UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Programa de pós-graduação em Biologia Oral

Mayara Sgarbi Semeghini

Efeito do carotenoide licopeno no metabolismo
ósseo e na atividade funcional de células da
linhagem osteogênica de ratas ovariectomizadas.

Ribeirão Preto
2019

MAYARA SGARBI SEMEGHINI

Efeito do carotenoide licopeno no metabolismo ósseo e na atividade funcional de células da linhagem osteogênica de ratas ovariectomizadas.

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP -
Ribeirão Preto

Semeghini, Mayara S

Efeito do carotenoide licopeno no metabolismo ósseo e na atividade funcional de células da linhagem osteogênica de ratas ovariectomizadas. Ribeirão Preto, 2019.

72 p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientadora: Bombonato-Prado, Karina F

Nome: SEMEGHINI, Mayara Sgarbi

Título: Efeito do carotenoide licopeno no metabolismo ósseo e na atividade funcional de células da linhagem osteogênica de ratas ovariectomizadas.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências pelo
Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.
Área de Concentração: Biologia Oral.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho

*À toda a minha família, principalmente aos meus pais Rosana e
Luciano, meus irmãos Caio Augusto e Lucas e minha avó Nair.
Obrigada por todo amor e carinho, incentivo e apoio incondicional.
Obrigada por sempre acreditarem em mim!
Vocês são tudo na minha vida!*

AMO VOCÊS!

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos à todas as pessoas que colaboraram e participaram, direta ou indiretamente, da realização deste trabalho e da minha formação profissional.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, pela sua dedicação, seriedade e comprometimento com o que faz. Obrigada pela confiança em mim depositada, pela paciência e incentivo de todo dia, fazendo com que eu superasse as dificuldades enfrentadas. Obrigada por tudo!

Ao técnico Luiz Gustavo de Souza do Departamento de Biologia básica e Oral pela ajuda na cirurgia das ratas. Muito obrigada!

Ao técnico do laboratório de Cultura de Células, Roger Rodrigo Fernandes e às técnicas do laboratório de Biologia Molecular, Fabíola Singaretti de Oliveira e Milla Sprone Tavares Ricoldi, por terem me ensinado técnicas que utilizei nesse trabalho e por toda a ajuda que me deram.

Ao técnico de laboratório Dimitrius Leonardo Pitol por ter me ajudado e ensinado as técnicas de preparação de lâminas histológicas.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP pelas alegrias, ensinamentos e colaborações.

Ao Prof. Dr. Augusto Coppi da *University of Surrey* (Guildford, Reino Unido) pela oportunidade de aprender novas técnicas aplicadas neste trabalho e por proporcionar a experiência de conhecer e trabalhar em uma Universidade estrangeira. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.”

Clarice Lispector

RESUMO

SEMEGHINI, Mayara Sgarbi. **Efeito do carotenoide licopeno no metabolismo ósseo e na atividade funcional de células da linhagem osteogênica de ratas ovariectomizadas.** Ribeirão Preto, 2019. 72 p. Tese (Doutorado em Biologia Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A osteoporose é uma doença silenciosa caracterizada pela diminuição da massa óssea levando à morbidade e alto risco de fratura. A sua incidência é maior em mulheres após a menopausa devido à mudanças hormonais, assim como propensão genética e hábitos de vida como sedentarismo, alcoolismo, tabagismo e alimentação inadequada. Além de alimentos ricos em cálcio que favorecem a manutenção da massa e densidade óssea, existem outros nutrientes que podem influenciar na prevenção de doenças associadas com o metabolismo ósseo, como os carotenoides. Entre os carotenoides, o licopeno tem sido associado a estes efeitos principalmente devido à suas propriedades antioxidantes. Assim, o objetivo desta investigação foi realizar estudos *in vivo* e *in vitro* sobre o efeito do licopeno no metabolismo ósseo de ratas osteoporóticas. Ratas *Wistar* foram ovariectomizadas e pareadas com animais sham. As avaliações *in vitro* foram realizadas após 60 dias da cirurgia, quando as células foram cultivadas em meio osteogênico e divididas em grupos controle (sham), ovariectomizado (Ovx) e ovariectomizado + 1 $\mu\text{mol/L}$ de licopeno (Ovx/Lic). Após os períodos experimentais, foram avaliados proliferação celular, detecção *in situ* de fosfatase alcalina, mineralização e expressão quantitativa de genes associados ao metabolismo ósseo. Além disso, os estudos *in vivo* foram realizados para avaliar a remodelação óssea por meio de parâmetros tomográficos, histomorfométricos e estereológicos após a ingestão diária de 10 mg/kg de licopeno por 60 dias após a ovariectomia. Todos os dados quantitativos foram analisados por meio de teste estatístico ANOVA com significância para $p \leq 0.05$. Os resultados *in vitro* mostraram que a presença do licopeno favoreceu a proliferação celular e a detecção *in situ* de ALP em estágio tardios das culturas, assim como promoveu um aumento significativo na deposição de nódulos mineralizados. O licopeno também aumentou a expressão dos genes *Alp*, *Runx2*, *Bglap* e *Bmp4*, além de diminuir a razão *Rankl/Opg* quando

comparado ao grupo Ovx. Os experimentos *in vivo* mostraram que a administração oral do licopeno promoveu uma significativa manutenção do volume tecidual e volume ósseo na epífise femoral, assim como do trabeculado ósseo e quantidade de osteócitos. Os resultados sugerem que o licopeno pode beneficiar o metabolismo do tecido ósseo associado à osteoporose.

Palavras chave: osteoporose, carotenoide, licopeno, metabolismo ósseo, remodelação óssea.

ABSTRACT

SEMEGHINI, Mayara Sgarbi. Effect of carotenoid lycopene on bone metabolism and functional activity of cells from the osteogenic lineage of ovariectomized rats. Ribeirão Preto, 2019. 72 p. Thesis (Doctorate in Oral Biology). Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Osteoporosis is a silent disease characterized by a decrease in bone mass leading to morbidity and high risk of fractures. Its incidence is higher in women after menopause because of hormonal changes, as well as genetic propension and life styles such as sedentarism, alcoholism, tabagism and poor food intake. Besides calcium rich foods that favour the maintenance of bone mass and its density, there are several other nutrients that may influence in the prevention of diseases associated to bone metabolism, such as carotenoids. Among carotenoids, lycopene has been associated to prevention of bone diseases because of its antioxidant properties. The purpose of this investigation was to perform *in vitro* and *in vivo* studies about the effect of lycopene in bone metabolism of ovariectomized rats. Wistar rats were ovariectomized and paired with sham animals. *In vitro* evaluations were performed after 60 days of surgery, when cells were cultured in osteogenic medium and divided into control (sham), ovariectomized (Ovx) and ovariectomized + 1 $\mu\text{mol/L}$ lycopene (Ovx/Lic) groups. After the experimental periods, there were evaluated cell proliferation, alkaline phosphatase *in situ* detection, mineralization and quantitative expression of genes associated to bone metabolism. Besides, *in vivo* studies were carried out to evaluate femur remodeling by tomographic, histomorphometric and estereological evaluation after daily intake of 10 mg/kg of lycopene for 60 days after ovariectomy. All quantitative data were analyzed by means of one-way ANOVA statistical test with significance of $p \leq 0.05$. The *in vitro* results showed that the presence of lycopene favored cell proliferation and *in situ* detection of ALP in late culture stages, as well as promoted a significative increase in the deposition of mineralized nodules. Lycopene significantly increased the expression of genes *Alp*, *Runx2*, *Bglap* and *Bmp4*, besides decreasing the *Rankl/Opg* ratio when compared to Ovx group. *In vivo* experiments showed that oral administration of lycopene promoted a significant maintenance

of tissue and bone volume in femoral epiphysis, as well as of bone trabeculae and number of osteocytes. Results suggest that lycopene can benefit bone metabolism with the onset of osteoporosis.

Key words: osteoporosis, carotenoids, lycopene, bone metabolism, bone remodeling.

LISTA DE SIGLAS

ALP	Fosfatase alcalina
BGLAP	<i>Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein</i>
BMP4	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMO	Densidade mineral óssea
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
LDL	<i>Low- density lipoproteins</i>
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
PVPI	Iodopovidona
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa- B ligand</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUNX2	<i>Runt Related Transcription Factor 2</i>
SP7	<i>Specificity protein-7/Osterix</i>
USP	Universidade de São Paulo
VOI	Volume de interesse

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	26
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Animais utilizados e considerações éticas.	32
4.2 Indução da osteoporose- Grupo tratado.....	32
4.3 Grupo controle- Sham.....	35
4.4 Experimentos <i>in vitro</i>	35
4.4.1 Cultura de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas.....	35
4.4.2 Ensaio bioquímico.....	36
4.4.2.1 Proliferação celular.....	36
4.4.2.2 Detecção <i>in situ</i> da atividade de fosfatase alcalina.....	37
4.4.2.3 Formação e quantificação de matriz mineralizada.....	37
4.4.3 Extração de RNA total e análise da integridade.....	38
4.4.4 Reações de transcrição reversa.....	39
4.4.5 Reação de PCR em tempo real.....	39
4.5 Experimentos <i>in vivo</i>	40
4.5.1 Administração <i>in vivo</i> do licopeno	40
4.5.2 Sacrifício dos animais e coleta de material.....	41
4.5.3 Análise microtomográfica (micro-CT).....	41
4.5.4 Avaliação histomorfométrica.....	42
4.5.5 Avaliação estereológica.....	42
4.5.5.1 Número total de osteócitos.....	42
4.5.5.2 Volume médio dos osteócitos.....	43
4.6 Análise dos dados.....	43
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	57
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Constituintes principais do esqueleto, os ossos servem de suporte para partes moles, protegem os órgãos vitais, alojam a medula óssea, além de proporcionarem apoio aos músculos esqueléticos para a movimentação. O tecido ósseo é constituído de tecido conjuntivo especializado composto por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e por uma matriz óssea que possui a característica essencial de sofrer mineralização. A mineralização da matriz confere a este tecido uma extrema dureza, permitindo o desempenho de importantes funções de sustentação e proteção. O colágeno presente na matriz proporciona maleabilidade permitindo movimentos de extensão e flexão (FENG; MC DONALD, 2011; JUDAS et al., 2012).

Apesar do seu aspecto aparentemente inerte, o osso é composto por estruturas altamente dinâmicas que crescem, remodelam-se e mantêm-se ativas durante toda a vida do indivíduo. Esta permanente reorganização do tecido ósseo é realizada por diversas células ósseas que assumem várias formas e funções e que, no seu conjunto, constituem a série osteoblástica e a série osteoclástica, responsáveis pela constante formação, reabsorção, reparação, remodelação e manutenção da microarquitetura óssea (JUDAS et al., 2012).

