

EFEITOS DA DEFICIÊNCIA EM CÁLCIO, DAS ISOFLAVONAS DA SOJA E DO ESTRÓGENO E SUA ASSOCIAÇÃO NA REMODELAÇÃO ÓSSEA

Evelyn Luzia de Souza Santos¹, Gabriela Esteves de Campos², Renata Falchete Prado³, Vanessa Ávila Silveira⁴, Yasmin Rodarte Carvalho⁵

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Avenida Francisco José Longo, 777, São José dos Campos – SP; CEP : 12245-000, evy.odonto@hotmail.com

Resumo- A osteoporose é caracterizada pela perda de massa óssea após menopausa. Neste estudo utilizou-se o modelo experimental de ovariectomia em ratas simulando menopausa, com o objetivo de analisar a perda óssea no côndilo e possíveis tratamentos. Utilizaram-se 126 ratas, sendo 105 ovariectomizadas e 21 falso operadas. Das 105 ovariectomizadas, 21 receberam ração com baixo teor de cálcio e as demais ração padrão. Estas 84 ratas, divididas em 4 grupos receberam: 1mg/kg/dia de 17 β -estradiol, 15mg/Kg/dia de extrato de isoflavonas a 40%, associação dos dois ou água. Os animais foram eutanasiadas 3, 5 e 8 semanas após a ovariectomia. As mandíbulas foram desmineralizadas e incluídas em parafina. Os cortes foram analisados histomorfometricamente determinando-se o volume trabecular ósseo (VT) com o programa *Image J*. A análise de variância mostrou que a deficiência hormonal não alterou o VT, contudo, a administração de estrógeno aumentou o VT quando comparado aos demais grupos ovariectomizados. A ração deficiente em cálcio aumentou o VT do côndilo. Conclui-se dos tratamentos propostos, somente o estrógeno e a deficiência em cálcio induziram formação óssea.

Palavras-chave: Côndilo mandibular, estrógeno, remodelação óssea, isoflavonas.

Área do Conhecimento: Patologia Bucal

Introdução

A deterioração da microarquitetura do tecido ósseo que ocorre na osteoporose torna os ossos susceptíveis às fraturas (Robling et al. 2006). Apesar de poder ser secundária a várias condições, as formas de osteoporose mais comuns são as que se desenvolvem no envelhecimento e na pós-menopausa (Rosenber et al., 2005).

Um modelo experimental que simula a deficiência estrogênica pós-menopausa em mulheres é a ovariectomia de ratas, a qual resulta na diminuição dos níveis de estrógeno (Sims et al., 1996). Como resultado, a ovariectomia causa perda óssea em ossos como mandíbula (Tanaka, et al., 2003) e maxila (Tanaka et al., 2001).

Alguns estudos evidenciaram perda óssea no côndilo após a ovariectomia (Tanaka et al., 1998, Fujita et al., 2001, Fujita et al., 2006), outros não verificaram tal diminuição (Yamashiro et al., 1998), e alguns encontraram áreas de perda óssea e áreas de neoformação óssea nos côndilos de ratas ovariectomizadas (Tanaka et al., 1999, Tanaka et al., 2000).

O estrógeno foi capaz de reverter a perda óssea nos côndilos mandibulares induzida pela ovariectomia nas ratas do estudo de Fujita et al., 2001.

Breitman et al., 2003 sugerem que dietas ricas em alimentos contendo isoflavonas e cálcio podem contribuir na manutenção da massa óssea em mulheres na pós-menopausa. Isoflavonas são fitoestrógenos presentes principalmente na soja que podem agir como agonistas dos estrógenos (Alves et al., 2002).

Hara et al. (2001) estudaram tíbias, mandíbulas e maxilas por meio de análise histomorfométrica e verificaram que a perda óssea de ratas com osteoporose foi agravada com uma dieta deficiente em cálcio.

Metodologia

Foram operadas e eutanasiadas 126 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com 90 dias de idade, peso aproximado de 300g. Estes animais foram aleatoriamente divididos em:

a) Ovariectomizados - constituído por 105 animais, os quais foram submetidos à ovariectomia;

b) Sham - constituído por 21 animais, os quais foram falsamente operados.

