

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**Análise do consumo de extrato hidrossolúvel de soja na  
qualidade do tecido ósseo de ratos jovens adultos**

Carolina de Matos Figueiredo de Andrade  
Nutricionista

ARAÇATUBA – SP

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**Análise do consumo de extrato hidrossolúvel de soja na  
qualidade do tecido ósseo de ratos jovens adultos**

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina Veterinária  
da Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho” - UNESP  
- Campus de Araçatuba, como  
parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal (Fisiopatologia  
Médica e Cirúrgica).

**Carolina de Matos Figueiredo de Andrade**

**Orientador: Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Louzada**

ARAÇATUBA – SP

2016

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

CAROLINA DE MATOS FIGUEIREDO DE ANDRADE- nascida em São Paulo SP no dia 19 de dezembro de 1988, estudou o terceiro ano do ensino médio na “boarding school” na região da Nova Inglaterra no estado de Vermont, Estado Unidos. Ingressou no curso de Nutrição na Universidade Anhembi Morumbi na cidade de São Paulo, em Janeiro de 2007, obtendo o título de Nutricionista em dezembro de 2010. Em 2012 cursou a disciplina de extensão University of California San Diego nos Estados Unidos

Em agosto de 2013 ingressou no curso de Mestrado em Ciência Animal pela UNESP, Campus de Araçatuba (SP), na área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica sob orientação do Prof. Adj. Mário Jefferson Quirino Louzada, responsável pelas disciplinas de Radioterapia e Biomecânica na pós-graduação em ciência animal e Biofísica no curso de graduação.

Buscando aprimoramento profissional obteve o título: Especialização em Terapia nutricional, no hospital Beneficência Portuguesa, São Paulo-SP.

Possui dois certificados de proficiência da língua inglesa, TOELF e IELST.

Domina a língua espanhola, curso avançado realizado na Espanha em junho de 2009.

Trabalha hoje em um consultório médico de Endocrinologia aplicando seus conhecimentos em nutrição e ciências.

## EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que  
fazemos não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais que acreditaram em minha competência,  
E ao meu marido que me ajudou a prova-la.  
Sem vocês me faltaria o essencial: o amor!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus primeiramente que permitiu que todas essas grandezas acontecesse em minha vida, que colocou no meu caminho oportunidades de crescimento e me permitiu a competência de concretizar mais um sonho.

Ao Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada, pela orientação científica e pessoal. Obrigada por abrir as portas e acreditar que eu tinha potencial para crescer e principalmente por fazer parte desse crescimento. Obrigada por ter me acolhido e acreditado na minha capacidade.

Aos meus pais e meu irmão que sempre confiaram na minha capacidade e me estimularam e apoiaram. Obrigada por permitir que eu tivesse as melhores oportunidades de estudo, por toda compreensão exercida, por todos os dias em que vocês abriram mão de algo para que eu tivesse o melhor. Família que sempre me serviu de exemplo sendo meu porto seguro e minha fonte de amor, que continuamente me incentivaram a busca dos meus sonhos. Obrigada por me formarem como sou hoje.

Ao meu amado marido que esteve ao meu lado nos momentos mais apertados dessa trajetória. Que teve paciência e sempre se demonstrou muito interessado, e foi com toda certeza o maior incentivador da ciência em minha vida. Obrigada por estudar comigo, revisar minha dissertação, chamar minha atenção, fazer um papel não apenas de esposo, mas sim de amigo e preceptor. Obrigada dividir essa experiência comigo sendo meu maior companheiro e fundamentalmente meu amor.

Ao Pedro Luís Florindo, pela grande ajuda, carinho, confiança, amizade, sem ele com certeza não sei o que teria acontecido.

Ao Prof. Paulo Ciarlini e a Profa. Cárís Maroni por aceitar o convite para compor a banca de qualificação mesmo sem antes me conhecer.

A Profa. Ana Cláudia por aceitar o convite para compor a banca e disponibilizar o laboratório de bioquímica.

Ao Prof. Antônio Hernandes por disponibilizar seu laboratório e seu tempo para as análises bioquímicas.

Aos professores e amigos por todas as palavras de conforto, pela preocupação e carinho para comigo.

Aos companheiros de laboratório, Bruna Rezende, Melise Ueno, Bruno Souza, Wellington Nogueira, obrigada pela convivência agradável.

Gostaria de agradecer especialmente pela atenção dada pelas colegas Bruna Rezende e Melise Ueno que tiveram muita paciência, dedicação todas as vezes que as procurei.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação, Secretaria e Biblioteca, pela contribuição e orientações para com este estudo.

Ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.

À Universidade Estadual Paulista, por ter sido o maior instrumento dessa etapa.

Agradeço a todas as pessoas que de modo direto ou indireto participaram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	13
2 Objetivo .....	18
3 Metodologia .....	19
3.1 Animais e procedimento experimental.....	19
3.2 Massa corporal.....	20
3.3 Consumo de ração e ingestão de líquidos e tratamento.....	20
3.4 Eutanásia dos animais .....	21
3.5 Densitometria óssea.....	21
3.6 Ensaio biomecânico .....	21
3.7 Dosagem de Cálcio pelas cinzas .....	23
3.8 Análise estatística .....	24
4 Resultados .....	24
5 Discussão.....	30
6 Conclusão .....	33
7 Referências.....	34
8 Anexos .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

- CMO: Conteúdo mineral ósseo
- DMO: Densidade mineral óssea
- EHS: Extrato hidrossolúvel de soja
- MC: Grupo macho controle
- MS: grupo macho suplementado
- FC: grupo fêmea controle
- FC: grupo macho suplementado
- cm<sup>2</sup>: Centímetros quadrados
- g/cm<sup>2</sup>: grama por centímetro quadrado
- g: grama
- DMOa: densidade mineral óssea areal
- DXA: densitômetro de dupla emissão de raios-X

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático do experimento animal .....	20
Figura 2: Densitômetro DPX-ALPHA LUNAR .....	21
Figura 3: Ensaio mecânico de flexão de três pontos .....	22
Figura 4: Ensaio mecânico de compressão no colo femoral .....	23
Figura 5: Diagrama esquemático da calcinação e dosagem de cálcio e fósforo....	24
Figura 6: Gráfico de massa corpórea por semana dos Grupos MC,MS,FC e FS...	25
Figura 7: Gráfico do consumo de ração semanal dos grupos MC e MS .....	26
Figura 8: Gráfico do consumo de ração semanal dos grupos FC e FS .....	26

## LISTA DE TABELA

- TABELA 1- Média e erro padrão da média na massa corpórea e do consumo de ração semanal e consumo de EHS, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS), grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS) ..... 25
- TABELA 2- Média e erro padrão da média das variáveis: densitometria óssea e ensaios biomecânicos das tíbias, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS)..... 27
- TABELA 3- Média e erro padrão da média na massa corpórea e do consumo de ração semanal, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS)..... 28
- TABELA 4 - Média e erro padrão da média da densitometria óssea da região cortical de fêmures e tíbias, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).....28
- TABELA 5 - Média e erro padrão da média da densitometria óssea da região cortical de fêmures e tíbias, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS)..... 29

## **ANÁLISE DO CONSUMO DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA NA QUALIDADE DO TECIDO ÓSSEO DE RATOS JOVENS ADULTOS**

### **RESUMO**

A soja é uma leguminosa rica em proteínas, fonte de cálcio e isoflavonas. Um dos possíveis efeitos das isoflavonas é de reduzir a perda óssea quando há uma deficiência de estrogênio. A proposta desse estudo foi analisar a influência da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) na massa óssea de ratos adultos jovens de ambos os sexos. Foram utilizados 40 ratos *Novergicus Albinus* linhagem Wistar adultos jovens e saudáveis, aleatoriamente separados em quatro grupos: macho controle (MC), macho suplementado (MS), fêmea controle (FC) e fêmea suplementada (FS) que permaneceram por 11 semanas em gaiola comum recebendo 500 mL de água e 300g de ração diariamente, os grupos suplementados (MS e FS), ao qual foi oferecido além de água e ração, 500 ml de EHS, durante o mesmo período experimental do controle. O consumo de ração e a ingestão de líquidos foram mensurados, bem como a massa dos animais. Ao final do período os animais foram eutanasiados. Os ossos foram submetidos à densitometria óssea-DXA (osso inteiro e região cortical) e ensaio mecânico, para avaliação da densidade mineral óssea - DMO ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), Força Máxima (N) e Rigidez (kN/m). Na análise de grau de mineralização foi utilizado as cinzas para quantificar de concentração de cálcio e fósforo. O consumo de EHS provocou diminuição da DMO no grupo MS, porém não houve alteração nas propriedades biomecânicas, força máxima e rigidez. A concentração de cálcio e fósforo nas cinzas dos fêmures do grupo MS foi significativamente menor que o grupo controle. Conclui-se assim, que o extrato hidrossolúvel de soja influenciou negativamente o conteúdo mineral ósseo de ratos machos jovens adultos diminuindo a mineralização, sem alterar as características mecânicas.

