FERNANDA LOPES DE FREITAS CONDI

Efeitos do estrogênio, raloxifeno e extrato de soja rico em genisteína sobre o osso de ratas adultas ovariectomizadas previamente androgenizadas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de :
Obstetrícia e Ginecologia

Orientador:
Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Co-orientador:
Prof. Dr. José Maria Soares Júnior

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de dezembro de 2010. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Condi, Fernanda Lopes de Freitas

Efeitos do estrogênio, raloxifeno e extrato de soja rico em genisteína sobre o osso de ratas adultas ovariectomizadas previamente androgenizadas / Fernanda Lopes de Freitas Condi. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Co-orientador: José Maria Soares Júnior.

Descritores: 1.Estrogênios 2.Raloxifeno 3.Genisteína 4.Osso e ossos 5.Ratos Wistar 6.Ovariectomia 7.Colágeno tipo I 8.Colágeno tipo III 9.Osteoprotegerina 10.Osteocalcina 11.Osteopontina

USP/FM/DBD-315/11

Não seja escravo do seu passado. Mergulhe em mares grandiosos, vá bem fundo, nade longe, e voltarás com respeito por si mesmo, com um novo vigor, com uma experiência a mais que explicará e superará a anterior.

Ralph Waldo Emerson

*Dedico este trabalho aos meus amores,
Maria José e Gustavo Alex, por
sustentarem a idéia de que nada é
impossível quando ainda há vida...*

Agradecimentos

À FAPESP

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(Processo número 2007/57049-0)

À CAPES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Agradecimentos

A **Deus**, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

Ao meu marido, **Gustavo Alex Condi** pelo amor, carinho, dedicação, força e palavras de luz, nos momentos em que mais precisei.

Aos meus pais e avós **Maria José, José Antônio, Tereza e José**, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho, possibilitaram o surgimento das oportunidades para a realização de sonhos e conquistas.

À minha irmã **Flavia**, pela sua alegria e vontade de viver, que me inspira.

Ao Professor **Nelson Villa**, pelos ensinamentos de sabedoria.

Aos Professores Dr. **Edmund Chada Baracat** e **José Maria Soares Jr.**, meu muito obrigado pelo carinho, paciência e orientação ao longo de todos estes anos.

À Professora **Walcy Rosolia Teodoro** (LIM 17), não só pela amizade, carinho e auxílio técnico, mas, principalmente, pelo sorriso e bom humor constantes.

Às Professoras Dra. **Vanda Jorgetti** (LIM 16), Dra. **Cecília H.A.Gouvea Ferreira** e à amiga **Cristiane C. Costa** (Anatomia, ICB, USP) pelo auxílio técnico e científico.

Às minhas colegas do LIM 17, **Natália Borsonello, Jymenez de Moraes, Priscila Andrade** pelo companheirismo e agradáveis momentos de convivência.

A todos do LIM 58, **Katia Carvalho, Gustavo Maciel, Rodrigo Marcondes, Vinicius Cestari, Natalia Garcia, Cecília Ferreira, Thiago Gonçalves** e **Marinalva Almeida** por todo auxílio e por fazerem parte dos melhores momentos desta jornada.

Ao Professor **Manuel de Jesus Simões** (UNIFESP), como membro da banca de qualificação, contribuiu com importantes e enriquecedoras sugestões.

À Professora **Vera Capellozi** e ao Dr. **Edwin Parra**, pelo carinho e prontidão com que sempre me auxiliaram nas análises histológicas.

Ao Professor **Chamas**, pelo auxílio em relação ao biotério.

Aos **animais** que contribuíram com a vida para a realização desta tese.

Esta tese está de acordo com:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Frazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª edição. São Paulo. Serviço de Biblioteca e documentação, 2008.

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals*. Editors (Vancouver)

Os dados desta tese foram utilizados na produção dos artigos científicos:

“Conjugated estrogen-raloxifene association or soy extract effects on collagen in bone rats”

“Conjugated estrogen-raloxifene association or soy extract effects on bone in rats ovariectomizeds”

Dados apresentados parcialmente:

“2009 Annual Meeting of the North American Menopause Society”. San Diego, Califórnia, Sept 30-Oct 3.

“Federação de Sociedades de Biologia Experimental” (FESBE), realizado em 19 a 22 de agosto de 2009, em Águas de Lindóia, São Paulo, SP, Brasil.

4º Simpósio “Avanços em Pesquisas Médicas dos Laboratórios de Investigação Médica do Hospital das Clínicas da FMUSP”, realizado em 30 de setembro e 01 de outubro de 2010.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Gráficos, Quadros e Tabelas

Lista de Figuras

1 INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Tecido ósseo.....	4
2.1.1 Fisiologia óssea.....	4
2.1.2 Proteínas da matriz óssea.....	9
2.2 Modelo experimental.....	10
2.3 Falência ovariana e intervenções medicamentosas.....	13
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral... ..	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Materiais.....	26
4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Análise histológica.....	28
4.2.1.1 Análise histomorfométrica e histoarquitetura do colágeno.....	28
4.2.2 Técnica de imunoistoquímica e imunofluorescência.....	30
4.2.2.1 Descalcificação do tecido ósseo com EDTA tamponado.....	30
4.2.2.2 Imunofluorescência para colágeno tipo I e III.....	31
4.2.2.3 Imunomarcção para osteoprotegerina (OPG), osteocalcina (OCN) e osteopontina (OPN) no tecido ósseo.....	32
4.2.3 Expressão gênica por PCR em tempo real (Real-Time PCR).....	33
4.3 Análise Estatística	36
4.3.1 Análise Descritiva.....	36
4.3.2 Análise inferencial.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Peso durante o estudo.....	37
5.2 Análise histomorfológica do tecido ósseo não-mineralizado.....	38
5.3 Quantificação do colágeno das tíbias por análise de imagem picrosirius	40
5.4 Quantificação do colágeno tipo I e tipo III.....	44
5.5 Quantificação da osteocalcina por imunoistoquímica.....	49
5.6 Quantificação da osteopontina por imunoistoquímica.....	51
5.7 Quantificação da osteoprotegerina por imunoistoquímica.....	53
5.8 Quantificação do colágeno da OPN, OCN e OPG por PCR em tempo real.....	55

6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO.....	69
8. ANEXO.....	70
9. REFERÊNCIAS.....	71

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>et al.</i>	e outros (autores)
MEC	Matriz extracelular
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-kb</i>
RANK-L	<i>Ligand receptor activator of nuclear factor-kb</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
OPG	Osteoprotegerina
OCN	Osteocalcina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
Gla	Ácido Gama Carboxiglutâmico
OPN	Osteopontina
ER- α	Receptor de Estrogênio α
ER- β	Receptor de Estrogênio β
RE	Receptor de Estrogênio
TGF- α	Fator de necrose tumoral - α
TGF- β	Fator de necrose tumoral - β
IL-1	Interleucina 1 - <i>insulin-like growth factor</i> - 1
IL-6	Interleucina 6 - <i>insulin-like growth factor</i> – 6
IL-7	Interleucina 7 - <i>insulin-like growth factor</i> - 7
mm	Milímetros
GM-CSF	Fator estimulador da colônia de granulócitos e macrófagos
M-CSF	Fator estimulador da colônia de macrófagos
SERMs	Modulador seletivo dos receptores de estrogênio
PLG	Propilenoglicol
ECE	Estrogênio
ESG	Extrato de soja rico em genisteína
AF-1	Fatores de ativação de áreas específicas dos receptores de estrogênio 1
AF-2	Fatores de ativação de áreas específicas dos receptores de estrogênio 2
IAF	Elemento de resposta ao estrogênio
TGF- β 3	Fator de crescimento transformante β 3
MC3T3-E1	Tipo celular osteoblástico de camundongos
MC3T2-E1	Tipo celular osteoblástico de camundongos
mg	Miligramas
Kg	Quilogramas
ml	Mililitros
Cm	Centímetros
μm^2	Micrômetro
L	Litros
%	Porcentagem
mmHg	Milímetros de mercúrio
°C	Grau Celsius
MHz	Megahertz

Mm ²	Milímetro quadrado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
PBS	Tampão fosfato salino
BSA	Albumina Sérica Bovina
DAB	Diaminobenzidina
ANOVA	Análise de variância
RLX	Raloxifeno
ERE	Elemento de resposta ao estrogênio
W	Watts
N	Número de animais
LIM	Laboratório de Investigação Médica
COL tipo I	Colágeno tipo 1
RNA	Acido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
X	Veze
TRAP+	Tipo celular precursor de oscteoclastos
pH	Potencial Hidrogeniônico
EUA	Estados Unidos da América
IgG	Imunoglobulina
DNAse	Enzima que degrada DNA em nucleotídeos
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DDCt	Método Delta Delta ciclo <i>treshould</i>

Lista de Gráficos, Quadros e Tabelas

Tabela 1: Sequência dos primers para PCR em tempo real.....	35
Tabela 2: Peso dos animais (média e desvio-padrão) durante o tratamento farmacológico após a ovariectomia.....	37
Gráfico 1: Fibras finas de colágeno na tíbia de ratas ovariectomizadas, após tratamento farmacológico.....	43
Gráfico 2: Porcentagem de fibras grossas de colágeno na tíbia de ratas ovariectomizadas, previamente androgenizadas, após tratamento farmacológico.....	44

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema ilustrativo do processo de remodelação do osso trabecular.....	08
Figura 2: Procedimento de ovariectomia.....	12
Figura 3: Esquema ilustrativo do osso sadio (A) e osteoporótico (B)	13
Figura 4: Mecanismo de ação do raloxifeno.....	18
Figura 5: Fotomicrografias da diáfise de ratas coradas pela hematoxilina-eosina e morfometria dos grupos de estudo.....	39
Figura 6: Fotomicrografias da diáfise de ratas coradas com picosirius e quantificação das fibras grossas e finas de colágeno, bem como de colágeno total dos grupos de estudo.....	42
Figura 7: Fotomicrografias de imunofluorescência de colágeno tipo I, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo.....	47
Figura 8: Fotomicrografias de imunofluorescência de colágeno tipo III, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo.....	48
Figura 9 :Fotomicrografias de imunoistoquímica da osteocalcina, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo.....	50
Figura 10 :Fotomicrografias de imunoistoquímica da osteopontina, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo.....	52
Figura 11 :Fotomicrografias de imunoistoquímica da osteoprotegerina, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo.....	54
Figura 12:PCR em tempo real do colágeno tipo I, osteocalcina e osteopontina osteoprotegerina.....	55

Resumo

Condi, FLF. Efeitos do estrogênio, raloxifeno e extrato de soja rico em genisteína sobre o osso de ratas adultas ovariectomizadas previamente androgenizadas [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUÇÃO: O hipoestrogenismo pode determinar perda da massa mineral óssea, diminuindo a qualidade do osso. Assim, vários fármacos são ministrados para evitar esta perda, porém, podem determinar efeitos colaterais importantes. Portanto, questiona-se se o emprego do estrogênio associado a estas substâncias poderia minimizar os efeitos adversos e manter a massa mineral óssea. Contudo, há poucas informações sobre os efeitos destas combinações. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a ação do estrogênio, raloxifeno e do extrato de soja rico em genisteína, isolado ou combinado no osso de ratas ovariectomizadas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** No nono dia de nascimento, todas as ratas receberam propionato de testosterona (0,1 µg/g). No sexto mês de idade, os animais do controle fisiológico foram identificados como GI e receberam apenas o veículo (propilenoglicol em 0,5 ml/dia) durante o experimento e os outros que receberam testosterona foram ovariectomizados e divididos aleatoriamente em seis grupos: GII – veículo (controle castrado, n=6); GIII - estrogênio conjugados eqüinos (ECE, (50 µg/Kg/dia, n=8); GIV – raloxifeno (RAL, 0,75 mg/kg/dia, n=8); GV – extrato de soja enriquecido com genisteína (ESG, 300 mg/kg/dia, n=7); GVI – ECE + ESG (50 µg/Kg/dia + 300 mg/kg/dia, n=7); GVII - ECE+RAL (50 µg/Kg/dia + 0,75mg/kg/dia, n=6). Após três meses da cirurgia, os fármacos foram ministrados por 120 dias consecutivos. Posteriormente, os animais foram sacrificados sob anestesia, sendo retirada a tíbia esquerda para rotina histológica. Os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina-eosina para avaliar a microarquitetura óssea. Foram feitos procedimentos imunoistoquímicos, de imunofluorescência e PCR para quantificar as principais proteínas ósseas estruturais (colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e osteoprotegerina), bem como de seus respectivos RNA mensageiros. Os dados foram analisados pelos testes de ANOVA e Tukey. **RESULTADOS:** Todos os tratamentos determinaram aumento da quantidade de osso trabecular ($p<0,05$). As fibras totais de colágeno apresentaram-se aumentadas em todos os grupos tratados, exceto com o raloxifeno. Já as fibras finas de colágeno diminuíram apenas no grupo tratado com estrogênio. As frações de colágeno tipo I, mostraram-se aumentadas nos grupos tratados com estrogênio e sua associação com o raloxifeno. O colágeno tipo III esteve aumentado no grupo tratado com estrogênio em associação com extrato de soja rico em genisteína. Em relação às proteínas não colagenosas, a osteoprotegerina apresentou-se aumentada nos grupos tratados com estrogênio, suas associações e com o extrato de soja rico em genisteína. A osteopontina esteve diminuída em todos os grupos tratados e a osteocalcina mostrou-se aumentada apenas no grupo tratado com raloxifeno, em comparação ao grupo castrado ($p<0,05$).

Não houve diferença estatística significativa do PCR em tempo real na análise dos transcritos entre os grupos estudados. **CONCLUSÃO:** A combinação de estrogênio com raloxifeno ou extrato de soja rico em genisteína não trouxe benefícios adicionais na qualidade do tecido ósseo, como ocorreu com esses fármacos isoladamente.

Descritores: Estrogênios, raloxifeno, genisteína, osso e ossos, ratos wistars, ovariectomia, colágeno tipo I, colágeno tipo III, osteoprotegerina, osteocalcina, osteopontina.

Abstract

Condi, FLF. Effects of estrogen, raloxifene and genistein-rich soy extract on bone of ovariectomized adult female rats and previously androgenized [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2011.

INTRODUCTION: Hypoestrogenism can determine bone mineral loss, resulting in decreased bone quality. To prevent that process, several drugs are administered, which can lead, however, to important side effects. Therefore, it is questionable whether the use of estrogen associated with those substances could minimize the adverse effects and maintain bone mineral mass. There is little information on the effects of those compounds. This research aims to evaluate the action of unopposed estrogen or combined with raloxifene and genistein-rich soy extract on ovariectomized adult female rats. **MATERIALS AND METHODS:** On the ninth day of birth, rats received, testosterone propionate (0.1 mg / g). On the sixth month, animals in the physiological control were identified as GI and received only the vehicle (propylene glycol at 0.5 ml / day) during the experiment and the other which was administered testosterone underwent ovariectomy and divided randomly into six groups: GII - vehicle (control castrated, n = 6); GIII - conjugated equine estrogen (CEE, 50 mg / kg / day, n = 8); GIV - raloxifene (RAL, 0.75 mg / kg / day, n = 8) ; GV - soy extract enriched with genistein (ESG, 300 mg / kg / day, n = 7), GVI - ECE + ESG (50 mg / kg / day + 300 mg / kg / day, n = 7); GVII - ECE + RAL (50 mg / kg / day + 0.75mg/kg/day, n = 6). Three months after the surgery, drugs were consecutively administered for 120 days. Subsequently, the animals were sacrificed on anesthesia and their left tibiae were removed for routine histology. The histological sections were stained by hematoxylin-eosin to evaluate bone microarchitecture. Immunohistochemical, immunofluorescence and PCR procedures were performed to quantify the main structural bone proteins (type I collagen, osteocalcin, osteopontin, and osteoprotegerin) as well as their mRNA. The data were analyzed by ANOVA and Tukey test. **RESULTS:** All treatments led to increased amounts of trabecular bone ($p < 0.05$). The total collagen fibers had to be enlarged in all treated groups, except with raloxifene. Already thin collagen fibers decreased only in the group treated with estrogen. The fractions of type I collagen, were increased in groups treated with estrogen and its association with raloxifene. Type III collagen was increased in the group treated with estrogen in combination with soybean extract rich in genistein. Regarding the non-collagenous proteins, the increased osteoprotegerin presented in groups treated with estrogen, and their associations with soy extract rich in genistein. The osteopontin was decreased in all treated groups and osteocalcin was increased only in the treated group raloxifeno, compared to the castrated group ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference from the real-time PCR analysis of transcribed between the groups. **CONCLUSION:** The combination of

estrogen with raloxifene or genistein-rich soy extract was incapable of bringing additional benefits to the quality of bone tissue as observed with those drugs alone.

