

VANESSA ÁVILA SARMENTO SILVEIRA

**EFEITOS INICIAIS DA OVARIECTOMIA E DO TRATAMENTO COM
ESTRÓGENO E ISOFLAVONAS DA SOJA, ISOLADOS E
ASSOCIADOS, NA REPARAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR E NO ÚTERO
DE RATAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

VANESSA ÁVILA SARMENTO SILVEIRA

**EFEITOS INICIAIS DA OVARIECTOMIA E DO TRATAMENTO COM
ESTRÓGENO E ISOFLAVONAS DA SOJA, ISOLADOS E
ASSOCIADOS, NA REPARAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR E NO ÚTERO
DE RATAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Prof^a Adjunto Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos

2007

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

ABNT, ABNBR para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico, São José dos Campos: UNESP;2006.

Silveira, Vanessa Ávila Sarmiento
Efeitos iniciais da ovariectomia e do tratamento com estrógeno e isoflavonas da soja, isolados e associados, na reparação óssea alveolar e no fero de ratas /Vanessa Ávila Sarmiento Silveira; orientadora Armin Edarte Carvalho. São José dos Campos, 2007.
119p.; IL
Tese (Programa de Pós-Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista;2007.
1.Isoflavonas – 2.Osteopenia – 3.Osteoporose

ackD74

Autorização

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, / /

Assinatura :
E-mail: assilveira@uol.com.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silveira VAS. Efeitos iniciais da ovariectomia e do tratamento com estrógeno e isoflavonas da soja, isolados e associados, na reparação óssea alveolar e no útero de ratas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

São José dos Campos, 10 de julho de 2007

Banca examinadora

1) Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

2) Profa. Dra. Juliana Mazzonetto Teófilo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

3) Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Faculdade de Odontologia de Taubaté - UNITAU

4) Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

5) Prof. Adj. Horácio Faig Leite

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

DEDICATÓRIA

Ao meu marido **Miro**, amigo e companheiro, seu apoio foi fundamental para que eu conseguisse alcançar esse objetivo. Obrigada pelo amor e por fazer parte da minha vida!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, especialmente à minha mãe, **Lourdinha**, que em todos os momentos, vibrou, incentivou e preocupou-se, agradeço com muito carinho.

À Prof^a Adjunto **Yasmin Rodarte Carvalho**, pelos conhecimentos transmitidos que contribuíram imensamente para minha formação profissional e pela orientação deste trabalho, apoiando nas dificuldades e comemorando as conquistas. Agradeço ainda a amizade, a confiança e o convívio ao longo desses anos. Obrigada!

À amiga **Renata Falchete do Prado**, por dividir comigo as responsabilidades, as dificuldades, as descobertas, as conquistas e as frustrações deste trabalho. Foi excelente trabalhar com você!

Às amigas, **Andresa Costa Pereira, Ângela Bolanho, Carolina Júdice Ramos, Elaine Dias do Carmo, Luana Marotta Reis de Vasconcellos, Giselle Segnini Senra e Susana Ungaro Amadei** pela convivência e pela amizade.

Sentirei saudades!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, representada pelo Diretor, Prof. **Paulo Villela Santos Júnior**, pela oportunidade de realização deste Doutorado e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pelo auxílio financeiro (processo 475681/2004-5).

Aos **professores** do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, em especial, à Profa. Adjunto **Rosilene Fernandes da Rocha**, ao Prof. Adjunto **Luíz Eduardo Blummer Rosa** e à Profa. Dr^a **Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, que serão sempre minha referência, agradeço pela grande ajuda durante todo o curso.

À Prof. Dr^a **Vanda Jorgetti** do Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da USP pelo auxílio em todas as etapas do trabalho.

Ao pesquisador Dr. **Carlos Alberto Alves Cairo** representando a Divisão de Materiais do IAE do Centro Tecnológico Aeroespacial (CTA) por permitir o a utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao amigo **Carlos Eduardo Dias Colombo**, pelo auxílio nas reações imunoistoquímicas.

Às alunas de iniciação científica **Fernanda de Oliveira e Silva, Erica Vedovatto, Mariana Garcia Bedin, Jucely Aparecida da Rosa e Lucileni Braga Sandes** pela ajuda durante a fase experimental desse estudo.

Aos **funcionários** do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, em especial, à **Ana Lourdes da Silva Machado, à Sílvia Scarpel e ao Valter Cruz** pela colaboração durante a realização dessa pesquisa.