**Palavras-chave:** densitometria; distúrbios do metabolismo do cálcio; soja.

### **ABSTRACT**

## **ANALYSIS OF SOYBEAN'S HYDRO SOLUBLE EXTRACT ON THE QUALITY OF THE BONE TISSUE OF YOUNG ADULTS RATS**

Soybeans are a rich legume protein, a source of calcium and isoflavones. One of the possible effects of isoflavones is to reduce bone loss when it was estrogen deficiency. The purpose of this study was to analyze the influence of diet supplemented with soybean's hydro soluble extract (SHE) in bone mass in young adults rats of both genders. Were used 40 rats *Novergicus Albinus Wistar* young and healthy, randomly separated into four groups: male control (MC) and female control(FC), which remained for 11 weeks in common cage receiving 500 ml of water and 300 g of feed daily, and the others supplemented groups; male supplemented (MS) and female supplemented, that was offered in addition to water and feed 500ml of SHE. During the experimental period, feed intake and intake of liquids were measured as well as the mass of animals. At the end, the animals were euthanized. The bones underwent bone densitometry – DXA(whole bone and cortical area) and mechanical testing for bone mineral density - BMD ( $\text{g} / \text{cm}^2$ ) Maximum Strength (N) and stiffness ( $\text{kN} / \text{m}$ ), respectively. To analyze the mineralization degree was used bone ashes to quantify calcium and phosphorus concentration. The consumption of SHE caused decreased of BMD in MS group, but there were no changes in the bone biomechanical properties, maximum strength and rigidity. Concluding that the water extract of soy beans negatively affected the bone mineral content of young adult males rats decreasing the mineralization degree without changing the mechanical characteristics.

**Keywords:** densitometry; calcium metabolism disorders; soybean

## 1. Introdução

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa da família *Fabaceae*. Soja e seus derivados têm sido utilizados há séculos nos países orientais como alimento básico da dieta, e ingrediente para produtos industrializados no ocidente (DELIZA et al., 2002). Os produtos de soja mais utilizados são o leite de soja, tofu e tempeh. Além disso, a soja é encontrada em 60 % de alimentos processados. Proteína texturizada de soja (50-70% de proteína de soja) é um substituto da carne encontrado em cachorros-quentes, hambúrgueres, salsichas e outros produtos à base de carne, enquanto proteína isolada de soja (90% de proteína de soja) é usado para enriquecer barras energéticas, bebidas esportivas, fórmulas infantis, cereais, barras de granola, imitação de produtos lácteos, sorvetes e queijos. Ademais, proteína texturizada de soja é usada para fortificar inúmeros produtos no café da manhã escolar e programas de almoço, bem como outros programas de assistência federais americanas (PATISAUL; JEFFERSON, 2010).

Grãos de soja são sementes ricas em proteínas, considerados boas fontes de cálcio e também a mais importante fonte alimentar de isoflavonas (COWARD et al., 1993). Estudos em seres humanos, animais, e em cultura de células sugerem que fitoestrógenos desempenham um papel importante na prevenção dos sintomas da menopausa, osteoporose, câncer e doenças cardíacas (KURZER; XIA, 1997).

Os fitoestrogénios são compostos químicos sintetizados nas plantas, estruturalmente e/ou funcionalmente semelhantes aos estrogénios humanos, e aos seus metabolitos ativos. Estão presentes numa grande variedade de vegetais, nomeadamente os cereais, os legumes e os frutos, mas apenas nas leguminosas, que é o caso da soja, se apresentam em concentrações relativamente altas. Uma planta poderá conter mais do que uma classe de fitoestrogénios (BABER, 2010).

São polifenóis, classificados de acordo com a sua estrutura química. Incluem os flavonóides (canferol e quercetina), as isoflavonas (genisteína, daidzeína formonectina e equol), os linhanos (enterolactona, enterodiol) os coumestanos (coumestrol) e os estilbenos (resveratrol) (ZHAO; MU, 2011).

Acredita-se que os fitoestrogénios da soja têm ação sobre alguns mecanismos biológicos tais como proliferação, diferenciação e síntese proteica em diferentes células alvo. Estes efeitos são dependentes da dose, do receptor sob o qual atuam, e do alvo celular. Podem exercer efeitos benéficos sobre o organismo humano, tais como as ações terapêuticas e preventivas da carcinogénese, aterosclerose, osteoporose, e as melhorias na sintomatologia da menopausa, tal como foi anteriormente referido. No entanto, muitos dos estudos experimentais e clínicos que analisaram o impacto do consumo destes compostos, presentes nas sementes de soja, produziram resultados contraditórios (8-10). Uma das grandes preocupações é a possibilidade de colocarem em risco a saúde de alguns grupos etários, principalmente os recém-nascidos e as crianças (PATISAUL; JEFFERSON, 2010).

As isoflavonas são os fitoestrogénios mais estudados. A quantidade de isoflavonas varia de acordo com a variedade de soja, com as condições de cultura e também com o processamento a que são submetidas. Nas sementes de soja, as isoflavonas estão associadas a proteínas. Estas podem ser dissociadas das proteínas usando extração alcoólica, que diminui significativamente a quantidade de isoflavonas ligadas. Isto explica a variabilidade substancial no conteúdo destas, em produtos contendo soja (0,1 a 5 mg de isoflavonas/g de proteína nas sementes de soja maduras e secas; 0,3 mg de isoflavonas/g de proteína nas sementes de soja pouco maduras e 0,1-2 mg de isoflavonas/g de proteína de semente de soja no tofu e em algumas preparações de leite de soja. A genisteína (5,7,4'-trihidroxiisoflavona) e a daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona) são as isoflavonas com maior concentração naturalmente presentes na soja (CEDERROTH; NEF, 2009).

Para muitas pessoas o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) – “leite” de soja – pode substituir o leite de vaca. A substituição do leite de vaca pelo EHS seria perfeita nutricionalmente se referisse apenas à quantidade de proteína, porém ao considerarmos a quantidade dos micronutrientes, como por exemplo, o cálcio, o “leite” de soja não se torna um adequado substituto para o leite bovino, cujo conteúdo de cálcio é de 123 mg/100 mL de leite,

sendo a maior fonte e de melhor absorção do mineral. Autores sugerem que, para atingir uma equivalência entre os dois leites, seria necessário que o de soja fosse enriquecido com 500 mg de Ca/porção e não apenas com as atuais 300 mg/porção referida pela maioria dos fabricantes (HEANEY et al., 2000).

A população vem apresentando uma mudança nos costumes e consequentemente nas necessidades dietéticas. Pessoas vêm optando por dietas vegetarianas, vegetarianas exclusivas (vegan) e há uma maior incidência de pessoas com intolerância à lactose ou a alergia à proteína do leite de vaca. A deficiência de cálcio pode aparecer com maior frequência, podendo acarretar perda da massa óssea. Além de problemas como câibras e irritabilidade por se um mineral necessário na transmissão nervosa, o cálcio também é fundamental na regulação dos batimentos cardíacos. O consumo adequado de cálcio durante a vida é um pré-requisito para a saúde dos ossos (KROEZE et al. 1990).

Dados estatísticos mostram 5% da população adulta Americana vegetariana, e 2% adotam a dieta vegana, na qual não há consumo de carne, peixe, frango, leites e derivados e ovos. Esse número corresponde a aproximadamente 5 milhões de pessoas.(LE; SABATÉ 2014). Outra informação importante é que o número de pessoas com alergia a proteína do soro do leite, intolerância a lactose e hipolactasia vem aumentando (KULL et al. 2009). A frequência da intolerância à lactose varia de 2% na Escandinávia para 20 - 40% em populações brancas na Europa Central. Aumenta para 53% entre os mexicanos-americanos e para cerca de 80% em negros, chegando a quase 100% em populações do Sudeste Asiática (OBERMAYER-PIETSCH et al., 2004).

Estudos sugerem que a hipolactasia desempenha um papel na determinação de riscos de algumas doenças. Baixa produção de lactase por si só não tem um efeito direto sobre o metabolismo do osso, mas pode influenciar indiretamente através da redução da ingestão de cálcio. Pacientes com hipolactesia e a intolerância à lactose tendem a reduzir a ingestão de produtos lácteos. Uma comparação entre mulheres tolerantes ao leite e intolerantes demonstrou uma diferença superior a 200 mg na ingestão

média diária de cálcio. Baixa ingestão de cálcio pode influenciar o metabolismo ósseo independente de idade e sexo, causando aumento na remodelação osséa e nos níveis séricos do paratormônio (PTH), com consequente diminuição da massa óssea (HONKANEN et al 1996; PORRO, 2009).

A osteoporose é definida como “uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo” (CONSENSUS, 1991). É uma doença osteometabólica que possui um grande impacto na qualidade de vida e na sobrevivência. Acomete ambos os sexos sendo mais frequente na mulher, já que no climatério a diminuição dos níveis estrogênicos precipitam perdas de massa óssea. A ocorrência de fraturas osteoporóticas aumenta sensivelmente a morbimortalidade e leva à perda funcional do indivíduo acometido em qualquer período da vida (YAZBEK; MARQUES NETO, 2009).

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica que sofre intensa e contínua remodelação pela ação combinada de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. O controle não só da atividade, mas também da proliferação e da diferenciação das células ósseas está sob a ação de diversos fatores sistêmicos e locais, cuja ação combinada e, frequentemente simultânea, é indispensável para a manutenção da homeostase do tecido ósseo. Fatores de crescimento, citocinas e prostaglandinas representam classes de fatores locais que atuam sobre as células ósseas. Entre os fatores sistêmicos associados à homeostase do tecido ósseo, o paratormônio (PTH)<sup>8</sup>, a calcitonina<sup>9</sup>, a 1,25-dihidroxi-vitamina D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]<sup>10</sup>, os glicocorticóides e o estrógeno são importantes para a regulação do metabolismo ósseo. Entre os fatores sistêmicos, o estrógeno apresenta grande importância para a homeostase do tecido ósseo, visto que a queda nas taxas desse hormônio está relacionada à ocorrência de osteoporose (FALONI; CERRI, 2007).