Descriptors: Estrogens, raloxifene, genistein, bone and bones, rats, wistars, ovariectomy, collagen type I, collagen type III, osteoprotegerin, osteocalcin, osteopontin.

1 INTRODUÇÃO

O remodelamento do tecido ósseo é necessário ao equilíbrio das atividades celulares, bem como para a integridade do osso. Este sofre constante modificação na proporção de osteoblastos e osteoclastos, elementos responsáveis pela formação e reabsorção óssea, respectivamente. A harmonia entre estes dois tipos celulares determina a integridade e a qualidade da estrutura óssea (Compston, 2006; Montagnani *et al.*, 2011), que é determinada pelas propriedades materiais e estruturais. É também influenciada pela taxa de renovação óssea, que incluem a geometria (tamanho e forma), a microarquitetura (trabecular, arquitetura do osso esponjoso, espessura do osso cortical e porosidade), assim como a composição mineral do colágeno (Martin e Correa, 2010).

O remodelamento ósseo é controlado por diversos fatores locais – interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), secretados pelas células osteoblásticas e osteoclásticas, e também por hormônios tireoidianos, calcitonina, vitamina-D, assim como pelos esteróides ovarianos (Clarke, 2008).

Entre os esteróides sexuais, realça o papel do estrogênio, sintetizado tanto nos ovários como nos tecidos periféricos, a partir dos androgênios, principalmente a testosterona. É importante para o desenvolvimento, a maturação e a reconstituição óssea (Imai *et al.*, 2009; Montagnani *et al.*, 2011).

Em relação ao sinal celular, o remodelamento ósseo determinado pelo estrogênio ocorre pela sua ligação aos seus receptores presentes na célula osteoblástica, o que induz ao incremento da produção de osteoprotegerina (OPG) e

suprime a síntese do ligante do receptor ativador do fator nuclear κ β (RANK-L). Esse processo diminui a ação dos osteoclastos levando, conseqüentemente, à redução da reabsorção óssea. Este mecanismo tende a manter a massa óssea. Além disso, o estrogênio predispõe à queda de citocinas envolvidas na reabsorção óssea, como IL-1 e TNF- α , produzidos pelos monócitos, IL-6, como também do fator estimulador da colônia de granulócios e macrófagos (GM-CSF) e do fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF), sintetizados por células estromais e osteoblastos (Clarke, 2008). Outro aspecto importante é a atuação do fator de crescimento e transformação β (TGF- β), também estimulado pelo estrogênio. Contudo, este fator diminui tanto a atividade osteoclástica, quanto a osteoblástica (Del Fattore *et al.*, 2008; Imai *et al.*, 2009).

Em situações de hipoestrogenismo, não há bloqueio completo do sistema RANK/RANK-L e das citocinas. Há, ainda, aumento dos fatores relacionados com o incremento da reabsorção óssea. Assim, este estado favoreceria a ação osteoclástica (Imai *et al.*, 2009; Trouvin e Goeb, 2010; Eriksen, 2010).

Para amenizar a perda óssea associada ao hipoestrogenismo da pós-menopausa, alguns autores sugerem o emprego de estrogênios (Mysliwiec *et al.*, 2011) e dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs) (Fontana *et al.*, 2003). Porém, estas substâncias apresentam alguns efeitos colaterais que podem dificultar e até mesmo impedir a continuidade de seu uso (Han *et al.*, 2002; Baracat *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2009). Alguns estudos apontam que o extrato de soja rico em genisteína poderia ter efeitos benéficos em mulheres na pós-menopausa. Entretanto, o seu efeito sobre a massa óssea ainda não está totalmente esclarecido (Fitzpatrick, 2003).

Deve-se assinalar, ainda, que todos esses fármacos agiriam sobre os receptores de estrogênio, pois, possuem similaridade química capaz de permitir a sua ligação ao receptor de estrogênio e daí sua ação sobre o osso (Grady *et al.*, 2002; Heirington *et al.*, 2002; Rossow *et al.*, 2002; Manson *et al.*, 2003; Eriksen, 2010). Entretanto, a potência do extrato de soja rico em genisteína em relação ao raloxifeno e ao estrogênio conjugado é menor (Weaver, 2005). Alguns investigadores sugerem que este extrato de soja teria ação antagonista ao estrogênio em determinados tecidos (Baracat *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2009). Todavia, os efeitos sobre o uso da combinação destas substâncias são ainda escassas na literatura. Assim, para avaliar de modo comparativo a ação destes fármacos sobre o tecido ósseo de ratas adultas castradas, após androgenização no período pós-natal imediato, idealizamos o presente estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo

2.1.1 Fisiologia óssea

O tecido ósseo é um dos mais resistentes do corpo humano. Desempenha funções protetoras de alguns órgãos e proporciona a movimentação do corpo. Além disso, é essencial para a homeostase do cálcio, fosfato e de outros íons como potássio, magnésio, citrato, sódio e bicarbonato (Graaf, 2003; Baron, 2003; Eriksen, 2010). É considerado, histologicamente, como um tecido conjuntivo. Macroscopicamente, pode ser classificado em: a) osso cortical ou compacto; b) trabecular ou esponjoso. Sua espessura e arquitetura variam de acordo com o sítio esquelético, refletindo no desempenho funcional do osso. O osso trabecular corresponde a 20% do total da massa esquelética e é encontrado, predominantemente, no interior de ossos longos (metáfises e epífises) e no esqueleto axial. Já o osso compacto, além de acomodar a medula óssea entre as suas traves, propicia resistência adicional aos ossos longos (Figura1) (Baron, 2003; Eriksen, 2010).

Tanto o osso trabecular quanto o cortical formam um reservatório de fosfato e cálcio que podem ser removidos ou acrescentados por ação celular, sob controle hormonal, dependendo da necessidade do organismo (Baron, 2003; Eriksen, 2010).

Microscopicamente, tecido ósseo consiste em uma porção celular e uma matriz extracelular (MEC). Esta possui um componente inorgânico de 65% e orgânico de 35%. Sua fase orgânica é formada por colágenos do tipo I, III, V e X e as proteínas não colágenas como osteopontina, osteocalcina e osteoprotegerina. O componente inorgânico é predominantemente constituído de cálcio e fósforo que, quando depositados como sais amorfos sobre a matriz extracelular e durante o processo de mineralização óssea, formam estruturas cristalinas similares aos cristais de hidroxiapatita (Junqueira e Carneiro, 2004).

As células do tecido ósseo são principalmente representadas por: a) células osteoprogenitoras, que dão origem aos osteoblastos; b) osteoblastos, responsáveis pela formação óssea; c) osteócitos, encontrados embebidos na MEC; d) células de revestimento ou de superfície, responsáveis pela proteção das superfícies ósseas; e) osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. Estas células, no geral, são responsáveis pelas diversas funções metabólicas do osso, como o remodelamento ósseo e a manutenção de níveis circulantes de cálcio (Baron, 2003; Eriksen, 2010).

As células osteoprogenitoras, derivadas de células mesenquimais, diferenciam-se em células da linhagem osteoblástica (osteoblastos e células de revestimento) (Gilbert, 2006; Eriksen, 2010).

As células de revestimento são de linhagem osteoblástica e estão geralmente sobre a superfície óssea quiescente. Acredita-se que representam osteoblastos inativos, que podem voltar ao estado ativo quando estimulados apropriadamente. Formam camadas contínuas e estão em contato umas com as outras e com osteócitos próximos a elas pelas junções celulares. Ademais, postula-se que essas células atuem na proteção das superfícies ósseas e exerçam papel ativo na regulação da diferenciação das células osteoprogenitoras. Estas células possuem

receptores de hormônios e fatores que iniciam a remodelação óssea (Menton *et al.*, 1982; Franz- Odendal *et al.*, 2006).

Os osteoblastos são células jovens, mononucleadas, com aspecto irregular, dotados de inúmeros prolongamentos, que participam intensamente da síntese matricial óssea e definem a formação primária do tecido. O processo de síntese da matriz óssea conduz à sua deposição em torno dos osteoblastos, fazendo com que eles fiquem aprisionados em uma lacuna no interior da matriz ao longo da formação do osso. Por sua intensa síntese, deposição e mineralização óssea, os osteoblastos possuem retículo endoplasmático e Complexo de Golgi bem desenvolvidos. Além disso, exercem papel indireto na regulação da reabsorção óssea, uma vez que essas células, e não os osteoclastos possuem receptores para vários fatores e hormônios que induzem a reabsorção óssea. Durante a deposição óssea, os osteoblastos podem inibir a atividade osteoclástica ou apenas deixar de estimulá-la (Puzaz, 1993; Ramalho *et al.*, 2000; Notelovitz, 2002; Gilbert, 2006; Eriksen, 2010).

Os osteócitos são osteoblastos em estágio mais avançado de amadurecimento, encontrados nas lacunas do tecido ósseo. São responsáveis pelo processo contínuo de síntese em quantidade suficiente para manter a integridade da matriz extracelular, bem como a arquitetura tecidual. Mantém entre as estruturas, com osteoblastos e com as células de revestimento encontradas nas superfícies ósseas, pela vasta rede de extensões citoplasmáticas localizadas no interior dos canalículos. Alguns estudos mostram que os osteócitos são capazes de sintetizar matriz óssea na superfície da lacuna osteocítica, a qual pode, posteriormente, sofrer mineralização. Embora alguns autores considerem que os osteócitos são capazes de reabsorver o osso mineralizado, que envolve a sua lacuna, estudos mais recentes põem em dúvida esta idéia. Os osteócitos são importantes também na recepção e

transdução dos estímulos mecânicos, detectando a deformação produzida pela força mecânica. Há ainda evidências de que tenham papel na ativação do remodelamento ósseo local, além de estar envolvidos na manutenção da matriz óssea (Yeh e Rodan, 1984; Notelovitz, 2002; Burger *et al.*, 2003; Noble, 2008).

Os osteoclastos são células grandes com formato irregular, o que permite sua movimentação do tipo amebóide no tecido ósseo. Sua estrutura é resultante de fusões de células mononucleadas originadas da medula óssea, formando uma célula multinucleada com 4 a 20 núcleos. São encontradas onde existe erosão ativa no osso. Ficam em contato com a superfície óssea, em depressões chamadas de lacunas de *Howship*. Sua função, como citada anteriormente, é causar destruição estrutural da matriz orgânica e desmineralização (Ross, 2008). Exibem grande quantidade de lisossomos em seu citoplasma, que possui fosfatase ácida do tipo 5b. Esta é uma enzima que resiste à influência inibitória do L(+) tartarato (fosfatase ácida resistente ao tartarato ou TRAP) que tem função catalítica para outras fosfatases ácidas. O TRAP está presente nas bordas em escova dos osteoclastos, sendo considerado um marcador bioquímico da reabsorção óssea, uma vez que está relacionado a esse processo (Swaminatan, 2001; Eriksen, 2010).

Os grandes responsáveis pelo remodelamento são os sinais de diferenciação celular, pois, como várias pesquisas deixam claro, há evidências de que a regulação é determinada pela interação entre proteínas nas superfícies dos osteoblastos e os osteoclastos, como a osteopontina (Del Fattore *et al.*, 2008).

O RANK-L é um membro da superfamília dos ligantes aos fatores de necrose tumoral (TNF). Acha-se presente na superfície das células osteoblásticas e se liga a seu receptor RANK. É responsável pela sobrevivência e diferenciação dos

osteoclastos (Wada *et al.*, 2006; Schneeweis *et al.*, 2005). É proteína de membrana do tipo I, localizada na superfície das células precursoras dos osteoclastos e nos osteoclastos maduros. A ligação RANK/RANK-L promove a indução da osteoclastogênese e a atividade dos osteoclastos (Anderson *et al.*, 1997; Eriksen, 2010; Trouvin, 2010).

A OPG é uma glicoproteína solúvel sintetizada pelos osteoblastos; liga-se ao RANK-L, bloqueando a ligação RANK/RANK-L. Desta forma, a interação entre OPG e RANK-L limita a sobrevivência e atividade osteoclástica (Schneeweis *et al.*, 2005; Wada *et al.*, 2006; Trouvin, 2010).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do processo de remodelamento no osso trabecular. 1. Osteoclasto; 2. Osteoblasto; 3. Osteócitos.

Fonte: (Pavon & Zanchetta, 2003)

2.1.2 Proteínas da Matriz Óssea

A porção orgânica do tecido ósseo é constituída por grande quantidade de colágeno do tipo I (90% da matriz), osteoprotegerina, osteocalcina, osteopontina e por outras proteínas não colágenosas. Deve-se ainda citar que o colágeno é proteína estrutural que, dentre outras funções, serve de molde para deposição mineral. Além do tipo I, também participam na formação da matriz os tipos III, V e X. (Robey e Boskey, 2003). O colágeno proporciona ductilidade e capacita a recepção de energia (resistência). Suas fibras são continuamente renovadas e são estabilizadas através de ligações, onde a piridinolina e a desoxipiridinolina, têm-se mostrado associadas à rigidez, mas parece ter pouca ligação com a tenacidade do osso (Martin e Correa, 2010).

A OPG pertence à superfamília do TNF. É considerada como inibidora da osteoclastogênese e, portanto, um regulador da massa óssea, reduzindo a reabsorção (Robey e Boskey, 2003; Eriksen, 2010).

A osteocalcina (OCN) pertence à família de proteínas com alta afinidade pelo cálcio, conhecidas como proteínas do ácido gama carboxiglutâmico (Gla). Sua influência no metabolismo celular ósseo é altamente significativa, com papel na regularização da mineralização e homeostase de íons de cálcio no organismo, além de constituir um regulador negativo da formação óssea (Robey e Boskey, 2003).

A osteopontina (OPN) pertence à família das glicoproteínas fosforiladas, contendo seqüências de ácido poliaspártico e ácido glutâmico, freqüentemente encontrado em proteínas com alta afinidade mineral. A OPN é uma proteína de matriz extracelular, negativamente carregada e participa da conectividade das progenitoras hematopoéticas osteoclásticas e células de apoio aos osteoblastos, na

osteoclastogênese e na osteoblastogênese que ocorre na medula óssea.. A sinalização celular pela osteopontina pode ocorrer por meio de uma seqüência de adesão celular que reconhece a integrina alfa-V beta-3 (Robey e Boskey, 2003).

2.2 Modelo Experimental

O uso do modelo experimental de ovariectomia contribui na investigação e desenvolvimento da afecção osteoporótica, bem como no incremento dos conhecimentos da etiologia, patofisiologia e terapia preventiva e curativa (Turner *et al.*, 2001). Utilizam-se ratas *Wistars*, cuja manipulação cirúrgica é relativamente fácil e resulta em importante reabsorção óssea e desordens de mineralização pela conseqüente deficiência hormonal (Figura 2) (Geddes *et al.*, 1996).

