

RINALDO FLORÊNCIO DA SILVA

**EFEITOS DAS ISOFLAVONAS DA SOJA ASSOCIADAS À
VIBRAÇÃO MECÂNICA DE BAIXA INTENSIDADE NO TECIDO
ÓSSEO DE RATAS OSTEOPÊNICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2011

RINALDO FLORÊNCIO DA SILVA

**EFEITOS DAS ISOFLAVONAS DA SOJA ASSOCIADAS À
VIBRAÇÃO MECÂNICA DE BAIXA INTENSIDADE NO TECIDO
ÓSSEO DE RATAS OSTEOPÊNICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Co-orientador: Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato

São Paulo

2011

Silva, Rinaldo Florêncio da

Efeitos das isoflavonas da soja associadas à vibração mecânica de baixa intensidade no tecido ósseo de ratas osteopênicas. /

Rinaldo Florêncio da Silva. -- São Paulo, 2011.

xx, 96f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia.

Título em Inglês: Effects of soy isoflavones associated with low intensity mechanical vibration on bone tissue of ooforectomized rats.

1. Soy isoflavones; Mechanical vibration; 2. Bone; 3. Osteopenic rats.

Orientador:

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Prof. Livre Docente da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – UNIFESP/EPM

Co-orientador:

Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato

Profa. Adjunta da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – UNIFESP/EPM.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E GENÉTICA



Chefe do Departamento: Profa. Dra. Sima Godosevicius Katz

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Janete Maria Cerutti

DISCIPLINA DE HISTOLOGIA E BIOLOGIA ESTRUTURAL

Chefe da Disciplina: Profa. Dra. Rejane Daniele Reginato

RINALDO FLORÊNCIO DA SILVA

EFEITOS DAS ISOFLAVONAS DA SOJA ASSOCIADAS À VIBRAÇÃO MECÂNICA DE
BAIXA INTENSIDADE NO TECIDO ÓSSEO DE RATAS OSTEOPÊNICAS

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marise Lazaretti Castro _____

Prof. Dr. Edmund Chada Baracat _____

Prof.Dr. Paulo Sérgio Cerri _____

Suplente:

Prof. Dr. José Maria Soares Júnior _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe e irmão, pelo amor, incentivo, compreensão e por ter me fornecido a base de tudo. Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela saúde, sabedoria e amparo em todos os momentos.

À **Profa. Dra. Janete Maria Cerutti**, coordenadora do curso de pós-graduação do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP pelo apoio e oportunidade.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith**, pela oportunidade de cursar a pós-graduação pelo Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP.

Ao Prof. Dr. **Manuel de Jesus Simões**, meu orientador, o qual tenho grande admiração, não só pelo profissionalismo, mas também pelo ser humano que é. Muito obrigado pela oportunidade, incentivo e orientação!

À Profa. Dra. **Rejane Daniele Reginato**, por ter me co-orientado durante todas as fases desse projeto. Sem sua ajuda não seria possível realizar esse trabalho. Muito obrigado pelos valiosos ensinamentos, incentivo, dedicação, paciência e momentos de descontração. Jamais esquecerei!

Ao Prof. Dr. **Eduardo Katchburian**, pelos valiosos ensinamentos. Ressalto aqui que é um privilégio para qualquer estudante, principalmente de tecido ósseo, conviver com esse grande professor. Sem dúvida nenhuma, um dos maiores cientistas e mestres que tive a oportunidade de conhecer.

À Profa. Dra. **Helena Bonciani Nader** (Departamento de Bioquímica – UNIFESP) por colaborar e ceder o espaço em seu laboratório para as análises de biologia molecular.

À Profa. Dra. **Keico Okino Nonaka** (UFSCar) por ceder o espaço e os equipamentos em seu laboratório para as análises físicas e biomecânicas.

À Profa. Dra. **Marise Lazaretti Castro** (Disciplina de Endocrinologia – UNIFESP) por ceder gentilmente a gaiola vibratória para ratos, desenvolvida pelo Departamento de Bioengenharia da USP – São Carlos). Muito obrigado!

À Dra. **Mônica Longo** (Disciplina de Endocrinologia - UNIFESP) pelas instruções para uso da gaiola vibratória.

À **Geni**, Técnica da Disciplina de Endocrinologia – UNIFESP pela assistência na realização da densitometria óssea. Muito obrigado pela valiosa ajuda!

A todos os Docentes da Disciplina de Histologia - e Biologia Estrutural: **Dra. Rejane Daniele Reginato, Dr. Manuel de Jesus Simões, Dr. Eduardo Katchburian, Dra. Sima Godosevicius Katz, Dra. Mizue Imoto Egami, Dra. Rita de Cássia Ribeiro da Silva Lapa e Dr. Álvaro.** Muito obrigado pelos valiosos ensinamentos!

À **Gisela Sasso (Gisa)** e **Miriam Aparecida**, que não são apenas colegas de pós-graduação, mas grandes amigas e companheiras que admiro muito. Muito obrigado não só pelas incontáveis ajudas durante todas as fases desse trabalho, mas também pelos inesquecíveis momentos de descontração e gargalhadas!

Ao **Prof. Jairo José Matozinho Cubas** (orientador da graduação), pelos ensinamentos e por me levar para conhecer o laboratório da disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da UNIFESP.

À **Valquíria Medeiros (Pós-Doutoranda)** e **Grace (iniciação científica)** pela paciência e valiosa ajuda durante todas as etapas de extração dos glicosaminoglicanos, ensaio de Elisa e posteriores análises moleculares. Muito obrigado!

À **Sônia da Silva** (Doutoranda do Departamento de Cirurgia) pela ajuda na captação das imagens da microscopia de polarização.

Aos doutorandos **Fábio Pastor, Charles Chenwei Wang** pelo auxílio no processamento do material para as análises físicas e biomecânicas.

Aos colegas de pós-graduação da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural, **Rafael Pacheco, Adriana Carbonel, Luiz Fuchs, Roberta Woff, Carla Maganhin, Luciana Alécio, Lilian Macedo, Regina Célia, Renato Tesser, Pedro Scherholz, Juliana Mora, Márcio Moura, Wémerson Ferreira e Robson Gutierre.** Muito obrigado pelo convívio!

As estudantes de iniciação científica e colegas de laboratório **Patrícia Gonçalves, Jenifer Freitas, Marta Alves (Martinha), Priscila Armijo, Talissa Cavalieri, Luciene do Nascimento,** pelo alegre convívio. Admiro muito vocês!

A todos os funcionários da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural, **Paulinho, Kellen Martins, Ilça Bessa, Aparecida Amaral (Dona Cida), Pedro Nobre**

(Pedrinho), Vicente Barros, Ednaldo, Sandra Santos, Luzia e Licurgo. Muito obrigado pelo apoio e momentos de descontração.

À secretária da pós-graduação **Sílvia Borragini Abuchaim** pela dedicação e suporte.

À minha mãe **Antônia Ocília da Silva** e irmão **Alessandro Florêncio da Silva**. Seria necessário um livro com infinitas páginas para expressar o significado deles em minha vida. O que sou hoje agradeço a eles. Amo vocês!

Meus sinceros agradecimentos as vidas dos animais que fizeram parte desse projeto!

Trabalho realizado com apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – CAPES.

*“O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano.”*

(Isaac Newton)

Sumário

Dedicatória.....	vi
Agradecimentos	vii
Lista de figuras.....	xiii
Lista de tabelas.....	xvi
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xvii
Resumo.....	xx
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 O tecido ósseo	3
2.1.1 As células do tecido ósseo.....	4
2.1.2 A matriz óssea.....	6
2.2 O metabolismo ósseo.....	10
2.3 A osteoporose.....	11
2.4 A Terapia hormonal.....	12
2.5 Isoflavonas da soja.....	12
2.5.1 Isoflavonas da soja e tecido ósseo.....	13
2.5.1.1 Mecanismo de ação das Isoflavonas da soja no tecido ósseo.....	14
2.6 Vibração mecânica e tecido ósseo.....	16
2.7 Associação entre agentes mecânicos e não mecânicos no tecido ósseo.....	17
2.7.1 Associação entre isoflavonas da soja e estímulo mecânico no tecido ósseo.....	18
3 OBJETIVOS.....	20
4 MÉTODOS.....	21
4.1 Animais de experimentação.....	21
4.2 Obtenção do modelo experimental.....	21
4.2.1 Procedimento cirúrgico da ooforectomia bilateral.....	21
4.3 Pós-operatório	23
4.4 Exame colpocitológico	23
4.5 Protocolo experimental.....	23
4.6 Administração das isoflavonas da soja.....	25
4.7 Procedimento da vibração mecânica de baixa intensidade.....	26
4.8 Eutanásia e coleta do material.....	27
4.9 Parâmetros físicos e biomecânicos em tíbias.....	28
4.9.1 Parâmetros físicos.....	28
4.9.2 Parâmetros biomecânicos.....	29
4.10 Análise morfológica.....	31
4.10.1 Processamento histológico	31
4.10.2 Coloração pela hematoxilina e eosina (H.E)	31

4.10.3 Histomorfometria óssea.....	32
4.10.4 Histoquímica pelo alcian blue em pH 2,5 e 0,5.....	33
4.10.5 Análise semiquantitativa das fibras colágenas pelo método histoquímico de Picro-sírius Red (PS) em microscópio de luz polarizada.....	34
4.11 Quantificação do condroitin sulfato nos fêmures por eletroforese em gel de agarose.....	34
4.12 Método do TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling).....	35
4.13 Análise estatística.....	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Peso corporal.....	37
5.2 Comprimento e espessura dos fêmures e tíbias.....	38
5.3 Parâmetros físicos.....	39
5.4 Parâmetros biomecânicos.....	42
5.5 Histomorfometria óssea.....	43
5.5.1 Volume ósseo trabecular (BV/TV)	43
5.5.2 Espessura do osso cortical (Ct.Wi)	44
5.5.3 Área do osso cortical (Ct.Ar).....	45
5.6 Quantificação dos GAGs pelo método histoquímico do alcian blue.....	46
5.7 Identificação e quantificação do condroitin sulfato (CS) nos fêmures.....	47
5.8 Análise semiquantitativa da birrefringência do colágeno dos fêmures por microscópio de luz polarizada.....	48
5.9 Método do TUNEL.....	49
5.10 Fotomicrografias.....	50
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÕES.....	66
8 REFERÊNCIAS.....	67
9 ANEXOS.....	95
9.1 Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	95
Abstract	
Bibliografia consultada	

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura química das principais isoflavonas (genisteína e daidzeína) e do estradiol. Adaptado de Oseni et al., (2008).

Figura 2 – A, B, C, D, E e F: Procedimento cirúrgico da ooforectomia bilateral.

Figura 3. Diagrama representativo do desenho experimental.

Figura 4 - Foto representativa da aplicação oral das isoflavonas da soja em ratas *Wistar*, pela técnica de gavagem utilizando-se uma cânula metálica acoplada a uma seringa de 5,0mL.

Figura 5, A e B - Plataforma vibratória para ratos (desenvolvida pelo Depto. de Bioengenharia da USP - São Carlos).

Figura 6 – Em A e B: Máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em tíbias de ratas. Em C: Esquema do ensaio.

Figura 7 - Fotomicrografia de corte histológico da região do osso fêmur distal de rata *Wistar* ilustrando as áreas de interesse para a análise histomorfométrica.

Figura 8. Representação da interface do programa ImageLab®, onde foi quantificada a intensidade do azul que reflete a quantidade dos GAGs, através da técnica histoquímica de alcian blue.

Figura 9 – Média do peso corporal dos animais durante todo o período experimental. Média \pm DP.

Figura 10 – Média do comprimento (A) e espessura (B) dos fêmures. Média \pm DP.

Figura 11 – Média do comprimento (A) e espessura (B) das tíbias. Média \pm DP. $P < 0,05$, #SHAM vs. OVX-ISO, *SHAM vs. OVX-ISO+VBI.

Figura 12 – Parâmetros físicos em tíbias. Peso imerso (B), densidade óssea (D) e porcentagem de material orgânico (H), $p < 0,05$: *SHAM, [§]OVX-VIB e [#]OVX-ISO+VIB vs. OVX e OVX-ISO. Volume ósseo (C), densidade mineral óssea (E), porcentagem de material mineral (G) e peso das cinzas (J), $p < 0,05$: *OVX e [#]OVX-ISO vs. SHAM, OVX-VIB e OVX-ISO+VIB. Média \pm DP.

Figura 13 – Parâmetros biomecânicos: Carga da fratura (A), Deslocamento no ponto da fratura (B), Tenacidade (C), Carga máxima (D), Resiliência (E), Deslocamento máximo (F) e Rigidez (G). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Média \pm DP.

Figura 14 – Média da área óssea trabecular dos fêmures. $P < 0,05$, SHAM vs. OVX, OVX-ISO, OVX-VIB e OVX-ISO+VIB. Média \pm DP.

Figura 15 - Média da espessura do osso cortical dos fêmures. $P < 0,05$, *OVX vs. [#]SHAM, OVX vs. OVX-ISO, [§]OVX vs. OVX-VIB, [@]OVX-ISO+VIB vs. OVX-VIB. Média \pm DP.

Figura 16 – Média da área do osso cortical dos fêmures. $P < 0,05$, *OVX vs. SHAM, [#]OVX-ISO+VIB vs. SHAM. Média \pm DP.

Figura 17 – Quantidade (%) de GAGs sulfatados e carboxilados (pH 2,5) e apenas as sulfatadas (pH 0,5) pelo método do alcian blue na região trabecular dos fêmures distais. $P < 0,05$, SHAM vs. OVX em pH 2,5. Média \pm DP.

Figura 18 – Perfil eletroforético dos GAGs sulfatados.

Figura 19 – Média do condroitin sulfato dos diferentes grupos. $P < 0,05$, *OVX-VIB vs. SHAM. Média \pm DP.

Figura 20 – Fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal das ratas dos diferentes grupos. Coloração H.E, Aumento: 25x (Figuras A, B, C, D e E). Aumento: 100x (Fig. F).

Figura 21 – Fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal das ratas dos diferentes grupos. Coloração: H.E, aumento: 40X.

