

## **Efeito da reposição fitoterápica com isoflavonas na histomorfometria do tecido ósseo de ratas Wistar ooforectomizadas**

### **Phytotherapeutic replacement with isoflavones in histomorphometry of bone tissue of Wistar ooforectomized rats**

*Juliana Roncini Gomes da Costa, Alana Ludemila de Freitas Tavares, Carlos Augusto Nassar, Gladson Ricardo Flor Bertolini, Rose Meire Costa, Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro*

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel

**Endereço para correspondência:**

Gladson Ricardo Flor Bertolini

Unioeste, Rua Universitária, 2069. Jardim Universitário, Cascavel PR. CEP: 85819-110

**E-mail:** gladsonricardo@gmail.com

#### **Resumo**

**Introdução:** Com o aumento na expectativa de vida da população, morbidades como a osteoporose estão mais presentes na vida de idosos e, principalmente, de mulheres que sofrem de afecções relacionadas com a menopausa. Para tentar prevenir a ocorrência dessa doença que afeta a densidade óssea, facilitando o acometimento por fraturas, estudos vêm sendo conduzidos com a utilização da terapia de reposição hormonal, voltadas para substâncias químicas que possam desempenhar a mesma função dos hormônios naturais, porém sem os efeitos colaterais encontrados na terapia medicamentosa. **Objetivo:** O presente estudo avaliou a influência do fitoestrógeno isoflavona na histomorfometria do tecido ósseo de ratas, submetidas à ooforectomia. **Métodos:** 30 ratas Wistar foram distribuídas em três grupos: controle (G1, n=10); ooforectomia (G2, n=10); e ooforectomia e fitoestrógeno (G3, n=10). Imediatamente após a ooforectomia, os animais dos grupos G3 foram tratados com isoflavona (0,25 mg/kg/dia) diluída em álcool benzílico 5% e óleo de milho 95%, duas semanas, via injeção subcutânea. Na sequência, todos os animais foram eutanasiados em guilhotina, as tíbias direitas coletadas e processadas para análise histomorfométrica em microscopia de luz. **Resultados:** A área do canal medular e a espessura do tecido ósseo cortical da tíbia, tanto G2 como G3, não revelaram variações teciduais significativas. **Conclusão:** Os modelos não foram efetivos na remodelação óssea de ratas Wistar ooforectomizadas.

**Palavras-chave:** osteoporose, fitoterapia, ovariectomia, tíbia.

#### **Abstract**

**Introduction:** With the increase in life expectancy of the population, morbidities such as osteoporosis are more present in the lives of the elderly and, especially, of women who suffer from conditions related to menopause. In order to try to prevent the occurrence of this disease, which affects bone density, making fractures easier, studies have been conducted with the use of hormone replacement therapy, focusing on chemical substances that can perform the same

function as natural hormones, but without the side effects found in drug therapy. Objective: This study evaluated the influence of the phytoestrogen isoflavone on bone tissue histomorphometry in rats submitted to oophorectomy. Methods: 30 Wistar rats were distributed into three groups: control (G1, n=10); oophorectomy (G2, n=10); and oophorectomy and phytoestrogen (G3, n=10). Immediately after oophorectomy, animals in the G3 groups were treated with isoflavone (0.25 mg/kg/day) diluted in 5% benzyl alcohol and 95% corn oil, two weeks, via subcutaneous injection. Following this, all animals were euthanized in guillotine, the right tibias collected and processed for histomorphometric analysis in light microscopy. Results: The medullary canal area and cortical bone tissue thickness of the tibia, both G2 and G3, revealed no significant tissue variations. Conclusion: The models were not effective in bone remodeling in oophorectomized Wistar rats.

**Keywords:** osteoporosis, phytotherapy, ovariectomy, tibia.

## INTRODUÇÃO

A expectativa de vida da população brasileira vem crescendo, consequência de melhores condições sanitárias, bem como na melhoria dos serviços de saúde, o que acarreta no envelhecimento populacional<sup>(1,3)</sup>.

O climatério, também popularmente conhecido como “menopausa”, corresponde ao período de transição entre o período fértil e não fértil da vida de uma mulher, sendo considerado como um momento de transição para o envelhecimento dos indivíduos deste sexo<sup>(4)</sup>. A menopausa traz alguns transtornos para a vida da mulher, como alterações hormonais, urogenitais e emocionais. Destaca-se a redução lenta e gradativa do hormônio estrogênio no corpo<sup>(5)</sup>. Essa diminuição, além de promover alterações no tecido ósseo predispondo à osteoporose, acaba afetando o tecido cartilaginoso devido ao estrogênio também atuar como um condroprotetor, ou seja, possibilitando a degradação da cartilagem articular<sup>(6)</sup>.