A ovariectomia em ratas provoca um mecanismo patológico similar ao de indivíduos com doenças que comprometem a estrutura óssea (Figura 3). Outras conseqüências similares são o ganho de peso e diminuição da absorção do cálcio intestinal como forma de proteção no caso de reabsorção óssea e no uso de medicamentos para tratamento da osteoporose como estrogênio, paratormônio, bisfosfonatos e calcitonina (Kalu, 1991; Bohic *et al.*, 2000).

O modelo experimental para estudar a massa óssea em ratas castradas deve obedecer alguns parâmetros. Kalu *et al.* (1989) utilizaram ratas *Wistars* de várias faixas etárias e perceberam que há aumento progressivo do osso em comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio ósseo do primeiro ao terceiro mês após o nascimento. No sexto mês, porém, ocorre o platô nas mudanças ósseas, ou seja, a maturação óssea nesses animais (Kalu *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 2005; Weaver e

Cheong, 2005). Para se obter modelo experimental que mimetize a osteoporose (Kalu, 1991) da mulher na pós-menopausa, deve-se realizar a ovariectomia após seis meses de idade (Kalu *et al.*, 1989).

Figura 2 - Fotografias da técnica de ovariectomia em ratas. A) Delimitação da área onde se encontra o ovário; B) Depilação do dorso e assepsia com polvidine (PVPI); C) Incisão da pele com lâmina fria; D) Abertura do plano muscular; E) Exposição do corno esquerdo do útero; F) Ligadura da tuba uterina esquerda; G) Exerese do ovário esquerdo; H) Fechamento dos planos e da pele.

Figura 3 – Ilustração de osso sadio (A) e osso osteoporótico (B)

Fonte: <http://www.medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>

Acesso: 23 de agosto de 2011.

Alguns investigadores reportam dificuldades na investigação de massa óssea após a castração. Assim, sugerem o emprego de artifícios para verificar a remodelação óssea. Portanto, deve-se salientar que a ação dos androgênios em animais recém-nascidos aumenta a massa óssea (Tamura *et al.*, 2005). Estes animais desenvolvem estro-permanente e aumento da massa óssea em relação aos que receberam veículo. Por esta razão, este modelo pode facilitar a identificação da perda de massa óssea em animais com hipoestrogenismo, ou seja, ovariectomizados (Tamura, *et al.* 2005).

2.3 Falência ovariana e intervenções medicamentosas

Mudanças histológicas na arquitetura e desordens do metabolismo ósseo estão diretamente relacionadas à macroarquitetura óssea e contribuem diretamente para o desenvolvimento de doenças estruturais neste tecido, sendo a mais comum, a osteoporose (Marcinkowska *et al.*, 2006).

Como já citado anteriormente, o tecido ósseo é caracterizado por um ativo metabolismo em constante remodelação cíclica e mineralização. A mudança no *turnover* que acompanha a ovariectomia ocorre diretamente pela diminuição da ação do estrogênio nas células ósseas (Okazaki *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2002; Eriksen, 2010).

Existem dois receptores para o estrogênio (ER), o alfa (ER- α) e o beta (ER- β), ambos presentes nos osteoblastos e osteoclastos. O estrogênio promove o desenvolvimento de osteoblastos através de células precursoras, aumenta a sua proliferação e síntese protéica, como o procolágeno tipo I, TGF- β e proteínas morfogenéticas. Além disso, tem um efeito anabólico e inibitório de apoptose dos osteoblastos, assim como dos osteócitos. *In vivo*, o início da terapia de reposição estrogênica é usualmente associado com a redução do número e atividade de osteoblastos. Isto é atribuído pela estreita relação entre a atividade osteoblástica e a osteoclástica e o efeito do estrogênio em reduzir a reabsorção óssea osteoclástica. Entretanto, não há evidência de que altas concentrações de estrogênio aumentem alguns índices histomorfométricos de atividade osteoblástica em humanos, possivelmente em razão da síntese osteoblástica aumentada de fatores de crescimento (Tomkinson *et al.*, 1997; Gohel *et al.*, 1999; Okazaki *et al.*, 2002, Fonseca, 2009).

A supressão estrogênica na atividade osteoclástica ocorre pelo aumento de apoptose osteoclástica, pela produção osteoblástica/estromal reduzida de RANK-L e produção aumentada de OPG. O estrogênio também regula a produção TNF- α pelas células T, através de mudanças na interleucina-7 (IL-7) e interferon-gama. O estrogênio diminui a produção desta citocina e modula os níveis dos receptores de IL-1 (Cenci *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2005; Eriksen, 2010; Trouvin, 2010).

A perda óssea após a ovariectomia é reduzida por bloqueadores destas citocinas, e bloqueio de TNF- α e IL-1 tem sido apontado na redução da reabsorção óssea em mulheres pós- menopáusicas (Gao *et al.*, 2004; Weitzman e Pacific, 2006).

A redução de reabsorção óssea também sofre influência de níveis aumentados de TGF- β , que inibe a diferenciação osteoclástica através da regulação da produção de TNF- α pelas células T (Weitzman e Pacific, 2006).

Na pós-menopausa, simultaneamente à diminuição estrogênica, ocorrem a absorção intestinal reduzida de cálcio, menor produção de calcitonina e aumento da reabsorção óssea. Nessas condições, a perda de osso é acelerada para 3 a 6% ao ano nos primeiros cinco anos de menopausa. A seguir, o ritmo cai para aproximadamente 1% ao ano. Nesse ritmo, a mulher perde cerca de 15% de sua massa óssea na primeira década após a menopausa. Para algumas mulheres, observa-se uma perda de até 30% da massa do mineral ósseo por volta dos 70 anos (Bagnoli *et al.*, 2005).

O clássico modelo dos mecanismos de ação dos estrogênios, particularmente do estradiol, baseia-se em sua entrada no núcleo das células-alvo, a fim de se ligar a uma série de proteínas inativas denominadas RE, existentes em duas diferentes isoformas, α e β ; transformam-se em receptores ativos com uma configuração espacial diferente quando se ligam ao estradiol, possibilitando a ela dimerizarem-se simultaneamente e interagir subsequentemente com uma sequência específica do DNA conhecida como elemento de resposta estrogênica (Riggs e Parfitt, 2005).

Um grupo específico de genes responsável pela síntese de proteínas celulares, capazes de disparar o efeito estrogênico em tecidos reprodutivos alvos como útero e mamas, depende deste elemento de resposta estrogênica (Rey, 2009).

Além disso, há duas áreas específicas nos receptores de estrogênio, conhecidas como fatores de ativação. A primeira é AF-1, localizada no sítio de interação com uma sequência específica de DNA, e a AF-2, localizada no sítio no qual o ligante se encaixa. Para que os grupos de genes associados àquele elemento de resposta ao estrogênio se ativem e atuem, a cadeia lateral de estradiol necessita interagir com a região AF-2 (Figura 4) (Rey, 2009).

Sabe-se que o receptor de estrogênio não tem único sítio molecular de ligação, mas apresenta dois diferentes domínios: um para ligantes similares ao estrogênio, e outro para os ligantes similares ao antiestrogênio e SERMs. Por essa razão, dependendo do sítio de ligação do ligante ao receptor de estrogênio, diferentes estruturas espaciais seriam geradas determinando, por sua vez, se o ligante tem uma ação agonista puramente estrogênica, uma ação agonista estrogênica parcial ou uma ação antagonista estrogênica pura (Rey, 2009).

À luz destas informações, acredita-se que os receptores do estrogênio não agem da mesma maneira em todos os tecidos alvos, de forma que sua ação depende da predominância do subtipo α ou β no tecido em questão, da natureza do ligante que se une a estes receptores (estrogênio, antiestrogênio ou SERMs), da transcrição celular (ERE- elemento de resposta do estrogênio) e da presença ou ausência de auxiliares ou proteínas reguladoras (Bryant *et al.*, 1996; Rey, 2009).

Ademais, o estradiol necessita atravessar a membrana citoplasmática e a membrana nuclear para se ligar ao receptor de estrogênio presente no núcleo. No interior desta estrutura, o anel benzotiofeno da molécula de raloxifeno se liga ao receptor de estrogênio com uma afinidade semelhante à do estradiol. Esta ligação, além de prevenir o acesso do estradiol ao receptor de estrogênio, também promove uma mudança na configuração espacial do receptor de estrogênio, em

contraposição à sua ativação e ligação ao elemento de resposta ao estrogênio. Entretanto, diferentemente da intimidade com a qual este anel se adapta ao receptor de estrogênio, a cadeia lateral da molécula, que é grande e pouco flexível, não se liga completamente a ele, causando uma protrusão, a partir da área do receptor. Esta peculiaridade provoca uma alteração da molécula que bloqueia sua possível atuação com AF-2, prevenindo, deste modo, que os genes associados sejam ativados e que ocorra a transcrição gênica (Rey, 2009).

Na opinião de alguns autores, este bloqueio seria a chave para os efeitos antagonistas ao estrogênio do raloxifeno nos tecidos uterinos e mamários (Bryant *et al.*, 1996).

Figura 4 – Mecanismo de ação do raloxifeno.

Fonte: Rey, 2009 (Modificada).

Por outro lado, no osso e em outros tecidos não reprodutivos, o raloxifeno se liga ao receptor de estrogênio e com a ajuda de uma série de proteínas auxiliares ativa uma seqüência específica de DNA conhecida como elemento de resposta ao estrogênio (ERE), sendo possível explicar como o raloxifeno mimetizaria o efeito de estrogênios em tecidos não reprodutivos como o osso (Riggs e Parfitt, 2005; Rey, 2009).

Em adição a este efeito, o raloxifeno demonstra outras ações diretas no tecido ósseo. A primeira delas indica que esta droga é capaz de reduzir a atividade

reabsortiva osteoclástica em até 50%, e em até 30% a produção de TNF- α , aos seis meses de tratamento, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. A segunda ação que depende da ativação do RRE sugere que o raloxifeno é capaz de aumentar a produção de fator de crescimento transformador beta 3 (TGF- β 3), diminuindo assim o número de osteoclastos e de sua atividade reabsortiva (Delmas *et al.*, 1997; Rey, 2009).

Os fitoestrogênios começaram a ser estudados e aplicados devido às complicações da terapia hormonal clássica e dos SERMs, pois existe grande similaridade estrutural e química com os estrogênios. A molécula de extrato de soja rico em genisteína tem sua estrutura semelhante com 17 β -estradiol, podendo se ligar aos REs, tendo funcionalmente atividade estrogênica e antiestrogênica. Estas, por sua vez, são dependentes dos hormônios sexuais endógenos, da sua concentração, dos órgãos alvos envolvidos e das características individuais de cada paciente (Rey, 2009). Por estas propriedades, alguns autores sugerem que a genisteína seria fito-SERMs (Drapter *et al.*, 1997; Mosquette *et al.*, 2004 a,b).

O extrato de soja corresponde à mistura de substâncias que tem diferentes afinidades pelos receptores de estrogênios como a daidzeína, glicitina, genistina, malonildaidzina, malonilglicitina, malonilgenistina, acetildaidzina, acetilglicitina, acetilgenistina que são ligadas à glicose; e as não ligadas à glicose: daidzeína, genisteína e gliciteína. Dentre estas, a genisteína e a daidzeína destacam-se por apresentarem maior atividade estrogênica (Mosquette *et al.*, 2007). Arjmandi *et al.* (1996) foram os primeiros a descrever os efeitos da soja na massa óssea de ratas ovariectomizadas. Estes autores sugerem que esta terapia teria ação semelhante à estrogênica.

A similaridade estrutural entre os fitoestrogênios e o estrogênio explica as ações de diferenciação e função nos tecidos alvos. Estas são mediadas através dos receptores α e β de transcrição (Whitten e Patisaul, 2001).

Ações dos receptores de estrogênio são mediados de modo genômico através da interação do ligante no receptor e são dependentes dos elementos de resposta presentes na região de potencialização de genes alvos, resultando em regulação da transcrição (Gouveia *et al.*, 1997; Whitten e Patisaul, 2001).

Os fitoestrogênios tem ações específicas nos tecidos dependentes do tipo celular, pelo subtipo de receptor estrogênico e pelos níveis de alguns co-ativadores e co-repressores locais (Watanabe *et al.*, 1997).

A genisteína pode ligar-se tanto aos ER- α quanto aos ER- β , no entanto, tem uma capacidade de ligação ao ER- β trinta vezes maior que ao ER- α , enquanto o 17 β -estradiol apresenta a mesma afinidade para os dois tipos de receptores. Tais diferenças de afinidade sugerem que distintos efeitos clínicos podem surgir quando o extrato de soja rico em genisteína age seletivamente em vias de transcrição mediados pelo ER- β . A genisteína é débil agonistas do ER- α e fortes agonistas dos ER- β . Esta diferença pode ser explicada por distintas transcrições dos ER- β e ER- α (Yamaguchi e Ma, 2001).

O extrato de soja rico em genisteína recruta seletivamente os co-reguladores dos ER- β e agem de forma não seletiva. Estes fármacos são dez a trezentas vezes mais potentes quanto à promoção da repressão transcricional do ER- β em comparação à sua ativação. Este fato é associado à ausência de regulação de genes mediadores dos ER- α . Isto tem contribuído para a baixa incidência de efeitos clínicos vinculados à menopausa em países nos quais seus habitantes consomem uma dieta rica em fitoestrogênios, como no Japão e China (Yamaguchi e Ma, 2001).

Aventa-se a hipótese de que o extrato de soja rico em genisteína é menos propenso a favorecer efeitos estimuladores de células mamárias e endometriais comparadas ao 17 β -estradiol, que é capaz de ativar vias de transcrição do ER- α (Yamaguchi e Ma, 2001; Piovesan *et al.*, 2005).

O extrato de soja rico em genisteína age nos osteoblastos e osteoclastos. A genisteína estimula a proliferação de células osteoblásticas-*like*, MC3T3-E1 e protege contra os danos celulares oxidativos (Lee *et al.*, 2001).

O extrato de etanol de grão de soja proporciona algumas alterações nas células osteoblásticas-*like* MC3T2-E1, como aumento da sobrevivência, da síntese de DNA, da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno e prevenção de apoptose (Choi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2011).

A genisteína causa importante elevação do teor de cálcio e da atividade da fosfatase alcalina na metáfise e diáfise femorais (Yamaguchi e Ma, 2001).

Vários autores sugerem que há vias dependentes e independentes dos receptores de estrogênio que podem sofrer alterações do extrato de soja rico em genisteína. OPG e o RANK-L são importantes no remodelamento ósseo em nível molecular. Além disso, a genisteína e daidzeína podem aumentar a produção de OPG e suprimir a liberação de IL-6 de maneira dose-dependente (Rickard *et al.*, 2003).

A formação osteoclástica ocorre de acordo com a secreção de RANK-L e OPG. RANK-L é produzido pelos osteoblastos e células estromais osteogênicas e está envolvido na formação de células osteoclásticas-*like*, na fusão de células precursoras dos osteoclastos e na reabsorção óssea. OPG inibe a

osteoclastogênese inibindo o RANK-L nos osteoblastos e células estromais osteogênicas (Fitzpatrick, 2003; Trouvin, 2010).

A genisteína parece alterar os níveis de expressão de RNAm de RANK-L e OPG. A daidzeína parece inibir o influxo de potássio em osteoclastos em ratos, enquanto a ação inibitória da genisteína é independente de mudanças das concentrações intracelulares de cálcio. Esta última ação pode causar despolarização da membrana e elevação da elevação de cálcio intracelular e conseqüente diminuição da reabsorção óssea (Okamoto *et al.*, 2001).