De acordo com o tratamento recebido os animais ovariectomizados foram ainda subdivididos em grupos:

a) Grupo Isoflavonas (ISO) – constituído por 21 ratas, as quais receberam 15mg/kg/dia, de extrato de isoflavonas a 40% via oral;

b) Grupo Estrógeno (EST) - constituído por 21 ratas, as quais receberam 1mg/kg/dia de valerato de 17 β -estradiol via oral;

c) Grupo Associação (ASS) - constituído por 21 ratas, as quais receberam 1mg/kg/dia de valerato de 17 β -estradiol associado a 15mg/kg/dia de extrato de isoflavonas a 40% via oral;

d) Grupo Ovariectomizado placebo (OVZ) - constituído por 21 ratas, as quais receberam placebo (água), via oral.

e) Grupo Ração Especial (ESP) - constituído por 21 ratas, as quais receberam placebo (água), via oral e foram alimentadas com ração deficiente em cálcio (dieta AIN-93M 0,1% de cálcio e 0,5% de fósforo).

A eutanásia ocorreu 3, 5 e 8 semanas após a ovariectomia. Os cõndilos direitos foram removidos e após a fixação e desmineralização foram submetidos à técnica histológica de rotina e incluídos em parafina e corados pela técnica convencional de hematoxilina e eosina para histomorfometria do tecido ósseo, realizada por meio da planimetria por contagem de pontos. Para esta análise foi utilizado um retículo com padrão quadrangular. Este retículo foi posicionado nas fotomicrografias com auxílio do programa (*Image J*) e quantificados os pontos de intersecção que recaíram sobre a matriz óssea. Os valores obtidos foram transformados em porcentagem de volume trabecular ósseo e submetidos aos testes estatísticos.

Resultados

Os dados foram comparados estatisticamente segundo três abordagens. Na primeira, foram considerados os efeitos dos fatores: ovariectomia e do tempo de sacrifício na remodelação óssea, e efetuado o teste de análise de variância (ANOVA, dois fatores). Na segunda abordagem, foram considerados os efeitos do tratamento e do tempo de sacrifício na remodelação óssea nas ratas ovariectomizadas. Para esses dados foi efetuado também o teste ANOVA, dois fatores e o teste de Tukey (5%). Na terceira abordagem, os grupos ovariectomizados que receberam ração comercial padrão ou ração deficiente em cálcio foram comparados pelo teste ANOVA, dois fatores (tempo de sacrifício e dieta).

Na primeira abordagem, o valor de $p=0,95$ para o fator presença o ausência de hormônio demonstrou igualdade na massa óssea tanto dos animais do grupo SHAM e do grupo OVZ, no entanto, $p=0,00$ para o fator tempo, mostrando o aumento significativo do volume trabecular com o decorrer do tempo (Tabela 1).

Tabela 1: Médias em porcentagem do volume trabecular ósseo de cada grupo nos diferentes tempos experimentais

Tempo /grupo	SHAM	OVZ	EST	ISO	ASS	ESP
3	34,57	35,09	38,98	36,89	41,89	42,14
5	41,07	39,75	46,98	36,56	33,85	56,64
8	48,26	49,34	53,08	42,32	44,26	48,88

A segunda abordagem com o teste ANOVA revelou como fatores significativos os medicamentos e o tempo experimental. O Teste de Tukey (Tabela 2) realizado em seguida mostrou que o grupo de maior volume trabecular foi que recebeu reposição estrogênica.

Tabela 2: Resultado do teste de Tukey para as médias dos grupos quanto ao efeito do tratamento

Grupo	Médias	Grupos homogêneos*
EST	46.34	A
OVZ	41.39	B
ISO	39.99	B
ASS	38.58	B

*grupos seguidos da mesma letra não diferem

A terceira abordagem estatística, comparando as rações, mostrou que no período de 5 semanas a dieta deficiente em cálcio no grupo com ração especial demonstrou significância estatística com maior volume trabecular, que decaiu no período de oito semanas, no qual foi semelhante ao grupo OVZ (gráfico 1).

