pesquisadores e que esses animais sejam sempre tratados com toda a dignidade, seguindo sempre os princípios éticos.

*E a todos os amigos que direta ou indiretamente se envolveram na realização deste trabalho. **MUITO OBRIGADA!***

RESUMO

DESSORDI, R. **Efeito da suplementação com boro no metabolismo ósseo de camundongos diabéticos não obesos.** 2015. 61f. Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.

O papel da nutrição no desenvolvimento do tecido ósseo tem sido foco de muitos estudos. O Diabetes Mellitus é uma doença que desregula a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, podendo desempenhar um papel na osteoporose. O presente estudo teve como objetivo estudar a influência de uma suplementação com boro no metabolismo ósseo de camundongos controles e diabéticos não obesos por um período de 30 dias. Os animais foram suplementados com 40 µg/0,5 ml de solução de boro (boro quelato H 5%). Foram avaliadas as alterações ósseas por análise dos parâmetros bioquímicos de cálcio total, fósforo, magnésio e boro no soro e por análises ósseas (microtomografia computadorizada óssea e ensaio mecânico de flexão em três pontos em tíbia e fêmur). O estudo foi constituído por 28 animais divididos em quatro grupos: Grupo controle água (n=10): receberam 0,5 ml/dia de água destilada, Grupo controle boro (n=8): receberam 0,5 ml de solução de boro, Grupo diabético água (n=5): receberam 0,5 ml de água destilada e Grupo diabético boro (n=5): receberão 0,5 ml de solução de boro. A partir das análises realizadas foi possível observar que o volume ósseo do osso cortical para o grupo DB foi significativamente maior em comparação com os grupos CA e DA. A fração do volume ósseo trabecular foi maior para o grupo CB em comparação com CA e DA. Os valores de superfície óssea específica foram maiores para o grupo DB em comparação com CA e a espessura trabecular e índice de estrutura foram significativamente diferentes para os grupos CA e CB em comparação com DA. As dosagens de boro no soro foram maiores para o grupo DB em comparação com CA e os grupos DA e DB apresentaram concentração de magnésio inferior aos grupos CA e CB. O teste biomecânico revelou manutenção dos parâmetros de força em animais DB em comparação com o grupo DA e controles. Sendo assim, os resultados sugerem que a suplementação com boro melhorou e manteve parâmetros relacionados à força óssea e a microestrutura do osso trabecular e cortical em animais diabéticos e controles suplementados.

Palavras - chave: Diabetes, Osteoporose, Suplementação, Metabolismo Ósseo, Boro.

ABSTRACT

DESSORDI, R. **Effect of boron supplementation on bone metabolism of non-obese diabetic mice.** 2015. 61f. Department of Food and Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, State University of São Paulo - UNESP, Araraquara, 2015.

The role of nutrition in the development of the bone tissue has been the focus of many studies. Diabetes Mellitus is an illness that deregulates the activity of osteoblasts and osteoclasts, predisposes a higher risk for the development of osteoporosis. Thus, the objective this study was investigates the influence of a boron supplementation on bone metabolism of control and non-obese diabetic mice for 30 days. The animals were supplemented with 40 µg/0,5 ml of boron solution (boron chelate H 5%). We evaluated the possible bone changes during the development of complications caused by diabetes for biochemical parameters, total calcium, inorganic phosphorus, magnesium and boron, bone analysis (bone computed microtomography, and biomechanical assay at three point test in tibia and femur). This study consisted of 28 animals divided in four groups: Group water control (n=10): received 0,5 mL/day of distilled water, Group boron control (n=8): received 0,5 ml/day of boron, Group diabetic water (n=5): received 0,5 mL/day of distilled water and Group diabetic boron (n=5): received 0,5 mL/day of boron. The results showed that bone volume for the DB group was significant higher compared with CA and DA. In relation to trabecular bone, volume fraction was higher for the CB group when compared with CA and DA. The values for specific bone surface were higher for the DB group compared with CA. The trabecular thickness and structure model index were significantly different for the CB, CA when compared with DA group. The boron serum dosages were higher for DB group compared with CA and DA. The magnesium concentration was lower for DA and DB compared with CA and CB group. Biomechanical test revealed maintenance of parameters the bone strength in animals DB compared with the DA group and controls. Thus, the results suggest that boron supplementation can improve parameters related to bone strength and microstructure of cortical and trabecular bone in diabetic animals and controls supplemented.

Keywords: Diabetes, Osteopenia, Supplementation, Bone Metabolism, Boron.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1- μ CT do osso cortical, diáfise do fêmur, adjacente e distal ao terceiro trocanter (cortes de 1 mm) de animais controles não suplementados (CA) e suplementados (CB) e animais diabéticos não suplementados (DA) e suplementados (DB).....49

Figura 2- μ CT do osso trabecular, na esponjosa secundária a 0,6 mm proximal da cartilagem de crescimento até 2,5 mm proximal, de animais controles não suplementados (CA) e suplementados (CB) e animais diabéticos não suplementados (DA) e suplementados (DB).....50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Aferição do peso e glicemia em camundongos NOD controles e diabéticos suplementados com boro e não suplementados, durante o período experimental de 30 dias.....58

Tabela 2. Valores correspondentes à dosagem de minerais no soro de animais controles e diabéticos suplementados e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.....58

Tabela 2. Ensaio mecânico de flexão em três pontos em tíbias de camundongos NOD controles e diabéticos, suplementados com boro e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.....58

Tabela 4. Ensaio mecânico de flexão em três pontos em fêmures de camundongos NOD controles e diabéticos, suplementados com boro e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.....59

Tabela 5. Valores correspondentes à avaliação de microtomografia óssea computadorizada do osso cortical de animais controles e diabéticos suplementados e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.....59

Tabela 6. Valores correspondentes à avaliação de microtomografia óssea computadorizada do osso trabecular de animais controles e diabéticos suplementados e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DM:** Diabete Mellitus
- RUNX2:** Fator de transcrição
- BMP:** Proteína morfogenética óssea
- Wnt:** Proteína wingless
- TGF- β :** Fator de crescimento β
- FGF:** Fator de crescimento de fibroblasto
- FAO:** Fosfatase alcalina óssea
- PTH:** Hormônio da paratireoide
- PDGFs:** Fator de crescimento derivado de plaquetas
- RANK:** Receptor ativador do fator nuclear κ - β
- RANKL:** Receptor ativador do fator nuclear κ - β ligante
- PTHr1:** Receptor do paratormônio
- M-CSF:** Fator estimulante de colônias de macrófagos
- ITAMs:** Imunoreceptor baseado em tirosina
- PKB:** Enzima antiapoptótica kinase β
- EROS:** Espécies reativas de oxigênio
- OPG:** Osteoprotegerina
- BMU:** Unidades multicelulares básicas de remodelação
- TRAP:** Fosfatase ácida resistente ao tartarato
- DMO:** Densidade mineral óssea
- IDF:** International Diabetes Federation
- ICA:** Anticorpo anticélula da ilhota
- IAA:** Anticorpo anti-insulina
- GAD 65:** Anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico
- IA2 e IA2B:** Anticorpo anti-tirosina fosfatase
- Znt:** Antitransportador de zinco
- IRS1 e IRS2:** Receptores de insulina expressos pelos osteoblastos
- IGF1:** Fator de crescimento semelhante à insulina
- IL-6:** Interleucina 6

AGE: Produtos finais de glicosilação avançada

B: Boro

B(OH)³: Ácido bórico

(B(OH)₄)⁻⁶: Ânion borato

(B(OH)₃): Ácido ortobórico

NAD⁺: Nicotinamina adenina

NADP: Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato

DRI's: Dietary reference intakes

NOD: Camundongos diabéticos não obesos

CA: Camundongo não diabéticos e não suplementado

CB: Camundongo não diabético suplementado

DA: Camundongo diabético não suplementado

DB: Camundongo diabético suplementado

Fcfpr/USP: Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

ICP-MS: Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo

μCT: Microtomografia computadorizada óssea

BV: Volume ósseo

BV/TV: Fração do volume ósseo

Ct.Th: Espessura do osso cortical

Ct.Po: Porosidade cortical

BS/BV: Superfície óssea específica

SMI: Índice de estrutura

Tb.Th: Espessura trabecular

Tb.N: Número de trabéculas

Tb.Sp: Separação trabecular

Conn.D: Conectividade trabecular

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. HIPÓTESE.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
4.1 TECIDO ÓSSEO.....	19
4.2 DIABETES MELLITUS E SAÚDE ÓSSEA.....	22
4.3 BORO.....	27
4.3.1 Características Gerais.....	27
4.3.2 Toxicidade, Deficiência, Absorção e Excreção.....	28
4.3.3 Fontes Alimentares e Recomendações.....	29
4.3.4 Ação no Organismo.....	29
REFERENCIAS.....	33

CAPÍTULO II – SUPLEMENTAÇÃO COM BORO MELHORA A MICROESTRUTURA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS NÃO OBESOS.....	42
--	-----------

RESUMO.....	43
--------------------	-----------

1.INTRODUÇÃO.....	44
--------------------------	-----------

2.MATERIAS E MÉTODOS.....	46
----------------------------------	-----------

2.1 Animais.....	46
-------------------------	-----------

2.2 Experimento.....	46
-----------------------------	-----------

2.3 Microtomografia Computadorizada Óssea.....	47
2.4 Ensaio Mecânico de Flexão em Três Pontos em Tíbia e Fêmur.....	48
2.5 Análises Estatísticas.....	48
3. RESULTADOS.....	49
4. DISCUSSÃO.....	51
Lista de Abreviaturas.....	48
Financiamento.....	55
REFERÊNCIAS.....	55
TABELAS.....	59
ANEXO A.....	61

ΣΑΡΪΤΥΛΟ Ι

1. INTRODUÇÃO

O papel da nutrição no desenvolvimento do tecido ósseo tem sido foco de muitos estudos, visando investigar os componentes dietéticos necessários para a manutenção das funções ósseas normais, assim como o seu desenvolvimento adequado. Os nutrientes como o cálcio, fósforo, magnésio, fluoreto, vitamina D, zinco, cobre e boro são conhecidos por promover um desenvolvimento normal das funções ósseas, promovendo o ganho de massa e força ao longo do desenvolvimento. O consumo inadequado desses nutrientes ou alterações no seu metabolismo, como aumento de sua excreção, prejuízos na absorção devido a presença de alguma doença, pode levar a um prejuízo na estrutura do osso e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças relacionadas ao tecido ósseo como a osteoporose (GHANIZADEH et. al., 2014).

A osteoporose trata-se de uma doença esquelética sistêmica caracterizada por um aumento na susceptibilidade à fratura. A maioria dos casos estão associados a pós menopausa ou ao envelhecimento, porém esta doença também pode desenvolver-se como consequência de alguma situação patológica (SORIANO et. al., 2014). A osteoporose é mais prevalente em mulheres na pós-menopausa do que em homens, sendo que aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo mundo apresentam esta doença. Anualmente, 1,5 milhões de pessoas sofrem fraturas, que estão relacionadas à osteoporose e 86% tem chance de sofrer fraturas subsequentes, representando um custo muito alto em tratamentos de saúde e serviços de reabilitação. Estimativas indicam que no ano de 2020, serão acometidas pela osteoporose aproximadamente 14 milhões de pessoas (ANDERSON, 2010; ALJUBRAN et. al., 2014).

O Diabetes Mellitus (DM) é um exemplo de uma doença que pode levar ao desenvolvimento da osteoporose (EMKEY; EPSTEIN, 2014). Esta doença, caracterizada por um desarranjo no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, apresenta elevada incidência e prevalência na população, traduzindo-se em um grande desafio para os sistemas de saúde (DANAEI et al, 2011). O número estimado de indivíduos adultos com diabetes em todo o mundo foi de aproximadamente 382 milhões em 2013, com expectativa de aumento de 55% em 2035 (592 milhões) (DIABETES ATLAS, 2013). Segundo dados do Ministério da Saúde, a prevalência desta doença no Brasil foi de 11,7 milhões de indivíduos no ano de 2012 (BRASIL, 2012). O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis, como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade, além do aumento da sobrevida dos pacientes com DM são os grandes responsáveis pelo aumento da prevalência (BRASIL, 2006; DIRETRIZES SBD, 2013).

O DM, sob condição crônica, pode afetar negativamente diversas partes do organismo, como os ossos, músculos, retina, rins e o sistema cardiovascular. Os efeitos desta doença, nas células ósseas são muito complexos e diversos estudos estão sendo realizados atualmente para tentar explorar os mecanismos exatos através dos quais o DM induz a osteoporose e conseqüentemente o aumento no índice de fraturas ósseas (HAMANN *et. al.*; 2012).

A hiperglicemia, condição que implica em várias complicações do diabetes, desregula o funcionamento normal das células osteoblásticas, responsáveis pela formação óssea e favorece o funcionamento das células osteoclásticas, que estão ligadas a reabsorção óssea, condição que poderia facilitar o processo de desenvolvimento da osteoporose e, além disso, ainda pode causar disfunção e falha em diferentes órgãos (LAMPROPOULOS *et. al.*, 2012; GAO *et. al.*, 2008; JACKULIAK; PAYER, 2014). Portanto, o DM exerce um efeito deletério não apenas nos ossos, mas também nos neurônios e nas células musculares e leva a diminuição da produção de vários estímulos necessários para a homeostase normal das células e ainda acelera a síntese de várias citocinas e outros fatores que afetam diretamente as células alvo ou antagonizam indiretamente as vias de sinalização de estímulo (BIPRADAS, 2013). Ainda são necessários mais estudos para avaliar a relação do diabetes com possíveis alterações na formação óssea e no metabolismo mineral, favorecendo a redução de massa óssea, tanto em pacientes como em animais experimentais, porém sabe-se que nenhum mecanismo isolado pode explicar todos os efeitos do diabetes na integridade óssea (MUSUMECI *et. al.*, 2011).

