

---

## Morphometric analysis of rat femurs submitted to the use of dexamethasone and the consumption of curcumin and symbiotics

### Análise morfométrica de fêmures de ratos submetidos ao uso de dexametasona e ao consumo de curcumina e simbiótico

Received: 18-05-2024 | Accepted: 21-06-2024 | Published: 24-06-2024

---

#### **Leonardo Augusto Felipe**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-5360-0500>  
Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Brasil  
E-mail: [le\\_a\\_felipe@hotmail.com](mailto:le_a_felipe@hotmail.com)

#### **Lais Pissinin Estácio**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2032-1368>  
Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Brasil  
E-mail: [laispissinin@outlook.com](mailto:laispissinin@outlook.com)

#### **Ana Clara Campagnolo Gonçalves Toledo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7660-0449>  
Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Brasil  
E-mail: [anaclara@unoeste.br](mailto:anaclara@unoeste.br)

#### **Wilson Romero Nakagaki**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8696-3067>  
Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Brasil  
E-mail: [wilromero@unoeste.br](mailto:wilromero@unoeste.br)

---

### ABSTRACT

The aim was to analyze whether the deleterious effects of dexamethasone on bone can be prevented or mitigated by using curcumin and the symbiotic concomitantly. The rats were divided into control (CT), dexamethasone (D), dexamethasone curcumin (DC), dexamethasone symbiotic (DS) and dexamethasone symbiotic/curcumin (DCS) groups. The thickness, area, and area fraction of the bone trabeculae of the femoral head were measured. The CT group showed greater trabecular thickness when compared to the D and DS groups. The thicknesses of the DC and DCS groups were greater than those of the DS group. The area and area fraction were smaller in groups D, DC and DS compared to CT. It can be concluded that curcumin, when consumed in isolation, had a slight effect on maintaining the thickness of trabecular bone. Considering its action on the structuring of the trabecular area, it is not possible to establish a clear relationship between its benefit for bone preservation and its interference with bone cell activity.

**Keywords:** Spongy Bone; Symbiotic; Femoral Head; Curcumin; Glucocorticoid.

---

### RESUMO

O objetivo foi analisar se os efeitos deletérios de dexametasona sobre ossos podem ser prevenidos ou mitigados ao se usar concomitantemente a curcumina e o simbiótico. Os ratos foram distribuídos em grupos controle (CT), dexametasona (D), dexametasona curcumina (DC), dexametasona simbiótico (DS) e dexametasona simbiótico/curcumina (DCS). Foram medidas as espessuras, área e fração área das trabéculas ósseas da cabeça do fêmur. O grupo CT demonstrou maior espessura trabecular quando comparado aos grupos D e DS. As espessuras dos grupos DC e DCS foram maiores em relação ao grupo DS. A área e a fração área foi menor nos grupos D, DC e DS em relação ao CT. Conclui-se que a curcumina quando consumida isoladamente demonstrou um efeito discreto na manutenção da espessura do osso trabecular. Considerando sua ação com a estruturação da área trabecular, não é possível estabelecer uma relação clara do seu benefício com a preservação do osso e da sua interferência com as atividades das células ósseas.

**Palavras-chave:** Osso Esponjoso; Simbiótico; Cabeça do Fêmur; Curcumina; Glicocorticoide.

---

## INTRODUÇÃO

Muitos fatores interferem no metabolismo dos ossos e, dentre eles, pode-se citar o uso a longo prazo de glicocorticoides. O uso de glicocorticoides sintéticos, como a dexametasona, são realizadas em tratamentos anti-inflamatórios e imunomoduladores. Além disso, as utilizações dos glicocorticoides em longo prazo apresentam efeitos colaterais e estão fortemente associados com perda de massa óssea e que eventualmente poderá evoluir para um quadro de osteoporose (CHEN *et al.*, 2018).

Os glicocorticoides influenciam a função das células ósseas promovendo alteração na remodelação do tecido. Estes medicamentos provocam efeitos diretos e indiretos sobre estas células podendo causar rápida perda óssea, por exemplo. Por inibir a ação de osteoblastos, os glicocorticoides diminuem a formação óssea, diminuindo a replicação celular em 48 horas de exposição, ao eliminar as células capazes de sintetizar o colágeno ósseo. Além disso, os glicocorticoides aumentam o número de osteoclastos e, conseqüentemente, aumentando a reabsorção óssea e a perda de massa óssea desde que os osteoblastos tiveram ação suprimida (BÖCKER *et al.*, 2014). Adicionado aos efeitos nocivos sobre as células ósseas, os glicocorticoides possuem também efeitos no intestino, rins, gônadas e provavelmente nas glândulas paratireoides (WEINSTEIN, 2012).