O estrógeno atua sobre a via RANK/RANKL/OPG (Receptor ativador de fator nuclear-κB/ligante de RANK/ Osteoprotegerina), relacionada à formação de osteoclastos. Ao agir sobre células mesenquimais osteoprogenitoras/osteoblastos, o estrógeno promove redução dos níveis de

RANKL – ligante de RANK – e aumento da produção de OPG – competidor de RANK. Assim, a OPG, que apresenta níveis aumentados, liga-se ao RANKL e impede a interação deste com o RANK (presente em precursores de osteoclastos), inibindo, conseqüentemente, a fusão dos precursores de osteoclastos (KAWAMOTO et al., 2002).

De acordo com os dados da literatura, fica claro que o estrógeno inibe a reabsorção óssea. A ação do estrógeno sobre os osteoclastos ocorre por diversas vias. Assim, diante da deficiência estrogênica, ocorre aumento na formação de osteoclastos, bem como aumento no tempo de sobrevivência dessas células, o que leva ao aumento do número e da atividade reabsortiva dos osteoclastos. Ainda a síntese de matriz óssea pelos osteoblastos é diminuída. Desse modo, esses eventos culminam no desequilíbrio da remodelação óssea, havendo maior reabsorção em relação à neoformação óssea, o que determina a ocorrência de osteoporose (MANOLAGAS,2000).

Recentemente, o estudo epidemiológico Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS) mostrou que cerca de 6% da população brasileira com mais de 40 anos têm o diagnóstico médico de osteoporose. Fraturas por baixo impacto foram relatadas por 15,1% das mulheres e 12,8% dos homens (PINHEIRO et al., 2009). Estimou-se que no triênio 2008- 2010, o ministério de saúde gastou cerca de R\$ 288.986.335,15 com procedimentos relacionados ao tratamento de osteoporose em idosos do Brasil (MORAES et al., 2014).

Um dos mais importantes determinantes do risco de desenvolver osteoporose na vida adulta depende especialmente da quantidade de massa esquelética adquirida durante a infância e adolescência. Diversos estudos mostram que a otimização da massa óssea ocorre na infância e adolescência. Um estudo americano transversal com 247 mulheres entre 11 e 32 anos, mostrou que aproximadamente 90% do conteúdo mineral ósseo é alcançado aos 17 anos, 95% aos 19 anos e 99% aos 22 anos (TEEGARDEN et al., 1995). Maximizar a massa óssea nesta faixa etária é extremamente importante para proteger contra fraturas. Podemos assim afirmar que o cálcio é necessário para o desenvolvimento ósseo durante o crescimento e

para a manutenção da integridade esquelética durante toda a vida adulta (LANZILLOTTI et al., 2003).

Existe uma carência de estudos sobre a ação da soja em homens e animais machos. A maioria das pesquisas realizadas nessa área é direcionada a mulheres que representam 40-50% das fraturas osteoporóticas (CHRISCHILLES et al., 1991). Entretanto sabe-se que 25-33% dos homens vão apresentar fraturas osteoporóticas em algum momento de suas vidas. Apesar dessa evidência continua ainda há negligência dessa patologia no sexo masculino (NGUYEN et al., 1996; GEMMARI et al., 2001; KIEBZAK et al., 2002; FELDSTEIN et al., 2005).

A proposta do estudo foi analisar a influência da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja na massa óssea de ratos jovens adultos e saudáveis de ambos os sexos. Assim mensuramos também o papel da soja como fonte de cálcio e a ação dos fitoestrógenos. Contribuindo para a escassez de pesquisas nessa população.

Em um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório usando ratos machos de 30 dias suplementados com EHS, foi observado uma ação deletéria nas propriedades ósseas dos ratos que usaram a suplementação (OLIVEIRA et al., 2013). Desse modo nossa hipótese é que o consumo de EHS ocasionará perda de densidade mineral óssea em ratos machos não influenciará em fêmeas.

## **2.Objetivo**

Analisar a ação da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja na massa óssea de animais adultos jovens machos e fêmeas saudáveis.

### 3. Metodologia

#### 3.1 Animais e procedimento experimental

Foram utilizados no total 40 ratos sendo: 20 ratos machos e 20 ratas fêmeas, com 4 meses de idade, da raça *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP/Araçatuba, escolhidos aleatoriamente. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), no Biotério da FMVA/UNESP/Araçatuba. O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – Protocolo 2012-02399.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo de Macho Controle (MC), grupo de macho Suplementado (MS), grupo de fêmea controle (FC) e grupo de fêmea suplementado (FS) – contendo 10 animais cada, mantidos em caixas próprias para animais experimentais (5 animais por caixa).

Para os grupos MC e FC foi ofertado bebedouro contendo água (500 mL) e ração (300g) Presence®, Paulínia, SP, Brasil, cujas informações nutricionais estão presentes na Figura 2. Para os grupos MS e FS foi ofertado bebedouro contendo água (500mL), outro contendo EHS (500mL) cuja informações nutricionais estão presentes na Figura 1, e ração (300g).

Durante o período experimental, a ingestão de líquidos e o consumo de ração foram mensurados diariamente, no mesmo horário (9h). O consumo de ração foi encontrado pela diferença entre o colocado inicialmente e as sobras. O mesmo ocorreu para o controle de ingestão de água e EHS. As sobras foram desprezadas, fazendo-se reposição de água, EHS e da ração. Após 11 semanas todos os valores de consumo foram analisados, obtendo-se a média semanal do consumo por animal.

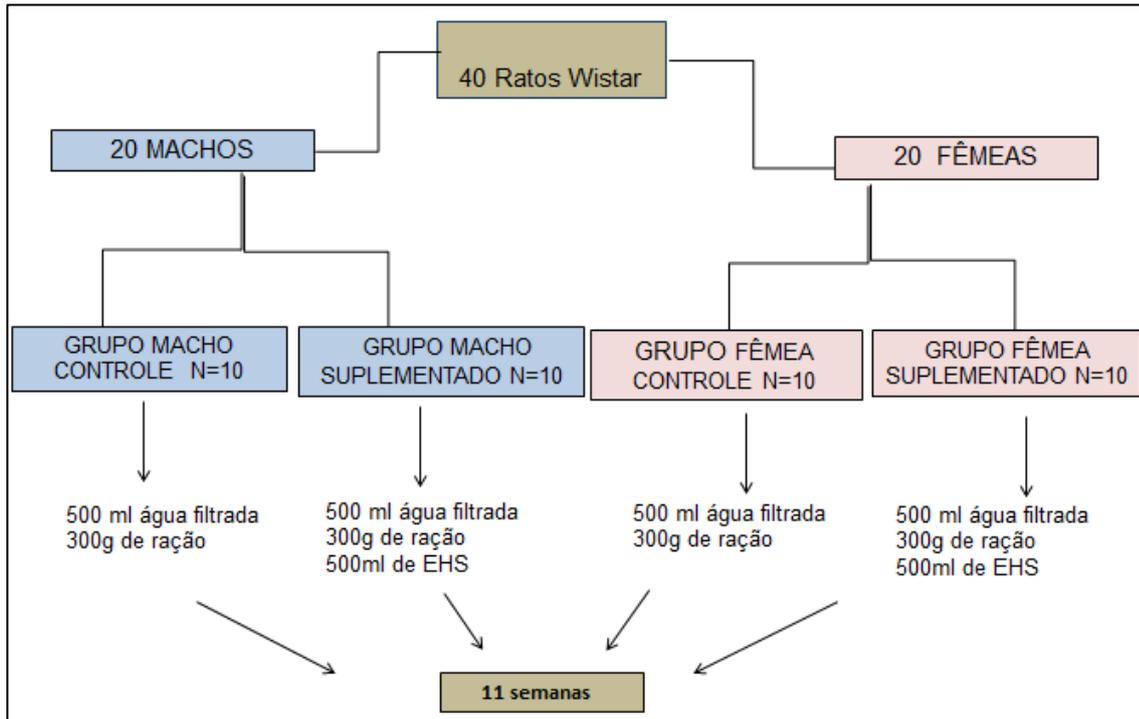


FIGURA1: Diagrama esquemático do experimento animal.

### 3.2 Massa corporal

A massa corporal dos animais foi mensurada uma vez por semana utilizando-se balança digital de precisão Toledo® sendo a primeira determinação no início do experimento e a última mensuração no dia do sacrifício dos animais.

### 3.3 Consumos de ração e ingestão de líquidos e tratamento

Para os grupos MC e FC foi ofertado bebedouro contendo água (500 mL) e ração (300g) Presence®, cujas informações nutricionais estão presentes no anexo 1. Para os grupos MS e FS foi ofertado bebedouro contendo água (500mL), outro contendo EHS (500mL) cuja informações nutricionais estão presentes na anexo 2, e ração (300g).