Aos funcionários do Biotério, **Lourival Jacob e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, pela valiosa ajuda na fase experimental deste trabalho.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria das Graças** pelo auxílio constante.

À bibliotecária **Ângela de Brito Bellini**, pela orientação na revisão deste estudo.

Aos **amigos** do Programa de Pós-Graduação, que diretamente ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

Aos **animais experimentais**, o meu profundo respeito.

À alunas de iniciação científica **Fernanda de Oliveira e Silva, Erica Vedovatto, Mariana Garcia Bedin, Jucely Aparecida da Rosa e Lucileni Braga Sandes** pela ajuda durante a fase experimental desse estudo.

Aos **funcionários** do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, em especial, à **Ana Lourdes da Silva Machado, à Sílvia Scarpel** e ao **Valter Cruz** pela colaboração durante a realização dessa pesquisa.

Aos funcionários do Biotério, **Lourival Jacob e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, pela valiosa ajuda na fase experimental deste trabalho.

À secretárias do Programa de PósGraduação, **Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria das Graças** pelo auxílio constante.

À bibliotecária **Ângela de Brito Bellini**, pela orientação na revisão deste estudo.

Aos **amigos** do Programa de PósGraduação, que diretamente ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

Aos **animais experimentais**, o meu profundo respeito.

SUMÁRIO

RESUMO	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Deficiência estrogênica e a remodelação óssea.....	15
2.2 Deficiência estrogênica e a reparação óssea	19
2.3 Isoflavonas da soja	24
2.4 Efeitos das isoflavonas no útero	31
3 PROPOSIÇÃO.....	34
4 MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 Animais	35
4.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia.....	35
4.3 Grupos experimentais e tratamento.....	37
4.4 Exodontia.....	37
4.5 Sacrifício dos animais	38
4.6 Tecido ósseo.....	41
4.6.1 Processamento tecidual sem desmineralização	41
4.6.2 Processamento tecidual com desmineralização	42
4.6.3 Análise histológica	44
4.6.4 Análise por microscopia eletrônica de varredura (BSE).....	44
4.6.5 Análise histomorfométrica com parâmetros estáticos.....	44
4.6.6 Análise imunoistoquímica	45
4.6.7 Análise histomorfométrica com parâmetros dinâmicos.....	47
4.7 Útero	47
4.8 Análise estatística	48
5 RESULTADOS.....	49

5.1 Peso dos animais.....	49
5.2 Análise histológica	53
5.2.1 Período de sete dias	54
5.2.2 Período de 21 dias	55
5.2.3 Período de 45 dias	57
5.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura (BSE).....	59
5.4 Análise histomorfométrica com parâmetros estáticos.....	61
5.4.1 Volume trabecular	61
5.4.2 Volume osteóide	64
5.4.3 Número de mastócitos	69
5.5 Análise imunoistoquímica	72
5.6 Taxa de aposição mineral	74
5.7 Análise histológica do útero	78
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÃO	95
8 REFERÊNCIAS	96
APÊNDICES	113
ANEXO	118
ABSTRACT.....	119

Silveira, V.A.S. Efeitos iniciais da ovariectomia e do tratamento com estrógeno e isoflavonas da soja, isolados e associados, na reparação óssea alveolar e no útero de ratas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