Segundo Li (2003), a genisteína suprimiria a reabsorção óssea pelos osteoclastos por ação na diferenciação, no citoesqueleto e na função dos osteoclastos de camundongos, bem como, metabolismo do cálcio no osso em ratas ovariectomizadas, prevenindo a reabsorção óssea pela promoção da formação de osso. Além disso, outro estudo também confirmou esta ação com a genisteína estimulando a formação de osso pelos osteoblastos em ratas ovariectomizadas (Morabito *et al.*, 2002). Em cultura de células, este fitohormônio aumentaria a síntese protéica em linhagens de osteoblastos, propiciando a formação óssea (Albertazzi, 2002). Acredita-se que este efeito seria decorrente de uma ligação ao receptor de estrogênio do tipo beta. Além disso, alguns autores sugerem que a genisteína purificada seria a extrato de soja rico em genisteína com melhor efeito em ratas com esqueleto jovem, porém em contraste com ratas adultas de esqueleto maduro, não mostraram resultados na reversão da osteopenia (Anderson *et al.*, 1998; Picherit *et al.*, 2001).

Em nosso laboratório, a dose eficaz para promover proliferação endometrial semelhante ao estrogênio foi de 300 mg/Kg/dia de extrato concentrado de soja em

ratas ovariectomizadas (Mosquette *et al.*, 2007). Por este motivo, empregamos esta dose em nosso estudo.

Há controvérsias sobre a ação do extrato de soja rico em genisteína sobre o tecido ósseo. Cai *et al.* (2005) avaliaram os efeitos da proteína de soja, extrato de soja rico em genisteína de soja e 17 β -estradiol no metabolismo ósseo de ratas adultas (seis meses) após a ovariectomia. Esses autores mostraram que o estrogênio preveniu a perda óssea trabecular e suprimiu a formação em ambas as faces corticais e trabeculares, porém não observaram efeitos das extrato de soja rico em genisteína sobre a perda óssea trabecular devido ao hipoestrogenismo. Adicionalmente, não houve ação deste fitohormônio no balanço total de cálcio ou na sua absorção, porém a proteína de soja reduziu a perda urinária de cálcio nos animais pela diminuição de aminoácidos contidos na proteína de soja (Cai *et al.*, 2005). Contudo, não se sabe se o extrato de soja teria a mesma ação da proteína purificada.

Em estudos comparativos em cultura de células, Sliwinski *et al.* (2005) mostraram que a genisteína (10^{-8}), o estradiol (10^{-8} e 10^{-7}) e o raloxifeno (10^{-9} e 10^{-8}), em altas doses, diminuíram o número de osteoclastos após nove dias de tratamento em cultura de células da medula óssea. Este estudo sugere que estes hormônios atuariam na redução da reabsorção óssea.

Ratas ovariectomizadas tratadas com raloxifeno e estrogênio durante cinco semanas mostraram que estes fármacos preveniram a perda óssea trabecular, pelo efeito reabsortivo ósseo, evidenciado pela redução do número de osteoclastos e concordante com este tratamento foi encontrada uma diminuição de células precursoras de osteoclastos (células multinucleares Trap+) em culturas de células de medula óssea humana (Evans *et al.*, 1994; Ramalho *et al.*, 2000).

A ação dos estrogênios sobre a massa óssea faz-se presente na reabsorção, inibindo as citocinas e influenciando as células osteoclásticas, osteoblásticas e unidades de remodelação óssea, podendo também estimular as células osteoclasto-*like* na medula óssea e promover apoptose precoce destas células. Os estrogênios são agonistas em todos os tecidos, sendo não seletivos, ligando-se em ER β e ER α (Ramalho *et al.*, 2000; Russo, 2001; Sliwinski *et al.*, 2005).

Moraes *et al.* associaram diversas dosagens de estrogênio e raloxifeno; perceberam que o raloxifeno na dose empregada neste estudo pode bloquear parcialmente a ação do estrogênio no endométrio de ratas adultas castradas.

A interação medicamentosa entre os fármacos na massa óssea não foi totalmente elucidada e há dúvidas sobre se haveria redução da perda óssea com estes esquemas de tratamento em mulheres com hipoestrogenismo na pós-menopausa (Erivit J, 2003). Apesar das limitações de ilações do modelo experimental para o ser humano, este estudo possibilita avaliar se os efeitos da combinação destes fármacos ocorrem sobre a remodelação óssea.

O presente estudo foi baseado nas informações ainda escassas da literatura e tem como propósito avaliar os efeitos isolados e da combinação dos fármacos (estrogênios conjugados equinos, raloxifeno e isoflavonas) no tecido ósseo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos, isolados ou combinados, do estrogênio, do raloxifeno e do extrato de soja rico em genisteína sobre o tecido ósseo de ratas adultas ovariectomizadas, previamente androgenizadas no período pós-natal imediato.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar, por meio da histomorfometria, a qualidade do tecido ósseo, pela análise da quantidade trabecular;
- b) Avaliar, por imunofluorescência, a distribuição e a quantidade de colágenos tipo I e III;
- c) Avaliar, por imunoistoquímica, a expressão das proteínas não colagenosas ósseas, osteocalcina (mineralização óssea), osteopontina (remodelação, reabsorção e formação óssea) e osteoprotegerina (osteoclastogênese).
- d) Avaliar, por meio de PCR em tempo real, o recrutamento de RNAm do colágeno tipo I, osteopontina, osteocalcina e osteoprotegerina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram utilizadas 70 ratas (*Rattus norvegicus albinus*) recém-nascidas, fornecidas pelo Biotério da Fundação Faculdade de Medicina de São Paulo – FMUSP. Os animais foram confinados em gaiolas plásticas medindo 45 x 35 x 15cm de comprimento, largura e altura, respectivamente, com tampa gradeada de metal. Foram mantidos em número de quatro por gaiola, com alimentação e água *ad libitum*, em temperatura ambiente de 22°C, iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, marca Philips (modelo luz do dia de 40W). Manteve-se fotoperíodo claro de 12 horas intercalado com escuro de 12 horas, considerando-se o período de luz das 7:00 às 19:00 horas.

Os animais, após nove dias de nascimento (período pós-natal imediato), receberam, por via subcutânea, propionato de testosterona (0,1 mg/g), com o propósito de promover o aumento da massa óssea final (Tamura *et al.*, 2005).

Após seis meses, 70 ratas permaneceram virgens e tinham peso de 278 a 312 g. Sessenta delas foram submetidas a ovariectomia; as 10 restantes, não castradas, constituíram o grupo controle. Após 21 dias, realizou-se exame colpocitológico para certificar que os animais estavam castrados (Marcondes *et al.*, 2002).

Para a ovariectomia, as ratas foram anestesiadas por via intraperitoneal com cetamina e xilasina. Com o auxílio de uma pinça, foi tracionada a gordura periovariana, e identificaram-se os ovários, as tubas uterinas e a porção distal dos cornos uterinos. Após a ligadura dos pedículos ovarianos, retiraram-se os ovários. Em seguida, procedeu-se o fechamento por planos cirúrgicos.

Após três meses da ovariectomia, todos os animais que foram submetidos à cirurgia foram divididos, ao acaso, em seis grupos iguais, contendo dez ratas cada. Assim os grupos foram denominados (excluindo o grupo ovariectomizado):

Controle (GI) - Grupo controle fisiológico sem ovariectomia;

PLG (GII) - Ratas que receberam apenas veículo (propilenoglicol em 0,5 ml/dia);

ECE (GIII) - Ratas que receberam estrogênios conjugados eqüinos (ECE), na dose de 50 µg/Kg/dia (Baracat *et al.*, 1998, a,b);

RLX (GIV) - Ratas que receberam raloxifeno, na dose total de 0,75 mg/kg/dia;

ESG (GV) - Ratas que receberam extrato de soja enriquecido com genisteína, na dose total de 300 mg/kg/dia;

ECE + ESG (GVI) - Ratas que receberam extrato de soja enriquecido com genisteína, na dose total de 300 mg/kg, associado a ECE na dose total de 50µg/Kg/dia;

ECE+RLX (GVII) - Ratas que receberam ECE, na dose total de 50µg/Kg/dia, associados a raloxifeno, na dose total de 0,75 mg/kg/dia (Moraes *et al.*, 2006).

As substâncias foram ministradas por durante 120 dias consecutivos (Cai *et al.*, 2005), sempre no mesmo período do dia (das 16:00 às 17:00 horas), com auxílio

de sonda metálica. Foram diluídas em propilenoglicol, produzindo-se soluções homogêneas de tal maneira que cada animal recebeu 1 ml/dia. Após o período de tratamento, os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂ conforme a diretriz institucional para manejo de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Em seguida, as tíbias foram coletados para processamento histológico, imunoistoquímico e de biologia molecular, conforme protocolo específico para cada análise.

No final do experimento, houve mortalidade de 20 animais. A autópsia mostrou processo inflamatório pulmonar em 12 ratas e, nas restantes, não houve sinais de anormalidades. Possivelmente, este desfecho pode estar relacionado com a gavagem dos animais. Assim, o número (n) final em cada grupo foi: Controle – n = 8; PLG – n = 6; ECE - n = 8; RLX – n = 8; ESG – n = 7; ECE + ESG – n = 7; ECE+RLX – n =6.

4.2 Métodos

4.2.1 Análise Histológica

4.2.1.1 Análise histomorfométrica e histoarquitetura do colágeno

As tíbias foram fixadas em formol por 24 horas, descalcificadas em ácido fórmico a 8%, convenientemente desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina líquida em estufa, regulada à temperatura de 60°C, segundo a metodologia preconizada por Michalany (1980). A inclusão foi realizada de tal maneira que se pudesse observar, nas lâminas histológicas, cortes longitudinais do osso.

Na sequência, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot, ajustado para 3 μm . Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e, a seguir, mantidas em estufa regulada à temperatura de 46°C durante 24 horas, para secagem e colagem. Quatro lâminas de cada animal foram submetidas ao método de coloração pela hematoxilina e eosina (HE) e picrosirius para posterior análise histomorfológica e histomorfométrica.

A análise histológica das lâminas coradas com HE foi realizada em microscópio de luz, da marca Zeiss, com aumento de 50 a 400x, para caracterização do tecido ósseo, assim como para observar eventuais alterações.

As lâminas coradas com HE foram analisadas pela da técnica do *point-counting*, para determinar a porcentagem de traves ósseas nos diferentes grupos. Utilizou-se um retículo contendo cem pontos e cinquenta retas. Ao aumento de 400x, foram examinados dez campos microscópicos aleatórios e não-coincidentes imediatamente um campo microscópico abaixo da linha de crescimento ósseo, totalizando mil (1.000) pontos por lâminas, cobrindo uma área de $62.500\mu\text{m}^2$ (Revel, 1983)

Foram considerados pontos positivos aqueles que incidiam nas traves ósseas. Os valores foram expressos em porcentagem de pontos positivos do total de pontos do retículo.

As lâminas coradas pelo picrosirius foram analisadas em microscópio óptico equipado com um polarizador de luz acoplado a um analisador de imagem. O sistema utilizado consistia de uma câmera CCD Sony acoplada a um microscópio Olympus, a partir do qual as imagens puderam ser visualizadas no monitor. Por sistema digital inserido em um computador (Pentium3 300Mhz), as imagens foram processadas, empregando o programa Image ProPlus. Foram selecionados,

aleatoriamente, cinco campos para a região trabecular, um campo abaixo da cartilagem de crescimento, visualizados sob um aumento de 400 vezes. A área total medida pelo analisador em cada campo foi de 68.265,680 mm². O colágeno presente no campo analisado foi medido pela seleção de tonalidades birrefringentes correspondentes às bandas colagênicas polarizadas, com posterior medida da área digitalizada.

4.2.2 Técnica de Imunoistoquímica e imunofluorescência

4.2.2.1 Descalcificação do Tecido Ósseo com EDTA Tamponado

A tíbia esquerda foi empregada para a realização dos testes de imunoistoquímica e imunofluorescência. Foi colocada em solução fisiológica gelada, seguida de fixação em formaldeído neutro tamponado-NBF (30 mM de NaH₂PO₄H₂O, 45 mM de NaHPO₄ e 3,7 % de formaldeído) a 4°C *overnight*. Após esse período, o fragmento foi lavado com tampão fosfato salina gelado – PBS (136,9 mM de NaCl, 2,68 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄, 1,46 mM de KH₂PO₄, pH 7,2 – 7,4) e descalcificado com EDTA - Etilenodiaminotetra acetato dissódico tamponado (390mM de EDTA em tampão fosfato salina), por aproximadamente quatro semanas, a 4°C. O fragmento permaneceu sob agitação, sendo o tampão trocado semanalmente. Após esse período, foi incluído em parafina. Desses blocos obtiveram-se cortes histológicos de 3 µm, os quais foram colocados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxy Silano (Sigma).

4.2.2.2 Imunofluorescência para colágenos tipo I e III

Cortes de tíbias de aproximadamente 3 micrômetros foram aderidos a lâminas previamente tratadas com aminosilano. Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados com banhos de álcool etílico, com concentrações decrescentes (100% - 75%), água corrente (10 minutos), água destilada e tampão fosfato pH 7,4 (PBS). Posteriormente, foi realizada a digestão enzimática com condroitinase ABC 2 UN/ml (Sigma, St. Louis/MO/EUA) dissolvida em tampão tris-HCl 0,05M pH 8,0, por 3 horas a 37°C, seguida de digestão com pepsina bovina (Sigma, St. Louis/MO/EUA) em ácido acético 0,5N, durante 30 minutos.

Os cortes tratados foram lavados 3 vezes por 10 minutos, com PBS e deixados incubando com leite desnatado 5% em PBS, durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos, com PBS e deixadas incubando com leite desnatado 5% em PBS, durante 15 minutos. Subsequentemente, as lâminas foram incubadas por uma noite, com anti-colágeno do tipo I e III provenientes de traquéia de boi policlonal, produzido em coelho, no Laboratório de Investigação Médica (LIM-17) da FMUSP, numa diluição de 1:50. Após esse período, os cortes foram lavados em PBS com Tween 20 à 0,05% e incubados por 90 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Sigma, St. Louis/MO/EUA), diluído em 1:100 em solução de azul de Evans 6% em PBS. Após esse período, as lâminas foram lavadas em PBS com Tween 20 à 0,05% e montadas com glicina tamponada. Finalmente, as reações foram visualizadas em um microscópio de fluorescência (Olympus).

Analizou-se a expressão do colágeno nas trabéculas ósseas presentes em cinco campos abaixo da cartilagem de crescimento entre as duas corticais (aumento

de 200x). Os resultados foram expressos em porcentagem da área total de trabéculas. Quanto à análise das outras proteínas (osteoprotegerina, osteocalcina e osteopontina), foi utilizada técnica de imunoistoquímica.

4.2.2.3 Imunomarcção da osteoprotegerina (OPG), osteocalcina (OCN) e osteopontina (OPN) no tecido ósseo

As lâminas foram imersas em xilol quente por 25 minutos; a seguir submetidas a dois banhos de xilol frio e hidratação com sucessivas lavagens com álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), água destilada e tampão fosfato de sódio (PBS). Para a exposição e recuperação de sítios antigênicos realizou-se tratamento enzimático com pepsina bovina (10000 unidades de tecido digerido UTD) (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA) dissolvida em tampão ácido (pH=2.2), na concentração de 2mg /500ul por 45 minutos a 37°C, para COL I, e com tripsina (Sigma Co., St Louis, Missouri, USA) 0,25% em PBS por 30 minutos a 37°C para OPG, OCN e OPN.