Durante o período experimental, a ingestão de líquidos e o consumo de ração foram mensurados diariamente, no mesmo horário (9h). O consumo de ração foi encontrado pela diferença entre o colocado inicialmente e as sobras. O mesmo ocorreu para o controle de ingestão de água e EHS. As sobras foram desprezadas, fazendo-se reposição de água, EHS e da ração. Após 11 semanas todos os valores de consumo foram analisados, obtendo-se a média semanal do consumo por animal.

### 3.4 Eutanásia dos animais

Os animais foram anestesiados com Ketamina (80mg/Kg) e Xilazina 2% (10mg/Kg) intraperitoneal para execução da eutanásia e retirada dos ossos para análises.

### 3.5 Densitometria óssea

A avaliação densitométrica foi realizada após a eutanásia dos animais. As tíbias e os fêmures direitos foram desarticulados e dissecados, e submersos em recipiente plástico contendo água a 2 cm de profundidade (para simular tecido mole), alinhados corretamente e em seguida scaneados, capturando sua imagem por absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) por meio de densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR, com software do próprio programa de versão especial para pequenos animais com alta resolução. Posteriormente, as imagens foram manualmente contornadas para obtenção dos valores de área ( $\text{cm}^2$ ), conteúdo mineral ósseo – CMO (g) e densidade mineral óssea areal –  $\text{DMO}_A$  ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ).



FIGURA 2: Densitômetro DPX-ALPHA LUNAR.

### 3.6 Ensaios biomecânicos

Os fêmures e tíbias do lado direito de todos os animais foram submetidos a ensaios mecânicos em máquina universal EMIC<sup>®</sup>, modelo DL 3000. A carga foi aplicada com velocidade de 2 mm/min e aplicação da força de 2000N para determinação da força máxima (N) e determinação posterior

da rigidez óssea (kN/m) e energia absorvida até a força máxima (mJ) calculados a partir da curva obtida no ensaio (TURNER; BURR, 1993). Os resultados foram registrados em sistema computacional pertencente ao próprio equipamento que fornece os valores de Força x Deformação. Para o cálculo da Rigidez determinou-se a parte da curva de Força x Deformação relativa à fase elástica do ensaio. A energia absorvida pelo osso é obtida pela área sob a curva força x deformação até o ponto de força máxima.

### *3.7.1 Flexão de três pontos do fêmur e da tíbia*

As tíbias e os fêmures foram apoiados em dois suportes (dois pontos) sendo a distância de vão de apoio de 20 mm (Figura 6). A força foi aplicada nos ossos em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios (ensaio de flexão em três pontos) (TURNER; BURR, 1993).



FIGURA 3: Ensaio mecânico de flexão de três pontos.

### *3.7.2 Colo femoral*

Para análise da força máxima, rigidez e energia na região do colo femoral, o fêmur foi colocado em aparato metálico adaptado e mantido fixado na vertical - longo eixo (Figura 7). A força de compressão foi aplicada na região da cabeça do fêmur cuja linha de ação do vetor força é paralela ao eixo longo do fêmur, causando momento fletor na região da cabeça e colo femoral (SHIRAZI-FAD et al., 2013).



FIGURA 4: Ensaio mecânico de compressão no colo femoral.

### 3.7 Dosagem de Cálcio e Fósforo pelas cinzas

Para análise da concentração de cálcio e fósforo nas cinzas, foi primeiramente aferido o peso dos ossos molhados (massa orgânica), posteriormente os ossos foram submetidos a 24 horas em estufa à 105 ° C até aferido o peso constante( peso seco) e submetidos a mufla à 800 ° C por 24 horas e só então foi encontrado o peso das cinzas. As cinzas dos ossos foram pesadas em balança de precisão, e diluídas em 800µL HCl e 700 µL NaOH. Subsequente a solução foi diluída em 1 :5, 100µl de amostra para 400 µL água. O teor de cálcio foi determinado pelo kit de cálcio Arsenazo III (Katal, Brasil), enquanto que o teor de fósforo foi determinado pelo kit U.V. Molibidato (Katal, Brasil). Os valores de absorbância foram dados pelo leitor de microplacas. O grau de mineralização foi estimado pela razão entre a massa de cinzas e massa óssea seca.

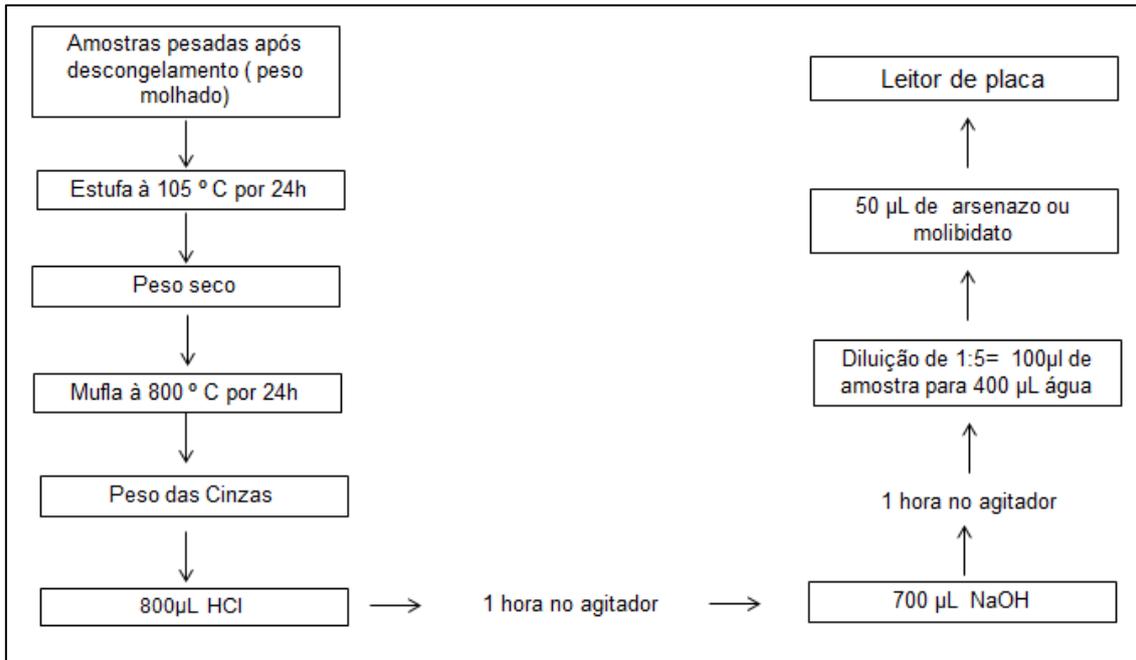


FIGURA 5: Diagrama esquemático da calcinação e dosagem de cálcio e fósforo

### 3.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram apresentados como média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 6.0. A normalidade dos dados foi analisada com o teste Kolmogorov-Smirnov . Para os contrastes das médias utilizou-se o teste t de Student não pareado sendo  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Os grupos foram comparados entre os gêneros, sendo grupo macho controle comparado com grupo macho suplementado, e grupo fêmea controle comparado com grupo fêmea suplementado.

## 4. Resultados

Com relação à massa corpórea e consumo de ração foi possível observar, o maior ganho de peso do grupo FS e o menos do MS. E o grupo que consumiu mais ração foi o FC. Foi também observado que os grupos que receberam o EHS consumiram uma menor quantidade de ração que os grupos controles. Esta alteração do consumo foi descrita e pode ser explicada pela elevada palatabilidade do EHS (SCLAFANI, 1984; NOVELLI,

2007). Os dados de massa corpórea e ingestão de ração e ingestão de EHS estão apresentados na tabela 1 e nas figuras 6,7 e 8.

**TABELA 1** - Média e erro padrão da média na massa corpórea e do consumo de ração semanal e consumo de EHS, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).

Grupos	MC	MS	p	FC	FS	p
<b>Massa corpórea (g) 1ª semana</b>	150,91±2,78	163,4±4,82	0,1006	148,74±2,57	152,41 ±2,37	0,3077
<b>Massa corpórea (g) 11ª semana</b>	348,55±2,03	306,6±2,65	<0,0001*	335,62±1,64	369,41 ±4,06	<0,0001*
<b>Consumo de ração semanal (g)</b>	144,91±11,8	80,96±4,36	<0,0001*	152,12±8,83	79,49 ±3,67	<0,0001*
<b>Consumo de EHS (ml)</b>		438,51±3,11			441,62 ±8,41	