Figura 22 – Fotomicrografias de cortes histológicos da região trabecular do osso fêmur distal das ratas dos diferentes grupos. Método do Alcian blue (pH 2,5 e 0,5), aumento: 100x.

Figura 23 – Fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal das ratas dos diferentes grupos, visualizadas em microscópio de polarização. Método do Picro-sirius red. Aumento: 200x.

Figura 24 – Fotomicrografias de cortes histológicos do osso fêmur distal de ratas submetidas ao método do TUNEL. Aumento: 400x.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Média da massa corporal durante todo o período experimental.

Tabela 2 - Comprimento e espessura dos fêmures.

Tabela 3 - Comprimento e espessura das tíbias.

Tabela 4 – Histomorfometria óssea dos fêmures.

Tabela 5 - Quantidade (%) dos GAGs sulfatados e carboxilados (pH 2,5) e sulfatados (pH 0,5), na área óssea trabecular dos fêmures distais.

Tabela 6 – Quantificação do condroitin sulfato (CS).

Lista de abreviaturas e símbolos

AB	Alcian Blue
AH	Ácido hialurônico
BSA	Albumina bovina sérica
BV/TV	Volume ósseo trabecular
CS	Condroitin sulfato
Ct	Cortical
Ct.Ar	Área do osso cortical
Ct.Wi	Espessura do osso cortical
DAB	Diaminobenzidina
De	Disco epifisário
DEXA	Absorimetria dupla de energia e raios X
DMO	Densidade mineral óssea
DO	Densidade óssea
DS	Dermatan sulfato
ELISA	Ensaio imuno-enzimático
GAGs	Glicosaminoglicanos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos
HCl	Ácido clorídrico
H.E	Hematoxilina-Eosina
HS	Heparan sulfato
ISO	Isoflavonas
J	Joule

kg	Quilograma
kN	kilo Nilton
M	Molar
Ma	Medula óssea
M-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Newton
nm	Nanômetro
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ooforectomizado
PBS	Solução salina tamponada
Pc	Peso de cinzas
PDA	1,3-diaminopropano acetato
Pe	Periósteo
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Peso imerso
Pm	peso do material mineral (cinzas),
PS	Picro-sirius red
Ps	Peso ósseo da amostra desidratada
PTH	Paratormônio
PTK	Proteínoquinase
Pu	Peso úmido

QS	Queratan sulfato
rpm	Rotações por minutos
SERMs	Moduladores seletivos de receptores estrogênicos
Tb	Trabécula
TCA	Ácido tricloroacético
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling
µg	Micrograma
µm	Micrômetros
µL	Microlitro
VIB	Vibração mecânica
VO	Volume óssea
vs	versus
ρ	Densidade da água destilada

Resumo

Introdução: É sabido que tanto as isoflavonas da soja (ISO) e a vibração mecânica de baixa intensidade e alta frequência (VIB) possuem efeitos protetores no tecido ósseo de ratas ooforectomizadas (OVX). **Objetivos:** estudar os efeitos dos tratamentos com ISO e VIB isolados e combinados no tecido ósseo de ratas OVX. **Métodos:** 50 ratas Wistar com 6 meses de idade foram SHAM operadas ou OVX e após três meses, divididas em 5 grupos: SHAM; OVX; OVX tratadas diariamente por gavagem com 200mg/kg de ISO por 90 dias consecutivos (OVX-ISO); OVX tratadas com VIB, 20 min./dia, 30 Hz, 0.6g, 5 dias por semana por 90 dias (OVX-VIB) e OVX tratadas com ISO e VIB (OVX-ISO+VIB). Após o tratamento, os fêmures e tíbias foram coletados e seus comprimento e espessura foram medidos. Os fêmures foram processados para histomorfometria e aos métodos histoquímicos, bioquímico e do TUNEL. As tíbias foram congeladas e destinadas para testes físicos e biomecânicos. **Resultados:** Os tratamentos não exerceram efeitos significantes no peso corporal e nas medidas de comprimento e espessura, exceto na espessura das tíbias dos grupos OVX-ISO e OVX-ISO+VIB que foi significativamente maior comparado ao grupo SHAM. Os testes físicos mostraram que o peso imerso, a porcentagem de material orgânico e a densidade óssea foram maiores nos grupos SHAM, OVX-VIB e OVX-ISO+VIB quando comparados aos outros grupos, enquanto que o volume ósseo, a densidade mineral óssea, porcentagem de material mineral e o peso das cinzas foram maiores nos grupos OVX e OVX-ISO do que nos outros grupos e não houve diferenças significantes nos parâmetros biomecânicos analisados entre os grupos. Nos fêmures, os tratamentos não exerceram efeitos significantes no volume ósseo trabecular, porém, o tratamento combinado exerceu efeitos positivos no osso cortical. Os tratamentos tiveram efeitos positivos em relação à quantidade e na organização das fibras colágenas e esse efeito foi mais expressivo no grupo OVX-ISO+VIB. O método do TUNEL não detectou diferenças nas células TUNEL-positivas entre os grupos. **Conclusão:** Esses resultados demonstram que o tratamento combinado (ISO+VIB) exerce maior efeito nos constituintes do tecido ósseo de ratas ooforectomizadas osteopênicas, quando comparado aos tratamentos isolados.

Palavras-chave: Isoflavonas da soja, Vibração mecânica, Histologia, tecido ósseo, ratas osteopênicas.

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma patologia que se caracteriza pela perda de massa óssea e pelo comprometimento da microarquitetura do tecido ósseo, o que leva à fragilidade esquelética e conseqüentemente ao aumento do risco de fraturas (Centers for Disease Control, 1991). A osteoporose afeta milhões de pessoas na Europa, no Japão e nas Américas (White, 2002), acometendo principalmente as mulheres com idade acima de 50 anos (Hildebolt, 1997). Em todo o mundo, aproximadamente 200 milhões de mulheres têm osteoporose (International Osteoporosis Foundation, 2007), sendo que no Brasil, cerca de 10 milhões de indivíduos sofrem dessa enfermidade (Sociedade Brasileira de Osteoporose, 2007).

Fraturas osteoporóticas são causas significativas de perda funcional e diminuição na qualidade de vida do indivíduo afetado (Oleksik et al., 2005). Além disso, o alto índice de mortalidade (Jiang et al., 2005), o alto custo e o longo tempo de permanência hospitalar das pessoas acometidas por fraturas osteoporóticas no Brasil, tem tornado a osteoporose um problema de saúde pública (Araújo et al., 2005).

Os primeiros números do censo, no Brasil, alertam para o grande número de idosos (14 milhões), população de maior risco para desenvolver a osteoporose (Maia et al., 2006). A longevidade da população brasileira está aumentando e, em 2050, haverá aproximadamente 15 milhões de idosos com 80 anos ou mais (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2007), e dessa forma, o número de pessoas acometidas pela osteoporose pode aumentar.

A terapia de reposição hormonal com estrógenos em mulheres na pós-menopausa é considerada eficiente na prevenção da perda óssea (Turner et al., 1994). Entretanto, estudos clínicos têm atribuído a este tipo de terapia, o surgimento de efeitos adversos, tais como, aumento no risco de câncer de mama, endométrio e tromboembolismo e, desta forma, seu uso tem sido limitado (Rossouw et al., 2002).

Por essa razão, e devido ao fato da crescente demanda por alternativas terapêuticas naturais, um número significativo de mulheres climatéricas tem utilizado os fitoestrogênios, particularmente as isoflavonas, como alternativa terapêutica para o alívio dos sintomas do climatério (Huntley, Ernst, 2003), bem como contra a perda de massa óssea (Anderson, Garner 1997; Alekel et al., 2000).

Sabe-se que a vibração mecânica de baixa intensidade exerce atividade anabólica sobre o osso (Rubin et al., 2006). No entanto, seus efeitos e mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados e também, não se sabe se a associação entre as isoflavonas da soja com a vibração mecânica de baixa intensidade tem efeito potencializado no tecido ósseo de ratas osteopênicas.

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 O tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e por uma matriz extracelular mineralizada (Sodek, McKee, 2000; Robling et al., 2006).

Atuando como o principal constituinte do esqueleto, o tecido ósseo exerce várias funções tais como, oferecer suporte para as partes moles do organismo, proteger órgãos vitais como os contidos na caixa craniana e torácica, alojam a medula óssea geradora das células do sangue e proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimento (Data et al., 2008). Além disso, o tecido ósseo possui uma função metabólica, que está associada à homeostase mineral, atuando como reservatório de íons vitais, tais como o cálcio e o fósforo, bem como na manutenção das concentrações destes e outros íons nos líquidos corporais (Robling et al., 2006; Fukumoto, Martin, 2009).

Os ossos originam-se de duas maneiras: no seio de uma membrana conjuntiva ou pela substituição gradual de um modelo cartilaginoso pré-existente, sendo estes processos denominados respectivamente de ossificação intramembranosa e endocondral (Arey, 1965; Buckwalter, 1987; 1994; Katchburian, Arana, 2004).

Macroestruturalmente, os ossos subdividem-se em compacto e esponjoso. O primeiro tipo possui uma estrutura densa e sem cavidades, ao passo que o osso esponjoso apresenta uma estrutura formada por placas e barras que se conectam, conhecidas como trabéculas ósseas, além de ser metabolicamente mais ativo do que o osso compacto (Sommerfeldt, Rubin, 2001; Data et al., 2008). No entanto, apesar dessas diferenças, esses dois tipos de tecido ósseo possuem a mesma estrutura histológica básica (Data et al., 2008).

Nos ossos longos, como por exemplo, o fêmur, as extremidades ou epífises são formadas por osso esponjoso com uma delgada camada superficial compacta, denominada de região cortical. A diáfise que é a parte cilíndrica é quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso na sua parte profunda, onde delimita o canal medular. As cavidades do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos são ocupados pela medula óssea (Junqueira, Carneiro, 2008).

Todos os ossos são revestidos externa e internamente por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o periósteo e o endósteo, respectivamente (Katchburian, Arana, 2004).

O tecido ósseo pode ser classificado em imaturo ou primário, onde as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, ou em tecido ósseo secundário ou lamelar, onde as fibras colágenas se organizam em lamelas paralelas uma às outras ou se dispõem em camadas concêntricas formando os Sistemas de Havers (Sommerfeldt, Rubin, 2001). Durante a formação óssea pelos osteoblastos, inicialmente ocorre produção de osso imaturo ou primário, ocorrendo posteriormente uma substituição por osso do tipo secundário ou lamelar (Shapiro, 2008).

2.1.1 As células do tecido ósseo

O tecido ósseo é formado por três tipos de células: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (Sodek, McKee, 2000; Datta et al., 2008). Os osteoblastos são células cubóides derivadas de células mesenquimais primitivas da medula óssea (Datta et al., 2008). Estão situados sempre nas superfícies ósseas (Sommerfeldt, Rubin, 2001). São ricos em organelas implicadas na síntese protéica, tais como, retículo endoplasmático rugoso e Complexo de Golgi.

Essas células são responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz, composta por colágeno tipo I, proteoglicanos e proteínas não colagenosas, além de também participarem do processo de mineralização da matriz óssea (Kierszenbaum, 2004). A matriz óssea recém-formada, adjacente aos osteoblastos ativos e que não está ainda mineralizada, recebe o nome de osteóide (Noble, 2008).

Os osteoblastos iniciam e controlam a mineralização subsequente do osteóide, através de vesículas (vesículas da matriz) contendo fosfato de cálcio que se desenvolvem na superfície dessas células e que posteriormente liberam íons fosfato para o meio extracelular (Katchburian, Arana, 2004). Uma vez aprisionado pela matriz recém sintetizada, os osteoblastos passam a ser chamados de osteócitos. A matriz se deposita ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos, formando assim as lacunas e os canalículos (Bonewald, 2007; Datta et al., 2008; Noble, 2008).

Os osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo (Parfitt, 1990; Marotti, 1996; Manolagas, 2000; Franz-Odenaal, 2006; Kogianni, 2007;

Rocheffort, 2010). Caracterizam-se por apresentarem prolongamentos citoplasmáticos que se comunicam com os osteoblastos da superfície óssea e com outros osteócitos, estabelecendo vias de transporte de nutrientes e metabólitos, exercendo assim, um importante papel no metabolismo ósseo e na manutenção da concentração do cálcio plasmático (Noble et al., 2003). Além disso, os osteócitos são capazes de produzir sinais para remodelação em resposta a fatores mecânicos, sendo dessa forma, consideradas células mecanosensoriais (Katchburian, Arana, 2004; Bonewald, 2006; Rocheffort, 2010).

Sabe-se que diante da deficiência estrogênica, observa-se aumento da apoptose de osteócitos (Tomkinson et al., 1997; 1998;) e estudos sugerem que esse processo exerce um papel central na sinalização e ativação do processo de reabsorção óssea (Noble et al., 1997; Bonewald, 2007; Cardoso et al., 2009). De fato, tem se observado que a morte dos osteócitos pode se constituir num fator quimiotático de osteoclastos, além de estimular sua atividade reabsortiva (Gu et al., 2005).

Dessa forma, a deficiência estrogênica, que promove a apoptose dos osteócitos, pode levar ao aumento do recrutamento e atividade dos osteoclastos, onde esses por sua vez irão degradar o tecido ósseo e fagocitar os osteócitos em apoptose (Gu et al., 2005). Além disso, estudos têm mostrado osteócitos, osteoblastos e células de revestimento ósseo em apoptose sendo fagocitados pelos osteoclastos (Boabaid et al., 2001; Cerri et al., 2003).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas, multinucleadas e são responsáveis pelo processo de reabsorção, caracterizado pela dissolução da matriz óssea em aminoácidos e minerais (Manolagas, 2000; Katchburian, Arana, 2004; Väänänen, Laitala-Leinonen, 2008). Esse processo é realizado por meio da secreção direcionada de ácido hidrocloreídrico no interior de um compartimento fechado denominado de lacuna de reabsorção, conhecida como lacuna de Howship (Fallon, 1984, Baron, 1985; Blair et al., 1989; Takahashi, 2007; Junqueira, Carneiro, 2008; Väänänen, Laitala-Leinonen, 2008). Quando ativos, os osteoclastos apresentam citoplasma acidófilo e com uma região intensamente corada voltada para a superfície da matriz óssea denominada de borda em escova (Gothlin, Ericsson, 1976) e uma região adjacente a essa e menos corada conhecida como zona clara, a qual é desprovida de organelas e rica em filamentos de actina (Suda, Takahashi, 2008).

