



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

THAÍS AGUIAR SANTOS

**EFEITOS DE *Limosilactobacillus reuteri* ASSOCIADO À VITAMINA
K2 EM CAMUNDONGOS OVARIECTOMIZADOS**

2023

THAÍS AGUIAR SANTOS

**EFEITOS DE *Limosilactobacillus reuteri* ASSOCIADO À VITAMINA K2 EM
CAMUNDONGOS OVARIECTOMIZADOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e reparação tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Thaís Aguiar

Efeitos de *Limosilactobacillus reuteri* associado à vitamina K2 em camundongos ovariectomizados / Thaís Aguiar Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
63 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.
Orientadora: Ana Lia Anbinder.

1. Osteoporose. 2. Osteopenia. 3. *Limosilactobacillus reuteri*. 4. Vitamina K. I. Anbinder, Ana Lia, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Assoc. Marinella Holzhausen Caldeira

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia

Campus São Paulo

Profa. Assoc. Roberta Okamoto

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Odontologia

Campus Araçatuba

Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Dra. Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Faculdade de Ciências da Saúde

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 09 de maio de 2023.

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, as pessoas mais gentis que conheci, por me fazerem acreditar que sou capaz!

AGRADECIMENTOS

À Unesp - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, meu obrigado por me proporcionar momentos únicos e pela acolhida durante esses anos.

A todos os meus familiares, por sempre me apoiarem e acreditarem nos meus sonhos. Aos meus pais, Edmara Aparecida e Aldo Luciano, ao meu irmão Rodrigo Aguiar, e ao meu companheiro Rodrigo Moura, pelos carinhosos incentivos, companheirismo e compreensão, que me estimularam a ultrapassar todos os obstáculos que apareceram ao longo do caminho. Aos meus avós, pelos valiosos ensinamentos que recebi ao longo da vida.

À minha orientadora Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder, pela disponibilidade, por todo o aprendizado e pelas inúmeras discussões científicas. Obrigada por ter caminhado comigo nesta difícil jornada.

À Biogaia®, pelo financiamento de parte dessa pesquisa e por gentilmente ceder a cepa de *L. reuteri* utilizada neste estudo. Obrigada por nos permitir contribuir um pouco mais para esse mundo incrível dos probióticos.

À Kappa Bioscience®, pela gentileza em ceder a vitamina K2 utilizada neste estudo, fundamental para a realização do mesmo. Obrigada por confiar em nosso trabalho.

À Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira, por abrir novamente as portas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, por confiar nas minhas capacidades, por todo o seu respeito, carinho e dedicação.

Aos amigos que a Patologia e a Microbiologia me deram, pelo convívio e por todo o conhecimento compartilhado. Certamente crescemos juntos nessa jornada. À Jaqueline Lemos, Maíra Terra e Renata Mendonça, pela amizade, companheirismo, incentivos e momentos de descontração. Vocês fizeram a jornada ser mais leve, prazerosa e divertida!

À aluna de Iniciação Científica, Luísa Souza Battistelli, pelo empenho e dedicação na realização dessa pesquisa e pela nossa amizade.

Aos Professores da banca, pelo aceite do convite, pelo tempo dedicado a este momento e pelo empenho em contribuir para este trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pelo apoio, disponibilidade e dedicação em compartilhar conhecimento.

“Um dia” ou “dia um”. Você decide!

Paulo Coelho

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Estudo <i>in vivo</i> - Animais e delineamento experimental	22
3.1.1 Controle de alimentação e peso.....	24
3.1.2 Ovariectomia e cirurgia <i>sham</i>	24
3.1.3 <i>L. reuteri</i>	25
3.1.4 Vitamina K2	25
3.1.5 Eutanásia, descarte das carcaças e cegamento.....	26
3.1.6 Teste de flexão em 3 pontos.....	27
3.1.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	30
3.1.8 Microtomografia Computadorizada	30
3.1.9 Análise histológica e histomorfométrica do intestino	31
3.1.10 Expressão gênica de proteínas de adesão celular no íleo	32
3.2 Estudo <i>in vitro</i> – Associação de MK-7 na cultura de <i>L. reuteri</i>	33
3.3 Análise estatística	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Estudo <i>in vivo</i>	35
4.1.1 Peso dos animais	35
4.1.2 Peso do útero após ovariectomia	36
4.1.3 Teste de flexão em 3 pontos.....	37
4.1.3.1 Propriedades extrínsecas	37

4.1.3.2 Propriedades intrínsecas.....	39
4.1.4 Níveis séricos de osteocalcina carboxilada e não carboxilada.....	39
4.1.5 Microtomografia computadorizada.....	40
4.1.6 Expressão gênica de proteínas de adesão celular no íleo	43
4.1.7 Análise histológica e histomorfométrica do intestino	43
4.2 Estudo <i>in vitro</i>	45
4.2.1 Efeitos de MK-7 na biomassa de <i>L. reuteri</i>	45
4.2.2 Efeitos de MK-7 na contagem de UFC/ml	46
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO.....	63

Santos TA. Efeitos de *Limosilactobacillus reuteri* associado à vitamina K2 em camundongos ovariectomizados [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

RESUMO

A osteoporose é uma doença osteometabólica, caracterizada pelo desequilíbrio entre deposição e reabsorção óssea. Probióticos e vitamina K2 (MK-7) têm recebido atenção como terapia para a osteoporose, isoladamente. A associação de probióticos com a vitamina K é interessante, visto que suas vias benéficas possivelmente estão interligadas, podendo apresentar efeitos sinérgicos. Neste estudo, foram avaliados os efeitos de *Limosilactobacillus reuteri* associado à vitamina K2 (MK-7) na perda óssea induzida por ovariectomia em camundongos e no crescimento bacteriano, *in vitro*. No estudo *in vivo*, os animais foram distribuídos em cinco grupos: falsa OVX (controle); ovariectomia (OVX); OVX + *L. reuteri* (LR); OVX + vitamina K2 (K); OVX + LR + K. Após 4 semanas de tratamento, avaliaram-se as propriedades biomecânicas de fêmur, microarquitetura vertebral (L5), níveis de osteocalcina carboxilada e não carboxilada, expressão gênica de *Ocludina*, *Jam3*, e altura de vilos e criptas intestinais. O tratamento com *L. reuteri*, MK-7, assim como a sua associação, melhoraram significativamente as propriedades biomecânicas do fêmur, deterioradas pela OVX, mas não houve diferença nos níveis séricos de osteocalcina, expressão gênica ou relação vilo/cripta; indicando que a melhora nas propriedades biomecânicas não está associada à osteocalcina e que a perda óssea não se relacionou com alterações intestinais. *L. reuteri*, assim como a associação com MK-7, restauraram os valores de microarquitetura vertebral ao nível de SHAM, porém sem diferença para o grupo OVX. O crescimento microbiano *in vitro* foi avaliado associando-se *L. reuteri* à vitamina K2. Após os períodos de interações, foram realizadas espectrofotometrias das soluções, e as bactérias cultivadas em ágar MRS para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml). Houve aumento significativo da densidade óptica e de células viáveis após 4h de interação. *L. reuteri* e a associação com MK-7 melhoraram as propriedades biomecânicas de fêmures e mostraram tendência positiva na microarquitetura vertebral. O benefício da associação pode possivelmente estar relacionado à maior quantidade de *L. reuteri* que alcançou o intestino, por utilizar a vitamina para seu crescimento.

Palavras-chave: Osteoporose. Osteopenia. *Limosilactobacillus reuteri*. Vitamina K.

Santos TA. *Effects of Limosilactobacillus reuteri associated with vitamin K2 in ovariectomized mice [doctorate thesis].* São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

ABSTRACT

Osteoporosis is an osteometabolic disease, characterized by an imbalance between bone deposition and resorption. Probiotics and vitamin K2 (MK-7) have received attention as therapies for osteoporosis, independently. It is interesting to consider the association of probiotics with vitamin K, as their beneficial pathways could be interconnected, potentially resulting in synergistic effects. In this study, the effects of Limosilactobacillus reuteri associated with vitamin K2 (MK-7) on ovariectomy-induced bone loss in mice and bacterial growth *in vitro* were evaluated. In the *in vivo* study, animals were divided into five groups: sham-operated (control); ovariectomy (OVX); OVX + L. reuteri (LR); OVX + vitamin K2 (K); OVX + LR + K. After 4 weeks of treatment, the biomechanical properties of the femur, vertebral microarchitecture (L5), levels of carboxylated and non-carboxylated osteocalcin, gene expression of Occludin, Jam3, and intestinal villi and crypt heights were evaluated. Treatment with L. reuteri, MK-7, as well as their combination, significantly improved the biomechanical properties of the femur, which were deteriorated by OVX, but there was no difference in serum levels of osteocalcin, gene expression, or villi/crypt ratio, indicating that the improvement in biomechanical properties is not associated with osteocalcin and that bone loss is not related to intestinal changes. L. reuteri, as well as the combination with MK-7, restored vertebral microarchitecture values to the SHAM level, but without difference for the OVX group. Microbial growth *in vitro* was evaluated by combining L. reuteri with vitamin K2. After the interaction periods, optical density of the solutions was spectrophotometrically measured, and bacteria were cultured on MRS agar for colony-forming unit (CFU/ml) counting. There was a significant increase in optical density and viable cells after 4 hours of interaction. L. reuteri and the combination with MK-7 improved the biomechanical properties of femurs and showed a positive trend in vertebral microarchitecture. The benefit of the combination may be related to the greater amount of L. reuteri that reached the intestine by using the vitamin for its growth.

Keywords: Osteoporosis. Osteopenia. Limosilactobacillus reuteri. Vitamin K.

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença osteometabólica caracterizada pela redução da densidade mineral e degradação da microarquitetura óssea, levando ao comprometimento da resistência desse tecido, aumentando a predisposição dos indivíduos a fraturas (NIH Consensus Development Panel, 2001). É descrita como uma doença silenciosa, raramente apresentando sinais e sintomas até que ocorra de fato a fratura (Cosman et al., 2014).

Os fatores de risco para desenvolvimento dessa doença são inúmeros, entre eles, idade, consumo excessivo de álcool, deficiência de vitamina D, baixa ingestão de cálcio, doenças genéticas como a fibrose cística, doenças gastrointestinais, e principalmente deficiência de hormônios sexuais, como observado após a menopausa (Cosman et al., 2014; Sözen et al., 2017).

A osteoporose é uma doença que apresenta alta prevalência, gerando altos custos de saúde pública. No Brasil, estima-se que a prevalência da osteoporose em mulheres varie de 15 a 33%, na faixa etária entre 40 a 75 anos (Baccaro et al., 2015). Já nos Estados Unidos, estima-se que 54% da população acima de 50 anos apresente osteoporose ou diminuição da massa óssea (Wright et al., 2014). Até o ano de 2025, calcula-se que haverá um aumento das fraturas relacionadas à osteoporose de aproximadamente 50%, representando um aumento de custos próximo de 25,3 bilhões de dólares por ano, totalizando cerca de 228 bilhões de dólares, somente nos Estados Unidos (Burge et al., 2007).

O osso é um órgão dinâmico, sendo a sua saúde mantida através do processo de remodelação óssea, onde ocorre deposição de matriz pelos osteoblastos e reabsorção pelos osteoclastos. Quando este equilíbrio é alterado, levando a uma maior reabsorção do que deposição de matriz, ocorre a perda óssea, como vista na osteoporose (Cosman et al., 2014). Estão envolvidos na regulação deste processo, além dos osteoblastos e osteoclastos, osteócitos, células do sistema imune, como linfócitos T, hormônios (Raggatt, Partridge, 2010), sistema nervoso (Elefteriou et al., 2014) e o trato gastrointestinal, importante na manutenção da homeostase do cálcio (Keller, Schinke, 2013) e na síntese de incretinas, hormônios associados ao

metabolismo da glicose e à regulação da massa óssea e de sua microarquitetura (Mabilleau, 2017).

Classificada como osteoporose primária, a osteoporose pós-menopáusica relacionada à deficiência de estrogênio (Rossini et al., 2016) é o tipo frequentemente encontrado em mulheres acima de 40 anos (Baccaro et al., 2015).

Atualmente, diversos fármacos são utilizados no tratamento da osteoporose, como os bisfosfonatos, teriparatida e denosumab. Entretanto, podem apresentar efeitos adversos como irritação e refluxo gastroesofágico, dor muscular severa, náuseas, tonturas, dores de cabeça, febre e eczema (Adler, Gill, 2011; Arden et al., 2006; Gagliardi et al., 2022; Kennel, Drake, 2009). Os bisfosfonatos são considerados a primeira linha no tratamento da osteoporose pós-menopáusica (Tu et al., 2018). Apesar disso há uma preocupação crescente com a sua prescrição, visto a ocorrência de uma complicação incomum, porém de importante severidade, a osteonecrose mandibular (Tu et al., 2018). A terapia de reposição hormonal se popularizou na década de 60 para diminuição de vários sintomas relacionados à menopausa, assim como para a redução do risco de fraturas associado à osteoporose pós-menopáusica (Lobo, 2017). Entretanto, a administração de hormônios sexuais como forma de terapia também não está isenta de riscos e efeitos colaterais, como náusea, câibras nos membros inferiores, depressão, além do aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama, acidente vascular encefálico, tromboembolismo e demência (Fait, 2019; Thaung et al., 2018). Muitas vezes, os riscos associados à terapia de reposição hormonal para mulheres acima de 60 anos excedem os seus benefícios (Thaung et al., 2018). Portanto, os tratamentos farmacológicos para a osteoporose pós-menopáusica devem ser prescritos de forma individualizada, levando em consideração o grau da perda óssea, idade do paciente, existência de doenças preexistentes, dose e tempo de tratamento, avaliando a relação risco-benefício (Tu et al., 2018). Sendo assim, tratamentos não farmacológicos e não hormonais são alternativas interessantes que devem ser investigadas quanto aos seus benefícios para a saúde óssea de mulheres após a menopausa.

A suplementação com vitamina K também têm um papel importante na manutenção do metabolismo ósseo na osteoporose pós-menopáusica. Em sua forma natural, a vitamina K é classificada em relação a sua forma molecular em: filaquinona (vitamina K1) e menaquinona (vitamina K2). A família das menaquinonas, MK-n, é

dividida em subtipos, onde o “n” representa o número de resíduos isoprenoides na cadeia lateral; sendo moléculas de cadeia curta, como a menaquinona-4 (MK-4) ou moléculas de cadeia longa, como exemplo, MK-7, MK-8 e MK-9 (Halder et al., 2019). As diversas formas de vitamina K apresentam diferentes características químicas, que afetam sua absorção e distribuição nos tecidos (Cirilli et al., 2022).

A MK-7 é encontrada em alimentos fermentados, como por exemplo os queijos munster (83,7 ng/g), camembert (32,4 ng/g) e gorgonzola (30,7 ng/g) (Vermeer et al., 2018). Essa vitamina também é encontrada em vegetais fermentados como o chucrute (2,3 ng/ml), que é a fermentação da folha de repolho, e o natto (9965 ng/ml), que é a soja fermentada (Vermeer et al., 2018). O Natto é de longe o alimento que contém a maior concentração de MK-7; apresentando uma concentração 4.400 vezes maior que o chucrute e 120 vezes maior que o queijo munster. O natto é um alimento tradicional japonês, sendo altamente consumido pela população japonesa. Apesar de ser extremamente rico em MK-7, o natto não é popular e nem é consumido com frequência pelas populações de outros países (Vermeer et al., 2018) devido à sua consistência peculiar e ao seu cheiro forte, semelhante a amônia. Em carnes, a MK-7 é encontrada em fígado de boi (49,9 ng/g) e de porco (5,1 ng/g), e em carne bovina (1,3 ng/g) (Vermeer et al., 2018).

A MK-7 é sintetizada por algumas cepas de microrganismos, como *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris*, *Bacillus subtilis* *natto*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus equorum*, oferecendo uma importante via natural de enriquecimento de vitamina K2 em alimentos fermentados (Liu et al., 2019; Walther et al., 2013).

A vitamina K está relacionada a benefícios à saúde óssea, entre eles, aumento da densidade mineral óssea, estimulação da osteoblastogênese e inibição osteoclastogênese (Palermo et al., 2017). Mas para gerar esses benefícios, ela deve chegar ao tecido alvo.