Os ossos, além de medicamentos, também podem sofrer a influência de fatores nutricionais, como por exemplo o uso de curcumina e de simbióticos. A curcumina é uma molécula altamente pleiotrópica que tem se demonstrado eficaz no tratamento de algumas doenças crônicas, como doença inflamatória intestinal, pancreatite, artrite e certos tipos de câncer (CHEN *et al.*, 2015). Estudos prévios demonstraram que a curcumina também pode proteger contra a perda de massa óssea, como aquelas provocadas por ovariectomia pelo fato de diminuir a osteoclastogênese em modelos de roedores (CHEN *et al.*, 2015). Outro estudo observou que a curcumina melhorou a microarquitetura óssea e promoveu um aumento da densidade mineral em camundongos transgênicos (YANG *et al.*, 2011). A partir da análise e comparação dos parâmetros estruturais apresentados pelos camundongos submetidos ao estudo, na qual um dos grupos foi tratado com a curcumina o qual apresentou aumento significativo na resistência óssea sem deterioração adicional da estrutura. Ao longo de um período longo, o tratamento com curcumina levou a um aumento na fração do volume ósseo, acompanhado por aumento no número trabecular e de espessura óssea (YANG *et al.*, 2011).

Os simbióticos são utilizados não apenas para a sobrevivência de microrganismos benéficos adicionados aos alimentos ou rações, mas também para a estimulação da

proliferação de bactérias nativas específicas presentes no trato gastrointestinal. Eles se caracterizam por combinar probiótico com prebióticos e os efeito dos simbióticos (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2017).

Os simbióticos são conhecidos também por estimular e aumentar a área de absorção através da proliferação de enterócitos mediada pela fermentação bacteriana. Parte das atividades desses micróbios inclui a absorção e a liberação de nutrientes essenciais da dieta, principalmente cálcio e fosfato, regulação do sistema imunológico, suporte da integridade e função intestinal, bem como a capacidade de reprimir a invasão patogênica de bactérias ou colônias prejudiciais (ILESANMI-OYELERE; KRUGER, 2020). Também são responsáveis por promover a expressão de proteínas de ligação ao cálcio e a degradação de moléculas complexantes de minerais, como oxalatos e ácido fítico. Recentemente, foi sugerido que bactérias comensais afetam a fisiologia óssea por meio da produção de pequenas moléculas, como a serotonina ou moléculas semelhantes ao estrogênio, benéficas para a osteogênese (ILESANMI-OYELERE; KRUGER, 2020).

Considerando os dados apresentados, este trabalho analisou os possíveis efeitos do consumo de curcumina e de simbiótico na arquitetura do osso trabecular de ossos de ratas submetidas concomitantemente ao uso de dexametasona para indução química de osteoporose para verificar se os dois suplementos serão capazes de mitigar a perda de massa óssea provocada pelo corticoide em questão.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Neste estudo foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar* (n = 50), com 50 dias de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Utilização Animal (CEUA) da referida universidade e seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Em cada gaiola foram mantidos dois animais com livre acesso à água e à alimentação (ração comercial), onde permaneceram em ambiente com temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controlada, em ciclo claro/escuro de 12 horas, durante todo o experimento. Este estudo utilizou material biológico de estudo prévio protocolado na CPDI sob numero 5893.

## **Divisão dos grupos**

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em cinco grupos experimentais (10 por grupo) do seguinte modo:

- Grupo controle (CT): os animais receberam somente água e ração comercial e submetidas à gavagem com solução salina;
- Grupo dexametasona (D): os animais receberam água, ração comercial e foram submetidos ao uso de dexametasona durante 5 semanas (3 vezes por semana);
- Grupo dexametasona e curcumina (DC): os animais receberam água e ração comercial e foram submetidos ao uso de dexametasona durante 5 semanas (3 vezes por semana) e ao consumo concomitante de curcumina durante 5 semanas (diariamente);
- Grupo dexametasona e simbiótico (DS): os animais receberam água e ração comercial e foram submetidos ao uso de dexametasona durante 5 semanas (3 vezes por semana) e ao consumo concomitante de simbiótico durante 5 semanas (diariamente);
- Grupo dexametasona e simbiótico/cúrcuma (DCS): os animais receberam água e ração comercial e foram submetidos ao uso de dexametasona durante 5 semanas (3 vezes por semana) e ao consumo concomitante de simbiótico e curcumina durante 5 semanas (diariamente).

