# Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

valiação do efeito osteogênico por diferentes fitoestrógenos em Itura de osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais
Amanda Natalina de Faria

RIBEIRÃO PRETO 2013

# Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Avaliação do efeito osteogênico por diferentes fitoestrógenos em cultura de osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Amanda Natalina de Faria

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Regina Torqueti

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 15/03/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RIBEIRÃO PRETO 2013 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### Faria, Amanda Natalina de

Avaliação do efeito osteogênico por diferentes fitoestrógenos em cultura de osteoblastos derivados de células tronco mesenguimais. Ribeirão Preto, 2013.

86p :il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Torqueti, Maria Regina

- 1. Menopausa 2. Isoflavonas 3. Extrato de Soja Biotransformado,
- 4. Menoflavon<sup>®</sup> 5. Células Tronco Mesenquimais 6. Osteoblastos.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

de

Autora: Amanda Natalina d Título: Avaliação do efeito d osteoblastos derivados de cé	osteogênico por diferentes fitoestrógenos em cultura d
	Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.
	Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
	Orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria Regina Torqueti
Aprovada em:	
	BANCA EXAMINADORA
. , . , ,	Assinatura:
	Assinatura:

Prof(a). Dr(a).

Instituição: — Assinatura: — —

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Dedico este trabalho aos meus pais Valdene e Pedro, por serem sempre meu porto seguro, pelos exemplos de caráter, perseverança, simplicidade e amor incondicional! Somente cheguei até aqui porque vocês acreditaram em mim e apoiaram nos momentos felizes e nos difíceis... Só tenho a agradecer a Deus por ter os melhores pais do mundo!

Dedico também esta tese às minhas falecidas avós Madalena Faria e Conceição Laurindo, pois desde pequena me incentivaram e mostraram como uma mulher pode ser batalhadora... Sei que hoje estão zelando por mim lá do Céu!

Agradeço aos meus amigos pela cumplicidade e companheirismo! Por compreenderem meus sumiços em épocas atarefadas e pelos brindes em momentos felizes! Pelos conselhos, risadas, puxões de orelha e principalmente pela paciência!

Tenho que agradecer a Deus todos os dias por ter colocado em minha vida amigos que me ensinaram muito como Patrícia, Genilza, Sheila, Aline, Gabriela, Priscila, Raquel, Márcio, Keila, Aline, Lucas, Natália, Gabriel, Sérgio, Augusto, Soninha, Thalita, Amanda, Willian, Daniela, Ana Maria, Juliana, Simone e Thuanny...

Agradeço á minha orientadora Professora Regina Torqueti pela oportunidade, pela confiança, pelos conselhos e ensinamentos que levarei sempre!

Agradeço ao Professor Pietro que me abriu as portas do seu laboratório para uma colaboração e transformou-se em um amigo! E agradeço também aos companheiros de laboratório que dividiram seu conhecimento comigo e também participaram de bons momentos: Ana Maria, Carolina, Marcelle, Daniela, Juliana, Simone, Maytê, Thuanny, Bruno, Ivana e Nilton!

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.

"Se enxerguei mais longe foi por estar sentado aos ombros de gigantes." (Isaac Newton, 1976)

Faria, A. N. Avaliação do efeito osteogênico por diferentes fitoestrógenos em cultura de osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A menopausa é provocada pela falência da produção de hormônios ovarianos e tem como consequências alterações desfavoráveis no metabolismo e perda de massa óssea. O declínio da produção de estrógeno é considerado um grande fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose em mulheres e como tratamento faz-se o uso da Terapia de Reposição Hormonal. No entanto, esta terapia tem trazido riscos á saúde de alguns grupos de mulheres. Como alternativa ao tratamento tradicional, tem-se os fitoestrógenos, e com eles as isoflavonas, encontradas principalmente na soja, Trifolium pratense e Cimicifuga racemosa. Este estudo teve como objetivo comparar a capacidade de estimular a osteogênese in vitro, a partir de cultura de osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais, em duas preparações de fitoestrógenos: O extrato de soja biotransformado pelo fungo Aspergillus awamori (ESBF), e o Menoflavon® 40mg (Melbrosin International) composto pela isoflavona Trifolium pratense. Para este objetivo foram realizadas: a) Avaliação do crescimento e proliferação celular b) Viabilidade e crescimento das culturas de osteoblastos. c) Dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos. d) Determinação da atividade específica da enzima fosfatase alcalina. e) Formação da matriz mineralizada. O Menoflavon<sup>®</sup> foi testado nas concentrações de 28,75 nM de daidzeína (D) + 7,5 nM de genisteína (G) (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon $^{\circ}$ ); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4 μg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); controle padrão de 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e controle de dimetilsulfóxido (DMSO). O ESBF foi testado nas concentrações de 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5 µg/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1 µg/mL de ESBF); 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4 µg/mL de ESBF); controle padrão de 2,361 nM de D + 1,845 nM de G comercial e controle de DMSO. Com a metodologia do MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) e da Resazurina comprovamos que não houve morte celular nas concentrações testadas com as duas formulações. A dosagem de proteínas totais manteve-se constante com as duas formulações e a formação de matriz mineralizada também manteve-se constante em relação ao controle para ambos. A atividade específica da fosfatase alcalina teve um decréscimo significativo ao 14º dia com todas as concentrações testadas e ao 21º dia com algumas concentrações de Menoflavon e com o ESBF decresceu em alguns dias, no entanto manteve-se estável no restante do teste. O ESBF mostrou ser melhor que o Menoflavon®, já que obtivemos resultados semelhantes e sua concentração é 24 vezes menor. No entanto, o estudo realizado mostrou que tanto o ESBF quanto o Menoflavon® não são capazes de estimular a osteogênese in vitro, a partir de cultura de osteoblastos derivados de células tronco mesenguimais.

**Palavras-Chave:** Menopausa, Isoflavonas, Extrato de Soja Biotransformado por fungo, Menoflavon<sup>®</sup>, Células Tronco Mesenquimais, Osteoblastos.

Faria, A. N. Evaluation of the osteogenic effect of different phytoestrogens in osteoblasts culture derived from mesenchymal stem cells. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Menopause is caused by failure in the production of ovarian hormones and its consequences are unfavorable changes in metabolism and bone loss. The decline in estrogen production is considered a major risk factor for the development of osteoporosis in women, and the Hormone Replacement Therapy is used as treatment. However, this therapy has brought some risks to the health of some groups of women. As an alternative to the traditional treatment, phytoestrogens as isoflavones, found mainly in soy, Trifolium pratense, Cimicifuga racemosa and rye can be used. This study aimed to compare the ability of two preparations of phytoestrogens to stimulate osteogenesis in vitro (from cultures of osteoblasts derived from mesenchymal stem cells): soy extract biotransformed by the fungus Aspergillus awamori (ESBF), and Menoflavon® 40mg (Melbrosin International) composed by the isoflavone *Trifolium pratense*. With this objective, were used: a) Evaluation of cell growth and proliferation; b) Viability of the cultures of osteoblasts; c) Determination of total protein from the cultures of osteoblasts; d) Determination of the specific activity of the enzyme alkaline phosphatase; e) Formation of mineralized matrix. Menoflavon® was tested at the concentrations of 28.75 nM of daidzein (D) + 7.5 nM of genistein (G) (Menoflavon® 0.5 µg/mL); 57.5 nM D + 15 nM G (Menoflavon® 1 µg/mL); and 230 nM D + 60 nM G (Menoflavon® 4 µg/mL); standard control of commercial 57.5 nM D + 15 nM G and DMSO control. ESBF was tested at the concentrations of 1.181 nM D + 0.922 nM G (ESBF 0.5 µg/mL); 2.361 nM D + 1.845 nM G (ESBF 1  $\mu$ g/mL); 9.445 nM D + 7.379 nM G (ESBF 4  $\mu$ g/mL); standard control of commercial 2.361 nM D + 1.845 nM G and dimetilsulfoxide (DMSO) control. With the MTT and Resazurin methods we verified that there was no cell death for all concentrations tested with the two formulations. The amount of total protein remained constant with the two formulations, and the formation of mineralized matrix also were the same as the control. The specific activity of alkaline phosphatase decreased significantly on day 14 for all concentrations tested, and at day 21 for some concentrations of Menoflavon®, with the ESBF decreased some days, however remained constant in the other tests. Therefore, ESBF proved better than Menoflavon®, since we obtained similar results for both, but the concentration of ESBF is 24 times smaller than the concentration of Menoflavon<sup>®</sup>. However, both the ESBF and the Menoflavon® were not capable of stimulating osteogenesis in vitro from cultures of osteoblasts derived from mesenchymal stem cells.

**Keywords:** Menopause, Isoflavones, Soy extract biotransformed by fungus, Menoflavon<sup>®</sup>, Mesenchymal stem Cells, Osteoblasts.

RESUMEN

Faria, A.N. Evaluación del efecto osteogénico de fitoestrógenos diferentes en osteoblastos cultivadas derivada de células madremesenquiales. 2013. 86f. Tesis (Master). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

La menopausia es causada por la falta de producción de hormonas ovaricas y sus consecuencias desfavorables cambios en el metabolismo y la pérdida ósea. La disminución en la producción de estrógeno se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de la osteoporosis en las mujeres y el tratamiento al igual que el uso de la Terapia de Reemplazo Hormonal. Sin embargo, esta terapia ha traído riesgos para la salud de algunos grupos de mujeres. Como una alternativa al tratamiento tradicional, tiene fitoestrógenos e isoflavonas con ellos, que se encuentra principalmente en la soja, Trifolium pratense y Cimicifuga racemosa. Este estudio tuvo como objetivo comparar la capacidad de estimular la osteogénesis en vitro, de la cultura de los osteoblastos derivados de células madre mesenquimales en dos preparaciones de fitoestrógenos: El estrato de soja biotransforma por el hongo Aspergillus awamori (ESBF), y Menoflavon® 40mg (Melbrosin Internacional) compuesto de isoflavonas Trifolium pratense. Para ello se llevaron a cabo: a) Evaluación del crecimiento y la proliferación celular. b) Viabilidad y el crecimiento de los osteoblastos cultivados. c) Determinación de la proteína total de cultivos de osteoblastos. d) Determinación de actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina. e) La formación de la matriz mineralizada. El Menoflavon<sup>®</sup> se probó a concentraciones de 28,75nM daidzeína (D) + 7,5nM genisteína (G) (0,5 μg/ml Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5nM D + 15nM G (1μg/ml Menoflavon<sup>®</sup>) y 230nM D + 60nM G (4 µg /mL Menoflavon®); patrón de control 57,5nM D + 15nM G comercial y el control de DMSO. El ESBF se ensayó a concentraciones de 1,181nM D + 0,922nM G (0,5  $\mu$ g/ml ESBF); 2,361nM D + 1,845nM G (1 $\mu$ g/ml ESBF); 9,445nM D + 7,379nM G (4 µg/ml ESBF), patrón de control de 2,361nM D + 1,845nM G comercial control y DMSO. Con la metodologia MTT y Resazurina demonstrado que ninguna muerte celular a las concentraciones ensayadas con ambas formulaciones. La dosis de proteína total se mantuvo constante con las dos formulaciones y la formación de la matriz mineralizada tambíen se mantuvo constante en comparación con el control para ambos. La actividad especifica fosfatasa alcalina tenían una disminución significativa en el día 14 con todas las concentraciones y al 21 días con algunas concentraciones de Menoflavon y la ESBF disminuido en unos pocos días, pero se mantuvo estable en el resto de la prueba. El ESBF demostrado ser mejor que Menoflavon<sup>®</sup>, ya que se obtuvieron resultados similares y su concentración es 24 veces menor. Sin embargo, el estudio demostró que tanto ESBF como Menoflavon® no son capaces de estimular la osteogenésis en vitro, a partir de cultivo de osteoblastos derivados de células madre mesenquimales.

**Palabras claves**: Menopausia, Isoflavonas, Extracto de Soja Biotransform por el hongo, Menoflavon<sup>®</sup>, Las células madre mesenquimales, Los esteoblastos.

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 01–	Custo médio da hospitalização de todas as causas de internação, segundo os grupos de idade - Brasil em 2006	02
Figura 02–	Representação esquemática do controle hormonal do sistema reprodutivo feminino	04
Figura 03–	Estrógenos e progesterona endógenos	05
Figura 04–	Representação esquemática do tecido ósseo e suas células	07
Figura 05–	Representação esquemática da diferenciação e auto renovação das células tronco mesenquimais e hematopoiéticas	10
Figura 06–	Estrutura química das isoflavonas e 17 β-estradiol	15
Figura 07–	Cultura de osteoblastos em placa antes da confluência celular, visualizado em microscópio de fase invertida (Axiovert 25, Carl Zeiss, Germany)	33
Figura 08–	Viabilidade celular dos osteoblastos com diferentes composições de meios de cultura	36
Figura 09–	Avaliação da citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos pela técnica do MTT	38
Figura 10–	Avaliação da citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos pela técnica da Resazurina	39
Figura 11–	Teste inicial de viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon <sup>®</sup> pela técnica do MTT	41
Figura 12–	Teste inicial de viabilidade celular com estímulos de ESBF pela técnica do MTT	42
Figura 13–	Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon <sup>®</sup> pela técnica do MTT	45
Figura 14–	Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF pela técnica do MTT	46
Figura 15–	Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos	

	de Menoflavon® pela técnica da Resazurina	48
Figura 16–	Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF pela técnica da Resazurina	49
Figura 17–	Dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon <sup>®</sup>	53
Figura 18–	Dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF	55
Figura 19–	Atividade específica da fosfatase alcalina das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon®	61
Figura 20–	Atividade específica da fosfatase alcalina das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF	63
Figura 21–	Formação da matriz mineralizada em culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon <sup>®</sup>	67
Figura 22–	Formação da matriz mineralizada em culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF	69
Figura 23–	Matriz mineralizada em culturas de osteoblastos corada com vermelho de alizarina ao 14º e 21º dia	71

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 01–	Viabilidade celular com diferentes composições de meio de cultura	36
Tabela 02–	Avaliação da citotoxicidade do DMSO pela técnica do MTT	37
Tabela 03–	Avaliação da citotoxicidade do DMSO pela técnica da Resazurina	39
Tabela 04–	Teste inicial de viabilidade celular com estímulos de Menoflavon® pela técnica do MTT	41
Tabela 05–	Teste inicial de viabilidade celular com estímulos de ESBF pela técnica do MTT	42
Tabela 06–	Viabilidade celular com estímulos de Menoflavon® pela técnica do MTT	45
Tabela 07–	Viabilidade celular com estímulos de ESBF pela técnica do MTT	46
Tabela 08–	Viabilidade celular com estímulos de Menoflavon® pela técnica da Resazurina	48
Tabela 09–	Viabilidade celular com estímulos de ESBF pela técnica da Resazurina	49
Tabela 10–	Dosagem de proteína total com estímulos de Menoflavon®	54
Tabela 11–	Dosagem de proteína total com estímulos de ESBF	56
Tabela 12–	Atividade específica da fosfatase alcalina com estímulos de Menoflavon <sup>®</sup>	62
Tabela 13–	Atividade específica da fosfatase alcalina com estímulos de ESBF	64
Tabela 14–	Formação da matriz mineralizada com estímulos de Menoflavon®	68
Tabela 15–	Formação da matriz mineralizada com estímulos de ESBF	70

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ADP** Adenosina difosfato

**ALP** Fosfatase alcalina (alkaline phosphatase)

**AMP** Adenosina monofosfato

ATP Adenosina trifosfato

**BMPs** Proteínas morfogenéticas ósseas

Col1 $\alpha$ 1 Colágeno tipo $1\alpha$ -1

CT Controle

CTH Célula tronco hematopoiética

**CTM** Célula tronco mesenquimal

**D** Daidzeína

**DMO** Densidade mineral óssea

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**EEC** Estrógeno equino conjugado

**eNOS** Óxido nítrico sintase endo

**ESBF** Extrato de Soja Biotransformado por Fungo

**FSH** Hormônio folículo estimulante

**G** Genisteína

**GLA** gamma-carboxyglutamic acid

**GLP-2** glucagon-like peptide 2

**GnRH** Hormônio de liberação das gonadotropinas

**HDL** Lipoproteína de alta densidade

**IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**LDL** Lipoproteína de baixa densidade

**LH** Hormônio luteinizante

MTT 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium

NO Óxido nítrico

PBS Tampão fosfato-salino

**PNF** p-nitrofenolato

**PNFFase** ρ-nitrofenilfosfatase

RANKL Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand

**SFB** Soro fetal bovino

**TNAP** Fosfatase alcalina tecido não-específica

**TRH** Terapia de reposição hormonal

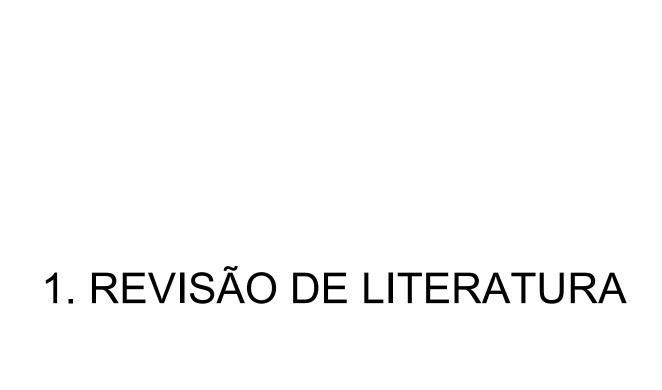
α-MEM Meio essencial mínimo com modificação α

# **SUMÁRIO**

RESUMO	II
ABSTRACT	IV
RESUMEN	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
1. REVISÃO DE LITERATURA	01
1.1 Introdução	02
1.2 Hormônios Sexuais Femininos	04
1.3 Menopausa	06
1.4 Constituição óssea	06
1.5Diferenciação das células tronco mesenquimais em	
osteoblastos	09
1.6 Papel do estrógeno no osso	11
1.7 Osteoporose	11
1.8 Terapia de Reposição Hormonal	12
1.9 Fitoestrógenos	14
1.10 Fitoestrógeno obtido a partir de soja biotransformada com	
fungo <i>Aspergillus awamori</i>	15
1.11 Isoflavonas na pesquisa científica	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21

	3.1 Extrato de Soja Biotransformado por Fungos	22
	3.2 Menoflavon <sup>®</sup>	22
	3.3 Preparo das soluções de tratamento das células	22
	3.4 Linhagem celular	23
	3.5 Isolamento e cultura de células tronco mesenquimais de ratos.	23
	3.6 Modificação do meio de cultura e avaliação da eficácia do	
	meio de cultura modificado	24
	3.7 Contagem das células com Azul de Tripan	25
	3.8 Citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos	25
	3.9 Ensaio de viabilidade celular com estímulos de diferentes	
	concentrações de fitoestrógenos pela metodologia do MTT	25
	3.10 Ensaio de viabilidade celular com estímulos de diferentes	
	concentrações de fitoestrógenos pela metodologia da	
	Resazurina	27
	3.11 Dosagem de proteína total	27
	3.12 Determinação da atividade específica da fosfatase alcalina	28
	3.13 Preparação das frações de membrana ricas em fosfatase	
	alcalina	28
	3.14 Avaliação do efeito dos fitoestrógenos na formação de matriz	
	mineralizada	29
	3.15 Análises estatísticas	29
4. RE	SULTADOS E DISCUSSÕES	30
	4.1 Contagem das células com Azul de Tripan	31
	4.2 Avaliação da eficácia do meio de cultura modificado	34
	4.3 Citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos	37
	4.4 Ensaio da viabilidade celular com estímulos de diferentes	
	concentrações de fitoestrógenos pela metodologia do MTT	40
	4.5 Ensaio da viabilidade celular com estímulos de diferentes	
	concentrações de fitoestrógenos pela metodologia da Resazurina	47
	4.6 Dosagem de proteína total	50
	4.7 Determinação da atividade específica da fosfatase alcalina	57
	4.8 Avaliação do efeito dos fitoestrógenos na formação de	

matriz mineralizada	65
4.9 Considerações finais	72
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76



#### 1.1 Introdução

De acordo com dados do censo demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) do ano de 2010, a população de idosos, ou seja, com 65 anos ou mais no Brasil tem um crescimento superior ás outras faixas etárias. Em 1991 esta taxa populacional era de 4,8%, passando para 5,9% em 2000, e atingindo o índice de 7,4% em 2010. O censo de 2010 também mostrou que a população feminina no Brasil é maior que a masculina. Em 2000 o censo já anunciava uma proporção de 96,9 homens para cada 100 mulheres, e esta proporção chegou a 96 homens para cada 100 mulheres no último censo, sendo um total de 3.941.819 mulheres a mais em relação ao número total de homens. Este resultado confirma a predominância historicamente comprovada do sexo feminino na população do Brasil (http://www.ibge.gov.br).