A expectativa de vida de indivíduos portadores de diabetes está crescendo devido a cuidados médicos, uso de fármacos, prática de atividades físicas entre outras mudanças. Esse aumento na expectativa de vida gera por consequência um aumento na incidência de fragilidade óssea (HAMANN *et al.*, 2012; SZULC *et al.*, 2007). O principal efeito na patogênese das anormalidades ósseas na deficiência de insulina relaciona-se à formação óssea. Em modelos experimentais de DM tipo 1 foi encontrado diminuição no número de osteoblastos e remodelação óssea, acompanhado por redução no conteúdo mineral (LAPROPOULOS *et al.*, 2012; SZULC *et al.*, 2007).

Pacientes diabéticos são susceptíveis a terem níveis diminuídos de minerais que exercem funções importantes no metabolismo ósseo e, além disso, devido às complicações geradas pelo quadro de hiperglicemia, podem sofrer prejuízo na saúde óssea. O boro (B) trata-se de um elemento essencial para as plantas, porém o seu papel no organismo de humanos e outros mamíferos, ainda não está bem esclarecido. Estudos sugerem que este mineral é essencial para a manutenção da saúde óssea e possui papel vital na embriogênese, crescimento ósseo, funções imunes e psicomotoras

(PAN et. al., 2010). Gorustovich e colaboradores (2008), por meio de um estudo experimental com camundongos, relataram que o boro é benéfico para o crescimento ósseo e sua manutenção e Hakki e colaboradores (2013), concluíram que a privação deste mineral pode afetar o crescimento ósseo, inibindo a formação do osso. Além disso, este mineral está ligado à formação de hormônios esteroides e influência no metabolismo de macrominerais como cálcio, magnésio e vitamina D e, portanto, pode estar envolvido na prevenção da perda de cálcio e desmineralização óssea (PALACIOS, 2006; NIELSEN, 2014).

Desta forma a suplementação com minerais essenciais ao metabolismo ósseo, como o boro, pode ser um fator importante na preservação da massa óssea, sugerindo ter uma função nutricional e farmacológica na prevenção e tratamento adjuvante da osteoporose diabética.

Os estudos disponíveis ainda são limitados sobre a real participação deste mineral no metabolismo ósseo e os efeitos de sua suplementação, porém os dados desses estudos são capazes de nortear sobre a sua importância na saúde óssea. Desta forma, torna-se necessário uma melhor investigação científica incluindo parâmetros bioquímicos específicos do metabolismo ósseo e parâmetros que avaliem a microarquitetura óssea.

2. HIPÓTESE

Animais diabéticos suplementados com boro apresentam menor prejuízo na saúde óssea, por meio da preservação da micro e macro estrutura óssea.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência de uma solução de boro nos parâmetros bioquímicos e no metabolismo ósseo de camundongos diabéticos não obesos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos da suplementação com boro em animais diabéticos e controles através do ensaio mecânico de flexão em três pontos e microtomografia computadorizada óssea.
2. Comparar dosagens bioquímicas de magnésio, cálcio, fósforo e boro em amostras de sangue de animais controles e animais diabéticos.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo trata-se de uma estrutura altamente dinâmica que sofre modelagem durante o crescimento (aumento de altura) e constante remodelagem após a interrupção do crescimento (RAGGAT; PARTRIDGE, 2010; ANDERSON, 2010).

Segundo dados da literatura os ossos *in natura* são constituídos, basicamente, de uma matriz orgânica, ou osteóide, fibras de colágeno, nas quais estão depositados sais de cálcio e fosfato associados a íons hidroxila em cristais de hidroxiapatita. Além disso, apresenta uma população heterogênea de células como condrócitos, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, células endoteliais, monócitos, macrófagos, linfócitos e células hematopoiéticas (ANDERSON, 2010).

O tecido ósseo é composto 80% por osso compacto e cortical, sendo que as diáfises dos ossos longos são constituídas principalmente de osso cortical, e os 20% restantes de esqueleto, são formados por osso trabecular ou esponjoso. Envolvida por esses dois tipos de estruturas, encontra-se a medula óssea (ANDERSON, 2010; ASBMR, 2007). Caracterizando os dois tipos de tecidos ósseos, o osso trabecular possui menor densidade que o osso cortical, sendo que os componentes do tecido ósseo trabecular que se interligam e oferecem suporte ao invólucro de tecido ósseo cortical dos ossos longos. Com base nesta constituição óssea, observou-se que a perda de tecido ósseo trabecular durante a vida, pode aumentar e predispor o risco de fraturas, principalmente da coluna (ANDERSON, 2010).

São responsáveis pela manutenção da qualidade e quantidade óssea, três tipos de células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos e osteoclastos são células derivadas de células precursoras primitivas encontradas na medula óssea (células tronco mesenquimais e células tronco hematopoiéticas, respectivamente) (LAMPROPOULOS et. al., 2012).

Os osteoblastos são células mononucleares que produzem osteóide e são responsáveis pela formação óssea. Essas células expressam o fator de transcrição RUNX2. A maturação, diferenciação e sobrevivência dessas células estão ligadas a diferentes tipos de fatores de crescimento e hormonais como: proteína morfogenética óssea (BMP), proteína wntless (Wnt), fator de crescimento β (TGF- β), hormônio da paratireoide (PTH), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFs) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (ANDERSON, 2010; LAMPROPOULOS et. al., 2012). A co-expressão da enzima fosfatase alcalina óssea (FAO) e

colágeno tipo 1, caracterizam os osteoblastos totalmente diferenciados e são importantes para a síntese da matriz óssea e mineralização subsequente. Os osteoblastos maduros produzem os reguladores de mineralização da matriz extracelular como: osteocalcina, osteopontina, osteonectina e RANKL (receptor ativador do fator nuclear κ - β ligante), necessária para a diferenciação dos osteoclastos, bem como o receptor do paratormônio (PTH_{1R}). Essas células, ao final de sua vida, podem se tornar osteócitos, deixando de gerar osteóide e matriz mineralizada, podendo atuar de forma parácrina nos osteoblastos ativos, e também parecem inibir a formação e a reabsorção óssea (ERIRSEN, 2010; LAMPROPOULOS et. al., 2012).

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do osso, removendo o osso velho. Essas células participam da osteoclastogênese e sabe-se que diferentes tipos de mediadores participam desse processo como: fator κ - β nuclear, RANKL, osteopontina, hormônio da paratireoide (PTH), fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) e angiotensina II. O osteoclasto pode exercer efeito na osteoclastogênese por 3 caminhos: RANKL mediado, M-CSF mediado e pelo imunoreceptor baseado em tirosina (ITAMs), sendo que o RANKL é o fator chave para promover a diferenciação dos osteoclastos pela sua ligação no receptor da superfície celular de células de linhagem monócito-macrófago, pode inibir a apoptose pela indução da enzima antiapoptótica kinase β (PKB) e ainda é responsável pela produção de EROS (espécies reativas de oxigênio), potente indutor da osteoclastogênese (ANDERSON, 2010; LAMPROPOULOS et. al., 2012; HODGE et. al.; 2011). O caminho dominante de regulação da diferenciação dos osteoclastos é o RANKL/RANK/OPG, onde os osteoblastos promovem a diferenciação dos osteoclastos através da ligação do RANKL no receptor de membrana RANK em osteoclastos mononucleares precursores. A diferenciação dos osteoclastos pelo RANKL é inibida pela osteoprotegerina (OPG), também produzida pelos osteoblastos (ERIRSEN, 2010).

Os osteócitos são osteoblastos maduros que não secretam mais matriz, participam nas trocas de nutrientes/resíduos através do sangue e não são capazes de se multiplicar. Contribuem com o processo de remodelação óssea por meio da regulação da atividade dos osteoblastos e osteoclastos. (BONEWALD, 2011; CLARKE, 2008).

Abordando a remodelação óssea, o processo de reabsorção é mais rápido que o de formação, que necessita de 3 a 6 meses ou até 1 ano (idosos) para ocorrer. Inicialmente ocorre a reabsorção dos componentes orgânicos e minerais do osso, ocorrendo à formação de pequenas cavidades nas superfícies ósseas e posteriormente ocorre a formação do novo osso. Esse processo de formação e reabsorção é ativado por hormônios específicos e citocinas e após ser concluído, o

resultado é um osso novo e saudável (ANDERSON, 2010; FENG; MCDONALD, 2011).

O processo de remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU), sendo caracterizado pelo acoplamento das funções dos osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Cada unidade é geográfica e cronologicamente separada de outros conjuntos, sugerindo que a ativação de sequência de ocorrências celulares responsáveis pela remodelação seja também controlada localmente por fatores gerados no microambiente ósseo (ERIRSEN, 2010).

A homeostase entre a formação e a reabsorção do osso é vital para manutenção da saúde do esqueleto e alterações nesse processo podem resultar em diferentes distúrbios, entre eles a osteoporose (WENDO; XIN, 2013).

A perda óssea está ligada à deterioração do colágeno formador da matriz orgânica óssea, bem como ao gradual desequilíbrio com o processo de remodelação (SHAPSE; RIEDT, 2006). Geralmente a perda óssea é acompanhada pela deterioração da arquitetura do osso, resultando na redução do número de trabéculas do osso esponjoso, aumentando a distancia intertrabecular e leva a perda de conectividade trabecular. Além disso, a redução na espessura do osso cortical e o aumento na porosidade do osso trabecular, podem resultar em fragilidade femoral (JACKULIAK; PAYER, 2014).

Os marcadores do metabolismo ósseo existem para mensurar tanto a formação quanto a reabsorção óssea. A fosfatase alcalina óssea (FAO) é um marcador de formação óssea, assim como a osteocalcina, pepídeo amino-terminal de pro colágeno I e pepídeo carboxi-terminal do pro colágeno I. Os marcadores de reabsorção incluem a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), hidroxiprolina, piridinolina, dioxipiridinolina e telopeptídeos de ligações cruzadas do colágeno tipo I (ANDERSON, 2010; JACKULIAK; PAYER, 2014).

A qualidade óssea pode ser definida abordando as características ósseas de rigidez, capacidade do osso de resistir a deformações, flexibilidade, capacidade de se deformar para permitir a absorção de energia durante um impacto e deve ser leve para permitir o movimento. A homeostase entre a rigidez óssea e a flexibilidade varia de acordo com o conteúdo mineral ósseo, portanto quanto maior o conteúdo mineral, maior a rigidez e menor a flexibilidade. A resistência do osso tem como seu principal determinante, a massa óssea, que é refletida pela densidade mineral óssea (DMO) e pela microarquitetura. Portanto, a força óssea surge a partir da quantidade e da qualidade óssea, sendo que esta última engloba os fatores geométricos e materiais que contribuem para a resistência à fratura. A qualidade do osso não é precisamente definida, ela é descrita como

uma fusão de todos os fatores que determinam a resistência do esqueleto a fraturas, como: microarquitetura dos danos microscópios acumulados, qualidade do colágeno, tamanho dos cristais de minerais e taxa de renovação óssea. A partir dessa definição, observa-se que a DMO pode explicar apenas 70-75% da variação na força óssea, enquanto o restante pode estar relacionado a outros fatores como o acúmulo de micro fraturas, microarquitetura alterada, remodelação óssea desordenada ou influência de fatores extras esqueléticos. Assim, uma forma importante e complementar de avaliar a qualidade óssea é por meio de sua microarquitetura, uma vez que essa medida contribui para mensurar a resistência do osso e desse modo, sua capacidade para resistir a fraturas (JACKULIAK; PAYER, 2014; SANYAL et.al., 2012).

Atualmente, nenhum método é capaz de caracterizar completamente a qualidade óssea, porém as técnicas atuais de imagem não invasivas combinadas com técnicas mecânicas e de composição, podem fornecer uma composição abrangente da qualidade óssea (JACKULIAK; PAYER, 2014).

O metabolismo ósseo, baseando-se nos conceitos citados anteriormente, pode ser afetado por algumas doenças, como o Diabetes Mellitus, que leva a desordens na atividade das células ósseas, podendo, dessa forma, promover o desenvolvimento da osteoporose (DANAIEI et. al., 2011).

4.2 DIABETES MELLITUS E SAÚDE ÓSSEA

Diabetes Mellitus é uma desordem metabólica, caracterizada por altos níveis de glicose sanguínea que altera o funcionamento de tecidos como: fígado, músculos esqueléticos, tecido adiposo, tecido cartilaginoso e ósseo, incluindo o sistema renal e cardiovascular (DANAIEI et. al., 2011; HAMANN et, al., 2012). Pesquisadores tinham conhecimento da existência de diferentes formas de diabetes ao longo do tempo, porém, somente na última década tiveram um substancial progresso na identificação e compreensão da etiologia de seus tipos distintos (MAŁECKI; SKUPIEŃ, 2008).

Conforme dados atuais, a classificação do DM está baseada na sua etiologia e não mais no tipo de tratamento. Por meio dessa atualização os termos utilizados anteriormente como Diabetes Mellitus não insulino dependente e Diabetes Mellitus insulino independente, foram eliminados (DIRETRIZES SBD, 2014/2015). A *Internacional Diabetes Federation* - IDF (2013), classificou a doença DM tipo 1, DM tipo 2 e outros tipos específicos como o DM gestacional.