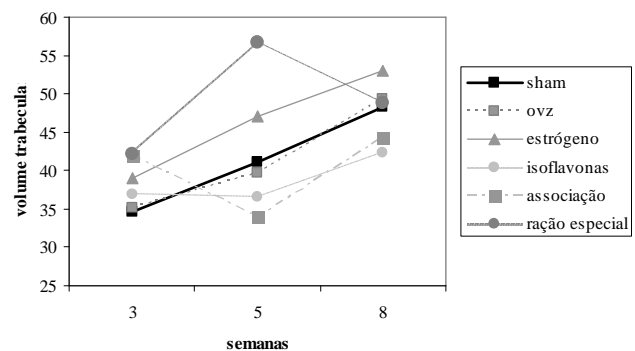


Gráfico 1 - Médias dos volumes trabeculares dos grupos conforme o tempo de sacrifício

Discussão

Tanto os animais do grupo SHAM, quanto do grupo OVZ tiveram aumento significativo do volume trabecular com o decorrer dos tempos experimentais, contudo sem diferirem entre si. Esperava-se encontrar menor volume trabecular condilar nos animais do grupo OVZ como descrito nos resultados dos estudos de Tanaka et al. 1998, Fujita et al. 2001A, Fujita et al. 2006, que

verificaram perda de massa óssea no cômulo após a ovariectomia. Entretanto, esta perda de massa óssea pós-ovariectomia no cômulo não representa uma unanimidade na literatura uma vez que Yamashiro et al. 1998 não verificaram tal diminuição.

Os estrógenos podem atuar sobre o processo de remodelação óssea pela sinalização osteoprotegerina (OPG), o receptor ativador de NF-κB (RANK) e a citocina RANK ligante (RANKL), identificados como os principais fatores envolvidos na osteoclastogênese. O RANK localiza-se na superfície de osteoclastos maduros e de seus precursores, enquanto a RANKL é uma proteína pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF). Seu principal papel é a inibição da apoptose dos osteoclastos e a estimulação da diferenciação e ativação destas células. A OPG pode atuar inibindo RANKL por meio da ligação com RANK e também diretamente, por meio de outros receptores presentes nos osteoclastos. Seus efeitos são antagônicos aos efeitos da RANKL. Diversas citocinas e compostos como os estrógenos, influenciam a osteoclastogênese por meio da regulação da produção de RANKL/OPG pelas células estromais e pelos osteoblastos (Steeve et al.). A deficiência hormonal decorrente da ovariectomia seria responsável pela maior reabsorção óssea pela maior ativação de osteoclastos e redução das taxas de apoptose destas células.

Assim, a reposição com o estradiol é responsável, como constatado na literatura, pela manutenção da massa óssea em ratas ovariectomizadas. Foi observado neste estudo que o grupo que recebeu estrógeno apresentou maior volume trabecular quando comparado com os grupos que receberam placebo, isoflavonas da soja e associação do estrógeno e isoflavonas, corroborando com resultados encontrados na literatura com relação à eficiência da reposição hormonal estrogênica na conservação da massa óssea (Fujita et al. 2001B, Cai et al. 2005).

Os fitoestrógenos ou fitohormônios constituem um grupo de compostos não esteróides encontrados em diversos vegetais. Grande parte desses compostos apresenta um anel fenólico em sua estrutura, responsável pela capacidade de ligação aos receptores hormonais, podendo agir como agonistas ou antagonistas dos estrógenos, dependendo do sítio de atuação (Alves e Silva 2002). Neste estudo, não foi constatado efeito da administração via oral do extrato de isoflavonas no volume trabecular dos cômulos mandibulares. Arjmandi et al. relataram, ao utilizar um modelo de ratos com osteopenia, uma pequena reversão da perda óssea tanto pelo grupo que consumiu proteína de soja com isoflavonas quanto pelo grupo que a consumiu sem as isoflavonas. Mas estes resultados nem sempre são alcançados (Cai

et al. 2005), permanecendo uma discussão quanto à eficácia das isoflavonas da soja na prevenção da perda de massa óssea decorrente da deficiência hormonal.

A dieta deficiente em cálcio foi utilizada no estudo com o objetivo de alcançar maior perda óssea pós-ovariectomia, contudo, surpreendentemente, no período de cinco semanas de deficiência hormonal, a massa óssea do grupo com ração especial demonstrou o maior volume trabecular, que decaiu no período de oito semanas, no qual foi semelhante ao grupo OVZ. Este fato pode ser devido à consistência extremamente rígida da dieta especial. Tal ração apresenta grande dificuldade, por exemplo, para ser moída (experimento realizado pelo mesmo grupo de pesquisa), utilizando-se um moedor de café manual, diferentemente da ração comercial, que facilmente fragmenta-se. Talvez este seja o motivo pelo qual a deficiência em cálcio não causou perda óssea considerável nos cômulos mandibulares das ratas, uma vez que a dieta deficiente em cálcio utilizada não foi moída. O esforço mastigatório já fora relacionado com a dificuldade para a perda óssea nos ossos gnáticos de roedores, sendo que o esforço mastigatório confere um fator preventivo na perda óssea decorrente da deficiência estrogênica em ratas (Zaffe et al.). Kiliaridis et al. verificaram maior perda óssea mandibular em ratos em crescimento mediante a administração de dieta triturada e umedecida (dieta macia).