Uma das consequências do envelhecimento populacional foi o aumento dos gastos públicos com a saúde dos idosos como podemos observar na Figura 01; já que estes utilizam uma variabilidade maior de serviços de saúde, o tempo da sua internação é maior em decorrência da pluralidade de patologias e as internações são mais frequentes, em comparação ás outras faixas etárias (INDICADORES SOCIODEMOGRÁFICOS E DE SAÚDE NO BRASIL, 2009).

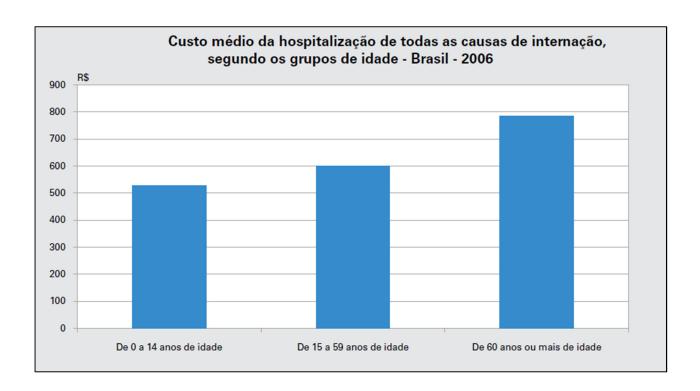


Figura 01 – Custo médio da hospitalização de todas as causas de internação, segundo os grupos de idade - Brasil em 2006. FONTE: Ministério da Saúde, Departamento de Informática do SUS- DATASUS, Sistemas de Informações Hospitalares do SUS, 2009.

A mulher ao envelhecer passa naturalmente pela menopausa, diminuindo progressivamente a secreção dos hormônios estrogênio e progesterona pelos ovários, o que causa mudanças desfavoráveis no metabolismo dos lipídios, da glicose e insulina e no sistema de coagulação/fibrinólise. No osso tem-se perda de massa, levando a uma maior fragilidade do esqueleto e risco de fraturas. (CRISAFULLI et al., 2005). Com o aumento da expectativa de vida brasileira, e do aumento da população de mulheres no Brasil (IBGE, 2010), estima-se que até 2030, mais de 1 bilhão e 200 milhões de mulheres estejam na menopausa (TRENCH et al., 2005).

A osteoporose é uma enfermidade crônica com alta incidência e prevalência nas mulheres na menopausa, onde a cada ano chega-se a perder de 1% a 3% de osso cortical e acima de 5% de osso trabecular (FERNANDES et al.; 1999). É considerada um problema de <u>Saúde Pública Mundial</u>, com repercussões clínicas e sociais devido à sua associação com as fraturas ósseas e consequente aumento dos gastos públicos para tratamento e reabilitação dos pacientes, além da perda da qualidade de vida dos idosos (COSTA-PAIVA et al., 2003).

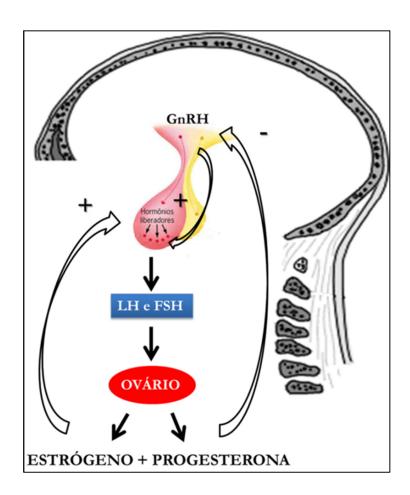
Para tratar os sintomas da menopausa, a literatura aponta os fitoestrógenos como alternativa para a terapia de reposição hormonal tradicional, pois esta aumenta a propensão a eventos tromboembólicos venosos e câncer de mama, além de contraindicações para pacientes com sobrepeso, histórico familiar de trombose e câncer.

Este estudo é de grande importância para a elucidação de dúvidas sobre a atividade dos fitoestrógenos no metabolismo ósseo, além de contribuir para a nossa área de conhecimento por explorar dois campos de grandes possibilidades futuras: o uso de células tronco mesenquimais e produtos naturais.

#### 1.2 Hormônios Sexuais Femininos

O sistema hormonal sexual feminino é composto pelo hormônio hipotalâmico de liberação, chamado de hormônio de liberação das gonadotropinas (GnRH), pelos hormônios adeno-hipofisários FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e LH (Hormônio Luteinizante), e pelos hormônios ovarianos: Estrógenos e Progesterona (Figura 02) (GUYTON & HALL, 2006).

A maturidade do sistema genital masculino e feminino é atingida na puberdade, época onde começam as ser desenvolvidas as características sexuais secundárias e é alcançado o potencial reprodutivo (TORTORA & GRABOWSKI, 2006).



**Figura 02** – Representação esquemática do controle hormonal do sistema reprodutivo feminino.

Os estrógenos são compostos esteroidais monofenólicos, que promovem a proliferação de algumas linhagens celulares e são responsáveis pelo aparecimento das características sexuais secundárias da mulher. Os estrógenos de ocorrência

natural no plasma feminino humano e presentes em quantidades significativas são o 17- $\beta$  estradiol, estriol e estrona, sendo que o 17- $\beta$  estradiol é o mais potente destes (Figura 03) (OSTERLUND & HURD, 2001 - GUYTON & HALL, 2006).

Já a progesterona tem como principal efeito a alteração da secreção no endométrio uterino, o preparando para a implantação do óvulo, caso ele seja fecundado, além de ser responsável pela diminuição das contrações uterinas, para evitar um possível aborto (GUYTON & HALL, 2006).

**Figura 03** - Estrógenos e progesterona endógenos. Adaptado de GUYTON & HALL, 2006.

O ciclo sexual feminino ocorre a partir da primeira menstruação ou menarca, e estende-se até a menopausa, onde há uma interrupção permanente das menstruações. Este período de vida fértil é conhecido como fase reprodutiva da mulher, ou menacme (TORTORA & GRABOWSKI, 2006).

#### 1.3 Menopausa

A transição entre a fase reprodutiva e a não reprodutiva nas mulheres é conhecida como climatério. Esta fase é consequência do esgotamento progressivo dos folículos ovarianos, e consequente decréscimo das taxas de estrógeno, culminando na interrupção definitiva da menstruação, conhecida como menopausa (BOSSEMEYER, 1999).

A menopausa é caracterizada pela ausência permanente dos períodos menstruais, decorrente da falência ovariana, que pode ocorrer fisiologicamente ou como resultado de intervenções medicamentosas e cirúrgicas com uma diminuição da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona pelos ovários (FILES; KO; PRUTHI, 2011). Essa diminuição causa mudanças desfavoráveis no metabolismo da mulher, como alterações nas lipoproteínas, lipídeos, distribuição da gordura corpórea, metabolismo da glicose e insulina e no sistema de coagulação/fibrinólise e perda da massa óssea, levando a uma maior fragilidade do esqueleto e risco de fraturas (CRISAFULLI et al., 2005), além dos sintomas de natureza somática que afetam o bem estar da mulher e consequentemente a sua qualidade de vida como ondas de calor, suor noturno, problemas de concentração, instabilidade emocional, distúrbios do sono (FILES; KO; PRUTHI, 2011). Dentre os sintomas que envolvam o epitélio vaginal tem-se o ressecamento da vagina, perda da libido, incontinência urinária, dispareunia (BARNABEI et al., 2002).

A North American Menopause Society calcula que até 2030, mais de 1 bilhão e 200 milhões de mulheres estejam na menopausa, devido á maior expectativa de vida no planeta (TRENCH et al., 2005).

Nas mulheres que chegam ao climatério, a perda de massa óssea está relacionada ao declínio agudo da produção ovariana de estrógeno, que tem ação protetora sobre o osso (SZEJNFELD, 2001) e este é considerado um grande fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose (SZEJNFELD, 2003). No início da deficiência ovariana, uma mulher chega a perder de 3 a 5% da sua massa óssea por ano (PRIOR et al., 1997).

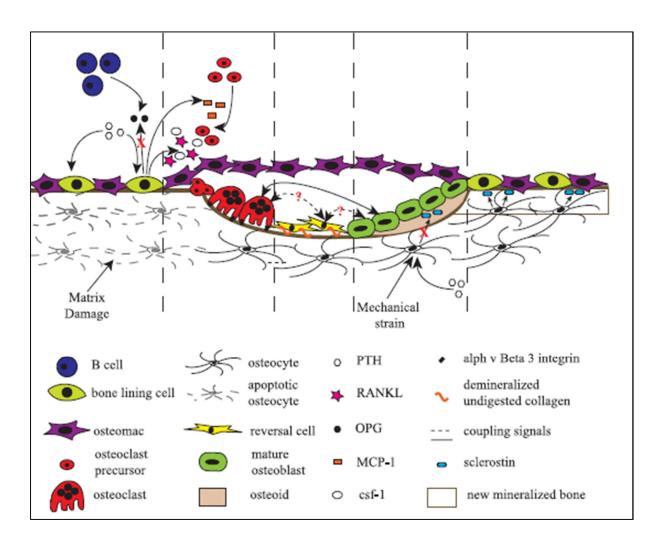
#### 1.4 Constituição óssea

O osso é um tecido dinâmico, com alta atividade metabólica, alto grau de rigidez e resistência à pressão. Esta rigidez deve-se principalmente á sua matriz

mineralizada, formada principalmente de colágeno tipo I (Col1α1), cálcio e fósforo, que na forma de fosfato de cálcio, formam os cristais de hidroxiapatita (SZEJNFELD, 2001 - BONNELYE & AUBIN; 2005).

O tecido ósseo tem como principais funções a proteção dos órgãos internos, apoio para os músculos e regulação da homeostase, pois armazena substâncias como os íons de cálcio e fósforo (SZEJNFELD, 2001).

Os constituintes celulares do tecido ósseo são os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e algumas células do sistema imunológico, como as células B, células T e osteomacs, como podemos observar na figura 04 (RAGGATT & PARTRIDGE. 2010).



**Figura 04** - Representação esquemática do tecido ósseo e suas células. RAGGATT & PARTRIDGE, 2010.

(PTH- Parathormone; RANKL- Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; OPG- Osteoprotegerin; MCP-1- monocyte chemotactic protein-1; csf-1- colony stimulating factor 1)

Os osteoblastos são células especializadas na formação dos ossos, e são os responsáveis pela produção da matriz, que posteriormente é mineralizada com a deposição dos cristais de hidroxiapatita (RAGGATT & PARTRIDGE, 2010). São células derivadas de células tronco mesenquimais (CTM), que sofrem esta diferenciação após receberem estímulos que ativam fatores de transcrição reguladores específicos (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2010). Possuem receptores para paratormônio, vitamina D<sub>3</sub>, glicocorticoides e estrógeno do tipo α e β, que estão envolvidos na regulação da diferenciação osteoblástica. (YAMAGUCHI; KOMORI; SUDA, 2000). Estes hormônios desempenham um importante papel no desenvolvimento das células ósseas e na manutenção da arquitetura do tecido ósseo (BONNELYE & AUBIN, 2005).

Entre as substâncias que os osteoblastos produzem, podemos citar a fosfatase alcalina (ALP), a osteocalcina ou proteína GLA (*gamma-carboxyglutamic acid*), o ligante RANK (RANKL - *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand*), a osteoprotegerina e grandes quantidades de colágeno do tipo 1α1 (Col1α1), além de uma variedade de outras proteínas colágenas e não colágenas da matriz (YAMAGUCHI; KOMORI; SUDA T, 2000). A ALP é encontrada no homem e primatas superiores em três isoformas distintas: placentária, intestinal e do ossofígado-rim. As isoformas intestinais e placentárias são expressas unicamente nestes tecidos, sendo conhecidas como tecido-específicas, enquanto a isoforma encontrada no osso-fígado-rim é encontrada em quase todos os tecidos, sendo por este motivo denominada com fosfatase alcalina tecido não-específica (TNAP). Esta isoforma é encontrada em níveis elevados nas membranas dos osteoblastos durante a formação e mineralização do tecido ósseo (ANDERSON, 1995)

Esta enzima catalisa uma reação de hidrólise em meio alcalino, onde é gerado fosfato inorgânico, utilizado na formação do fosfato de cálcio que se deposita na forma de cristais de hidroxiapatita no processo de mineralização (SIMÃO, 2008).

Estudos referentes à participação da ALP no processo de calcificação demonstraram a presença de duas formas enzimáticas: uma associada à membrana e outra solúvel; No entanto, apenas a forma ancorada à membrana tem sido associada ao processo de mineralização (SAY et al., 1991).

Cabe ressaltar que quantificar especificamente os níveis de fosfatase alcalina presente nestas células resulta no monitoramento do processo de biomineralização,

podendo ser considerado como um biomarcador fenotípico (CIANCAGLINI et al., 2010).

Os osteoclastos são células multinucleadas diferenciadas, originadas de precursores hematopoiéticos mononucleados. Produzem proteases responsáveis pela remoção da matriz mineralizada óssea, como a catepsina K e a metaloproteinase 9. Expressam receptores de calcitonina, fosfatase ácida tartaratoresistente e RANK e estão presentes principalmente nas lacunas de reabsorção dos ossos trabeculares, eles aparecem na superfície do osso e são responsáveis pela reabsorção, que é o processo por meio de onde cristais de fosfato de cálcio são removidos do osso e são absorvidos pelo sangue. As unidades de remodelação óssea são independentes e individuais, compondo-se cada uma de osteoblastos para formação e osteoclastos para a reabsorção do tecido ósseo (ATMACA et al.; 2008 - RAGGATT & PARTRIDGE; 2010)

#### 1.5 Diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos

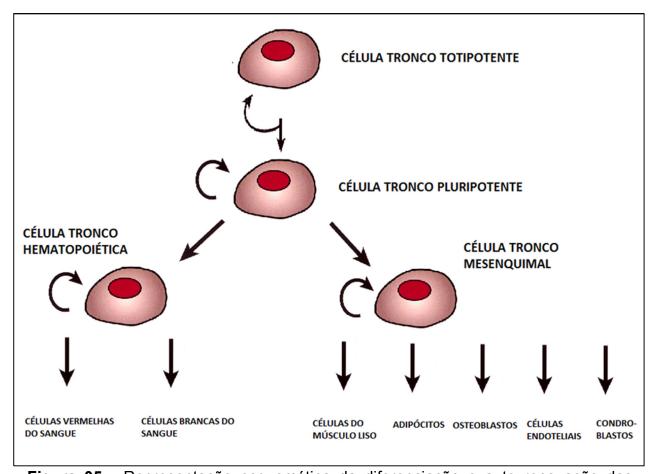
Entre os constituintes da medula óssea, encontramos as células tronco hematopoiéticas (CTH) e células tronco mesenquimais (CTM) (CONRAD & HUSS, 2005). As CTM têm capacidade de auto renovação e habilidade de se diferenciar em variados tipos celulares da linhagem mesodérmica, como adipócitos, condroblastos, células de músculo liso, células endoteliais e osteoblastos como mostrado na figura 05. Além de pesquisas recentes mostrarem que há a possibilidade de transdiferenciação das CTM em células neuronais e células progenitoras pancreáticas (POUNTOS & GIANNOUDIS, 2005 – VATER; KASTEN; STIEHLER, 2010). São células capazes de migrar para locais de lesão tecidual e promover a manutenção e regeneração deles (NAUTA & FIBBE, 2007).

Além da medula óssea, as CTM têm sido isoladas de uma ampla variedade de órgãos e tecidos, como sangue de cordão umbilical, placenta, tecido adiposo, sangue menstrual, pâncreas, periósteo, fígado e baço. (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2010)

Quando diferenciadas em osteoblastos, as CTM deixam de ter aparência fibroblástica e adquirem formato cuboide, começam a produzir matriz extracelular rica em Col1α1 e aumentam a expressão de ALP, além de notar-se acúmulo de cálcio.

Em um nível molecular, esta diferenciação é controlada pela interação de alguns hormônios e fatores de transcrição. São considerados marcadores da diferenciação osteoblástica: Runx-2, ALP, Col1α1, osteocalcina, TGF-β1 (*Transforming growth fator β 1*) entre outros. (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2010).

As CTM podem ser cultivadas *in vitro*, utilizando-se combinações de dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato e ácido ascórbico. Também se pode utilizar vitamina D<sub>3</sub>, TGF- $\beta$  e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). A dexametasona é um glicocorticoide sintético que induz fatores de transcrição, no entanto seu mecanismo de ação não está completamente elucidado. O  $\beta$ -glicerofosfato é hidrolisado pela enzima fosfatase alcalina, servindo como fonte de fosfato inorgânico, utilizado na formação dos cristais de fosfato de cálcio na mineralização da matriz extracelular. Já o ácido ascórbico serve como cofator da hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina no Col1 $\alpha$ 1, além da sua falta reduzir a expressão de ALP e inibir o acúmulo de cálcio (FERNANDES et al.; 2009 – VATER; KASTEN; STIEHLER, 2010).