Quanto a sua ultraestrutura, os osteoclastos apresentam características típicas de células com intensa atividade metabólica, com muitas mitocôndrias, abundante Complexo de Golgi, inúmeros lisossomos e um sistema de vesículas e vacúolos bem desenvolvido presente frequentemente na porção do citoplasma próximo à borda em escova (Gothlin, Ericsson, 1976).

O citoplasma dos osteoclastos contém inúmeros lisossomos ricos em fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), uma isoenzima tipo V da fosfatase ácida que é considerada um marcador específico dessas células e que as distingue dos macrófagos (Li et al, 1970; Minkin, 1982; Phan et al, 2004). Outras enzimas tais como, a metaloproteinase-9 e a catepsina K, uma ATPase vacuolar específica reguladora de prótons em sua membrana plasmática na região da borda em escova, bem como receptores para calcitonina também estão presentes nos osteoclastos (Väänänen et al., 2000; Suda, et al., 1997; Sorensen et al., 2007; Suda, Takahashi, 2008).

Atualmente, acredita-se que os osteoclastos se originam da fusão de precursores hematopoiéticos mononucleares da linhagem monócito/macrófago da medula óssea (Walker, 1975; Nijwelde et al., 1986; DeLacure, 1994; Väänänen, Laitala-Leinonen, 2008; Bloemen et al., 2010). As células progenitoras dos osteoclastos proliferam, diferenciam-se em pré-osteoclastos mononucleados, os quais se unem quando em contato com o tecido ósseo formando os osteoclastos multinucleados (Sodek, McKee, 2000; Suda, Takahashi, 2008). Um dos principais fatores estimuladores da osteoclastogênese são o RANKL (ligante do receptor ativador de fator nuclear- κ B) (Sodek, McKee, 2000) e o M-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos) (Yoshida et al., 1990; Yavropoulou, Yovos, 2008).

2.1.2 A matriz óssea

A matriz óssea é composta por uma parte orgânica e uma inorgânica. A parte orgânica que corresponde a 33% do peso do osso é constituída principalmente por fibras colágenas tipo I e pela fração orgânica não colágena, denominada substância fundamental, que por sua vez é constituída por proteoglicanos, glicosaminoglicanos, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fosfatase alcalina, colagenase, lipoproteínas, fosfoproteínas, glicoproteínas e fatores de crescimento

(Buckwalter et al., 1996; Sommerfeldt, Rubin, 2001; Young, 2003; Katchburian; Arana, 2004).

A parte inorgânica da matriz óssea representa cerca de 50% do peso da matriz óssea, sendo composta por íons, dos quais os mais abundantes são o cálcio e o fosfato. Existem ainda, em menores quantidades, bicarbonato, sódio, potássio, citrato, magnésio, carbonato, lactato, fluoreto, zinco, bário e estrôncio (Buckwalter et al., 1996; Katchburian, Arana, 2004; Downey, Siegel, 2006).

O cálcio e o fósforo formam um cristal semelhante às apatitas naturais e por ser hidratado, é denominado hidroxiapatita, cuja fórmula molecular é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A associação entre a hidroxiapatita e as fibras colágenas é a responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo (Datta, et al., 2008).

As fibras colágenas são formadas pela proteína colágeno, um tipo de família de proteínas multiméricas que compreendem vinte tipos diferentes de colágenos (Myllyharju, Kivirikko, 2001). No tecido ósseo, as fibras colágenas do tipo I compõem 95% da parte orgânica da matriz, estando presentes também os colágenos dos tipos III, V, X e XI, onde exercem principalmente funções estruturais, proporcionando rigidez e elasticidade ao tecido (Sodek, Mackee, 2000; Junqueira, Carneiro, 2008). Essas fibras são birrefringentes, de modo que quando examinadas ao microscópio de polarização, aparecem brilhantes, apresentando uma intensa birrefringência em cores amarela e vermelha contra um fundo escuro (Montes, 1996; Junqueira, Carneiro, 2008).

No tecido ósseo, o colágeno é sintetizado pelos osteoblastos e assim como em outros tecidos conjuntivos, é sintetizado sob a forma de procolágeno, que por sua vez é secretado para a matriz extracelular, onde se polimeriza formando as fibras colágenas (Junqueira, Carneiro, 2008).

Essas fibras são formadas por três polipeptídios em forma de tripla hélice. Cada tripla hélice pode conter três cadeias idênticas ou diferentes entre si, dependendo do tipo de colágeno. O colágeno do tipo I é composto por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$. Os principais aminoácidos que constituem o colágeno são a glicina, a hidroxiprolina e a hidroxilisina, sendo esses dois últimos, característicos do colágeno (Kierszenbaum, 2004).

Estudos indicam que o colágeno pode exercer efeito direto sobre a diferenciação, proliferação e apoptose de osteoblastos e osteócitos (Green et al.,

1995., Zhao et al., 2000), sendo que sua expressão anormal pode estar envolvida na fisiopatologia da osteoporose (McGuigan et al., 2001).

Outros importantes componentes da parte orgânica da matriz são os glicosaminoglicanos (Lozzo, 1997; Jackson et al., 2006). Essas moléculas são heteropolissacarídeos lineares constituídas por unidades dissacarídeas repetitivas de ácido hexurônico (ácido L-idurônico ou ácido D-glicurônico) e hexosamina (D-glicosamina ou D-galactosamina) (Conrad, 1989). Os principais glicosaminoglicanos são: dermatan sulfato, condroitin sulfato, queratan sulfato, heparan sulfato e o ácido hialurônico (Kjellen, Lindahl, 1991). Esses compostos exercem importantes funções durante o processo de remodelação óssea (Poole et al., 1982; Theoleyre et al., 2004; Shinmyouzu et al., 2007).

Com exceção do ácido hialurônico, esses compostos são sulfatados e não são encontrados sob a forma livre na matriz extracelular, se ligando covalentemente a um eixo protéico para formar a molécula de proteoglicano (Hardingham, Fosang, 1992). Esses compostos possuem cadeias com altas cargas negativas, o que retêm grande quantidade de água na matriz, colaborando para a manutenção da estrutura da matriz extracelular (Kjellen, Lindahl, 1991).

A heterogeneidade desses polímeros resulta do grau de variação de sulfatação e da ocorrência de dois tipos de ácido hexurônico. Os GAGs apresentam distribuição variada entre os organismos, ocorrendo em uma grande variedade na matriz extracelular e na superfície de membranas celulares de órgãos e tecidos (Kjellen, Lindahl, 1991). Proteoglicanos com condroitin sulfato são encontrados, por exemplo, na cartilagem, osso, córnea e nos discos intervertebrais, ao passo que proteoglicanos com dermatan sulfato são encontrados na pele e aorta (Hardingham, Fosang, 1992).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) exercem diversas funções. É sabido que o dermatan e o condroitin sulfato interagem com o colágeno para estabilizar a estrutura da matriz extracelular, regulam a atividade de fatores de crescimento, se ligando a esses com alto grau de especificidade e tem mostrado ter atividades anticoagulante, antiangiogênica e antitumoral (Hardingham, Bayliss, 1990; Hardingham, Fosang, 1992).

Além disso, acredita-se que a interação dos GAGs com o colágeno e outras glicoproteínas exerce importantes funções relacionadas a adesão celular e na formação de estruturas da matriz extracelular (Munakata et al., 1999).

O ácido hialurônico é um GAG não sulfatado que se encontra amplamente distribuído em vários tipos de tecidos de diversos órgãos tais como pele, olhos e em vários líquidos corpóreos (Laurence, 1996). Este GAG é um importante componente da matriz extracelular do tecido conjuntivo, onde participa da organização estrutural da matriz, com importantes funções relacionadas à hidratação e viscosidade dos tecidos, bem como promovendo a interação entre célula/célula ou destas com a matriz extracelular (Laurence, 1996). Um exemplo característico é a matriz cartilaginosa, onde vários proteoglicanos ligam-se a uma única molécula de ácido hialurônico para formar o agregado, um proteoglicano extenso característico da cartilagem (Kierszenbaum, 2004).

Alta concentração de ácido hialurônico nos tecidos tem sido associada à migração celular durante o desenvolvimento e remodelação (Kain et al., 1988; Toole, 1991). Além disso, observou-se que tendões em processo de reparação durante a primeira semana, apresentaram altas concentrações de ácido hialurônico, o que indica um possível papel dessa molécula durante o desenvolvimento e reparação dos tecidos.

Estudos indicam que em determinadas situações, as funções exercidas pelo ácido hialurônico varia de acordo com seu tamanho e peso molecular (Bollyky et al., 2007). Por exemplo, o ácido hialurônico de alto peso molecular possui função antiangiogênica e antiinflamatória, participando também em várias funções estruturais e reguladoras, como por exemplo, na lubrificação das articulações, suporte para o reparo tecidual e regulação osmótica durante a inflamação (Brown et al., 1991; Onarheim et al., 1991; Deed et al., 1997; Noble, 2002; Delmage et al., 2005; Jiang et al., 2005). Por outro lado, essa molécula quando em baixo peso molecular, que se apresenta como fragmentos gerados durante infecções e lesões teciduais, age como agente angiogênico e proinflamatório (Horton et al., 1999; Termeer et al., 2002).

No tecido ósseo, há evidências de que o ácido hialurônico possa estar envolvido no processo de reabsorção óssea (Prince, 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* tem relatado que o tratamento com paratormônio (PTH) estimula a síntese de ácido hialurônico com subsequente aumento na reabsorção óssea (Owen, Shetlar, 1968; Johnston et al., 1972; Severson et al., 1973; Luben et al., 1974), o que sugere uma relação entre a síntese de ácido hialurônico e a atividade dos osteoclastos.

2.2 O metabolismo ósseo

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica que sofre intensa e contínua remodelação pela ação combinada de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Katchburian, Cerri, 2002). Neste processo, ocorre um ciclo extremamente complexo onde os osteoclastos se aderem ao tecido ósseo e o removem por acidificação e digestão proteolítica, enquanto os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica protéica que é posteriormente calcificada (Datta et al., 2008).

O controle da atividade, proliferação e diferenciação das células ósseas está sujeita a ação de fatores sistêmicos e locais. A interação entre estes fatores é indispensável para a manutenção da homeostase do tecido ósseo (Raisz, Rodan, 1998). Os fatores locais incluem diversas citocinas (interleucinas e interferons), prostaglandinas e fatores de crescimento (Manolagas, 2000).

Entre os fatores sistêmicos envolvidos na homeostase do tecido ósseo estão o paratormônio (PTH) (Leaffer et al, 1995), a calcitonina (Chambers, Magnus, 1982), a 1,25-dihidroxi-vitamina D3 [1,25(OH)2D3] (Miao, Scutt, 2007), os glicocorticóides (Silvestrini et al, 1998) e o estrógeno (Liu, Howard, 1991). Com exceção da calcitonina, os demais fatores locais atuam sobre os osteoblastos que por sua vez, passam a produzir fatores locais que irão influenciar a formação e atividade dos osteoclastos (Pacifici, 1996). O PTH atua sobre seu receptor localizado nos osteoblastos, estimulando essas células a produzirem fatores locais que estimulam a diferenciação e a atividade dos osteoclastos, aumentando dessa forma a reabsorção óssea (O'Brien et al, 2008).

Um importante fator liberado pelos osteoblastos que tem recebido considerável atenção na literatura é o fator RANKL (ligante do receptor ativador de fator nuclear- κ B). O RANKL se liga em seu receptor (RANK) localizado nos precursores dos osteoclastos, estimulando sua diferenciação em osteoclastos e aumentando sua atividade reabsortiva (Boyce, Xing, 2008).

Tem sido sugerido que o estrógeno promove a apoptose dos osteoclastos diminuindo assim, a reabsorção óssea (Pacifici, 1996). De fato, o estrógeno, outro fator sistêmico, tem uma importante influência sobre a homeostase do tecido ósseo, uma vez que a queda na taxa desse hormônio está relacionada à ocorrência da osteoporose, principalmente em mulheres na pós-menopausa (Sowers et al., 1998; Riggs, 2000).

Todavia, o mecanismo de ação do estrógeno sobre o tecido ósseo é complexo e não está totalmente compreendido. Sabe-se que o estrógeno inibe a formação de RANKL (estimulador da osteoclastogênese) pelos osteoblastos e estimula essas e outras células a produzirem uma glicoproteína denominada de osteoprotegerina (OPG), um competidor de RANK (Väänänen, 2005). A OPG se liga ao RANKL e impede a interação deste com o RANK, inibindo assim, a formação de osteoclastos (Kawamoto, 2002). Dessa forma, atuando sobre a via RANK/RANKL/OPG, o estrógeno inibe a formação de osteoclastos (Väänänen, 2005).

O estrógeno também atua na redução dos níveis de citocinas estimuladoras de osteoclastos, tais como as interleucinas 1, 6 e 11 (IL-1, IL-6 e IL-11); os fatores de necrose tumoral α e β (TNF- α e TNF- β) e o fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (M-CSF) (Pacifci et al., 1989; Pacifci et al., 1990; Cenci et al., 2000).

2.3 A osteoporose

A osteoporose é uma patologia que se caracteriza pela perda de massa óssea e pelo comprometimento da microarquitetura do tecido ósseo, o que leva à fragilidade esquelética e conseqüentemente ao aumento do risco de fraturas (Centers for Disease Control, 1991; World Health Organization, 1994).

Um desequilíbrio no processo de formação e reabsorção óssea, caracterizado por uma menor atividade formadora dos osteoblastos e maior atividade reabsortiva dos osteoclastos resulta em perda de massa óssea e fragilidade esquelética, contribuindo para a fisiopatologia da osteoporose (Rodan, Martin, 2000; Katchburian, Arana, 2004).

A perda mais acentuada de massa óssea ocorre nas mulheres a partir da menopausa, e está associada à insuficiência de estrogênio (Sowers et al., 1998). De fato, o estrogênio é um hormônio esteróide que atua como um dos fatores sistêmicos importantes para a regulação do metabolismo ósseo (Liu, Howard, 1991).