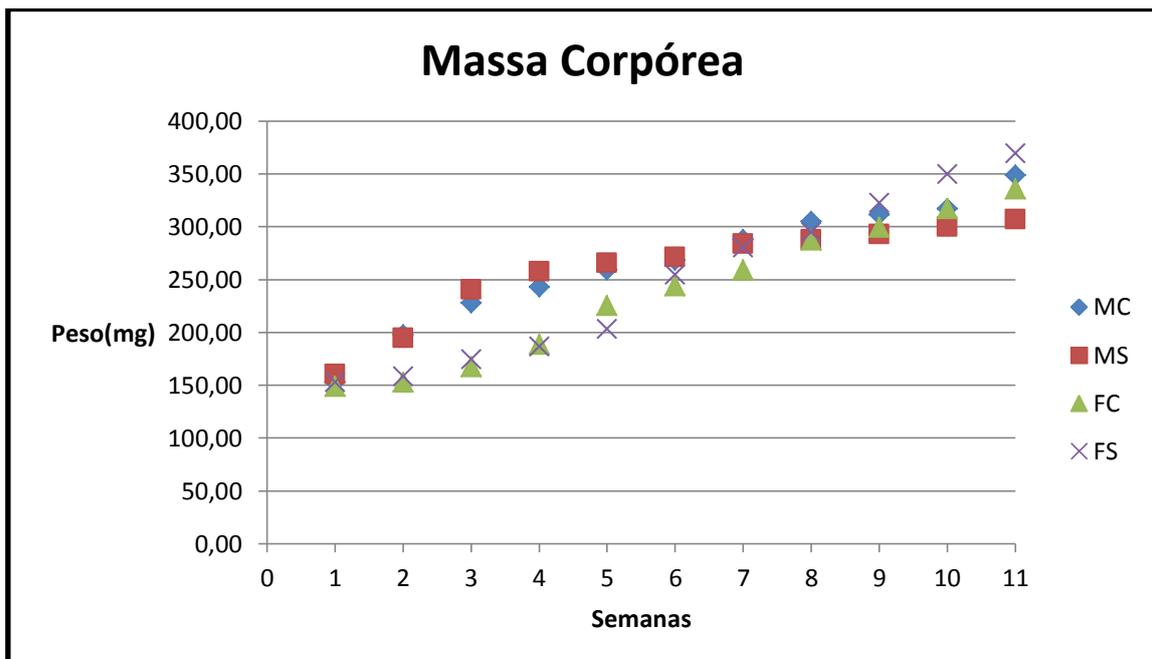


FIGURA 6: Gráfico do ganho de massa corpórea por semana dos grupos MC, MS, FC e FS.

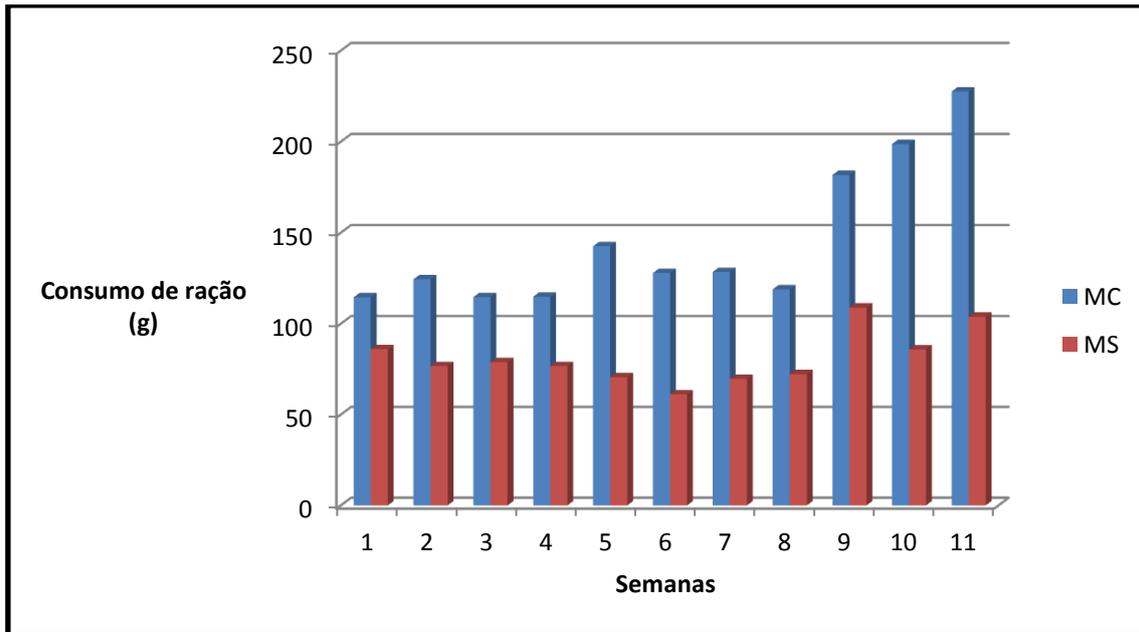


FIGURA 7: Gráfico do consumo de ração por semana dos grupos MC e MS.

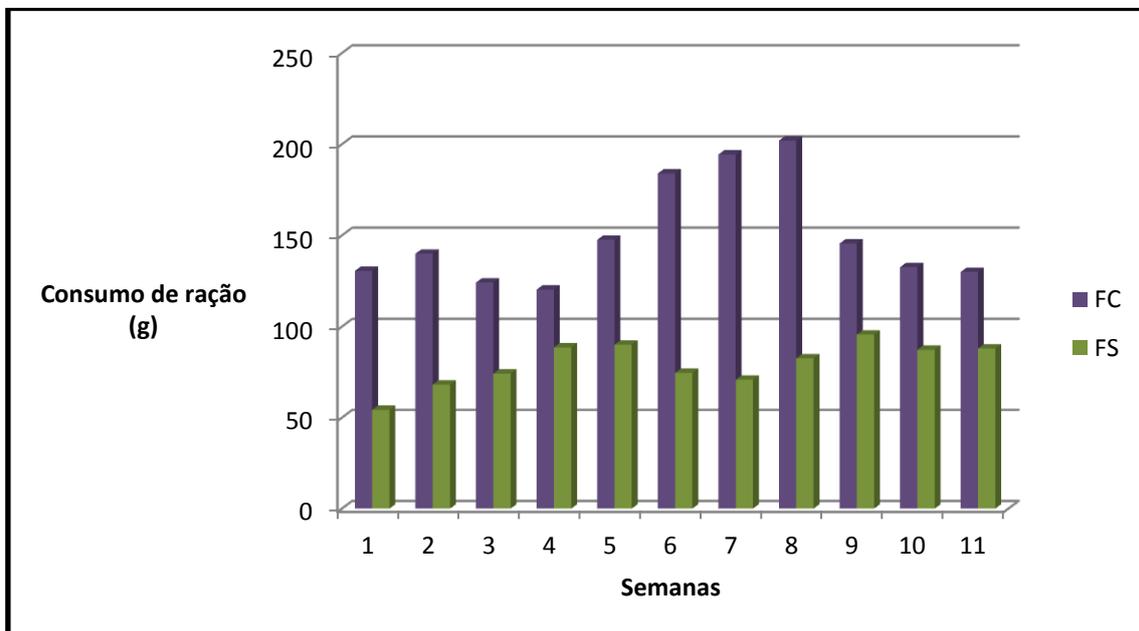


FIGURA 8: Gráfico do consumo de ração por semana dos grupos FC e FS.

Quando comparadas as variáveis CMO e área das tíbias e fêmures observaram-se que não ocorreu diferença significativa entre os grupos MC e MS, no entanto foi acusada diferença na variável DMO entre os grupos MC e MS. Já as análises de densitometria óssea entre os grupos FC e FS não diferiram. As variáveis biomecânicas advindas dos testes de flexão da tíbia, flexão da cabeça e terço médio

do fêmur, não apresentaram diferença estatística entre os grupos como o encontrado na densitometria óssea. As tíbias e os fêmures nas análises de força máxima, rigidez e energia, dos animais do Grupo MS não mostraram alteração significativa nas variáveis analisadas quando comparados ao grupo MC. Quando comparado os resultados dos grupos FC e FS também não encontramos diferença significativa. Os resultados estão apresentados na tabela 2 e na tabela 3, com média e erro padrão da média.

**TABELA 2** - Média e erro padrão da média das variáveis: densitometria óssea e ensaios biomecânicos dos fêmures, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).

Grupos	Fêmures			Fêmures		
	MC	MS	p	FC	FS	p
CMO (g)	0,3652 ±0,01	0,3276± 0,02	0,1261	0,295 ±0,01	0,287 ±0,01	0,6577
Área (cm <sup>2</sup> )	2,122 ±0,06	2,204 ±0,05	0,3264	1,653 ±0,03	1,713±0,031	0,2140
DMO <sub>A</sub> (g/cm <sup>2</sup> )	0,1716 ±0,01	0,1489 ±0,01	0,0097*	0,1785 ±0,01	0,1671±0,01	0,1892
Força máxima cabeça (N)	142,4 ±7,542	125,8 ±5,64	0,0946	106,9 ±6,128	117,5 ±4,232	0,1606
Rigidez cabeça (10 <sup>3</sup> kN/m)	262,4 ±24,6	318,6 ±14,50	0,0670	345,7 ±41,34	379,3 ±28,24	0,4982
Energia(mJ) cabeça	77,69 ±10,39	60,61 ± 6,379	0,1832	58,56 ±12,26	55,1 ±7,815	0,6750
Força máxima terço médio (N)	144,4 ±7,761	138,3 ±3,262	0,4728	101,9 ±3,527	113,4 ±4,396	0,0535
Rigidez terço médio (10 <sup>3</sup> kN/m)	264,7 ±13,73	268,3 ±12,66	0,8510	224,1 ±8,790	235,5 ±11,74	0,4468
Energia (mJ) terço médio	72,97 ±7,038	69,63 ±4,163	0,6883	41,69 ±3,480	47,85 ±2,763	0,1826

**TABELA 3** - Média e erro padrão da média das variáveis: densitometria óssea e ensaios biomecânicos das tíbias, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).