**Figura 05** - Representação esquemática da diferenciação e auto renovação das células tronco mesenquimais e hematopoiéticas.

#### 1.6 Papel do estrógeno no osso

Estudos apontam que o estrógeno tem um efeito protetor ósseo por diminuir sua reabsorção, prevenindo a perda de massa óssea e reduzindo o risco das fraturas (WHEDON, 1981). O estrógeno também melhora a absorção de cálcio no trato intestinal e diminui a perda de cálcio pela urina (HEANEY; RECKER; SAVILLE, 1987).

A literatura também mostra que o estrógeno modula positivamente a síntese de DNA nos osteoblastos e diminui a reabsorção óssea por inibir a proliferação e maturação dos osteoclastos (SOMJEN et al., 2011), e eleva a forma ativa de vitamina D na circulação e estimula a produção de calcitonina, que previne a remoção de cálcio do osso (RICHART & LINDSAY, 1987).

SZEJNFELD em 2004 mostrou que o estrógeno aumenta a densidade óssea da coluna e fêmur, além da redução em 50% do risco de fratura em qualquer sítio esquelético.

#### 1.7 Osteoporose

A osteoporose é considerada um problema de <u>Saúde Pública Mundial</u>, com repercussões clínicas e sociais devido à sua associação com as fraturas ósseas e perda da qualidade de vida. Devido ao aumento da expectativa de vida e, consequentemente, da proporção de idosos na população em geral, é esperado que a prevalência de osteoporose também aumente. Este problema causa um aumento dos gastos relacionados ao tratamento tanto para a rede pública quanto para a privada. Um grande problema de saúde pública das mulheres na pós-menopausa são as fraturas relacionadas à osteoporose (MARQUES, 2000).

Por volta dos 35 anos de idade, mulheres e homens atingem o pico de massa óssea. Após essa idade, as mulheres perdem aproximadamente 1% de sua massa óssea por ano e podem perder até 6% por ano durante os primeiros 5 anos após a menopausa. Os homens apenas começam a perder massa óssea, cerca de 0,3% por ano, por volta dos 50 anos (BORELLI, 2000).

Nos indivíduos acima de 35 anos, principalmente do sexo feminino, a formação óssea não consegue repor de forma eficiente a massa óssea perdida durante a atividade osteoclástica (LUKERT, 1987), há redução da massa esquelética

e os ossos tornam-se progressivamente porosos e suscetíveis às fraturas. Esta redução de massa óssea ao longo do tempo é conhecida como perda óssea involutiva (ALOIA; COHN; OSTUNI, 1987).

A osteoporose acontece quando os osteoclastos criam uma cavidade excessivamente profunda nos ossos e os osteoblastos não conseguem preenchê-la completamente ou quando estes não conseguem preencher uma cavidade de reabsorção normal (NORDIN et al., 1997).

Nas mulheres após a menopausa, há um grande desequilíbrio entre os processos de reabsorção e remodelação. Os osteoblastos, apesar de ativos, não são capazes de reconstruir completamente as cavidades ósseas reabsorvidas pelos osteoclastos e a partir daí inicia-se uma perda excessiva de massa óssea (NECO, 1994).

#### 1.8 Terapia de Reposição Hormonal

Para tratar vários sintomas que a menopausa provoca nas mulheres, pode-se fazer uso da Terapia de Reposição Hormonal (TRH), que basicamente é a administração do hormônio estrógeno em associação ou não com progestágeno para mimetizar ao máximo a produção fisiológica da fase reprodutiva (HANS et al., 1988). Em mulheres que possuem o útero intacto, deve-se fazer uso da TRH com estrógenos associados à progestágenos, pois este último sozinho pode causar a hiperplasia endometrial. Já em mulheres histerectomizadas, comumente utiliza-se o estrógeno isolado. Os estrógenos mais comumente utilizados na TRH são o estrógeno equino conjugado (EEC), o 17 β-estradiol e o valerato de estradiol (CHRISTIANSEN, 2001). Estes podem ser administrados por via oral, intramuscular, transdérmica, vaginal, intranasal ou subcutânea (AL-AZZAWI, 2001).

Os benefícios do estrógeno se estendem além do sistema reprodutor feminino, pois ele aumenta a irrigação sanguínea do cérebro, o que acarreta em uma melhora da capacidade cognitiva, aumenta a quantidade de colágeno da pele e mucosas, atua sobre os canais de cálcio e na produção de óxido nítrico, promovendo a vasodilatação do tecido vascular (GENAZZANI & GAMBACCIANI, 2001).

A terapia de reposição hormonal (TRH) é mais eficaz quando administrada em mulheres nos primeiros anos após a menopausa, quando ainda não houve grande perda da densidade óssea (SZEJNFELD, 2004).

Entretanto, estudos mostraram que as mulheres que fazem uso de terapia estro-progestiva têm uma maior propensão a eventos tromboembólicos venosos e câncer de mama, e atualmente é contraindicada para pacientes com fatores de risco como sobrepeso, tendência ou histórico familiar de trombose e câncer (HICKEY; DAVIS; STURDEE, 2005).

Um dos importantes estudos sobre a TRH, conhecido como *HERS* (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*), utilizou estrógenos conjugados a progesteronas para testar a sua prevenção secundária á doenças coronarianas na pós- menopausa. Os resultados mostraram que além de não apresentar redução das doenças coronarianas, ainda houve um aumento das doenças vesiculares e eventos tromboembólicos (HULLEY et al., 1998).

Outro estudo foi idealizado pelo grupo Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators para avaliar os riscos e benefícios da TRH (WHI, 2002). Este estudo selecionou mulheres de 50 a 79 anos, saudáveis e com útero íntegro que já estivessem na menopausa, e estas seriam comparadas ao placebo por 8,5 anos. Entretanto, houve uma elevação do risco relativo de eventos cardiovasculares e câncer de mama entre as pacientes que faziam uso da TRH, e o estudo foi precocemente finalizado ao tempo de 5,2 anos. Os dados obtidos com esta pesquisa mostraram que houve uma diminuição de fraturas ósseas e câncer de cólon nas usuárias de TRH.

Como alternativa para a TRH tradicional, a literatura aponta os fitoestrógenos, que são compostos não esteroidais, mas estruturalmente semelhantes ao estrógeno e que agem como agonista deste, produzindo efeitos estrogênicos em mamíferos, ou agem como antagonista dos receptores de estrógeno, bloqueando ou alterando seu mecanismo de ação (MACKEY; EDEN, 1998).

#### 1.9 Fitoestrógenos

Fitoestrógenos são um heterogêneo grupo de substâncias presentes nas plantas, que tem estrutura similar ao 17-β estradiol, no entanto são moléculas não esteroidais. Atualmente, conhece-se mais de 100 moléculas de fitoestrógenos, que são divididas de acordo com sua estrutura química, como isoflavonas, lignanas, coumestranas (WARREN; SHORTLE; DOMINGUES, 2002).

Entre os fitoestrógenos, as isoflavonas são um grupo encontrados em leguminosas como a soja (*Glycine max*), red clover (*Trifolium pratense*) e outras plantas como a *Cimicifuga racemosa* (origem americana), centeio (REINLI & BLOCK, 1996).

Nos alimentos, as isoflavonas estão presentes na forma glicosilada, principalmente como genisteína (G) (4,5,7-triidroxiisoflavona) e daidzeína (D) (4,7-diidroxiisoflavona) e em quantidades inferiores como gliciteína, fomononetina e biocianina A (MURPHY et al., 1999) e podemos observar suas estruturas químicas na figura 06. No trato gastrointestinal, elas são convertidas por bactérias naturais da microbiota em suas formas agliconas, que tem biodisponibilidade maior e são mais rapidamente absorvidas (KAWAKAMI; TSURUGASAKI; OSADA, 2005). As isoflavonas agliconas sofrem um processo de conjugação á proteínas ao chegar na parede intestinal e fígado, e nesta forma são levadas á corrente sanguínea e consequentemente aos seus sítios de atuação (ALVES & SILVA, 2003).

No trato gastrointestinal a daidzeína é metabolizada á diidrodaidzeína, O-desmetil-angolesina e equol. De acordo com SETCHELL et al. (2002) a capacidade de produzir equol é singular em cada organismo e está diretamente relacionada á variabilidade de benefícios que as isoflavonas proporcionam quando compara-se um ser humano a outro. Sendo assim, os produtores de uma quantidade maior de equol podem ser mais beneficiados em comparação aos não produtores.

Em relação ao metabolismo, as isoflavonas podem desempenhar tanto funções estrogênicas quanto antiestrogênicas, dependendo para esta seleção, de fatores como a sua concentração, características individuais, como o teor de estrógenos endógenos e a fase da menopausa em que a mulher se encontra (BARNES, 2004).

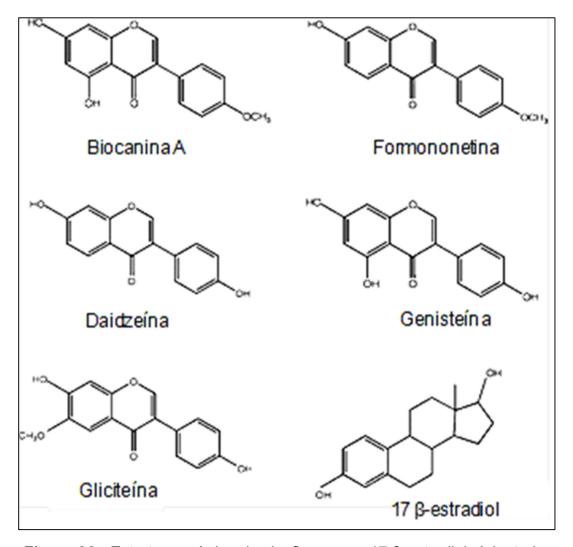


Figura 06 - Estrutura química das isoflavonas e 17 β-estradiol. Adaptado de BECK et al., 2005.

### 1.10 Fitoestrógeno obtido a partir de soja biotransformada com fungo Aspergillus awamori

O nosso trabalho envolveu o estudo de uma preparação de soja biotransformada por fungo. O Extrato de Soja Biotransformado por Fungo (ESBF) foi produzido no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da professora Dra. Maria José Vieira Fonseca, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP e cedido gentilmente às nossas pesquisas. Este extrato foi obtido a partir da ação enzimática da β-glicosidase do fungo Aspergillus awamori frente à farinha de soja cuidadosamente selecionada e

processada (GEORGETTI, 2007 - GEORGETTI et al., 2009). Este extrato apresentou uma melhor absorção intestinal do que os demais citados na literatura.

Dados preliminares do nosso grupo (Projeto FAPESP – 2009/002630-6) envolvendo esta preparação de ESBF atesta que este extrato possui capacidade de inibir a enzima aromatase; responsável pela conversão da testosterona em estradiol e androstenediona em estrona, podendo ser responsável por um efeito protetor contra o câncer de mama (FUMAGALLI, 2011).

#### 1.11 Isoflavonas na pesquisa científica

Pesquisas recentes indicaram que as isoflavonas possuem função de antioxidante, pois possui capacidade de prevenir o estresse oxidativo causado por moléculas de O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e OH<sup>-</sup> que causam danos nos lipídeos de membrana, nas proteínas celulares no DNA, o que pode contribuir para o aparecimento de doenças como a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (ARORA; NAIR; STRASBRUG, 1998).

Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisadores comparando a capacidade de estimular a produção de óxido nítrico por células endoteliais da linhagem ECV304 entre 3 tipos diferentes de extratos de fitoestrógenos (Menoflavon  $N^{\otimes}$  - *Trifolium pratense* suplementado com Cálcio e vitamina  $D_3$ , *Trifolium pratense* e *Cimicifuga racemosa*) chegou ao resultado que o Menoflavon  $N^{\otimes}$  obteve um aumento da produção de NO acima de 39,88%; *Trifolium pratense* aumentou a produção de NO em 24,9%; *Cimicifuga racemosa* aumentou em 26,98%, comparadas com 42,09% do 17- $\beta$  estradiol (PAULO et al., 2008).

A literatura aponta que o *Trifolium pratense* é um vegetal com atividade estrogênica, pois se liga aos receptores de estrógeno, e que o medicamento corresponde a cerca de 18 microgramas de 17β-estradiol por g de extrato para receptores ERα e cerca de 78 mg de 17β-estradiol por g de extrato de *Trifolium pratense* para receptores ERβ. Atestando assim, sua maior atividade estrogênica nos receptores β, daí sua importância no tratamento dos sintomas da menopausa, fazendo a prevenção do tumor de câncer de mama, tanto questionado como efeito colateral da reposição estroprogestiva (DORNSTAUDER et al., 2001).

Nos estudos de PIERSEN et al. (2004), com ratas ovariectomizadas, foi administrado 250mg, 500mg e 750mg/Kg de extrato de *Trifolium pratense*,

diariamente. Após 21 dias foi feito um aspirado do epitélio vaginal destas fêmeas, de onde observou-se uma cornificação estrogênica no referido epitélio, sendo o resultado progressivo de acordo com a dose administrada (maior atividade estrogênica observada com a concentração de 750mg/Kg do extrato de *Trifolium pratense*). Estes mesmos autores observaram que na concentração de 750mg/Kg houve um maior desenvolvimento do epitélio mamário das ratas.

CLIFTON-BLIGH et al. (2001) reportam também atividade da *Trifolium pratense* no metabolismo lipídico, onde as pacientes receberam 28,5mg , 57mg e 85,5mg do extrato por dia, durante seis meses. Houve um aumento significativo nos níveis séricos de HDL-colesterol da ordem de 15,7% a 28,6% com as diferentes doses testadas, e com relação à apolipoproteína B uma diminuição significativa da ordem de 11,5% a 17% nas mesmas doses citadas acima. Resultados semelhantes a este foram obtidos por ATKINSON et al. (2004a e b), avaliando o perfil lipídico, pressão sanguínea, fibrinogênio e PAI-1 (Inibidor do Ativador de Plasminogênio); estes autores observaram que 43,5mg do extrato de *Trifolium pratense*, administrado por 12 meses em mulheres de 49 a 65 anos, promoveram uma moderada proteção do risco cardiovascular, pois diminuiu significativamente os valores de triglicérides e PAI-1 séricos.

O medicamento Menoflavon<sup>®</sup> (40mg), foi avaliado por SIMONCINI et al. (2005) em cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano, onde avaliaram a produção de NO (óxido nítrico) e se o mesmo era dependente da enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial). Estes autores atestaram uma maior liberação de NO no sobrenadante desta cultura estimulado por isoflavonas após 48 horas de incubação. (SIMONCINI et al., 2005).

Vários estudos tentam correlacionar a influência das isoflavonas no metabolismo do tecido ósseo. RASSI et al. (2002) examinaram os efeitos do 17 β-estradiol e da daidzeína no desenvolvimento e na atividade dos osteoclastos *in vitro*, concluindo que ambos inibem a diferenciação dos osteoclastos, este fato ocorre pelo aumento da apoptose de seus precursores. No entanto, há dados muito divergentes sobre este assunto; em testes *in vivo* FANTI et al. (1998) administraram genisteína no tecido subcutâneo de ratas ovariectomizadas e relataram uma elevação no número de osteoblastos, no entanto não obtiveram diferença significativa nos seus parâmetros de reabsorção óssea.

A literatura aponta que o Menoflavon N<sup>®</sup>, medicamento á base de fitoestrógenos e cálcio, foi testado em um estudo duplo cego placebo controlado, promoveu uma maior densidade mineral óssea (DMO) quando testado em pacientes de 49 a 65 anos de idade, tomando 40mg durante um ano (CLIFTON-BLIGH et al., 2001 - ATKINSON et al., 2004a).

HA et al. (2010) relataram em que o fitoestrógeno formononetina preveniu a perda óssea em ratas ovariectomizadas tratadas com 1 e 10 mg/kg/dia por injeção intraperitoneal e avaliadas por nove semanas. O grupo tratado com D + G, assim como o tratado com formononetina mostrou aumento da densidade mineral óssea da tíbia ao final das 9 semanas.

LI et al. (2012) investigaram os efeitos da G na homeostase do osso subcondral mandibular de ratas ovariectomizadas. Em estudo com ratas ovariectomizadas alimentadas por gavagem com 10 e 50mg/kg de G ou placebo por 6 semanas, a G aumentou significativamente a DMO e o volume ósseo em ambas as concentrações.

Em contrapartida do grande volume de pesquisas *in vivo* envolvendo fitoestrógenos e o metabolismo ósseo, pouco se fala na literatura sobre pesquisas *in vitro*. Sendo assim, nosso grupo veio investigar os efeitos de duas preparações, formadas basicamente de daidzeína e genisteína em cultura de osteoblastos.

#### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é investigar os possíveis efeitos osteogênicos *in vitro* dos extratos de fitoestrógenos: Extrato de Soja Biotransformado e Menoflavon<sup>®</sup> em cultura de osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais.

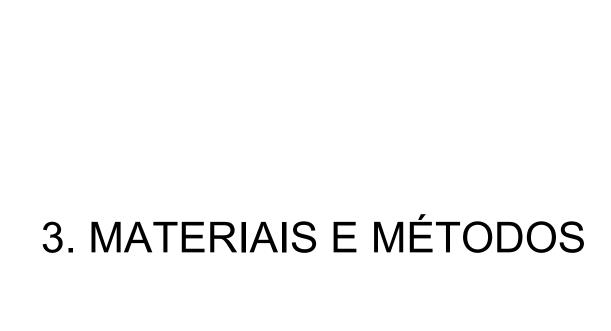
#### 2.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos de dois compostos de fitoestrógenos:

- Extrato de Soja Biotransformado por Fungo
- Menoflavon® *Trifolium pratense* (Melbrosin International)

Os testes a serem realizados com as duas preparações são:

- a) Avaliação do crescimento e proliferação celular
- b) Viabilidade e crescimento das culturas de osteoblastos
- c) Dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos
- d) Determinação da atividade específica da enzima fosfatase alcalina
- e) Formação da matriz mineralizada



#### 3.1 Extrato de Soja Biotransformado por Fungo

A obtenção do ESBF foi feito no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos e foi gentilmente cedido ao nosso grupo de pesquisa.