2.4 A Terapia Hormonal

A terapia hormonal com estrógenos em mulheres na pós-menopausa é considerada eficiente na prevenção da perda óssea (Turner et al., 1994; Davison, Davis, 2003), bem

como, para a diminuição dos sintomas do climatério (Rozenbaum et al., 1996; Nelson et al., 2002).

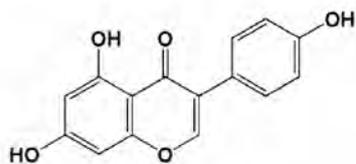
No entanto, embora bastante utilizada, estudos mostram que a terapia hormonal com estrógenos induz aumento no risco de câncer de mama, endométrio e tromboembolismo e, desta forma, seu uso tem sido limitado (Cauley et al., 2001; Rossouw et al., 2002; Stevenson, 2003).

Por essa razão, e devido ao fato da crescente demanda por terapias naturais, um número significativo de mulheres climatéricas tem utilizado os fitoestrogênios, particularmente as isoflavonas, como alternativa terapêutica para o alívio dos sintomas do climatério (Anthony et al., 1998; Huntley, Ernst, 2003; Xiao, 2008).

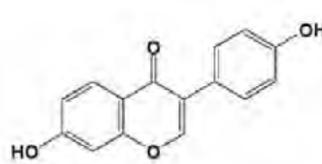
2.5 Isoflavonas da soja

Isoflavonas são compostos químicos fenólicos naturais não esteróides pertencentes à classe dos fitoestrógenos, que são encontrados habitualmente na soja, frutas e vários outros vegetais (Tham et al., 1998). Os principais tipos de isoflavonas da soja são a genistina, daidzina e a glicitina, moléculas que estão em sua forma glicosídicas, ou seja, possuem em suas estruturas químicas açúcares conjugados. Esses compostos são absorvidos pelo epitélio intestinal somente quando hidrolisados por bactérias da microflora intestinal e convertidos em suas formas bioativas, genisteína, daidzeína e gliciteína (Miniello et al., 2003).

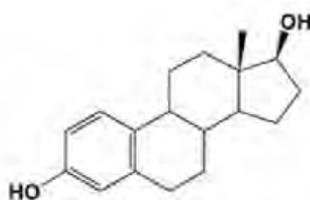
Esses compostos são estruturalmente similares ao estrogênio endógeno, por apresentarem um anel fenólico com um radical hidroxila no carbono 3, estrutura que lhe confere a capacidade de ligação seletiva, de alta afinidade aos receptores estrogênicos (Fig. 1), (Unfer et al., 2004., Oseni et al., 2008). A afinidade aos receptores estrogênicos alfa e beta, conferem às isoflavonas efeitos biológicos estrogênicos e antiestrogênicos semelhantes aos estrogênios endógenos (Sechell, Cassidy, 1999).



Genisteína



Daidzeína



Estradiol

Figura 1 - Estrutura química das principais isoflavonas (genisteína e daidzeína) e do estradiol (Adaptado de Oseni et al., 2008)

2.5.1 Isoflavonas da soja e tecido ósseo

Nos últimos anos, as isoflavonas da soja têm recebido considerável atenção na literatura médica e científica (Ma et al., 2008., Sharan et al., 2009). Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação positiva entre o consumo de isoflavonas da soja e a densidade mineral óssea (Horiuchi et al., 2000., Mei et al., 2001; Ma, 2007; 2008).

É sabido que a incidência de fraturas ocasionadas pela osteoporose é significativamente menor em mulheres asiáticas do que em mulheres ocidentais (Tham et al., 1998). Uma possível razão por essa diferença seria o alto consumo de soja; populações asiáticas consomem soja de dez a vinte vezes mais do que as populações ocidentais (Ho et al., 2003).

Estudos experimentais e em humanos sugerem que as isoflavonas daidzeína, genisteína e seus derivados glicosídeos exercem efeito protetor sobre o tecido ósseo, através da prevenção da perda de massa óssea (Knight, Éden, 1996; Anderson, Garner 1997; Draper et al., 1997; Arjmandi et al., 1998; Tham et al., 1998; Ishimi et al., 1999; Alekel et al., 2000).

Estudos com animais têm mostrado que extratos enriquecidos com isoflavonas aumentam a massa óssea, bem como recuperam a perda óssea induzida

em ratas ooforectomizadas (Anderson et al., 1998., Kawakita et al., 2009). Potter et al., (1998) demonstraram melhoria na densidade óssea em indivíduos tratados com preparações a base de soja enriquecidas com isoflavonas, por um período de seis meses. Estudos *in vitro*, confirmam essas evidências (Williams et al., 1998).

Yamaguchi, Gao (1998) estudaram, *in vitro*, os efeitos da genisteína e da genistina no tecido ósseo de fêmures de ratas em idade avançada. Os resultados desse estudo sugerem que a genisteína e a genistina possuem efeito anabólico no metabolismo ósseo. Gao, Yamaguchi (2000), estudando cultura de células osteoclásticas, verificaram que a genisteína exerceu efeito inibitório sobre a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), um marcador da atividade dos osteoclastos, sugerindo que a genisteína exerce efeito inibitório e diminuição na ação reabsortiva destas células.

Recentemente, foi observado que o consumo de uma dieta rica em isoflavonas proporcionou proteção contra perda óssea em ratas ooforectomizadas (Hertrampf, 2009). Tsuang et al. (2008) também observaram os efeitos das isoflavonas em tecido ósseo de ratas ooforectomizadas e verificaram que a massa óssea das ratas tratadas com dietas ricas em isoflavonas, apresentou-se maior do que o grupo controle após a ooforectomia, prevenindo dessa forma, a perda de massa óssea.

2.5.1.1 Mecanismo de ação das isoflavonas da soja no tecido ósseo

O mecanismo exato pelo qual as isoflavonas da soja agem sobre o tecido ósseo ainda não está completamente compreendido. Estudos *in vitro* sugerem que estes compostos possuem atividade estrogênica agonista e/ou antagonista agindo como os SERMs (Moduladores seletivos de receptores estrogênico) dependendo da quantidade e condições dos receptores estrogênicos (Atmaca et al., 2008).

Sugere-se que os osteoblastos e os osteoclastos são as células alvo para a ação da genisteína e daidzeína (Yamaguchi, Gao 1998). Foi observado *in vitro* que a genisteína combina-se com receptores de estrógeno presente nessas células e exerce seus efeitos pelo mesmo mecanismo dos estrogênios endógenos (Williams et al., 1998; Lieberherr et al., 2003).

Wang et al. (2006) observaram que o consumo de isoflavonas da soja aumentou a densidade mineral óssea de ratas ooforectomizadas, através do aumento da expressão de osteoprotegerina (OPG), um fator que inibe a reabsorção

óssea. Dessa forma, as isoflavonas da soja, assim como o estrógeno, podem promover proteção da perda óssea agindo sobre a via RANKL/RANK/OPG.

Todavia, outros mecanismos independentes dos receptores de estrógeno foram observados. Alguns investigadores sugerem que a genisteína ativa receptores peptídicos ligados à membrana, iniciando outros efeitos independentes dos receptores de estrógenos (Anderson et al; 1998; Okura et al., 1998). Por exemplo, os osteoclastos são dependentes da atividade de receptores tirosina quinase (PTK). A daidzeína e genisteína são inibidoras de PTK e poderiam agir por esse mecanismo na prevenção da osteoporose (Williams et al., 1998). Além disso, foi observado que as isoflavonas da soja agem nos osteoclastos também inibindo a via topoisomerase I e II (Okura et al., 1998).

A interleucina – 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que aumenta de concentração no organismo em decorrência de doenças crônicas, como por exemplo, em doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, diabetes e osteoporose (Atmaca et al., 2008). Tem sido observado que as isoflavonas da soja inibem indiretamente a produção de IL-6 na osteoporose (Chen et al., 2002).

Outro mecanismo proposto sobre a ação das isoflavonas da soja é denominado de efeito bifásico, ou seja, dependendo da dose utilizada, esses compostos podem exercer ou não efeitos benéficos sobre o tecido ósseo (Arjmandi et al., 1998). Esse efeito bifásico foi estudado por Anderson et al., (1998) em tecido ósseo de ratas ooforectomizadas, onde observaram que doses mais baixas de genisteína agem similarmente aos estrogênios com efeitos benéficos sobre o tecido ósseo, mas em doses elevadas, podem exercer efeitos potencialmente adversos.

Entretanto, apesar dessas pesquisas, os mecanismos pelos quais as isoflavonas da soja agem sobre tecido ósseo, bem como as dosagens corretas que devem ser administradas para obter resultados benéficos, estão pouco elucidados.

A apoptose e outras formas de morte celular têm sido alvos de muitos estudos nos últimos anos (Sperandio et al., 2000; Wyllie, Golstein, 2001; Reginato, Cruz-Landin, 2001 e 2002).

Estudos recentes sugerem que o estrógeno regula a atividade dos osteoclastos e induzem a apoptose dessas células através do FAS-ligante, um fator indutor de morte celular programada (Krum et al., 2008). Outras evidências sugerem que a atividade estrogênica das isoflavonas induz a proliferação de osteoblastos (Lieberherr et al., 2003) e também a morte dos osteoclastos (Rassi et al., 2002).

Embora alguns estudos na literatura tenham investigado o processo de morte celular em células do tecido ósseo (Cerri et al., 2000; Boabaid et al., 2001; Faloni et al., 2007), muitas peculiaridades ainda necessitam ser esclarecidas.

2.6 Vibração mecânica e tecido ósseo

Exercícios físicos são recomendados para a prevenção e tratamento da osteoporose, porém seu exato papel e eficácia na fase adulta não são claros (Rittweger, 2006).

Estudos realizados tanto em modelos animais como em seres humanos, têm sugerido que sinais mecânicos de baixa amplitude e com alta frequência possuem efeito anabólico no tecido ósseo (Judex et al., 2003; Christiansen, Silva, 2006).

A vibração mecânica, um tipo de estímulo mecânico não-fisiológico, tem sido indicada no tratamento e prevenção da perda de massa óssea causada pela osteoporose (Rubin et al., 2001; Verschueren et al., 2004; Gusi et al., 2006).

Estudos em diferentes modelos animais mostram que o uso do estímulo mecânico de baixa magnitude e alta frequência podem ter efeito osteogênico, capaz de aumentar a quantidade, melhorar a qualidade e resistência do osso trabecular (Rubin et al., 2002a) e prevenir a osteoporose (Rubin et al., 2001; Verschueren et al., 2004; Melchiorri et al., 2007).

Rubin et al. (2002) observaram em fêmur de ovelhas, que a vibração mecânica promoveu um aumento na densidade mineral óssea e no número de trabéculas ósseas, além de diminuir o espaçamento trabecular, indicando que a quantidade de osso foi aumentada tanto pela formação de novas trabéculas como pelo aumento da espessura daquelas existentes.

Judex et al. (2007) demonstraram que as modificações na frequência da vibração em ratas ooforectomizadas podem influenciar a eficácia da vibração de baixa magnitude no que diz respeito à formação óssea. Outros parâmetros da vibração como a aceleração (g) e o tempo de aplicação parecem ser responsáveis pela eficácia desse estímulo mecânico no tecido ósseo (Oxlund et al., 2003; Christiansen, Silva, 2006; Rubinacci, et al., 2008).

Há duas diferentes linhas que propagam o uso da vibração para a melhora da saúde do osso (Rittweger, 2006). Uma linha sugere que as vibrações de

baixa magnitude, mas de alta frequência obtêm uma resposta osteogênica por mecanismos diretos no osso. A validade deste conceito foi mostrada em um estudo com mulheres pós-menopausa, onde a vibração aumentou a densidade mineral óssea de vértebras lombares (Rubin et al., 2004).

A outra linha considera o papel importante que os músculos têm na manutenção do osso. Em consequência, a vibração de alta magnitude fortalece os ossos por meio da obtenção de fortes contrações musculares. Em ratos, tais vibrações foram capazes de prevenir em parte a perda óssea (Flieger et al., 1998).

Os mecanismos específicos pelo qual a carga mecânica influencia o ganho de massa óssea não são totalmente conhecidos (Christiansen, Silva, 2006). Todavia, tem sido atribuído aos osteócitos o papel central na detecção desses estímulos mecânicos, que por sua vez podem ser de naturezas diversas tais como, simples tensão, pressão, campo elétrico, força de arrasto e estresse de cisalhamento (Rochefort et al., 2010). Essas diversas formas de estímulos mecânicos irão induzir uma tensão no sistema lacuno-canalicular que será detectada pelos osteócitos através de integrinas ou proteínas associadas a integrinas e desses para o citoesqueleto, por meio de conexinas presentes nas junções comunicantes, canais iônicos ou por especializações da membrana, onde detectado o estímulo, esse irá se transformar em estímulo bioquímico (mecanotransdução) que ativará diversas vias de sinalização no citoplasma dos osteócitos (Rochefort et al., 2010).

Canais iônicos e junções comunicantes são cogitados como meios de comunicação intercelular para transmissão bioquímica do estímulo mecânico para osteócitos vizinhos (Scott et al., 2008), bem como para os osteoblastos nas superfícies ósseas onde serão estimulados a aumentar a produção de matriz óssea e células osteoprogenitoras a proliferarem e posteriormente se diferenciarem em osteoblastos (Oxlund et al., 2003).

2.7 Associações entre agentes mecânicos e não mecânicos no tecido ósseo

É sabido que atividades físicas proporcionam aumento na massa e na resistência óssea com maior eficácia em crianças do que em adultos e, além disso, quando se considera a estrutura óssea de indivíduos mais velhos, a atividade física tem se mostrado pouco eficaz (Forwood, Burr, 1993., Bassey et al., 1998). Esse decréscimo da eficácia em esqueletos de indivíduos mais velhos tem sido atribuído a redução da

sensibilidade do tecido ósseo a estímulos mecânicos com o aumento da idade (Rubin et al., 1992., Turner et al., 1995).