A seguir, os cortes foram lavados três vezes, 10 minutos cada, com PBS e a reação bloqueada com leite Molico a 5% diluído em PBS, durante 30 minutos. As lâminas foram incubadas durante uma noite com anticorpo policlonal anticolágeno do tipo I obtido de coelho e diluído em 1:50 em solução de PBS e com anticorpo policlonal anti-OPG (Santa Cruz Biotechnology), anti-OCN (Santa Cruz Biotechnology) e anti-OPN (Santa Cruz Biotechnology) obtido de cabra e diluído a 1:100, 1:100 e 1:80, respectivamente, em anticorpo diluente (Dako North America, Inc). No controle negativo as lâminas foram incubadas com soro fetal bovino no lugar do anticorpo primário. Após este período, os cortes foram lavados em PBS Tween

20 0,05% e incubados por 1 hora e 30 minutos com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína (Sigma, Chemical Co.; St. Louis, Missouri, USA) para COL I (1:50) e com anticorpo secundário anti-IgG de cabra conjugado com fluoresceína (Calbiochem) para OPG, OCN e OPN, diluído a 1:200 em solução de PBS contendo azul de Evans 6% e montadas com solução de glicerina tamponada. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Olympus (DX-15020) e as proteínas quantificadas com ajuda de um analisador de imagens. Esse sistema é composto por uma câmara acoplada ao microscópio e as imagens capturadas foram visualizadas em monitor LG, onde são digitalizadas (Oculus TCX, Coreco inc; St. Laurent, Quebec, Canadá). As imagens foram processadas pelo *software* Pro-plus 6.0.

Para analisar a expressão dessas proteínas, observaram-se as trabéculas ósseas presentes em cinco campos abaixo da cartilagem de crescimento entre as duas corticais (aumento de 200x), idêntica à do COL I, porém, com aumento de 400x. Essas proteínas expressavam-se predominantemente na medula óssea, e foram expressas em relação à área total dos 5 campos.

4.2.3 Expressão gênica por PCR em tempo real (*Real-Time* PCR)

A tíbia direita foi dissecada rapidamente sobre uma superfície resfriada (4°C), congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer - 80 °C. Para a extração do RNAm, as tíbias foram pulverizadas, na presença de nitrogênio líquido, em um mortar e pistilo de aço (Fisher Scientific International, Inc, Hampton, NH, USA) previamente resfriados em gelo seco. Ao pó de osso foi adicionado Trizol

(INVITROGEN- LIFE). A mistura de pó de osso mais Trizol foi homogeneizada com um polytron PT10-35 (Brinkmann Instruments, Inc, NY, USA).

O RNA total da tíbia foi extraído de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do Trizol e tratado com DNase I (Fermentas, Hanover, MD, USA), segundo indicação do fabricante. A concentração e pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria medindo-se a absorbância em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, e 1 mM EDTA) a 260 e 280 nm. O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir do RNA total extraído (1,0 µg), utilizando-se oligo (dT) e a enzima transcriptase reversa “ReverAid-H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase” (Fermentas, Hanover, MD, USA), conforme o seguinte protocolo: incubação com o oligo (dt) a 25 °C por 10 min, transcrição reversa a 37 °C por 1 hora e inativação por calor (*heat inactivation*) da transcriptase reversa a 95 °C por 5 min no termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Os oligonucleotídeos iniciadores para amplificação por PCR foram desenhados através do *software* Primer Express Version 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a partir das seqüências dos genes para colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e osteoprotegerina (Tabela1). As condições para construção de cada *primer* foram: (1) cruzar os limites intron-exon; (2) temperatura de anelamento entre 58-60°C; (3) 15-30 pares de base e (4) manter uma porcentagem entre 30-80% de bases G e C. Todos os *primers* foram sintetizados pela Integrated DNA Technology (DNA Technologies, Coralville, IA, USA).

Os valores relativos à amplificação do RNAm referente a cada gene foram estudados e avaliados pela mensuração da fluorescência, quantificados por termociclador e detector ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), comparando todas as amostras e o controle em duplicatas. Após

padronização da quantidade de DNAc e da concentração dos *primers*, as reações foram realizadas em um volume total de 25 µl, com 450 nM de *primers* e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). O gene 18srRNA e a beta actina foram selecionados como controle interno para corrigir a variabilidade nas amplificações. O DNAc foi amplificado em duplicatas nas seguintes condições: 1 ciclo a 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto (anelamento). Os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos foram normalizados com o controle interno e a quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método previamente descrito por Pfaffl (2011).

Tabela 1 Sequência dos *primers* para PCR em tempo real

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Acesso no <i>Gen Bank</i>
β Actina	F: AAG ATT TGG CAC CAC ACT TTC TAC A R: CGG TGA GCA CAG CAG GGT	NM_031144
Colágeno tipo I	F: GCG AAG GCA ACA GTC GAT R: CTT GGT GGT TTT GTA TTC GAT GAG	NM_0116132
Osteocalcina	F: TCT GAC CTG GCA GGT GCA A R: CCG GAG TCT ATT CAC CTT ACT	NM_009399
Osteopontina	F: CGG CCT TGC CTC CTG TCT R: TCT CCT CTG AGC TGC CAA ACT	NM_007388
Osteoprotegerina	F: CAG AGG ACC ACA ATG AAC AAG TG R: GTC CAT TCA ATG ATG TCC AAG AAC	NM_U94331

F: *Forward primer* ; R: *Reverse primer*

4.3 Análise Estatística

4.3.1 Análise Descritiva

Os dados foram analisados em planilha do *Excel*® (MS-Office 2000) e foram calculados as médias e os desvios-padrão da média para cada grupo avaliado.

4.3.2 Análise Inferencial

Inicialmente, avaliou-se a distribuição da amostra. Para a comparação entre os grupos, quando a distribuição foi homogênea, utilizou-se o teste de ANOVA ($p < 0,05$), seguido pelo pós-teste de Tukey. Caso contrário, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

Para a comparação entre dois grupos, foram empregados os testes de t de Student ou Mann-Whitney, na dependência da distribuição da amostra. Fixou-se como significativo quando $p < 5\%$. Todas as análises foram realizadas com o *software* estatístico SPSS 18.0 (Inc., Chicago, IL).

5 RESULTADOS

5.1 Peso durante o estudo

A Tabela 2 mostra a média e o desvio-padrão da média do peso dos animais (g), antes da ovariectomia e durante quatro meses de tratamento após a ovariectomia. Não houve variação significativa do peso entre os grupos.

Tabela 2 Peso dos animais (média e o desvio-padrão) durante o tratamento farmacológico após a ovariectomia

	Peso inicial	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês
Controle	312,2±11,9	313,8 ± 12,1	317,5 ± 17,4	315,6 ± 19,4	315,1 ± 12,2
(GI)	(n=10)	(n=10)	(n=9)	(n=8)	(n=8)
PLG	295,1± 20,3	306,6 ± 12,3	309,2 ± 15,3	303,2 ± 16,7	313,2 ± 14,2
(GII)	(n=10)	(n=10)	(n=9)	(n=7)	(n=6)
ECE	278,3±17,4	293,7 ± 21,1	309,4 ±12,2	271,5 ± 23,2	308,1 ± 23,9
(GII)	(n=10)	(n=10)	(n=9)	(n=8)	(n=8)
RLX	290,9±18,5	311,3 ± 18,9	295,3 ± 21,3	293,6 ± 19,4	307,6 ± 21,5
(GIV)	(n=10)	(n=10)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
ECE	301,6±14,4	318,5 ± 20,4	303,6 ± 28,4	312,2 ±18,4	323,1 ± 14,9
(GV)	(n=10)	(n=9)	(n=8)	(n=7)	(n=7)
ECE+ESG	310,6±19,8	321,7 ± 17,3	331,6 ± 21,1	342,3 ± 12,2	336,7 ± 18,6
(GVI)	(n=10)	(n=9)	(n=9)	(n=7)	(n=7)
ECE+RLX	302,7±15,3	318,3 ± 18,7	314,1 ± 20,1	305,8 ± 18,9	321,3 ± 19,3
(GVII)	(n=10)	(n=8)	(n=8)	(n=7)	(n=6)

* Não houve diferença entre os grupos estudados

5.2 Análise histomorfológica do tecido ósseo não mineralizado

A Figura 5 mostra a fotomicrografia da diáfise de ratas dos grupos de estudo. O grupo PLG (Figura 5 B) apresenta a histoarquitetura das trabéculas ósseas do grupo ovariectomizado. Neste grupo, as traves ósseas mostram-se finas, com distribuição heterogênea e importante redução de comunicação entre as trabéculas ósseas. Em contraste, no grupo controle (Figura 5 A), as trabéculas ósseas estão preservadas, dispostas de forma regular, com espessura e conectividade mantidas. Os grupos ovariectomizados e tratados com ECE (Figura 5 C), RLX (Figura 5 D), ESG (Figura 5 E), ECE+ESG (Figura 5 F), e ECE+RLX (Figura 5 G) mostraram características semelhantes, com aumento importante das trabéculas ósseas, por vezes semelhantes às do grupo controle. Além disso, houve aumento da espessura trabecular, bem como, sinais de restauração na conectividade das trabéculas. Estes mesmos resultados podem ser observados na Figura 5 H, onde há diminuição da quantidade de traves ósseas no grupo PLG (GII) em comparação com o grupo controle (GI). Houve, ainda, aumento significativo na quantidade de trabéculas nos grupos tratados com ECE (GIII), RLX (GIV), ESG (GV) e suas combinações ECE+ESG (GVI) e ECE+RLX (GVII), comparativamente ao grupo PLG (GII). Não houve significância estatística entre os grupos tratados com esses fármacos e o grupo controle, bem como em todos os grupos tratados entre si.

Figura 5- Fotomicrografias da diáfise de ratas coradas pela Hematoxilina-Eosina e morfometria dos grupos de estudo. A - grupo controle (GI); B – ovariectomizado (GII); C - ovariectomizado e tratado com estrogênio (GIII); D - ovariectomizado e tratado com raloxifeno (GIV); E - ovariectomizado e tratado com extrato de soja rico em genisteína (GV); F - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com extrato de soja rico em genisteína (GVI); G- ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com raloxifeno (GVII). Coloração HE. Lâminas descalcificadas. A seta indica a quantidade de trabéculas ósseas, sua conexão e espessura; H – O gráfico mostra a quantidade de trabéculas ósseas em cada grupo tratado ($p < 0,05$) comparada ao grupo castrado (GII).

5.3 Quantificação do colágeno das tíbias por análise de imagem (picrosirius)

Na Figura 6, pode-se observar que o grupo PLG (Figura 6 B) apresenta preservação da histoarquitetura do colágeno nas traves ósseas, caracterizada pela birrefringência avermelhada no tecido corado pelo picrosirius sob luz polarizada, porém, em algumas áreas, as traves aparecem mais finas e em menor quantidade. Os animais tratados com ECE (Figura 6 C) apresentaram remodelamento da cartilagem de crescimento, presença de osteoblastos com menor área de separação entre as traves. Houve aumento da produção de colágeno, caracterizada pela maior intensidade da birrefringência em vermelho, indicando uma rede de fibras mais resistentes. No grupo tratado com RLX (Figura 6 D), prevaleceu uma birrefringência esverdeada, indicando haver maior quantidade de fibras finas de colágeno, que pode corresponder a osso mais friável. No grupo tratado com ESG (Figura 6 E), houve aumento na diferenciação celular, formação de tecido ósseo, porém, a histoarquitetura das fibras colágenas modificou-se, tornando-se mais finas, devido à mudança da birrefringência de vermelho para esverdeado em alguns pontos das traves, sugerindo haver remodelamento da fibra colágena. Em ratas tratadas com ECE+ESG (Figura 6 F), ocorreu menor formação de traves, porém, as fibras mostraram-se mais preservadas, sugerido maior quantidade de fibras finas e, conseqüentemente, possível remodelação óssea com colágeno jovem, porém, caracterizando osso mais frágil. Nos grupos tratados com ECE+RLX houve, ao que parece, maior remodelamento de fibras colágenas, pela presença de grande quantidade de fibras finas (Figura 6 G). Na figura 6 H nota-se diminuição significativa do colágeno total do grupo PLG (GII) em comparação ao grupo controle (GI), com

$p < 0,05$. Em outros grupos: EST (GIII), ESG (GV) e combinações (GVI e GVII), houve aumento da quantidade de colágeno total comparado ao grupo PLG (GII). No restante dos grupos, quando comparados entre si, não houve diferenças significantes ($p > 0,05$).

Figura 6 - Fotomicrografias da diáfise de ratas coradas com picrosirius e quantificação das fibras grossas e finas de colágeno, bem como colágeno total dos grupos de estudo. A - grupo controle (GI); B - ovariectomizado (GII); C - ovariectomizado e tratado com estrogênio (GIII); D - ovariectomizado e tratado com raloxifeno (GIV); E - ovariectomizado e tratado com extrato de soja rico em genisteína (GV); F - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com extrato de soja rico em genisteína (GVI); G - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com raloxifeno (GVII). Coloração HE. Lâminas descalcificadas. A seta indica a birrefringência esverdeada/amarelada (fibras finas) ou avermelhada (fibras grossas) presentes nas trabéculas; H - O gráfico mostra a porcentagem de fibras totais de colágeno nas trabéculas ósseas (* $p < 0,05$) comparada ao grupo castrado (GII).

O Gráfico 1 mostra a quantidade, em porcentagem, de fibras finas presentes em todos os grupos. O grupo PGL (GII), em relação ao controle apresentou maior quantidade de fibras finas, com valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$), o que poderia representar maior fragilidade óssea. O grupo ECE (GIII), em comparação com todos os outros, mostrou menor quantidade de fibras finas de colágeno ($p < 0,05$). Tal achado sugere resistência óssea maior. Não houve diferenças significantes entre os grupos RLX (GIV), ESG (GV), ECE + ESG (GVI) e ECE + RLX (GVII) e em comparação ao grupo PLG (GII), todos com $p < 0,05$.

Gráfico 1 – Quantidade de fibras finas de colágeno presente em todos os grupos controle (GI), PLG (GII), ECE (GIII), RLX (GIV), ESG (GV), ECE+ESG (GVI), ECE +RLX (GVII) (* $p < 0,05$). A comparação foi realizada com o grupo castrado (GII).

O Gráfico 2 registra a porcentagem de fibras grossas de colágeno. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Gráfico 2 – Quantidade de fibras grossas de colágeno presente em todos os grupos: Controle (GI), PLG (GII), ECE (GIII), RLX (GIV), ESG (GV), ECE+ESG (GVI), ECE +RLX (GVII). A comparação foi realizada com o grupo castrado (GII).

5.4 Quantificação de colágeno tipo I e tipo III

Na Figura 7, observa-se o colágeno tipo I quantificado pelo método de imunofluorescência (cor verde). No grupo PLG (Figura 7 B), nota-se diminuição da birrefringência esverdeada, o que sugere um padrão homogêneo de perda deste tipo de colágeno, quando se compara com a trabécula óssea do grupo controle (Figura 7 A). No grupo tratado com estrogênio (Figura 7 C), a expressão de colágeno I está aumentada de forma significativa ($p < 0,05$), como também demonstrado na Figura 7 H. No entanto, há um padrão heterogêneo do ganho desta proteína. No grupo tratado com RLX (Figura 7 D), a distribuição das fibras de colágeno I está aumentada em toda superfície trabecular, mostrando, desta forma, um padrão homogêneo de deposição. Obteve-se o mesmo resultado no grupo ESG (Figura 7 E). O restante dos grupos tratados, como as combinações ECE + RLX (Figura 7) e

ECE + ESG (Figura 7 G), apresentaram o mesmo padrão homogêneo de distribuição do colágeno tipo I quando comparados ao grupo raloxifeno.

A Figura 7 H indica a quantidade de colágeno tipo I nas trabéculas ósseas de todos os grupos. Houve diminuição de colágeno I de forma significativa no grupo PLG (Figura 7 B), comparativamente ao grupo controle (Figura 7 A), com $p < 0,05$. Nota-se também aumento significativo desta proteína no grupo tratado com estrogênio (Figura 7 C), assim como ECE+RLX (Figura 7C), porém não houve aumento significativo em comparação ao grupo PLG (Figura 7 B) dos demais grupos tratados, RLX (Figura 7 D), ESG (Figura 7 E), ECE + ESG (Figura 7 F) e ECE + RLX (Figura 7 G).