Como parte do processo de obtenção, os grãos da soja (*Glycine max*), variedade Dko, foram secos e moídos em moinho de martelo. O pó de soja foi submetido ao processo de extração do óleo de acordo com procedimento padronizado por GEORGETTI (2007), passando por uma homogeneização com isopropanol e centrifugação para desengordurar a farinha de soja. A farinha de soja desengordurada foi posteriormente biotransformada empregando um filtrado aquoso contendo as enzimas (β-glicosidase) do fungo proveniente da cultura semissólida de *Aspergillus awamori* em farinha de soja, como única fonte de carbono. Após a incubação, a farinha de soja biotransformada foi extraída com solução hidroetanólica (etanol a 50 ou 80%). Após a agitação por 2 horas à temperatura ambiente, a suspensão foi filtrada em papel filtro, sob pressão a vácuo. O filtrado foi concentrado visando obtenção de um extrato hidroetanólico com 12% de sólidos totais. O extrato hidroetanólico (extrato de soja biotransformada) foi caracterizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para a quantificação de genisteína e daidzeína.

#### 3.2 Menoflavon®

Medicamento da indústria Melbrosin International e comercializado na Itália, constituído pelas isoflavonas contidas na planta *Trifolium pratense*, sendo que na caixa tem-se 30 comprimidos, sendo que cada comprimido contém 40mg de isoflavonas, sendo 0,6mg de genisteína, 9,6 mg de biocianina, 2,3mg de daidzeína e 27,5mg de formononetina (SIMONCINI et al., 2005).

#### 3.3 Preparo das soluções de tratamento das células

As diluições foram preparadas utilizando a solução-estoque e meio de cultura α-MEM. A concentração final de DMSO nas culturas foi de 0,05%.

Para todos os testes realizados, foram utilizadas preparações de Menoflavon<sup>®</sup> contendo 28,75 nM de daidzeína (D) e 7,5 nM de genisteína (G) (correspondente a 0,5 μg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D e 15 nM de G (correspondente a 1 μg/mL

de Menoflavon<sup>®</sup>) e 230 nM de D e 60 nM de G (correspondente a 4 µg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>).

Também foram utilizadas preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D e 0,922 nM de G (correspondente a 0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D e 1,845 nM de G (correspondente a 1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D e 7,379 nM de G (correspondente a 4  $\mu$ g/mL de ESBF).

#### 3.4 Linhagem celular

Neste estudo foram utilizadas culturas primárias de osteoblastos provenientes da diferenciação de células tronco mesenquimais de ratos machos Wistar.

#### 3.5 Isolamento e cultura de células tronco mesenquimais de ratos

Este procedimento foi feito conforme descrito por Simão et al. (2007). A obtenção das células foi realizada pela extração dos fêmures de ratos machos da linhagem Wistar criados em biotério convencional (4 ratos por caixa, cerca de 24°C de temperatura ambiente, umidade ambiente, 12 horas de luz e 12 horas de escuro) durante procedimento cirúrgico utilizando antisséptico, campo cirúrgico e instrumentos estéreis. O animal foi eutanasiado por overdose de anestésico Ketamina Agener (230 mg/Kg) e Xilasina (35 mg/Kg). Após sua morte, foi feita a antissepsia local com álcool iodado 1% para a retirada local da pele do animal. Após a retirada da pele foi feita a assepsia do local com clorexidina 2,5% e em seguida retirou-se os tecidos necessários para chegar até o fêmur que foi deslocado com cortes de tesoura nas articulações. Os fêmures retirados foram colocados em meio de transporte, que é composto por meio essencial mínimo com modificação α (α-MEM), antifúngico (fungisona) e antibiótico (gentamicina) para a posterior extração de medula óssea. Foram realizadas três passagens em meio de transporte antes da extração da medula óssea. Cada passagem teve duração de no mínimo 30 minutos, entre uma passagem e outra os restos de tecidos presos ao fêmur foram retirados com o auxilio de um bisturi. Em seguida, com auxílio de uma pinça, se segura o fêmur e fez-se um corte com tesoura em cada extremidade e, com auxílio de uma seringa fez-se uma lavagem interna do fêmur com cerca de 10 mL de meio de cultura extraindo toda a medula óssea contida. O meio de cultura 15% com a medula óssea foram distribuídos em garrafas de cultura primária e cultivados em incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico, onde permaneceram durante todo o tempo de cultivo. O procedimento de extração da medula óssea foi todo realizado dentro de uma capela de fluxo laminar.

O meio de cultura utilizado é composto por  $\alpha$ -MEM (Meio Mínimo Essencial modificação  $\alpha$ , Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco), 0,3 µg/ml de fungisona (Gibco), dexametasona  $10^{-5}$ M (Sigma, St. Louis, MO, USA), 5,0 µg/l de ácido ascórbico (Sigma) e 7 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma). Os meios foram trocados a cada 3 ou 4 dias. O desenvolvimento da cultura de células foi avaliado em microscópio de fase invertida (Axiovert 25, Carl Zeiss, Germany) por um período de 3 a 4 semanas. Ao final deste período as células confluentes foram liberadas das placas pelo tratamento com tripsina 0,25% (Gibco) e EDTA 1 mM (*Ethylenediamine-tetraacitic acid*, Gibco) e transferidas para placas contendo 24 ou 96 poços cada (Falcon, Franklin Lakes, USA) numa concentração de 2x10⁴ células/poço e o meio de cultura convencional foi trocado pelo  $\alpha$ -MEM sem vermelho de fenol suplementado com soro fetal bovino depletado de estrógeno.

## 3.6 Modificação do meio de cultura e avaliação da eficácia do meio de cultura modificado

Foram testados meios de cultura suplementados parcialmente semelhantes ao meio de cultura tradicional utilizado no crescimento de osteoblastos:  $\alpha$ -MEM tradicional, 50  $\mu$ g/ml de gentamicina (Gibco), 0,3  $\mu$ g/ml de fungisona (Gibco), dexametasona  $10^{-5}$ M (Sigma, St. Louis, MO, USA), 5,0  $\mu$ g/l de ácido ascórbico (Sigma), 7 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma) e SFB (Sigma).

As modificações no meio de cultura basearam-se na troca do α-MEM tradicional pelo α-MEM sem vermelho de fenol e na troca do SFB comum pelo SFB depletado de estrógeno a 15% (Gibco) e SFB depletado de estrógeno com carvão ativado do próprio laboratório de pesquisa. Sendo testados:

- α-MEM tradicional e SFB normal
- α-MEM tradicional e SFB depletado de estrógeno (Sigma)
- α-MEM sem vermelho de fenol e SFB normal
- α-MEM sem vermelho de fenol e SFB depletado de estrógeno (Sigma)

 α-MEM sem vermelho de fenol e SFB depletado de estrógeno (Depletado com carvão ativado no próprio laboratório)

#### 3.7 Contagem das células com Azul de Tripan

Foi preparada uma solução com Azul de Tripan na concentração de 0,1% (p/v) e foi filtrada em um filtro 0,22μm. A suspensão celular foi diluída na proporção 1:1 (v/v) com o corante. Após 10 minutos de incubação esta suspensão foi diluída apropriadamente em solução salina (PBS) para permitir uma fácil contagem de células em cada campo da câmara de Neubauer em microscópio óptico, possibilitando-se assim estimar a relação que há entre as células viáveis e as células lisadas.

#### 3.8 Citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos

O ESBF e o Menoflavon<sup>®</sup> foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) em soluções-estoques. Entretanto, sabendo-se da alta toxicidade celular do DMSO em concentrações elevadas (KATKOV et al., 2011), foi testado nos osteoblastos as concentrações de 0,01%; 0,1%; 0,5%; 1%; 5% e 10% em uma exposição de 24 horas a fim de conhecer quais concentrações poderiam ser utilizadas com segurança, isto é, sem causar morte celular provocada pelo diluente.

Para isto, foram realizados os ensaios do MTT e da Resazurina com as culturas de células.

## 3.9 Ensaio de viabilidade celular com estímulos de diferentes concentrações de fitoestrógenos pela metodologia do MTT

Determina-se espectrofotometricamente através deste ensaio o número total de células com a função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

No teste de viabilidade celular utilizamos o corante MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium). Soluções de MTT dissolvidas em meio ou em soluções salinas, balanceadas na ausência de indicador vermelho de fenol, são de cor amarelada. A desidrogenase mitocondrial das células viáveis atua sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan de cor púrpura, os quais são insolúveis

em solução aquosa. Os cristais são então dissolvidos em isopropanol acidificado. O produto obtido é monitorado espectrofotometricamente em 560 e 690 nm através de um sistema Elisa de análise de multiplaca. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade dos cristais de formazan formado, indicando assim o grau de viabilidade/citotoxicidade (Mosmann, 1983; Vistica, 1991).

O método do MTT de monitoramento da viabilidade/citotoxicidade *in vitro* é bem estabelecido para o uso com placas de poços múltiplos. Para melhores resultados, foram empregadas as células na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não excedeu 1,0x10<sup>6</sup> células/mL.

Testes-piloto foram inicialmente realizados a fim de definir as concentrações que futuramente seriam utilizadas nos testes. Para isto, a viabilidade celular foi analisada com estímulos de ESBF e do Menoflavon<sup>®</sup> nas concentrações de 0,5  $\mu$ g/mL; 1  $\mu$ g/mL; 4  $\mu$ g/mL; 6  $\mu$ g/mL; 8  $\mu$ g/mL; 10  $\mu$ g/mL e 12  $\mu$ g/mL de isoflavonas totais.

Após a realização dos testes-piloto, as células foram cultivadas em placa de 96 poços e incubadas com preparações de Menoflavon<sup>®</sup> contendo 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>).

As células também foram incubadas com preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF).

Os ensaios foram realizados em tempo de incubação de 24 horas, sempre em triplicata. Após o período de incubação, o sobrenadante foi subtraído e, em cada poço, foi adicionado 10µL de solução estoque de MTT (5 mg/mL) e incubado por mais 4 horas.

Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e então foi acrescida a solução estabilizadora. A absorbância foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 560 e 690 nm.

## 3.10 Ensaio de viabilidade celular com estímulos de diferentes concentrações de fitoestrógenos pela metodologia da Resazurina

A Resazurina foi utilizada como metodologia comparativa ao MTT. Constituise como um corante utilizado para verificar a presença de células viáveis. Inicialmente a Resazurina possui coloração azul, no entanto é oxidada á resofurina de coloração rosa/avermelhada na presença de células viáveis. Esta mudança na coloração permite a verificação da presença de crescimento celular.

As células foram cultivadas em placa de 96 poços e incubadas com preparações de Menoflavon<sup>®</sup> contendo 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>).

As células também foram incubadas com preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF). Os ensaios foram realizados em tempo de incubação de 24 horas, sempre em triplicata.

Foi preparada uma solução de resazurina diluída no meio de cultura α-MEM com concentração de 1mg/mL. Posteriormente, adicionou-se 5μL desta solução em cada poço da placa de cultura e foi incubado por 3 horas.

Após a incubação, absorbância foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm.

#### 3.11 Dosagem de proteína total

Utilizamos o método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2% (p/v) para determinação da quantidade de proteína. A soroalbumina bovina (Sigma) foi empregada como padrão e a leitura foi feita em 650nm. Os testes foram realizados no 7°, 14° e 21° dias de plaqueamento.

As células foram incubadas com preparações de Menoflavon<sup>®</sup> contendo 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>).

As células também foram incubadas com preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF).

As determinações foram realizadas em triplicata e a concentração de proteína

foi estimada a partir da curva padrão feita para cada dosagem.

#### 3.12 Determinação da atividade específica da fosfatase alcalina

As culturas de células ricas em fosfatase alcalina foram primeiramente processadas para a extração da enzima pela metodologia descrita no tópico 3.13.

Como a fosfatase alcalina é uma enzima inespecífica, sua atividade enzimática foi determinada pela sua ação em um de seus substratos: o p-nitrofenilfosfato. A atividade PNFFase (p-nitrofenilfosfatase) da fosfatase alcalina foi determinada descontinuamente, a 37°C, através da formação do íon p-nitrofenolato (PNF-) (ε= 17.600 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, pH 13), em 410 nm, em tampão AMPOL (2-amino-2-metil-1-propanol) 50 mM, pH 10, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e p-nitrofenilfosfato (PNFF) 10 mM, em um volume final de 1 ml, de acordo com o procedimento descrito por Camolezi et al. (2002).

Os testes foram realizados no 7°, 14° e 21° dia de plaqueamento, sendo que espera-se uma maior atividade ao 14° dia, pois é onde tem-se o início da mineralização.

Foram testadas as concentrações de Menoflavon<sup>®</sup> contendo 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5 µg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1 µg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4 µg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>).

As células também foram incubadas com preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF).

#### 3.13 Preparação das frações de membrana ricas em fosfatase alcalina

As frações de membrana ricas em ALP foram obtidas a partir das culturas osteoblásticas conforme descrito por Simão et al. (2010). As células foram lavadas com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, removidas com espátula plástica e ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgSO<sub>4</sub> 10 mM e NaCl 0,8 M (tampão de choque osmótico). A suspensão de células foi homogeneizada empregando-se um homogeneizador do tipo "potter" para suave ruptura das células. Para o isolamento da fosfatase alcalina, a fração de membrana

foi incubada com fosfolipase C específica para fosfatidilinositol em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, por 1 hora, a 37°C, com agitação constante. Em seguida, a mistura foi ultracentrifugada a 100.000xg, por 1 hora, a 4°C, e o sobrenadante rico em ALP clivada da membrana foi separado do pellet em eppendorfs (CIANCAGLINI et al., 2006).

## 3.14 Avaliação do efeito dos fitoestrógenos na formação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada no 14° e 21° dia, quando os nódulos de deposição de cristais de hidroxiapatita na matriz extracelular já se formam. Não há avaliação ao 7° dia, pois ainda não há quantidade significativa de matriz mineralizada.

As células foram cultivadas em placa de 24 poços, e incubadas com diferentes concentrações de ESBF e Menoflavon<sup>®</sup>. Ao término do 14° e 21° dia, os estímulos foram removidos, e os nódulos fixados com formalina a 10% por 24 horas. Em seguida, foram desidratados em série crescente de álcoois conforme o seguinte protocolo: álcool 30% (1 hora) - álcool 50% (1 hora) - álcool 70% (1 hora) - álcool absoluto (1 hora) e corado com vermelho de alizarina, que cora em vermelho os nódulos de mineralização ricos em cálcio. Posteriormente, o conteúdo dos poços foi solubilizado com ácido acético 10%, processado e neutralizado com hidróxido de amônia 10% e a leitura em espectrofotômetro foi realizada á 405nm, como em procedimento descrito por GREGORY et al., 2004.

#### 3.15 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foi realizada pelo programa Graph Pad Prism 5 (versão 5 Prism, Graph Pad, USA). Para tanto, utilizou-se a análise de variância entre os grupos (ANOVA) "one-way", e o teste complementar de Tukey, considerando-se um nível de significância p<0.05.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A resposta de células osteoblásticas às isoflavonas tem sido investigada nos últimos anos, e um modelo experimental *in vitro* bastante utilizado na literatura é o cultivo de células da linhagem MC3T3-E1 (GE et al., 2006). No entanto, nosso trabalho propôs uma avaliação dos possíveis efeitos osteogênicos de duas preparações ricas em fitoestrógenos (Menoflavon N<sup>®</sup> e ESBF) onde utilizamos como modelo celular para testes os osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais. Por ser uma cultura primária, espera-se uma maior semelhança entre este modelo celular e o organismo animal, se comparados com as células de linhagem.

Utilizamos células tronco mesenquimais retiradas dos fêmures de ratos Wistar somente machos, para que não haja ligação dos estrógenos do animal aos receptores de estrógeno dos osteoblastos, e assim não haja interferência nos resultados dos testes. E com a mesma finalidade citada acima, utilizamos soro fetal bovino depletado de estrógeno (Sigma) e  $\alpha$ -MEM sem vermelho de fenol (que possui estrutura química semelhante ao estrógeno) na suplementação do meio de cultura  $\alpha$ -MEM.

As isoflavonas são compostos não esteroidais que tem estrutura similar ao 17-β estradiol, podendo assim, ligar-se aos seus receptores, podendo desempenhar tanto funções estrogênicas quanto antiestrogênicas, dependendo para esta seleção, de fatores como a sua concentração, características individuais, como o teor de estrógenos endógenos e a fase da menopausa em que a mulher se encontra (BARNES, 2004).

O ESBF é um composto relativamente novo desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da USP-RP e ainda não há pesquisas o correlacionando ao metabolismo ósseo; e o Menoflavon<sup>®</sup> é um medicamento comercializado na Itália e também não há pesquisas o correlacionando ao tecido ósseo para que possamos comparar os nossos resultados. Sendo assim, em nossas discussões comparamos os resultados obtidos à pesquisas parcialmente semelhantes ao nosso trabalho.

#### 4.1 Contagem das células com Azul de Tripan

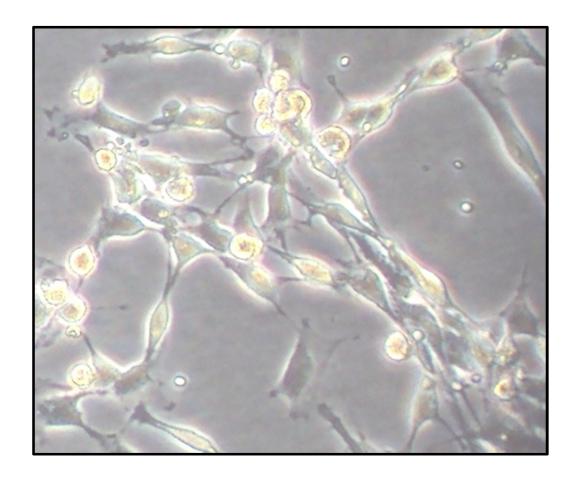
O corante Azul de Tripan foi utilizado na contagem celular por permitir diferenciar as células vivas das mortas. Este corante é incorporado pelas células não

viáveis, e estas apresentam núcleo azul e membranas disformes. As células viáveis apresentam membrana bem definida e não apresentam coloração azul.

Foi necessária a utilização deste corante na contagem celular para termos a certeza de testar células viáveis nas concentrações desejadas e necessárias, já que o tratamento com tripsina agride a membrana de algumas células. Este tratamento com tripsina 0,25% (Gibco) e EDTA 1 mM (*Ethylenediamine-tetraacitic acid*, Gibco) foi realizado após as células atingirem confluência para a liberação delas da garrafa de cultura.

A contagem das células foi realizada em todas as culturas, no entanto seus valores sofriam grande variação, pois a cultura celular sofre influências do metabolismo do animal eutanasiado, e cada animal originava somente 2 garrafas de células; Cada garrafa continha em torno de 1x10<sup>6</sup> células viáveis e 1x10<sup>4</sup> células mortas.