Sendo assim, após a ingestão da vitamina K por meio de alimentos ou suplementos, ou produção por microrganismos, ocorre sua digestão. A vitamina e os produtos da hidrólise pancreática dos triglicerídeos são emulsificados, formando micelas mistas que são então absorvidas pelos enterócitos e transformadas em quilomícrons. Por sua vez, os quilomícrons são secretados pelas vilosidades intestinais para os vasos linfáticos, chegando então à circulação sanguínea. Nos

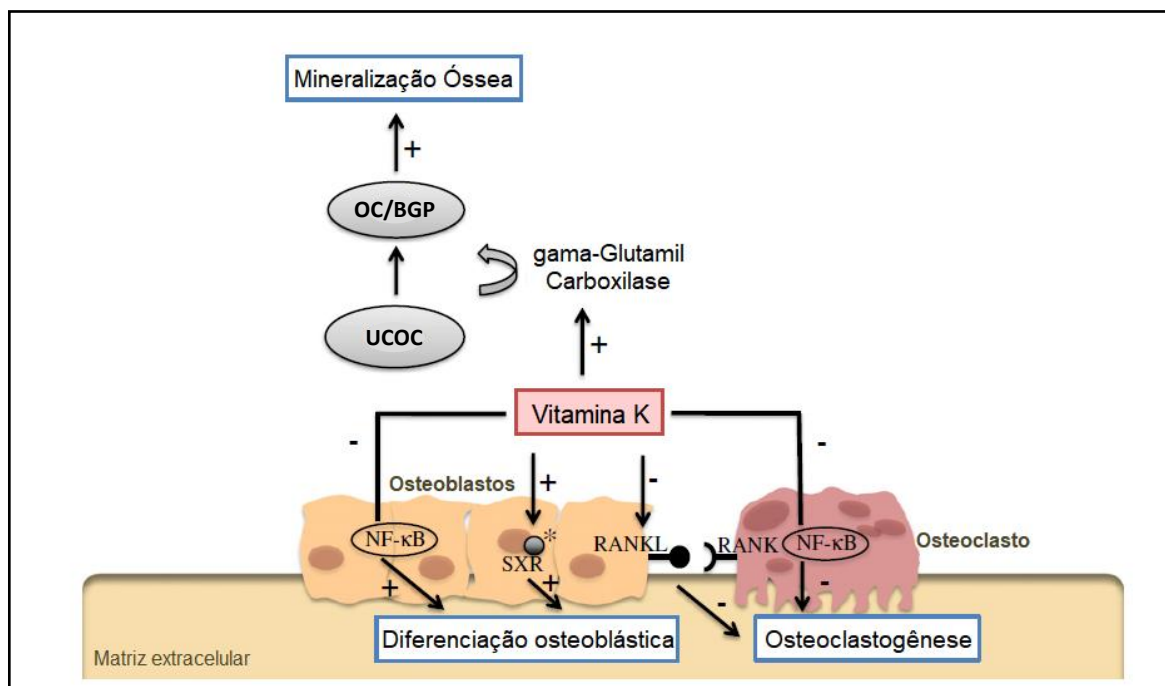
capilares, ocorre a hidrólise dos triglicerídeos dos quilomícrons, resultando em um quilomícron remanescente (QR), que é menor e entra novamente na circulação mantendo a vitamina K no seu núcleo lipofílico. No fígado, os QR são absorvidos pelos hepatócitos, onde seus lipídeos remanescentes são envoltos pelas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e retornam novamente para a circulação como lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). O metabolismo subsequente leva a partículas ainda menores, chamadas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), onde a vitamina K ainda está locada no núcleo lipofílico. As lipoproteínas circulantes, como os QR e as LDL, fornecem então lipídeos para os osteoblastos, que estão ligados às superfícies da matriz óssea, fazendo uma interação, permitindo assim a endocitose de QR e LDL e suas cargas de vitamina K. Osteoblastos parecem obter a maioria de sua MK-7 via LDL (Shearer et al., 2012; Shearer, Newman, 2008).

Uma vez que a vitamina K tem que percorrer todo esse percurso até chegar no tecido ósseo, ela necessita de uma maior biodisponibilidade. Quando no fígado, a vitamina K1 é rapidamente excretada, enquanto a K2 é transportada na circulação para os tecidos extra-hepáticos, como os ossos (Cirilli et al., 2022; Shearer, Newman, 2008). Além disso, evidências sugerem que a MK-7 tem a propriedade de se manter na circulação por um tempo estendido, apresentando uma maior biodisponibilidade quando comparada a outras formas de vitamina K2 (Sato et al., 2020; Shearer et al., 2012; Shearer, Newman, 2008).

A osteocalcina é uma proteína, vitamina K dependente, não colagenosa secretada por osteoblastos (O'Connor, Durack, 2017). A vitamina K atua como um cofator para a γ -carboxilação da osteocalcina, transformando a osteocalcina não carboxilada (UCOC) em osteocalcina carboxilada (OC/BGP), que age atraindo cálcio e facilitando a mineralização óssea (Palermo et al., 2017). A vitamina K2 também tem sido estudada quanto a sua função regulatória transcricional, pois inibe o fator nuclear kappa B (NF- κ B), independente da γ -carboxilação, resultando em inibição de RANKL. Outros efeitos da inibição de NF- κ B são a estimulação da diferenciação osteoblástica e mineralização, inibição da osteoclastogênese e da reabsorção óssea (Palermo et al., 2017; Yamaguchi, Weitzmann, 2011). Além disso, está relacionada à ativação do receptor de esteroide e xenobiótico (SXR), que resulta em aumento da produção de colágeno pelas células osteoblásticas, estimulando a formação da matriz extracelular (Palermo et al., 2017) (Figura 1). A vitamina K2 também demonstra atividade

imunomodulatória, como inibição da proliferação de células T, visto que estas células têm um importante papel na estimulação da reabsorção óssea na osteoporose pós-menopáusia (Myneni, Mezey, 2018)

Figura 1 – Efeitos ósseos da vitamina K



Legenda: OC/BGP – osteocalcina carboxilada, UCOC – osteocalcina não carboxilada, NF-κB – fator nuclear kappa B, SXR – receptor de esteroide e xenobiótico, RANKL – ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B, RANK – receptor do ativador do NF-κB. A vitamina K atua como um cofator para a enzima gama-Glutamil carboxilase, transformando a UCOC em OC/BGP, que se liga ao cálcio, facilitando a mineralização óssea. Além disso, a vitamina K inibe o NF-κB e RANKL, e estimula a ativação de SXR, o que resulta em aumento da diferenciação osteoblástica e inibição da osteoclastogênese.

Fonte: Palermo et al., 2017; modificado.

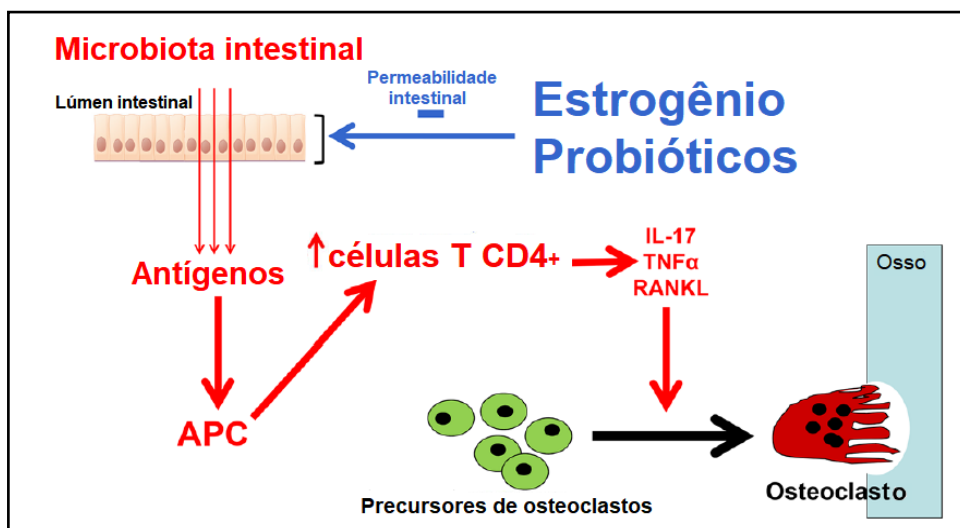
A diminuição de estrogênio na menopausa resulta também em importantes alterações no sistema gastrointestinal, como diminuição da absorção de cálcio e redução da diversidade microbiana (Collins et al., 2017a; Li et al., 2016a). A deficiência em estrogênio e as alterações microbianas levam ao aumento da permeabilidade intestinal devido à redução das proteínas de junção, o que facilita a entrada de microrganismos resultando em inflamação sistêmica (Li et al., 2016a; Ohlsson,

Sjögren, 2018). Além disso, o aumento da permeabilidade intestinal permite a passagem de produtos microbianos que agem como antígenos e interagem com as células apresentadoras, que ativam células T CD4, que por sua vez se diferenciam em células Th1 e Th17 e levam à produção de citocinas, como TNF α , RANKL e IL-17, resultando em osteoclastogênese e reabsorção óssea (Ohlsson, Sjögren, 2018).

A microbiota gastrointestinal participa ativamente das funções protetoras, estruturais e metabólicas relacionadas à saúde do hospedeiro, sendo recentemente considerada como um órgão endócrino virtual (Clarke et al., 2014). Evidências sugerem que a população microbiana gastrointestinal tem enorme capacidade de estimulação e regulação de diversos compostos que influenciam diferentes órgãos e sistemas (Clarke et al., 2014).

Embora ainda recente, estudos também têm avaliado a relação entre o microbioma intestinal e o metabolismo ósseo (Chen et al., 2017; Collins et al., 2017b; Pacifici, 2018). Recentemente, o emergente campo de pesquisa envolvendo o papel da microbiota na saúde do tecido ósseo recebeu o nome de “osteomicrobiologia” (Ohlsson, Sjögren, 2018). Possíveis mecanismos têm sido levantados para explicar tal relação, entre eles, a interferência na absorção de nutrientes, como o cálcio e fósforo e a alteração no pH intestinal o que facilita a absorção de minerais. Os microrganismos ainda participam na decomposição de macromoléculas em componentes menores e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), relacionados a regulação da inflamação e do sistema imune, além de atuarem na diminuição da permeabilidade da barreira da mucosa intestinal. Com a redução da permeabilidade intestinal há menor ativação do sistema imune, principalmente das células T CD4, reduzindo-se a produção de citocinas relacionadas a osteoclastogênese, como IL-17 e TNF α , o que leva à prevenção da perda óssea (Chen et al., 2017; D’Amelio, Sassi, 2018; Ohlsson, Sjögren, 2018) (Figura 2).

Figura 2 – Efeitos imunomoduladores da microbiota gastrointestinal no metabolismo ósseo, através da redução da permeabilidade intestinal

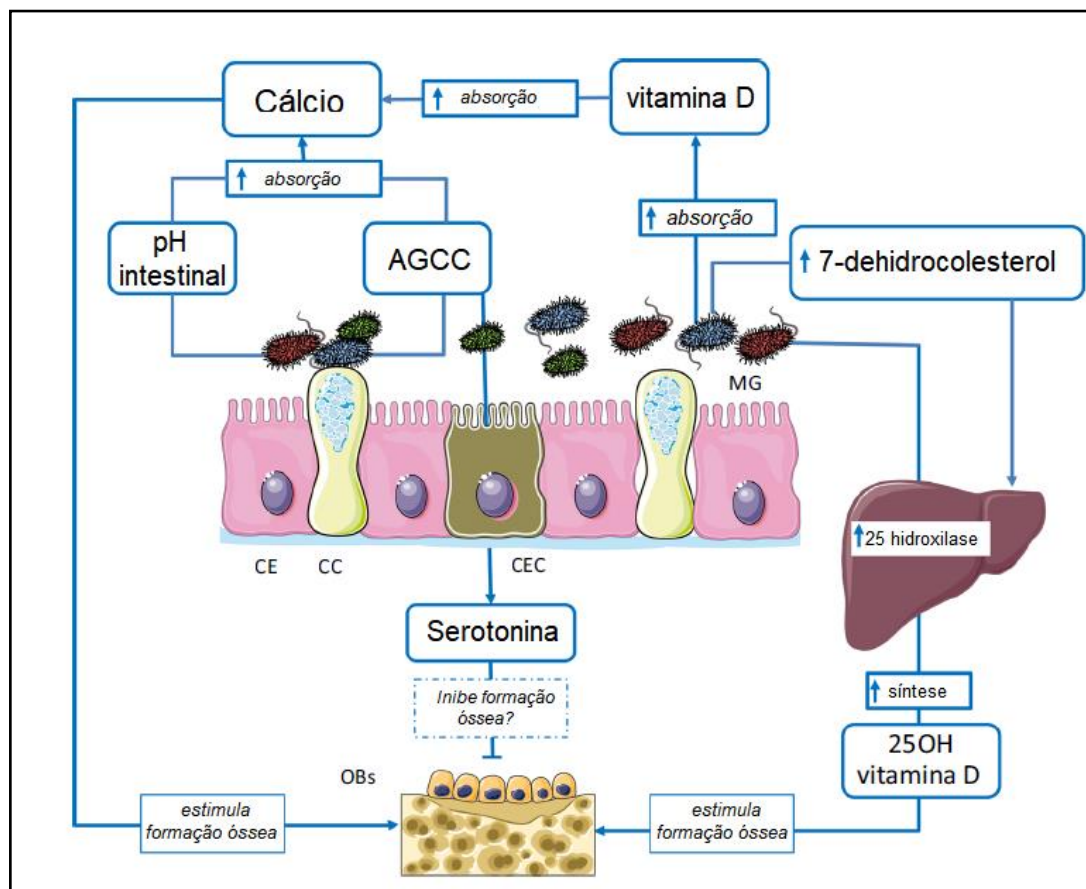


Legenda: APC – célula apresentadora de antígeno. O estrogênio e microrganismos probióticos estão relacionados à redução da permeabilidade intestinal, impedindo que produtos da microbiota gastrointestinal ultrapassem as junções intestinais e atuem como antígenos; isso inibe a ativação do sistema imune, principalmente as células T CD4+, que produzem citocinas relacionadas à osteoclastogênese, estimulando a reabsorção óssea.

Fonte: Ohlsson, Sjögren, 2018.

Além disso, a microbiota intestinal pode afetar os níveis de hormônios esteroides e vitamina D, que influenciam na absorção de cálcio (Charles et al., 2015). Outro possível mecanismo está relacionado à inibição da serotonina derivada do intestino (5HT) através da microbiota gastrointestinal, aumentando assim a formação óssea, visto que a 5HT está relacionada a diminuição da proliferação osteoblástica (D'Amelio, Sassi, 2018) (Figura 3).

Figura 3 – Relação entre microbiota gastrointestinal e saúde óssea



Legenda: AGCC – ácido graxo de cadeia curta. Os microrganismos gastrointestinais estão relacionados ao aumento da absorção de vitamina D, aumento da síntese de 7-deidrocolesterol e 25 hidroxilase, que fazem a conversão da vitamina D em sua forma ativa, estimulando a formação óssea. Esses microrganismos também alteram o pH intestinal e aumentam a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que atuam aumentando a absorção de cálcio. Outro possível mecanismo relacionado ao aumentando da formação óssea por essas bactérias, relaciona-se à inibição da serotonina derivada do intestino.

Fonte: D'Amelio, Sassi, 2018.

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). A maioria dos probióticos são microrganismos Gram positivos pertencentes ao gênero *Limosilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus* e *Bifidobacterium* (Parvaneh et al., 2014). Estudos têm analisado o uso de probióticos e seus benefícios para os tratamentos de várias doenças, entre elas, doenças cardiovasculares (Vasquez et al., 2019), gastrointestinais (Parker et al., 2018), metabólicas (Yoo, Kim, 2016), periodontais (Asok et al., 2018) e ósseas (Amin et al., 2020).

Limosilactobacillus reuteri é um microrganismo ácido-láctico, Gram positivo, anaeróbico facultativo (Mu et al., 2018), encontrado nos tratos gastrointestinal e urogenital de humanos, no leite materno e no trato gastrointestinal de alguns animais, como ratos, galinhas e porcos (Spinler et al., 2014). Numerosos efeitos benéficos têm sido relacionados ao uso desse probiótico como, alteração da microbiota intestinal, modulação do sistema imune do hospedeiro, supressão de citocinas pró-inflamatórias (Mu et al., 2018; Schepper et al., 2019), produção de histamina (Thomas et al., 2012), síntese de vitamina B12 (Gu et al., 2015), além da produção reuterina (3-hidroxi propionaldeído (3-HPA)), substância que apresenta efeito antimicrobiano, induzindo o estresse oxidativo em microrganismos patogênicos (Schaefer et al., 2010). Estudos também têm elucidado os importantes benefícios de *L. reuteri* para a saúde óssea, como redução da osteoclastogênese, aumento da densidade mineral óssea, diminuição do risco de fraturas (Collins et al., 2017b), aumento da vitamina D circulante e da absorção de cálcio (D'Amelio, Sassi, 2018).