Na Figura 8, pode-se observar que há maior birrefringência esverdeada no grupo PLG (Figura 8 B), quando comparado ao grupo controle (Figura 8 A), demonstrando a presença de colágeno tipo III. Esse tipo de colágeno aparece depositado entre as fibras de colágeno tipo I e encontra-se ao redor de vasos (Junqueira e Carneiro, 2004). O grupo tratado com ECE (Figura 8 C) destacou-se por apresentar pequena quantidade de colágeno tipo III, indicada pela baixa birrefringência, porém não parece diferir dos grupos controle (Figura 8 A) e PLG (Figura 8 B). Os grupos RLX (Figura 8 D), ESG (Figura 8 E), ECE+ESG (Figura 8 F) e ECE+RLX (Figura 8 G) tiveram a mesma intensidade de birrefringência, portanto parece não haver grande diferença na quantidade de colágeno tipo III nestes grupos.

De acordo com a Figura 8 H, não houve diferença significativa entre os grupos controle (GI), PLG (GII) e EST (GIII). Houve aumento de colágeno tipo III, de modo significativo ($p < 0,05$), apenas no grupo ECE+ESG (GVI), comparado ao grupo PLG (GII), com $p < 0,05$. Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) no aumento da

quantidade de colágeno tipo III entre todos os outros grupos tratados, comparado ao grupo PLG (GII).

Figura 7 - Fotomicrografias de imunofluorescência de colágeno tipo I, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo. A - grupo controle (GI); B - ovariectomizado (GII); C - ovariectomizado e tratado com estrogênio (GIII); D - ovariectomizado e tratado com raloxifeno (GIV); E - ovariectomizado e tratado com extrato de soja rico em genisteína (GV); F - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com extrato de soja rico em genisteína (GVI); G- ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com raloxifeno (GVII). Aumento de 400x. A seta indica as fibras de colágeno I marcadas com fluorescência. Observou-se que elas se dispõem em forma de fibras; H - O gráfico mostra a porcentagem de colágeno tipo I nas trabéculas ósseas de ratas (* $p < 0,05$) comparada ao grupo castrado (GII).

Figura 8 - Fotomicrografias de imunofluorescência de colágeno tipo III, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo. A - grupo controle (GI); B - ovariectomizado (GII); C - ovariectomizado e tratado com estrogênio (GIII); D - ovariectomizado e tratado com raloxifeno (GIV); E - ovariectomizado e tratado com extrato de soja rico em genisteína (GV); F - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com extrato de soja rico em genisteína (GVI); G - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com raloxifeno (GVII). Aumento de 400x. A seta indica a marcação de colágeno III que geralmente encontra-se ao redor dos vasos e entre o colágeno I; H - O gráfico mostra a porcentagem de colágeno III nas trabéculas ósseas (* $p < 0,05$), comparada ao grupo castrado (GII).

5.5 Quantificação da osteocalcina por imunoistoquímica

A figura 9 mostra a osteocalcina presente no osso. Observa-se que o grupo tratado com RLX (GIV) (Figura 9 H), mostrou aumento significativo da expressão desta proteína em relação aos outros grupos ($p < 0,001$). Não houve diferenças significantes entre os demais grupos ($p > 0,05$).

Figura 9 - Fotomicrografias de imunohistoquímica da osteocalcina, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo: A - grupo controle (GI); B - ovariectomizado (GII); C - ovariectomizado e tratado com estrogênio (GIII); D - ovariectomizado e tratado com raloxifeno (GIV); E - ovariectomizado e tratado com extrato de soja rico em genisteína (GV); F - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com extrato de soja rico em genisteína (GVI); G - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com raloxifeno (GVII). A seta indica a marcação com osteocalcina. H - O gráfico mostra a quantidade de osteocalcina (* $p < 0,001$), comparado ao grupo castrado (GII).

5.6 Quantificação da osteopontina por imunoistoquímica

Em relação à osteopontina (Figura 10), pode-se observar que houve diminuição significativa desta proteína em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle e ao PLG (Figura 10 H), com $p < 0,05$.

Figura 10 - Fotomicrografias de imunoistoquímica da osteopontina, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo: A - grupo controle (GI); B - ovariectomizado (GII); C - ovariectomizado e tratado com estrogênio (GIII); D - ovariectomizado e tratado com raloxifeno (GIV); E - ovariectomizado e tratado com extrato de soja rico em genisteína (GV); F - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com extrato de soja rico em genisteína (GVI); G - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com raloxifeno (GVII). A seta indica a marcação com osteopontina. H - O gráfico mostra a quantidade de osteopontina (* $p < 0,05$), comparada ao grupo castrado (GII).

5.7 Quantificação da osteoprotegerina por imunoistoquímica

Em relação à proteína osteoprotegerina (Figura 11), observa-se menor expressão no grupo PLG em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$). Em todos os grupos tratados houve aumento desta proteína, exceto o grupo tratado com RLX, porém, o que mais se assemelhou ao grupo controle foi o grupo ECE+RLX (Figura 11 H).

Figura 11 - Fotomicrografias de imunoistoquímica da osteoprotegerina, mostrando parte da diáfise de ratas pertencentes aos vários grupos de estudo: A - grupo controle (GI); B - ovariectomizado (GII); C - ovariectomizado e tratado com estrogênio (GIII); D - ovariectomizado e tratado com raloxifeno (GIV); E - ovariectomizado e tratado com extrato de soja rico em genisteína (GV); F - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com extrato de soja rico em genisteína (GVI); G - ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com raloxifeno (GVII). A seta indica a marcação com osteoprotegerina. H - O gráfico mostra, a quantidade de osteoprotegerina (* $p < 0,01$), comparada ao grupo castrado (GII).

5. Quantificação do colágeno, OPN, OCN e OPG por PCR em tempo real

Não houve diferenças significantes no número de transcritos das proteínas estudadas em todos os grupos (Figura 12 – A,B,C e D), com $p < 0,05$.

Figura 12 – Gráficos da Expressão relativa (RQ) do colágeno (A), osteocalcina (B), osteopontina (C) e osteoprotegerina (D) dos grupos: Grupo controle (GI); ovariectomizado (GII); ovariectomizado e tratado com estrogênio (GIII); ovariectomizado e tratado com raloxifeno (GIV); ovariectomizado e tratado com extrato de soja rico em genisteína (GV); ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com extrato de soja rico em genisteína (GVI); ovariectomizado e tratado com estrogênio combinado com raloxifeno (GVII).

6 DISCUSSÃO

O sistema ósseo é um tecido metabolicamente ativo, submetido a contínuo processo de renovação óssea. O hipoestrogenismo pode ocasionar alterações nos diferentes sistemas da mulher, incluindo o ósseo, resultando em perda da massa mineral óssea em ritmo variável, podendo culminar em osteoporose , e eventuais fraturas. Esta situação pode trazer conseqüências negativas à saúde da mulher, tornando-se grave problema em todo o mundo (Bagnoli *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, avaliamos fármacos que agem sobre o metabolismo ósseo em modelo animal desenvolvido em nosso laboratório.

A ministração de testosterona no nono dia de vida aumenta a massa muscular e óssea dos animais, facilitando a avaliação de perda e/ou formação óssea após castração e ministração de fármacos que atuam na cinética do osso (Tamura *et al.*, 2005).

Apesar de existirem evidências de que o estrogênio, o raloxifeno e o extrato de soja enriquecido com genisteína são capazes de melhorar as modificações ósseas causadas pelo hipoestrogenismo, bem como a quantidade de trabéculas ósseas em ratas ovariectomizadas, nosso estudo mostrou que houve efeito positivo na associação do estrogênio ao raloxifeno na qualidade do tecido ósseo de ratas castradas. Contudo, o extrato de soja rico em genisteína associado ao estrogênio não teve ação benéfica detectável no tecido ósseo, pelo contrário, piorou a qualidade óssea de ratas adultas castradas. Deve-se salientar que alguns estudos

também sugerem que este fármaco não seria eficaz na manutenção da massa óssea após a ovariectomia em animais, nem em mulheres na pós-menopausa (Weaver *et al.*, 2005).

Os mecanismos de ação do estrogênio sobre o tecido ósseo não estão completamente elucidados, apesar de algumas vias de ação desse hormônio já serem bem conhecidas. A administração de 17β -benzoato de estradiol inibe a formação e a atividade dos osteoclastos e, possivelmente, estimula a sua desintegração, ocasionando a redução do número dessas células (Liu *et al.* 1991; Hughes *et al.*, 1996). Em nosso estudo, o grupo tratado com estrogênio isoladamente foi o que teve melhor resposta à diminuição de perda óssea, comparado aos outros medicamentos utilizados isoladamente ou associados ao próprio estrogênio. Este dado corrobora os de Faloni *et al.* (2007), que observaram que, no osso alveolar de ratas tratadas com estrogênio, houve diminuição do número de osteoclastos. Além disto, estas células exibem sinais de apoptose (morte celular programada) em grande número (Faloni *et al.*, 2007). Portanto, em ratas tratadas com estrogênio, a apoptose deve ser responsável, pelo menos em parte, pela redução do número de osteoclastos e conseqüentemente pela diminuição da reabsorção óssea. Além disso, outros dados que correspondem à ação do estrogênio no osso, descritos logo a seguir, podem explicar este achado em nosso trabalho.

Evidências mostram que o estrogênio atua sobre os monócitos promovendo redução dos níveis de IL-1 (Interleucina-1) e TNF- α (Fator- α de necrose tumoral). IL-1 e TNF- α estimulam a produção de outras citocinas, como IL-6 (Interleucina-6), M-CSF (Fator estimulador de colônia de macrófagos) e GM-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos), que promovem a fusão de células

precursoras de osteoclastos. Assim, o estrogênio inibe a formação de osteoclastos (Paccifici, 1996).

O estrogênio também atua sobre as células T, visto que ocorre aumento da produção de TNF- α por essas células após a ovariectomia. Ao se ligar ao receptor p55-TNF- α , o TNF- α induz a liberação de M-CSF e RANKL (ligante do Receptor ativador de fator nuclear- κ B), fatores que promovem a fusão dos progenitores de osteoclastos (Cenci *et al.*, 2000).

A redução dos níveis de TNF- α e IL-1, que ocorre devido à ação do estrogênio sobre células T e monócitos, também inibe a atividade dos osteoclastos. Esta inibição pode ocorrer indiretamente, via ação primária em osteoblastos e/ou diretamente, por meio de efeito primário em osteoclastos (Paccifici, 1996).

A inibição da atividade do osteoclasto pelo estrogênio está relacionada à inibição de proteases associadas à degradação óssea. Assim, o estrogênio impede a degradação da matriz óssea ao atuar sobre a catepsina K e a MMP-9 (metaloproteinase-9), proteases produzidas por osteoclastos (Parika *et al.*, 2001). Assim, o estrogênio age na reabsorção óssea.

A atividade dos osteoclastos está relacionada à existência de interação com os osteócitos (Gu *et al.*, 2005). Como células que residem no interior de lacunas ósseas, os osteócitos exibem prolongamentos citoplasmáticos que os conectam aos osteócitos adjacentes e às demais células ósseas. Essa rede de células interconectadas permite o intercâmbio de diversas moléculas entre o tecido ósseo e o meio externo, contribuindo para a manutenção da homeostase óssea (Aardem *et al.*, 1995). Portanto, a apoptose dos osteócitos pode constituir em fator quimiotático de osteoclastos, além de estimular sua atividade reabsortiva (Gu *et al.*, 2005). Desta forma, a deficiência estrogênica, que promove a morte dos osteócitos (Tomkinson,

1998), talvez leve ao aumento do recrutamento e da atividade dos osteoclastos, células que degradam o tecido ósseo e fagocitam os osteócitos em apoptose. Essa idéia é reforçada por estudos que mostraram osteócitos, osteoblastos e/ou células de revestimento ósseo em apoptose sendo fagocitados por osteoclastos (Boabaid *et al.*, 2001; Cerri *et al.*, 2003). Talvez este seja o principal mecanismo de ação do estrogênio no osso.

Além dos mecanismos anteriormente mencionados, há outro pelo qual o estrogênio também inibe a reabsorção óssea, pela via RANK/RANKL/OPG (Receptor ativador de fator nuclear- κ B/ligante de RANK/ Osteoprotegerina), relacionada à formação de osteoclastos. Ao agir sobre células mesenquimais osteoprogenitoras/osteoblastos, o estrogênio promove redução dos níveis de RANKL – ligante de RANK – e aumento da produção de OPG – competidor de RANK (Lakatos, 2011). Assim, a OPG, que apresenta níveis aumentados liga-se ao RANKL e impede a interação deste com o RANK (presente em precursores de osteoclastos), inibindo, conseqüentemente, a fusão dos precursores de osteoclastos (Väänänen *et al.*, 2005; Kanzaki *et al.*, 2006). Contudo, em nosso estudo, a expressão do RNA mensageiro não foi diferente entre os animais castrados que receberam o veículo em comparação aos que receberam os fármacos. Possivelmente, esta ação não ocorreu em nosso modelo experimental.

A presença de receptores para estrogênio (RE) foi demonstrada em osteoblastos e osteócitos (Bonnelye *et al.*, 2002). Além de atuar sobre os osteoblastos estimulando a síntese de matriz óssea, o estrogênio também induz essas células a produzirem e liberarem fatores como, por exemplo, o TGF- β (Fator de transformação de crescimento- β). Esses fatores atuam paracrinamente sobre os osteoclastos (Ousler *et al.*, 1991), estimulando sua morte e inibindo a reabsorção

óssea. A ação parácrina entre osteoblastos e osteoclastos é considerada a principal via de diminuição da formação e/ou da atividade dos osteoclastos e, conseqüentemente, de controle da remodelação óssea. Porém, alguns autores têm demonstrado que o estrogênio pode agir diretamente sobre os osteoclastos (Hainey *et al.*, 2000). *In vitro*, observou-se apoptose em osteoclastos tratados com 17 β -estradiol, sugerindo que o estrogênio pode agir diretamente sobre essas células. Além disso, a presença de receptores α (RE α) e β (RE β) para estrogênio foi demonstrada em osteoclastos (Ousler *et al.*, 1991).

De acordo com os dados da literatura, fica claro que o estrogênio inibe a reabsorção óssea. A ação do estrogênio sobre os osteoclastos ocorre por diversas vias. Assim, diante da deficiência estrogênica, ocorre aumento na formação e na ação de osteoclastos, bem como aumento no tempo de sobrevivência dessas células, o que leva ao incremento do número e da atividade reabsortiva dos osteoclastos. Ainda a síntese de matriz óssea pelos osteoblastos é diminuída. Desse modo, esses eventos culminam no desequilíbrio da remodelação óssea, havendo maior reabsorção em relação à formação, o que resulta em perda de massa óssea (Manolagas *et al.*, 2000), bem como em desarranjo na microarquitetura óssea visto em nosso experimento, ao compararmos os animais ovariectomizados com o controle fisiológico.