Nesse sentido, o tratamento e/ou prevenção da menopausa pode ser feito com o uso do exercício físico, ingestão de cálcio e vitamina D<sup>(7)</sup> e pela terapia de reposição hormonal<sup>(8)</sup>. A reposição hormonal tem sido utilizada desde a década de 60 e ainda há controvérsias sobre os riscos e benefícios da terapia. O uso da reposição em baixas doses de estrógeno traz um efeito protetor sobre a densidade mineral óssea, porém, há indícios de que o estrogênio acaba resultando em alterações no endométrio, tromboembolismo venoso, aumento do risco do câncer de mama e de acidentes vasculares coronarianos<sup>(8,9)</sup>.

Desta forma, pesquisas sobre medicamentos alternativos para o tratamento dos efeitos da menopausa se apresentam efetivas, como estudos com o uso de isoflavonas, fitoestrógenos derivados da soja semelhantes ao estrógeno<sup>(10)</sup>. A isoflavona busca compensar a deficiência hormonal durante a fase do climatério e mesmo que seus efeitos estrogênicos sejam pequenos, ela ainda pode exercer um efeito agonista, substituindo funcionalmente o estrogênio e atuando nos efeitos da menopausa<sup>(11)</sup>.

Especificamente na cartilagem, a isoflavona parece interferir no metabolismo, reduzindo os sintomas de osteoartrite por meio do efeito antioxidante, controla a inflamação ao exercer papel imunomodulador, condição de ameniza os efeitos da doença<sup>(12,13)</sup>. Visto que os efeitos do uso de fitoestrógenos ainda não são totalmente esclarecidos e a substituição da terapia hormonal convencional por estes vem sendo utilizada<sup>(14)</sup>, o presente estudo avaliou a influência do fitoestrógeno isoflavona na histomorfometria do tecido ósseo de ratas, submetidas à ooforectomia.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), com certificado experimental no uso de animais em pesquisa nº 18/16 CEUA, registrado com nº 31/14. O grupo amostral foi composto por 30 ratas da linhagem Wistar, com idade média de 10 semanas, com peso aproximado de 250g, obtidas do Biotério Central da UNIOESTE e mantidas no Laboratório de Estudo de Lesões e Recursos Fisioterapêuticos, em caixas padrão de polipropileno (49cm comprimento x 34cm largura x 16cm altura, com 3 animais por caixa), em ambiente com temperatura de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas (ligado entre 7:00-19:00 horas), recebendo água e ração (Nuvital) ad libitum. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, composto por dez ratas cada, sendo:

- Grupo Controle (G1): ratas que não foram submetidas a nenhum tipo de intervenção, sendo o grupo controle absoluto;
- Grupo Ooforectomia (G2): ratas que foram submetidas ao protocolo de ooforectomia como forma de indução da osteoporose;
- Grupo Ooforectomia + Isoflavona (G3): ratas que foram submetidas ao protocolo de ooforectomia como forma de indução da osteoporose e tratadas com terapia de reposição fitoterápica.

### *Protocolo de Ooforectomia*

Após duas semanas de aclimação ao biotério setorial, aos 79 dias de vida, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (Dopalen, 100 mg/kg) e xilazina (Anasedan, 14 mg/kg)<sup>(15)</sup>. No procedimento de ooforectomia foi realizada a anestesia, tricotomia e antissepsia com álcool iodado na região do baixo ventre, sendo em seguida feita a incisão cirúrgica longitudinal, com lâmina de bisturi. Depois de ter acessado a cavidade peritoneal, o tecido adiposo foi afastado até a identificação das tubas uterinas e dos ovários. Em seguida, realizou-se a sutura com fio Catgut 4.0 simples na área dos cornos uterinos, promovendo a ressecção dos ovários bilateralmente. Ao final do procedimento, foram realizadas suturas por planos de estratigrafia, sendo feitas internamente com fio reabsorvível Catgut 4.0 simples e as externas com fio de nylon 4.0.