Grupos	Tíbias			Tíbias		
	MC	MS	p	FC	FS	p
<b>CMO (g)</b>	0,2502 ± 0,01	0,2129± 0,01	0,0602	0,2155± 0,01	0,2080 ± 0,01	0,6320
<b>Área (cm<sup>2</sup>)</b>	1,769 ±0,04	1,813 ±0,04	0,4955	1,462 ± 0,03	1,523 ± 0,03	0,2392
<b>DMOA (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0,1412 ± 0,01	0,1167± 0,01	0,0050*	0,1478 ± 0,01	0,1362± 0,01	0,2050
<b>Força máxima (N)</b>	73,01 ± 4,263	78,98 ± 2,850	0,2612	63,08 ± 2,249	68,96 ±4,359	0,2459
<b>Rigidez (10<sup>3</sup> kN/m)</b>	94,52 ±6,438	110,8 ±7,476	0,1182	113,7 ±6,922	122,1 ±11,5	0,9705
<b>Energia(mJ)</b>	35,28 ±2,636	32,45 ±1,848	0,3971	23,23 ±1,752	23,97 ±1,774	0,7679

**TABELA 4** - Média e erro padrão da média da densitometria óssea da região cortical de fêmures e tíbias, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).

Densitometria óssea Cortical	Fêmures			Fêmures		
	MC	MS	P	FC	FS	P
<b>CMO (g)</b>	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,6330	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,6024
<b>Área (cm<sup>2</sup>)</b>	0,83 ± 0,04	0,90 ± 0,03	0,1709	0,72 ± 0,01	0,76± 0,01	0,1494
<b>DMO<sub>A</sub> (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0,17 ± 0,004	0,15 ± 0,01	0,0187*	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,0974
	Tíbias			Tíbias		
<b>CMO (g)</b>	0,08 ± 0,003	0,07 ± 0,006	0,1253	0,07± 0,003	0,08 ± 0,005	0,3100
<b>Área (cm<sup>2</sup>)</b>	0,67 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,0576	0,63 ± 0,02	0,68 ± 0,01	0,0890
<b>DMO<sub>A</sub> (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0,13 ± 0,004	0,10 ± 0,007	0,0018*	0,12 ± 0,007	0,12± 0,01	0,9778

No presente trabalho, realizou-se a densitometria óssea do osso inteiro e também da região cortical. Os resultados obtidos no teste de densitometria óssea da região cortical dos ossos foram similares aos resultados dos ossos inteiros. Foi observado que nas variáveis Área e CMO não houve diferença significativa em nenhum dos grupos comparados. Quando comparado os grupos FC e FS a DMO não diferiu, porém na comparação entre os grupos MC e MS houve diferença significativa. Os resultados estão representados na tabela 4.

Na análise de dosagem de cálcio e fósforo pelas cinzas apenas os fêmures apresentaram uma diminuição na concentração de cálcio e fósforo em ratos machos suplementados quando comparados ao controle. Nas fêmeas não houve diferença em tíbias e fêmures. As dosagens de cálcio e fósforo a partir da calcinação estão apresentadas na tabela 5.

**TABELA 5** - Média e erro padrão da dosagem de cálcio e fósforo nas cinzas de fêmures e tíbias, peso seco e peso das cinzas, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).

Grupo	Fêmures			Fêmures		
	MC	MS	P	FC	FS	P
<b>Cálcio</b> (mg g <sup>-1</sup> cinzas)	0,252 ± 0,004	0,231 ± 0,007	0,0476*	0,255 ± 0,015	0,259 ± 0,008	0,6905
<b>Fósforo</b> (mg g <sup>-1</sup> cinzas)	0,128 ± 0,003	0,115 ± 0,002	0,0397*	0,110 ± 0,004	0,116 ± 0,003	0,2698
<b>Peso seco (g)</b>	0,763 ± 0,03	0,771 ± 0,02	0,8615	0,549 ± 0,01	0,591 ± 0,01	0,0721
<b>Cinzas (g)</b>	0,504 ± 0,02	0,515 ± 0,01	0,6792	0,371 ± 0,01	0,394 ± 0,01	0,1528
Grupo	Tíbias			Tíbias		
<b>Cálcio</b> (mg g <sup>-1</sup> cinzas)	0,250 ± 0,0158	0,231 ± 0,003	0,5350	0,259 ± 0,007	0,261 ± 0,005	0,5476
<b>Fósforo</b> (mg g <sup>-1</sup> cinzas)	0,114 ± 0,001	0,112 ± 0,002	0,4206	0,105 ± 0,003	0,114 ± 0,001	0,5952
<b>Peso seco (g)</b>	0,589 ± 0,02	0,606 ± 0,01	0,5845	0,447 ± 0,01	0,477 ± 0,01	0,1293
<b>Cinzas (g)</b>	0,375 ± 0,01	0,391 ± 0,01	0,3750	0,293 ± 0,01	0,307 ± 0,01	0,2352

## 5. Discussão

Os ratos, mesmo sendo quadrúpedes, dividem muitas similaridades com os humanos no que diz respeito ao comportamento de seu esqueleto. A formação rápida de ossos e a mineralização acontece durante os primeiros meses de vida, proporcionalmente igual aos humanos (MARDON et al., 2008). Em ratos Wistar, a construção de massa óssea acontece no primeiro ano de vida, a densidade mineral óssea e o pico de mineralização acontecem até os 12 meses de idade e a maioria dos valores estão atingidos na idade de 8 meses. Essa informação tem grande relevância, pois os ratos analisados começaram receber o tratamento com EHS no momento anterior à atingirem seu pico máximo de massa óssea, aos 4 meses de idade (SCHAPIRA et al., 1991).

Foi observado no presente estudo que o consumo de EHS afetou de forma significativa a densidade óssea de ratos machos, causando uma perda mineral no grupo suplementado. Resultado similar foi observado em outro estudo realizado em nosso laboratório, que utilizou ratos machos de 30 dias suplementados com EHS (OLIVEIRA et al., 2013). Os dados achados de Gaffney-Stomberg et al. (2014), afirmam que por ter uma estrutura semelhante ao estrógeno a isoflavona da soja acarretou perda de massa óssea de ratos machos orquiectomizados. Ratos machos expostos a isoflavonas não apresentaram efeitos benéficos para o fêmur e vértebra lombar dos animais, sugerindo que o efeito da exposição precoce a isoflavonas pode ser determinado pelo sexo (KALUDJEROVIC; WARD, 2009). Entretanto alguns estudos já realizados com soja em ratos machos apresentaram resultados contraditórios mostrando aumento na DMO em ratos machos (KALLIL et al., 2005; FUJOKA et al., 2007). Com tudo, a prole feminina quando exposta a isoflavonas da soja apresentaram maior densidade mineral óssea e melhor estrutura do fêmur e vértebras lombares (PIEKARZ; WARD, 2007). Pelo exposto concluímos que há escassez e discrepância em relação ao impacto da suplementação com isoflavonas no metabolismo ósseo de ratos machos. (CHIECHI et al., 2002; IKEDA et al., 2006; LAGARI; LEVIS, 2013; ).

A relação dos fitoestrogênios com saúde óssea da mulher é mais explorada e os resultados são mais consistentes. Os resultados encontrados em meta-análises que avaliaram estudos em ratas com deficiência de estrogênio são inconclusivos com uma tendência a ação positiva da soja (SHARIF et al., 2011; TAKU et al., 2010a, 2010b, 2011 ; LIU et al., 2009; WEI et al., 2012). Algumas linhas de pesquisas vêm apresentando resultados positivos das isoflavonas nas propriedades ósseas em ratos machos orquiectomizados (FANTI et al., 1998; ISHIMI et al., 2002; WU et al., 2003). A maioria das pesquisas compiladas em meta-análises utilizaram modelos de animais com deficiência de estrogênio. No presente estudo utilizamos um modelo diferente, que segue um indivíduo macho ou fêmea sem alterações hormonais. O uso de EHS não alterou na densidade mineral óssea das fêmeas. Efeito similar foi também observado da dieta rica em isoflavonas em ratos do sexo feminino do nascimento ou envelhecimento (MARDON et al., 2008). É muito controverso o impacto da soja e dos fitoestrogênios no metabolismo ósseo de indivíduos saudáveis. Ainda é incerto que a soja previna a osteopenia e fraturas.

As variáveis do ensaio mecânico fornecem informações sobre as propriedades ósseas dinâmicas (força máxima a ruptura, energia e rigidez) (TURNER; BURR, 1993). Ainda que o consumo de EHS tenha resultado em uma diminuição da DMO do osso todo (cortical e trabecular) no grupo MS, não houve alteração das propriedades biomecânicas dos fêmures e tíbias de ratos independente do gênero. Considerando esse resultado, foi aplicado a análise da densidade mineral óssea somente da região cortical. É importante ressaltar que os testes de força são realizados nos fêmures na região cortical (flexão de três pontos) e na região trabecular (cabeça de fêmur), porém nas tíbias os testes mecânicos são realizados apenas na região cortical do osso. Além disso, 80% do esqueleto é formado por osso cortical e 70% de toda perda óssea apendicular é no osso cortical (ZEBAZE et al., 2010). Entretanto os resultados encontrados na densitometria óssea da região cortical foram exatamente iguais aos resultados da densitometria dos ossos inteiros; o grupo MS teve a densidade mineral óssea diminuída na região cortical em fêmures e tíbias.