A remodelação óssea é um processo fisiológico que mantém a integridade do esqueleto através da substituição do osso antigo por uma matriz óssea jovem (MARIE; KASSEM 2011). Ela é contínua ao longo da vida, de modo que a maior parte do esqueleto adulto é substituído aproximadamente a cada 10 anos. Para isso, a substituição óssea requer ações coordenadas entre os osteoclastos, para remover a matriz óssea, e os osteoblastos, para substituí-la, como também a interação de forças mecânicas, hormônios sistêmicos, citocinas, prostaglandinas e fatores de crescimento produzidos localmente (Figura 1) (FENG; MCDONALD, 2011).

Os osteoblastos são células típicas do tecido conjuntivo, oriundas de células mesenquimais indiferenciadas e que produzem a parte orgânica da matriz óssea, sintetizando colágeno tipo I, proteínas da matriz extracelular, fosfatase alcalina e osteocalcina. Possuem ainda a capacidade de armazenar fosfato de cálcio, participando na mineralização da matriz (MARIE; KASSEM 2011). Estas células, após cumprirem sua função de síntese de matriz, tornam-se osteócitos, os quais inicialmente estão circundados por tecido osteoide, que é o tecido ainda não mineralizado e por fim tornam-se osteócitos maduros envoltos em matriz mineral. São células de extrema importância na manutenção da matriz óssea (BONEWALD et al., 2011). Os osteoclastos são células originárias do tecido hematopoiético, sendo derivados

de colônias de células formadoras de macrófagos. As lacunas formadas na matriz óssea pelos osteoclastos recebem o nome de lacunas de Howship (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001).

Figura 1: O processo de remodelação óssea envolve os seguintes passos: reabsorção, reversão, formação, mineralização e repouso. Em um corpo saudável, osteoclastos e osteoblastos trabalham juntos para manter o equilíbrio entre perda e formação óssea.

Fonte: FENG; MCDONALD, 2011.

Um desequilíbrio no processo de remodelação do tecido ósseo pode desencadear doenças crônicas degenerativas como a osteoporose, caracterizada por perda da microarquitetura do tecido ósseo, resultando em fragilidade óssea e susceptibilidade aumentada à fraturas. A população idosa, especialmente mulheres, corre maior risco de desenvolver esta doença, uma vez que o envelhecimento está relacionado a alterações hormonais, como a diminuição dos hormônios estrogênicos, hormônios tireoidianos e testosterona, assim como de fatores de crescimento como IGF-1, o que facilita o decréscimo da massa muscular e da massa óssea (KHOSLA; RIGGS 2005, RUSSELL; ESPINA; HULEY, 2006, ESQUENAZI; DA SILVA; GUIMARÃES, 2014).

Embora a osteoporose seja uma desordem de etiologia multifatorial, a deficiência dos hormônios estrogênicos após a menopausa é a causa mais comum do seu surgimento em mulheres (FENG; MC DONALD, 2011). Assim, esta deficiência associada à menopausa pode aumentar a perda de osso trabecular em até 5% ao ano, nessas mulheres. Alguns mecanismos chaves são propostos para demonstrar o déficit na formação óssea por meio de efeito direto do estrógeno nos osteoblastos, como, por exemplo, o aumento da apoptose e do estresse oxidativo (KHOSLA; RIGGS 2005). Produtos do estresse oxidativo, como as espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species-ROS*) e radicais livres regulam a

osteoclastogênese e a diferenciação osteoclástica, diminuem a osteoblastogênese e o tempo de vida de osteoblastos e osteócitos, induzindo assim, a perda óssea (ALMEIDA et al., 2009, XU et al., 2017).

Segundo o Compêndio de Osteoporose, desenvolvido em 2017, o século XXI testemunhará a mais profunda mudança na estrutura etária da população humana na história. Em 2015, dos 7,3 bilhões de indivíduos vivendo em nossa sociedade global, cerca de 12% tinham 60 anos ou mais. Em 2050, as Nações Unidas estimam que haverá mais de 9,7 bilhões de pessoas no mundo, o que incluirá 2,1 bilhões de pessoas que terão 60 anos de idade ou mais. Enquanto que este milagre de longevidade deve ser celebrado, somos obrigados a realizar a devida diligência com respeito ao impacto que uma mudança demográfica nesta escala terá sobre a nossa sociedade. A prevalência de condições crônicas que aflige as pessoas idosas aumentará consideravelmente, e isso incluirá a osteoporose e as fragilidades que essa doença causa, facilitando a ocorrência de fraturas (IOF- Compendium of Osteoporosis, 2017).

Em 2010, o número de indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos com alto risco de fratura osteoporótica em todo o mundo foi estimado em 158 milhões e este deve ser duplicado em 2040. Estima-se que o número de fraturas de quadril - as fraturas que resultam na maior morbidade, mortalidade e custos de saúde – será duplicado em países populosos, como o Brasil e a China até 2040 e 2050, respectivamente (IOF- Compendium of Osteoporosis, 2017). Assim, é necessário promover uma prevenção efetiva e estratégias de tratamento para equilibrar a morbidade, mortalidade e perda econômica associada a esta doença.

Na Odontologia, a osteoporose também é uma fonte de preocupação. Apesar de sua presença não ser uma contraindicação para a colocação de implantes, estudos comprovam que a osteoporose/osteopenia é um fator de risco para a perda em altura do osso alveolar. A perda óssea progressiva pode afetar a taxa de sucesso nos implantes dentários principalmente se houver a deterioração da microarquitetura óssea, o que é suficiente para impossibilitar a estabilidade primária do implante. A estabilidade do implante parece ser influenciada pelas densidades ósseas locais e esqueléticas. Os índices de estabilidade mais baixos no paciente com osteoporose esquelética reforçam as recomendações de que protocolos seguros e tempos de cicatrização mais longos devem ser recomendados ao tratar os pacientes com implantes dentários (MERHEB et al. 2016). Assim como nos ossos longos, a cortical da mandíbula sofre atividade de reabsorção em pacientes com osteoporose (GULSAHI, 2015), levando à uma diminuição da espessura e borda inferior porosa, características que podem ser

determinadas por radiografias panorâmicas (TAGUCHI, 2010). DUTRA et al. (2006) também mostraram que uma reduzida densidade mineral óssea (DMO) pode alterar o contorno mandibular. Além disso, a osteoporose pode interferir na adaptação das próteses totais em indivíduos totalmente desdentados, tendo em vista que a perda óssea acarretada por esta doença interfere no suporte das mesmas (PAYNE et al. 1999).

As terapias atuais aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) incluem agentes antirreabsortivos (e.g., bisfosfonatos e Denosumab) e agentes anabolizantes (e.g., teriparatida). Enquanto o Denosumab é relativamente novo e ainda não bem estudado, os bisfosfonatos e a teriparatida têm contribuído para uma diminuição do risco de fratura entre pacientes tratados. No entanto, os efeitos colaterais potencialmente indesejáveis associados com estas terapias farmacológicas, incluindo fraturas atípicas, osteonecrose maxilar, eventos adversos gastroesofágicos e tonturas, juntamente com a preocupações com os custos de tais medicamentos, continuam desafiando sua eficácia geral. Assim, os esforços de pesquisa são direcionados para descobrir uma solução terapêutica mais efetiva e de menor custo, incluindo alternativas naturais com baixos efeitos colaterais (ARDAWI et al. 2016).

Uma alternativa terapêutica para a osteoporose é evitar ou diminuir o estresse oxidativo no metabolismo ósseo. Há evidências crescentes de que o estresse oxidativo, induzido pelas ROS, aumenta com o envelhecimento ou com o início de um estado inflamatório, podendo afetar negativamente a homeostase óssea. O estresse oxidativo gera um dano celular devido a oxidação de lipídios, alteração estrutural das membranas, oxidação de proteínas e ácidos nucleicos; o dano pode se estender aos órgãos e tornar-se sistêmico. Muitas doenças têm sido associadas ao estresse oxidativo, incluindo doenças ósseas entre os quais uma das mais importantes é a osteoporose (ARDAWI et al. 2016). Estudos recentes sugerem que a perda óssea pós-menopausa pode ser causada pelo aumento das ROS, que induzem um microambiente ósseo mais oxidado, inibindo a diferenciação e proliferação de osteoblastos (ARDAWI et al. 2016). Assim, um desequilíbrio nos níveis das ROS pode acelerar a reabsorção óssea, resultando em fragilidade e fratura: consequentemente, a eliminação do excesso de ROS seria uma abordagem efetiva para a manutenção da integridade óssea (ARDAWI et al. 2016).

Estudos epidemiológicos também sugerem associação negativa entre estresse oxidativo e DMO, ou risco de osteoporose, o que é ainda corroborado pelas evidências de elevação do marcador sérico de estresse oxidativo nos pacientes com essa doença. Assim, torna-se plausível fazer uma hipótese de que a inibição do estresse oxidativo possa ser útil para

contrabalançar a diminuição da DMO, retardar o processo de osteoporose e reduzir o risco de fraturas osteoporóticas (XU et al. 2017).

De fato, o estresse oxidativo ativa a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos e fortalece a reabsorção óssea, além de induzir a apoptose de osteoblastos e osteócitos, favorecendo assim a osteoclastogênese (Figura 2).

Figura 2 - Efeito das ROS e antioxidantes na atividade de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos na atividade remodelação óssea. ROS ativam a diferenciação dos osteoclastos e apoptose dos osteócitos (+), enquanto inibe a dos osteoblastos (-) induzindo a reabsorção óssea; antioxidantes ativam a diferenciação dos osteoblastos (+) e inibem a atividade dos osteoclastos e a apoptose dos osteócitos (-) induzindo a formação óssea.

Fonte: DOMAZETOVIC et al. 2017.

Dado o papel importante das ROS e do estresse oxidativo na remodelação óssea, existe um interesse considerável no uso de antioxidantes em tratamentos potenciais para osteoporose e doenças ósseas inflamatórias. Diferentes protocolos experimentais têm sido utilizados usando tanto abordagens farmacológicas como nutricionais. Quanto às abordagens nutricionais, estudos epidemiológicos têm fornecido evidências de uma ligação entre nutrientes, consumo de antioxidantes e saúde óssea, o que tem levado à investigações das propriedades antioxidantes dos nutrientes e sua influência no metabolismo ósseo (DOMAZETOVIC et al. 2017).