## **Protocolo de administração de dexametasona**

A administração de dexametasona foi utilizada como protocolo de indução de perda de massa óssea e foi realizada conforme o estudo de Lucinda *et al.* (2013). A dexametasona (fosfato dissódico de dexametasona – 4mg/ml, ampola 2,5 ml) foi administrada via intramuscular na dose de 7mg/Kg de peso corporal, uma vez por semana, durante cinco semanas.

## **Suplementação com curcumina**

A administração da Curcumina foi realizada por via oral, através de goma, diariamente, durante 5 semanas. A cada três dias foram produzidas gomas de gelatina com curcumina (concomitante ao uso de dexametasona), na dose de 100 mg/kg, segundo (CIRANO *et al.*, 2018).

## **Suplementação com simbiótico**

O simbiótico que foi utilizado era composto por *Lactobacillus acidophilus* SD 5221 NCFM, *Lactobacillus rhamnosus* SD 5675 HN001, *Lactobacillus para casei* SD

5275 LPC-37, *Bifidobacterium lactis* SD5674 HN0019 e fruto-oligossacarídeo (5,5g). Para tanto, foi utilizado o protocolo descrito por (TAGLIARI *et al.*, 2017). O simbiótico foi administrado por via oral (concomitante ao uso de dexametasona) na dose diária de 200 mg/kg/dia/animal todos os dias do experimento. Segundo os autores, esta corresponde à “dose aproximada de 200.000 a 206.109 UFC (unidades formadoras de colônias)” e é uma estimativa da dose diária necessária para o ser humano.

### **Sacrifício dos animais e coleta do material biológico**

Ao fim do período experimental (5 semanas) e após um jejum de 4 horas, os animais foram anestesiados através da administração, por via intraperitoneal, de tiopental na dose de 100 mg/kg na concentração de 25 mg/mL. Foram verificados os indicativos de morte, tais como ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos. Posteriormente os ossos foram coletados. O material biológico está armazenado em biofreezer no Biotério Experimental.

### **Morfometria do osso trabecular do fêmur**

Para esta análise foram utilizados 6 fêmures (membros posteriores esquerdos) de cada grupo. Para cada fêmur foi utilizado cortes histológicos da epífise proximal (cabeça do fêmur). As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 72 horas à 4°C e foram descalcificadas em solução de ETDA (EDTA, tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio, HCl e água) (CASTANIA *et al.*, 2015). Em seguida, as amostras foram processadas através de técnicas histológicas de rotina e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais com 5µm de espessura que foram corados com Hematoxilina-Eosina. Após montagem de lâminas, foram realizadas medidas da espessura, da área e da fração área (área das trabéculas dividida pela área total do campo analisado) das trabéculas ósseas com auxílio do software Leica LAS acoplado a um fotomicroscópio da marca Leica. Para cada fêmur foram utilizados 4 cortes histológicos das epífises proximais e de cada corte foi capturado 1 campo em objetiva de 4X para medidas da espessura das trabéculas e foram capturados 2 campos em objetiva de 10X para medidas da área e fração área das trabéculas.

### **Análise estatística**

Os dados apresentaram distribuição normal e homocedasticidade da amostra e foi utilizado teste paramétrico para analisar os quatro grupos independentes por meio da

Análise de Variância de 1 via (ANOVA One Way), seguido de teste a posteriori de Tukey. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância.