### *Protocolo de Reposição com Isoflavona*

A reposição hormonal do G3 foi realizada de acordo com protocolo adaptado de CHOW et al. <sup>(16)</sup>, utilizando-se isoflavona (0,25 mg/kg/dia), diluída em álcool benzílico 5% e óleo de milho 95% com dose subcutânea no dorso dos animais, com as aplicações iniciadas imediatamente após a cirurgia e com uma dose diária, durante quinze dias.

### *Processamento histológico*

24 horas após o período de tratamento, os animais foram anestesiados (conforme protocolo citado) e eutanasiados por decapitação em guilhotina (Insight). As tíbias do lado direito foram coletadas para processamento histológico. Para tal, foram fixadas em solução de formol 10% por 24 horas. Após este período, foram lavadas em água corrente por 1 hora e imersas em solução de ácido tricloroacético 5%, sendo mantidas na solução descalcificadora por 10 dias, com trocas da solução a cada cinco dias. Na sequência, as tíbias foram novamente lavadas em água corrente por 1 hora, acondicionadas em álcool 70% e, posteriormente seguiram as etapas rotineiras para inclusão em parafina, onde foram desidratadas em séries crescentes alcóolicas e diafanizadas em xilol, sendo inclusas em parafina para obtenção dos blocos, e seccionadas transversalmente na espessura de 7

µm em aparelho de microtomia Olympus CUT 4055® com posterior coloração em hematoxilina e eosina (HE) <sup>(17)</sup>.

Após, as lâminas foram analisadas e o melhor corte de cada animal foi fotodocumentado, com fotomicroscópio Olympus DP71®, em aumento final de 40x para análise da área do canal medular. No aumento de 100x, foram mensuradas a espessura do osso cortical, em três pontos equidistantes da tíbia <sup>(18)</sup>.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados no programa Graph Pad Prism 6.0®. Inicialmente foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk, posteriormente a comparação entre os grupos foi realizada por meio de ANOVA unidirecional (Analysis of Variance), com pós teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

Na análise do tecido ósseo da tíbia, foi verificado que tanto o modelo de privação hormonal quanto o com reposição com isoflavonas, não foram efetivos na remodelação óssea, conforme tabela 1.

**Tabela 1.** Parâmetros morfométricos da tíbia de ratas com relação a área do canal medula e a espessura do osso cortical.

<b>GRUPOS</b>	<b>Área do Canal Medular (µm<sup>2</sup>)</b>	<b>Espessura do Osso Cortical (µm)</b>
G1	1870679 ± 381527	365,6 ± 28,80
G2	1538966 ± 370358	378,6 ± 29,79
G3	1775760 ± 110247	372,1 ± 39,29

Valores expressos como média ± desvio padrão da média.

## **DISCUSSÃO**

Os fitoestrógenos apresentaram efeitos positivos no processo de remineralização óssea, sendo considerados agentes anti-osteoporóticos em potencial <sup>(14,19)</sup>. No presente estudo, foi possível observar que tanto a técnica de privação hormonal quanto a de reposição com isoflavonas, não promoveram modificações morfométricas, considerando-se a área do canal medular, bem como a espessura do osso cortical, porém salienta-se que o período em que a provável privação hormonal, bem do tratamento fitoterápico foram relativamente curtos, o que provavelmente impactou nos achados.

Em um estudo realizado por Tai et al. <sup>(9)</sup>, 430 mulheres de 45 a 65 anos consumiram 300 mg/dia de isoflavonas, associado ao uso de vitamina D e cálcio durante dois anos, porém os resultados demonstraram que o tratamento não foi efetivo para prevenir o declínio da densidade mineral óssea da coluna lombar e do fêmur comparado ao grupo placebo. Ao contrário desse resultado, assim como do presente estudo, a terapia com isoflavonas já se mostrou benéfica a mineralização óssea <sup>(20,21)</sup>. No estudo de Singh et al. <sup>(22)</sup>, a formononetina, uma isoflavona metoxi, foi utilizada em camundongos

ovariectomizadas e lesionadas na base mediana do fêmur, com o objetivo de verificar o reparo ósseo e efeito curativo após tratamento no período de 21 dias. O grupo tratado com isoflavona, obteve melhor efeito de regeneração e expressão osteogênica, demonstrando um potencial reparador de fraturas em eventos de osteoporose. Deve-se salientar que tais resultados ocorreram em modelo de fratura, o que difere do presente estudo, no qual não havia um estímulo tão agressivo.