A discussão do papel da dieta na saúde do indivíduo e na prevenção de doenças crônicas está crescendo cada vez mais no meio científico. Com base em estudos clínicos, epidemiológicos, experimentos *in vitro* e *in vivo*, orientações dietéticas são elaboradas e sugeridas para que por meio da alimentação seja possível prevenir a ocorrência de diversas patologias como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e osteoporose (RAO; RAO, 2007; INOCÊNCIO, 2011). Assim sendo, a principal recomendação para prevenção de doenças crônicas baseia-se no aumento da ingestão de alimentos com alto valor nutricional, os quais podem ter efeitos positivos em diversos tecidos, inclusive nos mineralizados (SAHNI et al., 2009).

Antioxidantes que podem mitigar os efeitos prejudiciais das ROS tem sido o foco de pesquisas recentes. Neste contexto, os alimentos ricos em carotenoides têm atraído a atenção da comunidade científica por exibirem propriedades bioquímicas e farmacológicas capazes de prevenir diversas doenças (RAO; RAO 2007, SAHNI et al., 2009, INOCÊNCIO, 2011).

Os carotenoides são pigmentos orgânicos encontrados em bactérias, algas, fungos, plantas e animais. Estes últimos conseguem sintetizá-los, já os animais devem adquiri-los por meio da dieta (RAO; RAO 2007). São principalmente encontrados em alimentos com pigmentação que vão do amarelo ao vermelho como tomate, acerola, morango, pitanga, melancia, pimentão, abóbora, entre outros. Eles são divididos em 2 grupos principais: xantofilas, que são carotenoides oxigenados (e.g., luteína, zeaxantina, e b-criptoxantina) e carotenos, que são carotenoides hidrocarbonetos que podem ser ciclizados, como o α -caroteno e β -caroteno, ou lineares, como o licopeno (WANG, 2012).

O licopeno é um dos mais de 900 elementos integrantes do grupo dos carotenoides e o mais predominante no plasma humano, destacando-se por sua expressiva atividade antioxidante e capacidade de separação de oxigênio singlete, i.e., espécie eletronicamente excitada da molécula de oxigênio molecular (O_2), ajudando a impedir e/ou reparar os danos causados às células pelos radicais livres (RAO; RAO 2007, SAHNI et al., 2009, WANG 2012). É um hidrocarboneto aberto de cadeia linear altamente insaturado apresentando 11 ligações duplas conjugadas e 2 ligações não conjugadas. As duas ligações não conjugadas, além de conferirem ao licopeno elevada reatividade química, ainda constituem o cromóforo responsável por sua capacidade de absorção de luz na região visível, que confere aos vegetais em que está presente coloração vermelho-alaranjada (MORITZ; TRAMONTE, 2006; SILVA; SCHNEIDER; PEREIRA, 2006). Devido à presença de ligações duplas na sua estrutura, ele pode existir tanto nas formas isoméricas *cis* como *trans*. Na natureza, predomina a existência do licopeno na forma *trans*, que é termicamente mais estável e

representa cerca de 94-96% do licopeno presente nos alimentos vegetais (EDRMAN, 2005; INOCÊNCIO, 2005).

OMONI e ALUKO (2005) relatam que o licopeno possui capacidade antioxidante duas vezes maior que o β -caroteno e cerca de dez vezes superior à capacidade demonstrada pelo α -tocoferol, estando esta superioridade possivelmente relacionada às duplas ligações de sua estrutura. Os tomates e os alimentos à base de tomate representam mais de 85% de todas as fontes dietéticas de licopeno. Em geral, 10 a 30% do licopeno dietético é absorvido por humanos. Estudos sugerem que o licopeno é absorvido de forma mais eficiente a partir de produtos processados de tomate em comparação com tomates crus. O aumento da absorção de licopeno a partir de produtos processados de tomate é atribuído à presença de cis-isômeros de licopeno (RAO; RAO 2007). A quantidade absoluta de licopeno absorvido não parece variar muito com a dose, mas sim com diferenças inter-individuais (DIWADKAR-NAVSARIWALA et al. 2003).

Segundo estudos realizados por AIDOUUD et al. (2014), o licopeno pode prevenir a aterogênese e a carcinogênese protegendo biomoléculas essenciais como lipídios, LDL (*low-density lipoproteins*) e o DNA celular, sugerindo que a concentração do licopeno seja inversamente proporcional à incidência de doenças cardiovasculares e câncer de próstata.

Relatos científicos demonstram uma relação positiva entre o consumo de alimentos que são fontes de licopeno e a proliferação e diferenciação de osteoblastos, ajudando assim na manutenção do tecido ósseo (SAHNI et al., 2009, XU et al., 2017). Outros autores observaram que a administração *in vitro* do licopeno em células da linhagem SaoS-2 favoreceu o aumento da proliferação e diferenciação celular, sugerindo uma associação com suas propriedades antioxidantes. Além disso, este carotenoide foi responsável pelo aumento da atividade de fosfatase alcalina e da expressão do RNAm da proteína osteopontina em células osteoblásticas de camundongos (PARK et al., 1997, KIM et al., 2003, RAO et al., 2003).

Ainda assim, existem poucos relatos científicos associando o efeito do licopeno ao metabolismo do tecido ósseo em modelos humanos ou animais. Um deles é o artigo publicado por IIMURA et al. (2015), no qual observaram inibição da perda óssea em ratas ovariectomizadas após ingestão do licopeno, analisando parâmetros como a perda óssea mineral na tíbia e vértebras, além de marcadores de reabsorção óssea no soro e urina. LIANG et al. (2012) também observaram os efeitos benéficos deste antioxidante no mesmo modelo animal por meio de elevação de marcadores ósseos séricos como o cálcio, fosfato, fosfatase alcalina e osteocalcina. Sendo assim, estudos que definam uma ligação clara entre

estes fitonutrientes e a homeostasia do tecido ósseo existem, mas são atualmente insuficientes para gerar recomendações nutricionais seguras para pacientes com deficiência metabólica deste tecido. Assim, estabelecemos duas hipóteses para este trabalho: 1) *in vitro*, que a atividade funcional (avaliada por métodos bioquímicos e moleculares) de células osteoblásticas da medula óssea de ratas ovariectomizadas em contato com o licopeno seja favorecida, 2) *in vivo*, o licopeno seja capaz de impedir a perda de volume de tecido ósseo no fêmur (avaliadas por métodos histológicos, microtomográficos e estereológicos) promovida pela deficiência de hormônios estrogênicos após a ovariectomia.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo integrado *in vitro* e *in vivo* do efeito do licopeno no metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas, utilizando parâmetros bioquímicos, moleculares, morfométricos, tomográficos e estereológicos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os parâmetros analisados foram:

Ensaio Bioquímicos:

- Proliferação e Viabilidade celular (MTT);
- Detecção *in situ* de fosfatase alcalina;
- Detecção e quantificação de matriz mineralizada.

Ensaio Moleculares:

- Expressão quantitativa por meio de PCR em tempo real dos genes *Alp*, *Sp7*, *Bmp4*, *Bglap*, *Runx2*, *Rankl* e *Opg*.

Ensaio Histológico:

- Análise histológica qualitativa e quantitativa da epífise femoral com ênfase no trabeculado ósseo e presença de adipócitos.

Ensaio Microtomográfico:

- Análise do tecido ósseo femoral a partir dos seguintes parâmetros:
- volume tecidual (mm³)
- volume ósseo (mm³)
- superfície óssea (mm²)
- densidade de superfície óssea (1/mm)
- espessura trabecular (mm)
- número trabecular (1/mm)
- separação trabecular (mm)

- volume de poros fechados (mm^3)
- porosidade total (%)
- densidade de conectividade ($1/\text{mm}^3$)

Ensaio Estereológico:

- Quantificação do número total e volume médio de osteócitos das epífises femorais.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimentos *in vitro*

Experimentos *in vivo*

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais Utilizados e Considerações Éticas

Foram utilizadas 38 ratas *Wistar* (19 ratas do grupo controle e 19 ratas do grupo tratado) pesando aproximadamente 200g. Os animais foram procedentes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Eles foram tratados com ração especial para roedores e água filtrada *ad libitum* e separados em caixas com cama de maravalha em número de três por caixa. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA protocolo 2015.1.464.58.5).

4.2. Indução da osteoporose-Grupo Tratado

Os animais foram ovariectomizados bilateralmente. Primeiramente eles foram pesados e então anestesiados com 75mg/Kg de cloridrato de cetamina (Dopalen, Agibrands do Brasil, Campinas, SP) e 10 mg/kg de xilazina (Coopazine, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Holanda), injetados por via intraperitoneal. Também se realizou a aplicação em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, de uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas. Após a anestesia os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais e feita a assepsia dos locais a serem incisionados com álcool iodado (PVPI). Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários e excisão dos mesmos. Procedeu-se a sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho (Figura 3). Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil). Os animais permaneceram em número de três por caixa e receberam ração e água *ad libitum*. Os animais operados ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

Figura 3. Protocolo de Ovariectomia. A) Pinçamento do ovário. B) Exposição do ovário. C e D) Excisão do ovário. E) Sutura dos tecidos.

Fonte: Acervo pessoal.

A comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia foi feita pelo exame do ciclo estral e exame macroscópico dos cornos uterinos. Duas semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao exame do ciclo estral por meio da coleta de líquido vaginal por um período de 5 dias consecutivos. Para o desenvolvimento desta técnica de observação foi introduzido, com o auxílio de uma pipeta de pequena capacidade (200 μ L) acoplada a uma ponteira de pequeno calibre, uma dose de solução salina (cerca de 100 μ L) no interior da vagina da rata. Após a introdução a solução foi rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina de vidro e imediatamente observado em microscopia óptica. Este procedimento foi realizado no início da manhã, por volta das 7 horas (Figuras 4 e 5).

Figura 4. Procedimentos para realização do exame de ciclo estral.

Fonte: Acervo pessoal.

Figura 5. Esfregaço vaginal de ratas controles (sham) evidenciando grande quantidade de células epiteliais com alguns leucócitos (A), e de ratas ovariectomizadas evidenciando somente leucócitos (B).

Fonte: Acervo pessoal.

Durante o processo de sacrifício dos animais, foi possível avaliar, também, o efeito da ovariectomia, por meio do exame macroscópico dos cornos uterinos. Para a realização desta análise foi necessário, antes do sacrifício dos animais, incisionar a região abdominal para localização das respectivas estruturas. Nos animais ovariectomizados os cornos uterinos apresentaram-se finos, atróficos e anêmicos (Figura 6).

Figura 6. A) Cornos uterinos de ratas controle. B) Cornos uterinos de ratas ovariectomizadas.