Conclusão

A reposição hormonal com estrógeno induziu formação óssea no cômulo mandibular. O uso da dieta deficiente em cálcio em animais ovariectomizados induziu formação óssea no cômulo mandibular, devido ao esforço mastigatório decorrente da consistência da ração especial.

Referências

- ARJMANDI BH, GETLINGER MJ, GOYAL NV, ALEKEL L, HASLER CM, JUMA S et al. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *Am J Clin Nutr.* 1998 Dec.; 68(6): 1358-63.
- ALVES DL.; SILVA RC. Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2002. 105p
- BREITMAN PL, FONSECA D, CHEUNG AM, WARDA WE. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy

compared to isoflavones alone Bone 33. 2003 Oct;33(4):597-605.

- CAI DJ, ZHAO Y, GLASIER J, CULLEN D, BARNES S, TURNER CH, WASTNEY M, WEAVER CM. Comparative effect of soy protein, soy isoflavones, and 17beta-estradiol on bone metabolism in adult ovariectomized rats. J Bone Miner Res. 2005 May, 20(5): 828-39.

- FUJITA T, KAWATA T, TOKIMASA C, KOHNO S, KAKU M, TANNE K. Breadth of the mandibular condyle affected by disturbances of the sex hormones in ovariectomized and orchietomized mice. Clin Orthod Res. 2001 Aug, 4(3): 172-6

- FUJITA T, KAWATA T, TOKIMASA C, TANNE K. Influence of oestrogen and androgen on modelling of the mandibular condylar bone in ovariectomized and orchietomized growing mice. Arch Oral Biol. 2001 Jan, 46(1): 57-65.

- FUJITA T, OHTANI J, SHIGEKAWA M, KAWATA T, KAKU M, KOHNO S, MOTOKAWA M, TOHMA Y, TANNE K. Influence of sex hormone disturbances on the internal structure of the mandible in newborn mice. Eur J of Ortho. 2006 Apr; 28(2):190-4.

- HARA T, SATO T, OKA M, MORI S, SHIRAI H. Effects of ovariectomy and/or dietary calcium deficiency on bone dynamics in the rat hard palate, mandible and proximal tibia. Arch Oral Biol. 2001 May;46(5):443-51.

- KILIARIDIS S, THILANDER B, KJELLBERG H, TOPOUZELIS N, ZAFIRIADIS A. Effect of low masticatory function on condylar growth: a morphometric study in the rat. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1999 Aug.;116(2): 121-5.

- ROBLING AG, CASTILLO AB, TURNER CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2006, 8:455- 98.

- ROSENBER AE. Bone, joints and soft tissue tumors. In: Kumar,V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005.

- SIMS NA, MORRIS HA, MOORE RJ, DURBRIDGE TC. Estradiol treatment transiently increases trabecular bone volume in ovariectomized rats. Bone. 1996, 19(5):455-61.

- STEEVE KT, MARC P, SANDRINE T, DOMINIQUE H, YANNICK F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev. 2004 Feb.; 15(1): 49-60.

- TANAKA M, EJIRI S, KOHNO S, OZAWA H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. J Prosthet Dent. 1998 Jun, 79(6):685-90.

- TANAKA M, EJIRI S, NAKAJIMA M, KOHNO S, OZAWA H. Changes of Cancellous Bone Mass in Rat Mandibular Condyle Following Ovariectomy. Bone. 1999 Sep, 25(3):339-47

- TANAKA S, SHIMIZU M, DEBARI K, FURUYA R, KAWAWA T, SASAKI T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. Anat Rec. 2001 Feb 1, 262(2):203-12.

- TANAKA M, TOYOOKA E, KOHNO S, OZAWA H, EJIRI S. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003 Apr, 95(4):495-502.

- ZAFFE, D. et al. Induction and pharmacological treatment of oral osteopenia in rats. Minerva Stomatol, v.48, n.3, p.45-62, Mar. 1999.