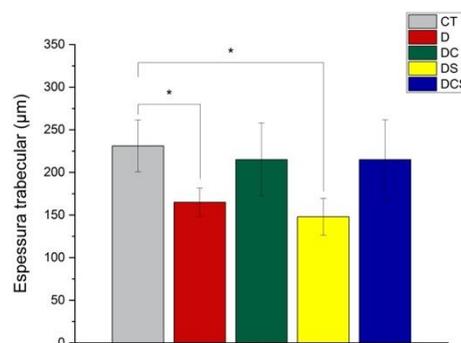
## RESULTADOS

O grupo CT demonstrou maior espessura trabecular quando comparado aos grupos D ( $p = 0,0441$ ) e DS ( $p = 0,0077$ ), mas foi semelhante estatisticamente em relação aos grupos DC ( $p = 0,9421$ ) e DCS ( $p = 0,9487$ ). As espessuras dos grupos DC ( $p = 0,0280$ ) e DCS ( $p = 0,0381$ ) foram maiores estatisticamente em relação ao grupo DS (Figura 1).

A análise estatística tanto para a área quanto para a fração área apresentaram similaridades. Em ambas o grupo CT foi maior quando comparado aos grupos D ( $p_{\text{área}} = 0,0020$ ;  $p_{\text{fração}} = 0,0020$ ), DC ( $p_{\text{área}} = 0,0019$ ;  $p_{\text{fração}} = 0,0019$ ) e DS ( $p_{\text{área}} < 0,0001$ ;  $p_{\text{fração}} < 0,0001$ ). Estes três grupos foram iguais estatisticamente, mas o grupo DS diferiu do grupo DCS ( $p_{\text{área}} = 0,0032$ ;  $p_{\text{fração}} = 0,0032$ ).

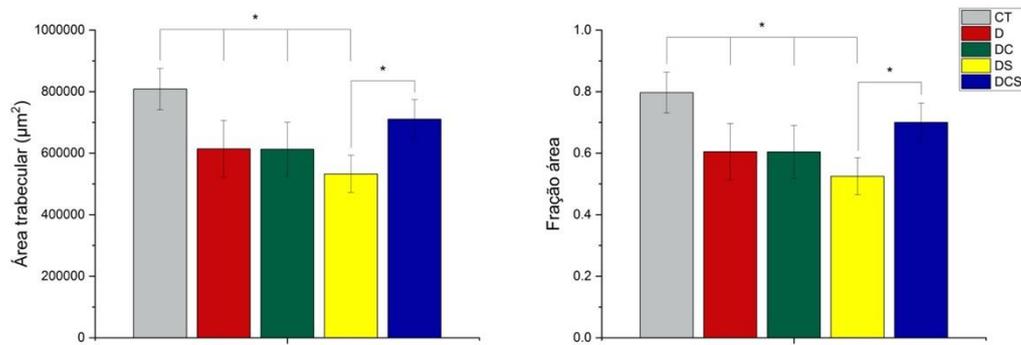
A observação das lâminas coradas com hematoxilina-eosina demonstrou que a área trabecular é claramente maior no grupo CT (Figura 3A) quando comparado com os demais grupos (Figuras 3B-D), mas com área semelhante ao grupo DCS.

**Figura 1** - Morfometria da espessura das trabéculas do osso esponjoso da cabeça do fêmur dos animais dos grupos controle, Dexametasona (D), Dexametasona e Curcumina (DC), Dexametasona e Simbiótico (DS) e Dexametasona e Curcumina/Simbiótico (DCS). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* do colchete indica diferença estatisticamente significativa entre dois grupos após o teste de Tukey.