Fonte: Acervo pessoal.

4.3. Grupo controle/sham

Os animais do grupo controle/sham foram submetidos somente à exposição dos ovários e reposicionamento dos mesmos, seguido de sutura dos tecidos. Estes animais também receberam, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil).

4.4. Experimentos *in vitro*

4.4.1. Cultura de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas

Os experimentos com cultura de células foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A cultura de células-tronco mesenquimais (CTM) obtidas da medula óssea de fêmures das ratas (n=3 para cada grupo) foi realizada como descrito por MANIATOPOULOS et al. (1988). As ratas foram sacrificadas com as doses convencionais de anestésico cloridrato de cetamina e xilazina citadas no item 3.2. seguido de decapitação. Os fêmures foram retirados e transportados até o laboratório em meio de transporte (α -MEM (Gibco) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia (clorexidina a 2,5% e álcool a 70% por 1 minuto cada). Posteriormente, foi realizada a remoção de tecidos moles restantes nos fêmures por meio de lâmina de bisturi intercalada com a permanência dos mesmos em meio de transporte/lavagem por 15 minutos (três vezes).

As epífises foram cortadas e a medula óssea extraída do fêmur por meio de irrigação das diáfises com meio de cultura. As células foram mantidas em frascos de 75 cm² (Corning) em meio de cultura α -MEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), dexametasona 10⁻⁷ (Sigma), 5 μ g/mL ácido ascórbico (Gibco), 0,3 μ g/mL de fungizona (Gibco), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco) e 2,16 g/ mL de β -glicerofosfato.

Após atingirem subconfluência, as células foram liberadas enzimaticamente dos frascos de cultura pela adição de solução de EDTA 1 mM (Gibco), 1,3 mg/mL de collagenase tipo II (Gibco) e tripsina a 0,25% (Gibco) e colocadas em presença de quantidade suficiente de meio de cultura para interromper a ação enzimática. Posterior à centrifugação a 2000 rpm por 5 min para obtenção do precipitado celular, as células foram homogeneizadas em meio de cultura α -MEM (Gibco) e uma alíquota de 100 μ L desta solução, adicionada à porção igual de corante azul de tripan 0,1% (Acros Organics) foi utilizada para contagem celular, por meio de um contador de células automático (Countess automated Cell Counter™, Invitrogen, USA). A primeira passagem celular foi utilizada para realização dos experimentos. As células foram cultivadas no mesmo meio de cultura descrito acima, na concentração de 2 x 10⁴ células por poço, em placas de cultura de 24 poços (n=5) e divididas em 3 grupos experimentais: Sham (controle), Ovx (ovariectomizado) e Ovx/Lic (ovariectomizado com presença de licopeno).

O licopeno (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, EUA) foi apresentado na forma de pó e misturado ao meio de cultura acima mencionado para atingir uma concentração de 1 μ mol/L. A diluição foi preparada a cada troca de meio de cultura, que ocorreu a cada dois dias.

As culturas foram incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono e 95% de ar atmosférico. Durante o tempo de cultivo de até 17 dias, as células foram acompanhadas por meio de observação em microscópio de luz invertido (Axiovert 25 Zeiss) sendo os meios de cultura trocados duas vezes por semana.

4.4.2. Ensaios Bioquímicos

4.4.2.1. Proliferação celular

Após 7, 10 e 14 dias a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma®). Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com solução de MTT em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após

esse período, o meio de cultura foi retirado dos poços que foram lavados com 1 ml de solução PBS aquecida. Em seguida, foi adicionado 1 ml de solução de isopropanol ácido em cada poço sob agitação por 5 min, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150 µl foram retiradas dos poços e transferidas para uma placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments, Inc.) a 570 nm. Os valores de absorbância obtidos da amostra controle e do grupo experimental foram submetidos à análise estatística.

4.4.2.2. *Deteção in situ da atividade de fosfatase alcalina*

A análise da enzima fosfatase alcalina *in situ* foi realizada aos 7, 10 e 14 dias. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS aquecido a 37°C. Trezentos e vinte miligramas do reagente Triz (Sigma) foram dissolvidos em 20mL de água deionizada e adicionados 7mg do reagente Fast Red (Sigma). Foram desprezados 2mL desta solução e acrescidos 8mg de naftol (Sigma) diluídos em 2mL de dimetil formamida (Merck) formando a solução de trabalho. Um mililitro dessa solução foi adicionado em cada poço. A placa foi levada à incubadora em uma atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi retirada dos poços e a placa deixada para secar à temperatura ambiente para posterior análise qualitativa e quantitativa.

4.4.2.3. *Formação e quantificação de matriz mineralizada*

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 17 dias. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados 3 vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37° C, preenchidos com 2 mL de formalina 10% e mantidos a 4 °C. Decorridas 24 horas, após remoção da formalina, os poços foram desidratados à temperatura ambiente em séries crescentes de álcoois (30°GL, 50°GL, 70°GL e 100°GL) e a duração da desidratação para cada graduação alcoólica durou 1 hora. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma) e as áreas de mineralização ricas em cálcio, evidenciadas pela coloração vermelha. Para quantificação da coloração segundo método de GREGORY et al (2004), 150 µL de ácido acético a 10% foi acrescentado a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi então removida com um raspador de células e a solução transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vórtex por 30 segundos. Em seguida, 100 µL de óleo mineral foram adicionados à amostra para evitar evaporação, que foi aquecida a 85°C por 10 minutos e transferida para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000 g por 15 minutos, adicionados 40 µL de hidróxido de amônia a 10% e 150 µL do

sobrenadante foram lidos em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de alizarina de 0,5 a 3 mM em acetato de amônia (10% de ácido acético glacial e 5M de hidróxido de amônia). A média e a comparação entre os grupos foram realizadas através de teste estatístico.

4.4.3. Extração de RNA total e avaliação da integridade

Para a extração de RNA total das células osteoblásticas da medula óssea utilizamos o *mirVana™* miRNA Isolation Kit (Ambion®, Austin, TX, USA). Após atingirem subconfluência (13 dias de cultura), o meio de cultura foi removido das garrafas e as células então foram lavadas 3 vezes com PBS. Após remoção total do PBS, adicionou-se 600 µl de solução de lise (*Lysis/Binding Solution*) agitando-se vigorosamente com a ajuda de um vórtex para a lise completa das células. Em seguida, adicionou-se 60 µl de *Homogenate Additive* e após agitação por 15 segundos, as amostras ficaram em gelo picado por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 600 µl de *Acid-Phenol:Chloroform* e agitou-se no vórtex por 60 segundos. O lisado foi então centrifugado a 10.000 xg por 5 minutos a temperatura ambiente para a separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 1,25x do volume recuperado, de etanol 100% a temperatura ambiente. Para cada amostra foi utilizada uma coluna em um tubo coletor no qual 700 µl da mistura lisado/etanol foram pipetados na coluna e centrifugados por 15 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e o procedimento repetido até que toda mistura fosse filtrada. Em seguida, aplicou-se 700 µL *miRNA Wash Solution 1* à coluna e centrifugou-se por 10 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e 500 µL *Wash Solution 2/3* foram aplicados à coluna e centrifugados por 10 segundos a 10.000 x g. Repetiu-se este último passo e após descartar o líquido, centrifugou-se por 1 minuto para remoção de resíduos líquidos no filtro. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e a ela foram adicionados 100 µl de água DEPC pré-aquecida (95°C). Centrifugou-se por 30 segundos para eluição do RNA o qual foi então conservado a -80°C. As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho *NanoVue Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare, United Kingdom) em diferentes comprimentos de onda: 230, 260, 280 e 320.

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluídica utilizando o aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent* e com os *RNA 6000 Nano Chips* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes, que até o momento estavam armazenados em freezer,

foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, iniciou-se o preparo do gel pipetando 550 µl do RNA 600 Nano Gel em uma coluna com filtro e centrifugou-se por 10 minutos a 1.500 x g a temperatura ambiente. Uma alíquota de 65 µl foi colocada num tubo eppendorf de 0,5 ml e adicionou-se 1 µl de RNA 6000 *Nano Dye* e após agitação por 10 segundos, centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 x g a temperatura ambiente. Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 Nano Chip o qual foi colocado no *priming station* com os ajustes corretos. Primeiramente pipetou-se 9 µl da mistura gel/dye na região G indicada no chip e com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station* distribuiu-se o gel por todo o chip. Em seguida, pipetou-se 9 µl das misturas nos demais pontos indicados com a letra G. Pipetou-se 1 µl do marcador na posição indicada e 5 µl do RNA 6000 *Nano Marker* em cada posição relacionada as amostras assim como na posição do marcador. Por último, 1 µl de cada amostra (100-150 ng de RNA total) foi adicionado nos respectivos poços marcados de 1 a 12 e com a ajuda de um aparelho tipo vórtex IKA MS 3 (Manca, Hong Kong, China) agitou-se o chip horizontalmente por 1 minuto a 2200 rpm antes da leitura. Com a ajuda do *Agilent 2100 Expert Software* obteve-se o resultado (eletroferograma e densitometria dos géis). A caracterização de um RNA mensageiro (RNAm) de boa qualidade foi verificada pela visualização de duas subunidades ribossômicas características nos eucariotos (18S e 28S).

4.4.4. Reações de transcrição reversa

Após extração do RNA total, o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para realizar o experimento, foram adicionados ao RNA: 2 µL de (10X) RT buffer, 0,8 µL de (25X) dNTP mix (100mM), 2 µL (10X) RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inhibitor e 3,2 µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/ reação. Em seguida, a amostra foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 segundos, seguido pelo resfriamento a 4 °C. Ao final da reação a amostra foi mantida em gelo e o cDNA estocado em freezer -20°C.

4.4.5. Reação de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real realizadas pelo sistema de sondas TaqMan foram preparadas para um volume final de 10 µL por reação. Para cada reação, foram adicionados 5

μL de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 μL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 11,25 ng de cDNA. As reações consistiram em 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* – ou ciclo limiar) e todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para o gene de expressão constitutiva gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os níveis de expressão do gene constitutivo foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda TaqMan utilizada. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Usando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo.

4.5. Experimentos *in vivo*

4.5.1. Administração *in vivo* do licopeno

Utilizamos o licopeno (Kangdou Biotech, China) na concentração de 10%, com certificado de análise de controle de qualidade emitido pela Via Farma (São Paulo, Brasil). Após sua solubilização em água destilada, o licopeno foi administrado por meio de sonda gástrica (gavagem), na dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal por um período de 60 dias imediatamente após o procedimento de ovariectomia (Figura 7). Os animais foram divididos nos grupos sham (controle), Ovx (ovariectomizado) e Ovx/Lic (ovariectomizado com presença de licopeno). Os animais do grupo sham receberam água em substituição ao licopeno.