Nessa perspectiva, acredita-se que a resposta óssea aos estímulos mecânicos no esqueleto de indivíduos mais velhos, pode ser potencializada quando combinada com agentes não mecânicos (Forwood et al., 2001). Dentre os agentes não mecânicos que tem sido utilizados para esse propósito estão o PTH (Gasser, 1998., Mikuni-Takagaki, 2002), a prostaglandina E2 (Tang et al., 1997), o hormônio do crescimento (Yeh et al., 1994) e o estrógeno (Notelovitz et al., 1991., Rutherford, 1999).

Os efeitos benéficos da combinação entre estímulo mecânico e agentes anabólicos foi proposto primeiramente por Johnson (1965) em um estudo com homens, onde foi observado que o tratamento com fluoreto de sódio resultou em uma resposta anabólica óssea mais rápida em locais do tecido submetido a carga mecânica. Esse estudo contribuiu para que nos anos 80 e 90, vários trabalhos com fluoreto de sódio e estímulo mecânico fossem realizados e dessa forma contribuísse para um melhor entendimento da ação combinada entre agentes mecânicos e não mecânicos (Schultz et al., 1984 e 1986., Libanti et al., 1996).

2.7.1 Associação entre isoflavonas da soja e estímulo mecânico no tecido ósseo

Estudos experimentais têm sugerido que a intervenção combinada entre doses de isoflavonas da soja e estímulo mecânico (não do tipo vibração) por meio de exercícios de intensidade moderada e de várias modalidades exibem efeitos sinérgicos na prevenção da perda de massa óssea em camundongos fêmeas ooforectomizadas (Wu et al., 2001; 2003).

Nakajima et al. (2001) verificaram que doses de genisteína combinadas com exercícios exerceram efeitos positivos contra a perda de massa óssea em ratas ooforectomizadas. Recentemente, Shiguemoto et al. (2007) sugeriram que a intervenção combinada entre isoflavonas da soja e estímulo mecânico por meio de exercícios físicos contribuem para aumentar a densidade mineral óssea em ratas ooforectomizadas.

Esses estudos sugerem que a associação entre estímulo mecânico e isoflavonas contribui para a potencialização do tratamento e/ou prevenção de doenças relacionadas com a deficiência de estrogênios (Wu et al., 2003).

Considerando-se o crescente interesse por terapias naturais com isoflavonas, bem como da vibração mecânica no tratamento da osteoporose e frente à escassez de relatos da ação desses tratamentos sobre as células e a matriz óssea, o objetivo desse estudo foi verificar a ação destes tratamentos isolados e também combinados no tecido ósseo de ratas osteopênicas.

Objetivo Geral:

Caracterizar as eventuais alterações morfológicas no tecido ósseo de ratas osteopênicas, sob a ação combinada e isolada das isoflavonas da soja e vibração mecânica de alta frequência e baixa intensidade.

Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar a influência dos tratamentos sobre a massa corporal;
- ✓ Avaliar medidas anatômicas de diâmetro e comprimento dos fêmures e tíbias;
- ✓ Quantificar por histomorfometria a área óssea trabecular e cortical e a espessura do osso cortical nos fêmures;
- ✓ Quantificar os glicosaminoglicanos sulfatados e carboxilados nos fêmures através de histoquímica;
- ✓ Quantificar o condroitin sulfato nos fêmures por eletroforese em gel de agarose;
- ✓ Analisar a organização das fibras colágenas nos fêmures;
- ✓ Avaliar as propriedades físicas e biomecânicas das tíbias;
- ✓ Avaliar a positividade dos osteócitos ao método do TUNEL nos diferentes grupos experimentais.

4 MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Projeto n° 0038/09.

Todos os resíduos biológicos e químicos utilizados nesse estudo foram descartados de acordo com as normas estabelecidas pela UNIFESP.

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizadas 50 ratas *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, adultas, com idade inicial de 6 meses, virgens, pesando aproximadamente 280 gramas, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais em Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Os animais foram transferidos para o biotério setorial da disciplina de Histologia e Biologia Estrutural (UNIFESP - EPM), onde permaneceram confinados em gaiolas (5 animais por gaiola) de comprimento, largura e altura, respectivamente de 45x 30x 15cm, em ambiente com luminosidade e temperatura controladas (ciclo claro-escuro constante de 12/12, temperatura ambiente de 22° C) e continuaram a receber alimento (Nuvilab CR1, Paraná, Brasil; composição por quilograma da ração: cálcio de 1,0% a 1,2%, fósforo de 0,78% a 0,90%, zinco aproximadamente 60 mg, vitamina D3 1.800,00 UI) e água *ad libitum*. As ratas foram pesadas uma vez por semana.

4.2 Obtenção do modelo experimental

4.2.1 Procedimento Cirúrgico da Ooforectomia bilateral

Quarenta ratas foram submetidas à ooforectomia bilateral, com o objetivo de interromper a atividade dos estrogênios ovarianos, para induzir os animais a um quadro de anestro-permanente, provocando menopausa e perda óssea. O uso de ratas ooforectomizadas como modelo animal para estudo de perda óssea na pós-menopausa foi preconizado por Kalu (1991).

A ooforectomia foi realizada sob anestesia intramuscular com Cloridrato de Cetamina a 10% (0,3 mL) e Xilazina a 2% (0,1 mL), anestésico e relaxante muscular, respectivamente. Posteriormente, foi realizada a tricotomia na

região abdominal em área de 4x2cm², acima da vagina; em seguida, foi aplicado álcool iodado com auxílio de gazes para se obter melhor condição de anti-sepsia, A seguir, a pele e músculo foram incisados com bisturi, com aproximadamente 1,5 cm de extensão, e o tecido muscular foi afastado do tecido cutâneo com auxílio de uma tesoura do tipo romba até se atingir a cavidade peritoneal.

Após isso, cada ovário foi localizado e pinçado, onde foi realizada uma ligadura com fio de algodão (Catgut, USP 4-0, EP 1,5, Brasuture, BRA), 2cm abaixo do ovário. Em seguida, os ovários foram retirados, bem como parte do corno uterino e tecido adiposo adjacente. Os demais tecidos foram internalizados e em seguida foi realizada a costura da musculatura e da pele com fio de sutura (4-0) reabsorvível (Catgut gastrointestinal com agulha 3/8, USP 4-0, EP 2, Brasuture, BRA), (Fig. 2).

As 10 ratas restantes não foram ooforectomizadas, sendo, no entanto, submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico dos animais ooforectomizados, porém, nestas 10 ratas os ovários foram expostos e recolocados intactos novamente na cavidade abdominal, com o intuito de submetê-las ao mesmo estresse do procedimento cirúrgico que as ratas ooforectomizadas foram submetidas, constituindo dessa forma, o grupo SHAM.

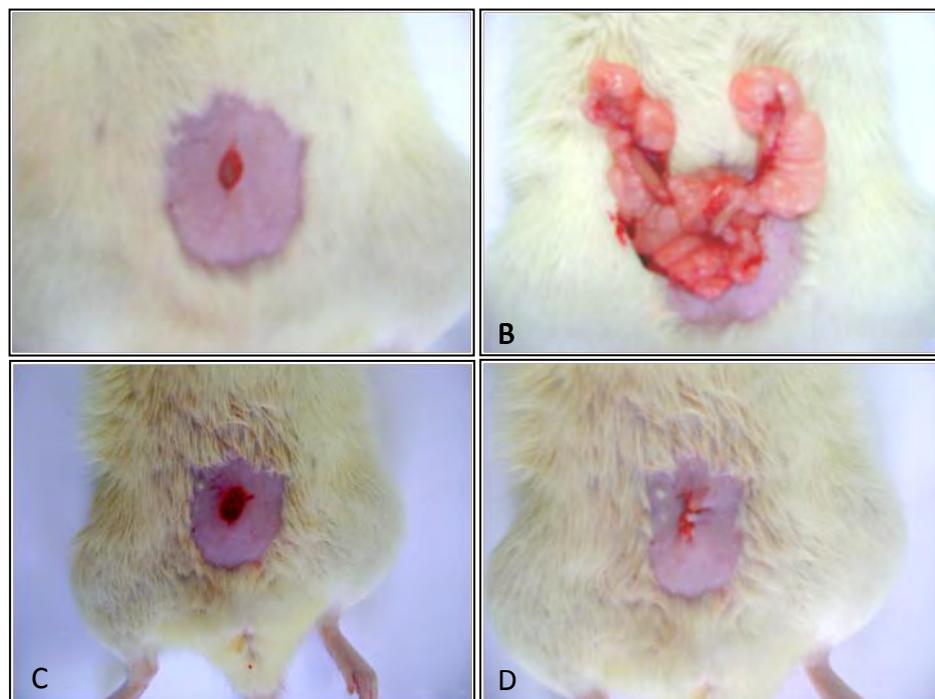


Figura 2 – A, B, C e D: Procedimento cirúrgico da ooforectomia bilateral.

4.3 Pós-operatório

Ao término da operação cirúrgica os animais receberam 5 mg/kg de Ibuprofeno dissolvido em 500 mL de água corrente durante 2 dias, para promover analgesia. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram recolocados nas gaiolas e monitorados por 90 dias, onde durante este período foram realizadas pesagens semanais para o acompanhamento dos pesos dos mesmos.

4.4 Exame colpocitológico

Com o objetivo de confirmar a interrupção da liberação do hormônio estrogênico, foram realizados exames colpocitológicos em todas as ratas por quatro dias consecutivos, no mesmo horário, a partir do 24^o dia após a ooforectomia.

Uma haste de algodão foi inserida parcialmente na vagina de cada rata e realizado movimentos circulares sobre o epitélio vaginal. Posteriormente, o material coletado foi distendido sobre uma lâmina histológica e imediatamente fixado em uma solução de álcool – éter (1:1) por 20 minutos, corado pelo método de Shorr-Hematoxilina (Shorr, 1941) e analisado ao microscópio de luz. Somente os animais que se apresentaram em anestro (ausência de produção de estrógenos e progesterona) durante os quatro dias analisados foram utilizados para o experimento. Para a constatação da perda óssea, os animais também foram submetidos à densitometria óssea através de absorvometria dupla de energia e raios X (DEXA), (modelo Hologic Discovery A- S/N 45274) antes e noventa dias após a ooforectomia (realizado na Disciplina de Endocrinologia, Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo).

4.5 Protocolo experimental

Noventa dias após a ooforectomia os animais foram separados em cinco grupos:

Grupo I (SHAM) - composto por 10 ratas não ooforectomizadas e sem nenhum tipo de tratamento.

As 40 ratas ooforectomizadas foram separadas em 4 grupos:

Grupo II (OVX)- 10 ratas tratadas com solução veículo de propilenoglicol durante 90 dias (controle);

Grupo III (OVX-ISO)- 10 ratas tratadas com 200 mg/kg/por dia de isoflavonas da soja por gavagem, 7 dias por semana, durante 90 dias;

Grupo IV (OVX-VIB)- 10 ratas submetidas à vibração mecânica de baixa intensidade (30Hz; 0,6g), 20min/dia, 5 vezes por semana, durante 90 dias;

Grupo V (OVX-ISO+VIB)- 10 ratas tratadas com 200 mg/Kg/por dia de isoflavonas da soja via oral, 7 dias por semana, durante 90 dias e submetidas à vibração mecânica de baixa intensidade (30Hz; 0,6g), 20 min/dia, 5 vezes por semana, durante 90 dias.

O diagrama a seguir (Figura 3) ilustra de forma resumida o desenho do experimento:

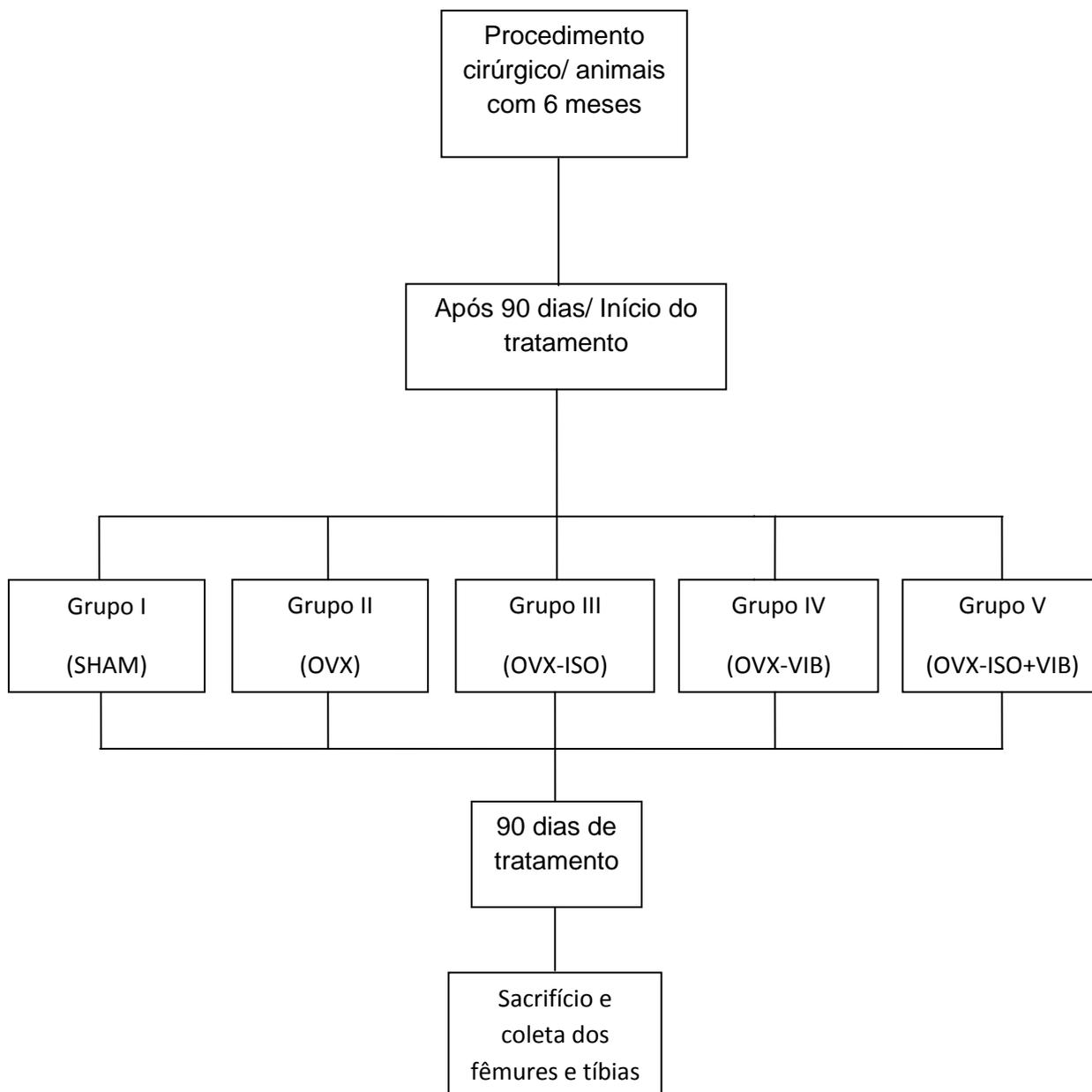


Figura 3. Diagrama representativo do desenho experimental.