Modelos animais de ooforectomia são amplamente usados para reproduzir a diminuição hormonal existente no período do climatério e estudar as alterações na massa óssea <sup>(23)</sup>. Zhu et al. <sup>(24)</sup>, demonstraram em 30 camundongos de 8 semanas de idade, comprometimento das estruturas trabeculares, diminuição do volume ósseo e perda óssea evidente após 8 semanas de ooforectomia. Isso sugere que o período de 15 dias é insuficiente para promover alterações degenerativas a estrutura óssea, bem como da reposição com isoflavona, não alterando o tecido tibial, também merece destaque que o modelo animal utilizado foi diferente, sendo uma possível causa da ausência de efeitos.

Apesar de não haver alterações ósseas, a literatura aponta que os fitoterápicos estão sendo utilizados como maneira alternativa para tentar equilibrar a perda hormonal ocasionada na menopausa <sup>(25,26)</sup>, bem como demonstraram colaborar com preservação óssea em mulheres na pós-menopausa <sup>(27)</sup>. Apesar da isoflavona de soja possuir efeitos comprovados em experimentos, além da sua capacidade de diminuição dos riscos em relação às doenças cardiovasculares em mulheres na menopausa <sup>(28)</sup>, sua utilização no tratamento da osteoporose foi relacionada em pesquisas epidemiológicas, onde mulheres asiáticas no período da pós-menopausa possuíam uma incidência menor de osteoporose, possivelmente explicada pela alta ingestão de produtos derivados da soja, comum aquelas culturas <sup>(29)</sup>.

Sugere-se que para melhor elucidação do efeito da isoflavona, sobre indivíduos com situação de privação hormonal, sejam avaliados períodos de tratamento mais longos, tanto para a privação hormonal como para a utilização de terapias com isoflavonas, visto que esta apresenta evidências positivas para mineralização óssea, mas que ainda não foram totalmente descritas, o período curto de privação e tratamento, mostrou-se como a principal limitação deste estudo. Também foram limitações a falta de coleta sanguínea para avaliar os efeitos da suplementação em relação aos parâmetros bioquímicos e hormonais, o que se sugere que novos estudos abordem, bem como o uso de animais idosos, visando mimetizar melhor o que ocorre com o ser humano.

## CONCLUSÃO

O modelo de ooforectomia bem como a terapia com isoflavona não promoveu alterações ao tecido ósseo da tibia de ratas Wistars ooforectomizadas.

## AGRADECIMENTO

À Fundação Araucária, pelo auxílio com bolsa de iniciação científica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A. Aging: a temporal dimension for neutrophils. *Trends Immunol.* 37(5):334-45, 2016.
2. Versey HS. A tale of two Harlems: Gentrification, social capital, and implications for aging in place. *Soc Sci Med*, 214(July):1-11, 2018.
3. Song X. Interactions between development and human health. *China Popul Today*, 17(2 3):14-18, 2000.
4. Slopian R, Wender-Ozegowska E, Rogowicz-Frontczak A, Meczekalski B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Jaremek JD, et al. Menopause and diabetes: EMAS clinical guide. *Maturitas*, 117:6-10, 2018.
5. Bliss-Moreau E, Baxter MG. Estradiol treatment in a nonhuman primate model of menopause preserves affective reactivity. *Behav Neurosci*, 176(1):100-106, 2016.
6. Wang Q, Liu Z, Wang Y, Pan Q, Feng Q, Huang Q, et al. Quantitative Ultrasound Assessment of Cartilage Degeneration in Ovariectomized Rats with Low Estrogen Levels. *Ultrasound Med Biol.*, 42(1):290-298, 2016.
7. Rizzoli R, Abraham C, Brandi M-L. Nutrition and bone health: turning knowledge and beliefs into healthy behaviour. *Curr Med Res Opin*, 30(1):131-41, 2014.
8. Pardini D. Terapia de reposição hormonal na menopausa. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 58(2):172-81, 2014.
9. Tai TY, Tsai KS, Tu ST, Wu JS, Chang CI, Chen CL, et al. The effect of soy isoflavone on bone mineral density in postmenopausal Taiwanese women with bone loss: A 2-year randomized double-blind placebo-controlled study. *Osteoporos Int*, 23(5):1571-1580, 2012.
10. Lee DH, Kim MJ, Park SH, Song EJ, Nam Y Do, Ahn J, et al. Bioavailability of isoflavone metabolites after korean fermented soybean paste (doenjang) ingestion in estrogen-deficient rats. *J Food Sci*, 83(8):2212-2221, 2018.
11. Ahn H, Park YK. Soy isoflavone supplementation improves longitudinal bone growth and bone quality in growing female rats. *Nutrition*, 37:68-73, 2017.
12. Mohammad-Shahi M, Haidari F, Rashidi B, Saei AA, Mahboob S, Rashidi MR. Comparison of the effects of genistein and daidzein with dexamethasone and soy protein on rheumatoid arthritis in rats. *BioImpacts*, 1(3):161-170, 2011.
13. Nemitz MC, Moraes RC, Koester LS, Bassani VL, von Poser GL, Teixeira HF. Bioactive soy isoflavones: extraction and purification procedures, potential dermal use and nanotechnology-based delivery systems. *Phytochem Rev*, 14(5):849-869, 2015.