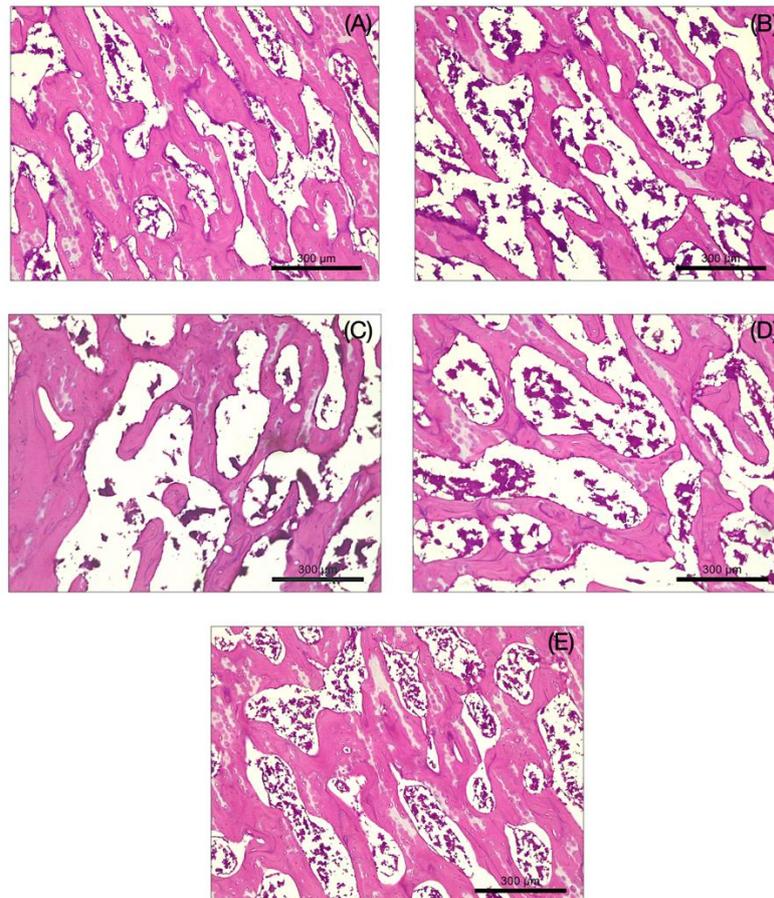
Fonte: autoria própria.

**Figura 2** - Morfometria da área e da fração área das trabéculas do osso esponjoso da cabeça do fêmur dos animais dos grupos controle, Dexametasona (D), Dexametasona e Curcumina (DC), Dexametasona e Simbiótico (DS) e Dexametasona e Curcumina/Simbiótico (DCS). Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* do colchete indica diferença estatisticamente significativa entre dois grupos após o teste de Tukey.



Fonte: autoria própria.

**Figura 3** - Microscopia de luz do osso trabecular da epífise proximal de fêmures dos grupos Controle (A), Dexametasona (B), Dexametasona e Curcumina (C), Dexametasona e Simbiótico (D) e Dexametasona e Curcumina/Simbiótico. Lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Barra de escala com 300 μm de imagens capturadas com objetiva de 10X. Os grupos Controle e Dexametasona e Curcumina/Simbiótico demonstraram maior área trabecular.



Fonte: autoria própria.

## DISCUSSÃO

O presente trabalho analisou se o consumo de curcumina e de simbiótico seria capaz de prevenir ou atenuar a perda de massa óssea, decorrente do uso de dexametasona, quando utilizados concomitantemente com a administração do glicocorticoide. Assim, foi proposto verificar como estes suplementos poderiam influenciar a arquitetura trabecular das cabeças dos fêmures de ratas *Wistar* submetidas ao efeito deletério do glicocorticoide.

Quando utilizada em tempo prolongado de tratamento, a dexametasona tem demonstrado estar associada com altas ocorrências de fraturas, desde que favorece perda de massa óssea e, conseqüentemente, uma redução na capacidade do osso em resistir a cargas mecânicas (CHEN *et al.*, 2016b). Seu uso prolongado é responsável pela diminuição da absorção intestinal e da reabsorção tubular renal de cálcio, além de interferir na atividade das células ósseas como os osteoblastos e os osteoclastos (ADAMI; SAAG, 2019). Há uma diminuição da densidade mineral óssea em decorrência de uma reabsorção óssea excessiva em da osteoclastogênese estar estimulada e uma supressão da formação de osso desde que a dexametasona prejudica a diferenciação e a maturação dos osteoblastos (ADAMI; SAAG, 2019; ZHOU *et al.*, 2023).

Considerando a administração da dexametasona, foi verificado que o protocolo utilizado no presente estudo provocou comprometimento na arquitetura do osso trabecular da cabeça do fêmur. A trabéculas ósseas se apresentaram mais delgadas nos grupos D e DS, mas a área ocupada por elas foi reduzida no grupo D, DC e DS quando comparada aos animais saudáveis (grupo controle). Pode-se verificar que a curcumina auxiliou na preservação da espessura, mas não da área trabecular quando utilizada isoladamente. Além disso, ela somente mitigou o efeito deletério da dexametasona na área trabecular quando seu uso foi associado ao do simbiótico. O estudo de Chen *et al.* (2016a) analisou a ação da curcumina na osteoporose induzida por dexametasona *in vivo* e na apoptose de osteoblastos *in vivo* e *in vitro* e constataram que esse suplemento restaurou os níveis séricos de fosfatase alcalina óssea e da densidade mineral óssea, demonstrando efeito protetor do tecido ósseo.