4.6 Administração das isoflavonas da soja

Após 90 dias do procedimento cirúrgico de ooforectomia bilateral foi iniciada a administração das isoflavonas da soja através da técnica de gavagem (Figura 4). Neste procedimento foi utilizada uma seringa de 5,0 mL acoplada a uma cânula

metálica de 9 cm de comprimento e 0,7mm de espessura com uma ponta romba, a qual foi introduzida adequada e cuidadosamente na cavidade oral do animal até a região inicial do esôfago onde foi injetado a solução de isoflavonas da soja previamente preparada.

Para o preparo da solução utilizou-se 200mg de isoflavonas da soja em pó (Novasoy-ADM Natural Health & Nutrition- Illinois, USA) por quilo de peso de cada animal, diluído em 0,5ml em solução aquosa veículo de propilenoglicol (Sinthy) em doses diárias durante 90 dias. As concentrações aproximadas de genistina, daidzina e glicitina do extrato das isoflavonas da soja utilizado neste estudo foram 18 a 20%, 16,5 a 19,5% e 2,5 a 5%, respectivamente.



Figura 4 - Foto representativa da aplicação oral das isoflavonas da soja em ratas *Wistar*, pela técnica de gavagem utilizando-se uma cânula metálica acoplada a uma seringa de 5,0mL.

4.7 Procedimento da vibração mecânica de baixa intensidade

Para o procedimento de vibração mecânica foi utilizado uma plataforma vibratória de 50cm x 30cm e 20cm de altura (Fig. 5), gentilmente cedida

pela Dra. Marise Lazaretti Castro da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP, desenvolvida para ratos pelo departamento de Bioengenharia da USP- São Carlos.

Os animais dos grupos IV (VIB) e V (ISO+VIB) foram colocados sobre a plataforma (5 ratos de cada vez)) e submetidos a um ciclo diário de vibração mecânica de baixa intensidade (30Hz; 0,6g), 20min/dia, 5 vezes por semana, durante 90 dias. Utilizou-se uma tampa adequadamente confeccionada e colocada sobre a plataforma a uma distância de 4cm dos animais, de modo que os mesmos pudessem permanecer em sua postura habitual e o mais confortável possível e serem submetidos a vibração mecânica no corpo inteiro.

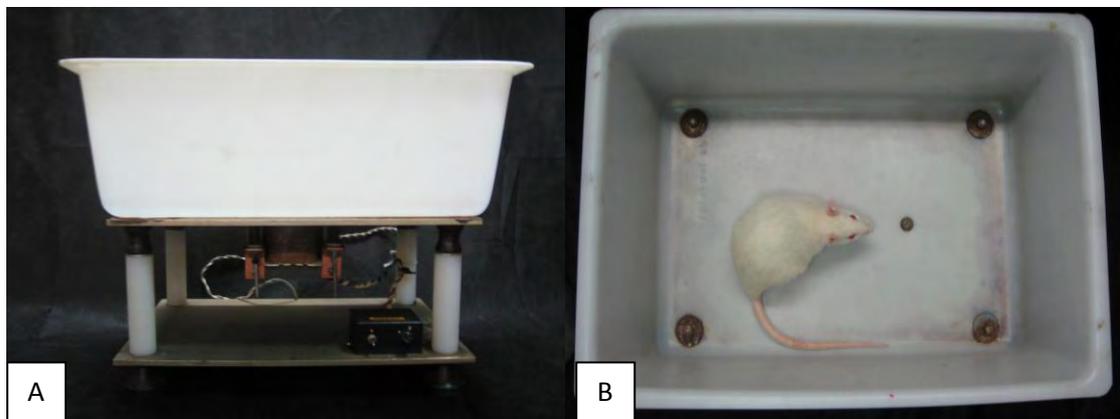


Figura 5, A e B - Plataforma vibratória para ratos (desenvolvida pelo Depto. de Bioengenharia da USP - São Carlos).

4.8 Eutanásia e coleta do material

Após 12 semanas de tratamento, os animais foram sacrificados por dose excessiva de Cloridrato de Cetamina a 10% (0,7mL) e Xilazina a 2% (0,3mL) por via intraperitoneal. Os animais foram colocados em decúbito ventral, e com o auxílio de um bisturi foi realizada uma incisão linear entre a região anterior da tíbia até o final de cada fêmur. Após isso, os fêmures e as tíbias foram cuidadosamente limpas e o comprimento e diâmetro total dos ossos foram obtidos com o auxílio de um paquímetro digital (Lee Tolls, erro de precisão de 0,01mm). O comprimento total dos fêmures foi obtido entre a região distal dos côndilos femorais (face articular com a tíbia) e a saliência óssea mais proximal do trocânter maior, ao passo que o comprimento total

das tíbias foi obtido entre as extremidades de cada epífise. Em ambos, o diâmetro foi obtido no centro da diáfise.

Em seguida, os fêmures foram seccionados e imediatamente colocados em solução fixadora de formaldeído 4% (preparado a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.2 por quatro dias e descalcificados em ácido fórmico 25% (pH 2,0) por aproximadamente 40 dias. As tíbias foram removidas e imediatamente congeladas em freezer a -20°C em solução de Cloreto de sódio a 0,9% para posterior análises físicas e biomecânicas. Para o material coletado, procedeu-se as seguintes análises:

4.9 Parâmetros físicos e biomecânicos em tíbias

4.9.1 Parâmetros físicos

As análises dos parâmetros físicos foram realizadas em conjunto com o Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da saúde da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

As tíbias foram descongeladas e imersas separadamente em água destilada e mantidas em um dessecador (DI-PUMP) por 24 horas. O Volume Ósseo (VO) e a Densidade Óssea (DO) foram calculados segundo o Princípio de Arquimedes (Mosekilde et al., 1992). Para tanto, obteve-se o peso imerso (P_i) inserindo as tíbias em um béquer com água destilada à temperatura ambiente, suspensas individualmente por um fio de cobre e sob uma balança de precisão. Em seguida as tíbias foram pesadas para obtenção do peso úmido (P_u) e o peso seco (P_s) foi obtido após desidratação em estufa a 100°C por 24 horas.

Os ossos foram então colocados em um forno mufla a 800°C (Quimis, modelo Q318A) por 24 horas para obtenção do peso de cinzas (P_c) (Bedani et al., 2006). Todas as medidas foram realizadas em balança analítica de precisão (Chyo JK-180, Japan, erro de precisão de 0,0001g). Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso úmido (g), peso imerso (g), densidade óssea (g/cm^3), volume ósseo (cm^3), densidade mineral óssea (g/cm^3), porcentagem de água no osso, porcentagem de material orgânico e material mineral no osso, peso seco (g) e peso das cinzas (g).

Os valores obtidos das pesagens foram calculados com base nas fórmulas descritas abaixo:

$$\text{Volume ósseo} = \frac{P_u - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P_u}{V_O} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_c}{V_O} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual ósseo de água} = 100 \times \frac{(P_u - P_s)}{P_u} \text{ (\%)}$$

$$\text{Percentual de material mineral} = 100 \times \frac{(P_c)}{P_u} \text{ (\%)}$$

$$\text{Percentual de material orgânico} = 100 \times \frac{(P_s - P_c)}{P_u} \text{ (\%)}$$

Sendo: P_u = peso úmido ósseo; P_s = peso ósseo da amostra desidratada; P_i = peso imerso ósseo; P_c = peso do material mineral (cinzas); V_O = volume ósseo e ρ = densidade da água.

4.9.2 Parâmetros biomecânicos

As propriedades mecânicas foram realizadas por meio do teste de flexão a três pontos realizado em uma máquina de ensaio universal Instron (Instron Cop. modelo 4444), Figura - 6.

Para tanto, as tíbias foram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,7 mm. Foi utilizada a célula de carga com capacidade de 1 kilo Newton (kN) e aplicada uma pré-carga de 5 Newton (N) para estabilizar a tibia. A força foi aplicada perpendicular ao eixo longitudinal do osso entre os dois apoios por

uma haste cilíndrica contendo um rolete de 3 mm em sua extremidade, em uma velocidade de 5 mm/min até o momento da fratura.

O ensaio foi registrado pelo software Instron Series IX Automated Materials Tester – Version 8.09.00, onde se obteve os seguintes parâmetros: carga da fratura (N), resiliência (J), tenacidade (J), rigidez (N/mm), deslocamento no ponto da fratura (mm), deslocamento máximo e carga máxima (N). Os ensaios foram realizados por um investigador cego para os grupos do estudo.

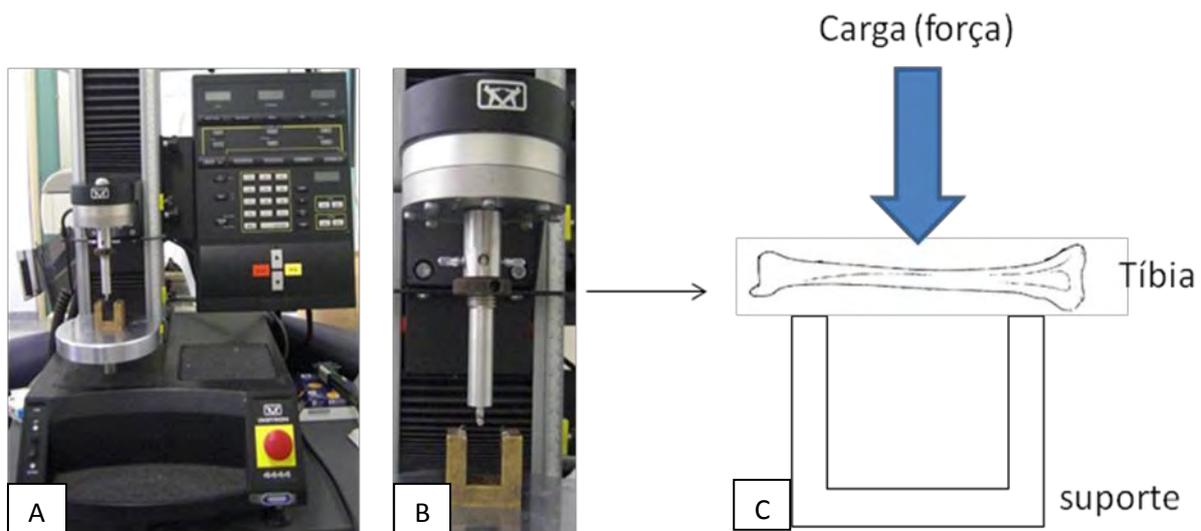


Figura 6 – Em A e B: Máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em tíbias de ratas. Em C: Esquema do ensaio.

Carga de fratura (N)

Corresponde a carga aplicada no momento da fratura durante o ensaio.

Resiliência (J)

Corresponde o impacto que o osso suporta sem deformar-se permanentemente.

Rigidez (N/mm)

Representa a capacidade da tibia de resistir a deformações.

Tenacidade (J)

Representa a energia necessária para provocar a ruptura do osso, ou seja, a capacidade de uma estrutura resistir a uma força de impacto depende da tenacidade do material.

4.10 Análise morfológica

4.10.1 Processamento histológico

Os fêmures distais foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico por 1 hora (70%, 80%, 90% e três trocas de 100% com três horas cada), diafanizados em xilol e impregnados pela parafina líquida, em estufa regulada à temperatura de 60°C por 48 horas e em seguida incluídos. Posteriormente, foram realizados cortes semi-sequenciados em micrótomo do tipo *Minot* (Leica, Modelo RM 2145), ajustado para 5 µm.

Os cortes foram distendidos em banho-maria e coletados em lâminas histológicas previamente untadas com albumina de Mayer ou silano (3 aminopropylthoxysylane – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) para as lâminas destinadas ao método do TUNEL. Após secagem por 6-8 horas em estufa a 60°C as lâminas foram destinadas aos métodos descritos a seguir:

4.10.2 Coloração pela Hematoxilina e Eosina (H.E)

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em concentrações crescentes de álcool, corados com Hematoxilina e Eosina, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e montados em Entellan®.

As fotomicrografias dos cortes dos fêmures distais dos grupos controle e experimental foram documentadas por um microscópio de luz (Axiolab Standard 20, Carl Zeiss) acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxionCam, Carl Zeiss) e posteriormente submetidas a análise histomorfométrica.

4.10.3 Histomorfometria óssea

Para a análise histomorfométrica do volume ósseo trabecular (BV/TV/%) dos fêmures distais, as medidas foram obtidas em um retângulo de 1800 x 1600 μm em regiões 390 μm a partir do ponto inferior do disco epifisário em direção a diáfise, para excluir a esponjosa primária (região entre a cartilagem e a metáfise) e 390 μm a partir do perióstio, (Nozaka et al., 2008). Para a análise da área (Ct.Ar/ μm^2) e espessura (Ct.Wi/ μm) do osso cortical, foi estabelecida uma área de 1600 x 600 μm na região cortical paralela ao retângulo estabelecido para a análise do BV/TV (Figura. 7). Para todos os parâmetros, foram analisados 5 cortes seqüenciados de cada animal.

A histomorfometria foi realizada com o auxílio do programa Axionvision 4.2 REL (Carl Zeiss). As fotomicrografias foram documentadas por um microscópio de luz (Axiolab Standard 20, Carl Zeiss) acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxionCam, Carl Zeiss). As abreviações dos parâmetros histomorfométricos estão baseadas na nomenclatura padronizada pelo Comitê da *American Society for Bone and Mineral Research* (Parfitt et al., 1987).