A terapia de reposição hormonal com estrógenos apresenta efeitos potencialmente adversos, portanto, novas terapias têm sido propostas, como as isoflavonas da soja. Entretanto, seus efeitos na reparação óssea e no epitélio uterino ainda não estão estabelecidos. O objetivo foi investigar os efeitos iniciais da ovariectomia e das isoflavonas isoladas e associadas ao estrógeno, na reparação óssea e no útero de ratas. Utilizaram-se 120 ratas, sendo 96 ovariectomizadas e 24 falso operadas (SHAM). As ovariectomizadas foram divididas em quatro grupos, recebendo, via oral: 1 mg/kg/dia de valerato de 17 β -estradiol (OVZ-E); 15 mg/kg/dia de isoflavonas (OVZ-I); associação dos tratamentos (OVZ-A) e placebo (OVZ). As ratas SHAM receberam placebo. O tratamento iniciou-se dois dias após a ovariectomia. Extraíu-se o primeiro molar inferior, bilateralmente, 15 dias após a ovariectomia. Os animais receberam o tratamento até o sacrifício, aos sete, 21 e 45 dias após as exodontias. O útero foi submetido à análise histológica e a mandíbula à análise histológica, histomorfométrica estática e dinâmica, imunoistoquímica e por microscopia eletrônica de varredura (BSE). Na reparação óssea, não se observou diferença no volume trabecular entre os grupos OVZ e SHAM em cada tempo. Na análise histológica e no BSE alterações da microarquitetura foram notadas aos 45 dias após a exodontia. Verificou-se que o grupo SHAM apresentou média maior de volume osteóide aos sete dias quando comparado ao OVZ e que os grupos OVZ-E e OVZ-A apresentaram as maiores médias do período. O número de mastócitos tendeu a ser maior no grupo OVZ aos 45 dias, apesar de não significativo. Forte expressão do TGF- β foi notada aos sete dias, sendo reduzida com o decorrer do tempo em todos os grupos. O grupo OVZ-E apresentou menor taxa de aposição mineral aos sete dias. Nos demais períodos nenhuma diferença foi verificada. Os grupos SHAM, OVZ-E e OVZ-A apresentaram aspectos morfológicos similares no útero, diferindo do OVZ e OVZ-I. Conclui-se que a ovariectomia não provoca efeitos iniciais evidentes e que os estrógenos têm efeito sobre o volume osteóide, bem como sua associação com as isoflavonas. Além disso, os estrógenos são capazes de incrementar a taxa de aposição mineral, e reduzir a remodelação óssea aumentada pelo trauma pós exodontia.

PALAVRAS-CHAVES: Isoflavonas; osteopenia; osteoporose; reparo ósseo; terapia de reposição de estrógeno.

1 INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo fisiológico constante, no qual a formação óssea é proporcional à reabsorção, sendo regulada por diversos fatores, como mecanismos regulatórios intracelulares, influência hormonal, fatores locais e externos. Alterações neste processo podem resultar em diferentes distúrbios, entre eles a osteoporose⁶⁷.

A osteoporose é a mais comum e mais significativa osteopatia metabólica. Constitui grande problema de saúde pública, com importante impacto social, por sua considerável morbidade, mortalidade e alto custo social, por si só e por sua maior consequência, a fratura, sendo assustadoras as projeções feitas para a doença neste século, em todo o mundo⁶⁴.

Podemos dividir a osteoporose em dois grupos: primária, na qual as causas fundamentais não são bem conhecidas, e secundária, cujas causas estão determinadas. As primárias se subdividem em idiopáticas e involutivas. As osteoporoses involutivas constituem um grupo heterogêneo, subdividido em Tipo I, antes chamada pós-menopáusica, e Tipo II, antes chamada senil⁵⁶.

A osteoporose Tipo I está presente nas mulheres, e sua evolução se faz após a menopausa, sendo a causa mais importante a deficiência de estrógeno que ocorre neste período. Há perda de osso trabecular em ritmo três vezes maior que o normal, sendo o elemento clínico fundamental as fraturas⁵⁶.

O processo da reparação óssea envolve uma cascata complexa de respostas biológicas. Assim como a remodelação óssea, é

afetado também por fatores locais e externos e regulado pela interação de diferentes mecanismos³⁸. Portanto, o aumento ou o decréscimo da capacidade de reparação óssea tem sido relacionado a alterações ocorridas no processo da remodelação⁹⁷.

As alterações subseqüentes à menopausa podem ser tratadas pela terapia convencional de reposição hormonal (TRH) com administração de estrógenos e seus derivados, por vezes associados a progesterona. Contudo, tem-se relacionado esta terapia com o aumento do risco de câncer de mama e outros efeitos adversos, como complicações cardio-vasculares¹⁰³.

Os benefícios que a reposição hormonal oferece para a mulher são incontestáveis, mas é discutível se compensam os riscos. Com o objetivo de minimizar os efeitos adversos, substâncias capazes de se ligar a receptores estrogênicos têm sido propostas, entre elas, as isoflavonas derivadas da soja. Entretanto, seus efeitos na perda óssea e no epitélio uterino ainda não estão completamente estabelecidos.

Portanto o objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos iniciais da ovariectomia e do tratamento com as isoflavonas isoladas e associadas ao estrógeno na reparação óssea alveolar e no útero de ratas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Deficiência estrogênica e a remodelação óssea

Os estrógenos são hormônios que produzem numerosas ações fisiológicas, incluindo efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do trato reprodutor para fertilização e implantação do óvulo e ações no metabolismo de minerais, dos carboidratos, das proteínas e dos lipídios. O uso terapêutico dos estrógenos é disseminado, sendo comumente utilizados na reposição hormonal após a menopausa e na anticoncepção¹⁰⁰.