Baseando-se no número de células confluentes, elas foram transferidas para placas de cultura contendo 24 ou 96 poços cada (Falcon, Franklin Lakes, USA) numa concentração de 2x10<sup>4</sup> células/poço, com 500 μL de meio de cultura para placas de 24 poços ou 200 μL de meio de cultura para placas de 96 poços.



**Figura 07 –** Cultura de osteoblastos em placa antes da confluência celular, visualizado em microscópio de fase invertida (Axiovert 25, Carl Zeiss, Germany).

#### 4.2 Avaliação da eficácia do meio de cultura modificado

Ao testar medicamentos em culturas de células há a necessidade de assegurar-se que não haja interferentes que possam levar á falsos resultados. Quando se trabalha com fitoestrógenos, estes interferentes são qualquer substância que se ligue aos receptores de estrógeno, pois estes devem estar livres para uma possível ligação do medicamento avaliado.

Há na composição do meio de cultura  $\alpha$ -MEM o indicador de pH vermelho de fenol, e este possui certa semelhança estrutural com o 17- $\beta$ -estradiol, uma vez que ambos apresentam anéis fenólicos. Para impedir qualquer interferência nos resultados, na fase de plaqueamento este meio foi trocado pelo  $\alpha$ -MEM sem vermelho de fenol, (Meio Essencial Mínimo com modificação  $\alpha$ , sem phenol red, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Para a total garantia que estas modificações não trariam prejuízos às culturas e, consequentemente, não interfeririam nos resultados, testamos o meio de cultura tradicional ( $\alpha$ -MEM) e o modificado ( $\alpha$ -MEM sem vermelho de fenol) com variados tipos de SFB:

- A) α-MEM e SFB tradicional
- B) α-MEM e SFB depletado de estrógenos (Sigma)
- C) α-MEM sem vermelho de fenol e SFB tradicional
- D) α-MEM sem vermelho de fenol e SFB depletado de estrógenos (Sigma)
- E) α-MEM sem vermelho de fenol e SFB depletado de estrógenos no próprio laboratório com carvão ativado.

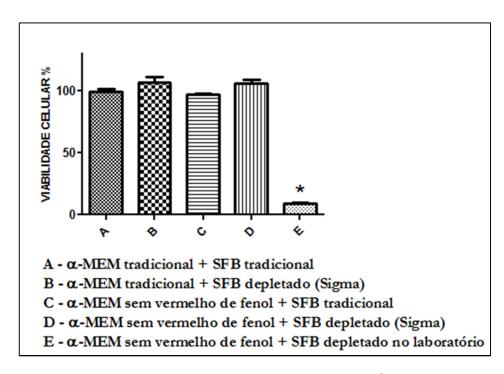
Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao branco (células não tratadas), que corresponde à preparação A.

Como podemos observar na figura 08, as médias das viabilidades são de 106,5%, 96,5%, 106% e 8,8% para B, C, D e E respectivamente.

Houve uma diminuição significativa da viabilidade celular com a preparação E, que continha o SFB depletado de estrógenos no laboratório com carvão ativado. Fato que nos levou a utilizar o SFB depletado de estrógenos da marca Sigma, que mostrou resultados semelhantes ao controle nas preparações B e D.

O meio de cultura  $\alpha$ -MEM sem vermelho de fenol mostrou-se tão eficiente no cultivo de osteoblastos quanto o  $\alpha$ -MEM tradicional, no entanto era livre dos

interferentes que poderiam ligar-se nos receptores de estrógeno. Por este motivo foi o meio de cultura de escolha para a realização de todos os nossos experimentos.



**Figura 8** – Viabilidade celular dos osteoblastos com diferentes composições de meios de cultura.

Os osteoblastos (2.10<sup>4</sup> cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meios de cultura suplementados. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs A.

Tabela 01 – Viabilidade celular com diferentes composições de meios de cultura.

Composição do meio	Médias das Viabilidades
de cultura	(%)
Α	100
В	106,5
С	96,5
D	106
E	8,8*

#### 4.3 Citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos

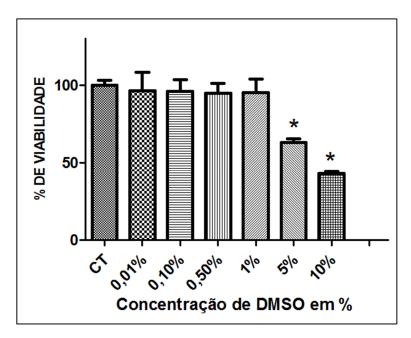
Os ensaios de citotoxicidade foram realizados para determinar em quais concentrações o DMSO poderia ser utilizado para a solubilização do ESBF e do Menoflavon<sup>®</sup> com segurança, sem causar morte celular; Pois sabe-se que o DMSO é altamente tóxico para as células em concentrações elevadas (KATKOV et al., 2011) Para isto, foram realizados testes com o corante MTT e a Resazurina, ambos com células após 24 horas de exposição ao DMSO. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas).

Como observado na figura 09, as médias das viabilidades para o ensaio do MTT foram de 96,4%; 96%; 94,8%; 95,4%; 63,1% e 42,9% para concentrações de 0,01%; 0,1%; 0,5%; 1%; 5% e 10% de DMSO, respectivamente.

Utilizando a Resazurina (figura 10), as médias das viabilidades foram de 97,4%; 97,1%; 96,5%; 100,5%; 70,8% e 37,6% para concentrações de 0,01%; 0,1%; 0,5%; 1%; 5% e 10% de DMSO, respectivamente.

Tanto o MTT quanto a Resazurina mostraram que houve uma diminuição significativa da viabilidade celular em concentrações acima de 5%, isto é, o DMSO mostrou-se citotóxico para osteoblastos a partir desta concentração.

Nos testes realizados utilizamos a concentração de 0,5% de DMSO pois esta foi a menor concentração onde os medicamentos solubilizaram completamente.



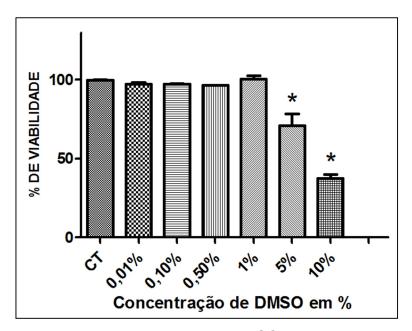
**Figura 09** – Avaliação da citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos pela técnica do MTT.

Os osteoblastos (2.10<sup>4</sup> cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meio de cultura e DMSO, exceto o controle. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 *vs* controle.

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço em meio de cultura)

**Tabela 02 -** Avaliação da citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos pela técnica do MTT.

Concentração de DMSO (%)	Médias das Viabilidades (%)
СТ	100
0,01	96,4
0,1	96,0
0,5	94,8
1	95,4
5	63,1*
10	42,9*



**Figura 10** – Avaliação da citotoxicidade do DMSO em cultura de osteoblastos pela técnica da Resazurina.

Os osteoblastos (2.10<sup>4</sup> cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meios de cultura e DMSO, exceto o controle. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 *vs* controle.

**CT** = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço em meio de cultura)

**Tabela 03 -** Avaliação da citotoxicidade do DMSO pela técnica da Resazurina.

Concentração de DMSO (%)	Médias das Viabilidades (%)
СТ	100
0,01	97,4
0,1	97,1
0,5	96,5
1	100,5
5	70,8*
10	37,6*

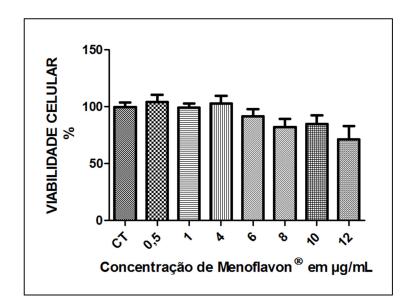
### 4.4 Ensaio da viabilidade celular com estímulos de diferentes concentrações de fitoestrógenos pela metodologia do MTT

Uma vez padronizadas as condições de diferenciação e crescimento dos osteoblastos, foram realizados ensaios da viabilidade celular com o corante MTT a fim de avaliar o efeito dos fitoestrógenos em diferentes concentrações em osteoblastos, após 24 horas de tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas).

Inicialmente realizamos testes-piloto a fim de definir as concentrações que futuramente seriam utilizadas nos testes. Para isto, analisamos a viabilidade dos osteoblastos com estímulos de ESBF e do Menoflavon<sup>®</sup> nas concentrações de 0,5  $\mu$ g/mL; 1  $\mu$ g/mL; 4  $\mu$ g/mL; 6  $\mu$ g/mL; 8  $\mu$ g/mL; 10  $\mu$ g/mL e 12  $\mu$ g/mL de isoflavonas totais.

Na figura 11, observamos que viabilidade com o Menoflavon<sup>®</sup> para as concentrações de 0,5 μg/mL; 1 μg/mL; 4 μg/mL; 6 μg/mL; 8 μg/mL; 10 μg/mL e 12 μg/mL de isoflavonas totais foram de 104,4%; 99,4%; 103,0%; 91,5%; 82,3%; 84,8% e 71,5%, respectivamente. O decréscimo ocorrido não obteve significância estatística ao ser analisado (tabela 4).

A figura 12 mostra que a viabilidade com o ESBF para as mesmas concentrações acima citadas foram de 99,9%; 95,4%; 86,2%; 89,3%; 87,2%; 87,9% e 88,4%, respectivamente. O decréscimo ocorrido também não obteve significância estatística ao ser analisado (tabela 5).



**Figura 11** – Teste inicial de viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup> pela técnica do MTT.

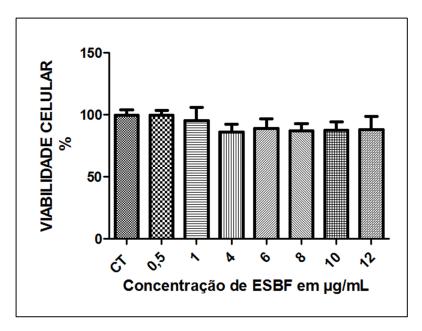
Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meio de cultura e concentrações de Menoflavon<sup>®</sup> de 0,5 µg/mL; 1 µg/mL; 4 µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL e 12 µg/mL exceto no controle. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado)

**Tabela 04** – Teste inicial de viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup> pela técnica do MTT.

Isoflavonas totais (µg/mL)	Viabilidade celular (%)
СТ	100,0
0,5	104,4
1	99,4
4	103,0
6	91,5
8	82,3
10	84,8
12	71,5

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura)



**Figura 12** – Teste inicial de viabilidade celular com estímulos de ESBF pela técnica do MTT.

Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meio de cultura e concentrações de ESBF de 0,5 µg/mL; 1 µg/mL; 4 µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL e 12 µg/mL, exceto no controle. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado)

**Tabela 05** – Teste inicial de viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF pela técnica do MTT.

Isoflavonas totais (µg/mL)	Viabilidade celular (%)
СТ	100,0
0,5	99,9
1	95,4
4	86,2
6	89,3
8	87,2
10	87,9
12	88,4

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura)

Mesmo não havendo significativa morte celular com as concentrações testadas, escolhemos a concentração de 4  $\mu$ g/mL de isoflavonas totais como máxima a ser testada a fim de respeitar o limite de 0,5% de DMSO presente nas culturas celulares. Então decidimos trabalhar com concentrações de isoflavonas totais de 0,5  $\mu$ g/mL; 1  $\mu$ g/mL e 4  $\mu$ g/mL, que corresponde respectivamente a 28,75 nM de D + 7,5 nM de G; 57,5 nM de D + 15 nM de G; e 230 nM de D + 60 nM de G para o Menoflavon<sup>®</sup> e 1,181 nM de D + 0,922 nM de G; 2,361 nM de D + 1,845 nM de G; e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G para o ESBF.

Nos testes posteriores também utilizamos um Controle com DMSO, que continha a mesma concentração empregada para a dissolução das isoflavonas contidas no Menoflavon<sup>®</sup> e no ESBF, e um Controle de Padrão, com D e G comercial na concentração de 57,5 nM de D + 15 nM de G para o Menoflavon<sup>®</sup>, e 2,361 nM de D + 1,845 nM de G para o ESBF.

Como observado na figura 13 de viabilidade com o Menoflavon<sup>®</sup>, as células incubadas com o controle de DMSO, controle de padrão, e incubadas com preparações de Menoflavon<sup>®</sup> contendo 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>) obtiveram viabilidades de 101,0%; 102,4%; 107,1%; 95,1% e 98,8%, respectivamente (tabela 6).

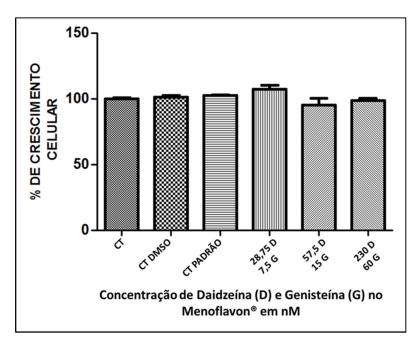
Como observado na figura 14 de viabilidade com o ESBF, as células incubadas com o controle de DMSO, controle de padrão, e as células incubadas com preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF) obtiveram viabilidades de 97,4%; 96,6%; 95,7%; 98,1% e 98,8%, respectivamente (tabela 7).

Com estes testes reafirmamos que tanto o Menoflavon<sup>®</sup> quanto o ESBF não causaram morte celular nas concentrações testadas, no entanto também não estimularam a proliferação celular. Comparando a viabilidade celular do ESBF com o Menoflavon®, observamos que não houve diferença a respeito da viabilidade entre as duas substâncias.

A literatura apresenta resultados divergentes acerca do efeito das isoflavonas na proliferação celular de osteoblastos. Nossos resultados estão de acordo com DE WILDE et al. (2004) que ao testar a proliferação celular de osteoblastos suínos estimulados com 1 nM de daidzeína ou 1 nM de estrógeno ao 6°, 7°, 9°, 11°, 13° e

14º dias com azul de metileno não relatou proliferação dos osteoblastos além daquela produzida também pelo controle. Isto é, a incubação crônica com daidzeína ou estrógeno não afetou a proliferação de osteoblastos. Śliwiński et al. (2009) sugeriu que as isoflavonas podem atuar no metabolismo ósseo não por aumentar a proliferação dos osteoblastos, mas sim por impedir que a reabsorção óssea ocorra.

No entanto, nossos resultados contradizem os achados de GE et al. (2006), que ao incubar células da linhagem MC3T3-E1 (linhagem celular semelhante ao osteoblasto de calvária de camundongo) com concentrações de 10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-5</sup> M de daidzeína por 2 dias obteve uma proliferação celular de até 132,3% com a concentração de 10<sup>-5</sup> M.



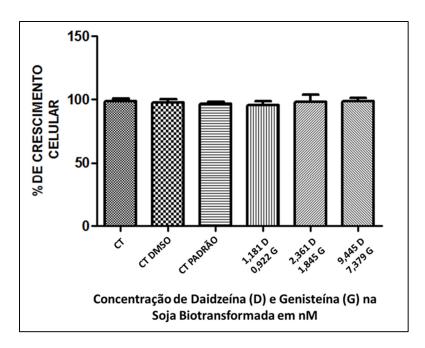
**Figura 13** – Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup> pela técnica do MTT.

Os osteoblastos ( $2.10^{\circ}$  cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meio de cultura e concentrações de Menoflavon<sup>®</sup> de 28,75 nM de D + 7,5 nM de G ( $0,5 \,\mu\text{g/mL}$  de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G ( $1 \,\mu\text{g/mL}$  de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G ( $4 \,\mu\text{g/mL}$  de Menoflavon<sup>®</sup>), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO (2.10<sup>4</sup> cél/poço, 1µL de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G (2.10<sup>4</sup> cél/poço; 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

**Tabela 06** – Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup> pela técnica do MTT.

Grupo	Viabilidade celular (%)
СТ	100,0
CT DMSO	101,0
CT PADRÃO	102,4
28,75nM de D +7,5nM de G	107,1
57,5 nM de D + 15 nM de G	95,1
230 nM de D + 60 nM de G	98,8



**Figura 14** – Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF pela técnica do MTT.

Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meio de cultura e concentrações de ESBF de 1,181 nM de D + 0,922 nM de G ( $0.5 \mu g/mL$  de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G ( $1 \mu g/mL$  de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G ( $4 \mu g/mL$  de ESBF), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO (2.10<sup>4</sup> cél/poço, 1µL de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G (2.10<sup>4</sup> cél/poço; 2,361 nM de D + 1,845 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

**Tabela 07** – Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF pela técnica do MTT.

Grupo	Viabilidade celular (%)
СТ	100
CT DMSO	97,4
CT PADRÃO	96,6
1,181 nM de D + 0,922 nM de G	95,7
2,361 nM de D + 1,845 nM de G	98,1
9,445 nM de D + 7,379 nM de G	98,8

## 4.5 Ensaio de viabilidade celular com estímulos de diferentes concentrações de fitoestrógenos pela metodologia da Resazurina

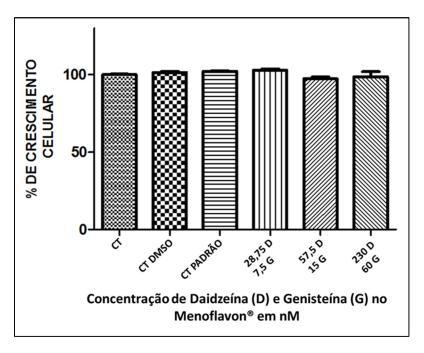
Este ensaio foi realizado como metodologia comparativa ao ensaio do MTT, com a finalidade de uma vez mais confirmar os resultados obtidos neste experimento. Os testes foram realizados com fitoestrógenos em diferentes concentrações em cultura de osteoblastos, após 24 horas de tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle (células não tratadas). Foi utilizado também um controle com DMSO, que continha a mesma concentração utilizada para a solubilização das isoflavonas e um controle de padrão, com daidzeína e genisteína comercial na concentração de 57,5 nM de D + 15 nM de G para o Menoflavon®, e 2,361 nM de D + 1,845 nM de G para o ESBF.

A figura 15 apresenta os resultados dos testes de viabilidade com o Menoflavon<sup>®</sup>, as células incubadas com o controle de DMSO obtiveram uma média da viabilidade de 100,6%; o controle de padrão obteve uma viabilidade de 102,8%; e as células incubadas com preparações de Menoflavon<sup>®</sup> contendo 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>) obtiveram viabilidades de 103,0%; 97,3% e 98,8%, respectivamente (tabela 8).