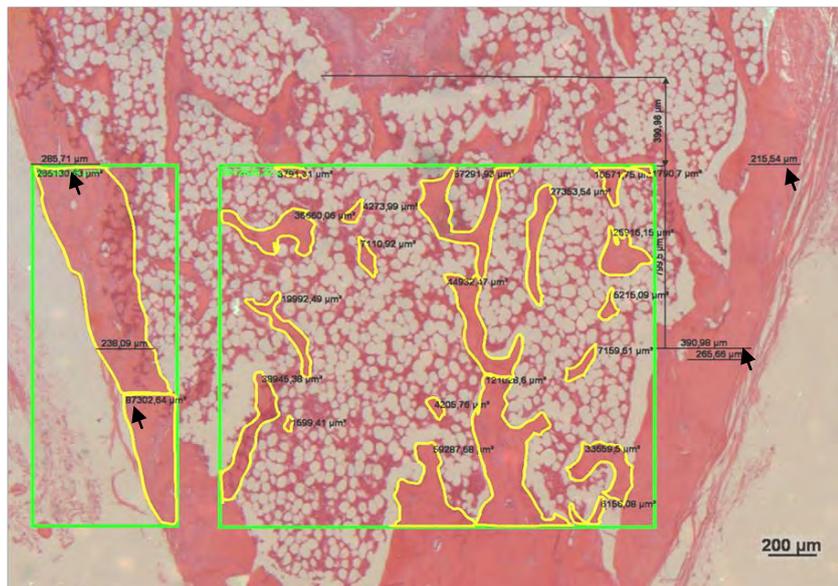


Figura 7 - Fotomicrografia de corte histológico da região do osso fêmur distal de rata *Wistar* ilustrando as áreas de interesse para a análise histomorfométrica. Foi estabelecida uma área de 1800 x 1600 μm localizada a 390 μm do ponto inferior do disco epifisário e 390 μm do perióstio (região central) para análise histomorfométrica do BV/TV e uma área de 1600 x 600 μm na região cortical paralela a área do BV/TV para a análise da área (Ct.Ar) (região delimitada à esquerda) e espessura (Ct.Wi) do osso cortical (setas). Coloração H.E, aumento de 25 x.

4.10.4 Histoquímica pelo Alcian Blue em pH 2,5 e pH 0,5

O alcian blue no pH 2,5 evidencia os glicosaminoglicanos sulfatados e carboxilados, enquanto que no pH 0,5 evidencia apenas os glicosaminoglicanos sulfatados, que aparecem em azul (Kiernan 2008).

Alguns cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool, posteriormente imersos em ácido acético a 3% e submetidos à solução de Alcian Blue pH 2,5 por 10 minutos. Outros cortes foram imersos em HCl a 0,5 Normal por 2 min e submetidos a solução de Alcian Blue, pH 0,5 por 10 minutos. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada, desidratados, diafanizados em xilol e montados em Entellan®.

As fotomicrografias foram obtidas com auxílio de um microscópio de luz (Axiolab Standard 20, Carl Zeiss) acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxionCam, Carl Zeiss). Dez fotomicrografias por grupo foram analisadas em objetiva de 10x com auxílio de um software de processamento e análise de imagem ImageLab 2000® (figura 8).

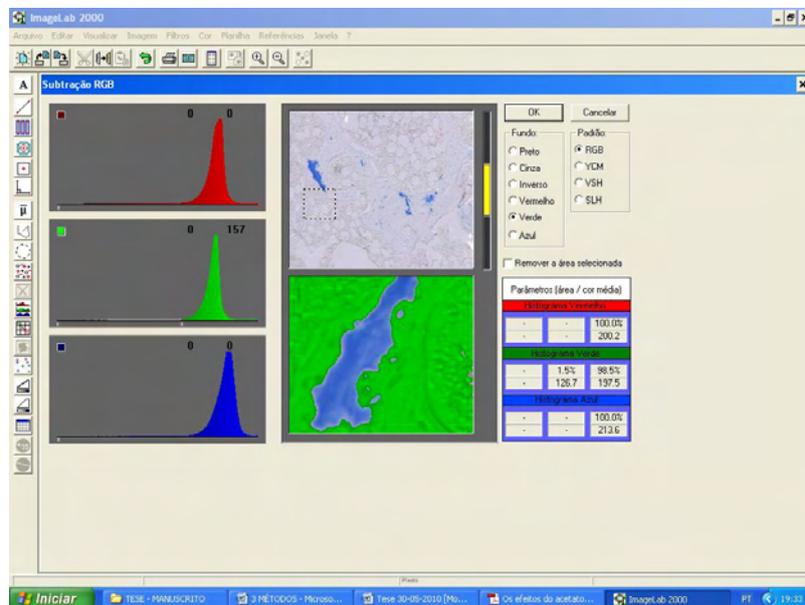


Figura 8. Representação da interface do programa ImageLab®, onde foi quantificada a intensidade do azul que reflete a quantidade dos GAGs, através da técnica histoquímica de Alcian blue.

4.10.5 Análise semiquantitativa das fibras colágenas pelo método histoquímico de Picro-sírius Red (PS) em microscópio de luz polarizada.

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em gradientes decrescentes de etanol. Posteriormente foi realizado o bloqueio da elastina com o ácido fosfomolibídico a 0,2% por 10 minutos. Após as lavagens em água destilada os cortes foram imersos por 90 minutos em solução de Sirius Red a 0,1% dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Em seguida, os cortes foram lavados em HCl 0,01 Normal durante 2 minutos. Depois as lâminas foram desidratadas em gradiente crescente de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan®.

Dez fotomicrografias por grupo dos cortes dos fêmures distais foram documentadas por um microscópio de luz polarizada (Axiolab Standard 20, Carl Zeiss), acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxionCam, Carl Zeiss) e analisadas semiquantitativamente.

4.11 Quantificação do condroitin sulfato (CS) nos fêmures por eletroforese em gel de agarose.

As análises foram realizadas em conjunto com a Disciplina de Biologia molecular - UNIFESP. Foram selecionados de cada grupo de animais, cinco fragmentos (2mm) da região distal dos fêmures contendo osso compacto e trabecular, sendo as epífises removidas para excluir o disco epifisário desta análise. Em seguida os fragmentos foram imersos em PBS (solução salina tamponada) com inibidor de protease por 3 horas e posteriormente descalcificados com ácido fórmico a 25%, pH 2,0 por 3 dias, e novamente imersos em PBS com inibidor de protease a 4°C para posterior análise.

Os fragmentos foram pesados individualmente e macerado em nitrogênio líquido. Posteriormente, cada amostra foi digerida com papaína (Calbiochem, USA) em tampão cisteína-fosfato (pH 6,5) por 18 horas a 60°C, para liberação dos glicosaminoglicanos do cerne proteico. Em seguida, o material foi centrifugado por 10 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi coletado, onde foi adicionado TCA a 90% (ácido tricloroacético) no volume final de 10% em banho de gelo por 15 minutos.

Após centrifugação por 30 min em temperatura ambiente, foram adicionados ao sobrenadante dois volumes de metanol gelado sob constante agitação e mantidos a -20°C por 24 h para precipitar os glicosaminoglicanos sulfatados. Após

isso, o material foi centrifugado por 30 min a 4000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o material foi seco a temperatura ambiente. O *Pellet* foi ressuspenso em 30 µL de água destilada e 5 µL foi aplicado em gel de agarose a 0,55% em tampão PDA (1,3-diaminopropano acetato, 0,05 M, pH 9,0).

Posteriormente, os GAGs foram precipitados na agarose utilizando o detergente catiônico CETAVLON (brometo de cetiltrimetilamônia) a 0,1% por 2 horas e em seguida o gel foi seco sob calor e ventilação, sendo corado posteriormente com azul de toluidina (0,1%) em ácido acético (0,1%) e etanol (50%) por 15 minutos. O excesso de corante foi removido com solução descorante de ácido acético (0,1%) em etanol (50%). Em seguida, o gel foi seco em temperatura ambiente.

A identificação dos GAGs sulfatados foi realizada comparando-se a migração das amostras com uma solução de GAGs conhecida e purificada, contendo condroitin sulfato, dermatan sulfato e heparan sulfato, na concentração de 1 mg/mL cada. De acordo com a mobilidade eletroforética, a banda de maior migração é uma mistura de condroitim 4 (extraído de cartilagem de baleia) e 6 sulfato (extraído de cartilagem de tubarão), a intermediária de dermatan sulfato (extraído de pele de porco) e a terceira de heparan sulfato (extraído de pâncreas bovino). A quantificação foi realizada através de densitometria a 525 nm, sendo os valores expressos em µg/mg de tecido.

4.12 Método do TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling)

O método do TUNEL foi realizado para detectar a fragmentação característica do DNA que ocorre em células em processo de apoptose (Gavrieli et al., 1992). Os cortes aderidos em lâminas silanizadas foram submetidos ao método do TUNEL (ApopTag Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection Kit, Chemicon, USA).

Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram tratados com proteinase K (20 µg/ml), durante 20 minutos à temperatura ambiente, para expor as quebras de DNA. Após lavagens em água destilada, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3%, por 10 minutos para bloquear a peroxidase endógena. Os cortes foram então colocados em tampão de equilíbrio por 20 minutos. Posteriormente, foi realizada a incubação com a enzima TdT, por 1 hora e 15 minutos, em câmara úmida a 37 °C. Após a incubação, os cortes foram imersos durante 10 minutos no tampão de bloqueio.

Após as lavagens em PBS, os cortes foram incubados com a anti-digoxigenina-peroxidase por 30 minutos; subsequentemente às lavagens em PBS, estes cortes foram revelados com o auxílio do cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB). Após lavagem em água destilada, foram contra-corados com hematoxilina de Carazzi. Controles negativos foram realizados substituindo-se a enzima TdT por água destilada (Faloni et al., 2007). Para o controle positivo foram observados os condrócitos hipertróficos do disco epifisário de cada corte.

As fotomicrografias dos cortes dos fêmures proximais do grupo controle e dos grupos experimentais foram documentadas por um microscópio de luz (Axiolab Standard 20, Carl Zeiss) acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxionCam, Carl Zeiss).

4.13 Análise estatística

Para a análise estatística, os dados obtidos foram expressos em Média \pm Desvio Padrão (DP). Os grupos foram comparados por meio do teste para análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para observar se ocorreram diferenças entre os grupos. O nível de significância para a rejeição da hipótese nula foi de $p \leq 0,05$. Para todos os testes utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5.0*, San Diego, California USA.

5 Resultados

5.1 Peso corporal

Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) e de forma semelhante, entre os pesos corporais de todos os grupos durante todo o período experimental desde a cirurgia até o final do tratamento. O maior ganho de peso corporal ocorreu no grupo OVX-VIB, sendo significativo ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos OVX-ISO e OVX-ISO+VIB. O menor ganho ocorreu no grupo OVX-ISO+VIB sendo significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo OVX-VIB (Figura 9, tabela 1).

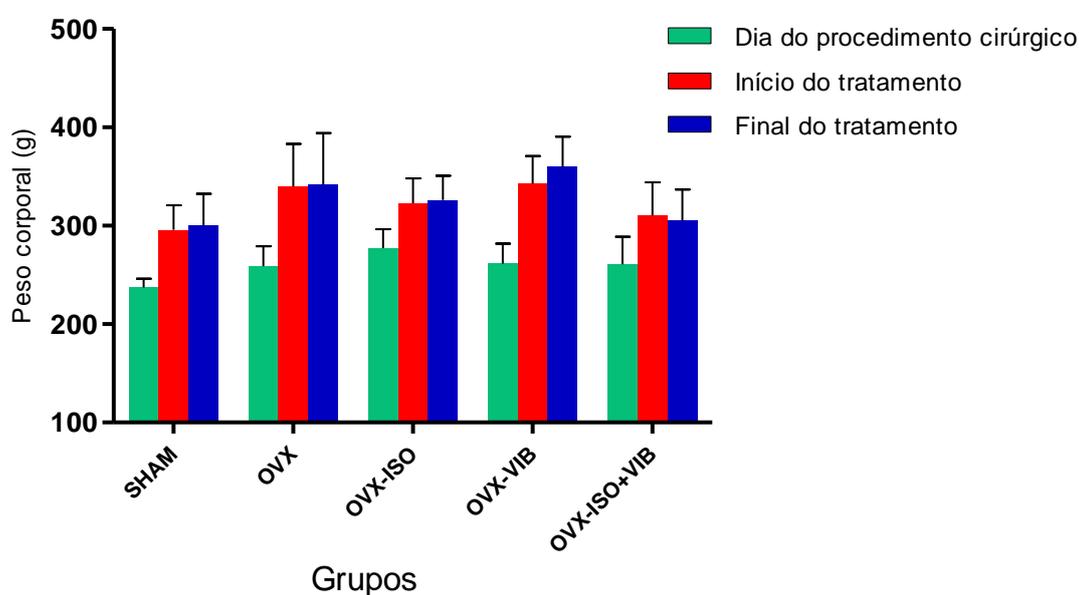


Figura 9 – Média do peso corporal dos animais durante todo o período experimental. Média \pm DP.

Tabela 1 - Média da massa corporal durante todo o período experimental.

Grupos	Massa corporal (g)		
	Inicial	Final	Ganho de massa (g)
SHAM	237,2 \pm 9,0	300,1 \pm 32,3	62,9 \pm 27,9
OVX	258,9 \pm 19,3	328,3 \pm 30,9	69,4 \pm 19,3
OVX-ISO	277,0 \pm 20,7	326,0 \pm 24,9	49,0 \pm 11,1 [#]
OVX-VIB	261,6 \pm 20,1	359,7 \pm 30,6	98,1 \pm 39,6
OVX-ISO+VIB	260,8 \pm 28,0	305,2 \pm 31,6	44,4 \pm 35,1 [*]

Dados expressos em Média \pm DP. $P < 0,05$,[#]OVX-ISO vs.OVX-VIB,^{*}OVX-ISO+VIB vs. OVX-VIB.