McCabe et al. (2013) verificaram que a administração de *L. reuteri* (ATCC PTA 6475) em camundongos saudáveis, resultou em aumento da densidade mineral óssea, fração de volume ósseo, número e espessura trabecular. Já Britton et al. (2014) utilizaram esta mesma cepa de *L. reuteri* para o tratamento de camundongos ovariectomizados, verificando importante redução da osteoclastogênese e prevenção da perda do volume ósseo trabecular femoral. Resultados ósseos semelhantes foram encontrados por outros estudos que utilizaram *Lactocaseibacillus rhamnosus* (Li et al., 2016a) e *Lactocaseibacillus paracasei* (Ohlsson et al., 2014). Em humanos, Nilsson et al. (2018) verificaram que a suplementação diária, durante 12 meses, de *L. reuteri* (ATCC PTA 6475) em mulheres de 75-80 anos com baixa densidade mineral óssea, resultou em diminuição da perda óssea. Embora estudos que avaliaram os efeitos do uso de probióticos, como o *L. reuteri*, no tratamento da osteoporose ainda sejam escassos na literatura, a suplementação probiótica têm se mostrado como um conceito inovador e promissor (Nilsson et al., 2018).

As vias benéficas da ação de *L. reuteri* e da vitamina K na saúde óssea se mostram semelhantes. Ambos atuam diretamente sobre as células ósseas e o sistema imune. Além disso, os probióticos e a vitamina K2 possuem ação mútua; alguns microrganismos probióticos são capazes de sintetizar vitamina K2 (Liu et al., 2019; Walther et al., 2013), assim como o co-cultivo de alguns microrganismos ácido lácticos

com a vitamina K2 resulta em um aumento do crescimento dessas bactérias (Brooijmans et al., 2009; Hojo et al., 2007). Não há na literatura estudos que avaliaram a estimulação de crescimento de *L. reuteri* por MK-7.

Também ainda não há na literatura estudos que analisaram os efeitos ósseos da associação específica de *L. reuteri* e vitamina K2. Até onde vai nosso conhecimento, somente um artigo verificou os efeitos ósseos da associação de probiótico com vitamina K. Guo et al. (2020) verificaram que a suplementação de *Bacillus subtilis* PB6 associado à vitamina K3 em aves resultou em ação sinérgica, estimulando o crescimento ósseo, as características físicas e químicas das tíbias das aves, modulação do metabolismo de cálcio e fósforo, assim como a expressão de genes osteogênicos.

Sendo assim, estudos que avaliam a relação microbioma-hospedeiro são relevantes no contexto da osteoporose, tanto para o entendimento da sua ação no tecido ósseo, assim como para o possível uso desses microrganismos para fins terapêuticos (Collins et al., 2017b). O uso de probióticos tem um apelo importante como suplemento nutricional natural e a associação de probióticos com a vitamina K é muito interessante como produto, visto que as vias benéficas dos probióticos e vitaminas possivelmente estão interligadas, podendo apresentar efeitos sinérgicos.

2 PROPOSIÇÃO

Geral

O objetivo deste trabalho é analisar os efeitos de *L. reuteri* (ATCC PTA 6475), associado à vitamina K2 (MK-7), em camundongos ovariectomizados.

Específica

Determinar os efeitos de *L. reuteri* vivo (ATCC PTA 6475), associado à vitamina K2 (MK-7), em camundongos fêmeas ovariectomizadas, por meio da avaliação de:

- a) Teste de flexão em 3 pontos em fêmur;
- b) Análise da microarquitetura óssea de vértebra (L5);
- c) Níveis séricos de osteocalcina carboxilada e não carboxilada;
- d) Expressão gênica em íleo para *Ocludina* e *Jam3*;
- e) Análise histológica e histomorfométrica do jejuno.

Avaliar a estimulação de crescimento de *L. reuteri* por vitamina K2 (MK-7), *in vitro*, por meio de:

- a) Espectrofotometria das soluções;
- b) Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo *in vivo* - Animais e delineamento experimental

Foram utilizados no total 40 camundongos (fêmeas, Balb/c, specific pathogen free), com aproximadamente 15 semanas de idade, que foram mantidos no biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos/SP. O projeto foi realizado em conformidade com os princípios éticos em experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008, foi planejado seguindo-se as recomendações da ARRIVE (Guidelines for reporting animal research) (du Sert et al., 2020) e foi aprovado pela CEUA institucional (18/219; ANEXO A). Este é um estudo randomizado, controlado e cego.

Para o cálculo amostral foi utilizado a análise KISS (Festing, 2018). Com base em trabalho já publicado na literatura (Britton et al., 2014), assumindo-se um nível de significância de 5%, foi possível alcançar um power de 80%, com número de animais por grupo sendo igual a 8, considerando-se fração de volume ósseo como desfecho principal.

Os animais foram pesados e divididos de forma randômica em cinco grupos (n=8). Foi utilizada a forma de randomização simples, que foi feita através do site <https://www.randomizer.org/>. Os grupos são os seguintes:

- a) Grupo SHAM: animais nos quais foram realizadas as ovariectomias simuladas; e receberam placebo;
- b) Grupo OVX: animais nos quais foram realizadas as retiradas completa dos ovários; e receberam placebo;
- c) Grupo OVX-LR: animais nos quais foram realizadas as retiradas completas dos ovários, e receberam *L. reuteri* ($1,3 \times 10^9$ UFC/dia, Britton et al., 2014);
- d) Grupo OVX-K: animais nos quais foram realizadas as retiradas completas dos ovários, e receberam vitamina K2 (MK-7, 21 ug/Kg/dia);
- e) Grupo OVX-LR-K: animais nos quais foram realizadas as retiradas

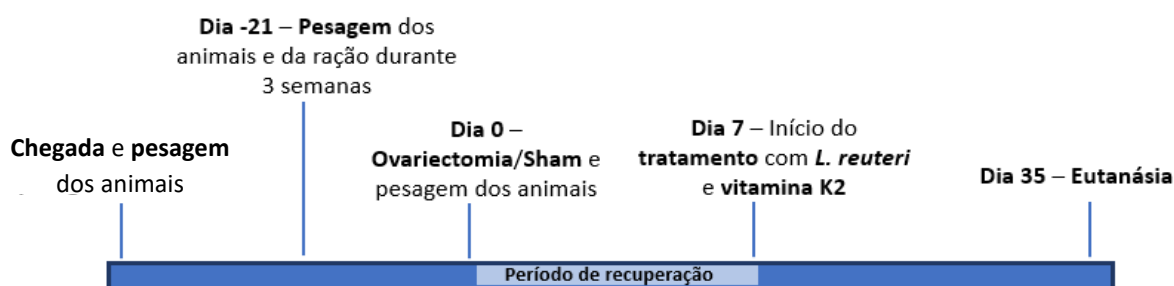
completas dos ovários, e receberam *L. reuteri* associado à vitamina K2.

Caldo MRS e óleo MCT foram os veículos de administração do probiótico e da vitamina K2, respectivamente. O placebo foi a combinação dos veículos. Os animais que não foram tratados com probiótico receberam apenas caldo MRS, assim como os animais não tratados com vitamina, receberam apenas óleo MCT. Portanto, todos os animais receberam os veículos e o tratamento diferiu apenas com relação ao princípio ativo a ser estudado.

Foram alocados 4 animais por gaiola, em racks ventilados, em sala com temperatura e iluminação controladas. Os animais continham uma marcação na cauda, feita com caneta permanente, para a sua identificação. Foi oferecida alimentação de acordo com a quantidade média ingerida (ver item 3.1.1) e água *ad libitum*.

O tratamento começou uma semana após a ovariectomia (Figura 4), através de gavagem com 0,25 ml/dia de *L. reuteri* ($1,3 \times 10^9$ UFC) (Britton et al., 2014) ou caldo MRS, e 0,05 ml/dia de MK-7 (21 ug/Kg) ou óleo MCT, dependendo do grupo, durante 4 semanas. O delineamento experimental, incluindo a dose, período de observação e cepa probiótica utilizada, foi baseado no estudo realizado por Britton et al. (2014), que encontraram resultados positivos com o uso de *L. reuteri* ATCC PTA 6475 para a prevenção da perda óssea por ovariectomia. O início do tratamento apenas uma semana após a ovariectomia foi proposto pelo estudo de medidas preventivas da osteoporose/osteopenia (WHO, 1998).

Figura 4 – Linha do tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.1 Controle de alimentação e peso

A alimentação foi oferecida *ad libitum* aos animais desde o primeiro dia, e a quantidade média ingerida foi avaliada durante as três semanas que antecederam a ovariectomia/*sham*. Após a ovariectomia/*sham* foi disponibilizada apenas a quantidade média avaliada no período, para se evitar o aumento de peso que decorre da ovariectomia. Esse controle é importante pois o tecido adiposo funciona como uma glândula endócrina, fato este que poderia influenciar nos resultados ósseos do presente estudo. Os animais foram pesados no dia da chegada, nas 3 semanas que antecederam a ovariectomia, no dia da ovariectomia, e semanalmente até o dia da eutanásia.

Foi utilizada ração de composição padronizada (Rhoster, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) baseada na fórmula AIN-93M (Reeves et al., 1993), de modo a garantir os níveis mínimos de nutrientes aos animais.

3.1.2 Ovariectomia e cirurgia *sham*

Todos os animais, previamente pesados, foram anestesiados com isoflurano (2% para indução e 1,8% para manutenção; oxigênio 2 L/min), e submetidos à ovariectomia ou cirurgia *sham*. A ovariectomia bilateral foi realizada através de uma incisão cutânea e muscular longitudinal na lateral da região dorsal, abaixo da última costela, e excisão total do ovário com bisturi, após ligadura na trompa com fio de sutura absorvível. A cirurgia *sham* foi feita expondo os ovários, sem excisão. A musculatura foi suturada com fio de sutura reabsorvível (Poliglactina 910 4–0, Shalon Medical, São Luís de Belos Montes, GO, Brasil) e a pele com fio de seda (3–0, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Os animais receberam medicação analgésica e anti-inflamatória via subcutânea nos 3 dias seguintes à cirurgia (Maxicam 0,2%, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil; 2 mg/kg e Tramadol; Grünenthal, Aachen, Alemanha, 5 mg/Kg).

3.1.3 *L. reuteri*

A cepa de *L. reuteri* (ATCC PTA 6475), gentilmente cedida pela Biogaia (Estocolmo, Suécia), foi cultivada sob condições anaeróbias em ágar e caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Acumedia, Lansing, MI, United States) por 24 horas, a 37 °C. Colônias isoladas foram confirmadas por coloração de Gram a partir do ágar. O caldo foi centrifugado (5000 rpm por 10 minutos), o sobrenadante descartado, o pellet foi ressuspenso em caldo MRS, e foi realizada a padronização do microrganismo para avaliação da quantidade de células viáveis (UFC/ml), em espectrofotômetro com 600 nm de comprimento de onda. A solução probiótica foi preparada diariamente e administrada imediatamente, via gavagem, nos animais ($1,3 \times 10^9$ UFC/dia).

3.1.4 Vitamina K2

Foi utilizada vitamina K2 na sua forma menaquinona-7 (MK-7), gentilmente cedida pela Kappa Bioscience (Oslo, Noruega), diluída em óleo MCT, de modo que os animais receberam a dose de 21 ug/Kg. A dose de MK-7 administrada nos animais experimentais na literatura varia bastante, de 10,57 ug/Kg (Yamaguchi et al., 2000) a 30 mg/Kg (Iwamoto et al., 2021), e geralmente é utilizada a forma de Natto, alimento tradicional japonês. MK-7 foi a forma escolhida pela sua maior biodisponibilidade e maior meia-vida que as outras formas de vitamina K (Sato et al., 2020). Somente dois artigos utilizaram a MK-7 em solução, de forma oral. Ambos os estudos ofertaram a MK-7 para ratos, na dose 30 mg/kg (Iwamoto et al., 2021) e 4 ug/rato (Omelka et al., 2021). Entretanto, Iwamoto et al. (2021) utilizaram uma dose extremamente alta e Omelka et al. (2021) utilizaram a MK-7 associada ao cálcio, o que impede a avaliação somente da vitamina. Sendo assim, fizemos a conversão dos valores recomendados de MK-7 de humanos (120 ug/dia; Kappa Bioscience; <https://www.kappabio.com/>) para camundongos, utilizando a fórmula Reagan-Shaw (Reagan-Shaw et al., 2008) para transformação de doses entre espécies.

Dose equivalente em humanos (mg/kg)

= Dose animal (mg/kg) x K_m animal / K_m humano

120 ug/ 70 kg = Dose camundongo x 3 / 37

Dose camundongo = 21 ug/kg

Legenda: K_m - Fator K_m, é o peso corporal (Kg) dividido pela área de superfície corporal. Fator K_m de camundongo = 3.

A solução contendo o probiótico e a solução contendo a vitamina MK-7 foram preparadas separadamente visto que, o probiótico é preparado em meio aquoso (caldo MRS) e a MK-7 é preparada em solução oleosa (óleo MCT). Após o preparo individual, as soluções foram administradas concomitantemente nos grupos que recebem ambas as terapias.

3.1.5 Eutanásia, descarte das carcaças e cegamento

Transcorridas as 4 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados com quetamina 10% (Vetnil, Louveira, SP, Brasil; 100 mg/Kg) e xilazina 2% (Anasedan, Ceva, Paulínia, SP, Brasil; 10 mg/Kg). Após pesagem, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e realizada uma incisão longitudinal da região púbica até o processo xifoide, abrindo a caixa torácica com a exposição do coração, onde foi introduzida uma agulha no ventrículo esquerdo, para coleta de sangue. Em seguida, foi realizado o aprofundamento da anestesia, com superdose de anestésico, os animais foram eutanasiados por decapitação e foram removidos fêmures, vértebras e intestino (íleo e jejuno). Fragmentos do intestino (jejuno) e vértebras foram armazenados em solução de paraformaldeído 4% tamponado (tampão fosfato pH 7,4; 0,1 M) durante 24 horas e em seguida transferidas para álcool 70% e armazenadas a 4 °C. O fêmur esquerdo foi envolto em gaze embebida em solução de Ringer e armazenado em freezer -20 °C, até a realização do teste de flexão em 3 pontos. O

íleo foi removido e congelado imediatamente em nitrogênio líquido, para posterior extração de RNA. O útero foi removido e acondicionado em estufa à 37 °C durante 24 h. Após, foi pesado para avaliação de sua atrofia nos grupos ovariectomizados, confirmando a eficácia do procedimento. Foi utilizada a fórmula: Razão (ratio) = Peso seco do útero / peso corporal (Souza et al., 2019).

O sangue coletado permaneceu em temperatura ambiente para coagulação durante 5 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm, durante 10 minutos, quando então o soro foi coletado e mantido a -80 °C até a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA).

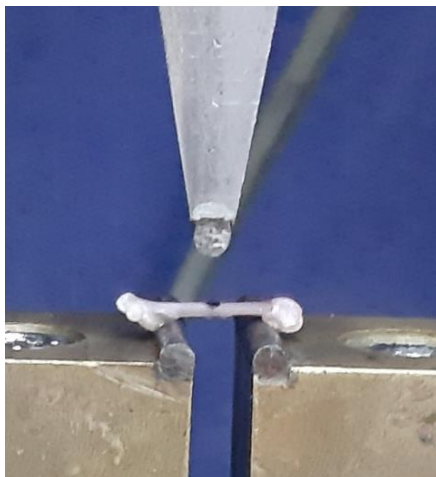
As carcaças foram armazenadas em freezer a -20 °C, em saco plástico branco, próprio para descarte de material biológico, até o recolhimento por empresa responsável. No momento do armazenamento do material removido durante a eutanásia, foi feito o cegamento dos pesquisadores. As peças foram codificadas e nomeadas por um examinador externo ao estudo, de forma que os pesquisadores, que realizaram as análises desconheciam a que grupo pertencia cada amostra.

3.1.6 Teste de flexão em 3 pontos

O teste de flexão em três pontos foi realizado em Máquina de Ensaio Universal (EMIC, INSTRON, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Os fêmures foram retirados do congelador 12 horas antes do ensaio e mantidos em solução de Ringer em temperatura ambiente até o momento antecedente ao teste. Para realização do teste de flexão em três pontos, os ossos foram biapoiados, nas regiões metafisárias, sobre dois suportes distanciados 7 mm entre si. A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, na região central, a uma velocidade constante de 3 mm/minuto até o momento da ruptura do osso (Figura 5). A célula de carga foi de 100 N (Bi et al., 2011) e as seguintes propriedades biomecânicas extrínsecas foram obtidas: força máxima (máximo de força que foi aplicado até o momento da ruptura do tecido ósseo, N), deslocamento (medida linear do quanto o osso deformou até que ocorresse a fratura; mm), energia (J) e rigidez (habilidade do osso em resistir à deformação em função de uma força aplicada; N/mm).