O DM tipo 1 é caracterizado por deficiência absoluta de insulina e seu diagnóstico é frequentemente acompanhado de sintomas agudos de desidratação e cetoacidose. Este tipo de DM acomete de 5 a 10% dos casos. A causa da doença é um processo autoimune direcionado a destruição das células β pancreáticas (DIRETRIZES SBD, 2014/2015; MAŁECKI; SKUPIEŃ, 2008). Na sua base etiopatogênica encontra-se a associação de fatores genéticos e ambientais. Em relação aos fatores genéticos, podem-se citar os marcadores de autoimunidade, como ICA (anticorpos anticélula da ilhota), IAA (anticorpos anti-insulina), GAD 65 (anticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico), IA2 E IA2B (antirosina-fosfatses) e Znt (antitransportador de zinco) que são detectados em cerca de 90% dos pacientes. Quanto aos fatores ambientais envolvidos na gênese do DM 1, sabe-se que são tão ou mais importantes que os fatores genéticos na gênese da doença, porém ainda são pouco conhecidos (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

O DM tipo 2 desenvolve-se como resultado de fatores de risco genéticos e ambientais, é caracterizado por defeitos na ação e/ou secreção de insulina, apresentando como sintoma principal a hiperglicemia e a maioria dos pacientes apresenta obesidade. Geralmente quando a hiperglicemia se manifesta ambos os defeitos podem estar presentes, porém pode haver predomínio de um deles (DIRETRIZES SBD, 2014/2015; MAŁECKI; SKUPIEŃ, 2008; ARSA, 2009). Este tipo de diabetes representa cerca de 90% de todos os casos de diabetes (WENBO; XIN, 2013). No DM 2, os fatores envolvidos da redução da massa de células β são diferentes do DM 1 e incluem: glicolipotoxicidade, estresse oxidativo e acúmulo de depósitos amilóides nas ilhotas. A forte herança genética poligênica associada a fatores ambientais como, obesidade e sedentarismo, são determinantes na gênese do DM 2 (VOLTARELLI *et al.*, 2009).

O DM gestacional é qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Similar ao DM tipo 2, o DM gestacional é associado tanto a resistência à insulina quanto à diminuição da função das células β . Este tipo de diabetes ocorre entre 1% a 14% de todas as gestações, e é associado a aumento de morbidade e mortalidade perinatal. Pacientes com DM gestacional devem ser reavaliadas quatro a seis semanas após o parto e reclassificadas como apresentando DM, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída ou normoglicêmica. Na maioria dos casos há reversão para a tolerância normal após a gravidez, porém existe um risco de desenvolvimento de DM tipo 2 dentro de cinco a dezesseis anos após o parto (DIRETRIZES SBD, 2014/2015).

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células β do pâncreas, cuja síntese é ativada pela elevação da glicemia. A insulina é o principal hormônio anabólico do organismo. Seus

efeitos mais conhecidos estão associados ao metabolismo energético, especialmente a regulação do metabolismo de glicose, ácidos graxos, aminoácidos, estimula a proliferação de osteoblastos e promove a síntese de colágeno. Além disso, esse hormônio age no osso através de receptores de insulina expressos pelos osteoblastos (IRS-1 e IRS-2) (JACKULIAK; PAYER, 2014).

No DM1 a deficiência de insulina e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina), levam a formação óssea prejudicada, microarquitetura óssea anormal, aumento na fragilidade óssea e reduzido pico de massa óssea (JACKULIAK; PAYER, 2014).

A osteopenia é uma complicação causada pelo DM, podendo resultar no aumento do índice de fraturas, prejuízo da saúde óssea e conseqüentemente deterioração da qualidade de vida (MUSUMECI et. al., 2011). Esta doença favorece o processo de osteopenia/osteoporose, pois afeta o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, favorecendo o funcionamento das células osteoclásticas que são responsáveis pela reabsorção óssea (LAMPROPOULOS et. al., 2012). Esta comorbidade afeta ambos os tipos de DM, reduzindo a qualidade do osso e aumentando o risco de fraturas (JACKULIAK; PAYER, 2014).

A progressão do quadro de osteopenia gera a osteoporose, que é considerada um dos maiores problemas mundiais de saúde da atualidade e a incidência de fraturas relacionadas a esta doença também está aumentando (ANDERSON, 2010; MUSUMECI, et. al. 2011).

A osteoporose é uma doença caracterizada pela diminuição da massa óssea e perturbação da microarquitetura óssea (especialmente em locais trabeculares) levando à insuficiência da força esquelética e um aumento da susceptibilidade de fraturas (ALJUBRAN et. al., 2014; CHEN et. al., 2013). O período de crescimento e o pico de acúmulo de massa óssea (etapa de maior quantidade de acúmulo de osso em qualquer idade) são fatores que podem determinar a origem da osteoporose no início da vida (ANDERSON, 2010). Essa doença é descrita como silenciosa e assintomática antes de ocorrer uma fratura, tendo um impacto negativo e significativo na morbidade e mortalidade, podendo levar a dor intensa, deformidade, incapacidade e morte (BRIPRADAS, 2013).

A osteoporose tem sido tradicionalmente caracterizada como primária e secundária. A osteoporose primária refere-se aquela que acomete a mulher na pós-menopausa e/ou está associada à idade. Esse tipo envolve primariamente a perda de osso trabecular, devido à interrupção da produção ovariana de estrogênios. Homens podem chegar a desenvolver este tipo de osteoporose pela redução na produção de andrógenos, porém esta condição é rara. A osteoporose primária caracteriza-se por fraturas na porção distal do rádio e nas vértebras lombares (fraturas por “esmagamento”) (ULIVIERE et. al., 2014; ANDERSON, 2010).

A osteoporose secundária está associada com uma doença subjacente conhecida ou a um medicamento, causando a perda de tecido ósseo. Estima-se que 1/3 das mulheres na pós-menopausa e metade das mulheres na pré-menopausa sofrem de osteoporose secundária (ULIVIERE et. al., 2014).

Essa doença é complexa e heterogênea de etiologia desconhecida onde a perda de massa óssea em um grau que produz fraturas pode ser resultante da aceleração excessiva da reabsorção, especialmente após a menopausa e pico sub ótimo de massa óssea, podendo resultar em osso, que após a menopausa é frágil e susceptível a fraturas (ANDERSON, 2010).

O DM, por sua vez, influencia negativamente as células tronco mesenquimais devido à hiperglicemia que compromete a função e a diferenciação das células ósseas, resultando em baixo turnover e formação óssea. Este quadro afeta a diferenciação de células tronco mesenquimais em células osteoblásticas, porém estimula a sua disponibilidade para a formação de adipócitos (BARBAGALLO, et. al., 2010; LAMPROPOULOS et. al., 2012). Esse processo gera uma contínua deposição de células de gordura dentro da medula óssea, o que aumenta a cavidade medular, deixando o osso frágil e com microcirculação diminuída (LAMPROPOULOS et. al., 2012; AMMARY-RISCH; HUANG, 2011). Portanto, a função limitada dos osteoblastos e a atividade exacerbada dos osteoclastos, são fatores que influenciam negativamente a regulação da formação óssea, podendo evoluir para um quadro de osteoporose (BIPRADAS, 2013).

A hiperglicemia, que é o resultado da ausência e/ou ação prejudicada da insulina, age nas células do tecido ósseo através do aumento na produção de interleucina 6 (IL-6) nas células de linhagem osteoblástica, a qual por sua vez estimula os osteoclastos a reabsorverem o osso (JACKULIAK; PAYER, 2014).

A formação de metabólitos provenientes da glicose altera os mecanismos celulares e a formação de vários tecidos (KEMPF et. al., 2008). A glicosilação de proteínas trata-se de uma modificação pós-tradução comum de proteínas, induzida pela condensação espontânea da glicose e intermediários metabólicos com os grupos amina livres. Este processo conduz a formação irreversível de uma classe de moléculas denominadas produtos finais de glicosilação avançada (AGE), como a pentosidina (DE PAULA; ROSEN, 2010). Os AGEs podem se acumular no organismo por longos períodos em macromoléculas extra e/ou intracelulares tais como proteínas e lipídios. A glicosilação causa mudanças qualitativas e quantitativas nos componentes da matriz extracelular como proteoglicanos e colágeno. Especificamente no caso do metabolismo ósseo, as mudanças da matriz extracelular causam alterações específicas na formação e remodelação do osso.

Um estudo experimental em ratos revelou que o aumento no teor de pentosidina coincidiu com o prejuízo das propriedades mecânicas do osso e em osteoblastos humanos a pentosidina causou uma redução significativa nos marcadores de remodelação óssea (SAITO et. al., 2006, SANGUINETI et. al., 2008).

Pacientes com DM descompensado possuem risco aumentado de quedas, não apenas pelas mudanças ósseas ocasionadas pela doença, mas também pela associação de outras complicações decorrentes da hiperglicemia crônica como a neuropatia, levando a redução da visão e aumentando o risco de fraturas osteoporóticas (AZIDAH et. al. 2012).

Segundo dados da literatura, observou-se que pacientes com DM tipo 1, apresentam redução acentuada no pico de massa óssea, mesmo após o início precoce do diagnóstico e tratamento da doença, sugerindo os efeitos anabólicos que a insulina exerce no osso (BIPRADAS, 2013; HAMANN et. al., 2012). A formação óssea prejudica, tem sido proposta como um importante fator que contribui com o pico de massa óssea em pacientes diabéticos tipo 1. Em contraste, pacientes diabéticos tipo 2, podem apresentar densidade mineral óssea em valores normais ou aumentada, devido ao quadro de hiperinsulinemia, porém esses pacientes tem como principal característica a resistência à insulina, sugerindo que a hiperinsulinemia pode encontrar baixa sensibilidade em células ósseas e mesmo com densidade mineral óssea dentro dos parâmetros de normalidade há aumento na fragilidade óssea. Com base nessas informações, sugere-se que as diferenças que o DM tipo 1 e o DM tipo 2 exercem no esqueleto, não podem ser totalmente explicadas pela hipótese da insulinopenia (WENDO; XIN, 2013; HAMANN et. al., 2012). Portanto, o risco de fraturas no DM tipo 1 aumenta devido a diminuição da densidade mineral óssea, sendo que o prejuízo na formação óssea é resultado da deficiência absoluta de insulina e IGF-1, que leva a baixos picos de massa óssea (JACKULIAK; PAYER, 2014).

As células β pancreáticas são responsáveis não apenas pela produção e secreção de insulina, mas também produzem outros fatores osteo-anabólicos, como o polipeptídeo amiloide (amilina) e a leptina. Portanto os pacientes com DM tipo 1, possuem prejuízo na produção de todos os fatores mencionados, contribuindo no déficit na formação óssea (HAMANN et. al., 2012).

Os estudos conduzem a hipótese que os pacientes diabéticos sofrem prejuízo da qualidade óssea e para ambos os tipos de diabetes, a hiperglicemia é a principal característica da doença, o que acarreta os efeitos adversos no metabolismo ósseo de pacientes com glicemia mal controlada, levando ao aumento do estresse oxidativo (STOLZING et. al., 2011). O funcionamento da cadeia de transporte de elétrons que reduz continuamente oxigênio para formar o potencial eletroquímico

transmembrana de prótons possui um importante efeito colateral para as células: a constante geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PAIM, 2008, 56-57). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando ocorre um aumento da concentração dessas espécies, ou uma deficiência nos sistemas enzimáticos responsáveis por sua detoxificação, tem-se uma condição caracterizada como estresse oxidativo. Nesta condição, a célula não consegue se defender contra a geração de EROs favorecendo o ataque destas a toda a estrutura celular (PAIM, 2008, p. 56-57). Essas EROS possuem impacto significativo na geração e sobrevivência das células ósseas (BIPRADAS, 2013). Segundo Manolagas (2010), as EROS não atenuam apenas a osteoblastogênese, também estimulam a apoptose de osteoblastos.

Além das complicações ósseas decorrentes do diabetes, os pacientes que possuem essa doença classificam-se entre os grupos que apresentam riscos de possuir concentrações de vitaminas e minerais diminuídos. Embora exista na literatura uma grande quantidade de informações onde vários autores subtendem que a dieta exerça um papel importante no controle das complicações do DM, ainda não há evidências suficientes sobre as concentrações dos micronutrientes nesses pacientes e os dados obtidos nos estudos não são conclusivos. Desta forma a suplementação com minerais essenciais ao metabolismo ósseo como cálcio, fósforo, magnésio e boro, podem ser fatores importantes na preservação da massa óssea (KAUR; HENRY, 2014).

4.3 BORO

4.3.1 Características Gerais

O boro (B) é um micromineral que tem se mostrado essencial em todo o ciclo de vida para os organismos em todo reino filogenético. Este mineral é encontrado na forma de ácido bórico $B(OH)_3$ em pH fisiológico e há estudos que mostram que o boro é necessário para uma boa saúde óssea, tendo um papel vital na embriogênese, crescimento ósseo, funções imunes e psicomotoras (NIELSEN, 2014; DA SILVA, et al., 2012; TASH et al., 2013).

O átomo de boro possui três elétrons em sua camada externa, não doa prótons, porém age

como um ácido de Lewis, aceitando íons hidroxila. O boro liga-se com vários elementos, resultando em um arranjo tetraédrico ou trigonal planar, tendo uma forte atração pelo oxigênio o que resulta na formação de boratos. Quando o boro se liga a quatro átomos de oxigênio, o composto resultante no arranjo tetraédrico é o ânion borato $(\text{B}(\text{OH})_4)^{-6}$ e quando se liga a três átomos de oxigênio, o composto resultante no arranjo triangular planar é o ácido ortobórico $(\text{B}(\text{OH})_3)$ (DERIVAN;VOLPE, 2003).

O boro tem uma forte tendência para formar complexos com moléculas orgânicas que possuem grupos hidroxilas adjacentes que se encontram na configuração *cis*. Este mineral é capaz de interagir com substâncias biológicas importantes, incluindo polissacáridos, piridoxina, riboflavina, ácido desidroascórbico, e os nucleótidos de piridina. A nicotinamida adenina (NAD^+) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) contêm componentes de ribose, os quais possuem forte afinidade com o boro, e estas moléculas são ativas no metabolismo energético, portanto a ligação entre elas e o boro pode afetar alguns processos de certas vias metabólicas. Assim, a estrutura química desse mineral permite que ele possa reagir com muitos outros metabolitos e enzimas, podendo ser capaz de modificar o metabolismo energético e de minerais em seres humanos e animais (DERIVAN;VOLPE, 2003; HUNT, 2012).