Os ovários são a principal fonte de estrógeno circulante. O principal produto secretório é o estradiol, sintetizado pelas células granulosas, a partir de precursores androgênicos (androstenediona ou testosterona), proporcionados pelas células da teca¹⁰⁰.

O estrógeno mais potente de ocorrência natural nos seres humanos é o 17 β -estradiol, seguido pelo estrona e pelo estriol^{79,100}. Cada uma de suas moléculas é um esteróide de 18 carbonos contendo um anel fenólico A (anel aromático com um grupo hidroxil no carbono 3) e um grupamento β -hidroxila ou cetona na posição 17 do anel D¹⁰⁰.

Os hormônios sexuais têm um importante papel no crescimento ósseo e na manutenção do pico de massa óssea²⁴. Existem claras evidências de que a diminuição ou ausência de estrógenos leva a uma progressiva diminuição da massa óssea¹¹.

Embora os receptores de estrógeno estejam predominantemente em osteoblastos, a principal atuação desse hormônio é na reabsorção óssea⁸⁷. Hughes et al.⁴² investigaram a capacidade do estrógeno afetar a função osteoclástica pela indução da apoptose. O 17 β -estradiol promoveu apoptose em osteoclastos de ratos *in vitro* e *in vivo*. Esses achados sugerem que os estrógenos possam prevenir perda óssea excessiva antes e após a menopausa, pela indução da apoptose dos osteoclastos.

Most et al.⁶⁶ investigaram o papel dos hormônios sexuais na remodelação óssea, verificando o potencial osteoclastogênico das células da medula de camundongos em diferentes momentos após a ovariectomia e a orquidectomia. Em culturas de células da medula óssea indicaram que a ausência de tais hormônios induz um aumento transiente na osteoclastogênese. O potencial osteoclastogênico das células da medula óssea aumentou sete dias após a castração e normalizou 30 dias após a cirurgia. Esses resultados sugerem que a deficiência de esteróides sexuais induz aumento na osteoclastogênese em ratos machos e fêmeas, o qual pode ser associado ao período inicial de rápida perda óssea.

Wronski et al.¹⁰¹ analisaram a relação entre a ovariectomia e o aumento da remodelação óssea com o decorrer do tempo. Os autores verificaram osteopenia e aumento do índice de reabsorção óssea aos 14 dias após a cirurgia, que se tornou gradualmente mais pronunciada até se estabilizar por volta dos cem dias. Os resultados indicam uma fase de perda óssea inicial rápida nas ratas ovariectomizadas, coincidente com o aumento máximo na remodelação.

Diversos estudos verificam as alterações causadas pela deficiência estrogênica nos ossos maxilares. Tanaka et al.⁸⁸ demonstraram que a deficiência estrogênica causa alterações osteoporóticas no osso trabecular mandibular e esse fenômeno pode acelerar a destruição desse tecido e a perda de dentes. Para tanto, realizaram ovariectomia em 8 ratas e falsa-cirurgia em outros oito animais.

Após sessenta dias verificaram que as ratas ovariectomizadas apresentavam menor volume e número de trabéculas ósseas na mandíbula do que as demais ratas.

Tanaka et al.⁹⁰ avaliaram as alterações na estrutura trabecular em mandíbula de ratas ovariectomizadas, causadas pela deficiência estrogênica durante um longo período de tempo. Observaram que, após um ano, ocorreram perda óssea e fragmentação das trabéculas do osso alveolar das mandíbulas das ratas. Concluíram, entretanto, que a reabsorção óssea elevada logo após a ovariectomia declina com o tempo. Portanto, a perda óssea teria sido causada pela reabsorção moderada ocorrida no decorrer do ano e principalmente pelo aumento inicial da taxa de reabsorção imediatamente a ovariectomia.

Jiang et al.⁴⁴ observaram em seu estudo que a deficiência da ingestão de cálcio associada a ovariectomia causou diminuição significativa do conteúdo mineral e da densidade óssea da mandíbula.