Quanto ao grau de mineralização, as tíbias não foram afetadas pelo consumo de EHS já os fêmures que apresentaram uma diminuição na concentração de cálcio e fósforo nas cinzas em ratos machos suplementados quando comparados ao controle. A soja interferiu negativamente na mineralização de fêmures dos animais machos suplementos.

Várias organizações fazem recomendações sobre a ingestão de soja e seus efeitos sobre a saúde óssea. A “US National Institutes of Health”, a “North American Menopause Society” e a “Belgian Bone Club” afirmaram que estudos sobre a soja não são conclusivos, impedindo quaisquer recomendações no que diz respeito a sua utilização para a saúde dos ossos. A “Association of Clinical Endocrinologists” não recomenda o uso de produtos à base de soja a mulheres com histórico familiar de doença cardiovascular e câncer hormônio dependente.

A densidade óssea é o principal determinante da resistência mecânica do osso e do risco de fraturas (RIGGS; MELTON, 2006). Outros fatores como exposição a traumas, qualidade e geometria óssea são também importantes (CUMMINGS et al., 1993). A qualidade óssea é responsável por cerca de 30 a 50% da resistência mecânica do osso. Por esse motivo, verifica-se em idosos uma redução maior da resistência óssea que a esperada pela simples perda de densidade óssea, pois a perda de volume ósseo observada com a idade é acompanhada por mudanças estruturais que também diminuem a resistência óssea (PARK et al., 2015; KRUGER et al., 2013; MOSEKILDE et al., 1987).

Apesar do grupo MS não apresentar alterações biomecânicas, devemos nos alertar que as análises foram realizadas após 11 semanas de suplementação com soja e por se tratar de ratos machos jovens saudáveis, a suplementação de 11 semanas não foi suficiente para alterar as propriedades biomecânicas e sim somente a densidade mineral óssea. Ou seja, não se sabe se estender o tempo de suplementação a soja seja talvez capaz de alterar também as propriedades biomecânicas. Embora levando em consideração que baixo DMO esteja associado com aumento do risco de fratura em humanos (SCUITS et al., 2004). Pode-se dizer que os ratos

machos que usaram suplementação de soja tiveram sua qualidade óssea afetada.

## **6. Conclusão**

O consumo de EHS provocou diminuição significativa dos valores das propriedades ósseas de ratos adultos jovens machos, como a densidade. Além disso, observou-se que o consumo de EHS não alterou propriedades mecânicas independente do gênero de ratos adultos jovens. O consumo de EHS não alterou as propriedades ósseas de ratas fêmeas jovens adultas, confirmando assim nossa hipótese.

## 7. Referências

- BABER, R. Phytoestrogens and post reproductive health. **Maturitas**, v.66, n.4, p.344-349, 2010.
- CEDERROTH, C.R. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.304, n.1/2, p.30-42, 2009.
- CHIECHI, L.M.; SECRETO, G.; D'AMORE, M.; VENTURELLI, E.; CANTATORE, F.; VALERIO, T.; LASELVA, G.; LOIZZI, P. Efficacy of a soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial. **Maturitas**, v.42, n.4, p. 295-300, 2002.
- CHRISCHILLES, E.A.; BUTLER, C.D; DAVIS, C.S.; WALLACE, R.B. A model of lifetime osteoporosis impact. **Arch. Intern. Med.** v.15, n.10, p.2026-2032, 1991.
- CONSENSUS development conference: Prophylaxis and treatment of osteoporosis. **Am J Med**, v.90, n.1, p.107-110, 1991.
- COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their- glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem*, v. 41, n.11, p.1961–1967, 1993.
- CUMMINGS, S.R.; BROWNER. D.M.; BLACK, D.M.; STONE, K.; ENSRUD, K.; CAULEY, J.; NEVITT, M.C. Risk factors for hip fracture: New Findings new questions. In: CHRISTIANSEN, C.; RIIS BR, Eds. **Proceedings from the Fourth the International Symposium on Osteoporosis**, Hong Kong, 1993. p.73-74.
- DELIZA R.; SERNA SALDIVAR, S.; GERMANI, R.; BENASSI, V.T.; CABRAL, L.C. The effects of colored textured soybean protein (TSP) on sensory and physical attributes of ground beef patties. **Journal of Sensory Studies**, v. 17, n. 2, p. 121-132, 2002.
- FALONI, A.P.S.; CERRI, O.S. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. **Rev. Odontol. UNESP**, v.36, n.2, p.181-88, 2007.
- FANTI, P. et al. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-termovariectomizedrats. **Osteoporos Int**, v.8, n.3, p.274–281, 1998.
- FELDSTEIN, A.C.; NICHOLS, G.; ORWOLL, E.; ELMER, P.J., SMITH, D.H.; HERSON, M. The near absence of osteoporosis treatment in older men with fractures. **Osteoporos Int.**, v.16, n.8,p.953-962, 2005.
- FUJIOKA, M. et al. Differential effects of isoflavones on bone formation in growing male and female mice. **Metabolism.**, v.56, n.8,p.1142-1148, 2007.

GAFFNEY-STOMBERG, E.; CAO, J.J.; LIN, G.G.; WULFF, C.R.; MURPHY, N.E.; YOUNG, A.J.; MCCLUNG, J.P.; PASIAKOS, S.M. Dietary protein level and source differentially affect bone metabolism, strength, and intestinal calcium transporter expression during ad libitum and food-restricted conditions in male rats. **J. Nutr.**, v.144, n.6, p.821-829, 2014.

GENNARI, C.; SEEMAN, E. The first international conference on osteoporosis in Men Siena, Italy, February 23-25, 2001. **Calcif. Tissue Int.**, v.69, n.4, p.177-178, 2001

HEANEY, R.P.; DOWELL, M.S.; RAFFERTY, K.; BIERMAN, J. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, n.5, p. 1166-1169, 2000.

HONKANEN, R.; PULKKINEN, P.; JARVINEN, R.; KROGER, H.; LINDSTEDT, K.; TUPPURAINEN, M.; UUSITUPA, M. Does lactose intolerance predispose to low bone density? A population-based study of perimenopausal Finnish women. **Bone** v.19, n.1, p. 23–8, 1996.

IKEDA, Y.; IKI, M.; MORITA, A.; KAJITA, E.; KAGAMIMORI, S.; KAGAWA, Y.; YONESHIMA, H. Intake of fermented soybeans, Natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese population-based osteoporosis study. **J. Nutr.**, v.136, n.5, p.1323-1328, 2006.

ISHIMI Y. et al. Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. **Bone**, v. 31, n.1, p.180–185, 2002.

KALIL, D.A.; LUCAS, E.A. Soy isoflavones may protect against orchidectomy-Induced bone loss in aged male rats. **Calcif. Tissue Int.**, v.76,n.1,p. 56-62, 2005.

KALUDJEROVIC, J.; WARD, W.E. Neonatal exposure to daidzein, genistein, or the combination modulates bone development in female CD-1 mice. **J. Nutr.**, v.139, n,3, p. 467-473, 2009.

KAWAMOTO, S.; EJIRI, S.; NAGAOKA, E.; OZAWA, H. Effects of estrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. **Arch. Oral Biol.**, v.47, n.1, p.67-73, 2002.

KIEBZAK, G.M.; BIENART, G.A.; PERSER, K.; AMBROSE, C. G.; SIFF, S. J.; HEGGENESS, M.H. Undertreatment of osteoporosis in men with hip fracture. **Arch. Intern. Med.**, v.162, n.19, p.2217-2222, 2002.

KREIJKAMP-KASPERS, S.; KOK, L.; GROBBEE, D.E.; HAAN, E.H.; ALEMAN, A.; LAMPE, J.W.; VAN DER SCHOUW, Y.T. Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **J. Am. Med. Assoc.**, v.292, n.1, p.65-74, 2004.

KROEZE, J.H.A. The perception of complex taste stimuli. In: MCBRIDE, R.L.; MASCFIE, H.J.H(Eds). **Psychological basis of sensory evaluation**, London: Elsevier Applied Science, 1990.p.41-68.

KRUGER M.C.; TODD J.M.; SCHOLLUM L.M.; KUHN-SHERLOCK B.; MCLEAN D.W.; WYLIE K. Bone health comparison in seven Asian countries using calcaneal ultrasound. **BMC Musculoskelet Disord**.14-81, 2013.

KULL, M.; KALLIKORM, R.; LEMBER, M. Impact of molecularly defined hypolactasia, self-perceived milk intolerance and milk consumption on bone mineral density in a population sample in Northern Europe. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.44, n.4, p. 415-421, 2009.

KURZER, M. S.; XIA, X. Dietary phytoestrogens. **Ann. Rev. Nutr.**, v.17, p. 353-381, 1997.

LAGARI, V.S.; LEVIS, S. Phytoestrogens in the prevention of postmenopausal bone loss. **J. Clin. Densit.**, v.16, n.4, p. 445-449, 2013.

LANZILLOTTI, H.S.; LANZILLOTTI, R.S.; TROTTE, A.P.R.; DIAS, A.S.; BORNAND, B. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. **Rev. Nutr.**, v.16, n.2,p.181-193, 2003.

LE L.T.; SABATÉ J. Beyond Meatless, the Health Effects of Vegan Diets: Findings from the Adventist Cohorts. **Nutrients**. v.6, n.6,p.2131-2147, 2014.