4.3.2 Toxicidade, Deficiência, Absorção e Excreção

A intoxicação por boro não é comum, pois o excesso deste mineral geralmente é excretado na urina. Os sintomas bioquímicos de toxicidade são similares à pelagra e incluem riboflavinúria e deficiência de riboflavina juntamente com a inibição de enzimas desidrogenases. Os sintomas de deficiência incluem náuseas, vômitos, diarreia, lesão renal, hiponatremia, agitação e cansaço. Além disso, a sua deficiência em humanos, ratos e frangos leva a um desenvolvimento ósseo anormal, independente de outro fator estressor que afeta a saúde óssea, e provoca aumento na excreção urinária de cálcio (DEVIRIAN; VOLPE, 2003). Estudos revelaram que a privação de boro afeta dois órgãos em especial, sendo estes o osso e o cérebro e a resposta à privação é intensificada quando outros nutrientes que alteram as funções metabólicas também estão deficientes, como magnésio, cálcio e vitamina D (NIELSEN, 2008; GALLAGHER, 2010).

Com relação à absorção, o boro trata-se de um mineral facilmente absorvido através do epitélio gastrointestinal, podendo chegar a uma taxa de absorção até cerca de 90%. Quando entra no

organismo, este é hidrolisado a ácido bórico, o qual é absorvido pelo enterócito e transportado. Sugere-se que durante o transporte, o boro esteja ligado sutilmente a substâncias que contenham grupos *cis*-hidroxila. O mecanismo pelo qual boro é absorvido ainda permanece inconclusivo, porém alguns estudos sugerem que seja por um processo de difusão não induzida. Este mineral é excretado em sua maioria na urina, cerca de 2% nas fezes e o remanescente no suor e na respiração (DA SILVA, et al., 2012; DERIVAN; VOLPE, 2003). A concentração de boro nos tecidos permanece constante através de um mecanismo homeostático que está diretamente relacionado com a excreção renal e devido a este mecanismo a ingestão elevada de boro não aumenta os níveis plasmáticos de boro significativamente (HUNT, 2012).

4.3.3 Fontes Alimentares e Recomendações

As fontes alimentares principais de boro são as frutas, verduras, legumes e tubérculos especialmente aquelas de plantas dicotiledôneas. As gramíneas como milho, arroz e trigo possuem menores quantidades. As frutas secas, nozes e abacate contêm entre 1 a 4,5 mg de boro/100 g. As frutas frescas, legumes e mel contêm entre 0,1 a 0,5 mg de boro/100 g, enquanto os alimentos de origem animal fornecem apenas 0,01 a 0,06 mg de boro/100 g. Outra fonte importante de boro é a água, sendo que o teor desse nutriente varia de acordo com a localização geográfica (HUNT, 2012; DERIVAN;VOLPE, 2003).

Segundo as DRI's (*Dietary Reference Intakes*), não há valores de ingestão adequada (AI), necessidade média estimada (EAR) e necessidade dietética recomendada (RDA), apenas valores referentes ao limite superior tolerável (UL) para a faixa etária de 19 a 70 anos, sendo 20 mg/dia de boro (IOM, 2002). As recomendações para animais, segundo a AIN-93, são de 0,5 mg/kg de dieta para o crescimento, reprodução e manutenção (REEVES, et. al., 1993).

4.3.4 Ação no Organismo

O interesse pelo boro na nutrição animal teve início no ano de 1981. O boro desempenha um papel regulador no metabolismo de vários micronutrientes como o cálcio, fósforo, alumínio e molibdênio. Os micronutrientes de maior interesse, no que se refere ao metabolismo ósseo são o

magnésio, cálcio, fósforo e vitamina D. O boro, segundo estudos, influencia positivamente o metabolismo destes nutrientes, os quais desempenham um papel importante na manutenção da saúde óssea e assim este mineral pode ser significativo na prevenção da osteoporose. O consumo médio de boro avaliado em uma população dos Estados Unidos, foi cerca de 0,86 mg por dia, através dos alimentos ingeridos. Este mineral pode ser encontrado nos tecidos e fluidos corporais em consequência de uma dieta normal, sendo que ossos, unhas e cabelos geralmente, possuem maiores níveis de boro do que outros tecidos (NIELSEN, 2000; GALLARDO-WILLIAMS, et. al., 2002; NIELSEN, 2008).

Com relação à vitamina D, estudos realizados com frangos que receberam suplementação com boro (3 mg/kg de dieta) sugeriram que este mineral afeta alguns aspectos do metabolismo da vitamina D ou é sinérgico com ela, com relação a influência no crescimento. Estudos subsequentes com dietas formuladas com boro e magnésio na presença de quantidades moderadas de Vitamina D revelaram que os animais em estudo (frangos) conseguiram manter uma taxa adequada de crescimento na dieta com deficiência de magnésio, porém suplementada com boro, independente da presença da vitamina D. Outro ponto abordado por este estudo foi com relação à privação do boro na dieta dos frangos acompanhada por baixas quantidades de vitamina D em sua composição. As análises microscópicas realizadas nesse grupo sugeriram retardo nas calcificações de partes cartilaginosas e também foi observado redução na densidade de condrócitos na zona de proliferação celular em deficiência de boro e colecalciferol. Baseando-se nos achados, sugere-se que o boro pode aumentar a maturação celular e o crescimento de ossos longos (NIELSEN, 2014; HUNT, 1994).

Avaliando ainda a relação do boro com a vitamina D, segundo as variações do mesmo estudo discutido anteriormente, observou-se que os frangos que receberam uma dieta deficiente em vitamina D, mas suplementada com Boro, tiveram um aumento nas concentrações de 25-hidroxicolecalciferol e 1,25-dihidroxicolecalciferol. Para a dieta adequada em vitamina D e com baixos níveis de boro, observou-se aumento nas concentrações plasmáticas de 1,25-dihidroxicolecalciferol, sugerindo a relação positiva entre o boro e esta vitamina (BAI; HUNT, 1996). Esses achados indicaram uma interação do boro com a vitamina D, sugerindo que o boro pode desempenhar um papel na hidroxilação ou na extensão da meia vida da vitamina D₃, com base na sua capacidade de formar complexos com grupos hidroxila em compostos orgânicos. Este papel do boro poderia, portanto afetar o metabolismo ósseo e melhorar a força dos ossos (DERIVAN;VOLPE, 2003).

A interação do boro com o cálcio sugere que a suplementação deste mineral leva a redução

na excreção urinária de cálcio e aumento nos níveis de cálcio ionizado no plasma. Além disso, há evidências que a suplementação de cálcio isolada não é eficiente para prevenir a perda óssea, porém estudos realizados em mulheres na pré e pós-menopausa revelaram que a suplementação com boro foi capaz de aumentar a absorção de cálcio (DERIVAN;VOLPE, 2003; PALACIOS, 2006).

Abordando o mineral magnésio, estudos realizados em animais que receberam uma dieta deficiente nesse mineral, porém suplementada com boro apresentaram redução no nível de anormalidades causadas pela deficiência de magnésio e aumento desse mineral no plasma. Além disso, observou-se que mulheres na pré e pós-menopausa suplementadas com boro apresentaram menor excreção urinária de magnésio (DERIVAN;VOLPE, 2003; PALACIOS, 2006).

Segundo dados da literatura, a suplementação com boro também mostrou ser capaz de aumentar a força óssea em ratos. Além disso, a suplementação levou a um aumento na força de resistência das vértebras da coluna em contraste com a sua privação que causou a redução da fração do volume ósseo, espessura trabecular e aumentou a separação entre as trabéculas ósseas (HAKKI, et. al., 2013; YING, et. al., 2011).

Os estudos disponíveis demonstraram que o boro é um importante nutriente para os seres humanos. Pesquisas realizadas com homens com mais de 50 anos e mulheres pós menopausadas em terapia hormonal que receberam uma dieta pobre em boro por 63 dias que posteriormente foi suplementada com 3 mg/dia de B por 49 dias, revelaram que após a suplementação foi observado que o B afetou de forma positiva o metabolismo de cobre e magnésio, assim como o metabolismo energético, de nitrogênio e oxigênio reativo em humanos. Este estudo também sugeriu que o B afeta a função cerebral, performance psicomotora e a resposta a ingestão de nitrogênio (NIELSEN, 1998; NIELSEN, 2014).

A suplementação com boro também pode afetar a concentração de insulina circulante, sendo que esta responde ao boro dietético sugerindo que este mineral pode funcionar de modo a reduzir a quantidade de insulina necessária para manter os níveis de glicose sanguínea, pois ele altera o metabolismo do NADPH. Alterações no metabolismo de NADPH causam mudanças na dinâmica da membrana celular, levando a secreção de insulina (HUNT, 2012; DERIVAN;VOLPE, 2003). Em estudos com ratos em jejum alimentar noturno, a privação de boro aumentou os níveis de insulina plasmática, mas não houve mudança na concentração de glicose. Em estudos realizados em frangos demonstraram que a privação de boro gerou um aumento no pico de liberação de insulina pelo pâncreas (BAKKEN; HUNT, 2003).

Os hormônios esteroides estão diretamente relacionados com o osso e o boro pode

desempenhar importante papel na saúde óssea através da formação de hormônios esteroides, e assim, estar envolvido na prevenção da perda de cálcio e desmineralização óssea. A química deste mineral permite a formação de complexos com compostos orgânicos que contenham grupos hidroxilas em sua estrutura e, portanto pode promover a formação de testosterona e 17 β estradiol a partir de precursores envolvendo a adição de grupos hidroxilas aos anéis esteroidais (DERIVAN;VOLPE, 2003).

Além dos estudos *in vivo* que abordam os benefícios do boro, estudos *in vitro* com culturas de células osteoblástica (MC3T3-E1), também demonstraram que o boro é benéfico para a manutenção e formação óssea, estimulando a mineralização óssea e ainda aumentando os níveis de RNAm relacionados com o crescimento ósseo como colágeno tipo I e osteocalcina (HAKKI et. al., 2010).

Embora as evidencias de estudos *in vivo* e *in vitro* comprovem o benefício do boro na saúde óssea, mais estudos são necessários, incluindo estudos em humanos, para melhor entendimento do mecanismos envolvidos na melhora da saúde óssea, os quais podem contribuir para o tratamento desta condição patológica (NIELSEN, 2014).

REFERÊNCIAS

- ABDULAMEER, S.A.; SULAIMAN, S.A.; HASSALI, M.A.; SUBRAMANIAM, K.; SAHIB, M.N. Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: what do we know, and what we can do? **Patient prefer adherence**, v. 6, p. 435-448, 2012.
- ALJUBRAN, S.A.; WHELAN, G.J.; GLAUM, M.C.; LOCKEY, R.E. Osteoporosis in the at-risk asthmatic. **Allergy**, 2014.
- AMADEI, S. U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 1, p. 5-12, fev, 2006.
- AMMARY-RISCH, N.J., HUANG, S.S. The primary care physician's role in preventing vision loss and blindness in patients with diabetes. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 103, p. 281-283, 2011.
- ANDERSON, J.J.B. Nutrição e Saúde Óssea (cap. 24). In: L. Kathleen Mahan, Sylvia Escott-Stump. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**, 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 614-627.
- ARMSTRONG, T.A.; FLOWERS, W.L.; SPEARS, J.W.; NIELSEN, F.H. Long-term effects of boron supplementation on reproductive characteristics and bone mechanical properties in gilts. **J. Anim. Sci.**, v. 80, n.1, p. 154-61, 2002.
- ARSA, G., LIMA, L., ALMEIDA, S. S., MOREIRA, S. R.; CAMPBELL, C. S. G.; SIMÕES, H. G.; Diabetes Mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Rev. Bras. Cineantropom. Desempenho Hum.**, v. 11, n. 1, p. 103-111, 2009.
- AZIDAH, A.K.; HASNIZ, H.; ZUNAINA, E. Prevalence of Falls and Its Associated Factors among Elderly Diabetes in a Tertiary Center, Malaysia. **Curr. Gerontol. Geriatr. Res.**, 53907, 2012.
- BAI, Y.; HUNT, C. D. Dietary boron enhance efficacy of cholecalciferol in broiler chicks. **J. Trace Elem. Exp. Med.**, v. 9, p.117-32, 1996.
- BAKKEN, N. A.; HUNT, C. D. Dietary boron decrease peak pancreatic in situ insulin release in chicks and plasm insulin concentration in rats regardless of vitamin D ou magnesium status. **J. Nutri.**, v. 133, p. 3516-22, 2003.

BARBAGALLO, I.; VANELLA, A.; PETERSON, S.J.; KIM, D.H.; TIBULLO, D.; GIALLONGO, C.; VANELLA, L.; PARRINELLO, N.; PALUMBO, G.A.; DI, R.F.; ABRAHAM, N.G.; ASPRINIO, D. Overexpression of heme oxygenase- 1 increases human osteoblast stem cell differentiation. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 28, n. 3, p. 276–288, 2010.

BIPRADAS, R. Biomolecular basis of the role of diabetes mellitus in osteoporosis and bone fractures. **World J. diabetes**, v. 4, n. 4, p. 101-113, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Diabetes mellitus*. Cadernos da Atenção Básica nº 16. Ministério da Saúde, Brasília. 2006. Disponível em: < http://dtr2004.saude.gov.br/dab/documentos/cadernos_ab/documentos/abcd16.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Rede Interagencial de informações para a saúde (RIPSA)*. 2012. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabnet.exe?idb2012/g01.def>>. Acesso em: 7 jul. 2014.

BONEWALD, L.F. The amazing osteocyte. **J. Bone Miner. Res.**, v. 26, n. 2, p. 229–23, 2011.

CHATTAN, N.L.T.; SHARIR, A.; WEINER, S.; SHAHAR, R. Determining the elastic modulus of mouse cortical bone using electronic speckle pattern interferometry (ESPI) and micro computed speckle tomography: a new approach for characterizing small-bone material properties. **Bone**, v. 25, p. 84-90, 2009.