O raloxifeno tem efeitos agonistas e antagonistas de forma seletiva nos tecidos. Este fármaco exerce afinidade pelo receptor de estrogênio semelhante ao 17 β -estradiol (McDonnell *et al.*, 1995). Múltiplos receptores de estrogênio e vias pós-receptores com diferentes cofatores protéicos seriam responsáveis por pelo menos parte da atividade seletiva (Lufkin *et al.*, 1998). Alguns estudos sugerem que o raloxifeno é capaz de estimular as vias estrogênicas pelo receptor β , mas não é

capaz de ativar via receptor α , podendo ser um dos mecanismos pelos quais este fármaco exerce ação diferencial nos tecidos. (Bryant e Dodge., 1998). Sua ação isolada foi benéfica ao osso, em nossa pesquisa, porém, a associação ao estrogênio, não trouxe benefícios ao osso de ratas ovariectomizadas. Esta resposta pode ser explicada por possível disputa destes medicamentos pelo receptor estrogênico tipo β , ou redução do receptor de estrogênio (“down regulation”) pela ação dos fármacos conjuntamente (Kuhnle *et al.*, 2011) visto que em alguns trabalhos, o raloxifeno é mais eficaz em tecido ósseo rico em receptor de estrogênio, como as vértebras da coluna, porém, sem grande eficiência em outros ossos com menor quantidade de receptor estrogênico (Martin e Correa, 2010).

O receptor de estrogênio possui múltiplas funções ativadoras transcricionais (sítios AF-1 e AF-2) que contribuem para alguns dos efeitos seletivos do raloxifeno. Assim, diferentes conformações do receptor induzidas pelos ligantes podem ser responsáveis pelo amplo efeito farmacológico dos vários SERMs. Como resultado de uma conformação própria receptor-raloxifeno, este complexo liga-se a sequências do DNA distintas no elemento de resposta estrogênica em tecidos onde o raloxifeno exerce efeitos agonistas ao estrogênio. Baseado na estrutura cristalográfica dos complexos formados por raloxifeno e 17β - estradiol com domínio de ligação do receptor, evidenciou-se que os dois compostos ligam-se no mesmo sítio, porém, exibem diferentes modos de ligação e induzem alterações conformacionais distintas no domínio de transativação, evidenciando uma base molecular para diferentes ações (Brzozowski *et al.*, 1997). Este, talvez, seja outro motivo pelo qual a combinação do estrogênio com o raloxifeno não foi eficiente como os mesmos isolados, uma vez que há diferentes alterações conformacionais no domínio de transativação do receptor para os dois fármacos.

Nas fibras de colágenas, tanto a ação do estrogênio quanto do raloxifeno, se faz na síntese pelos osteoblastos destas substâncias que aumentam a matriz óssea, resultando em melhor qualidade óssea (Viguet-Carrin *et al.*, 2006).

A genisteína possui conformação parecida com a molécula do estrogênio conjugado. Por esse motivo, estudos sugerem que possa suprimir a reabsorção óssea pelos osteoclastos pela diferenciação, prevenindo a reabsorção, bem como, promovendo a formação óssea por ação dos osteoblastos. Isto pode acontecer pela ligação desta molécula ao receptor de estrogênio do tipo β . Os fitoestrogênios ligam-se aos receptores de estrogênio, exercendo ação estrogênica ou antiestrogênica, dependendo do nível sérico de hormônios sexuais. Estudos mostram que este efeito estrogênico fraco pode exercer efeito agonista e antagonista no organismo, pois há competição com os estrogênios circulantes pelo mesmo receptor. Este fato poderia justificar, em parte, o resultado que obtivemos com a associação de estrogênios conjugados com extrato de soja rico em genisteína, resultando em ganho menor de massa óssea nas ratas ovariectomizadas em comparação com o estrogênio isoladamente.

A diminuição da massa mineral óssea induzida pela ovariectomia foi confirmada com os nossos dados em relação à literatura (Marcondes *et al.*, 2002). Além disso, os resultados obtidos com o emprego isoladamente do estrogênio conjugado, do raloxifeno ou do extrato de soja rico em genisteína, bem como a associação entre eles, na tíbia de ratas ovariectomizadas, trouxeram novas informações a respeito da ação destes medicamentos na fisiologia óssea, principalmente, que a ação da combinação dos fármacos não traria benefício adicionais à massa mineral óssea.

A análise histomorfométrica mostrou que os tratamentos com estrogênio, raloxifeno e extrato de soja rico em genisteína promoveram aumento da quantidade trabecular, corroborando com outros estudos da literatura (Fanti, *et al.*, 1998; Chung, 2011; Levis, 2011). Esses dados sugerem que todos os tratamentos elevariam a quantidade trabecular de forma adequada. Neste ponto, os fármacos foram semelhantes, com discreta melhora com a associação entre estrogênio e extrato de soja. Contudo, este parâmetro não é o único que pode ser mensurado na histomorfometria, para melhor para indicar a qualidade óssea após ovariectomia (Parffit *et al.*, 1987). Isto pode justificar o motivo da associação com a genisteína ter este efeito positivo no osso. Este fato parece controverso. Por isso, outras análises foram necessárias e não identificaram este benefício na qualidade e na quantidade de colágeno no osso das ratas castradas.

No tecido ósseo existe relação complexa entre o colágeno e os minerais de hidroxiapatita, que são fundamentais para a integridade óssea (Junqueira e Carneiro, 2004). Alterações das propriedades e da disposição do colágeno podem influenciar na disposição dos minerais, afetando a mecânica óssea. Hoje, ainda não há dados suficientes que possam explicar a ligação entre os diferentes tipos de colágeno e os minerais e sua contribuição para as propriedades mecânicas do osso. A taxa de renovação do colágeno ósseo parece ser importante para a determinação da resistência do osso. Na osteoporose da pós-menopausa, há evidências de que a fração de volume de mineral e as quantidades relativas de ligações cruzadas de colágeno maduro e imaturo são afetadas pela taxa de renovação dos tecidos, contribuindo assim para a fragilidade óssea, pois a extensão e a natureza da interação com colágeno são importantes contribuintes para a qualidade da matriz óssea. Em nosso estudo, pudemos observar que o estrogênio, o raloxifeno e o

extrato de soja rico em genisteína, quando utilizados isolados ou combinados, alteraram a composição e distribuição de colágeno no osso de ratas ovariectomizadas. Contudo, a associação dos fármacos não melhorou a qualidade e a quantidade do colágeno como quando essas substâncias quando foram empregadas isoladamente. Outros experimentos sugerem que a associação destas substâncias pode modificar a ativação do receptor de estrogênio (Gendimenic, *et al.*, 2002). No presente estudo, objetivou-se verificar se a adição de genisteína aos estrogênios conjugados equinos ou ao raloxifeno alterou o efeito desses fármacos sobre o osso, ou mais precisamente, as fibras de colágeno, a partir do ponto de vista morfológico.

Há vários estudos feitos sobre o ganho de massa óssea e da estrutura do colágeno ósseo em animais tratados com estrogênios conjugados eqüinos, raloxifeno e extrato de soja rico em genisteína, isoladamente. Ainda assim, não há consenso sobre o melhor tratamento capaz de melhorar a qualidade óssea e diminuir o risco de fratura com mínimos efeitos colaterais (Reinwald *et al.*, 2010), nem as vantagens e desvantagens sobre a ação dos fármacos. Há mais evidência dos efeitos dos estrogênios conjugados equinos e do raloxifeno sobre a manutenção da massa óssea do que com o extrato de soja em osteoporose na pós-menopausa (Yoles *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* mostram que o estradiol, o raloxifeno e a genisteína afetam a fisiologia do osso de forma semelhante pela ação nos osteoclastos, diminuindo a proporção de RNA mensageiro de RANKL e osteoprotegerina. Contudo, estes aspectos não conseguiram ser avaliados em nosso estudo. Outros estudos também falharam em reproduzir *in vivo* os achados em cultura de células (Carrin *et al.*, 2006).

A histomorfometria mostrou-nos que, independentemente, dos tratamentos

que foram ministrado, a quantidade de osso trabecular aumentou expressivamente nos animais que receberam estrogênios conjugados eqüinos em relação aos outros grupos e menos que o controle fisiológico. Esta informação por si só, não sugere redução da fragilidade óssea no grupo com estrogênio. No entanto, dado o aumento da espessura trabecular e os sinais de recuperação da atividade trabecular neste grupo, pode-se dizer que houve melhora na qualidade óssea. Além disso, também observamos melhor qualidade óssea no grupo que recebeu raloxifeno em comparação aos outros grupos tratados, em especial, com a associação hormonal e no que recebeu apenas o veículo.

O colágeno é importante no estudo da qualidade e da resistência óssea (Rizk *et al.*, 2008). O colágeno tipo I pode ser encontrado em abundância no osso e está incluído no grupo de fibras colágenas espessas. O colágeno tipo III pertence ao grupo de fibras finas, localiza-se entre as fibras grossas no osso cortical e está concentrado, sobretudo, no canal de Havers (Junqueira e Carneiro, 2004). Após a ovariectomia, há mudança na proporção destes tipos de fibras com aumento na quantidade de colágeno tipo III e diminuição considerável no colágeno tipo I. Alguns autores acreditam que essa mudança pode apontar para maior fragilidade óssea (Rizk *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, a análise imunoistoquímica mostrou aumento no colágeno tipo I em todos os grupos tratados, mas não no não tratado. O colágeno tipo III se elevou nos grupos tratados com raloxifeno, extrato de soja rico em genisteína e nos com combinação com estrogênio conjugado eqüino, em comparação aos animais sem castração (controle fisiológico). Estes dados sugerem que há aumento da fragilidade óssea quando esses fármacos são utilizados isoladamente ou, mais ainda, quando combinados. Alguns autores observaram que o extrato de soja rico

em genisteína e o raloxifeno aumentam a expressão de colágeno tipo I e seu RNA mensageiro (Hara *et al.*, 2007). Este estudo reforça a ação dessas substâncias na matriz óssea, particularmente no colágeno.

Finalmente, a terapia hormonal pode afetar a proporção dos vários tipos de colágeno no osso. As correlações encontradas entre a terapia hormonal e os tipos I e III de colágeno aumentam a qualidade óssea, quando todos os grupos de tratamento são comparados com o grupo controle. No entanto, dado que o colágeno tipo III é uma fibra mais fina de colágeno, o seu aumento, possivelmente, indica a fragilidade do tecido e, portanto, maior risco de fratura. Estrogênio conjugado eqüino sozinho é, sem dúvida, o melhor agente para o osso. O uso combinado de estrogênios conjugados eqüinos e raloxifeno ou genisteína de soja rica em extrato não parecem melhorar ou reduzir a qualidade óssea após ooforectomia.

A osteoprotegerina é proteína solúvel, que se liga ao RANK, impedindo a associação do RANK-L ao RANK, sendo considerada potente inibidora da osteoclastogênese e da atividade osteoclástica (Väänänen *et al.*, 2005; Kanzaki *et al.*, 2006), reduzindo a atividade do osteoclasto. Com relação à OPG, observamos que o grupo que mais se destacou na sua produção foi o que recebeu a combinação de estrogênio com raloxifeno. Este achado vai contra outros resultados presentes neste estudo, onde este mesmo grupo possui tendência ao aumento quantidade de fibras finas de colágeno, podendo indicar ter, portanto, maior fragilidade óssea. Possivelmente, neste grupo houve redução da reabsorção óssea sem aumentar a formação de colágeno. Por este aspecto, a qualidade óssea não seria melhor com esta combinação como com o estrogênio isoladamente.

A osteocalcina esteve presente em maior quantidade no grupo tratado com

raloxifeno. Essa proteína é sintetizada quase que exclusivamente por osteoblastos durante os últimos estágios de diferenciação e durante o início da mineralização da matriz extracelular do tecido ósseo (Hara *et al.*, 2007). Estes dados corroboram os de Mehl (2002), que encontrou alta concentração de osteocalcina em pacientes com alto e baixo grau de osteoporose tratados com raloxifeno. Contudo, este aumento não se refletiu na histomorfologia óssea.

Em seguida, investigamos a osteopontina, fosfoproteína ácida de 34 KDa, que foi originalmente secretada como um dos maiores componentes da matriz óssea não colagenosa expressa por osteoblastos e osteoclastos. Ela está intimamente associada com o remodelamento e a força óssea. Seu papel funcional está relacionado com a homeostase óssea (Chang *et al.*, 2010). Além disso, esta proteína está envolvida nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular durante a proliferação e migração celular. Seu progressivo aumento incrementa a quantidade de fosfatase alcalina e osteocalcina no tecido ósseo. A expressão de RNAm da osteopontina promove a diferenciação de três grupos celulares distintos: estroma/células osteoblastos *like*, osteoclastos *like* e macrófagos *like* (Yamate, 1998). Estudos sugerem que a perda da função ovariana promove o aumento da diferenciação de células da medula óssea, assim com um aumento da expressão da osteopontina. No nosso estudo, a osteopontina esteve diminuída de forma significativa em todos os grupos tratados, exceto no com estrogênio, em que houve apenas tendência à diminuição desta proteína. Este resultado justificaria a melhora na qualidade óssea, proporcionada pelo estrogênio isoladamente.

Em suma, baseado nos nossos resultados, a combinação de estrogênio com raloxifeno ou extrato de soja rico em genisteína não trouxe benefícios adicionais na qualidade do tecido ósseo como verificado com os fármacos isoladamente.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados permitiram concluir que:

- Os animais tratados com estrogênio, raloxifeno e extrato de soja enriquecido com genisteína, isolados ou associados, tiveram aumento da massa e da quantidade de trabéculas ósseas;
- O grupo que recebeu estrogênios isoladamente apresentou maior quantidade de colágeno tipo I e de fibras totais, com menor proporção de fibras finas de colágeno, em comparação aos outros grupos. Nos animais tratados com estrogênio associado ao raloxifeno notou-se maior quantidade de fibras de colágeno tipo I em relação ao que recebeu estrogênio associado ao extrato de soja rico em genisteína, comparado ao grupo castrado;
- Em relação às proteínas não colagenosas, a osteoprotegerina mostrou-se aumentada no grupo que recebeu estrogênio, extrato de soja rico em genisteína e as combinações de estrogênio com raloxifeno ou extrato de soja. Quanto à osteopontina, registrou-se quantidade diminuída em todos os grupos tratados, enquanto a osteocalcina estava aumentada no grupo tratado apenas com raloxifeno;
- Em relação à análise por PCR em tempo real, não houve diferenças significantes em nenhum dos grupos tanto para o colágeno tipo I quanto para as proteínas não colagenosas.

8 ANEXO

Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 20.06.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0421/07**, intitulado: **"EFEITOS DO ESTROGÊNIO, DO RALOXIFENO E DAS ISOFLAVONAS SOBRE O OSSO DE RATAS ADULTAS PREVIAMENTE ANDROGENIZADAS"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Edmund Chada Baracat**
Pesquisador (a) Executante: **Fernanda Lopes de Freitas**

CAPPesq, 20 de junho de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesa@hcnet.usp.br / secretariacappesa2@hcnet.usp.br
sol

9 REFERÊNCIAS

Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 1994;55:287-99.

Albertazzi P. Purified phytoestrogens in postmenopausal bone health: is there a role for genistein? *Climacteric.* 2002;5:190-6.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997;390:175-9.

Anderson JJB, Ambrose W, Gamer SC. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc. Soc Exp, Biol Méd.* 1998; 217:345-350

Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amim D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja Sc. Dietary soybean protein prevents bone loss in ovariectomized rats. *Ann Nutr.* 1996;126:161-7.

Bagnoli VR, Fonseca AM, Halbe HW, Pinotti JA. Climatério: Terapêutica não hormonal. 1 ed. São Paulo: Editora Roca; 2005.

Baracat EC, Simões MJ, Soares Jr JM, Dardes RC, Silva I, Ohashi EI. Standardization of the dose-effect of oral estrogens and progestogens in adult rats. *Menopause.* 1998; 5:263-265.

Baracat EC, Simões MJ, Soares Jr JM, Haidar MA, Rodrigues de Lima G. Determination of physiological doses of oral conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate in adult oophorectomized rats. *Climacteric.* 1999; 2:198.

Baracat EC, Soares Jr JM, Haidar MA, Rodrigues de Lima G. Aspectos Reprodutivos no Climatério. In Farnades CE. *Consenso brasileiro multidisciplinar de assistência à saúde da mulher climatérica*. 2003; 251-253.