- 14.Thent ZC, Froemming GRA, Ismail ABM, Fuad SBSA, Muid S. Employing different types of phytoestrogens improve bone mineralization in bisphenol A stimulated osteoblast. *Life Sci*, 210(July):214-223, 2018.
- 15.Fernandes EV, Filgueiras GB, Estanislau C, Venancio EJ. Effects of chronic REM sleep restriction on anxiety-like behavior and the immune system of rats. *SaBios Rev Saúde e Biol*, 15(2):49-54, 2020.
- 16.Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest*, 89(1):74-78, 1992.
- 17.Kakahata CMM, Peretti AL, Tavares ALF, Wutzke MLS, Ribeiro L de FC, Costa RM, et al. Morphometric effects of whole-body vibration on the bone in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Manipulative Physiol Ther*, 43(5):551-557, 2020.
- 18.Simas JMM, Brancalhão RMC, De Ribeiro LFC, Bertolini GRF. Influence of ladder climbing exercise on bone of rats induced to osteoporosis and immobilization. *Arch Med del Deport*, 33(3), 176-182, 2016.
- 19.Lambert MNT, Hu LM, Jeppesen PB. A systematic review and meta-analysis of the effects of isoflavone formulations against estrogen-deficient bone resorption in peri- and postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 106(3):801-811, 2017.
- 20.Taku K, Melby MK, Kurzer MS, Mizuno S, Watanabe S, Ishimi Y. Effects of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone*, 47(2):413-423, 2010.
- 21.Taku K, Melby MK, Takebayashi J, Mizuno S, Ishimi Y, Omori T, et al. Effect of soy isoflavone extract supplements on bone mineral density in menopausal women: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Asia Pac J Clin Nutr*, 19(1):33-42, 2010.
- 22.Singh KB, Dixit M, Dev K, Maurya R, Singh D. Formononetin, a methoxy isoflavone, enhances bone regeneration in a mouse model of cortical bone defect. *Br J Nutr*, 117(11):1511-1522, 2017.
- 23.Chen G, Xu Q, Dai M, Liu X. Bergapten suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomy-induced osteoporosis via suppression of NFκB and JNK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 509(2):329-334, 2019.
- 24.Zhu W, Yin Z, Zhang Q, Guo S, Shen Y, Liu T, et al. Proanthocyanidins inhibit osteoclast formation and function by inhibiting the NFκB and JNK signaling pathways during osteoporosis treatment. *Biochem Biophys Res Commun*, 509(1):294-300, 2019.

- 25.Silva ACV, da Rosa MI, Fernandes B, Lumertz S, Diniz RM, dos Reis Damiani MEF. Fatores associados à osteopenia e osteoporose em mulheres submetidas à densitometria óssea. *Rev Bras Reumatol*, 55(3):223-328, 2014.
- 26.Moreira AC, Silva AM, Santos MS, Sardão VA. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 143:61-71, 2014.
- 27.Pawlowski JW, Martin BR, McCabe GP, McCabe L, Jackson GS, Peacock M, et al. Impact of equol-producing capacity and soy-isoflavone profiles of supplements on bone calcium retention in postmenopausal women: A randomized crossover trial<sup>1,2</sup>. *Am J Clin Nutr*, 102(3):695-703, 2015.
- 28.Bolzan MS, Liberali R, Coutinho VF. Efeitos das isoflavonas no perfil lipídico de mulheres na menopausa. Uma revisão sistemática. *Ensaio e Ciência Ciências Agrárias, Biológicas e Saúde*, 15(6):181-94, 2012.
- 29.Carvalho HVM de. As evidências dos benefícios do consumo das isoflavonas da soja na saúde da mulher: revisão de literatura. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, 16(4):353-9, 2014.