CHEN, H.; DENG, L.; LI, J. Prevalence of osteoporosis and its associated factors among older men with type 2 diabetes. **Inter. Journ. Endocrin.**, 2013.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, 2008.

DANAEI, G.; FINUCANE, M.M.; LU, Y.; SINGH, G.M.; COWAN, M.J.; PACIOREK, C.J.; LIN, J.K.; FARZADFAR, F.; KHANG, Y.H.; STEVENS, G.A.; RAO, M.; ALI, M.K.; RILEY, L.M.; ROBINSON, C.A.; EZZATI, M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants, **Lancet**, n. 378, p. 31-40, 2011.

DA SILVA, A.G.H; PIRES, L.V.; COZZOLINO, S.M.F. Boro (cap. 33). In: Silvia M. Franciscato Cozzolino. **Biodisponibilidade de Nutrientes**, 4ª ed. Barueri: Manole, 2012, p. 814-817.

DE PAULA, J.A.; ROSEN, C.J. Obesity, diabetes mellitus and last but not least, osteoporosis. **Arq. Bras. Endocrin. Metab.**, v. 54, n. 2, 2010.

DE PAULA, F.J.A.; DICK-DE-PAULA, I.; BORNSTEIN, S.; ROSTAMA, B.; LE, P.; LOTINUN, S.; BARON, R.; ROSEN, C. J. VDR Haploinsufficiency Impacts Body Composition and Skeletal Acquisition in a Gender-Specific Manner. **Calcified Tissue International**, v. 89, p. 179-191, 2011.

DERIVAN, T. A.; VOLPE, S. L. The Physiological Effects of Dietary Boron. **Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 219-231, 2003.

DIABETES ATLAS. **International Diabetes Federation, 2013**. Disponível em: <http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2013.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). 2014/2015. Classificação epidemiológica do *diabetes mellitus*. Disponível em: <<http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2014-05/diretrizes-sbd-2014.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

EMKEY, G.R., EPSTEIN, S. Secondary osteoporosis: pathophysiology and diagnosis. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, p. 911-935, 2014.

ERIRSEN, E.F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 11, n. 4, p. 219–227, 2010.

KAUR, B.; HENRY J. Micronutrient status in type 2 diabetes: a review. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 71, 2014.

KENPF, K.; RATHMANN, W.; HERDER, C. Impaired glucose regulation and type 2 diabetes in children and adolescents. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 24, p. 427-437, 2008.

FENG, X.; MCDONALD, J.M. Disorders of bone remodeling. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 6, n. 1, p. 121–145, 2011.

GALLARDO-WILLIAMS, M.T.; MARONPOT, R.R.; TURNER, C.H.; JOHNSON, C.S.; HARRIS, M.W.; JAYO, M.J. Effects of boric acid supplementation on bone histomorphometry, metabolism, and biomechanical properties in aged female F-344 rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 93, p. 155–169, 2003.

GALLAGHER, M.L. Os Nutrientes e seu Metabolismo (cap. 3). In: L. Kathleen Mahan, Sylvia Escott-Stump. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**, 12^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 134.

GAO, Y.; ORDAS, R.; KLEIN, J.D.; PRICE, S.R. Regulation of caspase-3 activity by insulin in skeletal muscle cells involves both PI3- kinase and MEK-1/2. **J. Appl. Physiol.**, 2008.

GHANIZADEH, G., BABAEI, M. NAGHII, M.R., M MOFID, TORKAMAN, G., M HEDAYATI. The effect of supplementation of calcium, vitamin D, boron, and increased fluoride intake on bone mechanical properties and metabolic hormones in rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 3, p. 211-217, 2014.

GORUSTOVICH, A.A.; STEIMETZ, T.; NIELSEN, F.H.; GUGLIELMOTTI, M.B. A histomorphometric study of alveolar bone modeling and remodeling in mice fed a boron-deficient diet. **Arch. Oral Biol.**, v. 53, p. 677–682, 2008.

HAMANN, C.; KIRSCHNER, S.; GÜNTHER, K.P.; HOFBAUER, L.C. Bone, sweet bone–osteoporotic fractures in diabetes mellitus. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 8, n. 5, p. 297-305, 2012.

HAKKI, S.S.; BOZUKURT, B.S; HAKKI, E. Boron regulates mineralized tissue – associated protein in osteoblasts (MC3T3-E1). **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 24, p. 243-50, 2010.

HAKKI, S.S.; DUNDAR, N.; KAYIS, S.A.; HAKKI, E.E.; HAMURCU, M.; KERIMOGLU U.; BASPINAR, N.; BASOGLU, A.; NIELSEN, F.H. Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 27, p. 148–153, 2013.

HODGE, J.M.; COLLIER, F.M.; PAVLOS, N.J.; KIRKLAND, M.A.; NICHOLSON, G.C. M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts. **Plos One**, v. 6, 2011.

HUNT, C. D. Dietary Boron: Progress in Establishing Essential Roles in Human Physiology. **Journal and Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, p. 157-160, 2012.

HUNT, C. D. The Biochemical Effects of Physiologic Amounts of Dietary Boron in Animal Nutrition Models. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, Suppl. 7, 1994.

INABA, T.; SAITO, H.; FUKUSHIMA, R.; HASHIGUCHI, Y.; LIN, M.; INOUE, T.; FUKATSU, K.; T.MUTO, T.OKA, A.TAKENAKA. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor

1 (IGF-1) on hepatic IGF-1-mRNA, plasma IGF-1 and nitrogen excretion in gastrectomized rats with liver cirrhosis. **Clinical Nutrition**, v. 15, p. 321-325, 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE – IOM. DRI's - Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin K, arsenic, Boron, chromium, copper, iodine, iron, Manganese, Molybdenum, nickel, Silicon, vanadium and zinc. Washington, DC: national academy Press, 2002. Disponível em: <<http://www.nap.edu>>.

INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, 6ª edição, maio, 2013.

JACKULIAK, P.; PAYER, J. Osteoporosis, fractures, and diabetes. Inter. **Journ. of Endocrin**, v. 10, 2014.

LAMPROPOULOS, C.E.; PAPAIOANNOU, I.; D'CRUZ, D.P. Osteoporosis – a risk factor for cardiovascular disease? **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 8, p. 587-598, 2012.

MANOLAGAS, S.C. From estrogen centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v. 31, n. 3, p. 266–300, 2010.

MAŁECKI, M.; SKUPIEŃ, J. Problems in Differential Diagnosis of Diabetes Types. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 118, n. 7-8, 2008.

MUSUMECI, G.; LORETO, C.; CLEMENTI, G.; FIORE, C.E.; MARTINEZ, G. An in vivo experimental study on osteopenia in diabetic rats. **Acta histochemica.**, v. 113, p. 619-625, 2011.

NIELSEN, F.H. Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats. **Biofactors**, v. 3, p. 161–171, 2008.

NIELSEN, F.H. Is boron nutritionally relevant? **Nutrition Reviews**, n.4, v. 66, p.183–191, 2008.

NIELSEN, F.H. The emergence of boron nutritionally important throughout the life cycle. **Nutrition**, v. 16, p. 512-4, 2000.

NIELSEN, F.H. The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 66, p. 319–330, 1998.

NIELSEN, F.H. Update on human health effects of boron. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 5, 2014.

NIELSEN, F.H.; STOECKER, B.J. Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, n. 23, v. 3, p. 195-203, 2009.

OLOFSSON, E. Superoxide Dismutase 1 And Cataract. **Department of Clinical ciences, Ophthalmology Department of Medical Biosciences, Clinical Chemistry, Umeå University**, n. 1254, 2009.

PALACIOS, C. The role of nutrients in bone health, from A to Z. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 621-628, 2006.

PAIM, B. A. **Estresse Oxidativo em Camundongos Knockout para o Receptor de LDL: papel dos substratos redutores de NADP⁺ mitocondrial e dos níveis de Ca²⁺ intracelular** 2008. 123 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, 2008. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000445622>>. Acesso em: 22 jun. 2014.

PAN, H.B.; ZHAO, X.L.; ZHANG, X.; ZHANG, K.B.; LI, L.C.; LI, Z.Y.; LAM, W.M.; LU, W.W.; WANG, D.P.; HUANG, W.H.; LIN, K.L.; CHANG, J. Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration. **J. R. Soc. Interface**, v. 7, p. 1025–1031, 2010.

PARFITT, A.M.; DREZNER, M.K.; GLORIEUX, F.H.; KANIS, J.A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P.J.; Ott, S.M.; RECKER, R.R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J. Bone Miner. Res.**, v. 2, n. 6, p. 595-610, 1987.

PEREIRA, F. A.; FACINCANI, I.; JORGETTI, V.; RAMALHO, L.; VOLPON, J.B ; REIS, L.M.; PAULA, F.J.A. Etiopathogenesis of Hepatic Osteodystrophy in Wistar Rats with Cholestatic Liver Disease. **Calcified Tissue International**, v. 85, p. 75-83, 2009.

RAGGATT, L.J.; PARTRIDGE, N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.

REDLICH, K.; SMOLEN, J.S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nat. Ver. Drug Discov.**, v. 11, p. 234-250, 2012.

REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., GEORGE C. 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. **American Institute of Nutrition**, 0022-3166/93, 1993.

SAITO, M.; FUJII, K.; MORI, Y.; MARUMO, K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. **Osteoporos. Int.**, v. 17, n. 10, p. 1514–1523, 2006.

SANGUINETI, R.; STORAGE, D.; MONACELLI, F.; FEDERICI, A.; ODETTI, P. Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 1126, n. 1, p. 166–172, 2008.

SANYAL, A.; GUPTA, H. H.; BAYRAKTAR, R. Y. Kwon, and T. M. Keaveny, “Shear strength behavior of human trabecular bone.” **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 15, p. 2513–2519, 2012.

SHAPSES, S. A.; RIEDT, C. S. Bone, Body Weight, and Weight Reduction: What Are the Concerns? **J. Nutr.**, v. 136, p. 1453-1456, 2006.

SHENG, M.H.; TAPER, L.J.; VEIT, H.; QIAN, H.; RITCHEY, S.J.; LAU, K.H. Dietary boron supplementation enhanced the action of estrogen, but not that of parathyroid hormone, to improve trabecular bone quality in ovariectomized rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 82, n. 1-3, p. 109-23, 2001.

SORIANO,R., HERRERA, S., NOGUÉS, X. Current and future treatments of secondary osteoporosis. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, p. 885-894, 2014.

STOLZING, A.; COLLEY, H.; SCUTT, A. Effect of age and diabetes on the response of mesenchymal progenitor cells to fibrin matrices. **Int. J. Biomater.**, 378034, 2011.

SZULC, P.; KAUFMAN, J. M.; DELMAS, P. D. Biochemical assessment of bone turnover and bone fragility in men. **Osteoporos Int.**, v. 18, p. 1451-1461, 2007.

TASH, P.N.; DOGAN, A.; DEMIRCI, S.; SAHIN, F. Isolation enhances odontogenic and osteogenic differentiation human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 153, p. 419-427, 2013.

ULIVIERE, M.F.; SILVA, B.C.; SARDANELI, F. HANS, D.; BILEZIKIAN, J.P.; CAUDARELLA, R. Utility of the trabecular bone score (TBS) in secondary osteoporosis. **Endocrine**, 2014.

VOLTARELLI, J.C.; COUR, C.E.B.; RODRIGUES, M.C.; MORAES, D.A.; STRACIERI,

A.B.P.L.; PIERONI, F.; NAVARRO, G.; MADEIRA, M.I.A.; SIMÕES, B.P. Terapia celular no diabetes mellitus. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n. 1, p. 149-156, 2009.

WENB, Y.; LI, X. Impact of diabetes and its treatments on skeletal diseases. **Front. Med.**, v. 7, n. 1, p. 81-90, 2013.

YING, X.; CHENG, S.; WANG, W.; LIN, Z.; CHEN, Q.; ZHANG, W.; KOU, D.; SHEN, Y.; CHENG, X.; ROMPIS, F.A.; PENG, L.; ZHULU, C. Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 44, p. 306–315, 2011.

CAPÍTULO II

SUPLEMENTAÇÃO COM BORO MELHORA A MICROESTRUTURA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS NÃO OBESOS

Autores: Renata Dessordi¹, Adriano Levi Spirlandeli², Ariane Zamarioli², José Batista Volpon², Anderson Marliere Navarro²

Afiliação:

¹Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – FMRP/USP.

Autor Correspondente: Renata Dessordi. Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900. Monte Alegre, 14049-900. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Telefone-fax: (55) (16) 3602 2466. E-mail: re_dessordi@hotmail.com

Artigo submetido à revista: Bone

Qualis A1

RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma doença crônica caracterizada por um desarranjo no metabolismo de carboidratos, gorduras, e proteínas. Acredita-se que esta patologia afeta negativamente a atividade dos osteoblastos, podendo desempenhar um papel na osteoporose. O presente estudo teve como objetivo estudar a influência de uma suplementação com boro no metabolismo ósseo de camundongos controles e diabéticos não obesos por um período de 30 dias. Os animais foram suplementados com 40 µg/0,5 ml de solução de boro (boro quelato H 5%). Foram avaliadas as possíveis alterações ósseas durante o desenvolvimento das complicações geradas pelo diabetes por análise dos parâmetros bioquímicos, cálcio total, fósforo inorgânico, magnésio e boro no soro e por análises ósseas (microtomografia computadorizada óssea, histomorfometria e ensaio mecânico de flexão em três pontos em tíbia e fêmur). O estudo foi constituído por 28 animais divididos em quatro grupos: Grupo CA: animais não diabéticos (n=10) que receberam 0,5 mL/dia de água destilada, Grupo CB: animais não diabéticos que receberam 0,5 mL de solução de boro (n=8), Grupo DA: animais diabéticos que receberam 0,5 mL de água destilada (n=5) e Grupo DB: animais diabéticos que receberão 0,5 mL de solução de boro (n=5). A partir das análises realizadas foi possível observar que o volume ósseo do osso cortical para o grupo DB foi significativamente maior em comparação com os grupos CA e DA ($p \leq 0,05$). A fração do volume ósseo trabecular foi maior para o grupo CB em comparação com CA e DA. Os valores de superfície óssea específica foram maiores para o grupo DB em comparação com CA e a espessura trabecular e índice de estrutura foram significativamente diferentes para os grupos CA e CB em comparação com DA. As dosagens de boro no soro foram maiores para o grupo DB em comparação com CA e os grupos DA e DB apresentaram concentração de magnésio inferiores aos grupos CA e CB. O teste biomecânico revelou manutenção dos parâmetros de força em animais DB em comparação com o grupo DA e controles. Sendo assim, os resultados sugerem melhora nos parâmetros de força óssea e microestrutura óssea em animais diabéticos suplementados com boro.