Figura 7. Realização da gavagem nos animais, sendo o líquido vermelho a solução de licopeno e o transparente, água.

Fonte: Acervo pessoal.

4.5.2. Sacrifício Dos Animais e Coleta De Material

As ratas foram sacrificadas após sessenta dias da cirurgia por meio de doses convencionais de cloridrato de cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal, seguida de decapitação. Foi realizada a coleta dos fêmures para a realização das avaliações tomográfica, histomorfométrica e estereológica, como descrito a seguir.

4.5.3 Análise microtomográfica (micro-CT)

Após a eutanásia dos animais, os fêmures foram removidos e fixados em uma solução de formaldeído a 10% tamponado (pH=7) para análise tomográfica. Para a aquisição das imagens, adotou-se uma resolução espacial de 9.9 μm com o micro tomógrafo SkyScan 1172 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica) com ajuste de 60 kV de voltagem e corrente de 165 μA . O passo seguinte foi a reconstrução tridimensional das imagens e a determinação do volume de interesse (VOI), sendo este correspondente à região trabecular da epífise proximal do fêmur estendendo-se por 2 mm. Para tal, foi adotada escala de cinza “threshold” de 255 (máximo) e 85 (mínimo) para avaliação do tecido ósseo trabecular. Os seguintes parâmetros estruturais foram avaliados: volume tecidual (mm^3), volume ósseo (mm^3), superfície óssea

(mm²), densidade de superfície óssea (1/mm), espessura trabecular (mm), número trabecular (1/mm), separação trabecular (mm), volume de poros fechados (mm³), porosidade total (%) e densidade de conectividade (1/mm³). Os programas DataViewer versão 1.4.1 (SkyScan Ltda.) e CT Analyzer versão 1.11.8.0 (SkyScan Ltda.) foram utilizados para análise.

4.5.4 Avaliação histomorfométrica

Os fêmures coletados foram imersos em formaldeído a 4% tamponado, por 24 horas. Em seguida, os fêmures foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M, e as soluções foram trocadas a cada dois dias. Após o período de descalcificação, a ação do ácido foi neutralizada em uma solução de sulfato de sódio a 5%, por vinte e quatro horas. Após esse período os fêmures foram desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram, então, realizados cortes longitudinais de 6 µm de espessura. Estes cortes foram corados em hematoxilina-eosina que permite a avaliação morfológica qualitativa e quantitativa do tecido ósseo neoformado. Foi utilizado um microscópio de luz Leica DM 4000B, acoplado a uma câmera digital de vídeo Leica EC3 para captura das imagens. A análise quantitativa da porcentagem de trabéculas ósseas e de adipócitos foi realizada por meio do software ImageJ®. Com a adaptação de uma grade de 80 pontos que sobrepõe a imagem histológica previamente obtida, foi feita contagem dos mesmos que recaíam sobre o osso trabecular e sobre os adipócitos.

4.5.5. Avaliação estereológica

O método de contagem estereológica foi realizado na *School of Veterinary Medicine da Universidade de Surrey (Guildford, Inglaterra)* sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi. Foram estimados o número total e volume médio dos osteócitos presentes nas epífises femorais dos três grupos experimentais. A metodologia está descrita a seguir.

4.5.5.1. Número total de osteócitos

Foi utilizada a técnica do *fractionator* óptico para estimar o número total de osteócitos (GUNDERSEN ET AL., 1988; GUNDERSEN, 2002). Cada bloco foi serialmente seccionado em cortes de 20 µm de espessura e uma fração de amostragem média (ssf) – 1/4 para cada grupo - dessas seções foi selecionado. Antes do procedimento de contagem, a calibração (distribuição do eixo Z) foi realizada para determinar a distribuição dos osteócitos por toda a espessura do corte e estabelecer a altura do *dissector*, que foi de 20 µm para todos os grupos.

A espessura de cada corte foi medida em cada campo microscópico usando o ponto central da grade de contagem. O número total de osteócitos foi estimado pela multiplicação do número de partículas pelas frações amostrais:

$$N_{\text{ost}} := \text{ssf}^{-1} \cdot \text{hsf}^{-1} \cdot \text{asf}^{-1} \cdot \Sigma Q^{-}$$

onde **ssf** é a fração amostral, **hsf** a altura média da fração amostral, **asf** a média da área da fração amostral e ΣQ^{-} o número total de partículas contadas usando os *disectors* ópticos.

4.5.5.2. Volume médio dos osteócitos

O volume médio foi estimado pelo método rotator planar (VEDEL-JENSEN; GUNDERSEN, 1993) que faz uma estimativa local e direta do volume da partícula. O rotator planar é baseado no teorema de Pappus-Guldinus, e necessita de um sub-espaco definido da partícula, e.g. o núcleo ou nucléolo de uma célula. O disector óptico é usado como uma sonda para as partículas amostrais. Em nosso estudo o rotator planar foi utilizado com a sonda *6 half-line rotator* disponível no software *StereoInvestigator* (Microbrightfield) e nas mesmas secções de 20 µm de espessura utilizadas para estimar o número total de osteócitos.

4.6. Análise dos dados

Os dados obtidos foram normalizados e analisados através do *software* estatístico GraphPad Prism 5.0. Para a comparação entre os grupos utilizamos análise de variância simples (one-way ANOVA) seguida de teste *post-hoc* de Newman-Keuls para identificação das amostras estatisticamente diferentes umas das outras. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Experimentos *in vitro*

5.1.1. Proliferação Celular

A proliferação celular sofreu uma diminuição progressiva significativa ao longo do experimento, sendo que aos 7 e 10 dias os resultados foram similares entre os grupos estudados, não apresentando diferença estatística entre eles ($p=0.3875$). Já aos 14 dias, podemos observar uma queda significativa na proliferação das células nos grupos de ratas ovariectomizadas (Ovx e Oxv/Lic) com e sem a presença do licopeno ($p<0.0001$).

Figura 8. Proliferação celular de células osteoblásticas da medula óssea de ratas controles (sham), ovariectomizadas (Ovx) e ovariectomizadas com licopeno (Ovx/Lic). Teste estatístico one-way ANOVA para $p<0.005$. Letras diferentes significam diferença estatística.

5.1.2. Detecção *in situ* de ALP

A análise qualitativa da detecção *in situ* de ALP sugere uma deposição uniforme e crescente desta proteína nos poços de cultura. A análise quantitativa das imagens dos poços nos períodos de 7 e 10 dias mostra uma crescente e significativa deposição de ALP ao longo do experimento para os grupos sham e Oxv/Lic, enquanto que o grupo Oxv mostrou um pico aos 10 dias e subsequente diminuição significativa aos 14 dias ($p<0.0001$). A comparação entre os grupos experimentais mostrou um aumento significativo aos 7 e 10 dias da atividade

de ALP no grupo ovariectomizado (Ovx) quando comparado aos outros grupos experimentais ($p < 0.0001$), os quais se mostraram estatisticamente similares. Entretanto, aos 14 dias observamos uma deposição significativamente maior de ALP nos grupos sham e Ovx/Lic quando comparado ao grupo Ovx ($p < 0.0001$). Estes dados podem ser vistos na Figura 9.

Figura 9. Detecção *in situ* qualitativa e quantitativa de fosfatase alcalina em cultura de células osteoblásticas da medula óssea de ratos controles (sham), ovariectomizadas (Ovx) e ovariectomizadas com licopeno (Ovx/Lic). Teste estatístico one-way ANOVA para $p < 0.005$. Letras diferentes significam diferença estatística.

5.1.3. Formação e quantificação de matriz mineralizada

As análises qualitativa e quantitativa (Figura 10) realizadas aos 17 dias de cultura mostraram um aumento significativo na formação de nódulos mineralizados no grupo Ovx/Lic quando comparado aos demais grupos ($p=0,0008$), os quais permaneceram sem diferença estatística ($p=0.2659$).

Figura 10. Formação de nódulos mineralizados aos 17 dias em cultura de células osteoblásticas da medula óssea de ratas controles (sham), ovariectomizadas (Ovx) e ovariectomizadas com licopeno (Ovx/Lic). Teste estatístico one-way ANOVA para $p<0.005$. Letras diferentes significam diferença estatística.

5.1.4. Expressão quantitativa de genes por meio de qRT-PCR

A expressão quantitativa dos genes que sintetizam proteínas associadas ao metabolismo ósseo (*Alp*, *Sp7*, *Bmp4*, *Bglap*, *Runx2* e *Rankl/Opg*), foi analisada após 13 dias de cultura por meio de reações de PCR em tempo real (Figura 11).

Figura 11. Expressão gênica quantitativa de células osteoblásticas da medula óssea de ratas controles (Sham), ovariectomizadas (Ovx) e ovariectomizadas com licopeno (Ovx/Lic). Teste estatístico one-way ANOVA para $p < 0.005$. Letras diferentes significam diferença estatística.

A análise da expressão gênica mostrou que a modulação dos genes *Alp*, *Sp7*, *Bmp4* e *Bglap* foi significativamente reprimida no grupo OVX quando comparado ao grupo sham. ($p < 0.003$). Além disso, os dados mostram que a presença do licopeno modulou positivamente os genes *Alp*, *Bmp4* e principalmente o gene *Bglap*, onde observa-se similaridade estatística com o grupo sham. A expressão do gene *Runx2* foi maior no grupo Ovx/Lic quando comparado aos outros grupos experimentais ($p = 0.0003$), os quais que apresentaram valores similares (sham e Ovx, $p = 0,7568$). A razão entre os genes *Rankl/Opg* foi significativamente menor no grupo Ovx/Lic quando comparado aos demais grupos experimentais ($p = 0,017$).

5.2. Experimentos in vivo

5.2.1. Análise microtomográfica (micro-CT)

A análise qualitativa das imagens 3D reconstruídas da epífise proximal do fêmur das ratas utilizadas neste experimento demonstrou uma evidente diminuição do trabeculado ósseo e aumento dos espaços medulares no grupo Ovx em relação ao grupo sham. O grupo Ovx/Lic apresentou maior número e conexão de trabéculas ósseas quando comparado ao grupo Ovx (Figura 12).

Figura 12. Epífises proximais dos fêmures de ratas controles (Sham), ovariectomizadas (Ovx) e ovariectomizadas + licopeno (Ovx/Lic). Reconstrução de imagens por micro-CT.