Figura 5 – Teste de flexão em 3 pontos

a



b



Legenda: a) Fêmur biapoiado nas regiões metafisárias; b) Ruptura óssea após o teste.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Após o teste, com auxílio de disco de carborundum foi realizado um leve desgaste da superfície do osso onde ocorreu a fratura, para que ficasse plana. Foi então realizado um corte de secção transversal (3 mm), e esse corte foi posicionado sobre uma lâmina de cera 7 e fotografado em lupa estereoscópica (Figura 6). A maior e menor distância entre as corticais externas (denominadas B e D, respectivamente) e a maior e menor distância entre as corticais internas (denominadas b e d, respectivamente) foram mensuradas no programa Image J. Combinando-se os valores de espessura de cortical e os resultados dos testes biomecânicos, foram calculados o módulo de elasticidade (relação tensão/deformação na fase elástica, ou seja, se a força aplicada for retirada, o material retorna ao seu estado inicial) e a tensão máxima (máximo de tensão à flexão que o osso suporta) de cada osso, seguindo as fórmulas (ASABE, 1998):

$$E = F/D \cdot L^3 / 48I; \sigma_u = FLC / 4I$$

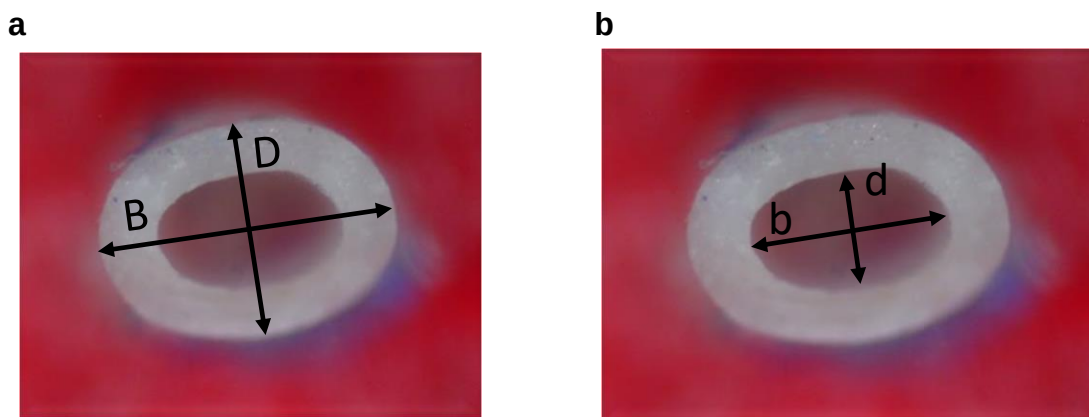
Onde: E é o módulo de Young (Pa); F é a força aplicada (N); D é o deslocamento (m); L é a distância entre os suportes (m); I é o momento de inércia (m⁴); σ_u é a tensão máxima (Pa); C é a metade do diâmetro do osso (m).

O momento de inércia foi obtido através da fórmula:

$$I = 0,049 \cdot [(B \cdot D^3) - (b \cdot d^3)]$$

Onde: I é a inércia (m⁴); B é a maior distância entre as corticais externas (m); D é a menor distância entre as corticais externas (m); b é a maior distância entre as corticais internas (m); d é a menor distância entre as corticais internas (m).

Figura 6 – Fêmur após leve desgaste da superfície onde ocorreu a fratura



Legenda: a) Medidas da maior e menor distância entre as corticais externas (denominadas B e D, respectivamente); b) Medidas da maior e menor distância entre as corticais internas (denominadas b e d, respectivamente).

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

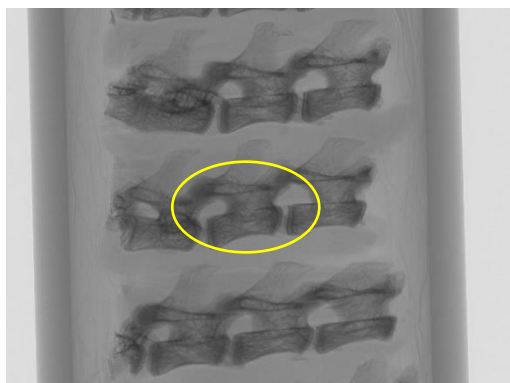
Foram avaliados os níveis séricos de osteocalcina não carboxilada e osteocalcina carboxilada pelo método ELISA. Foram utilizados kits com placas já sensibilizadas e seguidas as instruções dos fabricantes (Mouse UCOC (Uudercarboxylated Osteocalcin) ELISA – EKF59886 - Biomatik; Mouse Osteocalcin (OC/BGP) ELISA – E-EL-M0864 – Elabscience).

Basicamente, adicionamos a curva padrão e as amostras de soro nos poços correspondentes. Realizamos a diluição de soro: tampão de diluição de amostras, de 1:2 para UCOC e 1:5 para OC/BGP. Após o tempo indicado, removemos as soluções dos poços e adicionamos o anticorpo de detecção biotinilado. Foram realizadas lavagens e adicionada a estreptavidina conjugada com HRP. Os poços foram lavados e então foram adicionados o substrato reagente, e após a solução de parada. Imediatamente, as densidades ópticas (DO) foram lidas em leitor de microplacas com comprimento de onda de 450 nm. O teste ELISA foi realizado em duplicata.

3.1.8 Microtomografia Computadorizada

Análises tridimensionais por microCT de vértebras (L5) foram feitas utilizando um microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aartselaar, Bélgica) utilizando cortes de 12 μm de espessura (60 Kv e 166 μA), com filtro de cobre e alumínio e passo de rotação de 0,500 graus (Figura 7). As imagens foram reconstruídas tridimensionalmente, e um volume de interesse (VOI) foi padronizado a partir de um corte transaxial. Foi analisado o osso trabecular do corpo vertebral, tendo como referência os processos transversos, e padronizado 50 cortes acima deste ponto, sentido cranial. Fração de volume ósseo (BV/TV), porosidade total (Po (Tot)), número de trabéculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp) e densidade de conectividade (Conn.Dn) foram analisados utilizando-se método padrão.

Figura 7 – Microtomografia computadorizada da vértebra L5



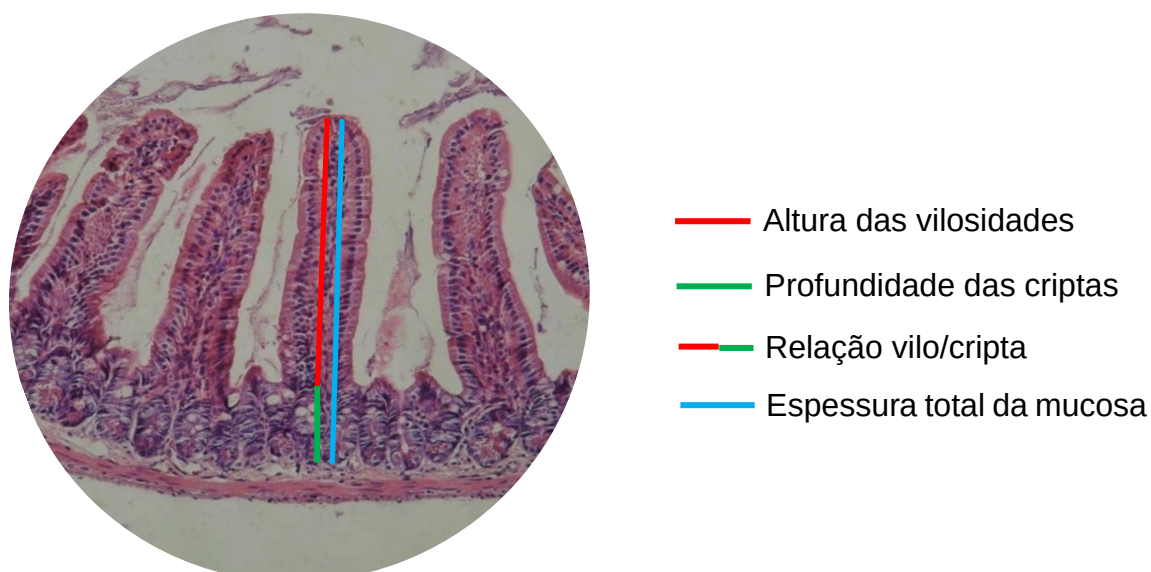
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.9 Análise histológica e histomorfométrica do intestino

Os intestinos (jejuno), foram incluídos em parafina e processados como de rotina para confecção de cortes para coloração em hematoxilina e eosina. Foram confeccionados 3 cortes distante 20 μm de distância entre si. As imagens foram obtidas através de um microscópio óptico (Axioplan 2, Zeiss) e então foi realizada a análise histomorfométrica (Figura 7) das seguintes variáveis:

- a) Altura das vilosidades: medida da base até o topo da vilosidade;
- b) Profundidade das criptas: medida de sua base até a região de transição vilo-cripta (Pelicano et al., 2005);
- c) Relação vilo/cripta: relação entre a altura das vilosidades e a profundidade das criptas;
- d) Espessura total da mucosa: medida do topo da vilosidade até a borda da muscularis mucosae.

Figura 7 – Histomorfometria de jejuno



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.10 Expressão gênica de proteínas de adesão celular no íleo

Os tecidos foram pulverizados com nitrogênio líquido em um grau e pistilo. O RNA foi extraído utilizando-se TRIzol e sua qualidade foi confirmada em gel de agarose (260/280). Após o tratamento com DNase (DNase I amplification grade, Thermo Fisher), 1 µg de RNA foi transcrito para cDNA utilizando-se o Kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR e o aparelho StepOnePlus™, sendo que todos os protocolos foram realizados de acordo com o recomendado pelos fabricantes. Primers para amplificação dos genes *Ocludina* e *Jam3* (molécula de adesão juncional 3) foram avaliados nos intestinos (Quadro 1). A JAM3 é uma proteína transmembranosa envolvida na formação de junções firmes, que apresenta propriedades funcionais, estruturais e bioquímicas, que regulam o ritmo da permeação de íons via paracelular, formando assim uma barreira seletiva e semipermeável. A ocludina também é uma proteína transmembranosa que compõe a junção de oclusão, e que forma rigorosa barreira seletiva e semipermeável.

A especificidade da amplificação foi observada pela curva de melting e a

eficiência entre 90–110%. As médias dos valores de Ct, medidas em duplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvos, com normalização a um controle interno, *Gapdh*. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$).

Quadro 1 – Primers

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>Ocludina</i>	CCTTCTGCTTCATCGCTTCC	AGCGCTGACTATGATCACGA
<i>Jam3</i>	ATGTACCACTGGGTTTCGGT	CTGCCTGACTTCTTCCTGCT

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Estudo *in vitro* – Associação de MK-7 na cultura de *L. reuteri*

Foi avaliada, *in vitro*, a influência de MK-7 sobre o crescimento de *L. reuteri*. Para isso, 2,950 ml de suspensão padronizada em $1,3 \times 10^9$ células de *L. reuteri* em caldo MRS, foi adicionada à 50 µl de MK-7 contendo 0,469 µg dessa vitamina, dissolvida em óleo MCT. Para o controle, 2,950 ml de suspensão padronizada em $1,3 \times 10^9$ células de *L. reuteri* em caldo MRS, foi adicionada à 50 µl de óleo MCT. As concentrações de *L. reuteri* e MK-7 foram as mesmas utilizadas no estudo *in vivo*.

Os tubos falcons contendo a interação foram incubados em anaerobiose à 37°C, por um período de 4 e 8 h (Yang et al., 2022).

O aumento da biomassa da bactéria em crescimento foi realizado através da leitura da densidade óptica (DO600 nm) das soluções, em 0, 4 e 8 h, mensuradas através de um espectrofotômetro (Yang et al., 2022).

Também foi realizada a quantificação de bactérias viáveis. Para isso, após a interação em caldo MRS nos períodos de 4 e 8 h, foram realizadas diluições seriadas decimais das culturas e alíquotas de 100 µl foram semeadas em placas de Petri

contendo ágar MRS. As placas foram incubadas em anaerobiose durante 3 dias e realizada a contagem de UFC/ml.

Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão.

3.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico mais conveniente, com nível de significância de 5% (GraphPad Prism 6, La Jolla, CA, EUA). Foram aplicados o teste ANOVA ou Kruskal-Wallis; Teste t ou Teste de Mann Whitney, dependendo da normalidade da amostra.

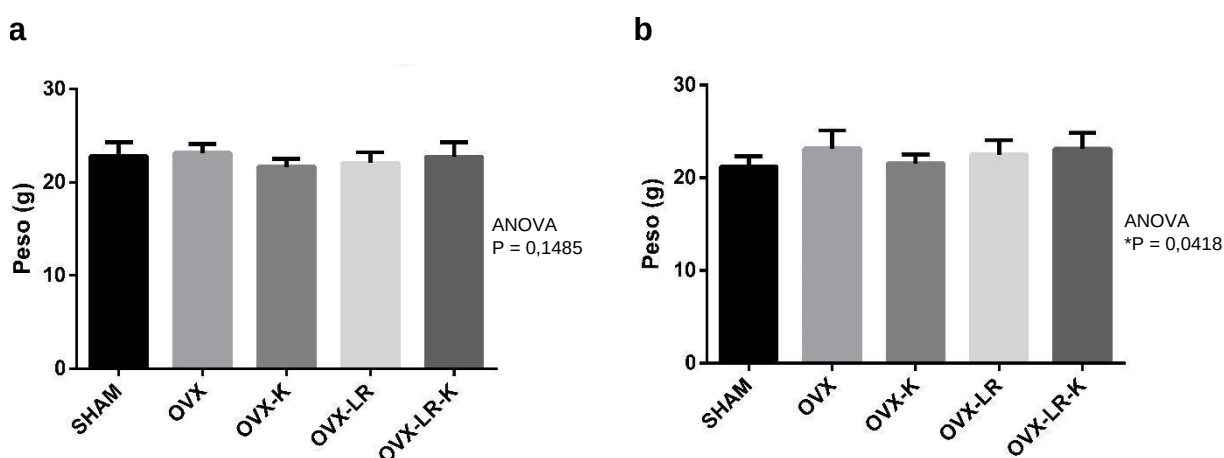
4 RESULTADOS

4.1 Estudo *in vivo*

4.1.1 Peso dos animais

No momento da cirurgia não havia diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P = 0,1485$, ANOVA, Figura 8a), assim como no momento da eutanásia ($P = 0,0418$, ANOVA, Figura 8b).

Figura 8 - Médias e desvios-padrão da variação de peso



Legenda: a) Peso dos animais no dia da cirurgia; b) Peso dos animais no dia da eutanásia. Sham - ovariectomia simulada. OVX – ovariectomia. K – vitamina K2. LR – *Limosilactobacillus reuteri*. n=8. *Apesar do valor de $P < 0,05$, não houve diferença entre os grupos após o teste de comparação múltipla de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2 Peso do útero após ovariectomia

Após a eutanásia, os úteros dos animais foram removidos e pesados para verificação da atrofia uterina e confirmação da eficácia da ovariectomia. Todos os grupos apresentaram redução significativa do peso uterino em comparação ao grupo SHAM ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallis, Figura 9 e 10), indicando atrofia do útero devido à depleção dos níveis circulantes dos hormônios ovarianos.

Figura 9 – Útero após 24 h acondicionado em estufa

a



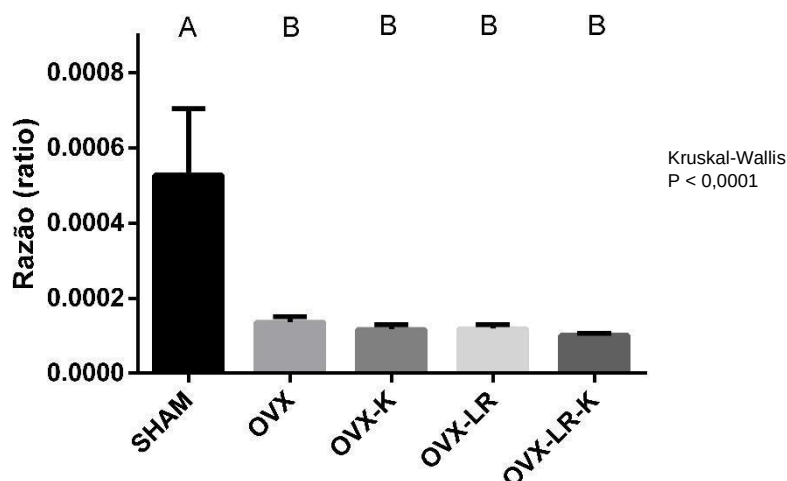
b



Legenda: a) Útero do grupo SHAM; b) Útero atrofiado do grupo OVX.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 – Médias e desvios-padrão dos valores da razão (ratio) entre peso do útero seco e peso corporal



Legenda: Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. Sham - ovariectomia simulada. OVX – ovariectomia. K – vitamina K2. LR – *Limosilactobacillus reuteri*. n=8.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3 Teste de flexão em 3 pontos

4.1.3.1 Propriedades extrínsecas

A ovariectomia levou a redução significativa da força máxima e da rigidez, quando comparado ao grupo SHAM (Figura 11).