Baron R. General principles of bone biology. In: Favus MJ. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 5a. ed. Washington: Primer; 2003. p1-8.

Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue Cell*. 2001;33:318-25.

Bohic S, Rey C, Legrand A, Sfihi H, Rohanizadeh R, Martel C, Barbier A, Daculsi G. Characterization of the trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. *Bone*. 2000; 26: 341-348.

Bonnelye E, Kung V, Laplace C, Galson DL, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor α impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology*. 2002;143:3658-70.

Bryant HU, Dodge JA, Sato M, Glasebrook AL. Comparative pharmacological profiles for a spectrum of estrogen receptor active agents in ovariectomized rats. *Osteoporosis Int*. 1996; 6:233-6.

Bryant HU, Dere WH. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *P.S.E.B.M*. 1998;217:45-52.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997;389:753-8

Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. *Journal of biomechanics*. 2003;36:1453-9.

Cai DJ, Zhao Y, Glasier J, Cullen D, Barnes S, Turner CH, Wastney M., Weaver C. Comparative effect of soy protein, soy isoflavones, and 17β -estradiol on bone

metabolism in adult ovariectomized rats. *Journal of bone mineral research*. 2005; 20: 828-839

Carrin VS; Garnero P; Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*. 2006; 17: 319-336

Cenci S, Toraldo G, Weitzmann MN, Roggia C, Gao YH, Qian WP, Sierra O, Pacifici R. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN γ - induced class II transactivator. *Proc Natl Acad Sci*. 2003; 100:10405–10410.

Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J Clin Invest*. 2000;106:1229-37.

Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res*. 2003;38:223-6.

Chang IC. Chiang TI, Yeh HL. Cheng YW. Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteoporos Int* 2010; 21:1401–1409

Choi EM, Suh KS, Kim YS, RyoWon C, Sung Ja K. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3–E1 cells. *Phytochemistry*. 2001;56:733–9.

Chung YE, Lee SH, Lee SY, Kim SY, Kim HH, Mirza ES. Long-term treatment with raloxifene, but not bisphosphonates, reduces circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2011.56-59

Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal American Society of the Nephrology*. 2008, 3: S131-S139.

Compston J. Bone Quality: What is it and How is it Measured? *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50:579-585)

Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473:147-60.

Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster J, Draper M Christiansen C. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentration and uterine endometrium in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med*. 1997; 337: 1641-7.

Draper CR, Edel MJ, Dick IM. Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats. *J Nutr* .1997;127:1795–9.

Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 2010; 11:219–227.

Erviti J. Drugs prescription for osteoporosis. *An Sist Sanit Navar*. 2003; 26:107-21

Evans G, Bryant HU, Magee D, Sato M, Turner RT. The effects of raloxifene on tibia histomorphometry in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1994;134:2283-8.

Fitzpatrick LA. Phytoestrogens – Mechanism of action and effect of bone markers and bone mineral density. *Endocrinol Metab. Clin. Nort. Am*. 2003, Mar; 32: 233-52.

Faloni APS, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res*. 2007;42:193-201.

Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, et al. The Phytoestrogen Genistein Reduces Bone Loss in Short-Term Ovariectomized Rats. *Osteoporos Int*. 1998; 8:274–281

Fontana A, Delmas, PD. Selective estrogens receptors moduladors in the prevention and treatment of postmenopausa osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003;32:219-32.

Fonseca TL. Interação do sistema nervosa simpático com o hormônio tireoidiano na regulação da massa e metabolismo ósseos (tese). Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2009.

Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006;235:176-90.

Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S. Estrogen activates cyclindependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 299:222–228.

Gao YH, Qian WP, Dark K, Toraldo G, Lin ASP, Guldberg RE, Flavell RA, Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:16618–16623.

Geddes AD, Bilezikians JP, Raisz LG, Rodan GA. Animal models of bone disease. *In: Principals of Bone Biology*. San Diego: Academic Press; 1996: 1343-1354.

Gendimenico GJ, Mack JM, Siock PA, Mezick JÁ. Topical estrogens: their effects on connective tissue synthesis in hairless mouse skin. *Arch Dermatol Res*; 2002: 294 231–236

Gilbert SF, ed. *Developmental biology*. Sunderland: Sinauer Associates; 2006.

Graaf VD. *Anatomia Humana*. São Paulo: Manole; 2003.

Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M. For the HEARS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HEARS II). *JAMA*. 2002; 288: 49-57.

Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J Bone Miner Res*. 1997; 12:2098-2107.

Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 1999;140:5339–5347.

Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335:1095-101.

Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders P, Hoyland JA, Braidman IP. Oestrogen receptor beta in vivo in osteoclasts and other bone cells of adult men and women. *J Bone Miner Res*. 2000;15:1217.

Han K, Soares Jr JM, Haidar MA, Lima GR, Baracat EC. Benefits of soy ESGflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol*. 2002; 99: 389-94.

Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y. Influence of bone osteocalcin levels on bone loss induced by ovariectomy in rats. *J Bone Miner Metab*; 2007 25:345–353.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med*. 1996;2:1132-6.

Herrington DM, Vittinghoff E, Howard TD, Major DA, Owen J, Reboussin DM. Factor V Leiden, hormone replacement therapy, and risk of venous thromboembolic events in women with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 1012-7.

Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Takao K, Kato S. Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Metab*, 2009; 27:127–130

JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004

Kanzaki H, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Therapy*. 2006;13:678-85.

Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*. 1989;124: 7-16.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991;15: 175-191.

Kim YH, Lee YS, Choi EM. Linarin isolated from *Buddleja officinalis* prevents hydrogen peroxide-induced dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cell Immunol.* 2011;268:112-6.

Kuhnle GG, Ward HA, Vogiatzoglou A, Luben RN, Mulligan A, Wareham NJ, Forouhi NG, Khaw KT Association between dietary phyto-oestrogens and bone density in men and postmenopausal women. *Br J Nutr.* 2011;17:1-7

Kumar V, Green S, Stack G, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* 1987; 51: 941-51.

Lakatos P. Pharmacologic treatment of osteoporosis 2011. *Orv Hetil.* 2011;152:1320-1326.

Lee YS, Chen X, Anderson JJB. Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3–E1 osteoblast-like cells. *Nutr Res.* 2001;21:1287–1298.

Levis S, Strickman-Stein N, Ganjei-Azar P, Xu P, Doerge DR, Krischer J. Soy Isoflavones in the Prevention of Menopausal Bone Loss and Menopausal Symptoms. *American Medical Association.* 2011: 1363-1369.

Li Y, Mi C. Proliferation inhibition and apoptosis onset in human ovarian carcinoma cell line SKOV3 induced by genistein. *Ai Zheng.* 2003; 22: 586-91.

Liu CC, Howard GA. Bone-cell changes in estrogen-induced bone-mass, increase in mice: dissociation of osteoclasts from bone surfaces. *Anat Rec.* 1991;229:240 50.

Lima GR, Girão MJBC, Baracat EC. Ginecologia. 1º ed. Barueri. Ed. Manole, 2009. 980p

Lufkin EG, Whitaker MD, Nickelsen T, Argueta R, Caplan RH, Knickerbocker RK. Treatment of established postmenopausal osteoporosis with raloxifene: a randomized trial. *J Bone Miner Res*. 1998;13:1747-54.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000; 21:115-37.

Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL. For the Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2003; 349: 523-34.

Marcinkowska M, Wawrzyniak A, Horst-Sikorska W. Następstwa osteoporotycznego złamania kości. *Przegląd menopauzalny*. 2006; 4: 228-230.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62:609-14.

Martin RM, Correa PHS. Bone quality and osteoporosis therapy. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010;54-52

McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME, Pike JW. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol*. 1995;9:659-69

MEDES – Institut de Médecine et de Physiologie Spatiales. Figura disponível em: <http://medes.fr/Eristo/Osteoporosis/BonePhysiology.html>

Mehl B, Delling G, Schlindwein I, Heilmann P, Voia C, Ziegler R, Nawroth P, Kasperk C. Do markers of bone metabolism reflect the presence of a high- or low-turnover state of bone metabolism? *Med Klin*. 2002;97:588-94.

Menton DN, Simmons DJ, Orr BY, Plurad SB. A cellular investment of bone marrow. *Anat Rec*. 1982;203(1):157-64.

Michalany J. Patologia cirúrgica e técnica histológica. Papel do cirurgião e da enfermagem. 1.ed. São Paulo, Ed. Pedagógica e Universitário; 1980.

Montagnani A, Gonnelli S, Alessandri M, Nuti R. Osteoporosis and risk of fracture in patients with diabetes: an update. *Agin Clin Exp Res*. 2011; 23: 84-90.

Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1904-12.

Moraes AVC, Simões RS, Fonzar LF, Simões MJ, Soares JM, Haidar MA, Baracat EC. Efeitos da terapia estro-raloxifeno sobre o endométrio de ratas. *RBGO*. 2006; 28:101-106.

Mosquette R, Simões MJ, Soares Jr JM, Simões RS, Guerreiro da Silva IDC, Carvalho AM, Baracat EC. Mecanismos moleculares e efeitos das extrato de soja rico em genisteína em mulheres. *Arq Bras Fitomed Cient*. 2004a; 2:21-29.

Mosquette R, Soares Jr JM, Simões MJ, Carvalho AM, Simões RS, Baracat EC. Ação do exercício físico na saúde óssea da mulher. *Rev Bras Clin Terap*. 2004b; 30:52-56.

Mosquette R, de Jesus Simões M, da Silva ID, Oshima CT, Oliveira-Filho RM, Haidar MA, Simões RS, Baracat EC, Soares Júnior JM. The effects of soy extract on the uterus of castrated adult rats. *Maturitas*. 2007;56:173-183.

Mysliwiec J, Zbucki R, Nikolajuk A, Mysliwiec P, Kaminski K, Bondyra Z, Dadan J, Gorska M, Winnicka MM. Estrogens modulate RANKL-RANK/osteoprotegerin mediated interleukin-6 effect on thyrotoxicosis-related bone turnover in mice. *Horm Metab Res*. 2011; 43:236-40.

Noble BS. The osteocyte lineage. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473:106-11.

Notelovitz M. Overview of bone mineral density in postmenopausal women. *J Reprod Med.* 2002; 47: 71-81.

Okamoto F, Okabe K, Kajiya H. Genistein, a soybean ESGflavone, inhibits inward rectifier K⁺ channels in rat osteoclasts. *Jpn J Physiol.* 2001;51:501–9.

Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology.* 2002; 143:2349–2356.

Ousler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology.* 1991;129:3313-20.

Paccifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1043-8.

Parikka V, Lehenkari P, Sassi ML, Halleen J, Risteli J, Härkönen P, et al. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology.* 2001;142:5371-8.

Parffit AM, Drezner M K, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2:595-610.

Pavon SJ, Zanchetta JR. Osteoporosis – Biblioteca Médica Digital (BMD), Buenos Aires. Data Visión S.A. (s.d.) CD-ROOM, 2003

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29:45.

Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco M J, Barlet, JP e Coxam, V. Soybean isoflavones dosedependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J. Nutr.* 2001; 131: 723-728

Piovesan AC, Soares Jr JM, Mosquette R, Simões MJ, Simões RS, Baracat EC. Estudo morfológico e molecular da mama de ratas castradas tratadas com isoflavona ou estrogênios. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2005; 27: 204-209

Puzaz JE. The Osteoblast. *In: Favus MJ, ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases and disorders of Mineral Metabolism.* New York: Raven Press. 1993:15-21.

Ramalho ACR, Lazaretti-Castro M, Cohen-Solal ME, Vernejoul MC. Modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM) no osso. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004; 44: 471-82.

Ramalho AC, Castro AL, Cohen Solal M Vernejoul MC. Por que estrogênio e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea? Mecanismo de ação do estrogênio e de um modulador seletivo do receptor de estrogênio (SERM) no osso. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2000; 44(6): 471- 82.

Reinwald S, Mayer LP, Hoyer PB, Turner CH, Barnes S, Weaver SM. longitudinal study of the effect of genistein on bone in two different murine models of diminished estrogen-producing capacity. *J Osteoporos.* 2010: 56-59.

Revel PA. Histomorphometry of bone. *J Clin Pathol* 1983;36:1323-1331

Rey JRC. Raloxifene: Mechanism of Action, effects on bone tissue and applicability in clinical traumatology practice. *The Open Orthopaedics Journal.* 2009; 3: 14-21.

Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC. Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *J Cell Biochem.* 2003;89:633-46

Riggs BL, Parfitt AM. Perspective-Drugs used to treat osteoporosis: The critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2005; 20(2):177-184.

Rizk DE, Hassan HA, Al-Marzouqi AH. Combined conjugated equine estrogen and ghrelin administration restores number of blood vessels and collagen type I/III ratio in the urethral and anal canal submucosa of old ovariectomized rats. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2008;19:547-52.

Robey PG, Boskey AL. Extracellular matrix and biomineralization of bone. *In: Favus MJ. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* Washington: American Society for bone and mineral research. 5a. ed. seção: Anatomy and biology of bone matrix and cellular elements. 2003; cap 6:38-46.

Ross FP. Osteoclast Biology and Bone Resorption. *In: Rosen V, ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 7 ed. Washington: ASBMR. 2008:16-21.

Rossow JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* 2002; 288: 321-333.

Russo LAT. Osteoporose pós-menopausa: Opções terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001; 45: 401-406.

Ryan MR, Shepherd R, Leavey JK, Gao YH, Grassi F, Schnell FJ, Qian WP, Kersh GJ, Weitzmann MN, Pacifici R. An IL-7- dependent rebound in thymic T cell output contributes to the bone loss induced by estrogen deficiency. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:16735–16740.

Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem.* 2005; 280:41155-64.

Sliwinski L, Folwaczna J, Janiec W, Gryniewicz G, Kuzyk K. Differential effects of genistein, estradiol and raloxifene on rat osteoclasts in vitro. *Pharmacological Reports.* 2005; 57, 352-359.

Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta.* 2001; 313:95-105.

Tamura N, Kurabayashi T, Nagata H, Matsushita H, Yhata T, Tanaka K. Effects of testosterone on cancellous bone, marrow adipocytes, and ovarian phenotype in a young female rat model of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility.* 2005; 1277-1285

Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res.* 1998;13:1243-50

Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:3128–3135.

Trouvin, AP, Goeb Vicent. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clinical Interventions in Aging* 2010;5 345–354

Yamaguchi M, Ma ZJ. Effect of polyphenols on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissue in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2001;24:1437–9.

Yamate T, Morchalla H, Tagushi Y, Igietsme JU, Monolagas SC, Abe E. Osteopontin Expression by Osteoclast and Osteoblast Progenitors in the Murine Bone Marrow: Demonstration of Its Requirement for Osteoclastogenesis and Its Increase After Ovariectomy. *Endocrinology.* 1998. 138: 3047-3055.

Yeh CK, Rodan GA. Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. *Calcified tissue international.* 1984;36: S67-71.

Yoles I, Yogev Y, Frenkel Y, Nahum R, Hirsch M, Kaplan B. Tofupill/Femarelle (DT56a): a new phyto-selective estrogen receptor modulator-like substance for the treatment of postmenopausal bone loss. *Menopause.* 2003;10:522-555.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006;12(1):17-25.

Watanabe T, Inoue S, Ogawa S, Ishii Y, Hiroi H, Ikeda K, Orimo A, Muramatsu M. Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 236:140–5.

Weaver CM, Cheong JMK. Soy isoflavones and bone health: The relationship is still unclear. *The Journal of Nutrition* 2005; 135: 1243-1247.

Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale. *J Clin Invest*. 2006; 116:1186–1194.

Whitten PL, Patisaul HB. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect*. 2001;109:5-20.

Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption – rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57:959-71.

Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*. 2006; 17: 319-336.