Figura 13. Análise microtomográfica do tecido ósseo femoral de ratas controles (Sham), ovariectomizadas (Ovx) e ovariectomizadas com licopeno (Ovx/Lic). Teste estatístico one-way ANOVA para $p < 0.005$. Letras diferentes significam diferença estatística.

Os resultados quantitativos de micro-CT mostram uma diminuição em 7 dos 10 dos parâmetros analisados no grupo Ovx quando comparado ao grupo sham (volume ósseo, volume tecidual, superfície óssea, espessura trabecular, número de trabéculas, volume de poros fechados e densidade de conectividade) com significância estatística em volume ósseo ($p=0.0017$), volume tecidual ($p=0,0428$) e volume de poros fechados ($p=0,0426$). A presença do licopeno no grupo Ovx/Lic aumentou significativamente o volume tecidual ($p=0,0428$) e o volume de poros fechados ($p=0,0426$), além de um aumento sem diferença estatística no volume ósseo, superfície óssea, número de trabéculas e densidade de conectividade.

5.2.2. Análise histológica qualitativa e quantitativa

A epífise femoral foi submetida à análise qualitativa após o processamento histológico, com as ratas ovariectomizadas apresentando uma diminuição do osso trabecular e aumento de adipócitos na medula óssea (Figura 14) quando comparado ao grupo sham. O grupo Ovx/Lic mostrou uma manutenção quase total do trabeculado, indicando menor perda óssea quando comparado ao grupo Ovx. A análise quantitativa confirmou estas observações, o que pode ser visto na Figura 15, mostrando que o grupo Ovx teve uma diminuição significativa na porcentagem de trabeculado ósseo quando comparado com os outros grupos ($p<0,0001$), assim como um aumento na porcentagem de adipócitos quando comparado ao controle. Já o grupo Ovx/Lic mostrou maior e significativa porcentagem de trabeculado ósseo quando comparado ao grupo Ovx ($p < 0.0001$) e similar ao grupo sham. A porcentagem de adipócitos no grupo Ovx/Lic diminuiu quando comparado ao grupo Ovx, mas ainda mostrou similaridade estatística ao mesmo e um aumento significativo quando comparado ao grupo sham ($p<0.0001$).

Figura 14. Cortes histológicos das epífises proximais dos fêmures dos grupos experimentais corados com hematoxilina-eosina em aumento de 10x. A) Grupo Sham. B) Grupo Ovx. C) Grupo Ovx/Lico trabeculado ósseo está indicado pelo asterisco (*) e os adipócitos pela seta preta. Barra=200 μ m.

Figura 15. Análise quantitativa da porcentagem de trabéculas ósseas e de adipócitos na epífise femoral das ratas do grupo sham, Ovx e Ovx/Lic. Barra=200 μ m. Teste estatístico one-way ANOVA para $p<0.005$. Letras diferentes significam diferença estatística.

5.2.3. Análise estereológica

Apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos estudados ($p=0,1268$), podemos notar um discreto aumento no número de osteócitos no grupo Ovx/Lic, quando comparado aos demais grupos. Já o volume médio dos osteócitos foi maior no grupo controle sham quando comparado aos grupos Ovx e Ovx/Lic ($p=0.013$) (Figura 16).

Figura 16. Cortes histológicos dos fêmures dos grupos experimentais corados com hematoxilina-eosina em aumento de 40x. A) Grupo Sham. B) Grupo Ovx. C) Grupo Ovx/Lic.

Figura 17. Número total e volume médio dos osteócitos encontrados nos grupos Sham, Ovx e Ovx/Lic.

Tabela I. Valores médios estereológicos correspondentes ao número total e volume médio de osteócitos nos grupos experimentais sham, Ovx e Ovx/Lic.

	Nº TOTAL DE OSTEÓCITOS	VOLUME MÉDIO DOS OSTEÓCITOS (MM³)
SHAM	56.702±3123,2	1.898±0,192
OVX	53.660±3620,4	1.258±0,275
OVX/LIC	58.921±4424,5	1.3394±0,085

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os mistérios da Biologia Óssea estão sendo desvendados em um ritmo sem precedentes e nossa compreensão sobre doenças resultantes da remodelação óssea e terapias direcionadas a elas estão evoluindo rapidamente. Assim, uma dieta antioxidante adequada rica em frutas, legumes, nozes e sementes está associada a valores mais elevados de densidade mineral óssea, demonstrando uma relação entre osteoporose e marcadores do estresse oxidativo (RIVAS et al., 2013; XU et al., 2017). Entre os antioxidantes que podem ser consumidos, os carotenoides representam um grupo heterogêneo muito importante, que está presente principalmente em frutas e vegetais. Os principais carotenoides ingeridos são o alfa e o β -caroteno, a β -criptoxantina, a luteína, a zeaxantina e o licopeno, sendo este último o mais potente do grupo com duas vezes mais capacidade antioxidante que o β -caroteno e 10 vezes mais que a do α -tocoferol (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989; KRINSKY 1998; OMONI & ALUKO 2005; J. COSTA-RODRIGUES et al. 2018).

Vários estudos com humanos revelaram um aumento na DMO em diferentes regiões anatômicas, associado a um aumento no consumo de licopeno, tanto em homens quanto em mulheres (RAO et al., 2007; SAHNI et al., 2009; XU et al., 2017). Em roedores, a administração diária de licopeno revelou-se protetora contra a perda de tecido ósseo induzida pela osteoporose, promovendo um aumento de marcadores anabólicos ósseos, como a fosfatase alcalina (LIANG et al., 2012; IIMURA et al., 2014; IIMURA et al., 2015). Em um modelo de camundongos ovariectomizados o licopeno revelou um efeito protetor do osso semelhante ao alendronato, fármaco utilizado para o tratamento de osteoporose, melhorando as propriedades biomecânicas do mesmo (ARDAWI et al., 2016).

A osteoporose é um distúrbio metabólico inflamatório, caracterizada pela perda de massa e força óssea, resultando em fraturas como consequência da deterioração da arquitetura trabecular (ARDAWI et al, 2016). O nosso estudo concentrou-se nas alterações ósseas

associadas à diminuição de hormônios estrogênicos, utilizando um modelo de rata ovariectomizada. Assim, utilizamos uma bateria de modalidades investigativas para examinar a resposta óssea frente ao tratamento com licopeno, além de examinarmos também alterações nos reguladores da diferenciação e metabolismo dos osteoblastos a nível tecidual.

A primeira hipótese deste estudo foi confirmada, demonstrando a influência do licopeno na atividade funcional de células osteoblásticas da medula óssea de ratas ovariectomizadas por meio de parâmetros bioquímicos e moleculares.

A proliferação celular, avaliada pelo ensaio MTT, apresentou uma diminuição significativa em todos os grupos ao longo da cultura, com similaridade entre os grupos experimentais nas fases iniciais. Apesar de ausência de diferença estatística, aos 14 dias, a presença do licopeno promoveu um aumento da proliferação celular em células da medula de ratas osteoporóticas. No estudo feito por COSTA-RODRIGUES et al. (2018), a osteoblastogênese foi modulada pelo licopeno, que promoveu uma ativação significativa da proliferação e diferenciação de células osteoblásticas com concentrações maiores ou iguais que 500 nM. IIMURA et. al. (2014), em um trabalho com células-tronco mesenquimais de camundongos, observaram que após hipóxia, a viabilidade celular aumentou na presença de licopeno em doses $\geq 20 \mu\text{M}$; no entanto, nas culturas celulares mantidas na presença de oxigênio, o licopeno não tinha efeito significativo.

A atividade funcional foi avaliada por meio do estudo da fosfatase alcalina, uma proteína importante na osteogênese e intimamente relacionada a deposição dos cristais de hidroxiapatita no processo de mineralização. O ensaio de detecção *in situ* evidencia a presença de ALP por meio de uma reação cromogênica com o substrato Fast Red associado a outros reagentes já descritos na metodologia. Nossos dados evidenciaram um aumento significativo na deposição de ALP ao longo da cultura principalmente para os grupos sham e Ovx/Lic, enquanto que o grupo Ovx mostrou um pico aos 10 dias com subsequente

diminuição da marcação. O grupo de células de ratas osteoporóticas que recebeu o licopeno mostrou um comportamento similar ao grupo sham apesar de evidenciar uma menor marcação de ALP. É importante enfatizar que o grupo Ovx apresentou uma marcação significativamente maior de fosfatase alcalina aos 10 dias quando comparado aos outros grupos. LIANG et al. (2012) apresentaram resultados similares, assim como YU et al. (2012) que mostraram resultados da atividade de MTT, ALP e OC (osteocalcina) maiores nos osteoblastos do grupo Ovx do que nos osteoblastos do grupo sham. Estes últimos autores sugerem que este efeito pode ocorrer ainda nas fases iniciais de culturas celulares como uma consequência do processo de osteoporose, criando uma necessidade de aumento no metabolismo dos osteoblastos para compensar os efeitos da diminuição dos hormônios estrogênicos. Kim et al. (2003) sugerem que o efeito do licopeno na atividade de ALP pode depender do estágio de diferenciação celular. Assim, o licopeno pode não ter qualquer efeito sobre as células osteoprogenitoras, mas, à medida que as células se diferenciam, uma população específica de células osteoprogenitoras diferenciadas são mais receptivas ao efeito estimulatório do licopeno, como pôde ser observado em nosso trabalho aos 14 dias de atividade de ALP, no qual há uma tendência de maior atividade no grupo Ovx/Lic que no grupo Ovx. Como consequência desta atividade, a análise da demarcação dos nódulos mineralizados, tanto qualitativa quanto quantitativa, mostrou um aumento significativo na mineralização no grupo Ovx/Lic quando comparado aos demais grupos.

A expressão quantitativa dos genes que codificam proteínas importantes e consideradas marcadores ósseos foi analisada após 13 dias em cultura por meio de reações de PCR em tempo real. O tratamento com licopeno regulou positivamente a atividade dos osteoblastos aumentando os níveis de *Alp*, *Bmp4*, *Bglap* e *Runx2*.