Palavras - chave: diabetes, osteopenia, suplementação, metabolismo ósseo, boro.

1. INTRODUÇÃO

O papel da nutrição no desenvolvimento do tecido ósseo tem sido foco de muitos estudos, visando investigar os componentes dietéticos necessários para a manutenção das funções ósseas normais, assim como o seu desenvolvimento adequado. Os nutrientes como o cálcio, fósforo, magnésio, fluoreto, vitamina D, zinco, cobre e boro são conhecidos por promover um desenvolvimento normal das funções ósseas, garantindo o ganho de massa e força ao longo do desenvolvimento. O consumo inadequado desses nutrientes ou alterações no seu metabolismo, como aumento de sua excreção, prejuízos na absorção devido a presença de alguma doença, pode levar a um prejuízo na estrutura do osso e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças relacionadas ao tecido ósseo como a osteoporose [1].

A osteoporose trata-se de uma doença esquelética sistêmica caracterizada por um aumento na susceptibilidade à fratura. A maioria dos casos estão associados a pós menopausa ou ao envelhecimento, porém esta doença também pode desenvolver-se como consequência de alguma situação patológica [2]. O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença que predispõe um maior risco para o desenvolvimento da osteoporose [3].

O DM, sob condição crônica, pode afetar negativamente diversas partes do organismo, como os ossos, músculos, retina, rins e o sistema cardiovascular. Os efeitos desta doença, nas células ósseas são muito complexos e diversos estudos estão sendo realizados atualmente para tentar explorar os mecanismos exatos através dos quais o DM induz a osteoporose e conseqüentemente o aumento no índice de fraturas ósseas [4].

A hiperglicemia, condição que implica em várias complicações do diabetes, regula negativamente o funcionamento normal das células osteoblásticas, responsáveis pela formação óssea e regula positivamente o funcionamento das células osteoclásticas, que estão ligadas a reabsorção óssea, condição que poderia facilitar o processo de desenvolvimento da osteoporose e, além disso, ainda pode causar disfunção e falha em diferentes órgãos [5, 6, 7].

O principal efeito na patogênese das anormalidades ósseas na deficiência de insulina relaciona-se à formação óssea. Em modelos experimentais de DM tipo 1 foi encontrado diminuição no número de osteoblastos e na remodelação óssea, acompanhado por redução no conteúdo mineral [5, 8].

Pacientes diabéticos são susceptíveis a terem níveis diminuídos de minerais que exercem funções importantes no metabolismo ósseo, como por exemplo, o boro. O boro é um elemento

essencial para as plantas, porém o seu papel no organismo de humanos e outros mamíferos, ainda não está bem esclarecido. Estudos sugerem que este mineral é essencial para a manutenção da saúde óssea e possui papel vital na embriogênese, crescimento ósseo, funções imunes e psicomotoras [9]. Gorustovich e colaboradores [10], por meio de um estudo experimental com camundongos, relataram que o boro é benéfico para o crescimento e manutenção óssea. Hakki e colaboradores [11], concluíram que a privação deste mineral pode afetar o crescimento ósseo, inibindo a formação do osso. Além disso, este mineral está ligado à formação de hormônios esteroides e influencia o metabolismo de micronutrientes como cálcio, magnésio e vitamina D e, portanto, pode estar envolvido na prevenção da perda de cálcio e desmineralização óssea [12, 13].

Desta forma a suplementação com minerais essenciais ao metabolismo ósseo como o boro pode ser um fator importante na preservação da massa óssea, sugerindo ter uma função nutricional e farmacológica na prevenção e tratamento adjuvante da osteoporose diabética.

Os estudos disponíveis ainda são limitados sobre a real participação deste mineral no metabolismo ósseo e os efeitos de sua suplementação. Desta forma, torna-se necessário uma melhor investigação científica com marcadores do metabolismo ósseo que avaliem a microarquitetura óssea. Portanto o objetivo desse estudo foi estudar a influência da suplementação com boro nos parâmetros bioquímicos e no metabolismo ósseo de camundongos diabéticos não obesos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas diabéticas não obesas (NOD) com peso entre 18-20 g, provenientes do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da USP, ficando por aproximadamente 16 semanas em observação e acompanhamento a partir do primeiro dia de alojamento com água e ração ad libitum. Após o início do desenvolvimento do diabetes estes animais foram divididos em quatro grupos: Grupo CA: animais não diabéticos (n=10) que receberam 0,5 mL/dia de água destilada, Grupo CB: animais não diabéticos que receberam 0,5 mL de solução de boro (n=8), Grupo DA: animais diabéticos que receberam 0,5 mL de água destilada

(n=5) e Grupo DB: animais diabéticos que receberão 0,5 mL de solução de boro (n=5). A administração da água destilada e da solução de boro foi realizada uma vez ao dia via gavagem.

2.2 Experimento

Os animais foram acompanhados seguindo as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais, obedecendo aos preceitos da lei 11.794/2008 e da Resolução nº 879/2008 da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, registrado sob número 074/2013 (ANEXO A).

Para a realização deste estudo, foi preparada uma solução de boro com 40 µg de boro em 0,5 ml de solução utilizando-se o boro quelato H 5%. Durante todo o experimento, foi realizado um acompanhamento quinzenal dos níveis glicêmicos e do peso dos animais controles e diabéticos. A glicemia foi dosada, através de um Monitor de Glicemia Accu - CheekAdvantage II com a utilização da tira teste e o peso em balança Filizola® Star precisão de 0,5g.

Os animais, após o período experimental de 30 dias, foram eutanasiados por decapitação para a coleta de 0,5 mL de sangue. A amostra de sangue foi coletada em um ependorfe de 2 ml e centrifugada a 2.500 rpm, durante vinte minutos. O soro obtido foi utilizado para determinação das dosagens bioquímicas de cálcio total, fósforo, magnésio e boro no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Fcfrp-USP.

Os minerais foram dosados pelo método ICP-MS (espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo). Foi realizada com um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado, equipado com uma célula de reação (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, Perkin Elmer, Sciex, Norwalk, CT, EUA), operando com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair, Brasil).

2.3 Microtomografia Computadorizada Óssea

Este método avaliou o fêmur esquerdo, segundo sugerido por De Paula et al. [14]. O fêmur esquerdo dos animais foi conservado em etanol 70%, por um período de 21 dias. Posteriormente os ossos foram limpos, a partir da retirada de todo o músculo que o envolve e armazenado novamente

em álcool 70% até a realização da análise, a qual foi realizada na Faculdade de Odontologia da USP de Ribeirão Preto.

As amostras ósseas foram escaneadas por Microtomógrafo de alta resolução modelo 1172, marca SkyScan (Bélgica), composto por um tubo de raios-X de microfoco com fonte de alta tensão (100kV), um porta amostra com manipulador de precisão e um detector baseado em uma câmera CCD de 11Mp conectados a um computador de controle e aquisição de dados interligado em rede a um cluster de computadores com software para reconstrução, visualização e quantificação de imagens 2D e 3D.

A varredura em fêmur foi realizada em baixa resolução, nível de energia 55k Vp e intensidade de 145 μ A. O aparelho foi calibrado semanalmente com phantom fornecido pela Scanco. A fração de volume trabecular e a microarquitetura foram avaliadas na esponjosa secundária, começando a 0,6 mm proximal da cartilagem de crescimento até 1,5 mm proximal. A análise do osso cortical foi realizada na região transversal da diáfise do fêmur, adjacente e distal ao terceiro trocânter, com cortes de 1 mm [15]. Para análise das imagens foi utilizado o programa CT Analyser v.1.13.

2.4 Ensaio Mecânico de Flexão em Três Pontos em Tíbia e Fêmur

Tíbia e fêmur direitos dos animais foram utilizados para a realização do teste mecânico de flexão em três pontos, através do equipamento de análise de resistência de material (Máquina Universal de Ensaio) do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A carga sobre o osso foi aplicada na região central no sentido ântero-posterior, por meio de um acessório acoplado a célula de carga. Os ossos (fêmur e tíbia) foram posicionados junto ao dispositivo, de maneira que o colón do fêmur e da tíbia se encostassem a um dos apoios, e suas faces anterior ficassem voltadas para a base da máquina. Um relógio comparador Mitutoyo®, com precisão de 0,01 mm foi utilizado para a coleta dos intervalos de deflexão durante todo ensaio mecânico. Os valores de deflexão foram medidos a cada 0,05 mm simultaneamente com a mensuração do valor da carga aplicada na ponte de extensimetria.

As medidas de deflexão e carga aplicada foram mensuradas até o momento da ruptura óssea ou até que os valores comecem a diminuir indicando que o osso atingiu sua capacidade máxima de

resistência. A cada incremento de carga aplicada ao material foi registrada a deformação correspondente, para construção do gráfico, carga versus deflexão, a partir do qual foi possível obter as propriedades biomecânicas como carga máxima, rigidez e resiliência.

2.5 Análise Estatística

Foi realizada a análise exploratória dos dados para uma visão global das características das variáveis obtidas, descrevendo-as por meio de tabelas com medidas descritivas. Foram calculadas as estatísticas mediana, mínimo e máximo com intervalo de confiança (95%). Após a análise da distribuição dos dados foram realizados os testes estatísticos para testar a igualdade entre os grupos.

Foi utilizado o software SPSS Statistics versão 22.0 para as análises estatísticas. Para comparação das variáveis de peso e glicemia ao longo do período de estudo foi realizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas com correção de Bonferroni. Para comparação entre todos os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis (ANOVA não paramétrica) e quando houve diferença significativa foi utilizado o teste post hoc de Dunn. A significância estatística foi definida como $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

As dosagens de peso e glicemia dos grupos CA, CB, DA e DB, estão apresentadas na Tabela 1. A análise realizada revelou que não houve diferença significativa no peso corporal dos animais controles e diabéticos na primeira e segunda aferição do peso, porém ao final do experimento houve perda significativa de peso nos animais diabéticos (DA e DB) em comparação com o grupo CA.

Os valores glicêmicos revelaram que os grupos DA e DB apresentaram valores de glicemia significativamente superiores aos grupos CA e CB na primeira aferição de glicemia, na segunda e na terceira, evidenciando o quadro de diabetes.

Os resultados referentes à dosagem de minerais em soro de animais controles e diabéticos podem ser observados na Tabela 2. Com relação à dosagem do boro, o grupo DB apresentou valores superiores ao grupo CA. A dosagem de magnésio revelou valores significativamente superiores desse mineral para os grupos CA e CB em comparação com os grupos DA e DB.

Os resultados do ensaio mecânico de flexão em tíbia e fêmur dos animais controles e diabéticos podem ser observados nas Tabelas 3 e 4. O teste biomecânico em tíbia revelou menor força no grupo DB em comparação com o grupo CA e CB. A rigidez óssea foi menor no grupo DA em comparação com o grupo DB. Com relação à energia de ruptura, o grupo DA apresentou valores inferiores ao CB. O deslocamento da força máxima foi superior para o grupo CA em comparação com o grupo DB. O fêmur de animais DA apresentaram menor força em comparação com o grupo CA, CB e DB. A energia de ruptura e a rigidez óssea foram menores para o grupo DA em comparação com o grupo CA.

Os resultados da microtomografia óssea do osso cortical podem ser observados na Tabela 5. A Figura 1 apresenta uma imagem representativa do exame ósseo para cada grupo de estudo.

O volume ósseo (BV) de animais dos grupos CB e DB apresentaram valores significativamente superiores aos grupos CA e DA. Os animais do grupo CB apresentaram valores de fração do volume ósseo (BV/TV) significativamente superiores em comparação com o grupo CA e DA. Com relação à porosidade do osso cortical, observou-se que os ossos dos animais CB e DA apresentaram maior porosidade em comparação ao grupo CA.

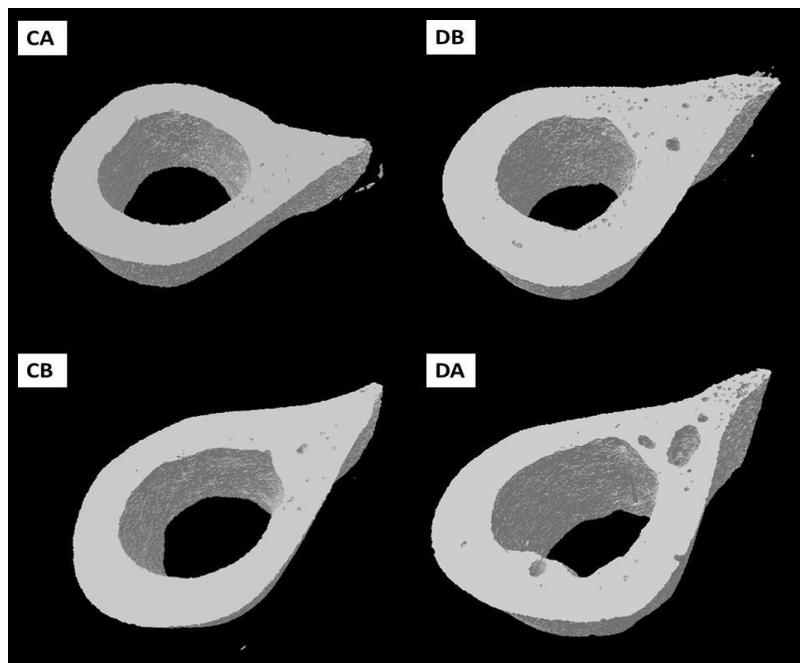


Figura 1. μ CT do osso cortical, diáfise do fêmur, adjacente e distal ao terceiro trocanter (cortes de 1 mm) de animais controles não suplementados (CA) e suplementados (CB) e animais diabéticos não suplementados (DA) e suplementados (DB).