A figura 16 nos mostra a viabilidade celular das culturas de osteoblastos estimuladas com o ESBF, onde as células incubadas com o controle de DMSO obtiveram uma média da viabilidade de 102,2%; o controle de padrão obteve uma viabilidade de 103,5%; e as células incubadas com preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF) obtiveram viabilidades de 101,2%; 101,4% e 107,8%, respectivamente (tabela 9).

Comparando a viabilidade celular do ESBF com o Menoflavon<sup>®</sup>, observamos que não houve diferença entre os dois tratamentos sobre a capacidade de estimular da proliferação dos osteoblastos, nem de estimular a morte celular nas concentrações testadas.

Os resultados encontrados nos testes de viabilidade com a Resazurina são condizentes com os resultados encontrados com o ensaio do MTT, sendo assim esta metodologia comparativa mostrou-se eficaz, tornando os resultados mais confiáveis.



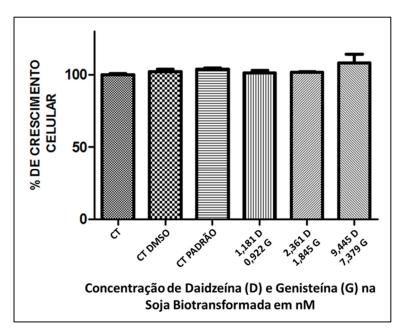
**Figura 15** – Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup> pela técnica da Resazurina.

Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meio de cultura e concentrações de Menoflavon® de 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5 µg/mL de Menoflavon®); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1 µg/mL de Menoflavon®); e 230 nM de D + 60 nM de G (4 µg/mL de Menoflavon®), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

**CT** = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado); **CT DMSO** = Controle de DMSO (2.10<sup>4</sup> cél/poço, 1μL de DMSO e meio de cultura suplementado); **CT PADRÃO** = Controle de padrão de D + G (2.10<sup>4</sup> cél/poço; 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

**Tabela 08** – Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup> pela técnica da Resazurina.

Grupo	Viabilidade celular (%)
СТ	100
CT DMSO	100,6
CT PADRÃO	102,8
28,75nM de D +7,5nM de G	103,0
57,5 nM de D + 15 nM de G	97,3
230 nM de D + 60 nM de G	98,8



**Figura 16** – Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF pela técnica da Resazurina.

Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meio de cultura e concentrações de ESBF de 1,181 nM de D + 0,922 nM de G ( $0.5 \mu g/mL$  de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G ( $1 \mu g/mL$  de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G ( $4 \mu g/mL$  de ESBF), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

**CT** = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado); **CT DMSO** = Controle de DMSO (2.10<sup>4</sup> cél/poço, 1μL de DMSO e meio de cultura suplementado); **CT PADRÃO** = Controle de padrão de D + G (2.10<sup>4</sup> cél/poço; 2,361 nM de D + 1,845 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

**Tabela 09** – Viabilidade celular das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF pela técnica da Resazurina.

Grupo	Viabilidade celular (%)
СТ	100
CT DMSO	102,2
CT PADRÃO	103,5
1,181 nM de D + 0,922 nM de G	101,2
2,361 nM de D + 1,845 nM de G	101,4
9,445 nM de D + 7,379 nM de G	107,8

#### 4.6 Dosagem de proteína total dos osteoblastos

Os osteoblastos produzem e são constituídos por uma enorme e variável quantidade de proteínas. Dentre elas podemos citar a fosfatase alcalina, a osteocalcina ou proteína GLA (*gamma-carboxyglutamic acid*) e grandes quantidades de colágeno do tipo I, além de uma variedade de outras proteínas da matriz. Estas proteínas possuem um importante papel na mineralização óssea (PLAPLER, 1997).

A quantidade proteica presente em cada poço da placa de cultura é diretamente proporcional ao número de células presente neste. Utilizamos este parâmetro para avaliar a variação proteica na presença do estímulo das diferentes concentrações de isoflavonas, sendo possível assim, correlacioná-la com a viabilidade/morte celular e com a atividade da fosfatase alcalina, que é uma proteína importante a ser estudada no processo de mineralização.

A concentração proteica foi analisada em mg/mL em análises realizadas em 7, 14 e 21 dias para as diferentes concentrações de Menoflavon<sup>®</sup> e ESBF, como mostrados nas figuras 17 e 18.

Como podemos observar na figura 17 de estímulos com o Menoflavon<sup>®</sup>, a concentração proteica aumentou gradativamente do 7° dia ao 21° dia para todas as variáveis.

No  $7^{\circ}$  dia, as médias das concentrações proteicas encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de Menoflavon<sup>®</sup> com 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5 µg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1 µg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4 µg/mL de Menoflavon<sup>®</sup>) foram de 0,0293 mg/mL; 0,0288 mg/mL; 0,0258 mg/mL; 0,0251 mg/mL; 0,0226 mg/mL; 0,0283 mg/mL, respectivamente.

Ao 14° dia, as médias das concentrações proteicas encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de Menoflavon® com 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon®) foram de 0,0694 mg/mL; 0,0679 mg/mL; 0,0670 mg/mL; 0,0509 mg/mL; 0,0490 mg/mL; 0,0610 mg/mL, respectivamente.

Ao 21° dia, as médias das concentrações proteicas encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de Menoflavon<sup>®</sup> com 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de

Menoflavon®) foram de 0,0850 mg/mL; 0,0916 mg/mL; 0,0880 mg/mL; 0,0910 mg/mL; 0,0953 mg/mL; 0,0932 mg/mL, respectivamente (tabela10).

Na figura 18 apresentamos os resultados da dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos estimulados com o ESBF. A concentração proteica também aumentou gradativamente do 7º dia ao 21º dia para todas as variáveis.

Ao  $7^{\circ}$  dia, as médias das concentrações proteicas encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5 µg/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1 µg/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4 µg/mL de ESBF) foram de 0,0608 mg/mL; 0,0585 mg/mL; 0,063 mg/mL; 0,0611 mg/mL; 0,0574 mg/mL; 0,0562 mg/mL, respectivamente.

Ao 14° dia, as médias das concentrações proteicas encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF) foram de 0,0675 mg/mL; 0,0699 mg/mL; 0,0649 mg/mL; 0,0668 mg/mL; 0,0657 mg/mL; 0,0578 mg/mL, respectivamente.

Ao 21° dia, as médias das concentrações proteicas encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF) foram de 0,0934 mg/mL; 0,0946 mg/mL; 0,0932 mg/mL; 0,0960 mg/mL; 0,0996 mg/mL; 0,0892 mg/mL, respectivamente (tabela 11).

Quando comparamos os resultados do Menoflavon<sup>®</sup> aos resultados do ESBF notamos que a dosagem proteica basal (do controle) mostram diferenças significativas, e estas podem ser explicadas devido a diferenças metabólicas entre os animais, quando realizamos a triplicata do teste. No entanto, esta diferença mostra-se insignificante, já que é mantida em todas as variáveis do mesmo teste.

Os experimentos mostraram um aumento da concentração proteica do 7º dia ao 21º dia, o que era esperado, devido ao aumento no número de células nesse período, no entanto não houve aumento significativo da produção proteica com os estímulos. Ambos não tiveram aumento ou diminuição significativos com as concentrações testadas em relação ao controle.

Nossos testes apresentaram resultados divergentes acerca do efeito das isoflavonas na dosagem de proteína total dos osteoblastos dos resultados expostos por Yamaguchi & Sugimoto (2000), que ao estimular células da linhagem MC3T3-E1 (linhagem celular semelhante ao osteoblasto de calvária de camundongo) com 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-5</sup> M de genisteína obtiveram um aumento significativo do conteúdo proteico celular; e o mesmo foi encontrado com um estímulo de 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-5</sup> M de daidzeína. Nossos resultados também divergiram de Uchiyama & Yamaguchi (2006), que ao estimular células da linhagem MC3T3-E1 com 10<sup>-5</sup> M de genisteína obtiveram um aumento significativo da concentração proteica celular. Estas divergências de resultados podem ser devidas às diferenças das linhagens celulares, das metodologias empregadas, e a concentração e duração dos tratamentos; No entanto não há pesquisas com metodologias similares para que pudéssemos fazer uma comparação mais efetiva dos resultados aqui expostos.

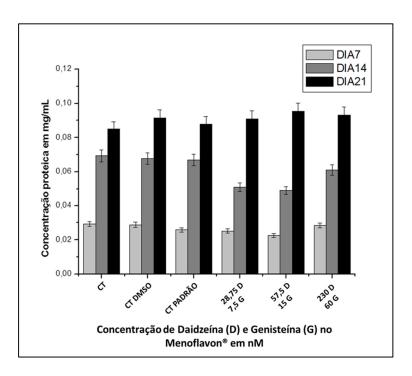


Figura 17 – Dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup>

Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 24 poços com meio de cultura e concentrações de Menoflavon® de 28,75 nM de D + 7,5 nM de G ( $0.5 \,\mu\text{g/mL}$  de Menoflavon®); 57,5 nM de D + 15 nM de G ( $1 \,\mu\text{g/mL}$  de Menoflavon®); e 230 nM de D + 60 nM de G ( $4 \,\mu\text{g/mL}$  de Menoflavon®), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO (2.10<sup>4</sup> cél/poço, 1µL de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G (2.10<sup>4</sup> cél/poço; 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

**Tabela 10** – Dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup>

	Dosagens d	Dosagens de Proteína Total em mg/mL		
	7º Dia	14º Dia	21º Dia	
СТ	0,0293	0,0694	0,0850	
CT DMSO	0,0288	0,0679	0,0916	
CT PADRÃO	0,0258	0,0670	0,0880	
28,75nM de D +7,5nM de G	0,0251	0,0509	0,0910	
57,5 nM de D + 15 nM de G	0,0226	0,0490	0,0953	
230 nM de D + 60 nM de G	0,0283	0,0610	0,0932	

CT = Controle ( $2.10^4$  cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO ( $2.10^4$  cél/poço,  $1\mu$ L de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G ( $2.10^4$  cél/poço; 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e meio de cultura suplementado).

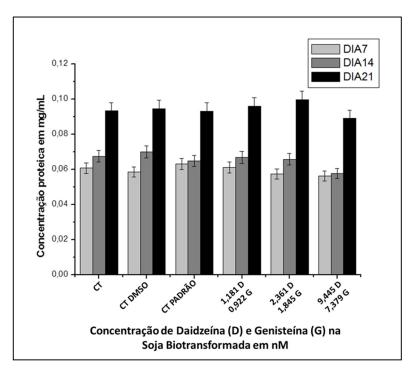


Figura 18 – Dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF

Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 24 poços com meio de cultura e concentrações de ESBF de 1,181 nM de D + 0,922 nM de G ( $0.5 \mu g/mL$  de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G ( $1 \mu g/mL$  de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G ( $4 \mu g/mL$  de ESBF), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO (2.10<sup>4</sup> cél/poço, 1µL de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão

**Tabela 11** – Dosagem de proteína total das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF

	Dosagens de Proteína Total em mg/mL		
	7º Dia	14º Dia	21º Dia
СТ	0,0608	0,0675	0,0934
CT DMSO	0,0585	0,0699	0,0946
CT PADRÃO	0,0630	0,0649	0,0932
1,181 nM de D + 0,922 nM de G	0,0611	0,0668	0,0960
2,361 nM de D + 1,845 nM de G	0,0574	0,0657	0,0996
9,445 nM de D + 7,379 nM de G	0,0562	0,0578	0,0892

CT = Controle ( $2.10^4$  cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO ( $2.10^4$  cél/poço,  $1\mu$ L de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G ( $2.10^4$  cél/poço; 2,361 nM de D + 1,845 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

## 4.7 Determinação da atividade específica da fosfatase alcalina

A enzima fosfatase alcalina desempenha um papel ativo na mineralização e se apresenta como um fator da progressão na osteogênese, sendo expressa durante o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico (MILLAN, 2006). É considerada um indicador da diferenciação osteoblástica e é um marcador representativo da presença de osteoblastos maduros (GE et al., 2006)

A ALP presente nos osteoblastos se encontra de duas formas: solúvel e ancorada à membrana celular; no entanto apenas a forma ancorada á membrana tem sido associada ao processo de mineralização (SAY et al., 1991).

Esta enzima, que é utilizada como marcador bioquímico do metabolismo ósseo em culturas de osteoblastos, (MILLAN, 2006) é uma fosfomonohidrolase inespecífica capaz de hidrolisar em pH alcalino monoésteres de fosfato (ATP, ADP, AMP, ρ-nitrofenilfosfato, glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, gliceraldeído-3-fosfato), pirofosfato, diésteres de fosfato (bis-ρ-nitrofenilfosfato e AMP cíclico), bem como catalisar reações de transfosforilação (CIANCAGLINI et al., 2006 – SIMÃO et al., 2007a,b).

Para conseguirmos medir a atividade da fosfatase alcalina ancorada á membrana, primeiramente utilizamos a enzima fosfolipase C, responsável pela clivagem da âncora e posterior liberação da enzima para o sobrenadante.

A determinação da atividade da fosfatase alcalina foi realizada no 7°, 14° e 21° dia de plaqueamento, com as culturas estimuladas com as concentrações de Menoflavon<sup>®</sup> e ESBF já citadas anteriormente.

Como podemos observar na figura 19, ao 7º dia, as médias das atividades específicas da fosfatase alcalina encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de Menoflavon® com 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon®) foram de 597,73 U/mg; 564,27 U/mg; 428,66 U/mg; 519,52 U/mg; 431,36 U/mg; 654,19 U/mg, respectivamente.

No 14° dia, as médias das atividades encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de Menoflavon® com 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon®) foram de

1347,75 U/mg; 1210,82 U/mg; 1253,67 U/mg; 791,36 U/mg; 395,89 U/mg e 391,17 U/mg, respectivamente.

No 21° dia, as médias das atividades encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de Menoflavon® com 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon®) foram de 989,77 U/mg; 969,96 U/mg; 864,19 U/mg; 719,83 U/mg; 299,28 U/mg e 316,33 U/mg, respectivamente (tabela 12).

Como observado na figura 20, ao  $7^\circ$  dia, as médias das atividades encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5 µg/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1 µg/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4 µg/mL de ESBF) foram de 1408,75 U/mg; 1346,05 U/mg; 1166,44 U/mg; 726,40 U/mg; 1067,88 U/mg e 635,18 U/mg, respectivamente.

Ao 14° dia, as médias das atividades encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF) foram de 1595,27 U/mg; 1451,11 U/mg; 1378,68 U/mg; 1338,17 U/mg; 1048,75 U/mg e 1241,02 U/mg, respectivamente.

Já no 21° dia, as médias das atividades encontradas para o controle, controle de DMSO, controle padrão, preparações de ESBF contendo 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF) foram de 809,80 U/mg; 581,85 U/mg; 706,56 U/mg; 664,36 U/mg; 494,04 U/mg e 170,06 U/mg, respectivamente (tabela 13).

Os gráficos da atividade da fosfatase alcalina mostram que o pico da atividade enzimática ocorre ao 14º dia, pois é quando há o início do processo da mineralização.

A atividade da fosfatase alcalina mostrada na figura 19 com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup> teve um decréscimo significativo ao 14º dia com todas as

concentrações testadas e ao 21º dia com as concentrações de 57,5 nM de D + 15 nM de G e 230 nM de D +60 nM de G.

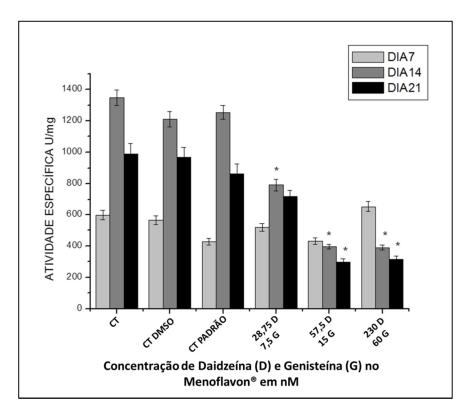
Com o estímulo do ESBF como mostrado na figura 20, a atividade da fosfatase alcalina decresceu ao 7º dia com a concentração de 1,181 nM de D + 0,922 de G e 9,445 nM de D + 7,379nM de G; ao 14º dia com concentração de 2,361 nM de D + 1,845 de G, e ao 21º dia com a concentração de 9,445 nM de D + 7,379nM de G, no entanto manteve-se estável no restante do teste.

Quando comparamos o teor de isoflavonas totais nos dois tratamentos, o ESBF mostrou uma atividade específica da ALP melhor que o Menoflavon<sup>®</sup> ao 14º dia de estímulo com todas as concentrações testadas, e ao 21º dia com a concentração de 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF). Já Menoflavon<sup>®</sup> mostrou-se melhor ao 7º dia com os estímulos nas concentrações de 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>) e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup>). Dados que mostram que o ESBF obteve uma atividade da ALP melhor que o Menoflavon<sup>®</sup>, ainda mais levando-se em consideração que sua concentração de D e G é 24 vezes menor.

No entanto, nossos dados evidenciaram que o aumento na concentração de isoflavonas, interfere na atividade da enzima ALP, resultados que estão parcialmente de acordo com LI et al. (2012), que ao estudar os efeitos dosedependentes da genisteína na homeostase em osso mandibular subcondral de ratos, evidenciou uma melhor atividade da ALP para animais alimentados com baixas concentrações de genisteína (10mg/kg) do que os animais alimentados com altas concentrações (50mg/kg).

Nossos resultados divergem dos achados de GE et al. (2006), que ao incubar células da linhagem MC3T3-E1 (linhagem celular semelhante ao osteoblasto de calvária de camundongo) com concentrações de 10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-5</sup> M de daidzeína por 10, 20 e 30 dias obteve um aumento da atividade da fosfatase alcalina, principalmente em altas concentrações (10<sup>-5</sup> M). Também divergem de Uchiyama & Yamaguchi (2006), que ao estimular células da linhagem MC3T3-E1 com 10<sup>-5</sup> M de genisteína obtiveram um aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina. No entanto, a literatura comprova que altas concentrações de genisteína (por volta de 10<sup>-4</sup>M) são tóxicas às células (WILLIAMS et al., 1998). Estas divergências entre os nossos resultados e os encontrados na literatura podem ser devido às várias

diferenças entre os experimentos, como a quantidade de dias de experimento, concentração das isoflavonas e a linhagem celular utilizada.