LIU, J.; HO, S.C.; SU, Y.X.; CHEN, W.Q.; ZHANG, C.X.; CHEN, Y.M. Effect of long-term intervention of soy isoflavones on bone mineral density in women: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Bone**, v. 44, n.5, p.948–953, 2009.

MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr. Rev.** v.21, n.2, p.115-137, 2000.

MARDON, J.; MATHEY, J.; KATI-COULIBALY, S.; PUEL, C.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; HORCAJADA, M.N.; COXAM, V. Influence of lifelong soy isoflavones consumption on bone mass in the Rat. **Exp. Biol. Med.**, v.233, n.2, p. 229-237, 2008.

MEI, J.; YEUNG, S.S.; KUNG, A.W. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, n.11 p. 5217-5221, 2001.

MORAES, L.F.S.; SILVA, E. N.; SILVA, D. A. S.; PAULA, A. P. Gastos com o tratamento da osteoporose em idosos do Brasil (2008 - 2010): análise dos fatores associados. **Rev. bras. epidemiol.**, v. 17, n. 3, p. 719-734, 2014.

MOSEKILDE, L.I.; MOSEKILDE, L.E.; DANIELSEN, C.C. Biochemical competence of vertebral trabecular bone in relation to ash density and age in normal individuals. **Bone**, v. 8, n.2, p.79-85, 1987.

NGUYEN, T.V.; EISMAN, J.A.; KELLY, P.J.; SAMBROOK, P.N. Risk factors for osteoporotic fractures in elderly men. **Am. J. Epidemiol.**, v.144, n.3, p.255-263, 1996.

NIKANDER, E.; METSÄ-HEIKKILÄ, M.; YLIKORKALA, O.; TIITINEN, A. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.89, n.3 p. 1207-1212, 2004.

NOVELLI, M.; D'ALEO, V.; LUPI, R.; PAOLINI, M.; SOLETI, A.; MARCHETTI, P.; MASIELLO, P. Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a nonobese mouse diabetes model. **Pancreas**, v.35, n.4, p. e10-17, 2007.

OBERMAYER-PIETSCH, B.M.; BONELLI, C. M.; WALTER, D. E.; KUHN, R. J.; FAHRLEITNER-PAMMER, A.; BERGHOLD, A.; GOESSLER, W.; STEPAN, V.; DOBNIG, H.; LEB, G.; RENNER, W. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. **J. Bone Miner. Res.**, v.19, n.1, p. 42–7, 2004.

OLIVEIRA, B.R.S.M.; COELHO, J.C.A.; LOUZADA, M.J.Q. Consumo excessivo de leite de soja afeta o desenvolvimento ósseo. **Braz. Arch. Endocrinol. Metabol**, v.57, supl.7 ,p.S514, 2013

PARK, K.A.; PARK, Y.H.; SUH, M.H.; CHOI-KWON, S. Lifestyle and Genetic Predictors of Stiffness Index in Community-dwelling Elderly Korean Men and Women. **Asian Nurs. Res.**, v.9, n.3 p. 251-258, 2015.

PATISAUL, H.B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. **Frontiers in neuroendocrinology**, v.31, n.4, p.400–419, 2010.

PIEKARZ, A.V.; WARD, W.E. Effect of neonatal exposure to genistein on bonemetabolism in mice at adulthood. **Pediatr. Res.**, v.61, n.1, p. 48-53, 2007.

PINHEIRO, M.M.; CICONELLI, R.M.; FERRAZ, M.B. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Osteoporos. Int.**, v.20, n.3, p. 399-408, 2009.

PORRO, C.B. This month in the Scandinavian Journal of Gastroenterology. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 44, n.4, p.388-389, 2009.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. Population-based analysis of the relationship of whole bone strength indices and fall-related loads to age- and sex-specific patterns of hip and wrist fractures. **J Bone Miner Res.**, v.21, p.315-23, 2006.

SCHUIT, S.C.; VAN DER KIFT, M.; WEEL, A.E.; DE LAET, C.E.; BURGER, H.; SEEMAN, E.; HOFMAN, A.; UITTERLINDEN, A.G.; VAN LEEUWEN, J.P.; POLS, H.A. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. **Bone**, v.34, n.1, p.195-202, 2004.

SCLAFANI, A.; XENAKIS, S. Sucrose and polysaccharide induced obesity in the rat. **Physiol. Behav.**, v.32, n.2, p. 169-174, 1984.

SETCHELL, K.D.R.; ADLERCREUTZ, H. Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: ROWLAND, I.R. (Ed) **Role of the gut flora intoxicity and cancer**. London: Academic Press, 1988.p.315-345.

SHARIF, P.S.; KIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. Prevention of bone resorption by intake of phytoestrogens in postmenopausal women: a meta-analysis. **Age**, v.33, n.3, p.421–431, 2011.

SHIRAZI-FAD, Y.; KUPKE, J.S.; BLOOMFIELD, S.A.; HOGAN, H.A. Discordant recovery of bone mass and mechanical properties during prolonged recovery from disuse. **Bone**, v.52, n.1, p. 433-443, 2013.

TAKU, K.; MELBY, M.K.; NISCHI, N.; OMORID, T.; KURZERE, M.S. Soy isoflavones for osteoporosis: An evidence-based approach. **Maturitas**, v.70, n.4, p.333–338, 2011.

TAKU, K.; MELBY, M.K.; TAKEBAYASHI, J.; MIZUNO, S. Effect of soy isoflavone extract supplements on bone mineral density in menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v.19, n.1, p. 33-42, 2010.

TAKU, K.; MELBY, M.K.; TAKEBAYASHI, J.; 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**, v.47, n.2, p.413–423, 2010.

TEEGARDEN, D.; PROULX, W.R.; MARTIN, B.R.; XHAO, J.; MCCABE, G.P.; LYLE, R.M.; PEACOCK, M.S. Peak bone mass in young women. **J. Bone Miner. Res.**, v.10, n.5, p.711-715, 1995.

TURNER, C.H.; BURR, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v.14, n.4, p.595-608, 1993.

WEI, P.; LIU, M.; CHEN, Y.; CHEN, D. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v.5, n.3, p.243-248, 2012.

WU, J. et al. Combined intervention of exercise and genistein prevented androgen deficiency-induced bone loss in mice. **J Appl. Physiol.**, v.94, n.1, p.335–342, 2003.

YAZBEK, M. A.; MARQUES NETO, J. F. M. Osteoporose e outras doenças osteometabólicas no idoso. **Einstein**, v. 6, supl.1, p.S74-S78, 2008.

ZEBAZE, R.M.; GHASEM-KADEH, A.; BOHTE, A.; ILULIANO-BURNS, S.; MIRAMS, M.; PRICE, R.I. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. **Lancet**, v.375, n.9727, p.1729-1736, 2010.

ZHAO, E.; MU, Q. . Phytoestrogen Biological Actions on Mammalian Reproductive System and Cancer Growth. **Sci. Pharm.**, v.79, n.1,p.1-20, 2011.

## 8. Anexos

**ANEXO A** - Informações nutricionais da ração

<b>Informações nutricionais</b>	
Magnésio	0,006 mg
Ferro	180 mg
Cobre	30 mg
Zinco	110 mg
Manganês	110 mg
Iodo	1 mg
Selênio	0,2 mg
Cobalto	2 mg
Vitamina A	25.577 UI
Vitamina D3	4.000 UI
Vitamina E	82 mg
Vitamina K	6,40 mg
Ácido Fólico	13 mg
Biotina	0.16 mg
Colina	2.800 mg
Niacina	220 mg
Pantotenato de cálcio	90 mg
Tiamina	11 mg
Riboflavina	12 mg
Piridoxina	vit. B6 HCl
Antioxidante	200 mg
Ácido propiônico	1.486 mg
Carboidratos	55%
Umidade máxima	13%
Proteína bruta (min.)	23%
Extrato etéreo (min.)	4%
Matéria fibrosa (max.)	7%
Matéria mineral (max.)	10%
Cálcio (min.)	1,20%
Cálcio (máx.)	1,30%
Fósforo (min.)	0,85%

Fonte: Fornecidas pelo fabricante, Nutrimentos Presence®, via email.

**ANEXO B** - Informações nutricionais do extrato hidrossolúvel de soja

<b>Informações nutricionais</b>		
Porção de 200 ml (1copo)		%VD*
	77 kcal - 323	
Valor energético	KJ	4%
Carboidratos, dos quais:	7,4 g	3%
Lactose	0 g	**
Açúcares	6,5 g	**
Proteínas	5,1 g	7%
Gorduras totais, das quais:	3 g	6%
Gorduras saturadas	0,4 g	2%
Gorduras trans	0 g	**
Gorduras monoinsaturadas	0,8 g	**
Gorduras poliinsaturadas	1,8 g	**
Colesterol	0 mg	**
Fibra alimentar	0,7 g	3%
Sódio	190 mg	8%
Cálcio	240 mg	24%
Zinco	1,1 mg	15%
Vitamina C	6,8 mg	15%
Vitamina E	1,5 mg	15%
Vitamina B <sub>6</sub>	0,20 mg	15%
Vitamina A	90 µm	15%
Ácido fólico	36 µm	15%
Vitamina D	2,0 µm	40%
Vitamina B <sub>12</sub>	1,0 µm	40%
Vitamina B <sub>2</sub>	0,20 mg	40%

Fonte: Site do fabricante,  
<http://www.ades.com.br/produtos/detalhe/645217/ades-original-11>