5.2 Comprimento e espessura dos fêmures e tíbias

O comprimento e espessura dos fêmures não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 10- A e B, tabela 2). Não houve diferença estatística entre os comprimentos das tíbias dos diferentes grupos (Figura 11- A, tabela 3), porém a espessura das tíbias dos animais dos grupos OVX-ISO e OVX-ISO+VIB apresentaram-se maior ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo SHAM (Figura 11- B, tabela 3).

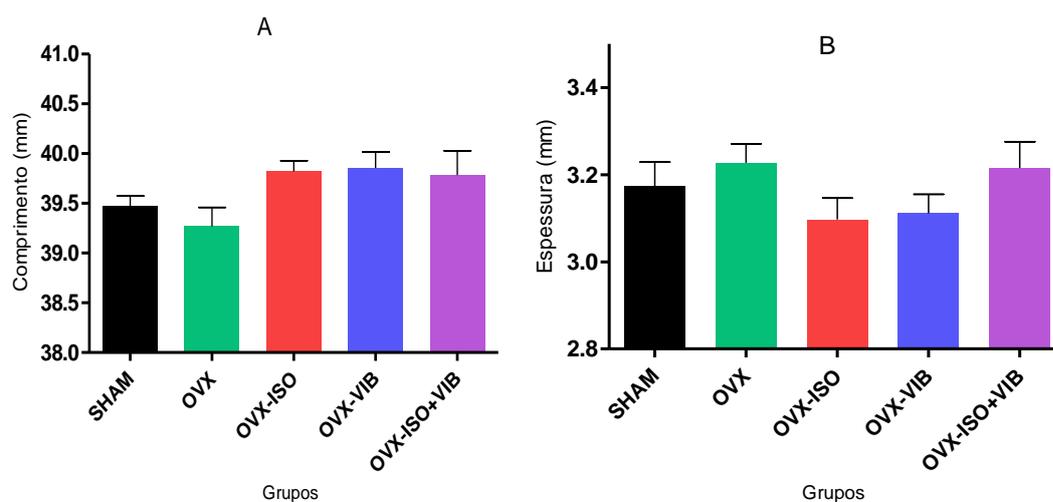


Figura 10 – Média do comprimento (A) e espessura (B) dos fêmures. Média \pm DP.

Tabela 2 - Comprimento e espessura dos fêmures.

Fêmures		
Grupos	Comprimento (mm)	Espessura (mm)
SHAM	36,82 \pm 0,65	3,17 \pm 0,21
OVX	37,46 \pm 0,92	3,23 \pm 0,17
OVX-ISO	36,68 \pm 1,04	3,10 \pm 0,21
OVX-VBI	36,89 \pm 0,78	3,11 \pm 0,18
OVX-ISO+VBI	36,72 \pm 1,20	3,22 \pm 0,24

Dados expressos em Média \pm DP.

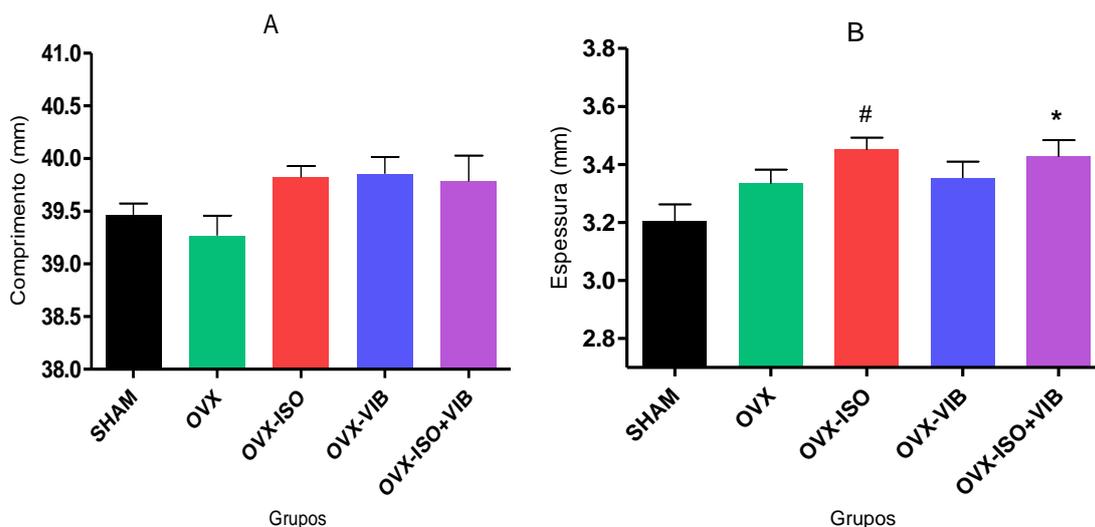


Figura 11 – Média do comprimento (A) e espessura (B) das tíbias. Média \pm DP. $P < 0,05$, [#]OVX-ISO vs. SHAM, ^{*}OVX-ISO+VIB vs. SHAM.

Tabela 3 - Comprimento e espessura das tíbias.

Grupos	Tíbias	
	Comprimento (mm)	Espessura (mm)
SHAM	39,47 \pm 0,45	3,21 \pm 0,24 ^{#*}
OVX	39,27 \pm 0,83	3,33 \pm 0,21
OVX-ISO	39,82 \pm 0,50	3,45 \pm 0,20
OVX-VBI	39,86 \pm 0,69	3,35 \pm 0,25
OVX-ISO+VBI	39,79 \pm 1,09	3,43 \pm 0,25

Dados expressos em Média \pm DP. $P < 0,05$, [#]OVX-ISO vs. SHAM, ^{*}OVX-ISO+VIB vs. SHAM.

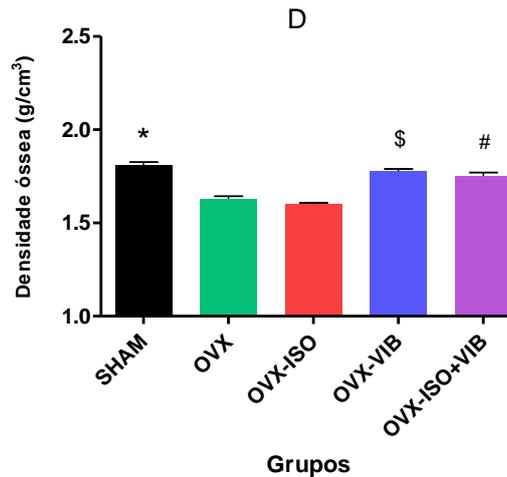
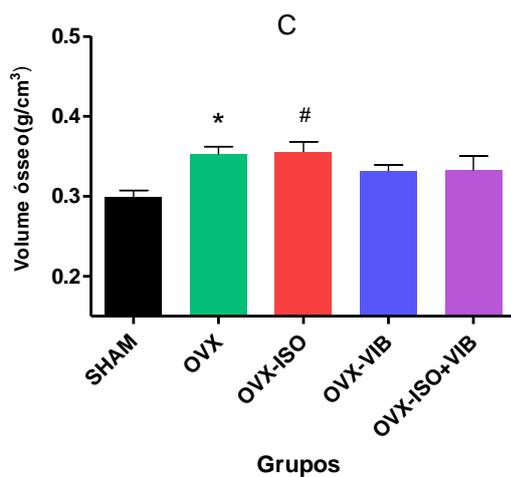
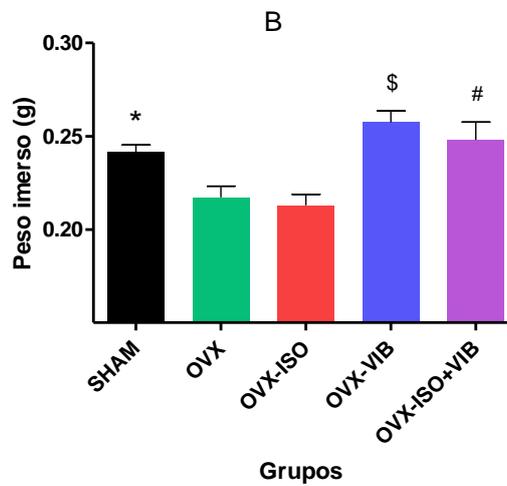
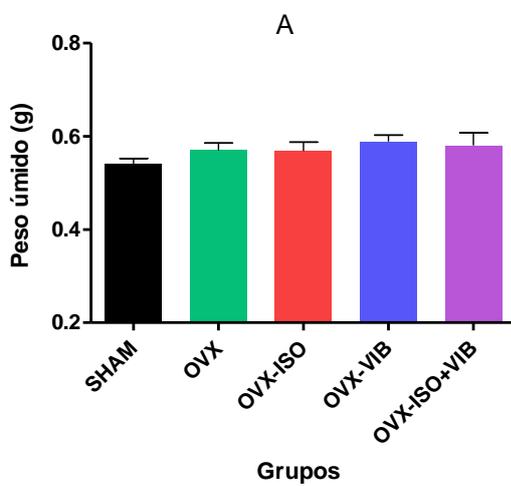
5.3 Parâmetros físicos

Os parâmetros físicos analisados nas tíbias foram: peso úmido, peso imerso, volume ósseo, densidade óssea, densidade mineral óssea, porcentagens de água no osso, de material mineral e de material orgânico, peso seco e peso das cinzas.

O peso imerso, a densidade óssea e a porcentagem de material orgânico foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos grupos SHAM, OVX-VIB e OVX-ISO+VIB quando comparados aos grupos OVX e OVX-ISO (Figuras 12 B, D e H, respectivamente).

Já o volume ósseo, densidade mineral óssea, porcentagem de material mineral e o peso das cinzas foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos grupos OVX e OVX-ISO, quando comparados aos grupos SHAM, OVX-VIB e OVX-ISO+VIB (Figuras 12 C, E, G e J, respectivamente).

Não houve diferenças significantes no peso úmido, na porcentagem de água no osso e no peso seco entre os diferentes grupos (Figuras 12 A, F e I, respectivamente).



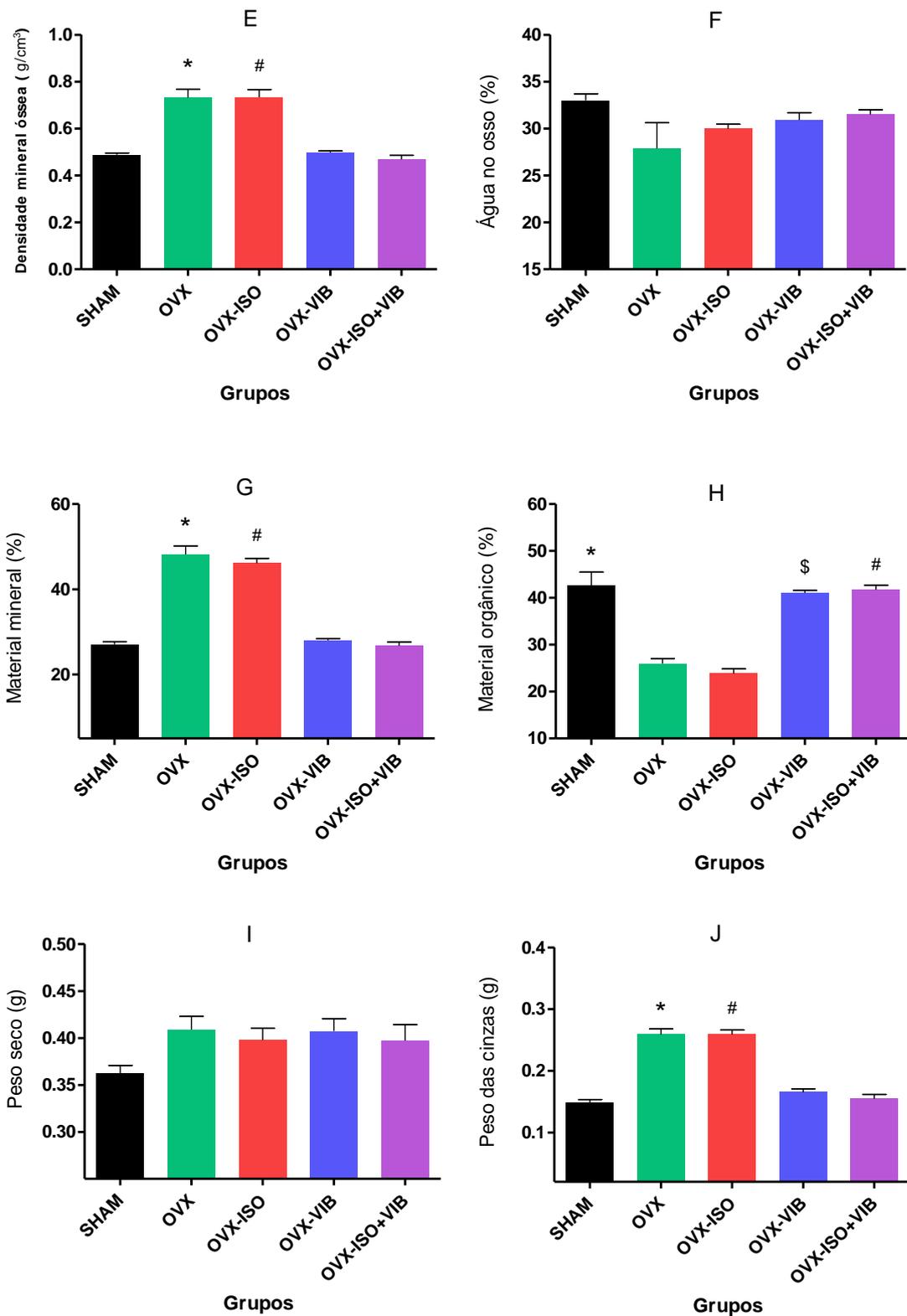


Figura 12 – Parâmetros físicos em tíbias. Peso imerso (B), densidade óssea (D) e porcentagem de material orgânico (H), $p < 0,05$: *SHAM, \$OVX-VIB e #OVX-ISO+VIB vs. OVX e OVX-ISO. Volume ósseo (C), densidade mineral óssea (E), porcentagem de material mineral (G) e peso das cinzas (J), $p < 0,05$: *OVX e #OVX-ISO vs. SHAM, OVX-VIB e OVX-ISO+VIB. Média \pm DP.