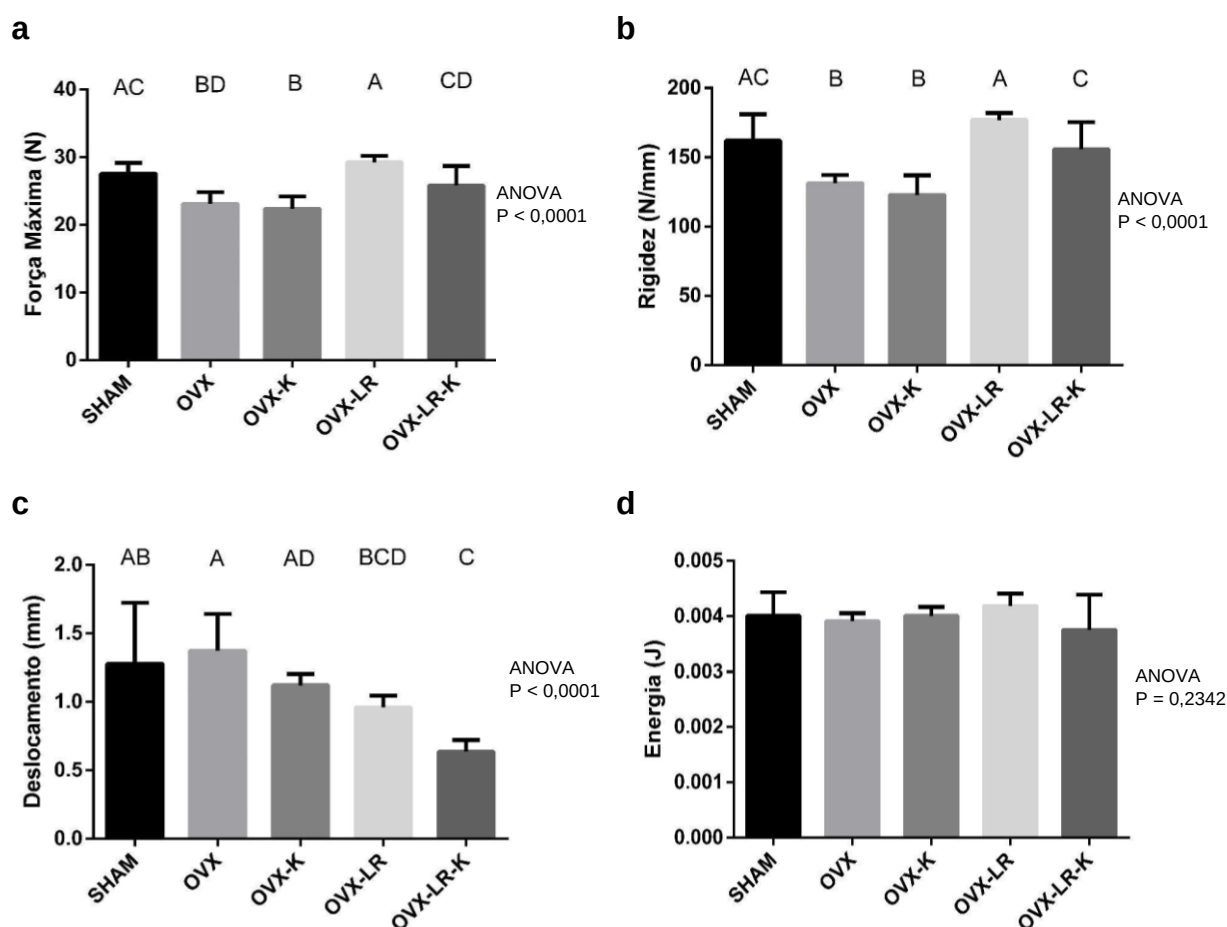
Observou-se que o grupo OVX-K foi estatisticamente igual ao grupo OVX em todos os parâmetros analisados (Figura 11), indicando que a suplementação somente com MK-7 não foi suficiente para melhorar as propriedades mecânicas do osso.

Já o tratamento somente com *L. reuteri* nos animais submetidos à ovariectomia, mostrou-se superior. O grupo OVX-LR demonstrou um aumento significativo da força máxima suportada e rigidez, e diminuição significativa do deslocamento, quando comparado ao grupo OVX (Figura 11).

O grupo OVX-LR-K foi estatisticamente igual ao grupo OVX em relação à força

máxima, entretanto demonstrou um aumento significativo na rigidez, e uma diminuição significativa no deslocamento quando comparado ao grupo OVX (Figura 11).

Figura 11 – Médias e desvios-padrão das propriedades extrínsecas dos fêmures obtidas através de teste biomecânico



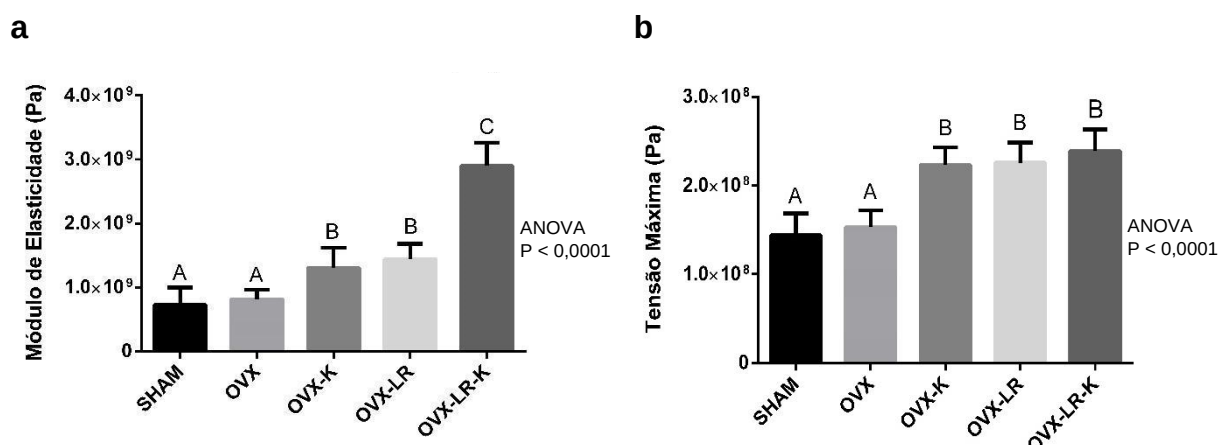
Legenda: a) Força máxima; b) Rigidez; c) Deslocamento; d) Energia. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. Sham - ovariectomia simulada. OVX – ovariectomia. K – vitamina K2. LR – *Limosilactobacillus reuteri*. n=8 para todos os grupos, exceto Força Máxima e Rigidez grupo SHAM, n=7.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3.2 Propriedades intrínsecas

Observou-se que, todos os grupos que receberam tratamento demonstraram um aumento estatisticamente significativo no módulo de elasticidade e na tensão máxima, em comparação ao grupo OVX (Figura 12).

Figura 12 – Médias e desvios-padrão das propriedades intrínsecas dos fêmures obtidas através de teste biomecânico



Legenda: a) Módulo de elasticidade; b) Tensão máxima. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. Sham - ovariectomia simulada. OVX - ovariectomia. K - vitamina K2. LR - *Limosilactobacillus reuteri*. n=8.

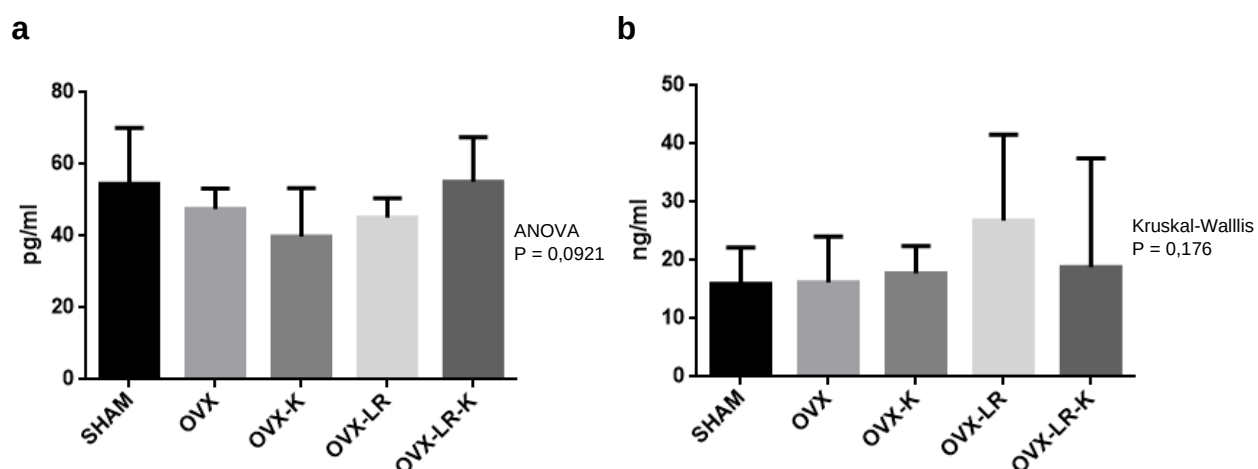
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Níveis séricos de osteocalcina carboxilada e não carboxilada

Os níveis séricos de UCOC e OC/BGP foram estatisticamente iguais em todos os grupos analisados ($P = 0,0921$ e $P = 0,176$, respectivamente; Figura 13).

O grupo OVX-K, apesar de ser estatisticamente igual aos demais grupos, demonstrou níveis séricos menores de UCOC (Figura 13). Os níveis séricos de vitamina K e UCOC são inversamente proporcionais (Wagatsuma et al., 2019).

Figura 13 – Médias e desvios-padrão dos níveis séricos



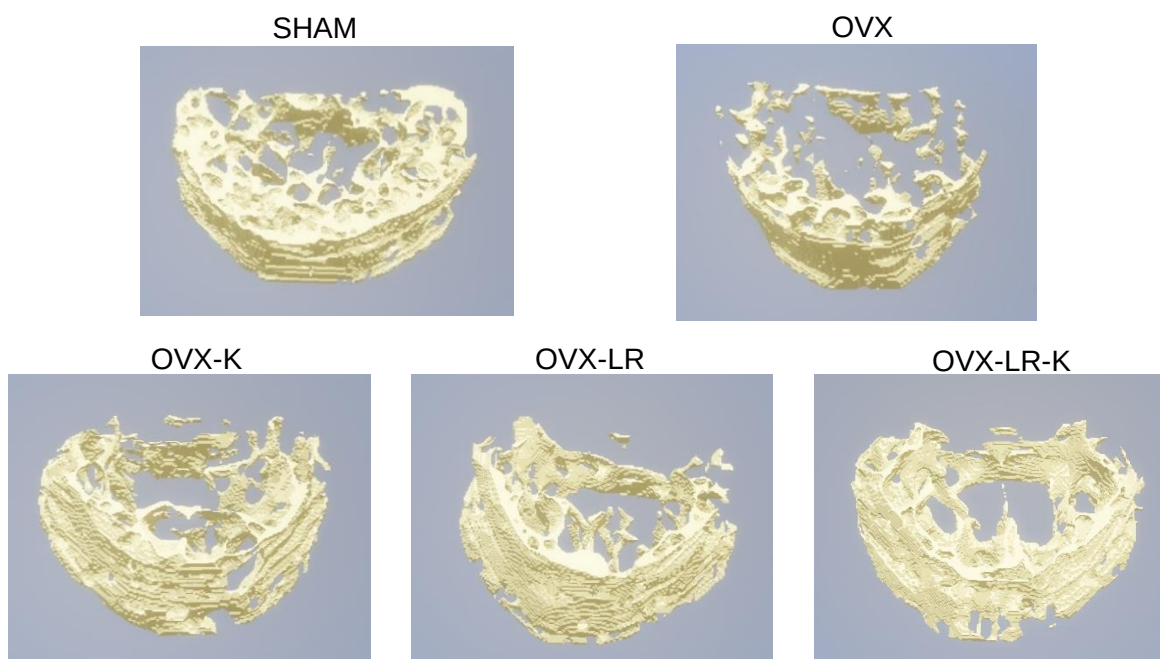
Legenda: a) UOC; b) OC/BGP. Sham - ovariectomia simulada. OVX – ovariectomia. K – vitamina K2. LR – *Limosilactobacillus reuteri*. UOC: n=7 para todos os grupos, exceto OVX, n=6. OC/BGP: n=8 para todos os grupos, exceto OVX-K, n=7.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.5 Microtomografia computadorizada

A ovariectomia levou à redução significativa de BV/TV e Tb.N, além de aumento de Po (Tot) e Tb.Sp em comparação com o grupo SHAM. No entanto, não alterou os valores de Tb.Th e Conn.Dn (Figura 14 e 15).

De uma maneira geral, os grupos OVX foram semelhantes entre si com relação a todos os parâmetros, exceto o grupo OVX-K que apresentou redução na Conn.Dn. Os tratamentos com *L. reuteri*, assim como a sua associação com a vitamina K2 restauraram os valores de BV/TV, Po (Tot) e Tb.Sp aos níveis do grupo SHAM, enquanto a associação também restaurou os valores de Tb.N.

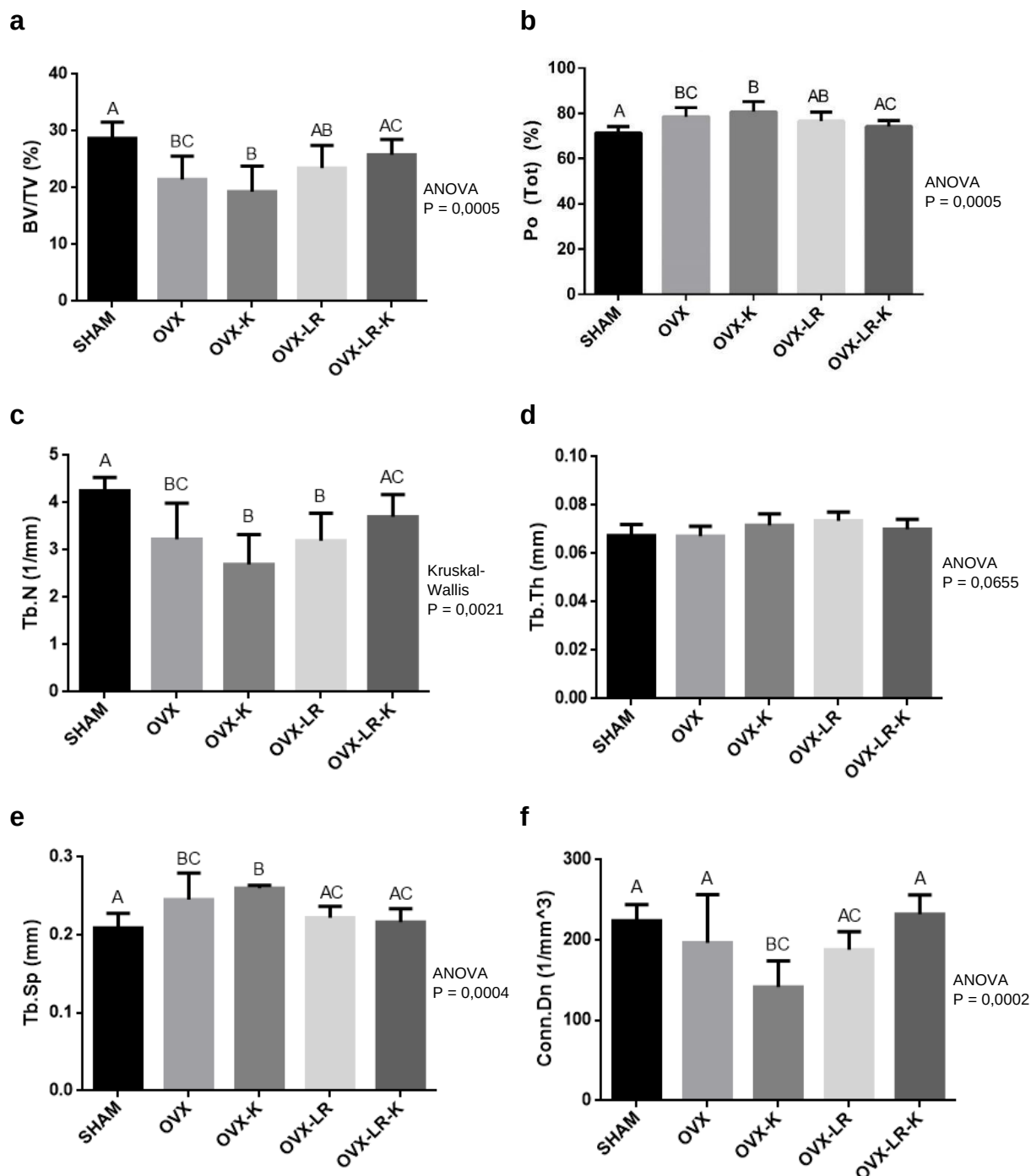
Figura 14 – Reconstrução 3D de vértebra L5



Legenda: Sham - ovariectomia simulada. OVX – ovariectomia. K – vitamina K2. LR – *Limosilactobacillus reuteri*. A ovariectomia levou a degradação significativa da microarquitetura trabecular de vértebra, quando em comparação ao SHAM. Já a administração dos tratamentos restaurou a estrutura trabecular.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Médias e desvios-padrão de parâmetros de microarquitetura óssea de vértebras (L5)

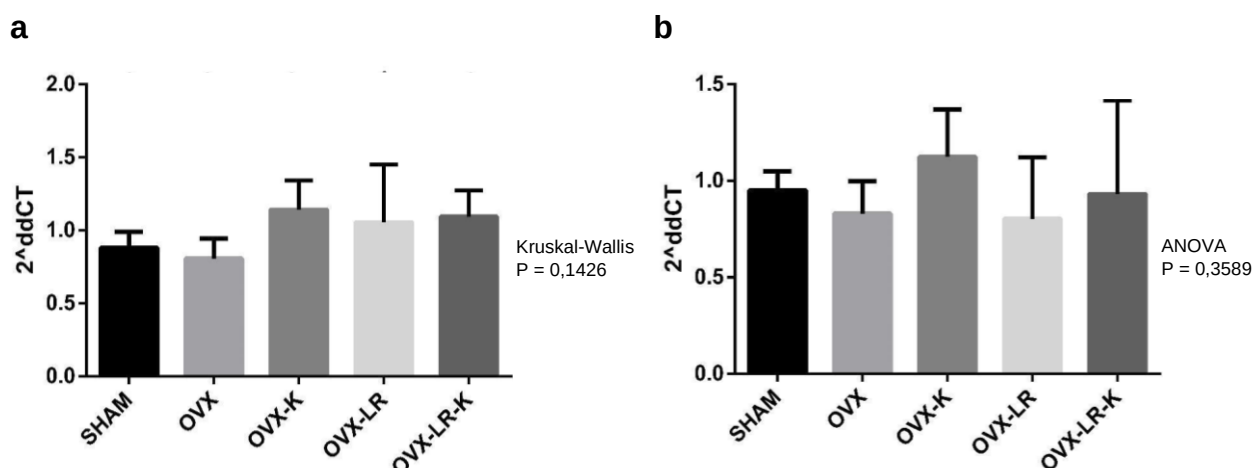


Legenda: a) BV/TV (Fração de volume ósseo); b) Po (Tot) (porosidade total); c) Tb.N (número de trabéculas); d) Tb.Th (espessura trabecular); e) Tb.Sp (separação trabecular); f) Conn.Dn (densidade de conectividade). Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. Sham - ovariectomia simulada. OVX – ovariectomia. K – vitamina K2. LR – *Limosilactobacillus reuteri*. n=7.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.6 Expressão gênica de proteínas de adesão celular no íleo

Verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica de *Jam3* e *Ocludina* entre os grupos ($P = 0,1426$ e $P = 0,3589$, respectivamente; Figura 16), indicando que tanto a ovariectomia quanto o tratamento não influenciaram na permeabilidade intestinal.

Figura 16 – Médias e desvios-padrão da expressão gênica em íleo



Legenda: a) *Jam3*; b) *Ocludina*. Sham - ovariectomia simulada. OVX – ovariectomia. K – vitamina K2. LR – *Limosilactobacillus reuteri*. *Jam3*: n=7 para todos os grupos, exceto Sham, n=8; e OVX-LR-K, n=6. *Ocludina*: n=7 para todos os grupos, exceto Sham, n=8; OVX-LR e OVX-LR-K, n=6
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.7 Análise histológica e histomorfométrica do intestino

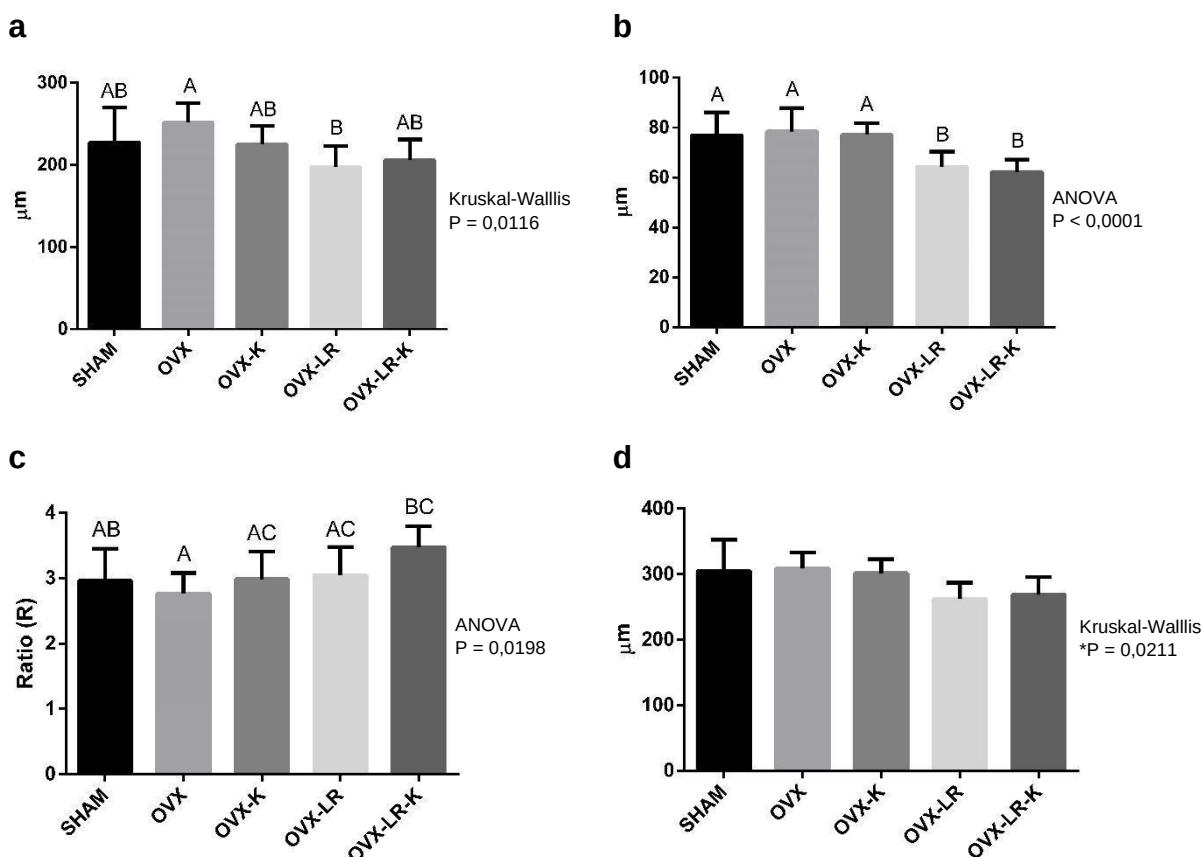
Observou-se que o tratamento somente com MK-7 não alterou os parâmetros analisados (Figura 17).

Já *L. reuteri* reduziu significativamente a altura dos vilos e profundidade das criptas, em comparação a OVX. Entretanto, essa foi uma diminuição proporcional que manteve a relação vilo:cripta dentro da normalidade, sendo estatisticamente igual à SHAM e OVX.

A associação de *L. reuteri* com MK-7 resultou em redução significativa da profundidade das criptas, em comparação a SHAM e OVX. Isso resultou em um aumento da relação vilosidade: cripta, em comparação a OVX, porém ainda dentro da normalidade (semelhante ao grupo SHAM).

Não houve diferença estatística entre os grupos na espessura total da mucosa.

Figura 17 – Médias e desvios-padrão das variáveis avaliadas na histomorfometria do intestino



Legenda: a) Altura dos vilos; b) Profundidade das criptas; c) Relação vilosidade: cripta; d) Espessura total da mucosa. Sham - ovariectomia simulada. OVX – ovariectomia. K – vitamina K2. LR – *Limosilactobacillus reuteri*. n=8. * Apesar do valor de P < 0,05, não houve diferença entre os grupos após o teste de comparação múltipla de Dunn.

Fonte: Elaborado pelo autor.

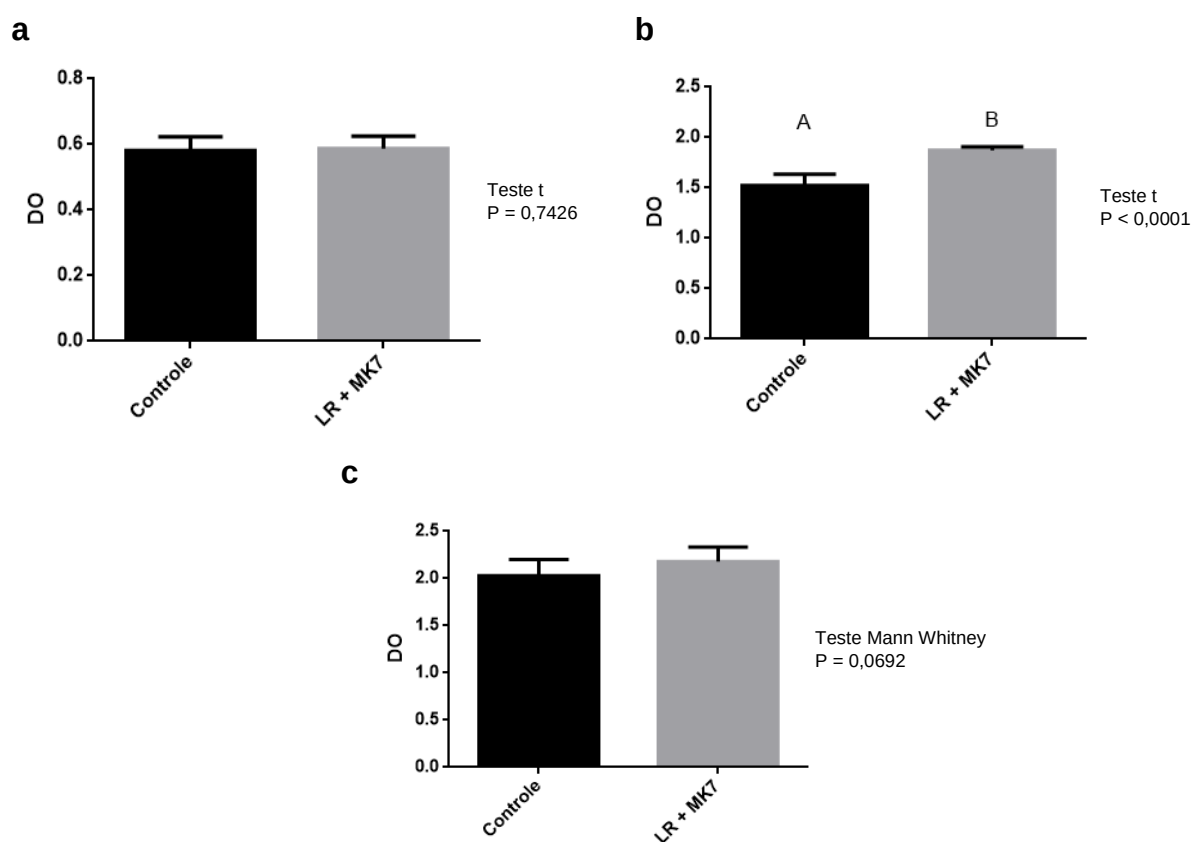
4.2 Estudo *in vitro*

4.2.1 Efeitos de MK-7 na biomassa de *L. reuteri*

Após 4 h de interação em caldo houve um aumento significativo da densidade óptica do grupo LR + MK7, quando em comparação ao controle ($P < 0,0001$, Teste t, Figura 18b).

Já após 8 h de interação, verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos LR + MK7 e controle ($P = 0,0692$, Teste Mann Whitney, Figura 18c).

Figura 18 – Médias e desvios-padrão das densidades ópticas das soluções



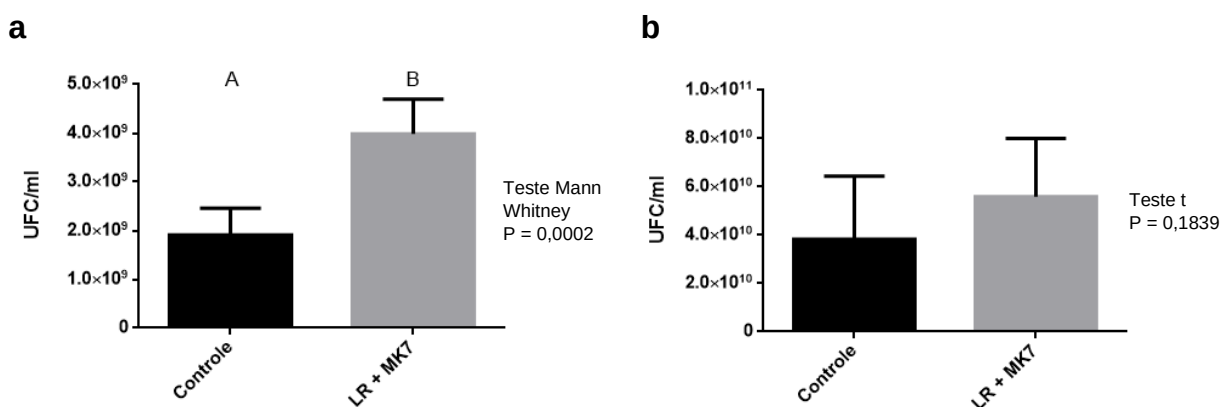
Legenda: a) Densidade óptica em 0 h; b) Densidade óptica após 4 h. c) Densidade óptica pós 8 h. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. LR – *Limosilactobacillus reuteri*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Efeitos de MK-7 na contagem de UFC/ml

Após a interação em caldo em 4 e 8 h, também foi realizada a análise de células viáveis pela contagem de UFC/ml em ágar MRS. Observou-se que houve um aumento significativo de UFC/ml de *L. reuteri* após 4 h de interação com MK-7 ($P = 0,0002$, Teste Mann Whitney, figura 19a). Já após 8 h de interação, verificou-se que não houve um aumento significativo de UFC/ml entre os grupos LR + MK7 e controle ($P = 0,1839$, Teste Mann Whitney, Figura 19b).

Figura 19 – Médias e desvios-padrão dos dados de UFC/ml de *L. reuteri* após interação com MK-7



Legenda: a) Comparação entre os grupos após 4 h; b) Comparação entre os grupos após 8 h. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística. LR – *Limosilactobacillus reuteri*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O uso de *L. reuteri* e vitamina K2, isoladamente, tem demonstrado diversos benefícios à saúde óssea, e alguns de seus mecanismos de ação se mostram complementares, especialmente pela associação entre a absorção de cálcio facilitada por *L. reuteri* (Chen et al., 2017; D'Amelio, Sassi, 2018) e a gama-carboxilação da osteocalcina, com consequente mineralização, pela vitamina K (Palermo et al., 2017). A vitamina K2 também está relacionada ao aumento do crescimento de alguns probióticos (Hojo et al., 2007). Além disso, tanto esses microrganismos (Cristofori et al., 2021; Lebeer et al., 2010; Ren et al., 2016) quanto a vitamina K2 (Halder et al., 2019; Myneni, Mezey, 2018; Pan et al., 2016) vêm sendo relacionados a efeitos imunomoduladores. Portanto, hipotetizamos que suas vias benéficas poderiam resultar em efeitos sinérgicos.

Após a eutanásia e pesagem dos úteros secos dos animais, verificou-se a eficácia da cirurgia de ovariectomia, uma vez que os grupos ovariectomizados apresentaram significativa atrofia uterina. Isso ocorre porque a redução de hormônios ovarianos leva à atrofia do útero, sendo esse procedimento bastante utilizado e consolidado nesse modelo experimental (Sophocleous, Idris, 2014).

A ovariectomia levou ao comprometimento das propriedades biomecânicas do osso, verificada pela redução significativa da força máxima e rigidez de fêmures, além de perda óssea demonstrada pela redução significativa de BV/TV e Tb.N, e aumento significativo de Po (Tot) e Tb.Sp em vértebras. Esses resultados confirmam os efeitos ósseos deletérios desse modelo experimental. Britton et al. (2014) utilizaram a mesma metodologia do presente estudo, porém não encontraram diferença estatística em Tb.N e Tb.Sp entre os grupos OVX e controle. Isso possivelmente pode ser explicado pelo fato de os autores terem usado a vértebra L3. A escolha da vértebra a ser avaliada pode influenciar nos resultados de perda óssea. Considerada uma região peculiar para diagnosticar a perda óssea precoce, a vértebra L5 tem sido utilizada em diversos estudos ósseos (Dar et al., 2018; Lawenius et al., 2022; Xiao et al., 2018).

O tratamento com *L. reuteri* resultou em melhora significativa das propriedades biomecânicas de fêmures. O teste de flexão em 3 pontos é um método

validado na literatura para análise de propriedades biomecânicas ósseas, exibindo diferenças significativas entre camundongos ovariectomizados e não ovariectomizados (Deckard et al., 2017). Como esperado, o tratamento com *L. reuteri* restabeleceu força máxima e rigidez ao nível de SHAM. Com relação às propriedades intrínsecas, o módulo de elasticidade é a relação tensão/deformação na fase elástica, ou seja, se a força aplicada for retirada, o material retorna ao seu estado inicial. Quanto maior o módulo de elasticidade, mais rígido é o material e menor é a sua deformação elástica. Já a tensão máxima refere-se ao máximo de tensão à flexão que o osso suporta, sendo demonstrada pelo ponto mais alto da curva tensão/deformação. Importaneamente, o grupo tratado somente com o probiótico, exibiu um aumento significativo do módulo de elasticidade e da tensão máxima, quando comparado ao grupo OVX. A tendência do osso à fratura depende da sua composição, como a quantidade de minerais, colágeno e proteínas não colagenosas (Boskey, 2013). Baseados na melhora significativa das propriedades biomecânicas, levantamos a hipótese que o tratamento com *L. reuteri* alterou a composição dos fêmures. Em estudo com metodologia semelhante, Britton et al. (2014) verificaram aumento da densidade mineral e do conteúdo mineral ósseo em fêmur de camundongos ovariectomizados tratados com *L. reuteri*, comprovando o efeito do probiótico na composição mineral do tecido.

Embora neste estudo não tenhamos avaliado a composição óssea, realizamos a avaliação da osteocalcina sérica. Tanto a osteocalcina carboxilada quanto a não carboxilada são encontradas no soro. Durante a formação óssea, a maioria da osteocalcina carboxilada é incorporada na matriz óssea, contribuindo para a sua mineralização. Entretanto, uma pequena fração sintetizada é secretada na circulação. Durante a reabsorção óssea, a osteocalcina incorporada na matriz é destruída. Por essas razões, a osteocalcina carboxilada é um indicador de formação óssea. Já a osteocalcina não carboxilada refere-se à não-carboxilação, carboxilação parcial, ou ainda a descarboxilação da osteocalcina, resultado da acidificação do meio pelos osteoclastos durante a reabsorção óssea (Li et al., 2016b). O grau de carboxilação influencia tanto na estrutura física quanto na funcionalidade da osteocalcina (Li et al., 2016b). Entretanto, verificamos que tanto a ovariectomia quanto o tratamento com probiótico não influenciaram nos níveis séricos de osteocalcina carboxilada e não carboxilada. Isso indica que a melhora nas propriedades

biomecânicas observada no presente estudo não está associada à osteocalcina, fortalecendo a hipótese de que os efeitos benéficos sejam associados à redução da atividade reabsortiva em contraposição à atividade anabólica (Britton et al., 2014).

O tratamento com *L. reuteri* restaurou os valores de microarquitetura vertebral ao nível de SHAM, porém sem diferença para o grupo OVX. Apesar de não termos observado uma melhora significativa da estrutura trabecular de vértebras após 4 semanas de tratamento, o tratamento resultou em melhora significativa das propriedades biomecânicas de fêmures neste período. Resultados semelhantes foram encontrados por Britton et al. (2014), utilizando a mesma cepa de *L. reuteri* em fêmur e vértebras, também em 4 semanas. No estudo de Britton et al. (2014), o tratamento com probiótico levou a melhora significativa da microarquitetura com relação ao grupo ovariectomizado apenas em fêmur, e não em vértebra. A resposta à ovariectomia é sítio-específica, sendo que a perda óssea é observada primeiramente em ossos longos (4 semanas após a ovariectomia), depois em vértebra (entre 5 e 12 semanas) e por último nos maxilares e em ossos cranianos (depois de 12 semanas) (Liu et al., 2015). Tais diferenças podem explicar as respostas positivas significantes ao tratamento observadas nas propriedades biomecânicas em fêmur, em contraposição à tendência positiva dos parâmetros trabeculares em vértebra, levando a crer que a extensão do período de tratamento e de observação poderiam resultar em diferenças mais evidentes na microarquitetura vertebral.

A depleção do estrogênio também está relacionada a alterações intestinais, que variam de acordo com o tempo após ovariectomia e com a região do intestino avaliada (Collins et al., 2017a). O íleo é a região intestinal que exhibe as mudanças mais dinâmicas em resposta à ovariectomia quando comparado as outras áreas intestinais (Collins et al., 2017a), sendo esta a região de interesse escolhida para a análise de expressão gênica neste estudo. As junções de oclusão são múltiplos complexos proteicos localizados no polo apical das células epiteliais associadas à permeabilidade paracelular a solutos, sendo ocludina, claudinas, JAMs e tricelulinas as mais importantes. No entanto, não observamos diferença entre os grupos em nosso período de observação (5 semanas após OVX). Interessantemente, Collins et al. (2017a) verificaram que apesar da ampla variação da expressão gênica das proteínas de oclusão em 8 semanas após a ovariectomia, a permeabilidade paracelular avaliada pelo teste fluoresceína isotiocianato dextrana (FITC-dextran) *in vivo* só foi alterada na

primeira semana após ovariectomia, retornando aos níveis basais nos períodos de 4 e 8 semanas. Isto evidencia que o aumento de permeabilidade pode ser transitório e normalizado por mecanismos compensatórios, e não necessariamente se relaciona com a expressão das proteínas de oclusão (Collins et al., 2017a). Outros autores, por outro lado, encontraram redução de *Ocludina* e *Jam3* em íleo após 7 e 8 semanas da ovariectomia (Jia et al., 2021; Ma et al., 2020), com aumento significativo após tratamento com mix de cepas probióticas (Jia et al., 2021). Frente a nossos resultados, a expressão de *Ocludina* e *Jam3* não se relacionou a alterações ósseas e não explica os benefícios observados com o tratamento probiótico.

As vilosidades expandem a área da superfície intestinal, fator importante para a máxima absorção de substâncias e nutrientes, que por sua vez entram na circulação sanguínea para então alcançar seu local de ação. Os vilos possuem invaginações chamadas criptas, sendo composta por diversos tipos celulares, entre eles as células tronco do epitélio intestinal, responsáveis pelo potencial proliferativo desse tecido, promovendo a sua constante renovação. A estrutura vilo-cripta é a unidade funcional que mantém a homeostasia intestinal e suas funções, sendo um índice de saúde intestinal (Kwon et al., 2020). O grupo SHAM e OVX foram estatisticamente iguais em todos os índices intestinais avaliados. Entretanto, observou-se que *L. reuteri* diminuiu a altura dos vilos e a profundidade das criptas no jejuno. Porém, essa foi uma redução proporcional que manteve a relação vilo: cripta ainda dentro da normalidade, 3:1 até 5:1 (Erben et al., 2014), resultando na espessura total da mucosa estatisticamente igual entre os grupos, mantendo assim a homeostasia intestinal. Provavelmente o tempo do experimento, assim como a porção do intestino analisada influenciaram nos resultados, visto que Jia et al. (2021) encontraram uma redução significativa da relação vilo/cripta em íleo no grupo OVX e o restabelecimento desse índice após 7 semanas de tratamento com probióticos. Os vilos também estão presentes no íleo e duodeno, que não foram avaliados, e que podem ter sido alterados tanto pela ovariectomia quanto pelo probiótico.

Como os estudos sobre MK-7 na literatura são heterogêneos, variando na dose, tempo de tratamento e na forma de administração, fizemos a conversão dos valores recomendados de MK-7 de humanos (120 ug/dia; Kappa Bioscience; <https://www.kappabio.com/>) para camundongos, utilizando a fórmula Reagan-Shaw (Reagan-Shaw et al., 2008) para transformação de doses entre espécies. Tanto as

doses baixas (10,57 ug/Kg) de MK-7 por 150 dias (Tsukamoto, 2004), como as doses altas (30 mg/Kg, Iwamoto et al., 2021), durante 84 dias, resultaram em benefícios à saúde óssea de ratas ovariectomizadas. Apesar das propriedades biomecânicas extrínsecas não serem alteradas com o tratamento com MK-7 (Fu et al., 2012; Iwamoto et al., 2021), nós encontramos melhoria nas propriedades intrínsecas, confirmando os seus efeitos benéficos em fêmur.

O tratamento com MK-7, no entanto, não preveniu a deterioração da microarquitetura trabecular em vértebra. As diferentes respostas observadas em ossos longos e vértebra podem explicar um possível atraso na resposta vertebral em comparação com fêmur. Outra hipótese a ser considerada é o efeito da MK-7 na composição óssea e não na microarquitetura. A MK-7 está associada ao aumento da produção de colágeno pelos osteoblastos (Sato, 2012) e à carboxilação da osteocalcina, levando ao aumento significativo da quantidade de cálcio na metáfise e diáfise femoral de ratos OVX (Yamaguchi et al., 1999). Porém, verificamos que o tratamento com MK-7 não alterou os níveis séricos de osteocalcina carboxilada e não carboxilada. De maneira semelhante, outros autores só verificaram diferença nos níveis séricos de osteocalcina carboxilada após 5 meses de tratamento (Tsukamoto, 2004; Yamaguchi et al., 2000), ratificando a importância do tempo de tratamento. Portanto, os efeitos positivos da MK-7 nas propriedades biomecânicas extrínsecas não podem ser explicados pelos níveis séricos de osteocalcina.

Pelos mecanismos de ação de *L. reuteri* e MK-7, levantamos a hipótese de que sua associação poderia ser benéfica, resultando em efeitos sinérgicos. A associação de *L. reuteri* e vitamina K2 resultou em aumento estatístico do módulo de elasticidade, que está intimamente relacionado à composição do tecido ósseo, quando em comparação aos demais tratamentos. Nos demais parâmetros avaliados, de uma maneira geral, o tratamento com a associação de *L. reuteri* e MK-7 foi estatisticamente igual ao tratamento somente com o probiótico na melhora da saúde óssea de camundongos OVX.

Observamos um aumento transitório da biomassa e de células viáveis de *L. reuteri* em 4 h de interação *in vitro* com MK-7. De forma semelhante, em outro estudo, a MK-4 aumentou o crescimento de espécies de *Bifidobacterium*. Entretanto, algumas dessas espécies reduziram a quantidade de MK-4 no meio, sugerindo que algumas dessas bactérias consomem ou absorvem essa vitamina (Hojo et al., 2007). A

quantidade de bactérias viáveis é importante pois o sistema gastrointestinal oferece desafios às bactérias probióticas. Dessa forma, o aumento significativo do módulo de elasticidade no grupo que recebeu a associação, poderia possivelmente ser explicado pela maior quantidade de *L. reuteri* que alcançou o intestino, por utilizar a vitamina como prebiótico para o estímulo de seu crescimento. O aumento desse microrganismo no intestino provavelmente está relacionado à redução do pH intestinal, o que facilitaria a absorção de nutrientes, que por sua vez se relacionam à composição óssea (Chen et al., 2017; D'Amelio, Sassi, 2018; Ohlsson, Sjögren, 2018). Porém, novos estudos se fazem necessários para elucidar os possíveis potenciais prebióticos da vitamina K2 quando associada à cultura *L. reuteri*.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que, o tratamento com *L. reuteri*, assim como a sua associação com a MK-7, melhoraram significativamente as propriedades biomecânicas de fêmures e demonstraram uma tendência positiva na microarquitetura vertebral, exibindo uma resposta sítio-específica. Tais alterações não estão associadas aos níveis séricos de osteocalcina carboxilada, não carboxilada, à expressão gênica de *Ocludina* ou *Jam3*, nem à relação vilo/crípta do jejuno, que não foram alteradas pela ovariectomia ou pelos tratamentos. A associação entre vitamina K e probiótico levou a maior biomassa e quantidade de células viáveis *in vitro*, o que nos faz levantar a hipótese de que o aumento significativo do módulo de elasticidade após o tratamento com a associação entre vitamina K e probiótico pode estar relacionado à maior quantidade de *L. reuteri* que alcançou o intestino, por utilizar a vitamina para o estímulo de seu crescimento.

REFERÊNCIAS*

Adler RA, Gill RS. Clinical utility of denosumab for treatment of bone loss in men and women. *Clin Interv Aging*. 2011;6:119-24. doi: 10.2147/CIA.S14565. PubMed PMID: 21753866.

Amin N, Boccardi V, Taghizadeh M, Jafarnejad S. Probiotics and bone disorders: the role of RANKL/RANK/OPG pathway. *Aging Clin Exp Res*. 2020;32(3):363-71. doi: 10.1007/s40520-019-01223-5. PubMed PMID: 31119697.

American Society of Agricultural and Biological Engineers - ASABE. ANSI/ASAE S459 MAR98: shear and three-point bending test of animal bone. Saint Joseph: ASABE; 1998.

Arden NK, Earl S, Fisher DJ, Cooper C, Carruthers S, Goater M. Persistence with teriparatide in patients with osteoporosis: the UK experience. *Osteoporos Int*. 2006;17(11):1626-9. doi: 10.1007/s00198-006-0171-5. PubMed PMID: 16823543.

Asok A, Bhandary R, Shetty M, Shenoy N. Probiotics and periodontal disease. *Int J Oral Heal Sci*. 2018;8(2):68-72. doi: 10.4103/ijohs.ijohs_10_18.

Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. *Clin Interv Aging*. 2015;10:583-91. doi: 10.2147/CIA.S54614.

Bi X, Patil CA, Lynch CC, Pharr GM, Mahadevan-Jansen A, Nyman JS. Raman and mechanical properties correlate at whole bone- and tissue- levels in a genetic mouse model. *J Biomech*. 2011;44(2): 297-303. doi: 10.1016/j.jbiomech.2010.10.009. PubMed PMID: 21035119.

Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep*. 2013;2:447. doi: 10.1038/bonekey.2013.181. PubMed PMID: 24501681.

Britton RA, Irwin R, Quach D, Schaefer L, Zhang J, Lee T, et al. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model. *J Cell Physiol*. 2014;229(11):1822-30. doi: 10.1002/jcp.24636. PubMed PMID: 24677054.

Brooijmans R, Smit B, Santos F, van Riel J, de Vos WM, Hugenholtz J. Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact*. 2009;8:1-11. doi: 10.1186/1475-2859-8-28. PubMed PMID: 19480672.

Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res*. 2007;22(3):465-75. doi: 10.1359/jbmr.061113. PubMed PMID: 17144789.

Charles JF, Ermann J, Aliprantis AO, Jimmy O, Way F. The intestinal microbiome and skeletal fitness: connecting bugs and bones. *Clin Immunol.* 2015;159(2):163-9. doi: 10.1016/j.clim.2015.03.019. PubMed PMID: 25840106.

Chen YC, Greenbaum J, Shen H, Deng HW. Association between gut microbiota and bone health: potential mechanisms and prospective. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(10):3635-46. doi: 10.1210/jc.2017-00513. PubMed PMID: 28973392.

Cirilli I, Orlando P, Silvestri S, Marcheggiani F, Dlodla PV, Kaesler N, et al. Carboxylative efficacy of trans and cis MK7 and comparison with other vitamin K isomers. *Res Commun.* 2022;48(5):1129-36. doi: 10.1002/biof.1844.

Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut Microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol.* 2014;28(8):1221-38. doi: 10.1210/me.2014-1108. PubMed PMID: 24892638.

Collins FL, Rios-Arce ND, Atkinson S, Bierhalter H, Schoenherr D, Bazil JN, et al. Temporal and regional intestinal changes in permeability, tight junction, and cytokine gene expression following ovariectomy-induced estrogen deficiency. *Physiol Rep.* 2017a;5(9):1-22. doi: 10.14814/phy2.13263. PubMed PMID: 28468850.

Collins FL, Rios-Arce ND, Schepper JD, Parameswaran N, McCabe LR. The potential of probiotics as a therapy for osteoporosis. *Microbiol Spectr.* 2017b;5(4):1-26. doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0015-2016. PubMed PMID: 28840819.

Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2014;25(10):2359-81. doi: 10.1007/s00198-014-2794-2. PubMed PMID: 25182228.

Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M, Francavilla R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: a door to the body. *Front Immunol.* 2021;12:578386. doi: 10.3389/fimmu.2021.578386. PubMed PMID: 33717063.

D'Amelio P, Sassi F. Gut microbiota, immune system, and bone. *Calcif Tissue Int.* 2018;102(4):415-25. doi: 10.1007/s00223-017-0331-y. PubMed PMID: 28965190.

Deckard C, Walker A, Hill BJ. Using three-point bending to evaluate tibia bone strength in ovariectomized young mice. *J Biol Phys.* 2017;43(1):139-48. doi: 10.1007/s10867-016-9439-y. PubMed PMID: 28132161.

Eleftheriou F, Campbell PMY, Ma Y. Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):140-51. doi: 10.1007/s00223-013-9752-4. PubMed PMID: 23765388.

Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spieckermann S, Haller D, Heimesaat MM, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(8):4557-76. PubMed PMID: 25197329.

Fait T. Menopause hormone therapy: Latest developments and clinical practice. *Drugs Context*. 2019;8:212551. doi: 10.7573/dic.212551. PubMed PMID: 30636965.

Festing MF. On determining sample size in experiments involving laboratory animals. *Lab Anim*. 2018;52(4):341-50. doi: 10.1177/0023677217738268. PubMed PMID: 29310487.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/ World Health Organization (WHO). Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live Lactic Acid Bacteria. *FAO Food Nutr Pap*. 2001;1-50.