**Figura 19** – Atividade específica da fosfatase alcalina das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup>

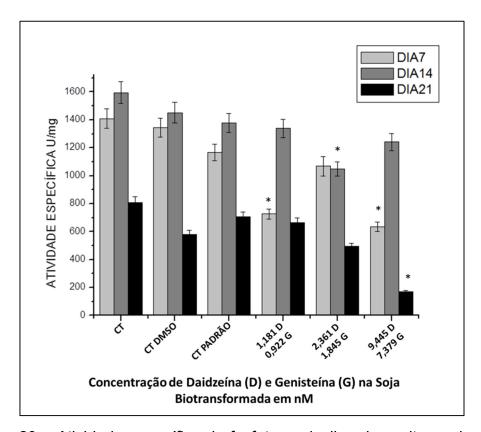
Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 24 poços com meio de cultura e concentrações de Menoflavon<sup>®</sup> de 28,75 nM de D + 7,5 nM de G ( $0,5 \mu g/mL$  de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G ( $1 \mu g/mL$  de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G ( $4 \mu g/mL$  de Menoflavon<sup>®</sup>), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle ( $2.10^4$  cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO ( $2.10^4$  cél/poço,  $1\mu$ L de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G ( $2.10^4$  cél/poço; 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e meio de cultura suplementado).

**Tabela 12** – Atividade específica da fosfatase alcalina das culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup>

	Atividade Específica da Fosfatase Alcalina em U/mg		
	7º Dia	14º Dia	21º Dia
СТ	597,73	1347,75	989,77
CT DMSO	564,27	1210,82	969,96
CT PADRÃO	428,66	1253,67	864,19
28,75nM de D +7,5nM de G	519,52	791,36*	719,83
57,5 nM de D + 15 nM de G	431,36	395,89*	299,28*
230 nM de D + 60 nM de G	654,19	391,17*	316,33*

CT = Controle ( $2.10^4$  cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO ( $2.10^4$  cél/poço,  $1\mu$ L de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G ( $2.10^4$  cél/poço; 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)



**Figura 20** – Atividade específica da fosfatase alcalina das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF.

Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 24 poços com meio de cultura e concentrações de ESBF de 1,181 nM de D + 0,922 nM de G ( $0.5 \mu g/mL$  de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G ( $1 \mu g/mL$  de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G ( $4 \mu g/mL$  de ESBF), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle ( $2.10^4$  cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO ( $2.10^4$  cél/poço,  $1\mu$ L de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G ( $2.10^4$  cél/poço; 2,361 nM de D + 1,845 nM de G comercial e meio de cultura suplementado).

**Tabela 13** – Atividade específica da fosfatase alcalina das culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF.

	Atividade Específica da Fosfatase Alcalina em U/mg		
	7º Dia	14º Dia	21º Dia
СТ	1408,75	1595,27	809,80
CT DMSO	1346,05	1451,11	581,85
CT PADRÃO	1166,44	1378,68	706,56
1,181 nM de D + 0,922 nM de G	726,4*	1338,17	664,36
2,361 nM de D + 1,845 nM de G	1067,88	1048,75*	494,04
9,445 nM de D + 7,379 nM de G	635,18*	1241,02	170,06*

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO (2.10<sup>4</sup> cél/poço, 1µL de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G (2.10<sup>4</sup> cél/poço; 2,361 nM de D + 1,845 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

## 4.8 Avaliação do efeito dos fitoestrógenos na formação de matriz mineralizada

A avaliação da formação da matriz mineralizada na presença de estímulos de diferentes concentrações de Menoflavon e ESBF foi realizada no 14° e 21° dia de crescimento quando os nódulos de deposição de cristais de hidroxiapatita na matriz extracelular já se formaram. Não há avaliação ao 7° dia, pois ainda não há quantidade significativa de matriz mineralizada.

A leitura do resultado foi realizada por colorimetria em 405 nm, e nos gráficos utilizamos os valores absolutos das leituras espectrofotométricas (para detalhes ver Materiais e Métodos).

Como podemos observar na figura 21 de mineralização na presença de estímulos com o Menoflavon $^{\mathbb{R}}$ , ao 14º dia encontramos médias de leituras de 0,1723; 0,1750; 0,1557; 0,1663; 0,1597 e 0,1423 para o controle; controle de DMSO; controle de padrão; concentração de 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon $^{\mathbb{R}}$ ); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon $^{\mathbb{R}}$ ); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon $^{\mathbb{R}}$ ), respectivamente.

Ao 21° dia, as médias foram de 0,2380; 0,2413; 0,2427; 0,2293; 0,1917 e 0,1607 para o controle; controle de DMSO; controle de padrão; concentração de 28,75 nM de D + 7,5 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); 57,5 nM de D + 15 nM de G (1  $\mu$ g/mL de Menoflavon®); e 230 nM de D + 60 nM de G (4  $\mu$ g/mL de Menoflavon®), respectivamente (tabela 14).

Na figura 22 de mineralização na presença de estímulos com o ESBF, ao 14° dia encontramos médias de leituras de 0,0640; 0,0765; 0,0715; 0,0785; 0,0835 e 0,074 para o controle; controle de DMSO; controle de padrão; concentração de 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF), respectivamente.

Ao 21° dia, as médias das leituras foram de 0,3120; 0,3025; 0,2510; 0,3140; 0,2740 e 0,2820 para o controle; controle de DMSO; controle de padrão; concentração de 1,181 nM de D + 0,922 nM de G (0,5  $\mu$ g/mL de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G (1  $\mu$ g/mL de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G (4  $\mu$ g/mL de ESBF), respectivamente (tabela 15).

A leitura da absorbância à 405nm de ambas as figuras de formação da matriz mineralizada e a figura 23 mostra que houve crescimento do 14º dia para o 21º dia.

Comparando-se a formação da matriz mineralizada do Menoflavon<sup>®</sup> ao ESBF, notamos que ao 21º dia de estímulo com o Menoflavon® houve um decréscimo da formação de nódulos de mineralização com a concentração de 230 nM de D +60 nM de G (4 µg/mL de Menoflavon®); Já os estímulos do ESBF na mesma concentração de isoflavonas totais mostra que a formação da matriz mineralizada manteve-se constante, evidenciando mais uma vez que o ESBF mostra-se mais eficaz que o Menoflavon®.

Os resultados da formação da matriz mineralizada estão intimamente ligados aos resultados da atividade da fosfatase alcalina, já que esta enzima é a responsável pela clivagem dos substratos fosfatados e consequentemente, a liberação do fosfato para sua posterior deposição da forma de cristais de hidroxiapatita na matriz extracelular. O que explica porque houve um decréscimo em ambos os gráficos (de atividade da ALP e formação da matriz mineralizada) de estímulos com o Menoflavon<sup>®</sup>.

Nossos testes apresentaram resultados divergentes dos resultados expostos por GE et al (2006), que ao incubar células da linhagem MC3T3-E1 (linhagem celular semelhante ao osteoblasto de calvária de camundongo) com concentração de 10<sup>-6</sup> M de daidzeína por 21e 28 dias obteve um aumento da mineralização. E também divergem dos resultados de Uchiyama & Yamaguchi (2006), que ao estimular células da linhagem MC3T3-E1 com 10<sup>-5</sup> M de genisteína por 7, 14 e 21 dias obtiveram um aumento significativo da mineralização. Estas divergências entre os nossos resultados e os encontrados na literatura também podem ser devido às várias diferenças entre os experimentos, como a quantidade de dias de experimento, concentração das isoflavonas e a linhagem celular utilizada.

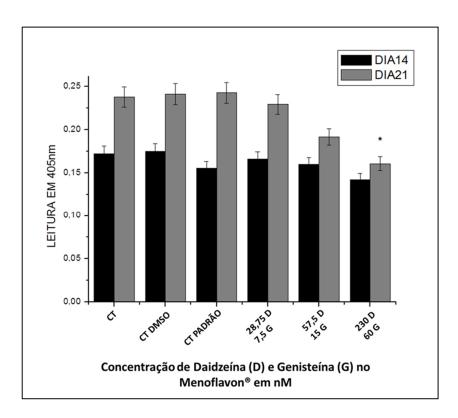


Figura 21 – Formação da matriz mineralizada em culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon<sup>®</sup>

Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 24 poços com meio de cultura e concentrações de Menoflavon<sup>®</sup> de 28,75 nM de D + 7,5 nM de G ( $0.5 \mu g/mL$  de Menoflavon<sup>®</sup>); 57,5 nM de D + 15 nM de G ( $1 \mu g/mL$  de Menoflavon<sup>®</sup>); e 230 nM de D + 60 nM de G ( $4 \mu g/mL$  de Menoflavon<sup>®</sup>), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle (2.10<sup>4</sup> cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO (2.10<sup>4</sup> cél/poço, 1µL de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G (2.10<sup>4</sup> cél/poço; 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

**Tabela 14** – Formação da matriz mineralizada em culturas de osteoblastos com estímulos de Menoflavon $^{\tiny{\circledR}}$ 

	Formação da matriz mineralizada Absorbância (405nm)	
	14º Dia	21º Dia
СТ	0,1723	0,2380
CT DMSO	0,1750	0,2413
CT PADRÃO	0,1557	0,2427
28,75nM de D +7,5nM de G	0,1663	0,2293
57,5 nM de D + 15 nM de G	0,1597	0,1917
230 nM de D + 60 nM de G	0,1423	0,1607*

CT = Controle ( $2.10^4$  cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO ( $2.10^4$  cél/poço, 1µL de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G ( $2.10^4$  cél/poço; 57,5 nM de D + 15 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)

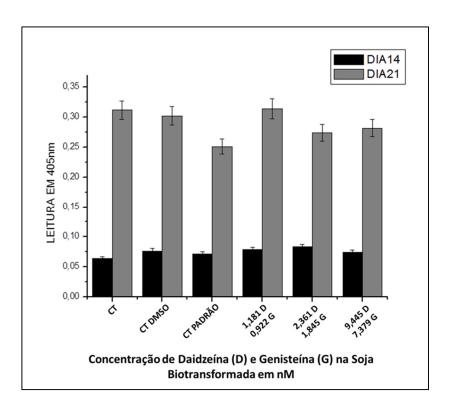


Figura 22 – Formação da matriz mineralizada em culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF

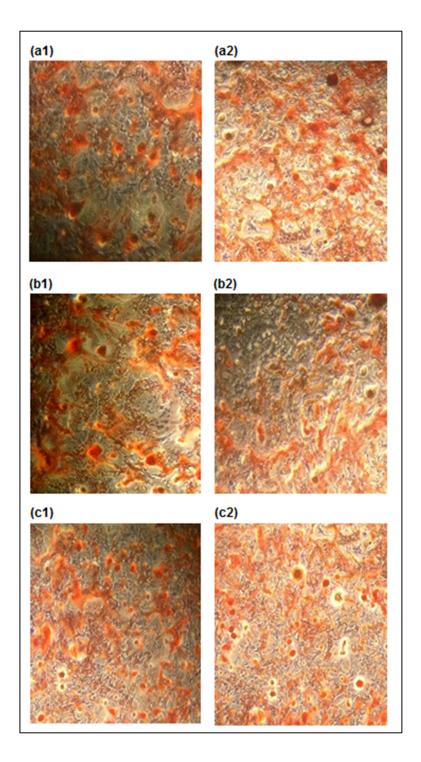
Os osteoblastos ( $2.10^4$  cél/poço) foram cultivados em placas de 96 poços com meio de cultura e concentrações de ESBF de 1,181 nM de D + 0,922 nM de G ( $0.5 \mu g/mL$  de ESBF); 2,361 nM de D + 1,845 nM de G ( $1 \mu g/mL$  de ESBF); e 9,445 nM de D + 7,379 nM de G ( $4 \mu g/mL$  de ESBF), exceto nos controles. Os resultados foram expressos como média de experimentos realizados em triplicata. \*p<0,05 vs controle.

CT = Controle ( $2.10^4$  cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO ( $2.10^4$  cél/poço, 1µL de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G ( $2.10^4$  cél/poço; 2,361 nM de D + 1,845 nM de G comercial e meio de cultura suplementado).

**Tabela 15** – Formação da matriz mineralizada em culturas de osteoblastos com estímulos de ESBF

	Formação da matriz mineralizada Absorbância (405nm)	
	14º Dia	21º Dia
СТ	0,0640	0,3120
CT DMSO	0,0765	0,3025
CT PADRÃO	0,0715	0,2510
1,181 nM de D + 0,922 nM de G	0,0785	0,3140
2,361 nM de D + 1,845 nM de G	0,0835	0,2740
9,445 nM de D + 7,379 nM de G	0,0740	0,2820

CT = Controle ( $2.10^4$  cél/poço e meio de cultura suplementado); CT DMSO = Controle de DMSO ( $2.10^4$  cél/poço,  $1\mu$ L de DMSO e meio de cultura suplementado); CT PADRÃO = Controle de padrão de D + G ( $2.10^4$  cél/poço; 2,361 nM de D + 1,845 nM de G comercial e meio de cultura suplementado)



**Figura 23 –** Matriz mineralizada em culturas de osteoblastos corada com vermelho de alizarina ao 14º e 21º dia

- (a1) Controle (células e meio de cultura suplementado) ao 14º dia
- (a2) Controle (células e meio de cultura suplementado) ao 21º dia
- (b1) Estímulo com 1 μg/mL de Menoflavon® (57,5 nM de D + 15 nM de G) ao 14° dia
- (b2) Estímulo com 1 μg/mL de Menoflavon® (57,5 nM de D + 15 nM de G) ao 21º dia
- (c1) Estímulo com 1  $\mu$ g/mL de ESBF (2,361 nM de D + 1,845 nM de G) ao 14° dia
- (c2) Estímulo com 1  $\mu$ g/mL de ESBF (2,361 nM de D + 1,845 nM de G) ao 21° dia

A figura 23 mostra fotos tiradas com câmera acoplada ao microscópio de fase invertida (Axiovert 25, Carl Zeiss, Germany) do processo de mineralização após coloração com vermelho de alizarina, onde os nódulos ricos em cálcio adquirem coloração vermelha.

Mostra-se a formação de matriz mineralizada ao 14° dia e ao 21° dia do controle; 1  $\mu$ g/mL de Menoflavon<sup>®</sup> (57,5 nM de D + 15 nM de G) e 1  $\mu$ g/mL de ESBF (2,361 nM de D + 1,845 nM de G).

## 4.9 Considerações finais

A qualidade de vida da mulher tende a sofrer um grande decréscimo com a chegada da menopausa e os seus sintomas. Destes, podemos citar as ondas de calor, problemas de concentração, instabilidade emocional e distúrbios do sono. No entanto os sintomas mais perigosos para a saúde da mulher são as mudanças no metabolismo e a perda da massa óssea que leva á osteoporose, o alvo do nosso trabalho (CRISAFULLI et al., 2005).

Para prevenir o aparecimento da osteoporose em mulheres na menopausa é aconselhável o uso de terapias de reposição hormonal (TRH), entretanto, a literatura aponta uma correlação do uso de TRH com o desenvolvimento de câncer de mama e problemas tromboembólicos (WHI, 2002).

As terapias modernas para a osteoporose incluem as drogas antirreabsortivas como os bisfosfonados, *glucagon-like peptide 2* (GLP-2), inibidores da catepsina K e drogas formadoras de osso como paratormônios, moduladores dos receptores sensíveis á cálcio e moduladores da sinalização Wnt (DEAL, 2009).

No entanto, nosso interesse é a busca por uma terapia alternativa, que vise não só o retrocesso no quadro da perda óssea, mas também sirva como prevenção para o seu aparecimento nas mulheres após a menopausa.

Atualmente, há um crescente número de pesquisas clínicas utilizando mulheres na menopausa que apontam benefícios do uso de fitoestrógenos como terapia alternativa á TRH, inclusive evidenciando a proteção contra a perda óssea e aumento da densidade mineral óssea na menopausa (CLIFTON-BLIGH et al., 2001 - ATKINSON et al., 2004a). No entanto, pouco se tem na literatura sobre os efeitos *in vitro* das isoflavonas nas culturas primárias de osteoblastos privados da presença de estrógeno.

O nosso trabalho avaliou a capacidade osteogênica de diferentes concentrações dos fitoestrógenos Menoflavon<sup>®</sup> e ESBF em cultura primária de osteoblastos (por assemelharem-se mais às células presentes nos seres vivos do que as células de linhagem). Entretanto, ambos os medicamentos testados não mostraram um efeito anabólico significativo na cultura celular citada. Mas o ESBF mostrou-se melhor do que o Menoflavon<sup>®</sup>, por proporcionar um efeito melhor em uma concentração 24 vezes menor.

Dados que não são suficientes para descartar os efeitos benéficos das isoflavonas no tecido ósseo; pois como foi citado anteriormente, os medicamentos atuantes no tecido ósseo dividem-se em antirreabsortivos e osteogênicos e nosso trabalho focou-se em avaliar a possível característica osteogênica dos dois compostos.

Há a necessidade futura de testar a característica antirreabsortiva destes compostos, principalmente porque a literatura aponta várias pesquisas clínicas que obtiveram melhora do quadro osteoporótico com aumento da densidade mineral óssea e prevenção da perda de massa óssea com o uso de isoflavonas em mulheres na menopausa (CLIFTON-BLIGH et al., 2001 - ATKINSON et al., 2004a), além de algumas pesquisas evidenciarem o aumento da liberação de fatores antirreabsortivos pelos osteoblastos como a osteoprotegerina, e a diminuição de fatores estimuladores da reabsorção óssea como o RANKL (LI et al., 2012 – CHEN, X. W.; GARNER, S. C.; ANDERSON, J. J. B., 2002 – DE WILDE et al., 2004).

Śliwiński et al. (2009) mostrou que as isoflavonas atuam no metabolismo ósseo não por aumentar a proliferação dos osteoblastos, mas sim por impedir que a reabsorção óssea ocorra, e o nosso trabalho mostrou que não houve um aumento da proliferação dos osteoblastos e de seus fatores osteogênicos.

Contudo, nossos resultados colaboram para a elucidação do mecanismo de ação das isoflavonas no tecido ósseo; assunto que comporta um amplo espectro de pesquisas, já que é uma proposta de tratamento natural e menos agressivo para as mulheres na menopausa, e consequentemente com osteoporose.

- O Menoflavon® e o ESBF não promoveram o aumento da proliferação celular dos osteoblastos nas concentrações testadas.
- Não houve aumento da dosagem de proteína total celular nas concentrações testadas de ESBF e Menoflavon®.
- Houve um decréscimo significativo da atividade da fosfatase alcalina em várias concentrações de Menoflavon® e ESBF
- A formação de matriz mineralizada manteve-se constante para o ESBF e para o Menoflavon® em quase todas as concentrações testadas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AZZAWI, F. The menopause and it's treatment in perspective. **Postgrad. Med. J.**, London, v.77, n.907, p.292-304, may. 2001.

ALOIA J. F., COHN S. H., OSTUNI J. A. Prevention of involutional bone loss by exercise. **Ann Intern Med**, 1978; v.89, p.356-358 apud AISENBREY, J. A., 1987.