A Tabela 6 apresenta os resultados referentes à análise de microtomografia do osso trabecular. A Figura 2 apresenta uma imagem representativa do osso trabecular de cada grupo de estudo.

Com relação à fração do volume ósseo do osso trabecular (BV/TV) os grupos CB e DB apresentaram valores significativamente superiores aos grupos CA e DA. A superfície óssea específica (BS/BV) foi significativamente superior para o grupo DB em comparação com o grupo CA. O índice de estrutura (SMI) foi superior para o grupo CA em comparação com o grupo DA. A espessura trabecular para os grupos CA e CB apresentaram valores significativamente superiores ao grupo DA. Não houve diferença significativa entre os grupos com relação aos parâmetros de volume ósseo, número de trabéculas, separação trabecular e conectividade trabecular.

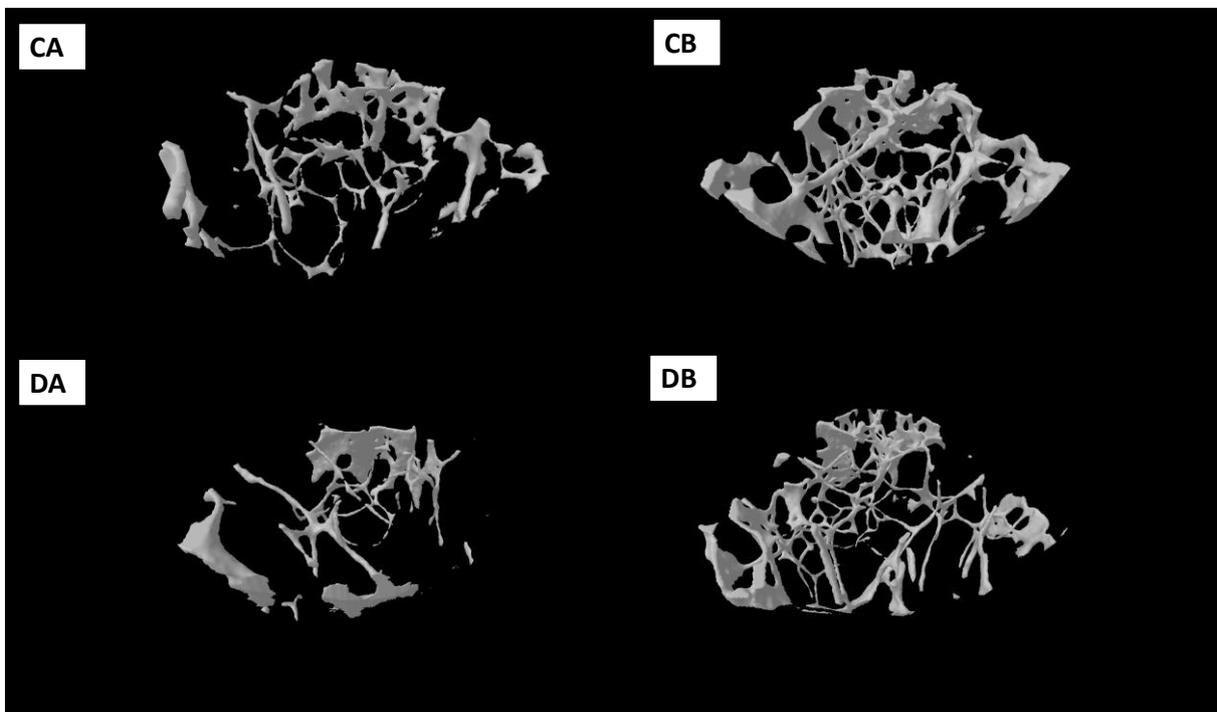


Figura 2. μ CT do osso trabecular, na esponjosa secundária a 0,6 mm proximal da cartilagem de crescimento até 2,5 mm proximal, de animais controles não suplementados (CA) e suplementados (CB) e animais diabéticos não suplementados (DA) e suplementados (DB).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou as possíveis alterações no metabolismo ósseo de animais controles e diabéticos suplementados e não suplementados por meio de exames que possibilitaram a

avaliação da microestrutura do osso, força e dosagem de minerais que estão relacionados à saúde óssea.

Segundo dados da literatura sabe-se que a osteoporose é uma doença de alta incidência e que leva a deterioração da microarquitetura do osso. Além disso, essa doença pode se desenvolver a partir de uma condição preexistente como, por exemplo, no diabetes [5, 16]. O DM tem como principal complicação a hiperglicemia, a qual pode levar ao desenvolvimento de vários outros problemas de saúde como a osteoporose [17]. Com base nos dados literários, este estudo foi realizado com camundongos da linhagem NOD diabéticos e controles. O acompanhamento quinzenal do peso e glicemia dos animais possibilitou a confirmação do diabetes nos grupos DA e DB em comparação os grupos CA e CB por meio da análise de perda de peso com o decorrer da evolução da doença e a manutenção dos índices glicêmicos elevados do início ao final do experimento.

Além das complicações ósseas decorrentes da hiperglicemia crônica provocada pelo diabetes, pacientes diabéticos também possuem risco aumentado de apresentarem concentrações de vitaminas e minerais diminuídos. Os estudos apontam que estes pacientes apresentam aumento na excreção urinária de alguns minerais como o cálcio, fósforo e magnésio, que estão diretamente relacionados com a saúde óssea [18].

Visando melhora nas complicações ósseas que podem se desenvolver a partir de um quadro de DM crônico, os animais desse estudo foram suplementados com boro. A escolha desse nutriente foi baseada em estudos que sugerem a essencialidade desse mineral na mineralização e na estrutura óssea, além da influência que exerce no metabolismo de alguns minerais que compõem a matriz óssea [13, 1]. A análise na concentração de boro no plasma ou no soro pode ser um indicativo do estado nutricional relativo ao boro. Com relação à sua dosagem realizada em soro de animais controles e diabéticos de ambos os grupos, verificou-se que o grupo DB apresentou concentrações de boro significativamente maiores em comparação com o grupo CA, sugerindo que esse aumento pode ter ocorrido devido à suplementação.

Estudo realizado em humanos revelou concentrações plasmáticas 1,5 vezes maior em resposta ao aumento desse mineral na dieta [19]. Outro estudo realizado em mulheres na perimenopausa que receberam uma dieta suplementada com boro por um período de 60 dias também apresentaram concentrações plasmáticas de boro aumentadas após a intervenção dietética [20, 21].

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de cálcio e fósforo no soro de animais de ambos os grupos. Estudos realizados por Derivan; Volpe [20] revelaram que a suplementação de boro reduziu a excreção urinária de cálcio e aumentou as concentrações plasmáticas desse mineral. Em contrapartida alguns estudos revelaram que o boro não afeta significativamente as concentrações de cálcio e fósforo, mesmo em casos de privação sendo que nesse sentido as alterações ósseas estão relacionadas a um menor turnover ósseo levando a insuficiência de força e prejuízo da estrutura do osso [11, 19, 22].

Derivan; Volpe [20] também analisaram o comportamento do magnésio em relação à suplementação de boro e segundo seus achados o boro aumentou as concentrações de magnésio nos animais suplementados e atenuou sua excreção urinária. Em contrapartida, no presente estudo os resultados referentes à dosagem de magnésio revelaram redução significativa em suas concentrações em animais DA e DB em comparação com CA e CB. Sugere-se que em animais diabéticos a suplementação não foi capaz de aumentar as concentrações de magnésio e nem mantê-la em níveis semelhantes aos animais controles, fato que pode ser explicado em resposta ao quadro de diabetes que causa aumento na excreção urinária de alguns minerais.

Os resultados do teste de flexão em três pontos realizado na tíbia de animais controles e diabéticos suplementados e não suplementados, não revelaram aumento na força óssea nos grupos DB e CB, porém a suplementação foi capaz de manter outros parâmetros de força como a rigidez e a energia de ruptura óssea de animais diabéticos suplementados com valores sem diferença significativa em comparação aos controles. O teste realizado no fêmur revelou que os animais diabéticos suplementados apresentaram maior força óssea em comparação com o grupo DA. Além disso, foi observado manutenção dos parâmetros de rigidez e energia de ruptura para os animais diabéticos suplementados em comparação com os controles.

Um estudo conduzido por Armstrong e colaboradores [23] avaliou se a suplementação com boro era capaz de aumentar a força óssea em fêmures de porcos. Os resultados desse estudo revelaram que os animais que foram suplementados apresentaram maior força óssea e comparação com os que não receberam a suplementação. Em outro estudo realizado por Sheng e colaboradores [24], foram avaliados os efeitos da suplementação de boro em fêmures e tíbias de ratos e em contrapartida, não observaram aumento nos parâmetros de força nos animais suplementados. Outro estudo que analisou os efeitos da privação do boro também em fêmures de ratos por meio o ensaio biomecânico, revelaram parâmetros de força óssea comprometidos pela carência de boro [25]. Hakki e colaboradores [11] encontraram resultado semelhante com o do presente estudo em

fêmures de coelhos suplementados com boro submetidos ao teste biomecânico e também Ghanizadeh e colaboradores [1] verificaram aumento na força máxima e na resistência de fêmures de ratos suplementados com boro e flúor, sustentando, portanto os resultados encontrados. Além disso, os pesquisadores também observaram aumento na força óssea do fêmur e da tíbia dos animais suplementados. Sugere-se, portanto, que o boro pode aumentar a força óssea por meio do aumento nas concentrações de cálcio e fósforo no osso, como foi determinado no estudo de Hakki e colaboradores [11], que verificaram que além dos ossos dos animais suplementados serem mais resistentes possuíam maiores concentrações de cálcio e fósforo em comparação com os animais que não foram suplementados.

A análise de microtomografia computadorizada óssea foi realizada no fêmur dos animais para avaliar a microestrutura do osso, sendo essa análise essencial para avaliar a ação do boro na microarquitetura óssea trabecular e cortical. Estudos sugerem que a ação desse mineral está direcionada para a melhora do osso trabecular [25, 13, 26]. Nesse estudo, além das melhoras nos parâmetros referentes ao osso trabecular, também foi observado uma melhora significativa nos parâmetros do osso cortical dos animais diabéticos suplementados e também nos controles que receberam a suplementação em comparação com os grupos não suplementados (DA e CA). Os animais suplementados apresentaram um ganho de volume ósseo significativamente superior em relação aos grupos DA e CA e, além disso, os animais DB apresentaram valores de BV/TV e Ct.Po sem diferença significativa com os controles, sendo que o mesmo não foi observado no grupo DA. O ganho de volume ósseo e manutenção dos parâmetros de BV/TV e Ct.Po, estão de acordo com o estudo realizado por Nielsen e Stoecker [25] e com os resultados do teste de força desse estudo, que demonstrou que o fêmur de animais diabéticos suplementados com boro apresentaram força óssea superior ao grupo DA. Com relação ao osso trabecular, foi observado manutenção nos valores dos parâmetros de BV/TV, SMI e Tb.Th nos animais diabéticos suplementados em comparação com os controles. Além disso, os animais do grupo DB apresentaram maiores valores de BS/BV em comparação com o grupo CA. Resultados semelhantes para o osso trabecular foram observados no estudo de Nielsen e Stoecker [25], porém avaliando a influência da privação desse mineral. A análise de microtomografia realizada por esses pesquisadores na quarta vertebra da coluna lombar indicou que a privação do boro levou a redução da fração do volume ósseo, redução na espessura trabecular, SMI e aumento na separação das trabéculas, sendo que o oposto foi observado nesse estudo que analisou a suplementação desse mineral.

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a suplementação com boro melhorou e manteve parâmetros relacionados à força óssea e a microestrutura do osso trabecular e cortical em animais diabéticos e controles suplementados.

Lista de Abreviaturas e Siglas

DM – Diabete Mellitus; NOD – Camundongos diabéticos não obesos; CA – Camundongo não diabéticos e não suplementado; CB – Camundongo não diabético suplementado; DA – Camundongo diabético não suplementado; DB – Camundongo diabético suplementado; Fcfrp/USP – Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; ICP-MS: Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo; μ CT – Microtomografia computadorizada óssea; BV – Volume ósseo; BV/TV – Fração do volume ósseo; Ct.Th – Espessura do osso cortical; Ct.Po – Porosidade cortical; BS/BV – Superfície óssea específica; SMI – Índice de estrutura; Tb.Th – Espessura trabecular; Tb.N – Número de trabéculas; Tb.Sp – Separação trabecular; Conn.D – conectividade trabecular.

Financiamento:

Este projeto foi financiado pela Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA do HCRP-FMRP.

REFERÊNCIAS

[1] GHANIZADEH, G., BABAEI, M. NAGHIL, M.R., M MOFID, TORKAMAN, G., M HEDAYATI. The effect of supplementation of calcium, vitamin D, boron, and increased fluoride intake on bone mechanical properties and metabolic hormones in rat. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 3, p. 211-217, 2014.

[2] SORIANO,R., HERRERA, S., NOGUÉS, X. Current and future treatments of secondary osteoporosis. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, p. 885-894, 2014.