Genes tais como o *Runx2* são muito importantes para a diferenciação osteoblástica, induzindo e/ou reprimindo outros genes envolvidos na formação do tecido ósseo

(BRUDERER et al., 2014). A expressão quantitativa do *Runx2* foi significativamente maior no grupo Ovx/Lic quando comparado ao grupo Ovx. O mesmo ocorreu com o gene *Bglap*, o qual codifica uma proteína óssea abundante, i.e., osteocalcina. Essa proteína codificada contém um domínio Gla (gama carboxiglutamato), que atua na ligação ao cálcio e hidroxiapatita, o componente mineral do osso, sendo um fator importante na regulação do metabolismo ósseo e na mineralização e homeostase do íon cálcio (LIANG et al., 2012). Ainda foi observado para este último uma similaridade na expressão para os grupos sham e Ovx/Lic, indicando uma maior formação óssea nesses grupos. Estes dados estão de acordo com PARK et al. (2014), que também observaram um aumento significativo na expressão de *Bglap*, *Runx2* e *Alp* após tratamento de 10 µg/mL de extrato de *Lycii Radicis Cortex* (LRC) por 3 dias em linhagens C3H10T1/2 e MC3T3-E1. A diminuição significativa na expressão do gene *Alp* no grupo Ovx quando comparado ao grupo sham reflete as características observadas em nossos experimentos *in vivo*, tais como redução da atividade funcional osteoblástica, e diminuição do trabeculado ósseo como sugerido por BALLA et al. (2019). A presença do licopeno aumentou significativamente a expressão de *Alp* mas não chegou a níveis similares ao grupo sham. É importante ressaltar também os dados encontrados em relação à razão da expressão de *Rankl/Opg*, a qual foi significativamente menor no grupo Ovx/Lic quando comparado ao grupo Ovx. Este resultado sugere uma influência do licopeno na remodelação da matriz óssea. Enquanto a sinalização RANKL/RANK regula a formação, ativação e sobrevivência de osteoclastos, a osteoprotegerina protege o osso da reabsorção excessiva, ligando-se ao RANKL e evitando que ele se ligue ao RANK. Assim, a concentração relativa de RANKL e OPG no osso é uma das principais determinantes da massa e força óssea. O tratamento com licopeno diminuiu a razão *Rankl/Opg*, sugerindo um efeito protetor deste carotenoide. ARDAWI et al. (2016) também já atribuíram ao licopeno ações anti-reabsortivas e anabólicas, favorecendo a neoformação do tecido ósseo.

O gene *Bmp4* é um membro da família de proteínas morfogenéticas ósseas, e apesar de ter sido inicialmente identificado devido à sua capacidade de promover osteogênese, atualmente é considerado um fator crítico não apenas para embriogênese e desenvolvimento, mas também para a homeostase de muitos tecidos adultos. Esse gene tem um papel bem estabelecido no desencadeamento do desenvolvimento de células-tronco mesenquimais em linhagem osteogênica e/ou adipogênica (MODICA; WOLFRUM 2017). A expressão quantitativa do *Bmp4* foi significativamente maior nos grupos sham e Ovx/Lic que no grupo Ovx, sugerindo que o licopeno ajudou a promover uma maior formação óssea no grupo em que esteve presente.

O gene *Sp7* é um fator de transcrição essencial para a osteogênese, sendo necessário para a diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos maduros. A deleção dirigida desse gene resulta em falha na diferenciação de osteoblastos e na formação óssea (RASHID et al., 2014). No entanto, esse gene apresentou maior expressão no grupo sham do que nos grupos ovariectomizados, indicando que nesses grupos houve uma menor diferenciação osteoblástica.

A segunda hipótese deste trabalho também foi confirmada, sugerindo que o licopeno é capaz de impedir a perda de volume de tecido ósseo no fêmur de ratas ovariectomizadas, avaliada por métodos microtomográficos, histomorfométricos e estereológicos.

A densidade mineral óssea é o padrão ouro para a avaliação de indivíduos com risco de osteoporose, pois prediz melhor o risco de fratura. A diminuição da DMO com a deterioração concomitante da microarquitetura do osso induzida pela ovariectomia está intimamente associada com alta taxa de remodelação óssea e desequilíbrio entre formação e reabsorção. A análise microtomográfica é amplamente utilizada para medir os efeitos das modalidades terapêuticas na remodelação óssea (ARDAWI et al, 2016; LIANG et al., 2012).

A análise microtomográfica realizada na epífise proximal do fêmur das ratas utilizadas neste experimento demonstrou que houve uma evidente diminuição do trabeculado ósseo e aumento dos espaços medulares no grupo Ovx em relação ao grupo sham. As amostras do grupo Ovx/Lic apresentaram maior número de trabéculas ósseas e maior volume ósseo que o grupo Ovx, sugerindo que a ingestão de licopeno impediu a perda óssea que ocorre após a ovariectomia, seguindo a mesma linha de pensamento publicado por LI et al. (2018), ARDAWI et al. (2016), IIMURA et al. (2013) e LIANG et al. (2012).

A análise histomorfométrica das epífises femorais mostrou que não houve perda óssea nos grupos controles, com manutenção da arquitetura e densidade óssea. O grupo Ovx apresentou histologia compatível com a condição osteoporótica: áreas medulares extensas, poucas trabéculas ósseas, reduzidas em número e espessura, desorganizadas e com perda de conectividade, além de um aumento na porcentagem de adipócitos na medula óssea. Já no grupo ovariectomizado com ingestão do licopeno podemos identificar menor perda da quantidade e espessura de trabéculas ósseas assim como da organização, arranjo e comunicação do tecido ósseo. Estes dados sugerem que a perda de massa óssea causada pela osteoporose, foi parcialmente evitada pelo tratamento com 10 mg/kg de peso corporal por dia licopeno.

Outro parâmetro utilizado neste estudo foi a estereologia, ciência que estuda os sólidos, ou seja, uma ferramenta que permite a interpretação tridimensional de secções transversais bidimensionais de materiais ou tecidos. Portanto, esta ferramenta pode ser usada não apenas para estimar o volume, mas também o número total de osteócitos encontrados no tecido ósseo analisado. A estereologia é basicamente estatística e os métodos dependem de um plano de amostragem cuidadoso e de uma teoria de amostragem sólida. Os métodos estereológicos não podem ser aplicados a menos que uma amostragem aleatória seja obtida (SCALIZE et al., 2015). DABBAGHMANESH et al. (2017) realizaram um trabalho parecido com esse, no

entanto, eles investigaram os efeitos do extrato hidroalcoólico do fitoterápico *Elaeagnus Angustifolia* - na osteoporose induzida por ovariectomia em ratas usando métodos estereológicos (volume ósseo da vértebra e tíbia, volume de trabéculas e número total de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos). O resultados destes autores mostraram que a ovariectomia diminuiu significativamente o nível de cálcio e aumentou o nível de ALP no grupo Ovx, além de um aumento no número total de osteócitos nos grupos tratados com extrato de frutas EA e estrógeno em comparação ao grupo Ovx. Eles também observaram que o extrato associado ao estrógeno promoveu um aumento significativo no número de osteoblastos na vértebra e tíbia em comparação com o grupo Ovx ($p < 0,05$) e uma redução no número de osteoclastos na tíbia dos ratos tratados com Ovx ($p < 0,05$). VASHISHTH et al. (2002) demonstraram também por meio de técnicas estereológicas que a densidade numérica de células ósseas contidas na matriz calcificada (densidade lacunar dos osteócitos) prediz o volume de matriz óssea extracelular tanto para osso esponjoso como cortical, em uma seção transversal ampla da população. Houve um relacionamento não linear (curva dose-resposta) altamente correlacionado entre volume da matriz extracelular e densidade de osteócitos, sendo que alterações na fração de volume ósseo podem ser diretamente atribuídas a mudanças na densidade de osteócitos. A apoptose dos osteócitos é seguida pela remoção da matriz óssea, sugerindo uma relação causal entre a manutenção da viabilidade celular e a permanência da matriz extracelular. Não foram encontrados na literatura trabalhos semelhantes ao nosso, utilizando análise estereológica para contagem de osteócitos em ratas ovariectomizadas com administração de licopeno. Nosso trabalho apresentou um maior número de osteócitos no grupo Ovx/Lic, quando comparado aos demais grupos, sugerindo que nesse grupo houve um aumento do volume de matriz extracelular, condizente com os resultados encontrados na análise microtomográfica. Já o volume médio dos osteócitos foi maior no grupo controle

sham e menor nos grupos ovariectomizados (Ovx e Ovx/Lic), sugerindo que o tamanho dos osteócitos foi inversamente proporcional à sua quantidade.

Em conjunto, nossos achados sugerem que o licopeno atue diretamente no metabolismo ósseo, inibindo a perda óssea em ratas ovariectomizadas, sendo um tratamento promissor seguro, eficaz e natural para a osteoporose pós-menopausa, e seus potenciais benefícios devem ser vigorosamente investigados.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

De acordo com as hipóteses formuladas e com os dados obtidos, podemos concluir que o licopeno:

- 1) pode aumentar a proliferação celular em estágios tardios da cultura;
- 2) pode aumentar a deposição de ALP por meio de detecção *in situ* em estágios tardios da cultura;
- 3) pode aumentar a detecção e quantificação de matriz mineralizada quando comparado com os outros grupos experimentais;
- 4) pode aumentar a expressão quantitativa dos genes *Alp*, *Bglap*, *Runx2* e *Opg* quando comparado com o grupo Ovx;
- 5) pode impedir a perda de trabeculado ósseo nas epífises femorais após análise histomorfométrica;
- 6) pode impedir a perda de volume tecidual e volume ósseo visto por análise microtomográfica;
- 7) pode favorecer a manutenção da quantidade de osteócitos e do volume de matriz óssea visto por análise estereológica.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOUD, A; AMMOUCHE, A; GARRIDO, M; RODRIGUEZ, A.B. Effect of lycopene-enriched olive and argan oils upon lipid serum parameters in Wistar rats. **J Sci Food Agric**, v. 94, n. 14, p. 2943-2950, 2014.

ALMEIDA, M; HAN, L; MARTIN-MILLAN, M; PLOTKIN, M. I; STEWART, A. S; ROBERSON, P. K; KOUSTENI, S; O'BRIEN, C. A; BELLIDO, T; PARFITT, A. M; WEINSTEIN, R. S; JILKA, R. L; MANOLAGAS, S. C. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. **J Biol Chem**, v. 282, p. 27285–27297, 2009.

ARDAWI, M. S. et al. Lycopene treatment against loss of bone mass, microarchitecture and strength in relation to regulatory mechanisms in a postmenopausal osteoporosis model. **Bone**, v. 83, p. 127-140, 2016.

BALLA B, SÁRVÁRI M, KÓSA JP, KOCSIS-DEÁK B, TOBIÁS B, ÁRVAI K, TAKÁCS I, PODANI J, LIPOSITS Z, LAKATOS P. Long-term selective estrogen receptor-beta agonist treatment modulates gene expression in bone and bone marrow of ovariectomized rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 2019 Jan 24. pii: S0960-0760(18)30379-0. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.01.012.

BONEWALD, L.F. The Amazing Osteocyte. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 2, p. 229-238, Feb. 2011.

BRUDERER M, RICHARDS RG, ALINI M, STODDART MJ. Role and regulation of runx2 in osteogenesis. **European Cells and Materials**, v. 28, p. 269-286, 2014.

CANALIS, E; MCCARTHY, T; CENTRELLA, M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. **J Clin Invest.**, v. 81, n. 2, p. 277-281, Feb. 1988.

COSTA-RODRIGUES J, FERNANDES MH, PINHO O, ROCHA-MONTEIRO PR. Modulation of human osteoclastogenesis and osteoblastogenesis by lycopene. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 57, p. 26-34, 2018.

DABBAGHMANESH MH, NOORAFSHAN A, TALEZADEH P, TANIDEH N, KOOHPEYMA F, IRAJI A, BAKHSHAYESHKARAM M, MONTAZERI-NAJAFABADY N. Stereological investigation of the effect of *Elaeagnus angustifolia* hydroalcoholic extract on osteoporosis in ovariectomized rats. **Avicenna J Phytomed**, v. 7, n. 3, p. 261-274, 2017.

DI MASCIO P, KAISER S, SIES H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys**, v. 274, p. 532-538, 1989.

DIWADKAR-NAVSARIWALA V, NOVOTNY J, GUSTIN DM, SOSMAN JA, RODVOLD KA, et al. A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lycopene in healthy men. **J Lipid Res**, v. 44, n. 10, p. 1927–39, 2003.

DOMAZETOVIC, V. G. et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clin Cases Miner Bone Metab**, v. 14, n. 2, p. 209-216, 2017.

DUTRA, V. et al. Mandibular morphological changes in low bone mass edentulous females: evaluation of panoramic radiographs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 5, p. 663-668, 2006.

ERDMAN JR. J. W. How do nutritional and hormonal status modify the bioavailability, uptake, and distribution of different isomers of lycopene? **J Nutr**, v. 135, p. 2046-7, 2005.

ESQUENAZI, D; DA SILVA, S.R.B; GUIMARÃES, M.A.M. Aspectos fisiopatológicos do envelhecimento humano e quedas em idosos. **Revista HUPE**, v.13, n. 2, p. 11-20, abr/jun 2014.

FENG, X; MCDONALD, J. M. Disorders of Bone Remodeling. **Annual review of pathology**, v. 6, p.121-145, 2011.

GREGORY CA, GUNN WG, PEISTER A, ET AL. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, v.329, p. 77-84, 2004.

GULSAHI, A. Osteoporosis and jawbones in women. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 5, n. 4, p. 263-267, 2015.

GUNDERSEN, H.J; BAGGER, P; BENDTSEN, T. et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 858-881, 1988.

GUNDERSEN, H. J. The smooth fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 207, p. 191-210, 2002.

HOWARD CV, REED MG. Unbiased stereology. (2010) QTP Publications, Liverpool.

IOF - Compendium of Osteoporosis. 2017, Switzerland. First Edition, October 2017; 76 p.

IIMURA, Y; AGATA, U; TAKEDA, S; KOBAYASHI, Y; YOSHIDA, S; EZAWA, I; OMI, N. The protective effect of lycopene intake on bone loss in ovariectomized rats. **J Bone Miner Metab**, v. 33, n. 3, p. 270-8, 2015.

IIMURA Y, AGATA U, TAKEDA S, KOBAYASHI Y, YOSHIDA S, EZAWA I, OMI N. Lycopene intake facilitates the increase of bone mineral density in growing female rats. **J Nutr Sci Vitaminol** (Tokyo). v. 60, n. 2, p. 101-7, 2014.

INOCÊNCIO, D.S.A. **Licopeno e prevenção de câncer**. 2011. 21p. Trabalho de conclusão de curso (Nutrição) - Ganep Nutrição Humana, Belo Horizonte, 2011.

JUDAS, F; MARQUES, A; MAXIMINO, L; LUCAS, F. Rapid progression of a severe femoral bone loss in a stable revision hip prosthesis: causes and management. **Acta Reumatol Port.**, v. 37, n. 2, p. 187-191, Apr/Jun 2012.

KHOSLA, S; RIGGS, B. L. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 34, n. 4, p. 1015-1030, 2005.

KIM, L; RAO, A. V; RAO, L. G. Lycopene II--effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. **J Med Food**, v. 6, n. 2, p. 79-86, 2003.

KRINSKY NI. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. **Ann N Y Acad Sci**, v. 854, p. 443-447, 1998.

LEE, Y. K; LEE, Y.J; HA, Y.C; KOO, K.H. Five-year relative survival of patients with osteoporotic hip fracture. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 1, p. 97-100, 2014.

LI X, XUE W, CAO Y, LONG Y AND XIE M. Effect of lycopene on titanium implant osseointegration in ovariectomized rats. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 13, n. 237, 2018.

LIANG, H; YU, F; TONG, Z; ZENG, W. Lycopene effects on serum mineral elements and bone strength in rats. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 7093-102, Jun 2012.

MANIATOPOULOS, C; SODEK, J; MELCHER, A. H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res**, v. 254, p. 317-330, 1988.

MARIE, P.J; KASSEM, M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. **European Journal of Endocrinology**, v. 165, p. 01-10, 2011.

MEIN, J. R; LIAN, F. WANG, X.D. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. **Nutr Rev**, v. 66, n. 12, p. 667-683, 2008.

MERHEB, J; TEMMERMAN, A; RASMUSSEN, L; KUBLER, A; THOR, A; QUIRYNEN, M. Influence of Skeletal and Local Bone Density on Dental Implant Stability in Patients with Osteoporosis. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 18, n. 2, p. 253-260, 2016.

MODICA, S; WOLFRUM, C. The dual role of BMP4 in adipogenesis and metabolism. **Adipocyte**, v. 6, n. 2, p. 141-146, 2017.

MORITZ, B; TRAMONTE, V. L. C. Biodisponibilidade do licopeno. **Rev Nut**, v.19, p. 265-73, 2006.

MUKAIYAMA K, KAMIMURA M, UCHIYAMA S, IKEGAMI S, NAKAMURA Y, KATO H. Elevation of serum alkaline phosphatase (ALP) level in postmenopausal women is caused by high bone turnover. **Aging Clin Exp Res**, v. 27, p. 413-418, 2015.

OMONI, A. O; ALUKO, R.E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. **Nutr Rev**, v. 63, n. 8, p. 272-283, 2005.

PARK, C. K; ISHIMI, Y; OHMURA, M; YAMAGUCHI, M; IKEGAMI, S. Vitamin A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 43, n. 3, p. 281-296, 1997.

PARK E, JIN HS, CHO DY, KIM J, KIM MC, CHOI CW, JIN Y, LEE JW, PARK JH, CHUNG YS, Huh D, Jeong SY. The effect of *Lycii Radicis Cortex* extract on bone formation *in vitro* and *in vivo*. **Molecules**, v.26, n.12, p.19594-609, 2014.

PAYNE, J. B; REINHARDT, R.A; NUMMIKOSKI, P. V; PATIL, K. D. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. **Osteoporos Int**, v. 10, n. 1, p. 34-40, 1999.

RAO, A. V; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

RAO, L.G; KRISHNADEV, N; BANASIKOWSKA, N; RAO, A. V. Lycopene effect on osteoclasts: lycopene inhibits basal and parathyroid hormone–stimulated osteoclast formation and mineral resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures. **J Med Food**, v. 6, n. 2, p. 69-78, 2003.

RASHID, H; MA, C; CHEN, H; WANG, H; HASSAN, MQ; SINHA, K; DE CROMBRUGGHE, B; JAVED, A. Sp7 and Runx2 Molecular Complex Synergistically Regulate Expression of Target Genes. **Connect Tissue Res**, v. 55, n. 1, p. 83–87, 2014.

RIVAS A, ROMERO A, MARISCAL-ARCAS M, MONTEAGUDO C, FERICHE B, LORENZO ML, et al. Mediterranean diet and bone mineral density in two age groups of women. **Int J Food Sci Nutr**, v. 64, p. 155-61, 2013.

RUSSELL, R. G; ESPINA, B; HULLEY, P. Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis. **Curr Opin Rheumatol** 18 Suppl 1: S3-10, 2006.

SAHNI, S; HANNAN, M. T; BLUMBERG, J; CUPPLES, L. A; KIEL, D. P; TUCKER, K.L. Protective effect of total carotenoid and lycopene intake on the risk of hip

fracture: a 17-year follow-up from the Framingham Osteoporosis Study. **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 6, p. 1086-1094, 2009.

SCALIZE PH, DE SOUSA LG, HALLAK-REGALO SC, SEMPRINI M, PITOL DL, DA SILVA GA, COELHO JA, COPPI AA, LOBO-LAAD AAB, BOMBONATO-PRADO KF, SIESSERE S. Low-level laser therapy improves bone formation: stereology findings for osteoporosis in rat model. **Lasers Med Sci**, v. 30, p. 1599–1607, 2015.

SILVA, A. M; SCHNEIDER, V. C; PEREIRA, C. A. M. Propriedades químicas e farmacológicas do licopeno. **Rev Eletr Farm**, v. 6, p. 36-61, 2006.

SOMMERFELDT, D.W; RUBIN, C.T. Biology of bone and how it orchestrates: The form and function of the skeleton. **Eur Spine J**,10: S86–S95, 2001.

TAGUCHI, A. Review Triage screening for osteoporosis in dental clinics using panoramic radiographs. **Oral Dis**, v. 16, n. 4, p. 316-27, May 2010.

VASHISHTH D, GIBSON G, KIMURA J, SCHAFFLER MB, FYHRIE DP. Determination of Bone Volume by Osteocyte Population. **The Anatomical Record**, v. 267, p. 292–295, 2002.

VEDEL-JENSEN, E. B; GUNDERSEN, H. J. The Rotator. **Journal of Microscopy**, v. 170, p. 35-44, 1993.

WANG, X. D. Lycopene metabolism and its biological significance. **Am J Clin Nutr**, v. 96, n. 5, p. 1214S-1222S, 2012.

XU, J; SONG, C; SONG, X; ZHANG, X; LI, X. Carotenoids and risk of fracture: a meta-analysis of observational studies. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 2391-2399, 2017.

YU SJ, LIU HC, LING-LING E, WANG DS, ZHU GX. Proliferation and differentiation of osteoblasts from the mandible of osteoporotic rats. **Exp Biol** , v. 237, n. 4, p. 395-440, 2012.

*De acordo com a norma ABNT NBR 6023