ALVES, D. L.; da SILVA, C. R. Fitohormônios – abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

ANDERSON, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. Clin. Orthop. Rel. Res. v.314, p.266-280, 1995.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. **Arquives of Biochemistry and Biophysics**, v.356, n.2, p.133-141, 1998.

ATKINSON, C.; COMPSTON, J, E.; DAY, N. E., DOWSELT, M.; BINGHAM, S. A. Effetto degli isoflavoni del trifoglio rosso sulla densità ossea delle donne in menopausa: uno studio in doppio cieco, randomizzato e contro placebo. **Am. J. Clin. Nutr.** v.79, p.326-333, 2004a.

ATKINSON, C.; OOSTHUIZEN, W.; SCOLLEN.; LOKTIONOV, A.; DAY, N. E.; BINGHAM, S. A. Moderati effetti protettivi di isoflavoni Del trifoglio rosso da fattori di rischio di malattie vascolari in donne in perimenopausa e evidenza di un'interazione com Il genótipo ApoE in donne comprese tra i 49 e 65 anni. **J. Nutr.**, v.134: p.1759-1764, jul. 2004b.

ATMACA, A.; KLEEREKOPER, M.; BAYRAKTAR, M.; KUCUK, O.; FACN. Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis. **Menopause**, v.15, n.4, Pt1, p.748-757, 2008.

BARNABEI, V. M.; GRADY, D.; STOVALL, D. W.; CAULEY, J. A.; LIN, F.; STUENKEL, C. A.; STEFANICK, M. L.; PICKAR, J. H. Menopausal symptoms in older women and the effect of treatment with hormone therapy. **Obstet. Gynecol.**, New York, v. 100; n.6, p. 1209-1218, dec. 2002.

BARNES, B. Soy isoflavonas – Phytoestrogens and what else? **J. Nutr.**, v.134, n.5, p.1225-1228, may. 2004.

BONNELYE, E.; AUBIN, J. E. Estrogen receptor-related receptor α: A mediator of estrogen response in bone – Review. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.90, n.5, p.3115-3121, may. 2005.

BORELLI A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: Filho ETC, Netto MP. **Geriatria** – **Fundamentos, clínica e terapêutica**. 1ªed. São Paulo: Atheneu v.22, p.297-307, 2000.

BOSSEMEYER, A. Aspectos gerais do climatério. In: FERNANDES, C. E.; MELO, N. R.; WEHBA, S. Climatério Feminino: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. São Paulo: Lemos Editorial, 1999.

CAMOLEZI, F. L.; DAGHASTANLI, K. P. R.; MAGALHÃES, P. P.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v.1282, p.1-11, 2002.

CHEN, X. W.; GARNER, S. C.; ANDERSON, J. J. B. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v.295, p.417-422, 2002.

CHRISTIANSEN, C. Hormone replacement therapy for the menopausal woman. **Maturitas**, Amsterdam, v.38, suppl.1, s.1-2, jun. 2001.

CIANCAGLINI, P.; SIMÃO, A. M. S.; CAMOLEZI, F. L.; MILLÁN, J. L.; PIZAURO, J. M. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.39, p.603-610, 2006.

CIANCAGLINI, P.; YADAV, M. C.; SIMÃO, A. M. S.; NARISAWA, S.; PIZAURO, J. M.; FARQUHARSON, C.; HOYLAERTS, M. F.; MILLÁN, J. L. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles. **J. Bone Min. Res.** v.25, p.716-726, 2010.

CLIFTON-BLIGH, P. B.; BABER, R. J.; FULCHER, G. R.; NERY, M; MORETON, T. Gli effetti di isoflavoni estratti dal trifoglio pratense sui lipidi e sul metabolismo ósseo. **Menopause.** v.8, n.4, 259-265, jul. 2001.

CONRAD, C.; HUSS, R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **Journal of Surgical Research**, v.124, p.201-208, 2005.

COSTA-PAIVA, L.; HOROVITZ, A. P.; SANTOS, A O.; FONSECHI-CARVASAN, G. A.; PINTO-NETO, A. M. Prevalência de osteoporose em mulheres na pósmenopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. **R.B.G.O.**, v.25, n.7, p.507-512, 2003.

CRISAFULLI, A.; D'ANNA, R.; BAVIERA, G.; CORRADO, F.; CANCELLIERI, F.; SQUADRITO. The effect of the phytoestrogen genistein and hormone replacement therapy on homocysteine and C-reactive protein level postmenopausal women. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v.5, p.474-477, may. 2005.

DEAL, C. Potential new drug targets for osteoporosis. **Nature Clinical Pratice Rheumatology**, v.5, p.20-27, n.1, 2009.

DE WILDE, A.; LIEBERHERR, M.; COLIN, C.; POINTILLART, A. A low dose of daidzein acts as an ERβ-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. **Journal of Cellular Physiology**, v.200, p.253-262, 2004.

DORNSTAUDER, E.; JISA, E.; UNTERRIEDER, I.; KRENN, L.; KUBELKA, W.; JUNGBAUER, A. Attività estrogenica di due estratti standardizzati di trifoglio pratense (Menoflavon®) per uso su vasta scala nella terapia ormonale sostitutiva. J. of Ster. Biochem. & Mol. Biol. 2005.

FANTI, P.; MOULER-FAUGERE, M. C.; GANG, Z. The phytoestrogen genistein reduces the bone loss in short-term ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v.8, n.3, p.274-28, 1998.

FERNANDES, C. E.; MELO, N. R.; WEHBA, S.; MACHADO, R. B.; Osteoporose pós-menopáusica. In: FERNANDES, C. E.; MELO, N. R.; WHEBA, S. **Climatério feminino: Fisiopatologia, diagnóstico e tratamento**. 1.ed. São Paulo: Lemos, 1999.

FERNANDES, H.; MENTINK, A.; BANK, R. A.; STOOP, R.; VAN BLITTERSWIJK, C.; DE BOER, J. Endogenous collagen influences differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. **Tissue Eng.** Part. A, v.16, n.5, p.1693-1702, 2009.

FILES, J. A.; KO, M. G.; PRUTHI, S. Bioidentical Hormone Therapy. *Mayo* Clin. **Proc.**, v.86, n.7, p.673-680, jul. 2011.

FUMAGALLI, H. F. Avaliação do efeito do extrato de soja (Glycine max) biotransformado pelo fungo Aspergillus awamory em cultura de células de câncer de mama estrógeno-dependente e independente. **Tese de mestrado**, Faculdade de

Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

GE, Y.; CHEN, D.; XIE, L.; ZHANG, R. Enhancing effect of daidzein on the differentiation and mineralization in mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. **Yakugaku Zasshi**. v.126, n.8, p.651-656, 2006.

GENAZZANI, A. R.; GAMBACCIANI, M.; SOCIETY. Controversial issues in climacteric medicine I. Cardiovascular disease and hormone replacement therapy. International Menopause Society Expert Workshop. 13-16 October 2000, royal society of medicine, London, UK. **Climateric**. New York, v.3, n.4, p.233-240, dec. 2001.

GEORGETTI, S. R. Obtenção de extrato seco padronizado de Glycine max (soja): otimização dos processos de extração e secagem, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo e estudos de estabilidade química. **Tese de doutorado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2007.

GEORGETTI, S. R.; VICENTINI, F. T. M. C.; YOKOYAMA, C. Y.; BORIN, SPADARO, A. C. C.; FONSECA, M. J. V. Enhanced *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different  $\beta$ -glucosidase-producing fungi. **J. of Applied Microb.**, v.106, p.459-466, 2009.

GREGORY, C. A.; GUNN, W. G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D. J. An Alizarin redbased assay of mineralization by adherent cells in culture: compairson with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, v.329, p.77-84, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., Cap. 81, 2006.

HA, H.; LEE, H. Y.; LEE, J. H.; JUNG, D.; CHOI, J.; SONG, K. Y.; JUNG, H. J.; CHOI, J. S.; CHANG, S. I.; KIM, C. Formononetin prevents ovariectomy-induced bone loss in rats. **Arch. Pharm. Res.** v.33, n.4, p.625-632, 2010.

HANS, S; WALSH, B; EVANS, S; KRACHE, M; RAVNIKAR, V. The effect of transdermal estradiol on hormone and metabolic dynamics over a six-week period. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.715, p.671-676, sep. 1988.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that

gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**. v.48, p.422-427, 1972.

HEANEY, R. P.; RECKER, R. R.; SAVILLE, P. D. Menopausal changes in calcium balance performace. **J. Lab. Clin. Med.** v.92, p.953-963, 1978; apud AISENBREY J. A., 1987.

HICKEY, M.; DAVIS, S. R.; STURDEE, D. W. Treatment of menopausal symptoms: what shall we do now? **Lancet**, v.366, n.9483, p.409-421, 2005.

HULLEY, S.; GRADY, D.; BUSH, T.; FURBERG, C.; HERRINGTON, D.; RIGGS, B.; VITTINGHOFF, E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin replacement Study (HERS) Research Group. **JAMA**, Chicago, v.280, n.7, p.605-613, aug. 1998.

IBGE. Sobre a condição de saúde dos idosos: Indicadores selecionados. **Indicadores Sociodemográficos de saúde no Brasil**, 2009.

KATKOV, I. I.; KAN, N. G.; CIMADAMORE, F.; NELSON, B.; SNYDER, E. Y.; TERSKIKH, A. V. DMSO-Free Programmed Cryopreservation of Fully Dissociated and Adherent Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells International.**, jun. 2011.

KAWAKAMI, Y; TSURUGASAKI, W; OSADA, K. Compairson of the functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p.205-212, apr. 2005.

LI, Y. Q.; XING, X. H.; WANG, H.; WENG, X. L.; YU, S. B.; DONG, G. Y. Dose-dependent effects of genistein on bone homeostasis in rats' mandibular subchondral bone. **Acta Pharmac. Sinica**, v.33, p.66-74, 2012.

LUKERT B. P. Diagnosis and management of osteoporosis. **Compr. Ther.** v.10, p.8-14, 1984; apud AISENBREY J. A., 1987.

MACKEY R; EDEN, J. Phytoestrogens and menopause. **Climateric: The Journal of the International Menopause Society**, New York, v.4, p.302-308, dec. 1998.

MARQUES NETO J. F., LEDERMAN R. Osteoporose Brasil 2000. Ed. Limay.1995.P.137 apud COSTA-PAIVA L, FILARDI S, PINTO-NETO A. M.,

SAMARA A, MARQUES-NETO J. F. Impact to degenerative radiographic abnormalities and vertebral fractures on spinal bone density of women with osteoporosis. **Med J.** São Paulo; v.120, n.1, 2002.

MILLÁN, J. L. Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology, *Wiley-VCH* **VerlagGmbH&Co.**, p.1-322, Weinheim, Germany. 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MURPHY, P. A.; SONG, T.; BUSEMAN, G.; BARUA, K.; BEECHER, G. R.; TRAINER, D.; HOLDEN, J. Isoflavones in retail and institutional soy foods. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v.47, n.7, p.2697-2704. Jul. 1999.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v.110, n.10, p.3499-3506, 2007.

NECO G. P. B. Proposta cinesioterápica no tratamento da mulher climatérica. **Fisioter. Mov.** v.7, n.1, p.30-48, 1994.

NORDIN B. E. C., CHATTERTON B. E., NEED A, HOROWITZ M. The definition, diagnosis and classification of osteoporosis. **Phys. Med. Rehabil. Clín. North Am.** v.6, p.395-414, 1995; apud PLAPLER, P. G. 1997.

OSTERLUND, M. K.; HURD, Y. L. Estrogen receptors in the human forebrain and the relation to neuropsychiatric disorders. **Progress in neurobiology**, v.64, p.251-267, jun. 2001.

PAULO M.; SALVADOR M. M., FILHO, M. A. N.; MONTES, M. B. A.; FRANCESCHINI, S. A.; TOLOI, M. R. T. Activation of nitric oxide synthesis in endothelial cell by different phytoestrogens. In: 13 World Congress of Gynecological Endocrinology, 2008, Florença. The official journal of the international society of gynecological endocrinology, Florença: Informa healthcare, v.24, p.216, 2008.

PLAPLER P. G. Osteoporose e exercícios. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**. v.52, n.3, p.163-170; 1997.

PESQUISA NACIONAL POR AMOSTRA DE DOMICÍLIOS-PNAD. Rio de Janeiro: 2001.

PIERSEN, C. E.; BOOTH, N. L.; SUN, Y.; LIANG, W.; BURDETTE, J. E.; VAN BREEMEN, R. B.; GELLER, S. E.; GU, C.; BANUVAR, S.; SHULMAN, L. P.; BOLTON, J. L.; FARNSWORTH. Caratterizzazione chimica e biológica e valutazione clinica di um prodotto fitoterápico: Studio di fase I. Il Trifoglio rosso come modello. **Cur. Med. Chem.**, v.11, p.1361-1374, 2004.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. Biology of mesenchymal stem cells. **Int. J. of the Care of the Inj.**, v.365, p. S8-S12, 2005.

PRIOR, J. C.; VIGNA, Y. M.; SCHECHTER, M. T.; BURGESS, A. E. Spinal bone loss and ovulatory disturbances. *N. Engl. J. Med.* v.323, p.1222-1227, 1990; apud KRAHE, C.; FRIEDMAN, R.; GROSS, J. L. Risk factors for decreased bone density in premenopausal women. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.30, n.9, p.1061- 1066, 1997.

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

RASSI, C. M.; LIEBERHERR, M.; CHAUMAZ, G.; POINTILLART, A.; COURNOT, G. Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzeína via caspase 3. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v.17, n.4, p.630-638, apr. 2002.

REINLI, K; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods – a compendium of literature values. **Nutr. Cancer**, v.26, p.123-148, 1996.

RICHART, R. M.; LINDSAY, R. Osteoporosis and its relationship to estrogen. **Contemporary Ob/Gyn.** v.24, p.201-224, 1984; apud AISENBREY, J. A., 1987.

SETCHELL, K. D.; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite aqual-a clue to the effectiveness of soy and its isoflavonas. **J. Nutr.,Philadelphia**, v.132, n.12, p.3577-3584, dec. 2002.

SAY, J. C.; CIUFFI, K.; FURRIEL, R. P. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. **Biochem. Biophys. Acta**. v.1074, p.256-262, 1991.

SIMÃO, A. M. S.; BELOTI, M. M.; CEZARINO, R. M.; ROSA, A. L.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic

mineralization and rat bone marrow cell culture. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol**. v.146, p.679-687, 2007a.

SIMÃO, A. M. S.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L.; DE OLIVEIRA, P. T.; GRANJEIRO, J. M.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. **Cell Biol. Int.** v.31, p.1405-1413, 2007b.

SIMÃO, A. M. S. Estudos das características cinéticas da fosfatase alcalina reconstituída em sistemas vesiculares. **Tese de doutorado**, 2008.

SIMÃO, A. M. S.; YADAV, M. C.; NARISAWA, S.; BOLEAN, M.; PIZAURO, J. M.; HOYLAERTS, M. F.; CIANCAGLINI, P.; MILLÁN, J. L. Proteoliposomes Harboring Alkaline Phosphatase and Nucleotide Pyrophosphatase as Matrix Vesicle Biomimetics. **J. of Biol. Chem.**, v.285, n.10, mar. 2010.

SIMONCINI, T.; FORNARI, L.; MANNELLA, P.; CARUSO, A.; GARIBALDI, S.; BALDACCI, C.; GENAZZANI, A. R. Activation of nitric oxide synthesis in human endothelial cells by red clover extracts. **Menopause**, New York, v.12, n.1, p.69-77, jan./feb. 2005.

ŚLIWIŃSKI, L.; FOLWARCZNA, J.; NOWIŃSKA, B.; CEGIELA, U.; PYTLIK, M.; KACZMARCZYK-SEDLAK, I.; TRZECIAK, H.; TRZECIAK, H. I. A comparative study of the effects of genistein, estradiol and raloxifene on the murine skeletal system. **Acta Biochimica Polonica**, v.56, n.2, p.261–270, 2009.

SOMJEN, D.; KATZBURG, S.; SHARON, O.; GRAFI-COHEN, M.; KNOLL, E.; STERN, N. The effects of estrogen receptors α- and β- specific agonists and antagonists on cell proliferation and energy metabolism in human bone cell line. **J. of Cel. Bioch.** v.112, p.625-632, 2011.

SZEJNFELD, V. L. Reumatologia. In: PRADO, F. C.; RAMOS, J.; VALLE, J. R. **Atualização terapêutica**. 20ªed. São Paulo: Artes Médicas. v.18, p.1434-1437, 2001.

SZEJNFELD, V. L. Alterações ósseas: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. In: FERNANDES, C. E. **Menopausa: diagnóstico e tratamento**. 1ªed. São Paulo, p.49, 2003.

SZEJNFELD, V. L. Osteoporose. Rev Bras Med. v.61, n.7, p.417-428, 2004.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. Corpo Humano: Fundamentos de anatomia e fisiologia. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TRENCH, B.; SANTOS, C. G. Menopausa ou Menopausas? **Saúde e Sociedade**, v.14, n.1, p.91-100, 2005.

UCHIYAMA, S.; YAMAGUCHI, M. Genistein and zinc synergistically enhance gene expression and mineralization in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **International Journal of Molecular Medicine**. v.19, p.213-220, 2007.

VATER, C.; KASTEN, P.; STIEHLER, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. **Acta Biomater.** v.7, n.2, p.463-477, feb. 2011.

VISTICA, D. Tetrazolium-based assays for cellular viability: Acritical examination of selected parameters affecting formazan production, **Cancer Research**. v.51, p.2515-2520, 1991.

WARREN, M. P.; SHORTLE, B.; DOMINGUEZ, J. E. Use of alternative therapies in menopause. **Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.** London, v.16, n.3, p.411-448, jun. 2002.

WHEDON, G. D. Osteoporosis. **N. Engl. J. Med.** v.6, p.397-398, 1981; apud AISENBREY, J. A., 1987.

WHI: 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.** v.288, p.321-333, 2002.

WILLIAMS, J.P., JORDAN, S.E., BARNES, S. Tyrosine kinase inhibitor effects on osteoclastic acid transport. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.68, n.6, p.1369-1374, 1998.

YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. **Endocr. Rev.**, n.21, v.4, p.393-411, aug. 2000.

YAMAGUCHI, M.; SUGIMOTO, E. Stimulatory effect of geistein and daidzein on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells: Activation of aminoacyl-tRNA synthesise. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.214, p.97-102, 2000.

(http://www.menoflavon.it/download/studi\_clinici\_menoflavon.pdf; acesso em 18 de agosto de 2010, ás 14:05min).

(http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\_visualiza.php?id\_noticia=1 866&id\_pagina=1; acesso em 19 de agosto de 2010, ás 08:20min.)