[3] EMKEY, G.R., EPSTEIN, S. Secondary osteoporosis: pathophysiology and diagnosis. **Best**

Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 28, p. 911-935, 2014.

[4] HAMANN, C.; KIRSCHNER, S.; GÜNTHER, K.P.; HOFBAUER, L.C. Bone, sweet bone–osteoporotic fractures in diabetes mellitus. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 8, n. 5, p. 297-305, 2012.

[5] LAMPROPOULOS, C.E.; PAPAIOANNOU, I.; D'CRUZ, D.P. Osteoporosis – a risk factor for cardiovascular disease? **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 8, p. 587-598, 2012.

[6] GAO, Y.; ORDAS, R.; KLEIN, J.D.; PRICE, S.R. Regulation of caspase-3 activity by insulin in skeletal muscle cells involves both PI3- kinase and MEK-1/2. **J. Appl. Physiol.**, 2008.

[7] JACKULIAK, P.; PAYER, J. Osteoporosis, fractures, and diabetes. **Inter. Journ. of Endocrin**, v. 10, 2014.

[8] SZULC, P.; KAUFMAN, J. M.; DELMAS, P. D. Biochemical assessment of bone turnover and bone fragility in men. **Osteoporos Int.**, v. 18, p. 1451-1461, 2007.

[9] PAN, H.B.; ZHAO, X.L.; ZHANG, X.; ZHANG, K.B.; LI, L.C.; LI, Z.Y.; LAM, W.M.; LU, W.W.; WANG, D.P.; HUANG, W.H.; LIN, K.L.; CHANG, J. Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration. **J. R. Soc. Interface**, v. 7, p. 1025–1031, 2010.

[10] GORUSTOVICH, A.A.; STEIMETZ, T.; NIELSEN, F.H.; GUGLIELMOTTI, M.B. A histomorphometric study of alveolar bone modeling and remodeling in mice fed a boron-deficient diet. **Arch. Oral Biol.**, v. 53, p. 677–682, 2008.

[11] HAKKI, S.S.; DUNDAR, N.; KAYIS, S.A.; HAKKI, E.E.; HAMURCU, M.; KERIMOGLU U.; BASPINAR, N.; BASOGLU, A.; NIELSEN, F.H. Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 27, p. 148–153, 2013.

[12] PALACIOS, C. The role of nutrients in bone health, from A to Z. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 621-628, 2006.

[13] NIELSEN, F.H. Update on human health effects of boron. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 5, 2014.

[14] DE PAULA, F.J.A.; DICK-DE-PAULA, I.; BORNSTEIN, S.; ROSTAMA, B.; LE, P.;

LOTINUN, S.; BARON, R.; ROSEN, C. J. VDR Haploinsufficiency Impacts Body Composition and Skeletal Acquisition in a Gender-Specific Manner. **Calcified Tissue International**, v. 89, p. 179-191, 2011.

[15] CHATTAN, N.L.T.; SHARIR, A.; WEINER, S.; SHAHAR, R. Determining the elastic modulus of mouse cortical bone using electronic speckle pattern interferometry (ESPI) and micro computed speckle tomography: a new approach for characterizing small-bone material properties. **Bone**, v. 25, p. 84-90, 2009.

[16] CHEN, H.; DENG, L.; LI, J. Prevalence of osteoporosis and its associated factors among older men with type 2 diabetes. **Inter. Journ. Endocrin.**, 2013.

[17] MUSUMECI, G.; LORETO, C.; CLEMENTI, G.; FIORE, C.E.; MARTINEZ, G. An in vivo experimental study on osteopenia in diabetic rats. **Actahistochemica.**, v. 113, p. 619-625, 2011.

[18] OLOFSSON, E. Superoxide Dismutase 1 And Cataract. **Department of Clinical sciences, Ophthalmology Department of Medical Biosciences, Clinical Chemistry, Umeå University**, n. 1254, 2009.

[19] NIELSEN, F.H. The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 66, p. 319-330, 1998.

[20] DERIVAN, T. A.; VOLPE, S. L. The Physiological Effects of Dietary Boron. **Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 219-231, 2003.

[21] HUNT, C. D. Dietary Boron: Progress in Establishing Essential Roles in Human Physiology. **Journal and Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, p. 157-160, 2012.

[22] YING, X.; CHENG, S.; WANG, W.; LIN, Z.; CHEN, Q.; ZHANG, W.; KOU, D.; SHEN, Y.; CHENG, X.; ROMPIS, F.A.; PENG, L.; ZHULU, C. Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 44, p. 306-315, 2011.

[23] ARMSTRONG, T.A.; FLOWERS, W.L.; SPEARS, J.W.; NIELSEN, F.H. Long-term effects of boron supplementation on reproductive characteristics and bone mechanical properties in gilts. **J. Anim. Sci.**, v. 80, n.1, p. 154-61, 2002.

[24] SHENG, M.H.; TAPER, L.J.; VEIT, H.; QIAN, H.; RITCHEY, S.J.; LAU, K.H. Dietary boron supplementation enhanced the action of estrogen, but not that of parathyroid hormone, to improve

trabecular bone quality in ovariectomized rats. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 82, n. 1-3, p. 109-23, 2001.

[25] NIELSEN, F.H.; STOECKER, B.J. Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, n. 23, v. 3, p. 195-203, 2009.

[26] NIELSEN, F.H. Is boron nutritionally relevant? **Nutrition Reviews**, n.4, v. 66, p.183–191, 2008.

TABELAS

Tabela 1. Aferição do peso e glicemia em camundongos NOD controles e diabéticos suplementados com boro e não suplementados, durante o período experimental de 30 dias.

GRUPOS		PESO (g)			GLICEMIA (mg/dl)		
		DIA 01	DIA 15	DIA 30	DIA 01	DIA 15	DIA 30
CA (n=10)	Mediana	26 {24–26}	24 {24–26}	26 ^a {24–26}	113,5 ^a {96–128}	114,5 ^a {94–154}	109,5 ^a {98–161}
CB (n=08)	Mediana	25 {22–28}	25 {24–28}	24 ^{ab} {22–28}	108 ^a {98–117}	118,5 ^a {111–130}	120 ^a {101–140}
DA (n=05)	Mediana	26 {26–28}	24 {22–24}	22 ^b {20–24}	360 ^b {308–500}	585 ^b {440–593}	556 ^b {403–560}
DB (n=05)	Mediana	24 {24–26}	22 {20–26}	20 ^b {16–24}	390 ^b {320–550}	551 ^b {545–593}	580 ^b {550–593}

Nota: Teste de Kruskal Wallis. Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Letras diferentes $p \leq 0,05$.

Tabela 2. Valores correspondentes à dosagem de minerais no soro de animais controles e diabéticos suplementados e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.

GRUPOS		BORO	CÁLCIO	FÓSFORO	MAGNÉSIO
		($\mu\text{g/l}$)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
CA (n=5)	Mediana	81.51 ^a {53.3–97.75}	25.04 {22.90–28.88}	17.17 {15.42–20}	2.38 ^a {2.18–2.83}
CB (n=5)	Mediana	98.72 ^{ab} {74.15–126.39}	25.60 {18.69–32.55}	18.42 {13.79–21.99}	2.64 ^a {2.16–2,94}
DA (n=5)	Mediana	83.36 ^{ab} {37.22–107.10}	24.26 {17.42–25.63}	16.10 {13.40–21.42}	1.81 ^b {1.85–1.88}
DB (n=5)	Mediana	114.88 ^b {93.35–160.78}	22.16 {18.12–28.28}	18.37 {13.46–23.12}	2.06 ^b {1.87–2.29}

Nota: Teste de Kruskal Wallis. Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Letras diferentes $p \leq 0,05$.

Tabela 3. Ensaio mecânico de flexão em três pontos em tíbias de camundongos NOD controles e diabéticos, suplementados com boro e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.

GRUPOS		Força máxima (N)	Deslocamento Força máxima (mm)	Rigidez (N/mm)	Energia de Ruptura (N.mm)
CA (n=9)	Mediana	21.45 ^a {18.10–22.70}	0.28 ^a {0.25–0.38}	98.55 ^{ab} {79.96–108.90}	8.01 ^{ab} {3.41–9.36}
CB (n=7)	Mediana	20.12 ^a {18.01–21.03}	0.29 ^{ab} {0.26–0.31}	93.51 ^{ab} {89.90–101.12}	7.09 ^a {4.23–9}
DA (n=5)	Mediana	19.64 ^{ab} {17.82–21.77}	0.25 ^{ab} {0.26–0.29}	85.88 ^a {81.72–93.26}	4.18 ^b {2.41–5.11}
DB (n=5)	Mediana	16.76 ^b {16.31–17.92}	0.27 ^b {0.25–0.29}	99.56 ^b {94.85–107.38}	5.18 ^{ab} {3.24–6.44}

Nota: Teste de Kruskal Wallis. Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Letras diferentes $p \leq 0,05$.

Tabela 4. Ensaio mecânico de flexão em três pontos em fêmures de camundongos NOD controles e diabéticos, suplementados com boro e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.

GRUPOS		Força máxima (N)	Deslocamento Força máxima (mm)	Rigidez (N/mm)	Energia de Ruptura (N.mm)
CA (n=9)	Mediana	23.76 ^a {23.03–24.66}	0.38 {0.26–0.41}	109.05 ^a {106.1–112.5}	7.80 ^a {5.99–9.29}
CB (n=7)	Mediana	21.81 ^a {20.30–22.57}	0.30 {0.27–0.51}	104.11 ^{ab} {93.90–109.90}	6.27 ^{ab} {3.43–8.70}
DA (n=5)	Mediana	17.76 ^b {14.79–19.13}	0.28 {0.23–0.35}	89.98 ^b {64.38–99.60}	3.45 ^b {1.87–4.54}
DB (n=5)	Mediana	21.91 ^a {19.33–25.12}	0.33 {0.30–0.35}	100.88 ^{ab} {93.20–112.70}	5.26 ^{ab} {4.09–9.78}

Nota: Teste de Kruskal Wallis. Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Letras diferentes $p \leq 0,05$.

Tabela 5. Valores correspondentes à avaliação de microtomografia óssea computadorizada do osso cortical de animais controles e diabéticos suplementados e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.

GRUPOS		BV (mm ³)	BV/TV (%)	Ct.Th (mm)	Ct.Po (%)
CA (n=5)	Mediana	1.03 ^a {1.02–1.06}	40,63 ^a {38.18–43.47}	1.96 {1.50–2.20}	51.41 ^a {42.02–55.86}
CB (n=5)	Mediana	9.02 ^b {9.31–9.64}	48.59 ^b {44.09–57.98}	1.53 {1.40–1.90}	59.36 ^b {56.53–61.11}
DA (n=5)	Mediana	1.04 ^a {1.03–1.10}	37.36 ^a {35.91–43.07}	1.74 {1.60–1.90}	62.64 ^b {56.92–64.08}
DB (n=5)	Mediana	9.61 ^b {9.23–9.99}	42.49 ^{ab} {40.58–44.37}	1,59 {1.60–1.70}	57,50 ^{ab} {55.62–59.41}

Nota: Teste de Kruskal Wallis. Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Letras diferentes $p \leq 0,05$. BV= volume ósseo; BV/TV= fração do volume ósseo; Ct.Th= espessura do osso cortical; Ct.Po.= porosidade cortical.

Tabela 6. Valores correspondentes à avaliação de microtomografia óssea computadorizada do osso trabecular de animais controles e diabéticos suplementados e não suplementados, após o período experimental de 30 dias.

GRUPOS		BV (mm ³)	BV/TV(%)	BS/BV (1/mm)	SMI	Tb.Th (mm)	Tb.N (1/mm)	Tb.Sp (mm)	Conn. D. (1/mm ³)
CA (n=5)	Mediana	0.03 {0.02–0.06}	2.13 ^a {1.93–2.28}	84.58 ^a {62.64–92.97}	2.70 ^a {2.60–2.80}	0.04 ^a {0.04–0.05}	0.49 {0.37–0.68}	0.43 {0.40–0.52}	43.22 {31.38–59.71}
CB (n=5)	Mediana	0.05 {0.03–0.10}	4.58 ^b {3.20–6.74}	86.69 ^{ab} {80.18–93.19}	2.52 ^{ab} {2.40–2.80}	0.05 ^a {0.04–0.06}	0.59 {0.43–0.99}	0.41 {0.37–0.46}	46.19 {34.40–64.60}
DA (n=5)	Mediana	0.03 {0.01–0.05}	1.91 ^a {0.98–2.69}	94.68 ^{ab} {77.64–99.33}	2.34 ^b {2.10–2.50}	0.03 ^b {0.03–0.04}	0.51 {0.21–0.70}	0.46 {0.38–0.66}	30.37 {19.16–67.46}
DB (n=5)	Mediana	0.04 {0.03–0.06}	2.35 ^b {2.32–2.70}	95.77 ^b {89.43–111.65}	2.54 ^{ab} {2.10–2.80}	0.04 ^{ab} {0.03–0.05}	0.54 {0.35–0.70}	0.54 {0.46–0.58}	46.67 {30.89–93.09}

Nota: Teste de Kruskal Wallis. Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo. Letras diferentes $p \leq 0,05$. BV= volume ósseo; BV/TV= fração do volume ósseo; BS/BV= superfície óssea específica; SMI= índice de estrutura; Tb.Th= espessura trabecular; Tb.N= número de trabéculas; Tb.Sp= separação trabecular; Conn.D.= conectividade trabecular.

ANEXO A: APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP DE RIBEIRÃO PRETO (FMRP-USP).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº **074/2013**, sobre o projeto intitulado “*Efeito da suplementação com boro no metabolismo ósseo de camundongos diabéticos.*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Anderson Marliere Navarro** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de outubro de 2013.

We certify that the protocol nº **074/2013**, entitled “*Effect of supplementation with boron in bone metabolism of diabetic mice*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in **10/29/2013**.

Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2013.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP