

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**EFEITO DO CONSUMO DE "IOGURTE" DE SOJA
SUPLEMENTADO COM ISOFLAVONAS E CÁLCIO
SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS MADURAS
OVARIECTOMIZADAS**

RAQUEL BEDANI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Ciência de Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área Ciência dos Alimentos.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. ELIZEU ANTONIO ROSSI

ARARAQUARA
2005

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

Bedani, Raquel

B299e

Efeito do consumo de "iogurte" de soja suplementado com isoflavonas e cálcio sobre o tecido ósseo de ratas maduras ovariectomizadas / Raquel Bedani .
– Araraquara, 2005.

101 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Elizeu Antonio Rossi

1. Iogurte de soja. 2. Isoflavonas. 3. Cálcio. 4. Osteoporose. I. Rossi, Elizeu Antonio, orient. .II. Título.

CDD: 664

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi
(Orientador)**

Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez

Prof^a Dr^a Iracilda Zeppone Carlos

Prof^a Dr^a Maria Rita Marques de Oliveira

Prof. Dr. João Bosco Faria

Dedico este trabalho aos meus pais, Dorival e Fátima, alicerces de toda e cada etapa sonhada e cumprida em minha vida

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da existência, por ser meu pai e meu pão; por me conduzir, guarda e me iluminar com Sua infinita bondade e sabedoria.

Aos meus pais, Dorival e Fátima, pelo amor incondicional, pela dedicação integral e pela calorosa generosidade.

A minha querida irmã, Renata, pela alegre companhia e amoroso apoio.

Ao Neto, pelo amor e por sempre me apoiar em tudo que faço.

Ao Prof. Dr. Elizeu A. Rossi, pela amizade, dedicação, disposição e confiança depositada em mim durante todos esses anos.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição, pela contribuição direta ou indireta para minha formação acadêmica.

À Seção de Pós-graduação da FCFAR: Cláudia, Sônia e Laura, pelo carinho, atenção e profissionalismo dispensados durante minha estada no programa.

À Prof^a Dr^a Keico do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar pelo empréstimo da máquina de ensaio de flexão e ao Charles e Darnival pela atenção e ajuda na realização dos ensaios.

Ao técnico do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, José Carlos Lopes, pela imensa ajuda na ovariectomia dos animais.

Ao Sr. Sebastião do Instituto de Química/UNESP-Araraquara pela ajuda na realização da microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Dr. José Salvador Lepera do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia pela ajuda na espectrofotometria de absorção atômica.

A Roseli, pela ajuda e amizade em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de tecnologia de Alimentos (os que estão e os que já se foram), pela ajuda e amizade em todos os momentos.

Às amigas Graciela e Mara, por tantos momentos enriquecedores que passamos juntas.

Aos membros da banca examinadora, pela relevante contribuição acadêmica e científica prestada a essa dissertação, através das correções e sugestões sugeridas.

A Capes pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Resumo	xii
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	2
2. Objetivos.....	6
3. Revisão Bibliográfica.....	8
3.1. Climatério e menopausa.....	8
3.2. Soja.....	9
3.3. “Iogurte” de soja.....	12
3.4. Isoflavonas.....	14
3.4.1. Efeitos das isoflavonas na saúde.....	19
4. Material e Métodos.....	41
4.1. Material.....	41
4.1.1. Obtenção das amostras.....	39
4.2. Animais experimentais.....	41
4.3. Protocolo Experimental.....	42
4.4. Métodos.....	45
4.4.1. Comprimento ósseo.....	45
4.4.2. Ensaio mecânico de flexão de três pontos.....	45
4.4.3. Peso, volume e densidade óssea.....	46
4.4.4. Conteúdo mineral ósseo.....	46
4.4.5. Conteúdo de cálcio ósseo.....	47

4.4.6. Análise de superfície óssea trabecular por microscopia eletrônica de varredura.....	47
4.4.7. Análise estatística dos dados.....	49
5. Resultados e Discussão.....	51
6. Conclusões	75
7. Considerações Finais.....	77
8. Referências Bibliográficas.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Conteúdo de isoflavonas em diferentes produtos de soja (µg/g).....	15
Tabela 2.	Isoflavonas da soja e seus respectivos radicais.....	17
Tabela 3.	Conteúdo aproximado de cálcio em alguns tipos de alimentos.....	31
Tabela 4.	Grupo de animais e os diferentes tratamentos durante o experimento.....	44
Tabela 5.	Peso das ratas.....	51
Tabela 6.	Comprimento (mm) das tíbias e fêmures esquerdos relativos aos diferentes grupos experimentais.....	56
Tabela 7.	Parâmetros físicos ósseos relativos aos diferentes grupos experimentais.....	58
Tabela 8.	Parâmetros químicos das tíbias esquerdas e fêmures direitos relativos aos diferentes grupos experimentais.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura das isoflavonas da soja.....	15
Figura 2.	Comparação da estrutura do estradiol e da genisteína.....	18
Figura 3.	Distribuição das ratas em gaiolas de contenção.....	42
Figura.4.	Anestesia e incisão lateral.....	43
Figura 5.	Exposição do ovário.....	43
Figura 6.	Laqueadura com linha.....	43
Figura 7.	Ovariectomia.....	43
Figura 8.	Administração do produto aos animais.....	44
Figura 9.	Ganho médio de peso corporal (g) dos diferentes grupos experimentais.....	52
Figura 10.	Carga máxima (kN) suportada até o momento de ruptura das tíbias direitas dos diferentes grupos experimentais.....	62
Figura 11.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo I (pseudo-ovariectomizado).....	66
Figura 12.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo I (pseudo-ovariectomizado).....	66
Figura 13.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo I (pseudo-ovariectomizado).....	66
Figura 14.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo II (ovariectomizado).....	67
Figura 15.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo II (ovariectomizado).....	67
Figura 16.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo II (ovariectomizado).....	67
Figura 17.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo III (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio).....	68

Figura 18.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo III (ovariectomizado produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio).....	68
Figura 19.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo III (ovariectomizado produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio).....	68
Figura 20.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo IV (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com cálcio).....	69
Figura 21.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo IV (ovariectomizado + ovariectomizado + produto fermentado suplementado com cálcio).....	69
Figura 22.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo IV (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com cálcio).....	69
Figura 23.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo V (ovariectomizado + placebo suplementado com cálcio).....	70
Figura 24.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo V (ovariectomizado + placebo suplementado com cálcio).....	70
Figura 25.	Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo V (ovariectomizado + placebo suplementado com cálcio).....	70
Figura 26.	Largura das trabéculas (μm) da porção média distal dos fêmures esquerdos dos diferentes grupos experimentais.....	72

RESUMO

A osteoporose é uma doença crônica que afeta principalmente mulheres na pós-menopausa, e caracteriza-se por perda de massa óssea e deterioração da arquitetura do tecido ósseo, sendo considerada como um sério problema de saúde pública. A Terapia de Reposição Hormonal (TRH) é talvez o tratamento mais efetivo para reduzir a perda óssea, no entanto vem acompanhada por efeitos adversos como o aumento do risco de câncer de mama e de endométrio. Terapias alternativas, como a ingestão de isoflavonas, vêm sendo propostas a fim de se prevenir a osteoporose. As isoflavonas, um tipo de fitoestrógeno, parecem desenvolver atividade biológica parecida com a dos estrógenos de mamíferos, pois apresentam habilidade para se ligarem aos receptores estrogênicos. Além disso, estudos em animais e em humanos têm mostrado que as isoflavonas vêm se constituindo numa alternativa interessante para o controle do metabolismo lipídico e da obesidade. Além das isoflavonas, uma das possíveis maneiras de se prevenir a perda óssea é por meio da ingestão de quantidades adequadas de cálcio, um dos componentes dietéticos de maior importância para a manutenção da integridade óssea. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da ingestão do “iogurte” de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti*, suplementado com isoflavonas e cálcio sobre o peso corpóreo e tecido ósseo de ratas maduras ovariectomizadas. Os animais foram divididos em 5 grupos, cada qual com 9 animais: pseudo-ovariectomizado, ovariectomizado; ovariectomizado que ingeriu o produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio, ovariectomizado que ingeriu o produto fermentado suplementado com cálcio e ovariectomizado que ingeriu placebo suplementado com cálcio. O tratamento durou 3 meses e foram utilizados tíbias e fêmures de cada animal para análise do comprimento ósseo; ensaio mecânico de flexão de três pontos; peso, volume e densidade óssea; conteúdo mineral ósseo; conteúdo de cálcio ósseo; medida das larguras das trabéculas. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio foi capaz de evitar o aumento do peso corpóreo causado pela ovariectomia, além de apresentar um efeito protetor sobre a largura das trabéculas, efeito também observado no grupo que consumiu o produto fermentado suplementado apenas com cálcio.

Palavras-chave: “iogurte” de soja, isoflavonas, cálcio, osteoporose

ABSTRACT

Osteoporosis is a chronic disease that affects mainly postmenopausal women, and it is characterized by bone loss and deterioration of the bone tissue architecture, and it is considered a serious problem of public health. The Hormonal Replacement Therapy (HRT) is the most effective treatment to reduce the bone loss, however it may be associated with adverse effects as the increase of the risk of endometrium and breast cancer. Alternative therapies, as intake of isoflavones, have been proposed to prevent the osteoporosis. Isoflavones, a type of phytoestrogens, seem to have biological activity like the mammalian estrogens, because they present the ability to bind to the estrogen receptors. Moreover, studies in animals and in humans have shown that isoflavones may be an interesting alternative for the control of the lipidic metabolism and the obesity. On the other hand, the intake of adequate amounts of calcium, one of the dietary components of greater importance for the maintenance of the bone integrity, is also considered to be able to prevent the bone loss. Then, the objective of this research was to study the effect of the intake of the soy "yoghurt", fermented with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus jugurti*, supplemented with isoflavones and calcium on the corporal weight and bone tissue of ovariectomized mature rats. The animals had been divided into 5 groups, each one with 9 animals: sham-ovariectomized, ovariectomized; ovariectomized treated with soy "yoghurt" supplemented with isoflavones and calcium, ovariectomized treated with soy "yoghurt" supplemented with calcium and ovariectomized treated with placebo supplemented with calcium. The treatment lasted 3 months and the tibia and femur of each animal were used for the following analysis: bone length; mechanical assay of three points; weight, volume and bone density; bone mineral content; bone calcium content; measure of the trabecular widths. In conclusion, the soy "yoghurt" supplemented with isoflavones and calcium was able to prevent the increase of the corporal weight caused by the ovariectomy, and to exert a protective effect on the trabecular width. This effect was also observed in the group treated with soy "yoghurt" only supplemented with calcium.

Key words: soy "yoghurt", isoflavones, calcium, osteoporosis

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o setor de alimentos vem investindo de maneira crescente no desenvolvimento de uma classe especial de produtos – os alimentos funcionais – que vem sendo amplamente estudada em decorrência de seus vários efeitos benéficos à saúde, destacando-se suas propriedades profiláticas e terapêuticas. A soja, alimento de consumo universal, constitui-se em um produto de grande importância no que se refere a alimentos funcionais. Com relação ao conceito de alimento funcional, a soja abre perspectivas às indústrias alimentícias para o desenvolvimento de diversas formulações alimentares. Vale ressaltar que o Brasil está entre os principais produtores mundiais de soja, no entanto, a maior parte dessa produção é exportada. Desta forma, o desenvolvimento de produtos a base de soja seria uma das alternativas para se aumentar a presença dessa leguminosa na dieta brasileira.

O consumo da soja “in natura” ou mesmo processada na forma de derivados tem despertado um grande interesse da população e, principalmente, dos pesquisadores, não só por ser considerada uma fonte importante de nutrientes de baixo custo, mas particularmente pela sua capacidade de diminuir o risco de determinadas doenças crônico-degenerativas.

Os alimentos funcionais apresentam substâncias com distintas funções biológicas denominadas de componentes bioativos, que são capazes de modular a fisiologia do organismo, garantindo a manutenção da saúde. Entre as substâncias presentes na soja responsáveis pelos efeitos benéficos associados ao seu consumo, as de maior interesse, atualmente, são as isoflavonas, particularmente a genisteína e daidzeína. As isoflavonas são denominadas fitoestrógenos por serem capazes de provocar uma resposta estrogênica em animais experimentais. Estudos em cultura de células, modelos animais e alguns ensaios clínicos em humanos indicaram ação das isoflavonas na prevenção e diminuição de cânceres, relacionados ou não a hormônios; efeito protetor contra doenças cardiovasculares; redução das concentrações séricas de colesterol; alívio dos sintomas da menopausa e benefícios no tratamento da osteoporose

Nesse sentido, há, hoje em dia, um grande interesse relacionado com a possibilidade das isoflavonas protegerem o organismo contra a perda óssea induzida pela deficiência estrogênica. Essa é uma das conseqüências que as

mulheres podem sofrer com o início da menopausa, ou seja, a diminuição ou cessação da produção de estrógenos contribuem para acelerar a perda de massa óssea, podendo conduzir a um quadro de osteoporose.

A osteoporose é uma doença crônica que afeta principalmente mulheres na pós-menopausa, e caracteriza-se por perda de massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a um aumento de sua fragilidade e um conseqüente aumento do risco de fraturas. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, um terço das mulheres brancas acima de 65 anos são portadoras de osteoporose. Estima-se que cerca de 50% das mulheres com mais de 75 anos venham a sofrer alguma fratura em decorrência dessa doença (WHO, 1994).

Além das isoflavonas, uma das possíveis maneiras de minimizar o problema da osteoporose é por meio da ingestão de altas quantidades de cálcio. É preciso, entretanto, que este cálcio seja bem absorvido, pouco excretado pela urina e que possa ser fixado nos ossos. No entanto, os resultados são conflitantes no que se refere à ingestão de cálcio dietético e à perda da massa óssea.

A soja representa uma fonte moderada de cálcio, com biodisponibilidade desse elemento igual à dos derivados lácteos (FISHBEIN, 2004) . É importante ressaltar que a proteína de soja diminui a excreção urinária de cálcio. Tem sido proposto que a excreção urinária do cálcio induzida pela ingestão de proteína animal constitui-se em um dos fatores que contribui para o surgimento da osteoporose (ADLERCREUTZ, 2002).

A suplementação de estrogênio mais cálcio vem se mostrando eficaz na proteção contra perda óssea (NIEVES et al., 1998). A substituição desse estrógeno por fitoestrógenos, como as isoflavonas, pode representar uma alternativa na prevenção da osteoporose, já que, além de apresentar atividade estrogênica, elas podem minimizar os efeitos colaterais trazidos com a utilização de estrógenos, como por exemplo o câncer de mama (ADLERCREUTZ et al., 1992; MESSINA et al., 1994)

É sabido que a grande maioria de produtos a base de soja apresentam as concentrações de isoflavonas substancialmente reduzidas em decorrência dos diferentes tipos de processamento aos quais são submetidos.

ROSSI et al. (2002) demonstraram que o “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* e *L. jugurti* perde cerca de 92% das isoflavonas originalmente

presentes no grão *in natura*, durante o processamento. Estudos desse tipo sugerem que os derivados de soja, para poderem apresentar um eventual efeito positivo sobre a inibição do desenvolvimento da osteoporose, devem, necessariamente, ser suplementados não só com isoflavonas, mas também com cálcio, uma vez que são também deficientes neste mineral (UMBELINO, 2001a). Com base nas propostas de suplementação do “iogurte” de soja com isoflavonas e cálcio (ROSSI et al., 2002; UMBELINO, 2001a) parece-nos oportuno e de grande interesse estudar o efeito da ingestão desse produto sobre a prevenção da osteoporose.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito da ingestão do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* e *L. jugurti*, suplementado com isoflavonas e cálcio sobre o tecido ósseo de ratas maduras ovariectomizadas.

2.2. Objetivos Específicos

Por meio de um protocolo apropriado, verificar, quanto ao peso corpóreo e tecido ósseo, o efeito do (a):

- Processo fermentativo realizado pelo *E. faecium* e *L. jugurti*;
- Suplementação com isoflavonas + cálcio;
- Suplementação com cálcio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CLIMATÉRIO E MENOPAUSA

Resultados de várias pesquisas mostram que em algumas partes do mundo não existe um termo, empírico ou científico, equivalente para menopausa. Isto porque alguns sintomas identificados no ocidente podem estar ausentes em outras populações, ou, se presentes, tidos como insignificantes (VIGETA e BRÊTAS, 2004). Nesse sentido, com a finalidade de estabelecer um consenso técnico, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1996) define e recomenda a utilização dos seguintes termos: “menopausa natural” para o evento da parada permanente da menstruação, que é resultante da perda da atividade folicular dos ovários e é reconhecido retrospectivamente após um ano de amenorréia sem outra causa patológica ou psicológica; “perimenopausa”, “climatério” ou “transição menopáusica” para o período em que surgem as irregularidades menstruais e queixas vasomotoras, que antecedem a menopausa e vão até o primeiro ano seguinte a ela; “pré-menopausa” como sendo o período total reprodutivo, anterior à menopausa; “pós-menopausa” corresponde ao período após o evento da menopausa, independe da menopausa ter sido natural ou induzida e se prolonga até uma idade avançada. Acredita-se que esse limite se dê por meio da homeostase hormonal que ocorre na velhice, quando a carência estrogênica fica compensada pela perda progressiva dos receptores estrogênicos (BAGNOLI e FONSECA, 1999).

Com o advento da menopausa, além da perda da capacidade reprodutiva, várias outras alterações podem ser observadas. Entre elas, destacam-se o ganho de peso (WING e MATTHEWS, 1991) e o agravamento de certos fatores cardiovasculares de risco (STAMPFER et al., 1991). Um aumento da porcentagem de massa gorda, ambas abdominal e subcutânea, tolerância à glicose e um aumento da concentração plasmática de colesterol total também têm sido registrados (DAWSON-HUGHES e HARRIS, 1992; KAYE et al., 1990).

Há uma relação positiva entre a taxa de ganho de peso ao longo dos anos e o risco de se desenvolver *diabetes mellitus* tipo 2: o ganho de apenas poucos quilogramas pode aumentar esse risco em duas vezes (COLDITZ et al., 1995). Mulheres idosas têm um risco maior quando comparado com as jovens. O

acúmulo de tecido adiposo abdominal difere da gordura subcutânea nos seus efeitos metabólicos: a quantidade abdominal correlaciona-se com o controle da glicose nas mulheres pós-menopausa (BROCHU et al., 2000). A adiposidade abdominal diabetogênica deve ser evitada, mas isso não significa que a gordura subcutânea seja inofensiva: ela é fonte de estrógenos que podem permitir o desenvolvimento de cânceres estógenos-dependentes.

A hipercolesterolemia é também mais prevalente em mulheres na pós-menopausa obesas do que em mulheres jovens e ou magras (DENKE, TEMPOS, GRUNDY, 1994). A hipertensão também está associada com o aumento do tecido adiposo (WILSGAARD, SCHIRMER, ARNESEN, 2000), em mulheres acima de 55 anos, um ganho de peso de 25 kg ao longo de 16 anos pode produzir um risco quatro vezes maior para a hipertensão comparadas com aquelas de peso inalterado. Nos lipídeos séricos, a menopausa favorece a elevação do colesterol total, dos triglicerídeos, da lipoproteína (a), do LDL-colesterol e a redução do HDL-colesterol (CAMPIOLO e MEDEIROS, 2003).

A incidência de câncer de mama varia de acordo com o peso e ganho de peso (VAN DEN BRANDT et al., 2000): mulheres que não fazem uso da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) e que ganharam entre 10 a 20 kg ao longo de 16 anos tiveram um risco 60% maior de desenvolver câncer de mama depois da menopausa. Mulheres que ganharam acima de 20 kg tiveram um risco duas vezes maior. O diagnóstico de câncer uterino é também mais freqüente entre as obesas (TERRY et al., 1999). A explicação para ambos pode estar relacionada aos estrógenos originados da gordura subcutânea (DUBNOV, BRZEZINSKI, BERRY, 2003).

3.2. SOJA

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa cultivada pelos chineses há cerca de cinco mil anos e no início do século XX passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. No Brasil, o grão chegou em 1908, porém a expansão agrícola aconteceu nos anos 70 com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional (SOUZA et al., 2000). O Brasil está entre os principais produtores mundiais de soja, ao lado dos EUA e Argentina, com uma produção estimada para 2004 de aproximadamente 58 milhões de toneladas

(CONAB, 2004). Com relação à exportação, o Brasil é o principal exportador mundial dessa leguminosa.

A soja é considerada um alimento de alto valor nutritivo e de grande importância na alimentação humana rica em proteína (30% a 45%) e em óleo (15% a 25%).

As proteínas de reserva são particularmente ricas em determinados aminoácidos como arginina, leucina e lisina, com uma deficiência observada para metionina e cisteína (NIELSEN, 1985).

O óleo de soja contém cerca de 15% de ácidos graxos saturados e 85% de insaturados, sendo grande seu conteúdo de ácidos graxos essenciais (MORAIS e SILVA, 1996).

Os carboidratos presentes no grão representam cerca de 34%, incluindo aí os oligossacarídeos estaquiose e rafinose (MITAL e STEINKRAUS, 1974).

Ainda quanto à composição química, a soja apresenta um teor de aproximadamente 5% de resíduo mineral, destacando-se potássio, fósforo, cálcio, magnésio, sódio e enxofre, além dos microelementos como silício, ferro, zinco, manganês e cobre (BORDIGNON e MANDARINO, 1994).

Apesar de sua composição quase completa, a soja possui fatores que limitam sua utilização, tais como fatores que dificultam sua digestão, proteínas inibidoras de tripsina (PIT), fatores que aumentam a necessidade de metais (em parte devido à ação quelante do fitato) e vitaminas, e fatores causadores de flatulência relacionados à presença de estaquiose e rafinose, que são oligossacarídeos não metabolizados pelo homem.

No Ocidente, o baixo consumo da soja está relacionado ao sabor, ao odor e aos hábitos alimentares. O sabor descrito como amargo, adstringente e rançoso, resultante da ação da lipoxigenase, é o principal fator limitante do consumo da soja. Todavia, a ação dessa enzima pode ser evitada com um tratamento térmico próximo de 100°C por 5 a 10 minutos (MORAIS e SILVA, 1996). No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias – EMBRAPA vem desenvolvendo variedades de soja próprias para o consumo humano com melhor sabor, alto teor de proteína, redução de fatores antinutricionais e melhoria dos aspectos físicos do grão, tais como tamanho e hilo claro, o que evita o escurecimento do produto quando processado (SOUZA et al., 2000).

Embora, todos os avanços tecnológicos realizados para melhorar a aceitação da soja, no Brasil ela ainda é pequena, exportando-se cerca de 70% da produção nacional, principalmente na forma de grão *in natura*.

As características químicas e nutricionais da soja e seus derivados qualificam-na como um alimento funcional. Além da qualidade de sua proteína, os resultados de estudos mostram que a soja pode ser utilizada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (SETCHELL e CASSIDY et al., 1999). Entre as substâncias presentes na soja responsáveis por esses efeitos, as de maior interesse, atualmente, são as isoflavonas, particularmente a genisteína e daidzeína. Dessa forma, a soja é um dos alimentos que oferece as maiores possibilidades para o desenvolvimento de produtos funcionais (SOUZA et al., 2000).

Nos EUA, em 1999, o “Food and Drug Administration” (FDA), órgão que regulamenta o comércio de alimentos e medicamentos, emitiu um documento enfatizando o potencial da soja na prevenção de doenças cardíacas e autorizando as indústrias a informarem nos rótulos as propriedades do produto para a saúde.

A soja participa da dieta humana por meio do consumo do próprio grão e de alimentos elaborados a partir dele. A população brasileira tradicionalmente não consome soja, por outro lado, as dietas japonesas contêm aproximadamente dez vezes mais soja que, por exemplo, as dietas dos norte-americanos e, além disso, os japoneses são, em todo, mundo os mais longevos e com as mais baixas incidências de doenças hormônio-dependentes (GENOVESE e LAJOLO, 2001).

O grão de soja destina-se principalmente à extração de óleo vegetal, amplamente consumido pela população brasileira, sendo a torta ou farelo resultantes utilizados para produção de ração animal ou de derivados protéicos, cuja funcionalidade os torna ingredientes importantes de diversos produtos alimentícios.

Dentre os alimentos produzidos a partir da soja destacam-se: “tofu”, “leite” de soja, “iogurte” de soja, “carne” de soja, “tempeh”, “miso”, isolado protéico, concentrado protéico, farinhas de soja, entre outros.

3.3. “IOGURTE” DE SOJA

Os alimentos fermentados têm se constituído em importantes componentes da dieta devido não somente as suas características nutricionais, mas também as suas propriedades profiláticas e terapêuticas (ROSSI et al., 2003). O consumo de produtos fermentados, principalmente aqueles derivados do leite, vêm sendo estimulado devido ao seu valor nutricional e grande número de propriedades terapêuticas. No entanto, o consumo destes produtos no Brasil é ainda restrito, provavelmente em função do alto custo que apresentam (UMBELINO et al., 2001b).

Norteados por esta situação, ROSSI et al. (1984) obtiveram a partir do extrato aquoso de soja, um produto similar ao iogurte, com custo reduzido, de boa aceitabilidade e que mantém preservadas as características nutricionais e terapêuticas apresentadas pelos produtos fermentados convencionais.

Os alimentos a base de soja ainda sofrem resistência ao consumo devido ao seu sabor tido como desagradável. O processo de fermentação do extrato hidrossolúvel de soja contribui para a melhoria das características sensoriais, podendo ser melhorado ainda mais com a adição de aromatizantes naturais.

Em estudo realizado por KINOUCI et al. (2002), o “iogurte” de soja, tanto sabor pêsego quanto o sabor morango, obtiveram uma boa nota nos testes afetivos realizados com adolescentes, demonstrando que é viável incentivar o consumo desse produto, por exemplo, em uma população que não possui o hábito de consumir soja.

Recentemente, a indústria de laticínios tem demonstrado grande interesse em desenvolver novos produtos lácteos fermentados por microrganismos probióticos. Esses microrganismos, notadamente algumas variedades de lactobacilos e bifidobactérias, fermentam a lactose produzindo ácido láctico. Eles têm a capacidade de se manterem vivos no produto fermentado e sobreviverem à passagem pelo trato gastro-intestinal, fixando-se no intestino e trazendo melhorias no balanço da flora microbiana de indivíduos que consumam periodicamente esses produtos (SEIBEL, 1998). O consumo diário de 10^6 a 10^9 células de microrganismos probióticos é requerido para o desenvolvimento de qualquer efeito benéfico em humanos (LEE e SALMINEN, 1995).

São vários os efeitos positivos já demonstrados resultantes do consumo de produtos fermentados. Entre eles pode-se destacar a diminuição dos sintomas resultantes da má absorção de lactose, a prevenção de diarreias, a redução da concentração de colesterol sérico, a estimulação da resposta imune e redução da incidência de tumores (ISOLAURI et al., 1991; SANDERS, 1993; ROSSI et al., 2000).

Dentro desse contexto, ROSSI et al.(1994) estudaram 18 cepas bacterianas de *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecium*. Essas cepas foram testadas quanto a sua capacidade de remoção do colesterol do meio de cultura em presença de sais biliares. A maior remoção do colesterol foi obtida pelo *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 (55,4% e 54%). Apoiado nesses resultados, foi desenvolvido um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* associado com *Lactobacillus jugurti*, o qual apresentou propriedades tecnológicas e sensoriais semelhantes aos fermentados tradicionais (ROSSI et al., 1999).

O efeito hipocolesterolêmico do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* e *L. jugurti* já foi demonstrado em coelhos machos e hipercolesterolêmicos. Os resultados mostraram que uma dose de 10 mL/dia, administrada durante 30 dias foi capaz de reduzir a concentração de colesterol total em 18,4% e de aumentar a fração HDL em 17,8% (ROSSI et al., 2000). Em humanos normocolesterolêmicos, a ingestão de 200 mL/dia desse produto de soja foi capaz de manter inalterada a concentração de colesterol total e de LDL-colesterol, e de aumentar em 10% o nível do HDL-colesterol, nas condições de estudo (ROSSI et al., 2003).

Esse mesmo produto foi também avaliado quanto ao seu potencial alergênico induzido pela sua ingestão oral, buscando demonstrar a relação existente entre o processo fermentativo e a alergenicidade. Os resultados mostraram que o produto fermentado apresentou um percentual de degranulação de mastócitos menor que o observado para o placebo. Concluiu-se que o produto fermentado não apresentou potencial alergênico e que o processo fermentativo reduziu favoravelmente a alergenicidade das proteínas de soja (CARLOS et al., 2000).

O “iogurte” de soja apesar de apresentar as características nutricionais semelhantes às dos produtos fermentados de leite, difere significativamente

destes em relação ao conteúdo mineral, sendo relativamente deficiente em cálcio. A adição de cálcio ao “iogurte” de soja na forma de citrato, carbonato, fosfato, gliconato e lactato de cálcio, apesar de provocar alterações na acidez titulável, viscosidade e consistência, não conferiu propriedades sensoriais indesejáveis ao produto e o tempo de fermentação não excedeu aos verificados nos processos industriais convencionais. Desta forma, todos os sais testados se mostraram viáveis para o processo de enriquecimento desse produto (UMBELINO, 2001a). Por outro lado, sabe-se que determinadas etapas do processamento do “iogurte” de soja determinam uma redução substancial das isoflavonas nesses produtos, (ROSSI et al.,2002b). Em vista disso, ROSSI et al. (2002a) propuseram um processo de suplementação desse “iogurte” com isoflavonas, sem que o mesmo provocasse alterações sensoriais nos atributos avaliados (aroma, cor, sabor e impressão global).

3.4. ISOFLAVONAS

Os fitoestrógenos são compostos vegetais, não-esteróides, capazes de exercer efeitos estrogênicos. Nas plantas, esses compostos atuam como fungicidas, detêm a herbivoria, regulam os hormônios vegetais e protegem as plantas contra os raios ultravioletas, além de funcionarem como antioxidantes (BARRET, 1996).

Há cerca de 20 tipos de fitoestrógenos, identificados a partir de 300 plantas de 16 famílias diferentes, que podem ser agrupados em três classes: as isoflavonas, os coumestanos, dos quais o principal é o coumestrol, e os lignanos, representados principalmente pelo enterodiol e enterolactona (ADLERCREUTZ, 2002). De acordo com ADLERCREUTZ (2002) existe uma quarta classe de fitoestrógenos que se refere aos micoestrógenos (lactonas do ácido resorcílico), representados pela zearalenona e zeararalenol.

As isoflavonas são compostos difenólicos pertencentes a uma subfamília dos flavonóides e encontrados em maior quantidade na soja (*Glycine max*) e em produtos a base de soja, embora estejam presentes em outros tipos de leguminosas (REINLI e BLOCK, 1996).

As principais isoflavonas encontradas na proteína de soja e nos alimentos a base de soja são: daidzeína, genisteína e gliciteína. Cada uma delas pode ser

encontrada em quatro formas: forma não conjugada ou agliconas, forma conjugada ou glicosilada (daidzina, genistina e glicitina), acetilglicosiladas e malonilglicosiladas (Figura 1 e Tabela 1).

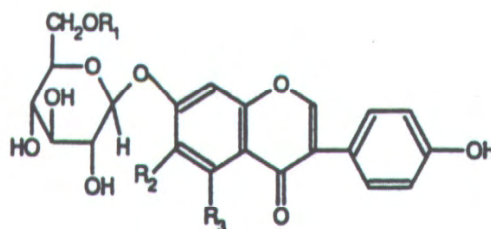


Figura 1. Estrutura das isoflavonas da soja

Tabela 1. Isoflavonas da soja e seus respectivos radicais

Composto	R1	R2	R3
Daidzina	-H	-H	-H
Glicitina	-H	-OCH ₃	-H
Genistina	-H	-H	-OH
6-O-malonildaizina	-COCH ₂ COOH	-H	-H
6-O-malonilglicitina	-COCH ₂ COOH	-OCH ₃	-H
6-O-malonilgenistina	-COCH ₂ COOH	-H	-OH
6-O-acetildaizina	-COCH ₃	-H	-H
6-O-acetilglicitina	-COCH ₃	-OCH ₃	-H
6-O-acetilgenistina	-COCH ₃	-H	-OH

Fonte: ARAÚJO et al., (1997)

A concentração de isoflavonas presente na soja e em seus derivados depende de inúmeros fatores, incluindo o tipo de alimento (WANG e MURPHY, 1994a), a variedade da soja, ano de colheita e a localização geográfica (WANG e MURPHY, 1994b).

O teor de isoflavonas de oito cultivares americanas analisadas variou entre 205 e 422 mg/100 g. Para três safras diferentes de uma mesma cultivar os resultados oscilaram entre 118 e 331 mg/ 100 g. Já a mesma safra colhida em diferentes locais apresentou teor de isoflavonas entre 118 e 175 mg/100 g. Além disso, as variedades americanas apresentaram maior teor de malonilglicitina e maiores proporções entre malonilgenistina e daidzina, comparado às japonesas (WANG e MURPHY, 1994b). A análise do teor de isoflavonas de 15 diferentes

cultivares de soja do Paraná mostrou que a concentração média era 31% maior para os cultivares de Ponta Grossa (120 mg/100 g), sendo essas variações atribuídas às diferenças de temperatura e solos entre as duas regiões (CARRAO-PANIZZI et al., 1998).

As condições de processamento da soja podem provocar alterações no teor total e no perfil das isoflavonas presentes. NAKAMURA et al. (2000) determinaram as concentrações de isoflavonóides em onze tipos de soja e doze tipos de alimentos processados. O conteúdo mais alto de isoflavonas foi encontrado no kinako (pó de soja tostado) e o mais baixo foi encontrado no molho de soja. O conteúdo e a composição de isoflavonóides nos onze tipos de soja variaram de acordo com a espécie e o país de origem e nos alimentos processados de acordo com o método de manufatura ou ingredientes.

Nessa linha, ROSSI et al. (2002b), quantificando as isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* e *L. jugurti*, mostraram que o processamento causou uma redução de 92% no teor total de isoflavonas em relação ao grão *in natura*.

Sabe-se que 97 a 98% do conteúdo total de isoflavonas em soja e derivados protéicos como farinha desengordurada, isolados, concentrados e proteína texturizada se encontra na forma esterificada. A distribuição entre essas formas varia de um produto para outro. Por outro lado, em produtos fermentados de soja, tais como “miso”, “tempeh” e pasta de soja, observa-se a predominância das agliconas em relação às formas conjugadas (WANG e MURPHY, 1994a) (Tabela 2).

Tabela 2. Conteúdo de isoflavonas em diferentes produtos de soja ($\mu\text{g/g}$)

Produto	Glicosídeo			Malonil			Acetil			Aglicona		
	Din	Gin	Glin	Din	Gin	Glin	Din	Gin	Glin	Dein	Gein	Glein
Soja verde	451	430	48	515	851	57	tr	2	nd	10	16	18
Farinha de soja	147	407	41	261	1023	57	tr	1	32	4	22	19
Soja em grão	727	870	132	106	193	60	72	135	48	12	27	22
Isolado de soja	133	382	55	19	95	37	36	122	40	12	36	22
Concentrado de soja	tr	18	31	nd	tr	nd	tr	1	nd	nd	nd	23
"Carne" de soja	460	551	68	45	63	72	397	743	102	39	69	52
"Tofu"	25	84	8	159	108	nd	8	1	29	46	52	12
"Tempeh"	2	65	14	255	164	nd	11	nd	nd	137	193	24
Pasta de soja	nd	96	21	nd	nd	19	1	2	nd	271	183	54
"Miso"	72	123	18	nd	nd	22	1	11	nd	34	93	15

Abreviaturas: Din – Daidzina; Gin – Genistina; Glin – Glicitina; Dein – Daidzeína; Gein – Genisteína; Glein – Gliciteína; tr – traço; nd – não detectado.

Adaptado de WANG e MURPHY, 1994a.

A soja participa da dieta humana com o consumo do seu próprio grão *in natura*. Estudos estimam que o consumo de isoflavonas por mulheres asiáticas na pós-menopausa está entre 25-40 mg/dia, enquanto as americanas consomem menos de 1 mg/dia (DE KLEIJN et al., 2001). O óleo de soja, única contribuição efetiva de soja na dieta brasileira, não contém isoflavonas. Desta forma, o desenvolvimento de alimentos derivados da soja seria uma alternativa para se aumentar a presença destas substâncias na dieta.

As isoflavonas são estrutural e funcionalmente similar ao 17 β -estradiol (KUIPER et al., 1998) (Figura 2). Dessa forma, as similaridades entre suas estruturas conferem às isoflavonas a ocupação dos receptores estrogênicos. Dependendo do ensaio empregado, as isoflavonas podem ter entre 1×10^{-4} a 1×10^{-2} da atividade do 17 β -estradiol, no entanto a genisteína liga-se 5 a 20 vezes com mais afinidade ao receptor estrogênico ER β do que ao ER α (KUIPER et al., 1997). A maior afinidade ao receptor ER β sugere que as isoflavonas podem ter efeitos seletivos (estrogênico e antiestrogênico) dependendo do tecido e da concentração de isoflavonas.



Figura 2. Comparação da estrutura do estradiol e da genisteína

As isoflavonas ligam-se a receptores estrogênicos ER β , distribuídos principalmente nos ossos, cérebro, endotélio vascular e bexiga (PAECH et al., 1997), enquanto o estradiol de mamíferos tem maior afinidade por receptores estrogênicos ER α , presentes no tecido mamário e uterino (KUIPER et al., 1998).

Uma concentração plasmática de 50-800 ng/mL (cerca de 0,2-3,2 μ mol/L) foi encontrada para daidzeína, genisteína e equol em adultos que ingeriram cerca

de 50 mg/dia de isoflavonas por meio de alimentos a base de soja (ADLERCREUTZ et al., 1993). Quando a soja é consumida de maneira regular, os níveis plasmáticos de isoflavonas podem exceder a concentração fisiológica do estradiol, que no homem e na mulher está entre 40 e 80 pg/mL (SETCHELL, 1999). Essas observações conduzem à hipótese de que as isoflavonas seriam compostos biologicamente ativos com benefícios para a saúde. Desta forma, a baixa prevalência de doenças hormônio-dependentes em indivíduos que vivem em países onde a soja representa a dieta principal poderia ser explicada.

Estudos em cultura de células, modelos animais e alguns ensaios clínicos em humanos têm se mostrado que as isoflavonas representam uma alternativa promissora na prevenção e/ou tratamento de cânceres relacionados ou não a hormônios, doenças cardiovasculares, osteoporose e alívio dos sintomas da menopausa.

Nesse sentido, os efeitos hormonais das isoflavonas aliados à baixa incidência de osteoporose em mulheres asiáticas propiciaram a investigação da ação dessas substâncias sobre o tecido ósseo e em relação à prevenção e/ou tratamento dessa doença (COOPER et al., 1992).

3.4.1. EFEITOS DAS ISOFLAVONAS NA SAÚDE

Câncer de mama

Estudos epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em isoflavonas, como a dos países asiáticos, propicia proteção contra várias formas de câncer, particularmente aqueles que são hormônio-dependentes, tais como câncer de mama e próstata (ADLERCREUTZ et al., 2000). A população asiática que emigrou para países do ocidente e adotou seus hábitos alimentares apresentou um risco maior de câncer de mama e outros cânceres hormônios-dependentes comparados com a população do país de origem (LU et al., 2000).

Na maioria dos estudos *in vitro* com cultura de células de câncer de mama MCF-7 é mostrado que altas concentrações de isoflavonas reduzem a proliferação celular, enquanto baixas concentrações têm efeito estimulatório sobre a proliferação das células MCF-7 (WANG et al., 1996), portanto a dose de isoflavonas parece desempenhar um importante papel sobre aumento ou

diminuição do risco dessa doença. Há vários estudos mostrando que a genisteína inibe o crescimento tanto de células cancerosas hormônio-dependentes quanto as hormônio-independentes.

Em 55 estudos com animais foram investigados os efeitos das isoflavonas sobre o câncer de mama. Na maioria, a incidência de tumores não foi afetada (ALLRED et al., 2001b). No estudo de LAMARTINIERE (2000), a multiplicação do tumor foi reduzida em 25-50%. Em outro estudo, a administração de genisteína para ratos com 21 dias de idade durante alguns dias inibiu em mais de 50% o câncer de mama induzido por DMBA (dimetilbenzantraceno) (APPLET e REICKS, 1999). No entanto, num estudo utilizando a indução biológica do câncer em ratos imunodeficientes, a genisteína estimulou o desenvolvimento de tumor de mama (ALLRED et al., 2001a).

Acredita-se que o consumo precoce de isoflavonas, já na infância, pode proteger contra o desenvolvimento do câncer de mama na fase adulta. Estudos realizados com ratos nos quais administravam-se, durante o período neonatal, genisteína em altas e baixas concentrações mostraram proteção significativa contra o câncer de mama induzido experimentalmente pela droga DMBA (LAMARTINIERE et al., 1995; MURRIL et al., 1996; BROWN et al., 1998; FRITZ et al., 1998). Nos primeiros estudos a genisteína foi administrada durante o período neonatal ou na pré-puberdade em altas concentrações (LAMARTINIERE et al., 1995; MURRIL et al., 1996), mas nos últimos estudos quantidades fisiológicas foram dadas antes dos 21 dias de idade. Estes últimos estudos mostraram claramente que a genisteína na dieta em baixas concentrações pode proteger os ratos contra o desenvolvimento do câncer de mama induzido por DMBA. Esses resultados assemelham-se a dois recentes estudos de caso que registraram que a ingestão de alimentos de soja ricos em isoflavonas na adolescência está associada com a redução do risco de câncer de mama na vida adulta (SHU et al., 2001; WU et al., 2002).

Acredita-se que a densidade do tecido mamário seja um indicador para o risco de câncer de mama e que a produção de fluido mamário fora do período de lactação seja um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. PETRAKIS et al. (1996) mostraram que o consumo de 40 g de proteína de soja (contendo isoflavonas) por vários meses aumentou a produção de fluido mamário e o número de células anormais. ATKINSON e BINGHAM (2002) demonstraram

que a suplementação com soja diminuiu a densidade da mama, enquanto o tratamento com estrógeno provocou seu aumento. Nota-se que há incertezas quanto ao efeito benéfico da soja em relação ao câncer de mama, desta forma, novos estudos devem ser realizados a fim que esses resultados sejam confirmados.

Atualmente, uma das pesquisas mais importantes no tratamento do câncer de mama envolve inibidores de angiogênese. Estudos mostram que a genisteína é capaz de bloquear esse processo (ZHOU et al., 1998; ZHOU et al., 1999).

A produção de equol no intestino parece estar associada ao baixo risco de câncer de mama (MESSINA e LOPRINZI, 2001) e é mais alta em indivíduos cuja dieta seja rica em carboidratos, fibra, proteína vegetal e pobre em gordura (ROWLAND et al., 2000).

Portanto, é provável que outros compostos, além das isoflavonas, atuem na prevenção do câncer de mama e que a composição da dieta com respeito a ácidos graxos, proteína animal e vegetal, carboidratos e fibras também desempenhem um papel essencial nesse sentido (ROSE e CONNOLY, 1998).

Câncer de próstata

O câncer de próstata é o câncer hormônio-dependente mais comum no homem e a incidência vem aumentando rapidamente em muitos países. Acredita-se que o alto consumo de isoflavonas por homens asiáticos contribua para a baixa incidência de câncer de próstata (ADLERCREUTZ, 1995). O alto consumo de isoflavonas em homens japoneses é evidenciado pela alta concentração de isoflavonas detectadas no sangue (ADLERCREUTZ et al., 1993), urina (HAGGANS et al, 1999) e fluido prostático (MORTON et al., 1997), comparado com europeus e ocidentais. Resultados de um estudo de emigração registraram um alto risco em desenvolver câncer de próstata quando os asiáticos são expostos às dietas ocidentais (SHIMIZU et al., 1991).

Em estudos epidemiológicos, a relação do consumo de soja rica em isoflavonas e o risco de câncer de próstata têm sido sustentada, embora não consistentemente. Dois grandes estudos, um em homens japoneses-hawainos e outro em homens adventistas do 7º dia da Califórnia, registraram que o consumo de tofu e “leite” de soja foram associados com a redução no risco de câncer de

próstata em 65 e 70%, respectivamente (SEVERSON et al., 1989; JACOBSEN et al., 1998). Esses resultados devem ser vistos com reserva, uma vez que o “leite” de soja, assim como o “iogurte” de soja, perde cerca de 92% de isoflavonas em decorrência do processamento (ROSSI et al., 2002b). Num estudo de caso realizado por KOLONEL et al. (2000) foi encontrada uma relação inversa significativa entre o consumo de alimentos de soja e risco de câncer de próstata. Nessa linha, STROM et al. (1999) observaram uma tendência à associação inversa entre consumo de daidzeína e o risco de câncer de próstata. No entanto, outras pesquisas, todas feitas em países asiáticos, foram incapazes de detectar associações significativas entre o consumo de soja e o risco de câncer de próstata (OISHI et al., 1988; LEE et al., 1998).

Câncer de endométrio

Do ponto de vista geográfico, o risco de câncer de endométrio segue o mesmo modelo de incidência do câncer de mama (PARKIN, 1989). Num estudo caso/controle em asiáticos e não asiáticos, realizado no Hawaii, associou-se o baixo risco de câncer endometrial ao consumo de produtos de soja e outras leguminosas (GOODMAN et al., 1997). Estudos *in vitro* têm demonstrado que células endometriais de adenocarcinoma respondem às isoflavonas da mesma maneira que o estradiol (ISHIMI et al., 1999). No entanto, quando ratas ovariectomizadas são suplementadas com isoflavonas, estas não mostraram os mesmos efeitos uterotróficos evidenciados quando se administra estradiol (HARRISON et al., 1998).

NAGAMANI et al. (1998) investigando os efeitos de diferentes fitoestrógenos (genisteína, daidzeína, biochanina A e apigenina) sobre o crescimento de culturas de células de câncer de endométrio (HEC-I-A) mostraram que os quatro compostos produziram uma inibição dose-dependente sobre o crescimento celular. Todavia, a genisteína foi o inibidor mais potente do crescimento de células de câncer endometrial.

Não há estudos clínicos consistentes que possam responder com certeza se as isoflavonas apresentam um efeito estimulatório ou inibitório em relação ao desenvolvimento desse tipo de câncer. Em experimento com animais, altas doses de isoflavonas, particularmente genisteína, estimularam o crescimento uterino e a

expressão genética de vários parâmetros uterinos conhecidos por regularem os estrógenos endógenos (BURDETTE et al., 2002).

Um estudo prospectivo examinou a suplementação com isoflavonas e as mudanças no endométrio de mulheres na pós-menopausa. Observaram-se as biópsias endometriais antes e depois de um período de 3 meses de dieta e não foi encontrada nenhuma evidência de proliferação em 14 mulheres estudadas (DUNCAN et al., 1999). No entanto, estudos de longo prazo são necessários antes de qualquer conclusão definitiva em relação à diminuição do risco de câncer de endométrio.

Sintomas da menopausa

A severidade e freqüência de sintomas vasomotores, especialmente ondas de calor, são menores em mulheres asiáticas quando comparadas com mulheres ocidentais (BOULET et al., 1994). Essas diferenças têm sido atribuídas a características social e racial, estilo de vida e dieta. Acredita-se que o conteúdo de isoflavonas no alimento possa explicar esse fenômeno. Há poucos estudos clínicos que investigam os efeitos dos fitoestrógenos sobre os sintomas do climatério. BAIRD et al. (1995) não encontrou qualquer efeito benéfico da soja em relação à sintomatologia durante 4 semanas de estudos. Uma possível explicação para efeitos pouco expressivos pode relacionar-se ao período de consumo das isoflavonas, que deve ocorrer no início da menopausa (MESSINA, 2000).

MURKIES et al. (1995) mediram as ondas de calor como um determinante da atividade estrogênica em resposta a uma dieta rica em fitoestrógenos. Eles encontraram uma redução significativa na ocorrência de ondas de calor quando a dieta das mulheres pós-menopausa foi suplementada com soja ou farinha de trigo por 12 semanas. Em 6 semanas a dieta a base de soja produziu melhores resultados, ou seja, reduziu o número diário de ondas de calor de maneira mais eficaz que a dieta a base de trigo. ALBERTAZZI et al. (1998) encontraram que a soja foi significativamente superior em reduzir a média do número de ondas de calor por 24 horas depois de 4, 8 e 12 semanas de tratamento. As mulheres que consumiram soja tiveram uma redução de 45% nas ondas de calor diárias em comparação a uma redução de 30% obtida pelo placebo, no final de 12 semanas.

Em outro estudo realizado por QUELLA et al. (2000) não foi observado nenhum efeito benéfico das isoflavonas em relação a esses sintomas.

WASHBURN et al. (1999) estudaram 51 mulheres na peri-menopausa com sintomas climatéricos em ensaio randomizado, duplo-cego, no qual utilizaram suplementos contendo carboidratos ou proteínas de soja em duas formulações e verificaram que os sintomas vasomotores melhoraram significativamente em mulheres que utilizaram 29 g de proteínas de soja com 34 mg de fitoestrógenos, duas vezes ao dia, em comparação ao grupo que utilizava carboidratos.

Utilizando-se a mesma quantidade de 45 g/dia de proteína de soja como suplemento alimentar, WILCOX et al. (1990) confirmaram a melhora da atrofia vaginal, fato não verificado por MURKIES et al. (1995). Tais resultados podem estar relacionados às concentrações variadas de fitoestrógenos presentes na proteína de soja utilizada.

Em vista do que foi exposto, os resultados relativos aos efeitos benéficos das isoflavonas sobre os sintomas da menopausa são insuficientes para que se tenha conclusões definitivas sobre o uso de isoflavonas para o tratamento de tais sintomas.

Sistema imunológico

O estrógeno apresenta um efeito importante sobre o sistema imunológico. Por exemplo, a maioria das doenças auto-imunes é mais comum em mulheres e se inicia geralmente em condições de mudanças nas concentrações de estrógenos endógenos, como é o caso da puberdade, menopausa e gravidez (ENMARK e GUSTAFSSON, 1999). WANG et al. (1997) mostraram *in vitro* que a daidzeína aumentou a ativação de linfócitos murinos. Em outro estudo, ZHANG et al. (1999) demonstraram que as isoflavonas (conjugadas com ácido glucurônico) não competiam apenas com o estrógeno endógeno inibindo a proliferação de células cancerígenas dose-dependentes, mas também eram capazes de ativar células natural killer (NK), podendo aumentar as defesas imunológicas contra o câncer em concentrações nutricionalmente relevantes.

WATANABE et al. (2000) sugeriram que o aumento de células NK seja devido à influência das isoflavonas sobre o sistema imune. A atividade das células NK aumentou de 13% para 26% em seus estudos preliminares.

Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte entre homens e mulheres. Nas mulheres, o risco de tais doenças aumenta substancialmente depois da menopausa, provavelmente devido à deficiência estrogênica.

Sabe-se que a dieta apresenta um papel importante em relação às doenças cardiovasculares. Recentes estudos têm demonstrado que o consumo de alimentos a base de soja pode contribuir para a redução de tais doenças.

O componente protéico parece desempenhar um papel crucial no efeito protetor da soja contra as doenças cardiovasculares. Nenhum efeito foi observado quando as isoflavonas foram extraídas da proteína de soja e adicionadas a uma proteína animal (caseína) (GREAVES et al., 1999). No entanto, quando a proteína de soja e isoflavonas estavam presentes, houve uma melhora no perfil lipoprotéico, sendo essa redução proporcional à concentração de isoflavonas (CROUSE et al., 1998).

Os resultados de estudos realizados com primatas tratados com proteína de soja rica em isoflavonas mostraram um aumento da concentração de HDL-colesterol e a manutenção da concentração de triglicérides em níveis semelhantes à do grupo controle, no entanto, quando foram tratados com proteína de soja livre de isoflavonas esse efeito não foi observado. Vale ressaltar que tais efeitos não foram restaurados quando as isoflavonas extraídas pelo álcool retornaram à matriz protéica da soja (CLARKSON et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados em estudos realizados em humanos por NESTEL et al. (1999) e DEWELL et al. (2002).

Uma meta análise de 38 estudos clínicos, realizada por ANDERSON et al. (1995), demonstrou que uma média diária de consumo de 47 g de proteína de soja pode diminuir a concentração plasmática de triglicérides em 11% e de LDL-colesterol em 13%, e aumentar o HDL-colesterol em 2%.

SANDERS et al. (2002), utilizando indivíduos normocolesterolêmicos, investigaram os efeitos de uma dieta a base de proteína de soja contendo alta concentração de isoflavonas (56 mg/dia) e outra com baixa concentração (2

mg/dia) durante 17 dias. Demonstrou-se que a primeira dieta permitiu o aumento do HDL-colesterol e apolipoproteína A-I, mas não influenciou nas concentrações do LDL-colesterol, TGF- β 1, nas atividades do fator VII de coagulação e do PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type 1).

A partir de outubro de 1999, em virtude de análises de diversas pesquisas, preparações contendo 25 g de proteína de soja passaram a ser recomendadas pelo FDA (US Food and Drug Administration) por contribuir para a redução do colesterol.

Osteoporose

Osteoporose é um distúrbio ósseo caracterizado pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, sem alterações significativas da proporção entre matriz mineral e não mineral, levando a um aumento da fragilidade óssea e um conseqüente aumento do risco de fratura (WHO, 1994).

O osso é um tecido dinâmico que está continuamente sob o processo de reabsorção e formação, atividade mediada pelos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente e conhecida como remodelagem óssea (GURR, 1999). A osteoporose ocorre quando os osteoclastos criam uma cavidade excessivamente profunda que não consegue ser preenchida suficientemente ou quando os osteoblastos não conseguem preencher uma cavidade de reabsorção normal. Ambas podem ocorrer simultaneamente na menopausa (PAPLER, 1997).

Aproximadamente um milhão de americanos sofrem problemas com fraturas que acarretam um custo de mais 14 bilhões de dólares a cada ano (KENNY e PRESTWOOD, 1998). As mulheres de mais de 40 anos perfazem o grupo mais vulnerável para as conseqüências debilitantes da osteoporose, e apresentam probabilidade cerca de quatro vezes maior que os homens de desenvolvê-la (GUNBY e MORLEY, 1994). Nos EUA, metade das mulheres acima de 45 anos e 90% das mulheres acima de 75 anos são afetadas pela doença, conduzindo para 1,3 milhões de fraturas/ano (NIAMS, 1998), demonstrando que a prevenção se constitui em estratégia primordial para a saúde pública. No Brasil, pode-se estimar que cerca de um milhão de mulheres poderão ficar inválidas e pelo menos 200 mil irão morrer nos próximos anos se a doença não for

combatida. Estas estimativas colocam a osteoporose como uma das principais causas de morte da população feminina no país, ao lado do câncer (MARQUES NETO, 2004)

A osteoporose é classificada em tipo I e II (WHO, 1994). A do tipo I desenvolve-se quando os níveis de circulação de estrógeno diminuem após a menopausa resultando em aumento da reabsorção óssea sem um concomitante aumento na formação, causando uma aceleração na perda óssea (RIGGS et al., 1981). O metabolismo ósseo é regulado por fatores hormonais e locais. Os estrógenos constituem-se em um dos principais mecanismos de controle hormonal do *turnover* ósseo. O mecanismo de ação dos estrógenos no processo de remodelação óssea deve-se principalmente ao efeito inibitório na atividade osteoclástica, resultado da sua ação direta e indireta sobre as células osteoclásticas (SPELSBERG et al., 1999). A osteoporose do tipo I tem sua maior incidência em mulheres idosas entre 15 e 20 anos da menopausa, e envolve primeiramente o osso trabecular. Caracteriza-se por fraturas na porção distal do rádio e nas vértebras lombares.

A osteoporose do tipo II, ou senil, está relacionada ao envelhecimento e aparece por deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do paratormônio e um declínio gradual na densidade mineral óssea (EDWARDS e PERRY, 1994). Afeta ambos os sexos, e pode envolver tanto o osso trabecular quanto cortical. Embora a osteoporose do tipo II afete ambos os sexos, as mulheres sofrem não apenas os efeitos degenerativos do envelhecimento, comuns a ambos os sexos, mas também a deterioração do esqueleto que caracteriza o período de pós-menopausa. As fraturas de bacia afetam aproximadamente 20% das mulheres na pós-menopausa até a idade de 80 anos e quase 50% delas além dessa idade (ANDERSON, 1990).

Múltiplas são as causas da osteoporose, dentre elas: hormonais, mecânicas, genéticas e nutricionais. Nas mulheres, como já foi visto, a osteoporose está particularmente associada com a menopausa, uma vez que a diminuição de estrógenos acelera a perda óssea. Por vários anos, as mulheres perdem massa óssea duas a quatro vezes mais rápido do que elas perdiam antes da menopausa. Na idade de 65 anos, algumas delas podem perder metade de sua massa óssea (BONING, 2002). Todavia, o aspecto nutricional é de extrema importância no desenvolvimento e manutenção da massa óssea e na prevenção e

tratamento da osteoporose. Um dos componentes dietéticos de grande importância para o tecido ósseo é o cálcio.

Alguns estudos têm mostrado que a suplementação da dieta com cálcio reduz a perda óssea em mulheres na pós-menopausa com baixo consumo de cálcio (DAWSON-HUGHES et al., 1990) e o risco de fraturas em mulheres idosas quando associado com vitamina D (CHAPUY et al., 1992; DAWSON-HUGHES et al., 1997). Comparado à TRH, o cálcio não é tão efetivo em diminuir a ativação do ciclo de remodelagem óssea ou prevenir a perda óssea (RIIS et al., 1987).

O corpo do homem adulto contém aproximadamente 1000 a 1500 g de cálcio (dependendo do gênero, raça e tamanho do corpo) dos quais 99% são encontrados nos ossos na forma de hidroxapatita. Por essa razão, o cálcio é provavelmente o nutriente mais estudado na área de saúde óssea e considerado importante na prevenção e tratamento da osteoporose (ILICH e KERSTETTER, 2000; DELMAS, 2002). Os ossos atuam como tecidos fisiológicos vitais fornecendo uma fonte de cálcio prontamente disponível para a manutenção dos níveis normais da concentração plasmática de cálcio (BERDANIER, 2002). Embora 99% do cálcio corpóreo seja encontrado no esqueleto, o 1% remanescente é crítico para uma variedade de processos vitais como a coagulação sangüínea, transmissão nervosa, contração muscular, entre outros (GURR, 1999).

Mais de 1/3 do cálcio proveniente dos alimentos é absorvido, via transporte passivo e ativo, o restante sendo excretado nas fezes (GURR, 1999).

A absorção intestinal ativa de cálcio (aproximadamente 30% do total de Ca^{2+} ingerido) é primariamente regulada pelo calcitriol (hormônio esteróide formado a partir da vitamina D) (NORMAN, 1990). Todavia, o hormônio paratireóide (PTH), hormônios de crescimento, estrógeno e progesterona podem aumentar a absorção de cálcio por mecanismos diferentes (CHARLES, 1992). A absorção de cálcio diminui com a idade (HEANEY et al, 1989). Essa diminuição pode ser causada pela deficiência de vitamina D na dieta, redução na produção de vitamina D endógena que é parcialmente devido à menor exposição da população idosa ao sol (HEANEY et al, 1989;) ou devido ao menor número de receptores de vitamina D (GURR, 1999). Além disso, o prejuízo na função renal com a idade e a falta de estrógenos nas pós-menopausa contribuem para diminuir a produção de calcitriol renal (CHARLES, 1992)

A não produção de estrógenos durante a menopausa contribui para acelerar a perda óssea. Mulheres entre 50 a 60 anos que não recebem nenhum tratamento podem perder de 20 a 30% de osso esponjoso (trabecular) e 5 a 10% de osso compacto (cortical) (RIGGS et al., 1998).

O pico de massa óssea pode ser definido como a quantidade máxima de massa óssea que um indivíduo acumula desde o nascimento até a maturidade do esqueleto (OTT, 1990), ou seja, o máximo de massa óssea atingido antes da perda inexorável associada ao envelhecimento.

Nos primeiros 20-25 anos de vida, a densidade mineral óssea (DMO) aumenta com a idade, até que o pico de massa óssea seja alcançado. Ele então permanece relativamente constante até que, nas mulheres, a menopausa é alcançada (PATEL, 1996). Depois da menopausa, há uma fase de rápida perda óssea dependente de estrógenos por 5 a 10 anos, e então uma fase um pouco mais lenta de perda óssea induzida pela idade (PATEL, 1996). A DMO é altamente relacionada com a resistência óssea e prediz o risco de futuras fraturas. Um consumo adequado de cálcio e vitamina D, a partir dos alimentos e/ou suplementos, é claramente necessário para assegurar o pico máximo de DMO no final da adolescência, bem como de diminuir a taxa de perda óssea numa idade mais avançada (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e GARCÍA-COHEN, 2002.). Dois estudos epidemiológicos, um realizado na Croácia e o outro na China, (cross-sectional) (MATKOVIC et al., 1979; HU et al., 1993) fundamentam essa informação. Eles examinaram, desde a juventude até a velhice, a massa óssea de populações habituadas a uma diferença no consumo de cálcio e verificaram que o cálcio foi um importante agente de formação óssea afetando o pico de massa óssea e as subseqüentes taxas de fratura. Dessa forma, acredita-se que indivíduos com um maior pico de massa óssea (PMO) alcançado na juventude podem apresentar um menor risco de desenvolver osteoporose na vida adulta.

Por outro lado, é sabido, a partir de estudos de balanço de cálcio, que esse mineral tem um efeito limiar, no qual acima de certo nível de consumo nenhum aumento de massa óssea é alcançado (HEANEY, 1993). Portanto, a avaliação do consumo basal de cálcio dos indivíduos torna-se de extrema importância dado que um consumo acima do limiar poderá não provocar um efeito adicional sobre o tecido ósseo (CHAN et al., 1995; ILICH e KERSTETTER, 2000)

É importante ressaltar que além do consumo de cálcio, vários outros fatores afetam o acúmulo de massa óssea e a retenção de cálcio durante a infância e adolescência e o posterior risco de desenvolver osteoporose, dentre eles destacam-se: a atividade física, fatores ambientais, *status* hormonal, outros componentes da dieta (HEANEY 2000, 2001 a, b), idade, etnia, genética, presença de alterações gastrintestinais, doenças no fígado e rins (GURR, 1999; GUEGUEN e POINTILLART, 2000; HEANEY, 2001 a; BERDANIER, 2002)

A diminuição da DMO observada na osteoporose é o fator de risco mais importante para a fratura óssea. O risco de fratura aumenta em duas vezes para cada diminuição no desvio-padrão na DMO (MARSHALL, 1996). Entre outros fatores a deficiência em cálcio e vitamina D pode levar à diminuição da DMO e à predisposição à osteoporose. Como foi dito, um consumo adequado de cálcio determina o desenvolvimento de uma massa óssea máxima no final da adolescência e melhora a perda progressiva de massa óssea com a idade.

A necessidade diária pode ser obtida pela ingestão de alimentos enriquecidos com cálcio, suplementos farmacológicos ou ambos. Todavia, para se alcançar adequada absorção de cálcio, a intervenção da vitamina D (colecalfiferol ou vitamina D₃) é necessária. Essa vitamina é um precursor essencial do metabólito ativo 1, 25 dihidroxivitamina D (1, 25 dihidroxicholecalciferol, calcitriol), hormônio esteróide necessário não apenas para o crescimento, desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo, mas também para a prevenção da osteoporose e fraturas em idosos (GURR, 1999; GUEGUEN e POINTILLART, 2000; BERDANIER, 2002). As necessidades de vitamina D também dependem da idade.

O NIH Consensus Conference (1994) sobre o consumo adequado de cálcio encontrou que esse mineral em doses de 1500 mg/dia ajuda na prevenção e tratamento da osteoporose e concluiu que 2000 mg de cálcio elementar/dia foi seguro para a maioria das pessoas. Concluiu-se que enquanto a fonte preferencial de cálcio é via alimentos ricos em cálcio como o leite e outros derivados, alimentos fortificados com cálcio e suplementos são outros meios pelos quais o consumo ótimo do cálcio pode ser alcançado (FISHBEIN, 2004).

Leite e derivados são a principal e maior fonte de cálcio disponível. Todavia, para muitos que não consomem esses produtos, há uma grande variedade de outras fontes, incluindo: vegetais de folhas verde-escuras (por

exemplo, a mostarda), algumas leguminosas (soja), nozes, peixe (salmão, sardinha) bem como alimentos enriquecidos ou fortificados e/ou suplementos que podem fornecer a quantidade necessária de cálcio (WEAVER et al., 1999; BERDANIER, 2002; FAIRWEATHER-TAIT e TEUCHER, 2002) (Tabela 3).

Tabela 3. Conteúdo aproximado de cálcio em alguns tipos de alimentos

Alimento	Porção	Cálcio (mg)
Leite integral	1 xícara	290-300
Leite desnatado	1 xícara	300-310
logurte com pouca gordura	227g	300-415
Suco de laranja fortificado com cálcio	1 xícara	300
Tofu	1/2 xícara	200-434
Pão enriquecido com cálcio	85 g	290
Sardinha, enlatada, com ossos	6	250
Batata doce (purê)	1/2 xícara	44
Soja (cozida)	1 xícara	175

Adaptado de FISHBEIN (2004)

Embora a soja seja rica em oxalato e fitato, produtos a base de soja têm relativamente alta quantidade de cálcio disponível (biodisponibilidade equivalente à do leite). O tofu é uma boa fonte de cálcio, principalmente dependendo do agente coagulante (sulfato de cálcio) usado para precipitar a proteína durante o processamento (FISHBEIN, 2004).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 15 a 40% das pessoas (dependendo da idade, raça ou gênero) tomam suplementos de minerais ou vitaminas (ERVIN et al., 1999). Devido ao crescimento da atenção que a osteoporose tem recebido nos recentes anos, o consumo de suplementos de cálcio tem aumentado. Além disso, muitos alimentos estão sendo fortificados com cálcio (entre eles, suco de laranja, cereais matinais e margarina). Quer seja o cálcio ou qualquer outro mineral e/ou vitaminas, os suplementos devem ser tomados com cautela. Enquanto os suplementos de cálcio são justificados para a maioria das mulheres, há uma possibilidade de que eles causem alguns efeitos adversos e desequilíbrio se forem tomados em excesso.

Em geral, a absorção não varia significativamente entre os suplementos, e é aproximadamente equivalente à absorção a partir de um copo de leite (MURRAY, 1996). Os suplementos são bem dissolvidos em meio ácido do estômago e absorvidos no intestino. Além disso, uma variação interindividual na fração de cálcio absorvida foi encontrada em mulheres na pós-menopausa

ingerindo 800 mg de Ca^{2+} /dia (HEANEY et al., 1989), suportando que a absorção de cálcio é mais dependente de fatores homeostáticos individuais do que pequenas diferenças na absorção de cálcio a partir de diferentes formas farmacêuticas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e GARCÍA-COHEN, 2002).

Cada 300 mg de cálcio fornecido por bebidas fortificadas e suplementos proverá aproximadamente a mesma quantidade de cálcio absorvida de um copo de leite (240 mL) (WEAVER et al., 1999).

Os suplementos de cálcio estão geralmente na forma de sais ou combinações de sais, por exemplo, carbonato, citrato, lactato e fosfato, e em menor proporção o gluconato, glubionato, gluceptato e muitas formas orais. Tais suplementos irão variar no conteúdo de cálcio, com maior porcentagem para CaCO_3 . Outros sais como o citrato, lactato e gluconato fornecem 21, 14 e 9,3% de cálcio, respectivamente (BERDANIER, 2002). Um aumento na eficiência de absorção de cálcio tem sido observado pela co-ingestão de CaCO_3 com alimentos em mulheres normais jovens e em idosos (HEANEY et al., 1989)

Em geral o efeito do cálcio na dieta sobre a perda óssea na pós-menopausa tardia é mais pronunciado do que na pós-menopausa precoce. Existem ao menos 6 estudos que corroboram para essa informação. Tais estudos documentaram um aumento ou manutenção da DMO quando o cálcio foi administrado tanto como suplemento quanto como alimento (DAWSON-HUGHES et al., 1990; REID et al., 1993; CHEVALLEY et al., 1994; PRINCE et al., 1995; DEVINE et al., 1997). Uma grande melhora foi observada quando o consumo basal de cálcio era menor (DAWSON-HUGHES et al., 1990). De acordo com PRESTWOOD et al., 1999, a combinação de estrógeno e cálcio na dieta foi mais efetiva que o tratamento apenas com cálcio em mulheres com 70 anos de idade, particularmente se o consumo de cálcio fosse baixo. Contrariamente, é claro que a perda óssea em mulheres na menopausa sem tratamento é exacerbada pela deficiência de cálcio na dieta (HEANEY, 1990).

É importante notar que o efeito do cálcio sobre os ossos é mais fraco do que o estrógeno, bisfosfonatos ou calcitonina e o cálcio isolado não deve ser considerado uma terapia única para a osteoporose. Todavia, um consumo adequado de cálcio é a base para que qualquer terapia ou tratamento comece (RIGGS et al., 1998). De acordo com alguns autores, um alto consumo de cálcio aumenta o efeito protetor nos ossos gerado pela TRH em mulheres na pós-

menopausa, permitindo o dobro ou triplo do efeito do estrógeno (NIEVES et al., 1998; RECKER et al., 1999).

Meta-análises têm mostrado que o efeito positivo da suplementação com cálcio sobre a DMO é usualmente observado dentre os dois primeiros anos da suplementação, com pequeno benefício depois disso (MACKERRAS e LUMLEY, 1997; SHEA et al., 2002). O efeito positivo associado ao cálcio foi maior no primeiro ano de suplementação (ELDERS et al., 1991; MACKERRAS e LUMLEY, 1997). O remodelamento ósseo é lento. Ele necessita de 6 a 18 meses para alcançar um equilíbrio em resposta a um consumo alterado de cálcio. Todavia, é provável que o benefício da suplementação com cálcio observado no primeiro ano tenha sido resultado de um remodelamento transitório. O consumo por períodos longos, pelo menos de 2 a 3 anos, é necessário para se caracterizar adequadamente a resposta da perda óssea para alterações no consumo habitual de cálcio, mas poucos estudos têm sido realizados (REID et al., 1995; RIGGS et al., 1998).

Além disso, em uma revisão de literatura concluiu-se que não é claro o benefício do alto consumo de leite ou derivados sobre a massa óssea ou risco de fratura em mulheres com mais de 50 anos, mas que o efeito benéfico é percebido em mulheres com menos de 30 anos (WEINSIER, KRUMDIECK, 2000).

Por outro lado, FESKANICH et al. (2003) e DAWSON-HUGHES et al. (1995) verificaram que um consumo adequado de vitamina D está associado com um menor risco de fraturas osteoporóticas no quadril em mulheres na pós-menopausa. Nem o leite, nem a dieta rica em cálcio parecem reduzir esse risco.

Um aumento apenas na DMO pode não ser útil se não houver uma redução concomitante no risco de fraturas. Em alguns estudos é mostrada uma redução ao redor de 30% no risco de fraturas em mulheres na pós-menopausa que tomavam 1000 mg/dia de cálcio (suplemento) (REID et al., 1995; CHEVALLEY et al., 1994; CHAPUY et al., 1992).

Como foi visto, vários estudos com relação à suplementação com cálcio mostraram que ela pode reduzir a perda óssea e o risco de fraturas. No entanto, vale ressaltar que a maioria dos suplementos de cálcio está associado à vitamina D. Esse tratamento concomitante dificulta atribuir quais os reais benefícios do cálcio, além disso, o aumento da densidade óssea com a suplementação com cálcio pode não continuar depois de dois anos de tratamento (ELDERS et al.,

1991; DAWSON-HUGHES et al., 1997). Em contraste com dados clínicos, a maioria dos estudos de observação não encontrou associação significativa entre o consumo de cálcio e o risco de fratura (CUMMINGS et al., 1995; FESKANICH et al., 1997; CUMMINGS et al., 1997) ou perda óssea (MEYER et al., 1997).

Os estudos do efeito da suplementação com cálcio no conteúdo mineral ósseo parecem ser promissores. Muitos estudos têm mostrado que o cálcio causa um modesto aumento no conteúdo mineral ósseo que parece ser importante (HEANEY, 2000). Entretanto, não é claro se tais mudanças têm um efeito significativo na taxa de fratura. Como foi verificado, muito deles foram comprometidos porque a vitamina D foi administrada simultaneamente com o cálcio; a administração de suplemento apenas com vitamina D tem contribuído para inibir a perda óssea (DAWSON-HUGHES et al., 1995).

Além do consumo de cálcio, terapias tradicionais para a osteoporose têm enfatizado agentes que inibem a reabsorção óssea tais como: estrógenos, calcitonina e bisfosfonatos. No entanto, entre os agentes anti-reabsorção disponíveis hoje, a TRH é talvez o tratamento mais efetivo, no entanto vem acompanhada por vários efeitos adversos, tais como o aumento de risco de câncer de mama e de endométrio (ZUMOFF, 1998).

Um grupo de compostos conhecidos como moduladores seletivos de receptores estrogênicos (SERMs) (BRYANT e DERE, 1998) vem sendo usados para o tratamento da osteoporose. Eles ligam-se e interagem com os receptores estrogênicos. O raloxifeno é um exemplo desse tipo de composto, ele inibe competitivamente a ação estrogênica na mama e endométrio, e atua como um agonista estrogênico nos ossos e metabolismo lipídico (DELMAS, 2002). Ultimamente, as isoflavonas têm sido caracterizadas como SERMs naturais com benefícios similares para os ossos (BREZINSKI e DEBI, 1999).

Devido a sua fraca, mas significativa atividade estrogênica, os fitoestrógenos, em especial as isoflavonas, têm sido propostos como uma alternativa segura em atenuar os sintomas da menopausa, como por exemplo, a perda óssea.

Em estudos usando roedores ovariectomizados têm-se mostrado que as isoflavonas, isoladas ou associadas à proteína de soja, reduzem a perda de massa óssea que ocorre após a ovariectomia (ARJMANDI et al., 1998a; PICHERIT et al., 2001a). Similarmente, ensaios em humanos têm registrado que

as isoflavonas, isoladas ou associadas à proteína, atenuam a perda óssea que ocorre no período peri e pós-menopáusico (ALEKEL et al., 2000; MORABITO et al., 2002). Em geral, tanto evidências epidemiológicas como clínicas apontam para uma relação positiva entre consumo de isoflavonas e a densidade mineral óssea (DMO).

BLUM et al (2003) mostraram que uma dieta rica em proteína de soja apresentou um efeito benéfico na preservação da DMO associada com a perda óssea induzida pela deficiência estrogênica em ratas adultas ovariectomizadas. O grupo ovariectomizado + proteína de soja apresentou uma maior DMO e maior índice de formação endocortical se comparado com o grupo ovariectomizado + caseína. Com relação ao osso trabecular, as taxas de formação também foram maiores no grupo ovariectomizado + proteína de soja. Todavia, tal estudo não demonstrou quais os componentes da soja foram responsáveis por esse efeito protetor sobre o tecido ósseo.

ARJMANDI et al. (1996) também estudaram a proteína de soja na prevenção da perda óssea induzida pela deficiência de hormônio ovariano em ratas. Os resultados sugeriram que uma dieta baseada em isolado de proteína de soja (22,7 g/100g de dieta) é efetiva na prevenção da perda óssea devido à deficiência de hormônio ovariano, promovendo uma maior densidade mineral óssea de fêmures e vértebras se comparada com o grupo ovariectomizado sem tratamento. Em outro estudo, ARJMANDI et al (1998a), com o objetivo de determinar se as isoflavonas presentes na proteína de soja são as responsáveis pelo efeito protetor nos ossos, verificaram que as ratas ovariectomizadas (OVX) alimentadas com um conteúdo normal de isoflavonas apresentaram uma densidade mineral óssea de fêmures maior se comparada com a dos grupos OVX que ingeriram proteína de soja com um conteúdo reduzido de isoflavonas (90% das isoflavonas foram extraídas com etanol) e caseína em substituição à proteína de soja. Em virtude desses resultados, os autores puderam concluir que o efeito protetor alcançado nos ossos foi em decorrência da presença de isoflavonas na proteína de soja.

ONO e YAMAGUCHI (1999) investigaram o efeito do conteúdo de isoflavonas, presente no extrato de soja (nijiru), nos componentes ósseos de ratas ovariectomizadas. Demonstrou-se que as isoflavonas estimularam a formação óssea e mineralização no tecido femoral desses animais desempenhando, desta forma, um importante papel na prevenção da osteoporose.

PICHERIT et al. (2000) realizaram estudos com o objetivo de verificar o efeito da ingestão de genisteína e daidzeína comparada com o 17 α -etinilestradiol, na prevenção da perda óssea em ratas ovariectomizadas e notaram que o consumo de 17 α -etinilestradiol e daidzeína foi mais eficiente que a genisteína. Além disso, nem a genisteína nem a daidzeína exibiram atividade estrogênica no útero. Em outro estudo realizado por PICHERIT et al. (2001a), foi mostrado que um consumo diário de isoflavonas promoveu um efeito poupador com relação à perda óssea, tanto pela depressão da reabsorção óssea como pelo estímulo da atividade osteoblástica. A dose considerada ótima que preveniu a perda de osso trabecular e cortical e que não exibiu qualquer atividade uterotrófica foi de 40 μ g/g de peso corpóreo por dia, sendo aproximadamente 18 μ g/g de peso corpóreo por dia de daidzeína e 18 μ g/g de peso corpóreo por dia de genisteína.

MA et al. (2000) investigaram o efeito de uma dieta baseada em soja fermentada (natto) e suplementada com zinco e isoflavonas na perda óssea induzida pela ovariectomia em ratas, e demonstraram que essa dieta apresentou um efeito preventivo em relação à perda óssea, podendo, desta forma, desempenhar um papel importante na prevenção da osteoporose.

FONSECA e WARD (2004), verificaram que a ingestão de daidzeína (200 mg/kg dieta) preservou a DMO do fêmur de ratas ovariectomizadas e a combinação de daidzeína e cálcio (25 g/kg dieta) protegeu contra a perda de DMO de fêmur e vértebras e da resistência biomecânica de vários sítios esqueléticos.

No entanto, de acordo com DEYHIM et al. (2003) a suplementação da dieta de ratos com baixas doses de isoflavonas (0,575 e 1,15 mg/g de proteína da dieta) não foi capaz de exercer efeito protetor nos ossos.

Vários estudos em humanos apontam para a capacidade das isoflavonas em prevenir a osteoporose. Recentemente, POTTER et al. (1998) suplementaram 66 mulheres pós-menopausa com preparações a base de soja enriquecidas com 56 mg e 90 mg de genisteína. Observou-se um aumento significativo na densidade mineral óssea no grupo suplementado com 90 mg, mas não no grupo de 56mg, sugerindo a necessidade de um consumo mínimo diário de isoflavonas para se alcançar um efeito positivo sobre os ossos.

Nessa linha, ALEKEL et al. (2000) estudaram o efeito do consumo de proteína de soja com isoflavonas (80,4 mg agliconas/dia) por 24 semanas em mulheres na transição da menopausa (perimenopausa) e concluíram que as isoflavonas atenuam a perda óssea em vértebras lombares.

Com relação ao mecanismo de ação das isoflavonas, algumas evidências sugerem que a soja e suas isoflavonas, enquanto suprimem a reabsorção óssea, concomitantemente aumentam a atividade osteoblástica.

Os resultados de estudos realizados em ratas ovariectomizadas mostraram que as isoflavonas diminuíram a excreção urinária de deoxipiridinolina (Dpd), um marcador específico para reabsorção óssea (PICHERIT et al., 2001a; PICHERIT et al., 2001b).

Similarmente, HORIUCHI et al. (2000) mostraram que o consumo de proteína de soja em mulheres japonesas na pós-menopausa foi associado à diminuição da excreção de Dpd. ARJMANDI et al. (2000) registraram que mulheres na pós-menopausa que consumiam diariamente 40 g de proteína de soja, mas não de “leite” de soja, durante três meses, tiveram também uma diminuição de Dpd.

Estudos *in vitro* revelam que a genisteína inibe a reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos por meio da inibição da formação (YAMAGUCHI e GAO, 1997) e diferenciação de células osteoclastos *like* provenientes de células da medula óssea, e induz apoptose de osteoclastos maduros pelo mecanismo de canais de Ca^{2+} (GAO, YAMAGUCHI, 1999). O efeito supressor da genisteína sobre os osteoclastos é devido parcialmente à inibição da proteína tirosina quinase e ativação da proteína tirosina fosfatase (GAO, YAMAGUCHI, 2000).

Em relação à formação óssea, vários estudos *in vitro* têm evidenciado o efeito estimulatório da genisteína sobre a formação e mineralização num sistema de cultura de células (YAMAGUCHI e GAO, 1997; YAMAGUCHI e GAO, 1998). Esses estudos mostram que os efeitos são parcialmente mediados pela ligação da genisteína aos receptores estrogênicos e pela síntese de componentes protéicos nos osteoblastos.

Além disso, a soja e suas isoflavonas promovem a produção de um fator de crescimento (IGF-I) (ARJMANDI et al., 1998b), que aumenta a atividade osteoblástica em humanos e correlaciona-se positivamente com a massa óssea em mulheres na pré (ROMAGNOLI et al., 1993) e pós-menopausa (BOONEN et

al., 1996). SUGIMOTO et al. (1997) mostraram que indivíduos com baixas concentrações de IGF-I apresentavam um aumento no risco de sofrerem fraturas vertebrais e femorais. No entanto, essas observações indiretas devem ser confirmadas usando modelos *in vivo* e *in vitro* incluindo estudos de longo prazo.

Usando o modelo de osteopenia, mostrou-se que a proteína de soja aumentou a expressão do gene para IGF-I (*insulin-like growth factor I*) indicado pela elevação do RNAm femoral. Nesse estudo, a incorporação da proteína de soja ao conteúdo normal de isoflavonas (2,3 mg/g de proteína) teve um maior efeito sobre o RNAm femoral de IGF-I. Esses resultados indicam que as isoflavonas devem influenciar no aumento da síntese de IGF-I. Similarmente, foi observado que a suplementação com proteína de soja aumentou a concentração sérica de IGF-I, confirmando os resultados em animais (ARJMANDI et al., 2000).

Como foi visto, vários estudos realizados demonstram uma associação positiva entre proteína de soja / isoflavonas e a melhora da qualidade óssea. No entanto, outros estudos, principalmente de longo prazo, devem ser realizados a fim de solucionar várias questões como a relação entre isoflavonas e proteína de soja na prevenção da perda óssea; se há necessidade de um consumo diário para que os efeitos sejam observados; se o efeito da proteína de soja ou isoflavonas sobre o tecido ósseo é transitório; se a combinação de isoflavonas a baixas doses de estrógenos é válida na prevenção da perda de DMO. Essas e outras questões devem ser respondidas a fim de que a eficácia da proteína de soja e suas isoflavonas atuem como alternativa e/ou adjuvante para o tratamento da osteoporose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O material foi constituído por amostras de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus jugurti* 416 e suplementado com isoflavonas e cálcio.

4.1.1. Obtenção das amostras

O “iogurte” de soja foi produzido a partir do “leite” de soja, fornecido pela Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja – UNISOJA, instalada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, segundo a metodologia descrita por ROSSI et al. (2003). A partir desse produto a suplementação com isoflavonas foi feita utilizando-se Isoflavin[®], procedente da Galena, até a obtenção de uma concentração de aproximadamente 0,7 mg de isoflavonas/mL de “iogurte” de soja. O Isoflavin[®], produto comercial contendo 40% de isoflavonas, foi adequadamente solubilizado em sorbitol e incorporado sob agitação ao produto já fermentado. O placebo constituiu-se]do produto não fermentado, mas acidificado com ácido láctico até pH 4,3. A suplementação com cálcio foi de 0,6 mg de cálcio elementar/mL de “iogurte” de soja ou placebo, utilizando-se para isto o citrato tribásico de cálcio (Montedison Farmacêutica), segundo metodologia descrita por UMBELINO et al. (2001a). O “iogurte” e o placebo destinados ao experimento foram produzidos semanalmente no próprio laboratório, e mantidos sob refrigeração a ± 5 °C.

4.2. Animais experimentais

Foram utilizadas 45 ratas da raça Wistar, com 12 semanas de idade, nulíparas, peso inicial aproximado de 250 gramas, provenientes do Biotério Central da UFSCar. Os animais foram mantidos sob fotoperíodo controlado (10 horas claro/14 horas escuro), em temperatura entre 20°C e 24°C, alimentados com ração padrão, marca Purina e água à vontade (Figura 3).



Figura 3. Distribuição das ratas nas gaiolas de contenção

4.3. Protocolo experimental

As ratas foram divididas em 5 grupos, contendo 9 animais em cada grupo ($n=9$). O primeiro grupo foi constituído de animais pseudo-ovariectomizados (POVX) cujos ovários foram manuseados, porém não removidos, e os outros 4 grupos foram ovariectomizados (OVX), segundo o modelo proposto por KALU (1991) – Modelo da Rata Madura. A ovariectomia bilateral foi realizada segundo metodologia descrita por ZARROW et al. (1964). Todas as cirurgias foram realizadas na 13^a semana de vida dos animais, sob o efeito anestésico do éter (Figuras 4, 5, 6 e 7).



Figura 4. Anestesia e incisão lateral



Figura 5. Exposição do ovário



Figura 6. Laqueadura com linha



Figura 7. Ovariectomia

Dentre os grupos que sofreram a ovariectomia, o primeiro foi constituído de ratas alimentadas apenas com ração padrão; o segundo, além da ração, recebeu uma dose 4mL/kg de peso corpóreo por dia de “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas e cálcio; o terceiro constitui-se de indivíduos alimentados com ração padrão e 4mL/kg de peso corpóreo por dia de “iogurte” de soja suplementado com cálcio; o quarto grupo com animais alimentados com ração padrão e 4mL/kg de peso corpóreo por dia de placebo (produto não fermentado, mas acidificado com ácido láctico até pH 4,3) suplementado com cálcio (Tabela 4).

Tabela 4. Grupo de animais e os diferentes tratamentos durante o experimento

Grupo de animais	Tratamentos
I - Pseudo-ovariectomizado (POVX)	ração padrão + água
II - Ovariectomizado (OVX)	ração padrão + água
III - OVX + ISO + Ca	ração padrão + água + 4mL/kg de peso/dia de "iogurte" de soja suplementado com isoflavonas e cálcio
IV - OVX + Ca	ração padrão + água + 4mL/kg de peso/dia de "iogurte" de soja suplementado com cálcio
V - OVX + placebo + Ca	ração padrão + água + 4mL/kg de peso/dia de placebo suplementado com cálcio

Antes da ovariectomia, as ratas foram submetidas a um período de condicionamento (3 semanas). Na primeira semana os animais foram condicionados para o sabor doce (solução de sacarose 8%). Na segunda semana o condicionamento foi para sabor doce e ácido (solução de sacarose 8%, acidificada com ácido láctico até pH 4,3). Na terceira semana o condicionamento foi realizado com placebo.

A administração dos produtos após a ovariectomia foi realizada por gavagem com o animal imobilizado. A imobilização foi por meio de tração manual da pele da região dorsal (Figura 8).



Figura 8. Administração do produto aos animais

Após 3 meses de tratamento, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico, sendo, logo após, retirado os ossos: fêmur e tíbia esquerdos e

direitos. Os ossos foram mantidos em solução salina a 0,9% na temperatura de -20°C até o momento da análise.

O período de 3 meses foi definido com o objetivo de se obter alterações detectáveis dos parâmetros estudados, quer devido à ovariectomia, quer devido à administração do “iogurte” de soja. Durante esse período, os animais foram submetidos, semanalmente, a uma avaliação do peso corpóreo.

Com o material coletado foram analisados os seguintes parâmetros: comprimento ósseo; ensaio mecânico de flexão de três pontos; peso, volume e densidade óssea; conteúdo ósseo mineral (COM); conteúdo ósseo de cálcio; análise da superfície óssea trabecular por microscopia eletrônica de varredura.

4.4. MÉTODOS

4.4.1. Comprimento ósseo

Os comprimentos ósseos da tíbia e fêmur esquerdos foram medidos com o auxílio de um paquímetro.

4.4.2. Ensaio mecânico de flexão de três pontos

Foi realizado o teste biomecânico (flexão óssea) nas tíbias direitas de acordo com metodologia descrita por Christel et al. (1981). Doze horas antes dos ensaios, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento imediatamente anterior ao teste. Os ensaios mecânicos foram realizados em Máquina Universal Instron, modelo 4444, em temperatura ambiente (ENGESAETER et al., 1978; PENG et al., 1994). As extremidades das tíbias foram apoiadas em dois pontos com distância entre eles de 21,70 mm.

A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido latero-lateral, no meio da distância entre os dois apoios por uma haste cilíndrica, numa velocidade de 5 mm/min.

Utilizou-se uma célula de carga, específica da máquina, de 1kN.

4.4.3. Peso, volume e densidade óssea

As tíbias esquerdas foram colocadas em água destilada e hidratadas num dessecador em baixo vácuo por 24 horas (HADJDAKIS et al., 1993; DONAHUE et al., 1998). Após esse período, os ossos foram retirados do dessecador e imersos em água destilada à temperatura ambiente, suspensos por um fio de cobre, obtendo-se o peso ósseo imerso (P_i).

Com os valores obtidos de peso ósseo imerso e peso ósseo foi possível calcular o volume ósseo (V) e a densidade óssea (d) segundo o Princípio de Arquimedes (VAN et al., 1982; MOSEKILDE, 1991)

$$V = (P - P_i) / d_{\text{água}} \quad (\text{em cm}^3) \qquad d = P / V \quad (\text{em g/cm}^3)$$

4.4.4. Conteúdo mineral ósseo (CMO)

Foi calculado segundo KENNEY et al., 1994; ORTOFT, G. e OXLUND, 1988, pela fórmula:

$$\text{CMO} = 100 \times (P_m / P) \quad (\text{amostra integral})$$

$$\text{CMO} = 100 \times (P_m / P_s) \quad (\text{amostra seca})$$

Para tanto, as tíbias esquerdas foram secas em estufa a 100°C por 24 horas, sendo obtido o peso da amostra desidratada (P_s). Todas as medidas foram realizadas em balança eletrônica de precisão (Boeco).

Após a secagem, as amostras foram calcinadas em cadinhos de porcelana em mufla numa temperatura de 600°C durante 24 horas, para a obtenção da porção da matriz óssea inorgânica ou mineral. A amostra óssea mineral obtida foi pesada individualmente em balança eletrônica de precisão, obtendo-se o peso ósseo do material mineral (P_m).

4.4.5. Conteúdo de cálcio ósseo

O fêmur direito de cada um dos animais foi calcinado a 600°C por 24 horas e cerca de 50 mg das cinzas resultantes, exatamente pesadas, foram retomadas

em 2 mL de ácido clorídrico concentrado (Merck PA, 32%, $d = 1,19$) e quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 100 mL, ajustando-se o volume com água deionizada. Para análise, uma alíquota de 2 mL da amostra diluída na razão de 1:10 (10 mL da amostra em 100 mL de água) foi misturada em 6 mL de cloreto de lantânio 0,2%, homogeneizada e diretamente aspirada em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer 3110), com atomização em chama ar/acetileno, otimizado nas seguintes condições de operação: lâmpada de catodo oco de cálcio, a 7 mA, comprimento de onda de 422,7 e fenda 0,7 nm.

A calibração foi construída a partir de padrão de cálcio (Tritisol, Merck), diluído para as concentrações finais de 4, 8, 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$, preparadas em triplicata, de modo análogo ao das amostras, e resultou na seguinte regressão linear: $y = 0,005812x + 0,005221$ ($r^2 = 0,9982$)

4.4.6. Análise da superfície óssea trabecular por microscopia eletrônica de varredura

Foi analisada, por microscopia eletrônica de varredura, a porção média distal das amostras do fêmur esquerdo.

Os espécimes foram dissecados de suas partes moles e desidratados em soluções crescentes de álcool, permanecendo 20 minutos em cada solução (70°, 80°, 90°, 95° e 100°).

Foi realizada a criofratura da porção distal do fêmur esquerdo, após a amostra ser mantida em nitrogênio líquido por 2 minutos. A fratura foi feita entre os côndilos femorais no plano sagital, com o auxílio de um martelo e um bisturi. As amostras foram submersas imediatamente em álcool absoluto (CLARK, 1991).

Para a remoção do material orgânico, as amostras foram mantidas em água destilada à 37°C, trocada diariamente, durante 2 dias, e depois mantidas em solução de hipoclorito de sódio (5%) à 37°C por 48 horas, sendo então lavadas várias vezes em água destilada para a remoção da solução de hipoclorito de sódio (BAGI e MILLER, 1994; MILLER e WRONSKI, 1993). Após a remoção do material orgânico, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de acetona mantidas por 20 minutos em cada solução (60°, 70°, 80°, 90°, 100°). A seguir o material foi seco em estufa à 100°C por 3 dias. As amostras foram

coladas em suporte de alumínio, e revestidas com uma tinta à base de prata para facilitar o fluxo dos elétrons e recobertas com uma fina camada de ouro (Sputter Coater – SCD050, Bal – Tec), tornando-as condutoras para serem observadas ao microscópio eletrônico de varredura -MEV (Jeol JSM – T330A).

Foi utilizado o aumento de 35 vezes da imagem da amostra para a caracterização da região dos côndilos femorais (epífise óssea), sendo possível a observação da região da metáfise central. Com o aumento de 50 vezes na região da metáfise central foi observada qualitativamente a conectividade entre as trabéculas e as alterações da arquitetura trabecular. Ainda foram obtidas imagens com aumento de 100 vezes, em região trabecular (ZHOU et al., 1994; CANOTILHO, 1996; BERTONCELLO, 2001).

Após a captação das fotos ósseas pelo MEV, as mesmas foram transferidas para o programa de análise digital Image-Pro Plus (versão 4.0). As fotos receberam tratamento de acordo com os recursos disponíveis no *software*. Foi possível selecionar trabéculas e efetuar a medida de suas larguras, a fim de comparar os diferentes grupos experimentais.

4.4.7. Análise estatística dos dados

Todos os resultados representaram médias dos valores individuais dos animais pertencentes a cada grupo, os quais foram submetidas à análise de variância e ao teste de médias de Tukey para a comparação entre grupos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 5 estão apresentados os valores do peso corporal médio dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

Tabela 5. Peso das ratas (g)

Grupo	Peso inicial	Peso final
I	257 ± 20 ^a	305 ± 29 ^b
II	254 ± 17 ^a	355 ± 22 ^a
III	258 ± 14 ^a	321 ± 7 ^b
IV	259 ± 20 ^a	346 ± 19 ^a
V	257 ± 23 ^a	349 ± 29 ^a

Valores com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados

II – Grupo de animais ovariectomizados

III – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com isoflavonas e cálcio

IV – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com cálcio

V – Grupo de animais OVX que ingeriram o placebo suplementado com cálcio

Pode-se perceber pela tabela 5 que os animais dos diferentes grupos de estudo não diferiram entre si quanto ao peso inicial, fato que não foi verificado para os pesos finais, uma vez que as ratas ovariectomizadas pertencentes aos grupos II, IV e V, apesar de não diferirem significativamente entre si, apresentaram-se significativamente mais pesadas (p<0,05) que aquelas do grupo I e III.

Na figura 9 são apresentados os ganhos médios de peso corporal relativos aos animais dos diferentes grupos de estudo.

Pela figura 9 é possível notar que os animais do grupo I (pseudo-ovariectomizado) e do grupo III (grupo que ingeriu o produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio) foram os que apresentaram os mesmos ganhos de peso, sem diferirem estatisticamente entre si.

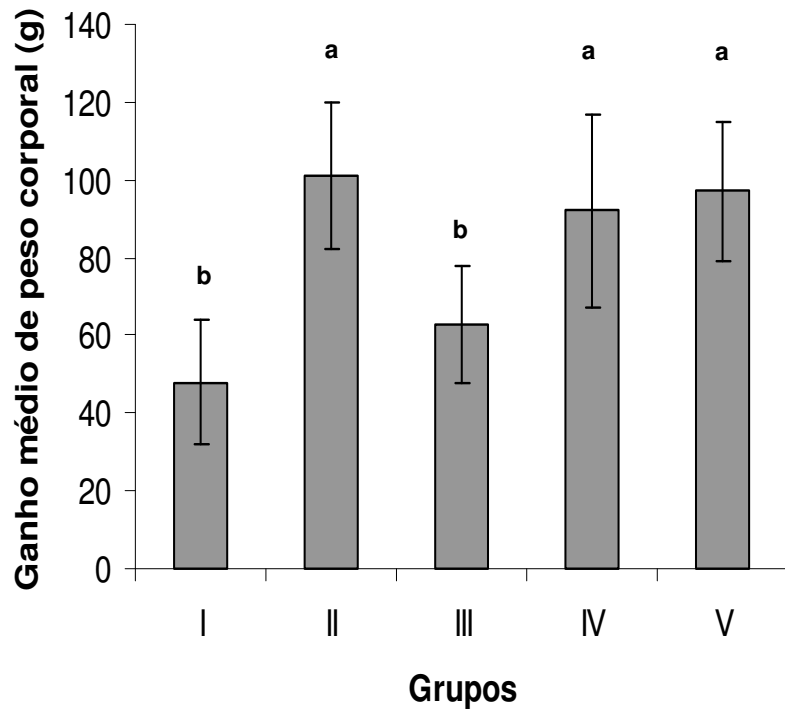


Figura 9. Ganho médio de peso corporal (g) dos diferentes grupos experimentais

- I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados
- II – Grupo de animais ovariectomizados
- III – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com isoflavonas e cálcio
- IV – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com cálcio
- V – Grupo de animais OVX que ingeriram o placebo suplementado com cálcio

Ao se comparar o ganho de peso dos animais do grupo I e II, constata-se claramente que a ovariectomia provoca um aumento significativo no peso, aumento esse que não pôde ser evitado nos animais do grupo IV e V, demonstrando que os tratamentos que esses grupos receberam não foram eficazes no sentido de impedir tal aumento. Por outro lado, o tratamento do grupo III (ingestão do produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio) foi capaz de manter o peso dos animais sem diferença significativa daqueles pertencentes ao grupo I, os quais não sofreram ovariectomia. Sem dúvida, esse resultado pode ser atribuído a presença das isoflavonas, uma vez que os

tratamentos do grupo III e IV difere apenas quanto à presença desses fitoestrógenos.

Diversos trabalhos na literatura relatam que a ovariectomia pode produzir alterações metabólicas e comportamentais na rata, que provocam aumentos significativos da ingestão alimentar e peso corporal (KALU, 1991; DANIELSEN, 1993; THOMPSON, 1995; BREITMAN et al., 2003). De acordo com DANIELSEN (1993) e ARJMANDI et al. (1998a), o ganho médio de peso corpóreo é maior mesmo quando sua ingestão é pareada à ingesta de ratas intactas. THOMPSON (1995), num estudo a longo prazo com ratas, relatou um peso corporal maior em animais após 12 meses de ovariectomia. Esse autor verificou que o aumento da massa corporal foi devido inteiramente a um aumento no acúmulo de tecido adiposo, sem o aumento da massa de outros tecidos corporais.

O aumento significativo do peso das ratas ovariectomizadas também já foi observado por outros trabalhos experimentais que relacionavam o aumento do peso corporal como um mecanismo fisiológico para prover um estímulo adicional à neoformação óssea e servir de proteção parcial contra a osteopenia que ocorre nos ossos longos (tíbia e fêmur), por meio do suporte de peso corporal (KALU, 1991; ONO et al., 2000; UESUGI et al., 2001; NOTOMI et al., 2003). Esse aumento de peso das ratas ovariectomizadas parece estar relacionado com o aumento excessivo do depósito de lipídeos. NOTOMI et al. (2003) observaram que o aumento do peso das ratas ovariectomizadas ocorreu em virtude do aumento do peso dos coxins gordurosos (que estavam mais pesados do que no grupo pseudo-ovariectomizadas), já que, tanto a massa óssea como a massa magra estavam diminuídas (osteopenia e sarcopenia). Assim como no estudo relatado acima, em nosso trabalho todas as ratas ingeriram quantidades de alimentos iguais em todo o período experimental, corroborando com resultados obtidos por outros autores em que o aumento excessivo do peso corporal estava relacionado com alterações no metabolismo energético lipídico e com o aumento de gordura no tecido adiposo das ratas (KALU, 1991; DANIELSEN et al., 1993; KALU et al., 1994; UESUGI et al., 2001).

O aumento de peso observado em ratas maduras também ocorre em mulheres no período pós-menopáusico como consequência de um distúrbio neurovegetativo provocado pela falta de estrogênio (BYDLOWSKI, 2002). Outro fator importante que se associa à obesidade pós-menopáusica fica por conta das

alterações ateroscleróticas que se aceleram e culminam em distúrbios coronarianos ou alterações circulatórias encefálicas graves. Novamente, a ausência dos estrogênios, principalmente o 17 β -estradiol, cuja ação sobre o metabolismo lipídico de mulheres em período fértil normal é elevar a concentração de HDL-colesterol e reduzir o colesterol total e o LDL-colesterol, altera o metabolismo energético culminando com o aumento do depósito de lipídeos no tecido adiposo de todo o corpo humano e com o aumento dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL-colesterol, e a diminuição do HDL-colesterol (UESUGI et al., 2001; BYDLOWSKI, 2002). Essas alterações no metabolismo energético lipídico levam a mulher no período pós-menopáusico à obesidade e ao aumento do risco de ocorrência de distúrbios coronarianos ateroscleróticos e distúrbios encefálicos graves (UESUGI et al., 2001; BYDLOWSKI, 2002).

Trabalhos realizados com humanos têm demonstrado que as isoflavonas encontradas na soja, conhecidas por apresentarem estrutura química e função similar ao 17 β -estradiol (KUIPER et al., 1998), vêm constituindo numa alternativa bastante interessante para o controle do metabolismo lipídico e da obesidade e, conseqüentemente, para a prevenção de distúrbios ateroscleróticos coronarianos e de acidentes vasculares encefálicos em mulheres no período pós-menopáusico (POTTER et al., 1998; WANGEN et al., 2001; DALAIS et al., 2003).

SZKUDELSKA et al. (2000) verificaram que a genisteína é capaz de reduzir a lipogênese e aumentar a lipólise em adipócitos isolados de ratos, podendo resultar em limitações no depósito de gordura nessas células. Podendo ser este um possível mecanismo para redução do peso corporal nas ratas que consumiram o produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio.

Vale ressaltar que a TRH é talvez o tratamento mais efetivo para o controle do metabolismo lipídico e a prevenção de doenças coronarianas no período menopáusico. Diversos trabalhos indicam que ela reduz as concentrações do colesterol total, dos triglicerídeos e da LDL-colesterol, e, concomitantemente, aumenta os níveis de HDL-colesterol, contribuindo decisivamente para a prevenção da obesidade e das doenças coronarianas no período pós-menopáusico (KIM et al., 2000; TONG et al., 2002). Todavia esse tratamento vem acompanhado por vários efeitos adversos, tais como o aumento do câncer de mama e endométrio (ARJMANDI et al., 1996; UESUGI et al., 2001). De acordo

com esses autores, as isoflavonas poderiam se constituir em uma alternativa promissora para a TRH.

UESUGI et al. (2001) realizaram um estudo em ratas ovariectomizadas no qual compararam o efeito da administração via gavagem das isoflavonas (daidzeína, genisteína e gliciteína) de forma isolada sobre o controle de peso corporal e do metabolismo lipídico; encontraram efeito benéfico apenas nos grupos que ingeriram a daidzeína e a gliciteína, cujos resultados foram homólogos com o grupo em que foi administrado a estrona, mas não encontraram efeito benéfico no grupo que ingeriu genisteína. Corroborando com os resultados do estudo anterior, NAKAJIMA et al. (2001) também não encontraram efeitos favoráveis da genisteína no controle de peso corporal e no perfil lipídico. Convém observar que, nesse estudo, as doses de genisteína foram altíssimas (12 mg/kg de peso corporal/dia) e administradas subcutaneamente.

O modelo experimental de osteoporose realizado nesse trabalho designado pela literatura como “modelo da rata madura” (KALU, 1991), no qual a ovariectomia é realizada com 12 semanas de idade, apresenta características de diminuição de massa óssea muito similares aos modelos de osteoporose relacionados à idade, nos quais a ovariectomia nas ratas é realizada entre 24 e 48 semanas de idade (KALU, 1991). O termo “maduro” é utilizado para se enfatizar que as ratas na idade de 12 semanas estão reprodutivamente maduras e capazes de responder apropriadamente à deficiência hormonal e às conseqüentes seqüelas proporcionadas pela ovariectomia (KALU, 1991; NAKAJIMA et al., 2001). Tanto as ratas ovariectomizadas quanto as mulheres no período pós-menopáusico perdem massa óssea como resultado da deficiência hormonal. Estudos de KALU (1991) e WRONSKI et al. (1989) demonstraram que as características de perda de massa óssea no modelo com ratas apresentam-se parecidas, em muitos aspectos bioquímicos e biomecânicos, com as características de perda de massa óssea das mulheres no período pós-menopáusico precoce.

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos na determinação do comprimento longitudinal de tíbias e fêmures esquerdos de todos os grupos participantes desse estudo.

Tabela 6. Comprimento (mm) de tíbias e fêmures relativos aos diferentes grupos de experimentais

Grupos	Comprimento (mm)	
	Tíbia	Fêmur
I	38,88 ± 0,78 ^a	36,27 ± 1,27 ^a
II	36,36 ± 0,91 ^a	36,51 ± 1,18 ^a
III	39,79 ± 0,34 ^a	36,25 ± 0,43 ^a
IV	38,76 ± 1,05 ^a	35,90 ± 1,00 ^a
V	38,77 ± 0,83 ^a	35,91 ± 1,04 ^a

Valores com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados

II – Grupo de animais ovariectomizados

III – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com isoflavonas e cálcio

IV – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com cálcio

V – Grupo de animais OVX que ingeriram o placebo suplementado com cálcio

Pode-se observar pela tabela 6 que todos os grupos experimentais não diferiram significativamente entre si (p>0,05) quanto ao comprimento ósseo das tíbias e fêmures esquerdos. A partir desses resultados, pôde-se verificar que nem a ovariectomia, nem a ingestão dos produtos a base de soja foram capazes de provocar alterações com relação ao comprimento das tíbias e fêmures esquerdos, sugerindo que tal parâmetro utilizado, nas condições de estudo, pode não ter sido adequado para se observar o efeito da ovariectomia e dos diferentes tratamentos pelos quais as ratas foram submetidas.

Nessa linha, ARJMANDI et al. (1998a), DEYHIM et al. (2003) e BREITMAN et al. (2003), todos usando o modelo da rata madura, mas com diferentes períodos experimentais (35 dias, 40 dias e 2 meses, respectivamente) não verificaram efeito da ovariectomia sobre o comprimento ósseo de fêmures. Todavia, para tíbias, DEYHIM et al. (2003) verificaram um aumento no comprimento ósseo das ratas ovariectomizadas comparado ao grupo pseudo-ovariectomizado. PENG et al. (1997) e DANIELSEN (1993), o primeiro utilizando

ratas ovariectomizadas com 6 meses de idade e o segundo com 3 meses, verificaram um aumento no comprimento longitudinal de fêmures em 16 e 12 semanas após a ovariectomia, respectivamente.

Com base nessas informações, pôde-se perceber que os resultados quanto ao comprimento ósseo são conflitantes, alguns trabalhos relatam o seu aumento com a ovariectomia, outros não, corroborando para o fato de que a medida do comprimento ósseo pode não ser um parâmetro indicado para se verificar os efeitos da ovariectomia e, muito menos, o efeito dos diferentes tratamentos sobre as ratas ovariectomizadas.

A tabela 7 apresenta os resultados relativos ao peso, volume e densidade óssea realizados nas tíbias esquerdas dos diferentes grupos experimentais.

Os grupos ovariectomizados II, IV e V apresentaram peso e volume ósseo que não diferiram ($p > 0,05$) entre si, mas que foram menores ($p < 0,05$) se comparado com os do grupo pseudo-ovariectomizado (grupo I). No entanto, o grupo de animais que ingeriu “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas e cálcio (grupo III) não diferiu do grupo I, indicando que esse produto é capaz de prevenir os efeitos decorrentes da ovariectomia, em relação aos parâmetros em questão. Mas, considerando também que o grupo III não diferiu estatisticamente do grupo IV e que este, por sua vez, não diferiu do grupo V, sugere-se que o cálcio tenha sido o fator responsável pela inibição da perda de peso e volume ósseo causado pela ovariectomia. Todavia, em se tratando de densidade óssea, nota-se que nem a ovariectomia, nem os diferentes tratamentos provocaram alterações nesse parâmetro, uma vez que os grupos não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.

É válido ressaltar que nessa análise não estão sendo considerados os possíveis efeitos de interação entre as variáveis.

Tabela 7. Parâmetros físicos ósseos relativos aos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Peso ósseo (g)	Volume ósseo (cm³)	Densidade óssea (g/cm³)
I	0,64 ± 0,05 ^a	0,42 ± 0,03 ^a	1,55 ± 0,07 ^a
II	0,56 ± 0,03 ^b	0,35 ± 0,02 ^b	1,60 ± 0,04 ^a
III	0,62 ± 0,02 ^{a,c}	0,39 ± 0,01 ^{a,c}	1,57 ± 0,03 ^a
IV	0,59 ± 0,04 ^{b,c}	0,37 ± 0,02 ^{b,c}	1,59 ± 0,03 ^a
V	0,56 ± 0,01 ^b	0,35 ± 0,02 ^b	1,61 ± 0,09 ^a

Valores com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados

II – Grupo de animais ovariectomizados

III – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com isoflavonas e cálcio

IV – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com cálcio

V – Grupo de animais OVX que ingeriram o placebo suplementado com cálcio

Pôde-se perceber que nos grupos que tinham um peso ósseo maior, o volume também era maior, enquanto os que tinham peso ósseo menor, o volume também era menor. Isso fez com que não houvesse alterações significativas entre os grupos quanto à densidade óssea.

No grupo III, o efeito protetor contra a perda do peso e volume ósseo proporcionado pelo cálcio não se refletiu na densidade óssea. Uma possível explicação relaciona-se ao fato de que esse mineral pode ter evitado a perda de matriz óssea orgânica levando a um maior peso e volume ósseo se comparado ao grupo II (ovariectomizado). Todavia, o tempo pós-ovariectomia (3 meses) pode ter sido reduzido para que se evidenciasse alterações na densidade óssea.

No remodelamento ósseo ocorre remoção de osso (reabsorção óssea) seguida pela síntese de nova matriz óssea e subsequente mineralização (formação óssea) (MUNDY, 1993). O tempo gasto para a formação óssea é maior do que para a reabsorção. Em humanos, a primeira fase do ciclo é realizada pelos osteoclastos, responsáveis pela retirada de cálcio dos ossos, e leva cerca de 10

dias, a fase de formação óssea, atividade realizada pelos osteoblastos, pode demorar cerca de três meses para se completar (PARFITT, 1993).

Vale ressaltar que a explicação para esse efeito protetor refere-se principalmente à matriz óssea orgânica e não à matriz óssea inorgânica (mineral), uma vez que nos resultados da tabela 8, os quais serão comentados a seguir, verifica-se que não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao conteúdo mineral e conteúdo de cálcio ósseo, portanto não sendo esses parâmetros os responsáveis pelo peso e volume ósseo do grupo III semelhantes aos do grupo I (pseudo-ovariectomizado).

Na tabela 8 estão apresentados os resultados do conteúdo mineral, em amostra seca e integral, das tíbias esquerdas e o conteúdo de cálcio dos fêmures direitos relativos aos diferentes grupos experimentais.

Foi verificado, a partir dos resultados apresentados, que a ovariectomia e os diferentes tratamentos não causaram alterações no conteúdo mineral (amostra integral e amostra seca) e no conteúdo de cálcio, uma vez que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre todos os grupos experimentais.

Em se tratando de conteúdo de cálcio ósseo, esses resultados foram semelhantes aos encontrados por DEYHIM et al. (2003) e ARJMANDI et al. (1996). Eles estudaram ratas ovariectomizadas com 3 meses de idade e submetidas a um período de experimentação de 40 e 30 dias, respectivamente. Por outro lado, PICHERIT et al. (2000) mostraram uma relação linear positiva entre o conteúdo mineral do fêmur total e o seu conteúdo de cálcio. Vale ressaltar que esse estudo durou 3 meses, todavia as ratas foram ovariectomizadas com 12 meses de idade. Em vista disso, fica claro que esses animais sofreram, por um período maior, a ação dos agentes causadores de osteopenia. Portanto, uma possível explicação para a não detecção de mudanças no conteúdo mineral e conteúdo de cálcio em nosso estudo pode estar relacionada ao tempo insuficiente de experimentação.

Tabela 8. Parâmetros químicos das tíbias esquerdas e dos fêmures direitos relativos aos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Conteúdo Mineral (%) (amostra integral)	Conteúdo Mineral (%) (amostra seca)	Conteúdo de cálcio (mg/g de cinzas)
I	67,06 ± 1,37 ^a	46,85 ± 3,11 ^a	380 ± 10 ^a
II	65,48 ± 1,32 ^a	44,30 ± 1,88 ^a	380 ± 10 ^a
III	68,21 ± 2,99 ^a	45,88 ± 2,83 ^a	370 ± 0 ^a
IV	66,64 ± 1,19 ^a	46,49 ± 2,33 ^a	380 ± 10 ^a
V	67,33 ± 2,35 ^a	44,27 ± 2,73 ^a	380 ± 10 ^a

Valores com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados

II – Grupo de animais ovariectomizados

III – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com isoflavonas e cálcio

IV – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com cálcio

V – Grupo de animais OVX que ingeriram o placebo suplementado com cálcio

Além disso, com relação ao conteúdo mineral, há uma tendência, em termos de valores médios absolutos, de redução no grupo de animais ovariectomizados (grupo II), podendo ser mais um indício de que o tempo de experimentação necessário para se evidenciar diferenças significativas não foi suficientemente adequado.

O aumento do peso corporal médio das ratas ovariectomizadas pode ter contribuído para a não evidenciação mudanças no conteúdo mineral e conteúdo de cálcio ósseo. O ganho de peso corpóreo protege as ratas do desenvolvimento da osteopenia depois da ovariectomia (ROUDEBRUSH et al, 1993), mas tal proteção está limitada para ossos longos, sugerindo um efeito suporte para o aumento de peso (WRONSKI et al., 1987). Vale ressaltar que os ossos utilizados para a realização de todos os parâmetros estudados foram ossos longos, particularmente tíbias e fêmures. Portanto, em nosso trabalho, o aumento do peso corporal das ratas causado pela ovariectomia pode ter proporcionado uma proteção contra a perda óssea, principalmente da porção mineral das tíbias e fêmures.

Na figura 10 estão apresentados os resultados obtidos da carga máxima suportada até o momento de ruptura das tíbias direitas dos diferentes grupos experimentais.

De acordo com a figura 10, pôde-se perceber que os cinco grupos experimentais não diferiram entre si ($p > 0,05$) com relação à carga máxima suportada até o momento de ruptura da tíbia, mostrando que nem a ovariectomia, nem o consumo do produto fermentado foram capazes de provocar alterações na resistência óssea à fratura. Resultados semelhantes foram alcançados por BREITMAN et al. (2003) que estudaram ratas ovariectomizadas e pseudo-ovariectomizadas com 3 meses de idade, com um tempo de experimento de 2 meses. Eles não verificaram diferença significativa na carga máxima suportada pelo fêmur entre os grupos estudados (pseudo-ovariectomizado e ovariectomizado). Todavia, quando este teste (flexão de três pontos) foi realizado em vértebras lombares (L5), a carga máxima do grupo pseudo-ovariectomizado foi estatisticamente maior do que a do grupo ovariectomizado. Esses resultados sugerem que o sítio esquelético (diáfise da tíbia) utilizado em nosso trabalho não foi adequado para se verificar alterações na carga máxima durante 3 meses de estudo. Talvez, mudanças nesse parâmetro pudessem ser percebidas se o tempo de estudo excedesse os 3 meses.

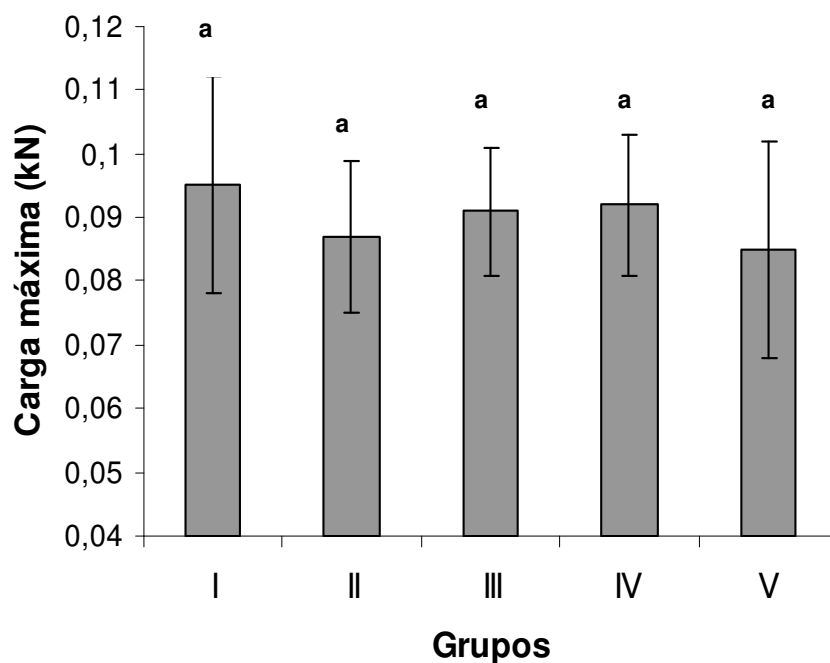


Figura 10. Carga máxima suportada (kN) até o momento de ruptura das tíbias direitas dos diferentes grupos experimentais

- I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados
- II – Grupo de animais ovariectomizados
- III – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com isoflavonas e cálcio
- IV – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com cálcio
- V – Grupo de animais OVX que ingeriram o placebo suplementado com cálcio

É sabido que, as proporções de osso trabecular e cortical diferem nas regiões do fêmur e tíbia, enquanto que nas vértebras elas são mais homogêneas (BREITMAN et al., 2003). Essas diferenças também podem explicar porque a carga máxima suportada pela tíbia e fêmur não foi afetada pela ovariectomia, ao contrário do que ocorreu nas vértebras lombares que tiveram sua carga máxima reduzida após a cirurgia.

Ambos os tipos de ossos estão sujeitos ao processo de remodelagem, embora a maior parte ocorra no osso trabecular, que está localizado em áreas expostas a uma maior carga de estresse por suportar o peso corporal. A natureza do osso trabecular também é outro fator que contribui para o exposto anteriormente, pois a relação superfície/volume desse tipo de osso é substancialmente maior que a do osso cortical. Essa relação provavelmente explica o maior envolvimento do osso trabecular em qualquer forma de osteoporose (RIGGS e MELTON, 1988; WHO, 1994). Desta forma, as

quantidades de reabsorção e formação óssea podem variar de acordo com o sítio anatômico usado (FROST, 1987).

Vale destacar que o teste de flexão de três pontos utilizado para se determinar a carga máxima suportada até o momento de ruptura foi feito no ponto médio da diáfise da tíbia, uma região predominantemente de osso cortical. Desta forma, a realização desse tipo de teste em regiões ricas em osso trabecular poderia ser adequada tanto para se verificar alterações ósseas decorrentes da ovariectomia quanto para se estudar o efeito do consumo de “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas e cálcio em ratas ovariectomizadas.

PICHERIT et al. (2001a) observaram que a carga suportada pelo fêmur (teste de flexão de três pontos) de ratas ovariectomizadas foi menor ($p < 0,05$) do que aquela obtida pelo grupo pseudo-ovariectomizado, enquanto que os grupos de animais que consumiram isoflavonas nas doses de 20, 40 e 80 $\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo por dia suportaram uma carga superior a do grupo ovariectomizado controle e, que não diferiu significativamente do grupo pseudo-ovariectomizado, mostrando um efeito positivo do consumo de isoflavonas com relação à resistência óssea. Vale destacar aqui que, a diferença significativa entre os grupos pseudo-ovariectomizado e ovariectomizado pode ser devido ao fato das ratas usadas serem mais velhas (a castração ocorreu aos 7 meses de idade) e submetidas a um tempo de estudo de 91 dias. Mais uma vez fica claro que o tempo de estudo usado em nosso trabalho pode ter sido reduzido para se observar alterações na carga suportada pela diáfise da tíbia, pois nossas ratas foram castradas com 3 meses e submetidas a um tempo de estudo também de 3 meses.

SHEN e WRONSKI (1997) verificaram que a osteopenia trabecular e cortical associada com um alto *turnover* ósseo (velocidade de remodelagem óssea) ocorre no fêmur proximal de ratas ovariectomizadas com 3 meses de idade, sendo que a perda de osso trabecular ocorre nesse sítio esquelético nos primeiros 30 dias pós-ovariectomia, mas permanece relativamente moderada nos primeiros 90 dias antes de se tornar mais pronunciada no período subsequente. A osteopenia cortical do fêmur proximal não foi observada antes do primeiro ano de pós-ovariectomia.

OMI e EZAWA (1995) quantificaram a densidade mineral óssea (DMO) de ratas pseudo-ovariectomizadas e ovariectomizadas (com 8 meses de idade) após

um período pós-ovariectomia de 6 meses. Eles verificaram que a DMO das vértebras lombares e da metáfise da tíbia proximal (região rica em osso trabecular) do grupo ovariectomizado foi consistentemente menor que a do grupo pseudo-ovariectomizado. Observou-se que um mês após a cirurgia, a DMO das vértebras lombares e da tíbia proximal do grupo ovariectomizado já era menor se comparada com o grupo controle. Por outro lado, a DMO da diáfise da tíbia do grupo ovariectomizado não diminuiu significativamente. Desta forma, concluiu-se que a DMO do sítio de osso trabecular (vértebras lombares e tíbia proximal) diminuiu devido a ovariectomia nos primeiros estágios do experimento. No entanto, a redução na DMO de osso cortical (diáfise da tíbia) não foi observada nesse mesmo período. Esses resultados sugerem que é importante levar em consideração a idade e o sítio esquelético ósseo para se avaliar os efeitos da ovariectomia e dos diferentes tipos de tratamentos utilizados em modelos animais.

Embora o modelo experimental com ratas ovariectomizadas utilizado nesse estudo apresente características similares às daquelas de mulheres no período pós-menopáusicas precoce (WRONSKI et al., 1989; KALU, 1991), a ovariectomia em ratas tem sido usada com sucesso para se estudar o mecanismo de perda de osso trabecular, no entanto esse modelo não tem se mostrado consistente para a redução de massa de osso cortical (KALU, 1991; THOMPSON, 1995).

JEE et al. (1990) têm observado que ratos mais velhos podem ser mais adequados do que ratos mais jovens para se estudar o remodelamento de osso cortical e a possibilidade da perda desse tipo de osso após a ovariectomia. Vale destacar que as ratas usadas em nosso estudo eram jovens (3 meses de idade), portanto, a não redução dos parâmetros ósseos causados pela ovariectomia utilizados nesse estudo pode estar relacionada com a idade dos animais, uma vez que os sítios esqueléticos usados (tíbias e fêmures) são predominantemente de osso cortical.

Nas figuras 11 a 25 estão apresentadas as micrografias eletrônicas de varredura (aumentos de 35, 50 e 100 vezes) representativas de cada grupo de estudo, utilizadas para a análise da superfície óssea trabecular.

Com o aumento de 35, 50 e 100 vezes, por meio da microscopia eletrônica de varredura, foram observadas a organização das estruturas trabeculares e suas interconectividades nas regiões médias centrais das epífises femorais (Figuras 11 a 25).

Numa primeira análise qualitativa, as amostras dos animais pseudo-ovariectomizados (grupo I) apresentaram predominância de estruturas trabeculares interconectadas (Figuras 11, 12 e 13). Verificou-se que a ovariectomia provocou diminuição do volume tecidual na porção média entre os côndilos femorais, com alterações da arquitetura óssea trabecular ocorrendo maior espaçamento entre as trabéculas. As trabéculas mais largas foram substituídas por trabéculas mais finas, que apresentaram perda de conectividade com outras trabéculas vizinhas. No entanto, o grupo de animais que recebeu "iogurte" de soja suplementado com isoflavonas e cálcio (grupo III) (Figuras 17, 18 e 19) e o que recebeu "iogurte" de soja suplementado apenas com cálcio (grupo IV) (Figuras 20, 21 e 22) mostraram-se com menos escavações entre as trabéculas, além de apresentarem trabéculas aparentemente mais grossas do que aquelas encontradas no grupo II (Figuras 14, 15 e 16). Portanto, por meio dessa análise qualitativa das micrografias eletrônicas de varredura dos animais pode-se sugerir que tanto a ingestão do produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio (grupo III) quanto a do produto fermentado apenas suplementado com cálcio (grupo IV) permitiram que as interconectividades trabeculares fossem mantidas em condições semelhantes às aquelas observadas para o grupo I (pseudo-ovariectomizado) e em condições melhores às aquelas verificadas para o grupo II e V.

No entanto, esses resultados diferem daqueles obtidos por WESTERLIND et al. (1997). Eles obtiveram valores semelhantes das espessuras das trabéculas para ratas ovariectomizadas e ratas controle, tanto na metáfise quanto na epífise femoral.

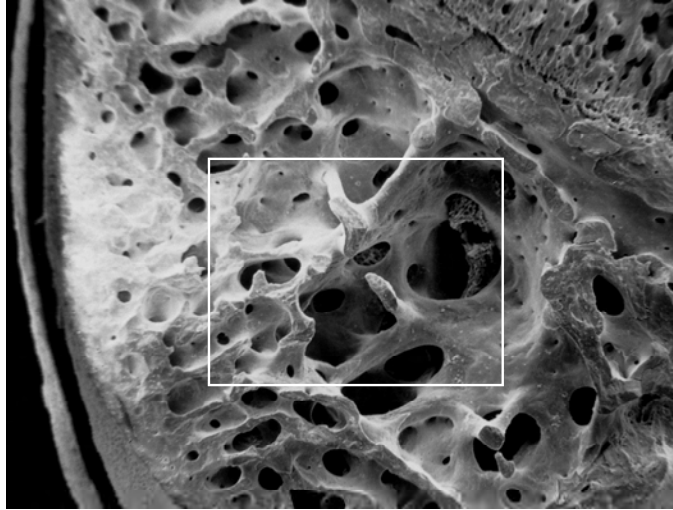


Figura 11: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo I (pseudo-ovariectomizado)

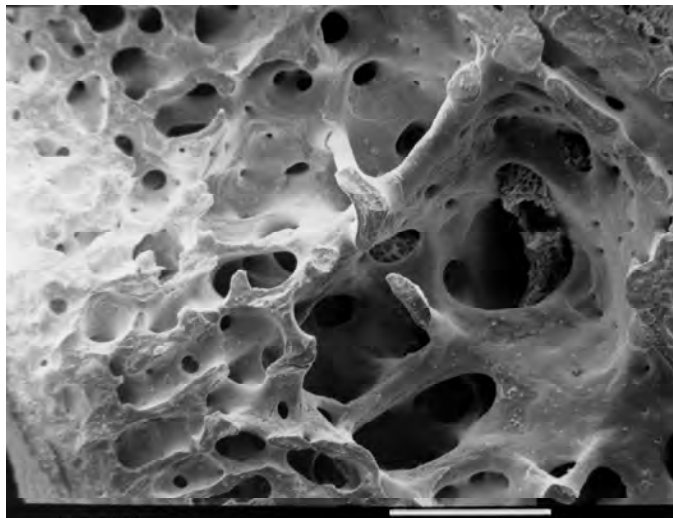


Figura 12: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo I (pseudo-ovariectomizado)

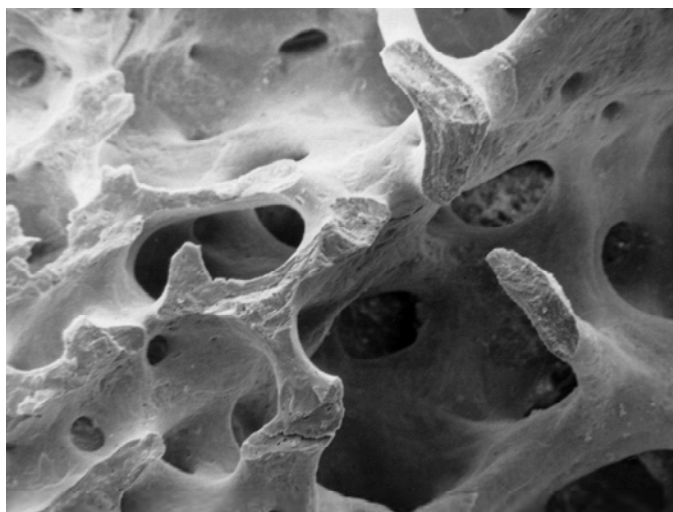


Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo I (pseudo-ovariectomizado)

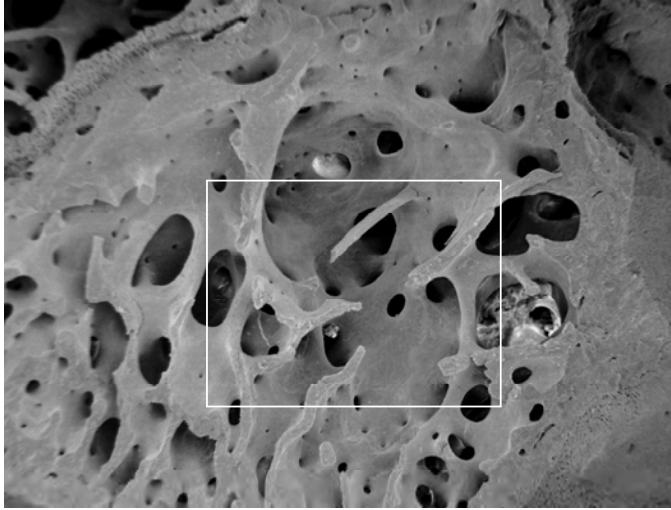


Figura 14: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo II (ovariectomizado)

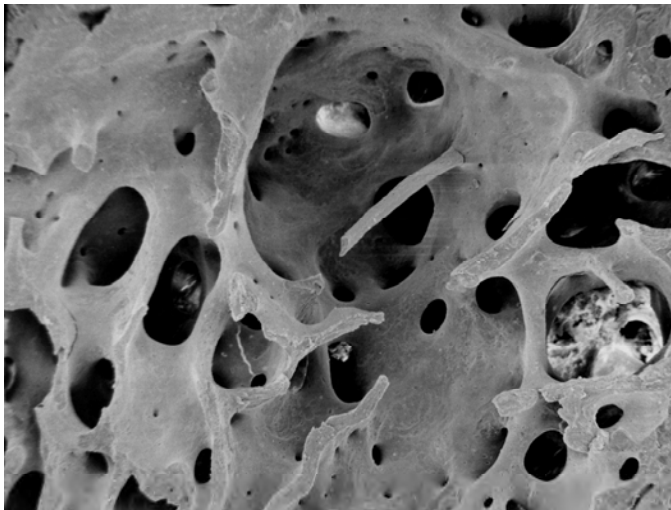


Figura 15: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo II (ovariectomizado)

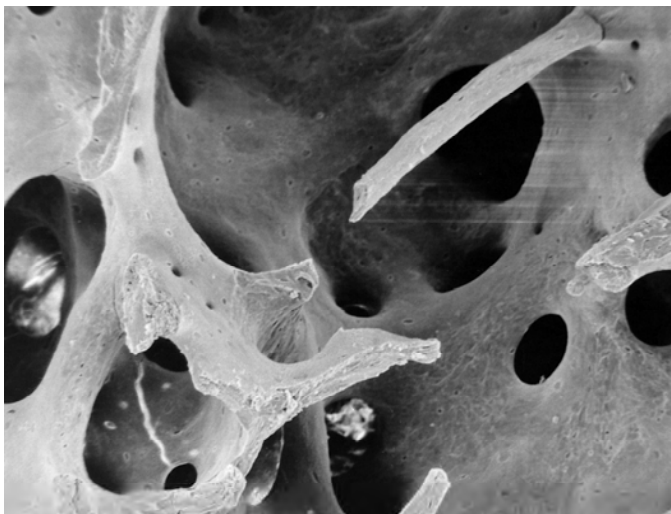


Figura 16: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo II (ovariectomizado)

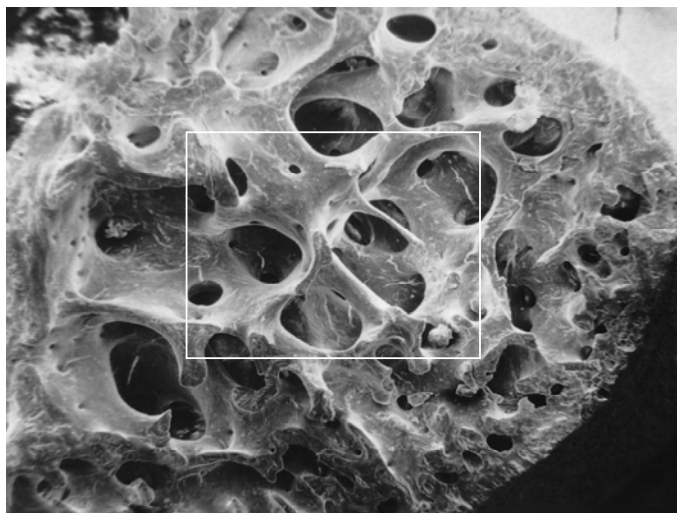


Figura 17: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo III (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio)

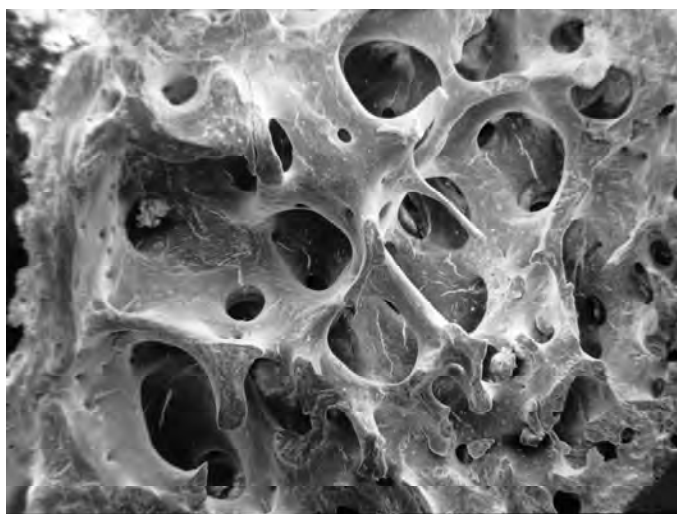


Figura 18: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo III (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio)

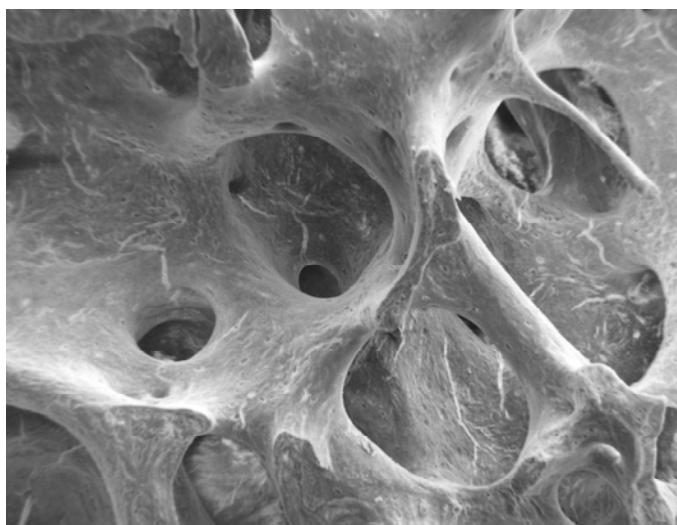


Figura 19: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo III (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio)

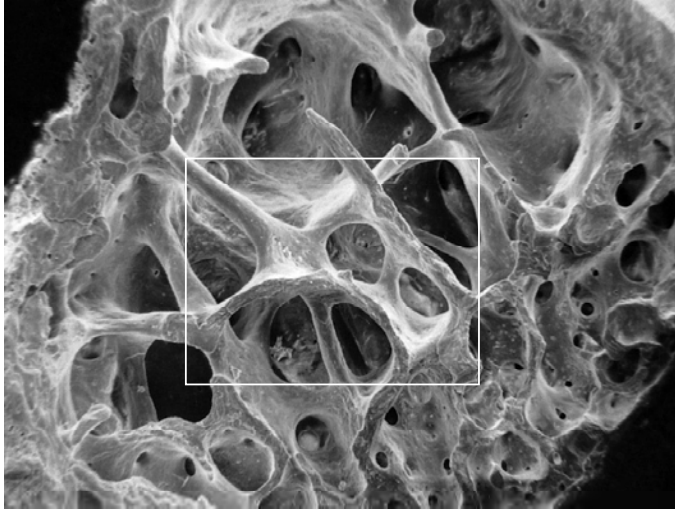


Figura 20: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo IV (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com cálcio)

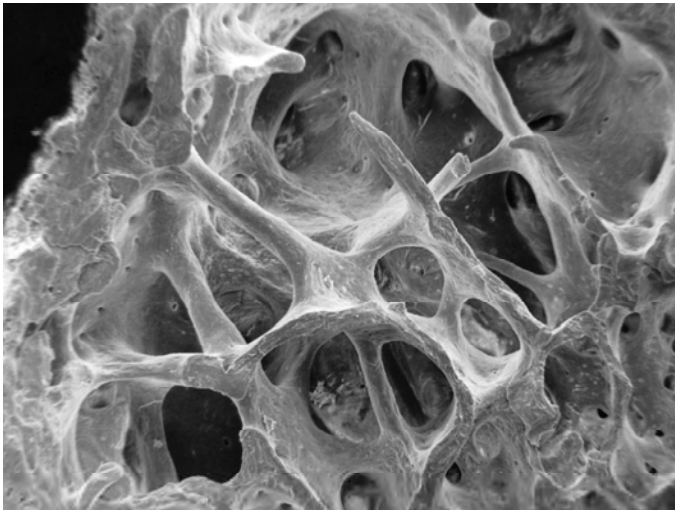


Figura 21: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo IV (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com cálcio)

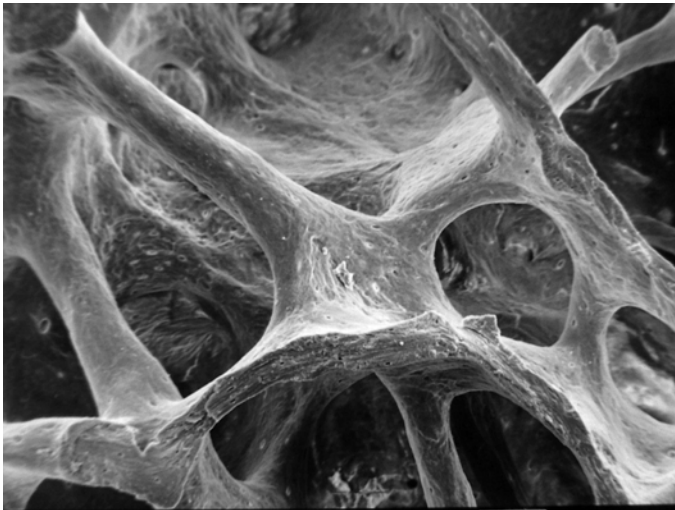


Figura 22: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo IV (ovariectomizado + produto fermentado suplementado com cálcio)

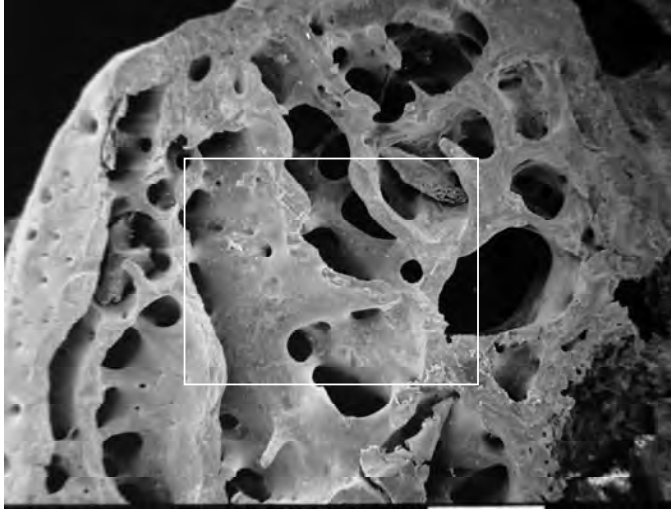


Figura 23: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 35 vezes) de fêmur esquerdo do grupo V (ovariectomizado + placebo suplementado com cálcio)

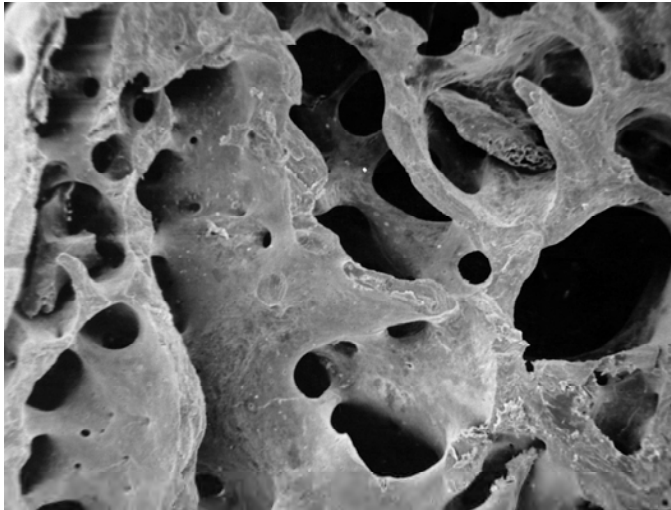


Figura 24: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 50 vezes) de fêmur esquerdo do grupo V (ovariectomizado + placebo suplementado com cálcio)

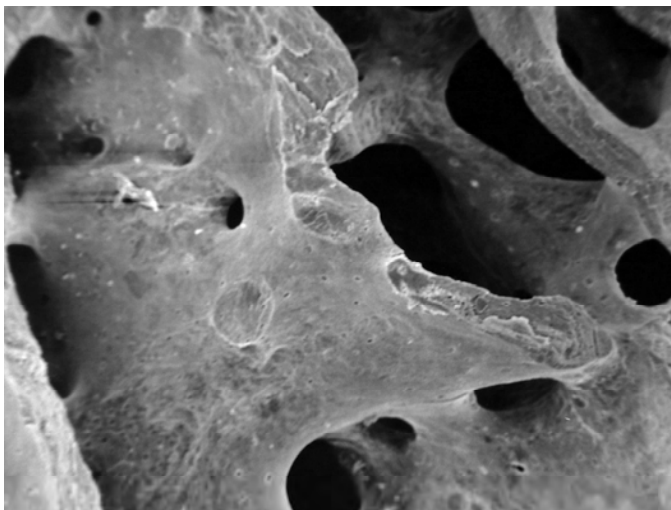


Figura 25: Micrografia eletrônica de varredura (aumento de 100 vezes) de fêmur esquerdo do grupo V (ovariectomizado + placebo suplementado com cálcio)

Vale ressaltar que com a realização da criofatura muitas vezes não é possível obter o mesmo corte, na mesma região óssea. No entanto, através das fotos obtidas neste estudo vê-se claramente o efeito da castração, o que está de acordo com o trabalho desenvolvido por THOMPSON (1995), CANOTILHO (1996) e BERTONCELLO (2001). Na osteoporose, as trabéculas tornam-se afinadas, com número diminuído e espaço entre elas aumentado, podendo ocorrer conversão de alguns platôs em barras trabeculares. BAGI e MILLER (1994) verificaram a diminuição da conectividade trabecular e aumento dos volumes medulares, indicando maior separação entre as trabéculas, em ratas após 12 semanas de ovariectomia.

A figura 26 apresenta a medida da largura das trabéculas (μm) relativa a cada grupo de estudo.

Pôde-se perceber pela figura 26 que o afinamento das trabéculas observado na análise qualitativa das micrografias eletrônicas (Figura de 14 a 16) para o grupo ovariectomizado (grupo II) pôde ser comprovado pela medida da largura das trabéculas.

O grupo II (ovariectomizado) apresentou largura menor ($p < 0,05$) que o grupo I (pseudo-ovariectomizado). Desta forma, a ovariectomia foi capaz de provocar afinamento trabecular. O grupo de animais que ingeriu o “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas e cálcio (grupo III) e o grupo que ingeriu o produto fermentado suplementado apenas com cálcio apresentaram larguras maiores ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo II (ovariectomizado), mas que não diferiram estatisticamente das do grupo I (pseudo-ovariectomizado). Todavia, o grupo que consumiu o placebo suplementado com cálcio (grupo V) apresentou uma menor largura das trabéculas se comparada com o grupo III, sem, entretanto, diferir significativamente do grupo ovariectomizado (grupo II) e do grupo IV.

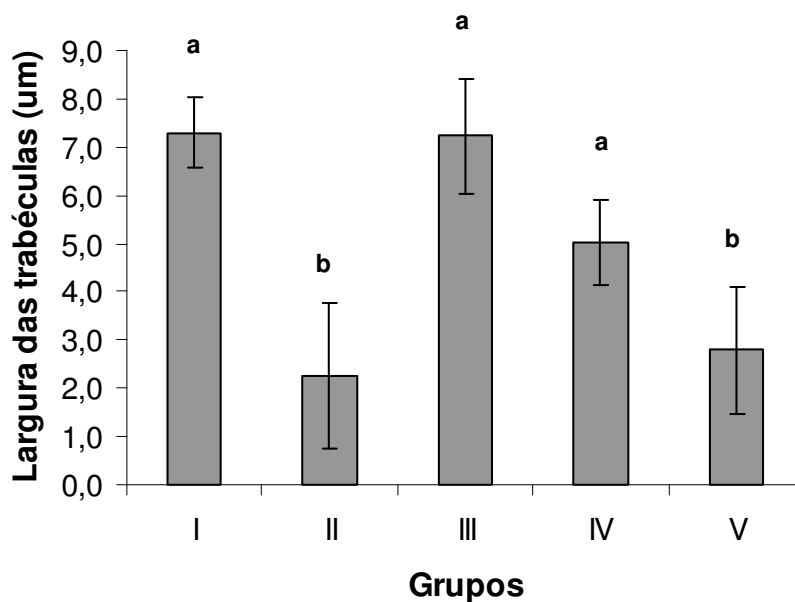


Figura 26. Largura das trabéculas (μm) da porção média distal dos fêmures esquerdos dos diferentes grupos experimentais

I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados

II – Grupo de animais ovariectomizados

III – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com isoflavonas e cálcio

IV – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto fermentado suplementados com cálcio

V – Grupo de animais OVX que ingeriram o placebo suplementado com cálcio

Embora o grupo III tenha apresentado, em termos de valores médios absolutos, uma tendência a larguras trabeculares maiores que as do grupo IV, esses dois grupos não diferiram ($p > 0,05$) entre si com relação a esse parâmetro. Desta forma, nem a suplementação com isoflavonas, nem a suplementação com cálcio foram responsáveis pelo fato das larguras das trabéculas do grupo III e IV não terem diferido da do grupo I (pseudo-ovariectomizado). Uma possível explicação pode estar relacionada com o processo fermentativo e/ou devido à presença de microrganismos viáveis no produto encontrados tanto no produto ingerido pelo grupo III quanto pelo grupo IV. Novamente aqui, os resultados parecem indicar um tempo de estudo insuficiente para que pudessem ser observadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos utilizados, pois como foi dito, os valores médios absolutos para as larguras das trabéculas do grupo III apresentaram uma tendência a serem superiores às do grupo IV. Um tempo maior de estudo poderia representar uma possibilidade para que o grupo III diferisse estatisticamente do grupo IV.

A partir desses resultados pôde-se perceber que o produto fermentado apresentou um efeito protetor sobre a largura das trabéculas, prevenindo a redução ocasionada pela OVX. Além disso, a dose de isoflavonas consumida pelas ratas do grupo III pode ter sido baixa, o que explicaria o fato do grupo III e IV não terem diferido significativamente entre si quanto ao parâmetro em questão. DEYHIM et al. (2003), utilizando doses de isoflavonas semelhantes às empregadas em nosso trabalho concluíram que baixas doses podem não ser capazes de exercer qualquer efeito de proteção óssea aparente, pelo menos com relação ao modelo de osteoporose utilizado (Modelo de ovariectomia da rata madura). No entanto, PICHERIT et al. (2000) observaram que o consumo de daidzeína por ratas ovariectomizadas com 12 meses de idade e submetidas a um período de experimentação de 90 dias resultou na preservação da área da porção trabecular na região da metáfise distal do fêmur se comparada ao grupo ovariectomizado. Vale ressaltar que além das ratas utilizadas nesse estudo serem mais velhas, a dose de isoflavonas, no caso a daidzeína, usada foi muito maior do que aquela utilizada em nosso experimento.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, nas condições deste estudo (tempo de experimentação, idade dos animais, sítios esqueléticos e dose de isoflavonas), foi possível concluir que:

- O “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* suplementado com isoflavonas e cálcio foi capaz de evitar o aumento de peso corpóreo causado pela ovariectomia.
- O “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* suplementado com isoflavonas e cálcio e o suplementado apenas com cálcio apresentaram um efeito protetor sobre a largura das trabéculas de fêmures, prevenindo a redução ocasionada pela ovariectomia.
- Nem a suplementação com isoflavonas, nem a suplementação com cálcio mostraram-se responsáveis pelo efeito protetor da largura das trabéculas verificado nos grupos de animais que ingeriram o produto fermentado suplementado com isoflavonas e cálcio (grupo III) e o suplementado apenas com cálcio (grupo IV), portanto, é provável que o referido efeito seja decorrente da ação exclusiva do produto fermentado.
- Não foi possível observar diferenças entre os tratamentos utilizados nos diversos grupos em estudo (I, II, III, IV e V), principalmente com relação à matriz óssea mineral das tíbias e fêmures, uma vez que os parâmetros físicos, químicos e biomecânicos utilizados, com exceção da medição da largura das trabéculas, não se alteraram com a ovariectomia.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados neste trabalho fornecem embasamento para estudos futuros, os quais deverão estar centrados no efeito do produto fermentado suplementado com isoflavonas sobre sítios esqueléticos ricos em osso trabecular, como por exemplo vértebras lombares. Os parâmetros usados não foram suficientemente adequados para a determinação das possíveis alterações ósseas causadas pela ovariectomia, embora estejam embasados na literatura. Em estudos futuros deveremos quantificar a densidade mineral óssea (DMO) por meio da densitometria óssea. A não utilização dessa metodologia no presente trabalho se deu em decorrência da indisponibilidade de equipamento.

Além disso, o período experimental deverá ser revisto a fim de que ele seja suficientemente longo para permitir alterações ósseas significativas. Um outro ponto a se refletir está relacionado com a dose de isoflavonas utilizada, que deverá ser aumentada tendo como base dados da literatura que descrevem o efeito positivo destas sobre o tecido ósseo, quando administradas em concentrações maiores.

Desta forma, este trabalho é o ponto de partida para uma série de outros estudos voltados ao efeito do consumo do “iogurte” de soja suplementado com isoflavonas na prevenção da perda óssea tanto em animais quanto em humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ, H.; FOTSIS, T.; LAMPE, J. Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 215, p. 5-18, 1993.

ADLERCREUTZ, H.; HAMALAINEN, E.; GORBACH, S.; GOLDIN, B. Dietary Phyto-oestrogens and the menopause in Japan (letter). **Lancet**. v. 339, p 1233, 1992.

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W.; BARTELS, P.; ELOMAA, V.; WATANABE, S.; WAHALA, K.; LANSTROM, M.; LUNDIN, E.; BERGH, A.; DAMBER, J.E.; AMAN, P.; WIDMARK, A.; JOHANSSON, A.; ZHANG, J.X.; HALLMANS, G. Phytoestrogens and prostate disease. **J. Nutr.**, v. 130, p. 658S-659S, 2000.

ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **Lancet Oncol**, v. 3, p. 364-373, 2002.

ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. **Environ. Health Perspect.**, v. 103, supplement 7, p. 103-112, 1995.

ALBERTAZZI, P.; PANSINI, F.; BONACCORSI, G.; ZANOTTI, L.; FORINI, E.; DE ALOYSIO, D. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. **Obstet Gynecol.**, v. 91, n.1, p. 6-11, 1998.

ALEKEL, D.L.; GERMAIN, A. S.; PETERSON, C.T.; HANSON, K.B.; STEWART, J.W.; TODA, T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 844-852, 2000.

ALLRED, C.D.; ALLRED, K.F.; JU, Y.H.; VIRANT, S.M.; HELFERICH, W.G. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose dependent manner. **Cancer. Res.**, v. 61, p. 5045-5050, 2001a.

ALLRED, C.D.; JU, Y.H.; ALLRED, K.F.; CHANG, J.; HELFERICH, W.G. Dietary genistein stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1667-1673, p. 2001b.

ANDERSON, J.J.B. Dietary calcium and bone mass through the life cycle. **Nutr. Today**, v. 25, p. 9-14, 1990.

ANDERSON, J.W.; JOHSTONE, B.M.; COOK-NEWELL, M.E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **New Engl. J. Med.**, v. 333, p. 276-282, 1995.

APPLET, L.C.; REICKS, M.M. Soy induces phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz(a)anthracene-induced carcinogenesis in female rats. **J. Nutr.**, v. 29, p. 1820-1826, 1999.

ARAÚJO, J.M.A.; CARLOS, J.C.S.; SEDYAMA, C.S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de β -glicosidade na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciê. Tecnol. Aliment.**, v. 17, p. 137-141, 1997.

ARJMANDI, B.H.; ALEKEL, L.; HOLLIS, B.W.; AMIN, D.; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; GUO, P.; KUKREJA, S.C. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **J. Nutr.**, v. 126, p. 161-167, 1996.

ARJMANDI, H.B.; BIRNBAUM, R.; GOYAL, N.V.; GETLINGER, M.J.; JUMA, S.; ALEKEL, L.; HASLER, C.M.; DRUM, M.L.; HOLLIS, B.W.; KURKREJA, S.C. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p. 1364S-1368S, 1998a.

ARJMANDI, B.H.; GETLINGER, M.J.; GOYAL, N.V.; ALEKEL, L.; HASLER, C.M.; JUMA, S.; DRUM, M.L.; HOLLIS, B.W.; KUKREJA, S.C. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p. 1358S-1363S, 1998b.

ARJMANDI, B.H.; KHALIL, D.A.; LUCAS, E.A.; JUMA, S.; SINICHI, N.; HODGES, S.B.; PAYTON, M.; HAMMOND, L.; MUNSON, M.E.; WILD, R. Soy protein with its isoflavones improves bone markers in middle-aged and elderly women. **FASEB**, v. 15, p. 728, 2000 (abstract)

ATKINSON, C.; BINGHAM, S.A. Mammographic breast density as a biomarker of effects of isoflavones on the female breast. **Breast Cancer Res.**, v. 4, p. 1-4, 2002.

BAGI, C.M.; MILLER, S.C.. Comparison of osteopenic changes in cancellous bone induced by ovariectomy and/or immobilization in adult rats. **Anat. Rec.**, v. 239, p. 243-54, 1994.

BAGNOLI, V.R.; FONSECA, A.M. Etiopatogenia do climatério. In: SAMPAIO, N.A.P.; FONSECA, A.M.; BAGNOLI, V.R.; HALBE, H.W.; PINOTTI, J.A. (Org). Síndromes climáticas. São Paulo: Atheneu, 1999, p. 9-14.

BAIRD, D.D.; UMBACH, D.M.; LANSDELL, L.; HUGHES, C.L.; SETCHELL, K.D.R.; WEINBERG, C.R.; HANEY, A.F.; WILCOX, A.J.; McLACHLAN, J.A.

Dietary intervention study to assess oestrogenicity of dietary soy among postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 80, p. 1685-1690, 1995.
BARRET, J. Phytoestrogens. Friends or foes? **Environ Health Perspect**, v. 104, p. 478-482, 1996.

BERDANIER, G.D. (Ed.), 2002. Handbook of Nutrition. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington DC, p. 1604. In: FISHBEIN, L. Multiple sources of dietary calcium – some aspects of its essentiality. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 39, p. 67-80, 2004.

BERTONCELLO, D. **Efeitos do tratamento com melatonina sobre o tecido ósseo de ratos castrados**. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado) UFSCar.

BLUM, S.C.; HEATON, S.N.; BOWMAN, B.M.; HEGSTED, M.; MILLER, S.C. Dietary soy protein maintains some indices of bone mineral density and bone formation in aged ovariectomized rats. **J. Nutr.**, v. 133, p. 1244-1249, 2003.

BONING up on osteoporosis, 2002. Disponível em: www.cfsan.fda.gov/~dms/fdaosteo.html. Acesso em: 27/9/2004.

BOONEN, S.; LESAFFRE, E.; DEQUEKER, J.; AERSSSENS, J.; NIJS, J.; PELEMANS, W.; BOUILLON, R. Relationship between baseline IGF-I and femoral bone density in women aged over 70 years: potential implications for prevention of aged-related bone loss. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 44, p. 1301-1306, 1996.

BORDIGNON, J.R.; MANDARINO, J.M.G. Soja: Composição química, valor nutricional e sabor. Londrina: Centro Nacional de Pesquisa de Soja – CNPSo, 1994. 31p. (Embrapa, Doc. 70).

BOULET, M.J.; ODDENS, B.J.; LEHERT, P.; VEMER, H.M.; VISSER, A. Climateric and menopause in seven south-east Asian countries. **Maturitas**, v. 19, p. 157-176, 1994.

BREITMAN, P.L.; FONSECA, D.; CHEUNG, A.M.; WARD, W.E. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. **Bone**, v. 33, p. 597-605, 2003.

BREZINSKI, A.; DEBI, A. Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators. **Eur. J. Obstet. Gyn. Rep. Biol.**, v. 85, p. 47-51, 1999.
BROWN, N.M.; WANG, J.; COTRONEO, M.S.; ZHAO, Y.X.; LAMARTINIERE, C.A. Prepubertal genistein treatment modulates TGF- α , EGF and EGF-receptor mRNAs and proteins in the rat mammary gland. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 144, p. 149-165, 1998.

BROCHU, M.; STARLING, R.D.; TCHERNOF, A.; MATTHEWS, D.E.; GARCIA-RUBI, E.; POEHLMAN, T. Visceral adipose tissue is an independent correlate of glucose disposal in older obese postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 2378-2384, 2000.

BRYANT, H.U.; DERE, W.H. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 217, p. 45-52, 1998.

BURDETTE, E.; LIU, J.; LANTVIT, D.; LIM, E.; BOOTH, N.; BHAT, K.P.; HEDAYAT, S.; VAN BREEMEN, R.B.; CONSTANTINOU, A.I.; PEZZUTO, J.M.; FARNSWORTH, N.R.; BOLTON, J.L. Trifolium pratense (red clover) exhibits estrogenic effects in vivo in ovariectomized Sprague-Dawley rats. **J. Nutr.**, v. 132, p. 27-30, 2002.

BYDLOWSKI, S.P. Fisiologia da gônada feminina. In: DOUGLAS, C.R. **Tratado de fisiologia aplicada à saúde**. 5. ed. São Paulo: Roubie Ed., 2002. cap. 82, p. 1313-1330.

CAMPIOLO, D.J.; MEDEIROS, S.F. Tromboembolismo venoso e terapia de reposição hormonal da menopausa: uma análise clínico-epidemiológica. **Arq. Bras. Edocrinol. Metab.**, v. 47, p. 534-542, 2003.

CANOTILHO, M.M. Osteoporose experimental em ratas: efeitos da administração crônica de ácido acetilsalicílico. 1996. 114f. Dissertação (Mestrado) DCF-UFSCar.

CARLOS, I.Z.; ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; MACHADO, C.O.; CYRILLO, R.N.S.; PERRAZO, F.F.; VADZ, G.F. Avaliação do potencial alergênico de um novo produto fermentado de soja. **Rev. Ciên. Farm.**, São Paulo, v. 21, p. 103-113, 2000.

CARRAO-PANIZZI, M.C.; KITAMURA, K.; BELEIA, A.D.; OLIVEIRA, M.C.N. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybeans cultivars. **Breeding Sci.**, v. 48, p. 409-413, 1998.

CHAN, G.M.; HOFFMAN, K.; MCMURRY, M. Effects of dairy products on bone and body composition in pubertal girls. **J. Pediatr.**, v. 126, p. 551-556, 1995.

CHAPUY, M.C.; ARLOT, M.E.; DUBOEUF, F.; BRUN, J.; CROUZET, B.; ARNAUD, S.; DELMAS, P.D.; MEUNIER, P.J. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N. Engl. J. Med.*, v. 327, p. 1637-1642, 1992.

CHARLES, P. Calcium absorption and calcium bioavailability. **J. Intern. Med.**, v. 231, p. 161-168, 1992.

CHEVALLEY, T.; RIZZOLI, R.; NYDEGGER, V.; SLOSMAN, D.; RAPIN, C.H.; MICHEL, J.P.; VASEY, H.; BONJOUR, J.P. Effects of calcium supplements on femoral bone mineral density and vertebral fracture rate in vitamin-D-replete elderly patients. **Osteoporos. Int.**, v. 4, p. 245-252, 1994.

CHRISTEL, P.; CERF, G.; PILLA, A. Time evolution of the mechanical properties of the callus of fresh fractures. **Ann. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 383-391, 1981

CLARK, J.M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of tibial plateau in dog, rabbit and man. **J. Orthop. Res.**, v. 9, p.246-57, 1991.

CLARKSON, T.B.; ANTHONY, M.S.; MORGAN, T.M. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, p. 41-47, 2001.

COLDITZ, G.A.; WILLET, W.C.; ROTNITZKY, A.; MANSON, J.E. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Ann. Intern. Med.**, v. 122, p. 481-486, 1995.

CONAB. Intenção de plantio safra agrícola 2003/2004 - **Quinto levantamento - junho de 2004.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/safra/safra20032004Lev05.pdf>. Acesso em: 11/08/2004.

COOPER, C.; CAMPION, G.; MELTON, L.J. Hip fractures in the elderly: A world – wide projection. **Osteoporos. Int.**, v. 2, p. 285-289, 1992.

CROUSE, J.R.; MORGAN, T.; TERRY, J.G.; ELLIS, J.; VITOLINS, M.; BURKE, G.L. A randomized trial comparing the effect of caseine with that of soy protein containing varying amount of isoflavones on plasma concentration of lipids and lipoproteins. **Arch. Intern. Med.**, v. 159, p. 2070-2076, 1998.

CUMMINGS, R.G.; CUMMINGS, S.R.; NEVITT, M.C.; SCOTT, J.; ENSRUD, K.E.; VOGT, T.M.; FOX, K. Calcium intake and fracture risk: results from Study of Osteoporotic Fractures. **Am. J. Epidemiol.**, v. 145, p. 926-934, 1997.

CUMMINGS, S.R.; NEVITT, M.C.; WARREN, S.; BROWNER, W.S.; STONE, K.; FOX, K.M.; ENSRUD, K.E.; CAULEY, J.; BLACK, D.; VOGT, T.M. Risk factors for hip fracture in white women. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 767-773, 1995.

DALAIS, F.S.; EBELING, P.R.; KOTSOPOULOS, D.; McGRATH, B.P.; TEEDE, H.J. The effects of soy protein containing isoflavones on lipids and indices of bone resorption in postmenopausal women. **Clin. Endocrinol.**, v. 58, p. 704-709, 2003.

DANIELSEN, C.C.; MOSEKILDE, L.; SVENSTRUP, B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. **Calcif. Tissue Int.**, v. 52, p. 26-33, 1993.

DAWSON-HUGHES, B.; DALLAL, G.E.; KRALL, E.A.; SADOWSKI, L.; SAYHOUN, N.; TANNENBAUM, S. A controlled trial of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 879-883, 1990.

DAWSON-HUGHES, B.; HARRIS, S.S. Regional changes in body composition by time of year in healthy postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 56, p. 307-313, 1990.

DAWSON-HUGHES, B.; HARRIS, S.S.; KRALL, E.A.; DALLAL. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p. 670-676, 1997.

DAWSON-HUGHES, B.; HARRIS, S.S.; KRALL, E.A.; DALLAL, G.E.; FALCONER, G.; GREEN, C.L. Rates of bone loss in postmenopausal women randomly assigned to one of two dosages of vitamin D. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 61, p. 1140-1145, p. 1995.

DE KLEIJN, M.J.; VAN DER SCHOUW, Y.T.; WILSON, P.W.; ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W.; GROBBEE, D.E.; JACQUES, P.F. Intake of dietary phytoestrogen is low in post-menopausal women in the United States; the Framingham study. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1826-1832, 2001.

DELMAS, P.D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **Lancet**, v. 359, p. 2018-2026, 2002.

DENKE, M.A.; TEMPOS, C.T.; GRUNDY, S.M. Excess body weight: an under-recognized contributor to dyslipidemia in white American women. **Arch. Intern. Med.**, v. 154, p. 401-410, 1994.

DEVINE, A.; DICK, I.M.; HEAL, S.J.; CRIDDLE, R.A.; PRINCE, R.L. A 4 year follow-up study of the effects of calcium supplementation on bone density in elderly postmenopausal women. **Osteoporos. Int.**, v. 7, p. 23-28, 1997.

DEWELL, A.; HOLLENBECK, C.B. e BRUCE, B. The effects of soy-derived phytoestrogens on serum lipids and lipoproteins in moderately hypercholesterolemic post-menopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 118-121, 2002.

DEYHIM, F.; STOECKER.; BRUSEWITZ, G.H.; ARJMANDI, B.H. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. **Nutr. Res.**, v. 23, p. 123-130, 2003.

DONAHUE, H.J. MAZZEO, R.S.; HORVATH, S.M. Endurance training and bone loss in calcium-deficient and ovariectomized rats. **Metabolism**, v.37, n.8, p. 741-744, 1998.

DUBNOV, G.; BRZEZINSKI, E.; BERRY, E.M. Weight control and management of obesity after menopause: the role of physical activity. **Maturitas**, v. 44, p. 89-101, 2003.

DUNCAN, A.M.; UNDERHILL, K.E.W.; XU, X.; LAVALLEUR, J.; PHIPPS, W.R.; KURZER, M.S. Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 3479-3484, 1999.

EDWARDS, B.J.; PERRY, H.M. Age-related osteoporosis. **Clin. Geriatr. Med.**, v. 10, p. 575-588, 1994.

ELDERS, P.J.; NETELENBOS, J.C.; LIPS, P.; VAN GINKEL, F.C.; KHOE, E.; LEEUWENKAMP, O.R.; HACKENG, W.H.; VAN DER STELT, P.F. Calcium supplementation reduces vertebral bone loss in perimenopausal women: a controlled trial in 248 women between 46 and 55 years of age. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 73, p. 533-540, 1991.

ENGESAETER, L.B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthop. Scand.**, v. 49, p. 512-518, 1978.

ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J.A. Oestrogen receptors: an overview. **J. Int. Med.**, v. 246, p. 133-138, 1999.

ERVIN, R.B.; WRIGHT, J.D.; KENNEDY-STEPHENSON, J. Use of dietary supplements in the United States. **Vital Health Stat.**, v. 244, p. 1-14, 1999.
FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; TEUCHER, B. Iron and calcium bioavailability of fortified foods and dietary supplements. **Nutr. Rev.**, v. 60, p. 360-367, 2002.

FESKANICH, D.; WILLETT, C.; COLTIZ, A. Calcium, vitamin D, milk consumption, and hip fractures: a prospective study among postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 77, p. 504-511, 2003.

FESKANICH, D.; WILLETT, C.; STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A. Milk, dietary calcium, and bone fractures in women: a 12-year prospective study. **Am. Public Health.**, v. 87, p. 992-997, 1997.

FISHBEIN, L. Multiple sources of dietary calcium – some aspects of its essentiality. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 39, p. 67-80, 2004.

FONSECA, D.; WARD, W.E. Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. **Bone**, v. 35, p. 489-497, 2004.

FRITZ, W.A.; WANG, J.; ELTOUM, I.E.; LAMARTINIERE, C.A. Dietary genistein down-regulates androgen and oestrogen receptor expression in the rat prostate. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 186, p. 89-99, 2002.

FROST, H.M. Bone mass and the mechanostat: a proposal. **Anat. Rec.**, v.219, p. 1-9, 1987.

GAO, Y.H.; YAMAGUCHI, M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: Apoptosis is induced through Ca²⁺ signaling. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 22, p. 805-809, 1999.

GAO, Y.H.; YAMAGUCHI, M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. **Int. J. Mol. Med.**, v. 5, p. 261-267, 2000.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavonas da soja: fatores que influem nos tipos e teores em alimentos. **Food Ingredients**, v. 11, p. 62-64, 2001.

GOODMAN, M.T.; WILKENS, L.R.; HANKIN, J.H.; WU, A.H.; KOLONEI, L.N. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. **Am. J. Epidemiol.**, v. 146, p. 294-306, 1997.

GREAVES, K.A.; PARKS, J.S.; WILLIAMS, J.K.; WAGNER, J.D. Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgous monkeys. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1585-1592, 1999.

GUEGUEN, L.; POINTILLART, A. The bioavailability of dietary calcium. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 19, p. 119S-136S, 2000.

GUNBY, M.C.; MORLEY, J.E. Epidemiology of bone loss with aging. **Clin. Geriatr. Med.**, v. 10, p. 557-573, 1994.

GURR, M. **Calcium Nutrition**. Washington, DC, ILDI Press: 1999. 40p.

HADJDAKIS, D.; LEMPERS, U.G.; MINNE, H.W. Bone loss in experimental diabetes. **Hormon. Metab. Res.**, v.25, p. 77-81, 1993.

HAGGANS, C.J.; HUTCHINS, A.M.; OLSON, B.A.; THOMAS, W.; MARTINI, M.C.; SLAVIN, J.L. Effect of flaxseed consumption on urinary oestrogen metabolites in post-menopausal women. **Nutr. Cancer**, v. 33, p. 188-195, 1999.

HARRISON, E.; ADJEI, A.; AMEHO, C.; YAMAMOTO, S.; KONO, S. The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 44, p. 257-268, 1998.

HEANEY, R.P. Bone mass, nutrition, and other lifestyle factors. **Am. J. Med.**, v. 95, p. 29S-33S, 1993.

HEANEY, R.P. Calcium, dairy products and osteoporosis. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 19, p. 83S-99S, 2000.

HEANEY, R.P. Calcium needs of elderly to reduce fracture risk. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 20, p. 192S-197S, 2001a.

HEANEY, R.P. Estrogen-calcium interactions in the postmenopause: a quantitative description. **Bone Miner.**, v. 11, p. 67-84, 1990.

HEANEY, R.P. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1344S-1348S, 2001b.

HEANEY, R.P.; RECKER, R.R.; STEGMAN, M.R.; MOY, A.J. Calcium absorption in women: relationships to calcium intake, estrogen status, and age. **J. Bone Miner. Res.**, v. 4, p. 469-475, 1989.

HORIUCHI, T.; ONOUCHI, M.; TAKAHASHI, M.; ITO, H.; ORIMO, H. Effects of s and 2000 oy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women. **Osteoporos. Int.**, v. 11, p. 721-724, 2000.

HU, J.F.; ZHAO, X.H.; JIA, J.B.; PARPIA, B.; CAMPBELL, T.C. Dietary calcium and bone density among middle-aged and elderly women in China. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 58, p. 219-227, 1993.

ILICH, J.Z.; KERSTETTER, J.E. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 19, p. 715-737, 2000.

ISHIMI, Y.; MIYAURA, C.; OHMURA, M.; ONOE, Y.; SATO, T.; UCHIYAMA, Y.; ITO, M.; WANG, X.; SUDA, T.; IKEGAMI, S. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. **Endocrinology**, v. 140, p. 1893-1900, 1999.

ISOLAURI, E.; JUNTUNEN, M.; RAUTANEN, T.; SILLANAUKKEE, P.; KOIVULA, T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes on recovery from acute diarrhoea in childrens. **Pediatrics**, v. 88, p. 90-97, 1991.

JACOBSEN, B.K.; KNUTSEN, S.F.; FRASER, G.E. Does high soy milk intake reduce prostate cancer incidence? The adventist health study (United States). **Cancer Cause Control**, v. 9, p. 553-557, 1998.

JEE, W.S.S.; MORI, S.; LI, X.J.; CHAN, S. Prostaglandin E₂ enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. **Bone**, v. 11, p. 253-266, 1990.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v.15, p. 175-192, 1991.

KALU, D.N.; ARJMANDI, B.H.; LIU, C.C.; SALIH, M.A.; BIRBAUM, R.S. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3. **Bone Miner.**, v. 25, p. 135-148, 1994.

KAYE, S.A.; FOLSOM, A.R.; PRINEAS, R.J.; POTTER, J.D.; GAPSTUR, S.M. The association of body fat distribution with lifestyle and reproductive factors in population study of post-menopausal women. **Int. J. Obesity**, v. 16, p. 495-504, 1992.

KENNEY, M.A.; MCCOY, H.; WILLIAMS, L. Effects of magnesium deficiency on strength, mass, and composition of rat femur. **Calcif. Tissue Int.** v. 54, p. 44-9, 1994.

KENNY, A.M.; PRESTWOOD, K.M. Osteoporosis: Pathogenesis, diagnosis and treatment in older adults. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, v. 26, p. 569-591, 2000.

KIM, J.C.; KIM, T.H.; RYU, W.S.; RYOOD, U.H. Influence of menopause on high density lipoprotein-cholesterol and lipids. **J. Korean Med. Sci.**, v. 15, p. 380-386, 2000.

KINOUCI, F.L.; CARDELLO, H.M.B.; ROSSI, E.A.; TELAROLLI JÚNIOR, R. Aceitação do "iogurte" de soja entre adolescentes. **Alim. Nutr., São Paulo**, v. 13, p. 131-142, 2002.

KOLONEL, L.N.; HANKIN, J.H.; WHITTEMORE, A.S. WU, A.H.; GALLANGHER, R.P.; WILKENS, L.R.; JOHN, E.M.; HOWE, G.R.; DREON, D.M.; WEST, D.W.; PAFFENBARGER, R.S. Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: a multiethnic case-control study. **Cancer Epidemiol. Biomarker Prev.**, v. 9, p. 795-804, 2000.

KUIPER, G.G.J.M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN,K.; ENMARK, E.; HAGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 138, p. 863-870, 1997.

KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, B.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

LAMATINIERE, C.A. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 1705-1709S, 2000.

LAMARTINIERE, C.A.; MOORE, J.B.; BROWN, N.M.; THOMPSON, R.; HARDIN, M.J.; BARNES, S. Genistein suppresses mammary cancer in rats. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 2833-2840, 1995.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 241-245, 1995.

LEE, M.M.; WANG, R.T.; HSING, A.W.; GU, F.L.; WANG, T.; SPITZ, M. Case-control study of diet and prostate cancer in China. **Cancer Cause Control**, v. 9, p. 545-552, 1998.

LU, L.J.; ANDERSON, K.E.; GRADY, J.J.; KOHEN, F.; NAGAMANI, M. Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention. **Cancer. Res.**, v. 60, p. 4112-4121, 2000.

MA, Z.J.; SHIMANUKI, S.; IGARASHI, A.; KAWASAKI, Y.; YAMAGUCHI, M. Preventive effect of dietary fermented soybean on bone loss in ovariectomized rats: enhancement with isoflavone and zinc supplementation. **J. Health Sci.**, v. 46, n. 4, p. 263-268, 2000.

MACKERRAS, D.; LUMLEY, T. First and second-year effects in trials of calcium supplementation on the loss of bone density in postmenopausal women. **Bone**, v. 21, p. 527-533, 1997.

MARQUES NETO, J.F. **Epidemia da osteoporose no Brasil**. Disponível em: <http://www.nutricaoempauta.com.br/novo/51/entrevista3.htm>. Acesso em : 27/07/2004.

MARSHALL, D.; JOHNNELL, O.; WEDEL, H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. **Br. Med. J.**, v. 312, p. 1254-1259, 1996.

MATKOVIC, V.; KOSTIAL, K.; SIMONOVIC, I.; BUZINA, R.; BRODAREC, A.; NORDIN, B.E. Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 32, p. 540-549, 1979.

MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. S71-S77, 2000.

MESSINA, M.J.; LOPRINZI, C.L. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. **J. Nutr.**, v. 131, p. 3095-3108, 2001.

MESSINA, M.J.; PERSKY, V.; SETCHEL, K.D.R.; BARNES, S. Soy intake and cancer risk: review of the in vitro and in vivo data. **Nutr. Cancer**. v.21, p. 113-131, 1994.

MEYER, H.E.; PEDERSEN, J.L.; LOKEN, E.B.; TVERDAL, A. Dietary factors and the incidence of hip fractures in middle-aged Norwegians. **Am. J. Epidemiol.**, v. 145, p. 117-123, 1997.

MILLER, S.C.; WRONSKI, T.J. Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. **Anat. Rec.** v. 236, p. 433-42, 1993.

MITAL, B.K.; STEINKRAUS, K.H. Growth of lactic acid bacteria in soy milks. **J. Food Sci.**, v. 39, p. 1018-1022, 1974.

MORAIS, A.A.; SILVA, A.L. **Soja: suas aplicações**. Rio de Janeiro: Médici Editora Médica e Científica, 1996. 259p.

MORABITO, N.; CRISAFULLI, A.; VERGARA, C.; GAUDIO, A.; LASCO, A.; FRISINA, N.; D'ANNA, R.; CORRADO, F.; PIZZOLO, M.A.; CINCOTTA, M.; ALTAVILLA, D.; IENTILE, R.; SQUADRITO, F. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 176, p. 1904-1912, 2002.

MORTON, M.S.; CHAN, P.S.; CHENG, C. Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. **Prostate**, v. 32, p. 122-128, 1997.

MOSEKILDE, L. Normal age-related changes in bone mass, structure and strength – consequences of the remodeling process. **Dan. Med. Bull.**, v.1, p. 175-92, 1991.

MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. **Physiology and pharmacology of bone**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. v. 107. 762p.

MURKIES, A.L.; LOMBARD, C.; STRAUSS, B.J.G.; WILCOX, G.; BURGER, H.G.; MORTON, M.S. Dietary flour supplementation decreases postmenopausal hot flashes: effect of soy and wheat. **Maturitas**, v. 21, p. 189-195, 1995.

MURRAY, T.M. Calcium nutrition and osteoporosis. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 155, p. 935-939, 1996.

MURRIL, W.B.; BROWN, N.M.; ZHANG, J.X.; MANZOLILLO, P.A.; BARNES, S.; LAMARTINIERE, C.A. Prepubertal genistein exposure suppresses mamary cancer and enhances gland differentiation in rats. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1451-1457, 1996.

NAGAMI, M.; CAO, H.A.; LU, L.J.W. Potency of different isoflavones on growth inhibition of endometrial cancer cells in culture. **J. Soc. Gynecol. Invest.**, v. 5, p. 112A, 1998.

NAKAJIMA, D.; KIM, C.S.; OH, T.W.; YANG, C.Y.; NAKA, T.; IGAWA, S.; OHTA, F. Suppressive effect of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. **J. Physiol. Anthropol. Appl. Human.**, v. 20, p. 285-291, 2001.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the japanese daily intake. **J. AOAC Int.**, v. 8, n. 3, p. 635-650, 2000.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS CONFERENCE. NIH Consensus Developmental Panel on Optimum Calcium Intake. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 272, 1934-1948, 1994.

NESTEL, P.J.; POMEROY, S.; KAY, S.; KOMESAROFF, P.; BEHRING, J.; CAMERON, J.D.; WEST, L. Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women. **J. Clin. Endocrinol. Metabolism.**, v. 84, p. 895-898, 1999.

NIELSEN, N.C. Structure of soy proteins. **New Proteins Food**, v. 5, p. 27-63, 1985.

NIEVES, J.W.; KOMAR, L.; COSMAN, F.; LINDSAY, R. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: review and analysis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67, p. 18-24, 1998.

NORMAN, A.W. Intestinal calcium absorption: vitamin D – hormone – mediated adaptative response. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 51, p. 290-300, 1990.

NOTOMI, T.; OKIMOTO, A.N.; OKAZAKI, Y.; NAKAMURA, T.; SUZIKI, M. Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recobres bone strength of

the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, p. 140-149, 2003.

OISHI, K.; OKADA, K.; YOSHIDA, O. A case-control study of prostatic cancer with reference to dietary habits. **Prostate**, v. 12, p. 179-190, 1988.

OMI, N.; EZAWA, I. The ovariectomy on bone metabolism in rats. **Bone**, v. 17, p. 163S-168S, 1995.

ONO, R.; JIE MA., Z.; YAMAGUCHI, M. Prolonged intake of fermented soybean diets with supplementation of isoflavone and saponin prevents bone loss in ovariectomized rats. **Journal of Health Science**, v. 46, p. 70-74, 2000.

ONO, R.; YAMAGUCHI, M. Increase in bone components of rats orally administered isoflavone-containing soybean extract (nijiru). **J. Health Sci.**, v. 45. n. 2, p. 66-69, 1999.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Ivestigaciones sobre la menopausia en los años noventa. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1996 (Serie de Informes Técnicos 866).

ORTOFT, G.; OXLUND, H. Reduced strenght of rat cortical bone after glucocorticoid treatment. **Calcif. Tissue Int.**, v. 43, p.376-382, 1988.

OTT, E.M. Editorial: Attainment of peak bone mass. **J. Endocrinol. Metab.**, v. 71, p. 1082A-C, 1990.

PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPPER, G.G.J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A.; KUSHNER, P.J.; SCANLAN, T.S. Differential ligand activation of estrogen receptors ER and ER β at API sites. **Science**, Washington, DC, v. 277, p. 1508-1510, 1997.

PAPLER, P.G. Osteoporose e exercícios. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. São Paulo**, v. 52, p. 163-170, 1997.

PARFITT, A.m. calcium homeostasis. In: MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. **Physiology and pharmacology of bone**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 1-65.

PARKIN, D.M. Cancers of the breast, endometrium and ovary: geographic correlations. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, v. 25, p. 1917-1925, 1989.

PATEL, S. Current and potential future drug treatments for osteoporosis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 55, p. 700-714, 1996.

PENG, Z.; TUUKKANEN, J.; ZHANG, H.; JÄMSÄ, T.; VÄÄNÄNEN, H.K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, p. 523-532, 1994.

PENG, Z.; VÄÄNÄNEN, H.K.; ZHANG, H.; TUUKKANEN, J. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. **Bone**, v. 20, p. 207-212, 1997.

PETRAKIS, N.L.; BARNES, S.; KING, E.B.; LOWENSTEIN, J.; WIENCKE, J.; LEE, M.M.; MILKE, R.; KIRK, E.B.; COWARD, L. Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre and postmenopausal women. **Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.**, v. 5, p. 785-794, 1996.

PICHERIT, C.; CHANTERANNE, B.; BENNETAU-PELISSERO, C.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; BARLET, J.P.; COXAM, V. Dose-dependent bone-sparing effects dietary isoflavones in the ovariectomized rat. **Br. J. Nutr.**, v. 85, p. 307-316, 2001a.

PICHERIT, C.; COXAM, V.; BENNETAU-PELISSERO, C.; KATI-COULIBALY, S.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; BARLET, J.P. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1675-1681, 2000.

PICHERIT, C.; BENNETAU-PELISSERO, C.; CHANTERANNE, B.; LEBECQUE, P.; DAVICCO, M.J.; BARLET, J.P.; COXAM, V. Soybean isoflavones dose dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. **J. Nutr.**, v. 131, p. 723-728, 2001b.

POTTER, S.M.; BAUM, J.A.; TENG, H.; STILMAN, R.J.; SHAY, N.F.; ERDMAN, J.W. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p. 1375S-1379S, 1998.

PRESTWOOD, K.M.; THOMPSON, D.L.; KENNY, A.M.; SEIBEL, M.J.; PILBEAM, C.C.; RAISZ, L.G. Low dose estrogen and calcium have an additive effect on bone resorption in older women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 179-183, 1999.

PRINCE, R.; DEVINE, A.; DICK, I.; CRIDDLE, R.A.; KERR, D.; KENT, N.; PRINCE, R.; RANDELL, A. The effects of calcium supplementation (milk powder or tablets) and exercise on bone density in postmenopausal women. **J. Bone Miner. Res.**, v. 10, p. 1068-1075, 1995.

QUELLA, S.K.; LOPRINZI, C.L.; BARTON, D.L.; KNOST, J.A.; SLOAN, J.A.; LA VASSEUR, B.I.; SWAN, D.; KRUPP, K.B.; MILLER, K.D.; NOVOTNY, P.J. Evaluation of soy phytoestrogens for the treatment of hot flashes in breast cancer survivors: A North Central Cancer Treatment Group Trial. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 1068-1074, 2000.

RECKER, R.R.; DAVIES, K.M.; DOWD, R.M.; HEANEY, R.P. The effect of low dose continuous estrogen and progesterone with calcium and vitamin D on bone in elderly women. **Ann. Int. Med.**, v. 130, p. 897-904, 1999.

REID, I.R.; AMES, R.W.; EVANS, M.C.; GAMBLE, G.D.; SHARPE, S.J. Effect of calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 460-464, 1993.

REID, I.R.; AMES, R.W.; EVANS, M.C.; GAMBLE, G.D.; SHARPE, S.J. Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women: a randomized controlled trial. **Am. J. Med.**, v. 98, p. 331-335, 1995.

REINLI, K.; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods – a compendium of literature values. **Nutr. Cancer**, v. 26, p. 123-148, 1996.

RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON, L.J. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. **J. Bone Miner. Res.**, v. 13, p. 763-773, 1998.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. **Osteoporosis:** etiology, diagnosis, and management. New York: Raven Press, 1988. p. 133-154.

RIGGS, B.L.; WAHNER, H.W.; DUNN, W.L.; MAZESS, R.B.; OFFORD, K.P.; MELTON, L.J. Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging. **J. Clin. Invest.**, v. 67, p. 328-355, 1981.

RIIS, B.; NILAS, L.; CHRISTIANSEN, C. Does calcium potentiate the effect of estrogen therapy on postmenopausal bone loss? **Bone Miner.**, v. 2, p. 1-9, 1987.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M.A. e GARCÍA-COHEN, E.C. Role of Ca²⁺ and vitamin D in the prevention and treatment of osteoporosis. **Pharmacol. Therapeutic**, v. 93, p. 37-49, 2002.

ROMAGNOLI, E.; MINISOLA, S.; CARNEVALE, V.; SCARDA, A.; ROSSO, R.; SCARNECCHIA, L.; PACITTI, M.T.; MAZZUOLI, G. Effect of estrogen deficiency on IGF-I plasma levels: relationship with bone mineral density in premenopausal women. **Calcif. Tissue Int.**, v. 53, p. 1-6, 1993.

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Influence of dietary linoleic acid on experimental human breast cancer cell metastasis in athymic nude mice. **Int. J. Oncol.**, v. 13, p. 1179-1183, 1998.

ROSSI, E.A.; DÂMASO, A.R.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z. Quantificação de isoflavonas nas diversas etapas de processamento do “iogurte” de soja e sua

suplementação com genisteína e daidzeína. In: Estudos de propriedades funcionais "iogurte" de soja: Caracterização de capacidades anticarcinogênica e imunomodulatória e identificação de possíveis ações sinérgicas na redução dos lípides séricos. Relatório Científico FAPESP, Araraquara, 2002. 352pa

ROSSI, E.A.; GIORI, G.S.; HOLGADO, A.P.R.; VALDEZ, G.F. *In vitro* effect of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* on cholesterol. **Microbiol. Alim. Nutr.**, v. 12, p. 267-270, 1994.

ROSSI, E.A.; REDDY, K.V.; SILVA, R.S.S.F. Formulation of soy-whey yogurt using response surface methodology. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 27, p. 387-390, 1984.

ROSSI, E.A.; ROSIER, I.; DÂMASO, A.R.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; ABDALLA, L.; TALARICO, V.H.; MINTO, D.F. Quantificação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do "iogurte" de soja. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, 18, 2002b.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; OLIVEIRA, M.G.; VALDEZ, G.F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Arq. Latin. Nutr.**, v. 53, p. 47-51, 2003.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; PEI, Y.C.; VALDEZ, G.F. Development of a novel fermented soymilk product with potencial probiotic properties. **Eur. Food. Res. Technol.**, v. 209, p. 305-307, 1999.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; UEIJI, I.S.; SQUINZARI, M.M.; SILVA JUNIOR S.I.; VALDEZ, G.F. Effects of a novel soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 74, p. 213-216, 2000.

ROUDEBUSH, R.E.; MAGEE, D.E.; BENSLAY, D.N.; BENDELE, A.M.; BRYANT, H.U. Effect of weight manipulation on bone loss due to ovariectomy and the protective effects of estrogen in the rat. **Calcif. Tissue Int.**, v. 53, p. 61-64, 1993.

ROWLAND, L.R.; WISEMAN, H.; SANDERS, T.A.B.; ADLERCREUTZ, H.; BOWEY, E.A. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. **Nutr. Cancer.**, v. 36, p. 27-32, 2000.

SANDERS, M.E. Effect of consumption of lactic cultures on human health. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 37, p. 67-130, 1993.

SANDERS, T.A.B.; DEAN, T.S.; GRAINGER, D.; MILLER, G.J.; WISEMAN, H. Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor

β , concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 373-377, 2002.

SEIBEL, W. Funktionelle lebensmittel auf getreidebasis. Getreide Mehl und Brot., v. 52, p. 185-187, 1998. In : BEHRENS, J.H.; ROIG, S.M.; DA SILVA, M.A.P. Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação de extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. **Bol. SBCTA**, v. 34, p. 99-106, 2000.

SETCHELL, K.D.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human. **J. Nutr.**, v. 129, p. 758S-767S, 1999.

SEVERSON, R.K.; NOMURA, A.M.; GROVE, J.S.; STEMMERMANN, G.N. A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. **Cancer Res.**, v. 49, p. 1857-1860, 1989.

SHEN, M.L.Y.; WRONSKI, T.J. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 20, p. 55-61, 1997.

SHEA, B.; WELLS, G.; CRANNEY, A.; ZYTARUK, N.; ROBINSON, V.; GRIFFITH, L.; ORTIZ, Z.; PETERSON, J.; ADACHI, J.; TUGWELL, P.; GUYATT, G. Meta-analysis of therapies for postmenopausal osteoporosis. VII. Meta-analysis of calcium supplementation for the prevention of postmenopausal osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v. 23, p. 552-559, 2002.

SHIMIZU, H.; ROSS, R.K.; BERSTEIN, L. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. **Br. J. Cancer**, v. 63, p. 963-966, 1991.

SHU, X.O.; JIN, F.; DAI, Q.; WEN, W.; POTTER, J.D.; KUSHI, L.H.; RUAN, Z.; GAO, Y.T.; ZHENG, W. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 10, p. 483-488, 2001.

SOUZA, G.; VALLE, J.L.E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Bol. SBCTA**, 34, p. 61-69, 2000.

SPELSBERG, T.M.; SUBRAMANIAM, M.; RIGGS, L.; KOSHLA, S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. **Mol. Endocrinol.**, v. 13, p. 819-828, 1999.

STAMPFER, M.J.; COLDITZ, G.A.; WILLET, W.C.; MANSON, J.E.; ROSNER, B.; SPEIZER, F.E.; HENNEKENS, C.H. Post-menopausal estrogen therapy and cardiovascular disease: ten-year follow-up from the Nurse's Health Study. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 756-762, 1991.

STROM, S.S.; YAMAMURA, Y.; DUPHORNE, C.M. Phytoestrogen intake and prostate cancer: a case-control study using a new database. **Nutr. Cancer**, v. 33, p. 20-25, 1999.

SUGIMOTO, T.; NISHIYAMA, K.; KURIBAYASHI, F.; CHIHARA, K. Serum levels of IGF-I, IGFBP-2 and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spine fractures. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, p. 1272-1279, 1997.

SZKUDELKA, K.; NOGOWSKI, L.; SZKUDELSKI, T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 75, p. 265-271, 2000.

TERRY, P.; BARON, J.A.; WEIDERPASS, E.; YUEN, J.; LICHTENSTEIN, P.; NYRÉN, O. Lifestyle and endometrial cancer risk: a cohort study from the Swedish twin registry. **Int. J. Cancer**, v. 82, p. 38-42, 1999.

THOMPSON, D.D.; SIMMONS, H.A.; PIRIE, C.M.; KE, H.Z. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, p. 125S-133S, 1995.

TONG, P.L.; SU, T.C.; SUNG, F.C.; CHIEN, K.L.; HUANG, S.C.; CHOW, S.N.; LEE, Y.T. Effects of menopause on intraindividual changes in serum lipids, blood pressure, and body weight: the Chin-Shan Community Cardiovascular Cohort study. **Atherosclerosis**, v. 161, p. 409-415, 2002.

UESUGI, T.; TODA, T.; TSUJI, K.; ISHIDA, H. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by isoflavones, daidzin, genistin and glycitin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 24, p. 368-372, 2001.

UMBELINO, D.C.; CARDELLO, H.M.A.B.; ROSSI, E.A. Efeito de diferentes sais de ferro sobre as características sensoriais do "iogurte" de soja. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, v. 51, p. 199-203, 2001a.

UMBELINO, D.C.; ROSSI, E.A. Aspectos tecnológicos e sensoriais do "iogurte" de soja enriquecido com cálcio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, p. 276-280, 2001b.

VAN DEN BRANDT, P.A.; SPIEGELMAN, D.A.; YAUN, S.S.; HADAMI, H.O.; BEESON, L.; FOLSOM, A.R.; FRASER, G.; GOLDBOHM, R.A.; GRAHAM, S.; KUSHI, L.; MARSHALL, J.R.; MILLER, A.B.; ROHAN, T.; SMITH-WARNER, S.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C.; WOLK, A.; HUNTER, D.J. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. **Am. J. Epidemiol.**, v. 152, p. 514-527, 2000.

VAN, P.; VIGNERY, A.; BARON, R. Cellular kinetics of the bone remodeling. **Anat. Rec.**, v. 202, p. 445-451, 1982.

VIGETA, S.M.G.; BRÊTAS, A.C.P. A experiência da perimenopausa e pós-menopausa com mulheres que fazem uso ou não da terapia de reposição hormonal. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 20, p. 1682-1689, 2004.

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 1666-1673, 1994a.

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **J. Agricultural Food Chem.**, v. 42, p. 1674-1677, 1994b.

WANG, T.T.; STHYAMOORTTHY, N.; PHANG, J.M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 271-275, 1996.

WANG, W.; HIGUCHI, C.M.; ZHANG, R. Individual and combinatory effects of soy isoflavones on the in vitro potentiation of lymphocyte activation. **Nutr. Cancer**, v. 29, p. 29-34, 1997.

WANGEN, K.E.; DUNCAM, A.M.; XU, X.; KURZER, M.S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 225-231, 2001.

WASHBURN, S.; BURKE, G.L.; MORGEN, T.; ANTHONY, M. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. **Menopause**, v. 6, p. 7-13, 1999.

WATANABE, S.; TERASHIMA, K.; SATO, Y.; ARAI, S.; EBOSHIDA, A. Effects of isoflavone supplement on healthy women. **Biofactors.**, v. 12, p. 233-241, 2000.

WEAVER, C.M.; PROULX, W.R.; HEANEY, R. Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 543S-548S, 1999.

WEINSIER, R.L.; KRUMDIECK, C.L. Dairy foods and bone health: examination of the evidence. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, p. 681-689, 2000.

WESTERLIND, K.C.; WRONSKI, T.J.; RITMAN, E.L.; LUO, Z.P.; NA, K.N.; BELL, N.H.; TURNER, R.T. Estrogen regulates the rate bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanical strain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 4199-4204, 1997.

WILCOX, G.; WAHLQUIST, M.L.; BURGER, H.G.; MEDLEY, G. Oestrogenic effects of plants foods in postmenopausal women. **Brit. Med. J.**, v. 301, p. 905-906, 1990.

WILSGAARD, T.; SCHIRMER, H.; ARNESEN, E. Impact of body weight on blood pressure with a focus on sex differences. **Arch. Intern. Med.**, v. 160, p. 2847-2853, 2000.

WING, R.R.; MATTHEWS, K.A. Weight gain at time of menopause. **Arch. Int. Med.**, v. 151, p. 97-102, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of WHO Study Group". **World Health Org. Tech. Rep. Ser.**, v. 843, p. 1-129, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: World Health Organization, 1998. In: DUBNOV, G.; BRZEZINSKI, E.; BERRY, E.M. Weight control and management of obesity after menopause: the role of physical activity. **Maturitas**, v. 44, p. 89-101, 2003.

WRONSKI, T.J.; DANN, L.M.; SCOTT, K.S.; CINTRON, M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the skeleton. **Calcif. Tissue Int.**, v. 45, p. 360-366, 1989.

WRONSKI, T.J.; SCHENCK, P.A.; CLINTRON, M.; WALSH, C.C. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. **Calcif. Tissue Int.**, v. 40, p. 155-159, 1987.

WU, A.H.; WAN, P.; HANKIN, J.; TSENG, C.C.; YU, M.C.; PIKE, M.C. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1491-1496, 2002.

YAMAGUCHI, M.; GAO, Y.H. Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, p. 71-76, 1998.

YAMAGUCHI, M.; GAO, Y.H. Anabolic effect of genistein on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats is inhibited by the anti-estrogen tamoxifen. **Res. Exp. Med.**, v. 197, p. 101-107, 1997.

ZARROW, M.X.; YOCHIM, J.M.; MCCARTHY, J.L. **Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques**. New York: Academic Press, 1964. p. 39-40.

ZHANG, Y.; SONG, T.T.; CUNNICK, J.E.; MURPHY, P.A.; HENDRICH, S. Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. **J. Nutr.**, v. 129, p. 399-405, 1999.

ZHOU, H.; CHERNECKY, R.; DAVIES, J.E. Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone. **J. Bone Miner. Res.**, v. 9, p. 367-374, 1994.

ZHOU, J.R.; GUGGER, E.T.; TNAKA, T.; GUO, Y.; BLACKBURN, G.L.; CLINTON, S.K. Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplanted human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1628-1635, 1999.

ZHOU, J.R.; MUKHEJEE, P.; GUGGER, E.T.; TANAKA, T.; BLACKBURN, G.L.; CLINTON, S.K. Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis and angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 58, p. 5231-5238, 1998.

ZUMOFF, B. Does postmenopausal estrogen administration increase the risk of breast cancer? Contributions of animal, biochemical and clinical investigative studies to resolution of the controversy. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 217, p. 30-37, 1998.