Fu X, Moreines J, Booth SL. Vitamin K supplementation does not prevent bone loss in ovariectomized Norway rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):12. doi: 10.1186/1743-7075-9-12. PubMed PMID: 22348311.

Gagliardi I, Celico M, Gamberini MR, Pontrelli M, Fortini M, Carnevale A, et al. Efficacy and safety of teriparatide in beta-thalassemia major associated osteoporosis: a real-life experience. *Calcif Tissue Int*. 2022;111(1):56-65. doi: 10.1007/s00223-022-00963-3. PubMed PMID: 35243531.

Gu Q, Zhang C, Song D, Li P, Zhu X. Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. *Int J Food Microbiol*. 2015;206:56-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.033. PubMed PMID: 25955289.

Guo S, Xv J, Li Y, Bi Y, Hou Y, Ding B. Interactive effects of dietary vitamin K3 and *Bacillus subtilis* PB6 on the growth performance and tibia quality of broiler chickens with sex separate rearing. *Animal*. 2020;3:1-9. doi: 10.1017/S1751731120000178.

Halder M, Petsophonsakul P, Akbulut AC, Pavlic A, Bohan F, Anderson E, et al. Vitamin K: Double bonds beyond coagulation insights into differences between vitamin K1 and K2 in health and disease. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(4):1-15. <https://doi.org/10.3390/ijms20040896>. PubMed PMID: 30791399.

Hojo K, Nagaoka S, Murata S, Taketomo N, Ohshima T, Maeda N. Reduction of vitamin K concentration by salivary *Bifidobacterium* strains and their possible nutritional competition with *Porphyromonas gingivalis*. *J Appl Microbiol*. 2007;103(5):1969-74. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03436.x. PubMed PMID: 17953607.

Iwamoto D, Masaki C, Shibata Y, Watanabe C, Nodai T, Munemasa T, et al. Microstructural and mechanical recovery of bone in ovariectomized rats: the effects of menaquinone-7. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2021;120:104571. doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104571. PubMed PMID: 34029943.

Jia L, Tu Y, Jia X, Du Q, Zheng X, Yuan Q, et al. Probiotics ameliorate alveolar bone loss by regulating gut microbiota. *Cell Prolif*. 2021;54(7):e13075. doi: 10.1111/cpr.13075. PubMed PMID: 34101283.

Keller J, Schinke T. The role of the gastrointestinal tract in calcium homeostasis and bone remodeling. *Osteoporos Int.* 2013;24(11):2737-48. doi: 10.1007/s00198-013-2335-4. PubMed PMID: 23536255.

Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(7):632-7. doi: 10.1016/S0025-6196(11)60752-0. PubMed PMID: 19567717.

Kwon O, Han TS, Son MY. Intestinal morphogenesis in development, regeneration, and disease: the potential utility of intestinal organoids for studying compartmentalization of the crypt-villus structure. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:593969. doi: 10.3389/fcell.2020.593969. PubMed PMID: 33195268.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker S. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8:171-84. Doi: 10.1038/nrmicro2297

Lawenius L, Colldén H, Horkeby K, Wu J, Grahnmö L, Vandenput L, et al. A probiotic mix partially protects against castration-induced bone loss in male mice. *J Endocrinol.* 2022;254(2):91-101. doi: 10.1530/JOE-21-0408. PubMed PMID: 35661635.

Li JY, Chassaing B, Tyagi AM, Vaccaro C, Luo T, Adams J, et al. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *J Clin Invest.* 2016a;126(6):2049-63. doi: 10.1172/JCI86062. PubMed PMID: 27111232.

Li J, Zhang H, Yang C, Li Y, Dai Z. An overview of osteocalcin progress. *J Bone Miner Metab.* 2016b;34(4):367-79. doi: 10.1007/s00774-015-0734-7. PubMed PMID: 26747614.

Liu Y, Van Bennekom EO, Zhang Y, Abee T, Smid EJ. Long-chain vitamin K2 production in *Lactococcus lactis* is influenced by temperature, carbon source, aeration and mode of energy metabolism. *Microb Cell Fact.* 2019; 18(1):129. doi: 10.1186/s12934-019-1179-9. PubMed PMID: 31387603.

Liu XL, Li CL, Lu WW, Cai WX, Zheng LW. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):392-8. doi: 10.1111/clr.12360. PubMed PMID: 24593016.

Lobo RA. Hormone-replacement therapy: current thinking. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(4):220-31. doi: 10.1038/nrendo.2016.164. PubMed PMID: 27716751.

Ma S, Qin J, Hao Y, Shi Y, Fu L. Structural and functional changes of gut microbiota in ovariectomized rats and their correlations with altered bone mass. *Aging (Albany NY).* 2020;12(11):10736-53. doi: 10.18632/aging.103290. PubMed PMID: 32484785.

Mabilleau G. Interplay between bone and incretin hormones: a review. *Morphologie*. 2017;101(332):9-18. doi: 10.1016/j.morpho.2016.06.004. PubMed PMID: 27423214.

McCabe LR, Irwin R, Schaefer L, Britton RA. Probiotic use decreases intestinal inflammation and increases bone density in healthy male but not female mice. *J Cell Physiol*. 2013;228(8):1793-8. doi: 10.1002/jcp.24340. PubMed PMID: 23389860.

Mu Q, Tavella VJ, Luo XM. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Front Microbiol*. 2018;9:757. doi: 10.3389/fmicb.2018.00757. PubMed PMID: 29725324.

Myneni VD, Mezey E. Immunomodulatory effect of vitamin K2: Implications for bone health. *Oral Dis*. 2018;24(1–2):67-71. doi: 10.1111/odi.12759. PubMed PMID: 29480629.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001;285(6):785-95. doi: 10.1001/jama.285.6.785. PubMed PMID: 11176917.

Nilsson AG, Sundh D, Bäckhed F, Lorentzon M. *Lactobacillus reuteri* reduces bone loss in older women with low bone mineral density: a randomized, placebo-controlled, double-blind, clinical trial. *J Intern Med*. 2018;284(3):307-17. doi: 10.1111/joim.12805. PubMed PMID: 29926979.

O'Connor EM, Durack E. Osteocalcin: The extra-skeletal role of a vitamin K-dependent protein in glucose metabolism. *J Nutr Intermed Metab*. 2017;7:8-13. doi: 10.1016/j.jnim.2017.01.001.

Ohlsson C, Engdahl C, Fak F, Andersson A, Windahl SH, Farman HH, et al. Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. *PLoS One*. 2014;9(3):e92368. doi: 10.1371/journal.pone.0092368. PubMed PMID: 24637895.

Ohlsson C, Sjögren K. Osteomicrobiology: a new cross-disciplinary research field. *Calcif Tissue Int*. 2018;102(4):426-32. doi: 10.1007/s00223-017-0336-6. PubMed PMID: 29079994.

Omelka R, Martiniakova M, Svik K, Slovak L, Payer J, Oppenbergerova I, et al. The effects of eggshell calcium (Biomim H®) and its combinations with alfacalcidol (1 α -hydroxyvitamin D3) and menaquinone-7 (vitamin K2) on ovariectomy-induced bone loss in a rat model of osteoporosis. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2021;105(2):336-44. doi: 10.1111/jpn.13458. PubMed PMID: 33012134.

Pacifici R. Bone remodeling and the microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(4):a031203. doi: 10.1101/cshperspect.a031203. PubMed PMID: 28847904.

Palermo A, Tuccinardi D, D'Onofrio L, Watanabe M, Maggi D, Maurizi AR, et al. Vitamin K and osteoporosis: myth or reality? *Metabolism*. 2017;70:57-71. doi: 10.1016/j.metabol.2017.01.032. PubMed PMID: 28403946.

Pan MH, Maresz K, Lee PS, Wu JC, Ho CT, Popko J, et al. Inhibition of TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β by pretreatment of human monocyte-derived macrophages with menaquinone-7 and cell activation with TLR agonists in vitro. *J Med Food*. 2016;19(7):663-9. doi: 10.1089/jmf.2016.0030. PubMed PMID: 27200471.

Parker EA, Roy T, D'Adamo CR, Wieland LS. Probiotics and gastrointestinal conditions: an overview of evidence from the Cochrane Collaboration. *Nutrition*. 2018;45:125-34. doi: 10.1016/j.nut.2017.06.024. PubMed PMID: 28870406.

Parvaneh K, Jamaluddin R, Karimi G, Erfani R. Effect of probiotics supplementation on bone mineral content and bone mass density. *Sci World J*. 2014;2014:595962. doi: 10.1155/2014/595962.

Pelicano ERL, Souza PA, Souza HBA, Figueiredo DF, Boiago MM, Carvalho SR, et al. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Rev Bras Ciência Avícola*. 2005;7(4):221-9. doi:10.1590/s1516635x2005000400005.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25103-8. doi: 10.1074/jbc.R109.041087. PubMed PMID: 20501658.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659-61. doi: 10.1096/fj.07-9574LSF. PubMed PMID: 17942826.

Ren C, Zhang Q, de Haan BJ, Zhang H, Faas MM, de Vos P. Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Sci Rep*. 2016;6:34561. doi: 10.1038/srep34561. PubMed PMID: 27708357.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11):1939-51. doi: 10.1093/jn/123.11.1939. PMID: 8229312.

Rossini M, Adami S, Bertoldo F, Diacinti D, Gatti D, Giannini S, et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis. *Reumatismo*. 2016;68(1):1-39. doi: 10.4081/reumatismo.2016.870. PubMed PMID: 27339372.

Sato T. Vitamin K2 and bone quality. *Vitam Trace Elem*. 2012:S6. doi: 10.4172/2167-0390.S6-001.

Sato T, Inaba N, Yamashita T. MK-7 and its effects on bone quality and strength. *Nutrients*. 2020;12:965. doi:10.3390/nu12040965.

Schaefer L, Auchtung TA, Hermans KE, Whitehead D, Borhan B, Britton RA. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*. 2010;156(6):1589-99. doi: 10.1099/mic.0.035642-0. PubMed PMID: 20150236.

Schepper JD, Collins FL, Rios-Arce ND, Raehtz S, Schaefer L, Gardinier JD, et al. Probiotic *Lactobacillus reuteri* prevents postantibiotic bone loss by reducing intestinal dysbiosis and preventing barrier disruption. *J Bone Miner Res*. 2019;34(4):681-98. doi: 10.1002/jbmr.3635. PubMed PMID: 30690795.

du Sert NP, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2020;18(7):e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410. PMID: 32663219.

Shearer MJ, Fu X, Booth SL. Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Adv Nutr*. 2012;3(2):182-95. doi: 10.3945/an.111.001800.

Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost*. 2008;100(4):530-47. PMID: 18841274.

Sophocleous A, Idris AI. Rodent models of osteoporosis. *Bonekey Rep*. 2014;3:614. doi: 10.1038/bonekey.2014.109.

Souza VR, Mendes E, Casaro M, Antiorio ATFB, Oliveira FA, Ferreira CM. Description of ovariectomy protocol in mice. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:303-9. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_29. PubMed PMID: 30535707.

Sözen T, Özişik L, Basaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*. 2017;4(1):46-56. doi: 10.5152/eurjrheum.2016.048. PubMed PMID: 28293453.

Spinler JK, Sontakke A, Hollister EB, Venable SF, Oh PL, Balderas MA, et al. From prediction to function using evolutionary genomics: Human-specific ecotypes of *Lactobacillus reuteri* have diverse probiotic functions. *Genome Biol Evol*. 2014;6(7):1772-89. doi: 10.1093/gbe/evu137. PubMed PMID: 24951561.

Thaung Zaw JJ, Howe PRC, Wong RHX. Postmenopausal health interventions: Time to move on from the Women's Health Initiative? *Ageing Res Rev*. 2018;48:79-86. doi: 10.1016/j.arr.2018.10.005. PubMed PMID: 30355506.

Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP, Hemarajata P, Trinh DV, Hu W, et al. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNFvia modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One*. 2012;7(2):1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0031951. PubMed PMID: 22384111.

Tsukamoto Y. Studies on action of menaquinone-7 in regulation of bone metabolism and its preventive role of osteoporosis. *Biofactors*. 2004;22(1-4):5-19. doi: 10.1002/biof.5520220102. PubMed PMID: 15630245.

Tu KN, Lie JD, Wan CKV, Cameron M, Austel AG, Nguyen JK, et al. Osteoporosis: a review of treatment options. *P T*. 2018;43(2):92-104. PubMed PMID: 29386866.

Vasquez EC, Pereira TMC, Peotta VA, Baldo MP, Campos-Toimil M. Probiotics as beneficial dietary supplements to prevent and treat cardiovascular diseases: uncovering their impact on oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1-11. doi: 10.1155/2019/3086270. PubMed PMID: 31205584.

Vermeer C, Raes J, van 't Hoofd C, Knapen MMHJ, Xanthoulea S. Menaquinone Content of Cheese. *Nutrients*. 2018;10(4):446. doi: 10.3390/nu10040446.

Wagatsuma K, Yamada S, Ao M, Matsuura M, Tsuji H, Iida T, et al. Diversity of gut microbiota affecting serum level of undercarboxylated osteocalcin in patients with crohn's disease. *Nutrients*. 2019;11(7):1541. <https://doi.org/10.3390/nu11071541>.

Walther B, Karl JP, Booth SL, Boyaval P. Menaquinones, bacteria, and the food supply: the relevance of dairy and fermented food products to vitamin K requirements. *Adv Nutr*. 2013;4(4):463-73. <https://doi.org/10.3945/an.113.003855>. PubMed PMID: 23858094.

World Health Organization - WHO. Guidelines for preclinical evaluation and clinical trials in osteoporosis. Geneva: 1998.

Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *Physiol Behav*. 2014;29(11):2520-6. doi: 10.1002/jbmr.2269. PubMed PMID: 24771492.

Xiao ZF, He JB, Su GY, Chen MH, Hou Y, Chen SD, et al. Osteoporosis of the vertebra and osteochondral remodeling of the endplate causes intervertebral disc degeneration in ovariectomized mice. *Arthritis Res Ther*. 2018;20:207. doi: 10.1186/s13075-018-1701-1.

Yamaguchi M, Taguchi H, Gao YH, Igarashi A, Tsukamoto Y. Effect of vitamin K2 (menaquinone-7) in fermented soybean (natto) on bone loss in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 1999;17(1):23-9. doi: 10.1007/s007740050059. PubMed PMID: 10084398.

Yamaguchi M, Kakuda H, Gao YH, Tsukamoto Y. Prolonged intake of fermented soybean (natto) diets containing vitamin K2 (menaquinone-7) prevents bone loss in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2000;18(2):71-6. doi: 10.1007/s007740050014. PubMed PMID: 10701161.

Yamaguchi M, Weitzmann MN. Vitamin K2 stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B activation. *Int J Mol Med*. 2011;27(1):3-14. doi: 10.3892/ijmm.2010.562. PubMed PMID: 21072493.

Yang Z, Wen A, Qin L, Zhu Y. Effect of coix seed extracts on growth and metabolism of *Limosilactobacillus reuteri*. *Foods*. 2022;11(2):187. doi: 10.3390/foods11020187. PMID: 35053919.

Yoo JY, Kim SS. Probiotics and prebiotics: Present status and future perspectives on metabolic disorders. *Nutrients*. 2016;8(3):1-20. doi: 10.3390/nu8030173. PubMed PMID: 26999199.

Zhang J, Motyl KJ, Irwin R, MacDougald OA, Britton RA, McCabe LR. Loss of bone and Wnt10b expression in male type 1 diabetic mice is blocked by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Endocrinology*. 2015;156(9):3169-82. doi: 10.1210/EN.2015-1308. PubMed PMID: 26135835.

ANEXO A – Parecer CEUA



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 18/2019, intitulado:- **"Influência de Lactobacillus Reuteri Viável, não-Viável e Associações com vitaminas D e K em camundongos ovariectomizados"** sob a responsabilidade ANA LIA ANBINDER, tendo como colaboradoras:- JAQUELINE LEMES RIBEIRO, THAÍS AGUIAR SANTOS, LUISA SOUZA BATISTELLI e LARISSA SANDY LEITE e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 17/12/2019 e alterado na Reunião do dia 13/12/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	06/01/2020 a 31/12/2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongos isogênico Balb/c
Nº de Animais	80 (oitenta)
Peso/Idade	10 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério da UNICAMP - CEMIB
Compromisso/Relatório(s)	Final:- 12/12/2021 a 31/12/2022 -Envio para a CEUA:- 31/01/2023
Alterações	Em 13/12/2021, foram incluídos os nomes das Colaboradoras LUISA SOUZA BATISTELLI e LARISSA SANDY LEITE

São José dos Campos, 13 de dezembro de 2021

Andrea Carvalho de Marco

Profa.Dra ANDREA CARVALHO DE MARCO
COORDENADORA/CEUA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax (12) 3947-9028 / carlos.guedes@unesp.br/ andrea.marco@unesp.br