Como previamente mencionado, o uso de glicocorticoides diminuem a absorção intestinal de cálcio (ADAMI; SAAG, 2019; ZHOU *et al.*, 2023). Como a microbiota intestinal exerce papel importante sobre a saúde óssea, Scholz-Ahrens *et al.* (2016) estudaram o metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas, para indução de osteoporose, submetidas ao uso de simbiótico (*Lactobacillus*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*) e constataram que ocorreu proteção contra a perda do conteúdo mineral dos ossos

analisados. Entretanto, no estudo citado não houve prejuízo da microbiota intestinal como acontece quando se faz uso de dexametasona (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). Isso poderia explicar o efeito negativo do simbiótico quando utilizado isoladamente.

Considerando os dados apresentados, foi possível verificar que a curcumina quando consumida isoladamente apresentou um efeito discreto na manutenção da espessura do osso trabecular quando consumida simultaneamente à administração de dexametasona.

## CONCLUSÃO

Ao relacionar a ação da curcumina com a estruturação da área ocupada pelas trabéculas ósseas da cabeça do fêmur, não é possível estabelecer uma relação clara do seu benefício com a preservação do osso e da sua interferência com as atividades osteoblástica e osteoclástica.

## REFERÊNCIAS

ADAMI, G.; SAAG, K. G. Glucocorticoid-induced osteoporosis: 2019 concise clinical review. **Osteoporosis International**, v. 30, n. 6, p. 1145–1156, 1 jun. 2019.

BÖCKER, W. *et al.* Short-term glucocorticoid treatment causes spinal osteoporosis in ovariectomized rats. **European Spine Journal**, v. 23, n. 11, p. 2437–2448, nov. 2014.

CASTANIA, V. A. *et al.* Advantages of a combined method of decalcification compared to EDTA. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, n. 2, p. 111–118, fev. 2015.

CHEN, S. M. *et al.* Dexamethasone Down-regulates Osteocalcin in Bone Cells through Leptin Pathway. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 5, p. 507–516, 2018.

CHEN, W. *et al.* Dexamethasone inhibits the differentiation of rat tendon stem cells into tenocytes by targeting the scleraxis gene. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 152, p. 16–24, ago. 2015.

CHEN, Z. *et al.* Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis by protecting osteoblasts from apoptosis in vivo and in vitro. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 43, n. 2, p. 268–276, 2016a.

CHEN, Z. *et al.* Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, n. 2, p. 329–338, 1 fev. 2016b.

CIRANO, F. R. *et al.* Effect of curcumin on bone tissue in the diabetic rat: repair of peri-implant and critical-sized defects. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 11, p. 1495–1503, nov. 2018.

DE OLIVEIRA, J. A. G. T. *et al.* Analysis of the effects of curcumin and symbiotic consumption on bones of rats submitted to the use of dexamethasone. **Life Sciences**, v. 304, p. 120690, 1 set. 2022.

ILESANMI-OYELERE, B. L.; KRUGER, M. C. The Role of Milk Components, Pro-, Pre-, and Synbiotic Foods in Calcium Absorption and Bone Health Maintenance. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, p. 578702, 2020.

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. E1021, 15 set. 2017.

SCHOLZ-AHRENS, K. E. *et al.* Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats — impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. **NFS Journal**, v. 3, p. 41–50, 1 ago. 2016.

TAGLIARI, E. *et al.* The impact of the use of symbiotics in the progression of nonalcoholic fatty liver disease in a rat model. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 30, n. 3, p. 211–215, set. 2017.

WEINSTEIN, R. S. Glucocorticoid-induced osteonecrosis. **Endocrine**, v. 41, n. 2, p. 183–190, abr. 2012.

YANG, M.-W. *et al.* Curcumin improves bone microarchitecture and enhances mineral density in APP/PS1 transgenic mice. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 18, n. 2–3, p. 205–213, 15 jan. 2011.

ZHOU, R.-X. *et al.* Linking the relation between gut microbiota and glucocorticoid-induced osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 41, n. 2, p. 145–162, mar. 2023.