Yang et al.¹⁰⁶ utilizaram a ovariectomia para investigar os efeitos da deficiência estrogênica na microarquitetura óssea, na mandíbula e na tíbia de ratas. Após quatro meses da cirurgia, verificaram significativa diminuição na taxa de volume ósseo e espessura trabecular, em relação ao grupo controle. O tamanho dos espaços medulares e a forma das trabéculas foram correlacionados com as alterações osteoporóticas que ocorrem em ossos longos. Em estudo seguinte, observaram uma redução da espessura da cortical óssea mandibular após um ano da ovariectomia em ratas¹⁰⁵.

Os estrógenos funcionam como reguladores da expressão gênica. Ao atravessarem a membrana plasmática por difusão passiva e se ligarem a receptores nucleares, promovem mudanças conformacionais nestes receptores, resultando na formação de um complexo ativado, com alta afinidade por determinados sítios do DNA. Geralmente, a ligação do complexo hormônio-receptor a estes elementos regulatórios afeta a expressão gênica, induzindo ou reprimindo a iniciação da transcrição de

genes específicos. Os produtos da tradução do RNA mensageiro de síntese regulada por esses hormônios, promoverão determinados efeitos metabólicos nas células-alvo⁷⁸.

Entre as citocinas com propriedades de reabsorção, moduladas pelo estrógeno, destaca-se a interleucina (IL)-1. A deficiência estrogênica provoca aumento na secreção desta citocina, uma potente indutora da reabsorção óssea⁴⁰. Outro possível mecanismo da ação estrogênica faz-se pela intervenção da interleucina (IL)-4, que inibe a diferenciação dos osteoclastos. Porém, o fator mais influenciado pelo estrógeno é o fator de crescimento transformante (TGF)- β , produzido por muitas células, inclusive pelos osteoblastos. Para os osteoblastos, constitui importante agente mitogênico, mas sobre os osteoclastos, diminui seu recrutamento e sua atividade reabsortiva. Os fatores de crescimento insulínico (IGFs), inicialmente produzidos pelos osteoblastos e incorporados dentro da matriz, como o TGF- β , são liberados com a atividade osteoclástica. Ao serem liberados estimulam a proliferação e diferenciação osteoblástica, porém também possuem ação parácrina sobre os osteoclastos⁹⁵.

Finkelman et al.³³ verificaram que a ovariectomia reduz a deposição de TGF- β nos osso de ratas e tal diminuição pode desempenhar papel na patogênese da perda óssea, fraturas e microfraturas que ocorrem devido à deficiência estrogênica.

A osteoprotegerina (OPG), receptor ativador de NF- κ B (RANK) e a citocina RANK ligante (RANKL) têm sido identificadas como os principais fatores envolvidos na osteoclastogênese. O RANK localiza-se na superfície de osteoclastos maduros e de seus precursores, enquanto a RANKL é uma proteína pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF). Seu principal papel é a inibição da apoptose dos osteoclastos e a estimulação da diferenciação e ativação destas células. A OPG pode atuar inibindo RANKL por meio da ligação com RANK e também diretamente, por meio de outros receptores presentes nos

osteoclastos. Seus efeitos são antagônicos aos efeitos da RANKL. Diversas citocinas e compostos como os estrógenos, influenciam a osteoclastogênese por meio da regulação da produção de RANKL/OPG pelas células estromais e pelos osteoblastos⁸⁴.

Steeve et al.⁸⁴ afirmaram que tanto os estrógenos quanto o TGF- β aumentam a produção de OPG, diminuindo, conseqüentemente, a diferenciação e ativação dos osteoclastos, bem como induzindo a apoptose destas células.

2.2 Deficiência estrogênica e a reparação óssea

Ao estudar a reparação alveolar de ratos, verificou-se que um dia após a exodontia, o alvéolo foi preenchido por coágulo contendo cordões de fibrina e restos das fibras periodontais. No segundo dia, o coágulo já apresentava maior organização assemelhando-se ao tecido de granulação e tanto a reabsorção, quanto a formação óssea já eram observadas neste período⁴⁵.

Três dias após a extração dentária, o alvéolo foi completamente preenchido por tecido de granulação, além de numerosos fibroblastos e macrófagos contendo hemossiderina. A aposição e reabsorção óssea ocorreram concomitantemente na parede do alvéolo. Extensa aposição óssea e células periosteais foram observadas ao redor da mandíbula e ao redor da região da extração. A superfície apresentava-se, em grande parte, recoberta por epitélio⁴⁵. Fibras colágenas eram vistas emergindo do osso maduro do alvéolo e estendendo-se para o interior do tecido de granulação²⁶.

Aproximadamente do terceiro ao quinto dia houve intensa formação óssea no interior do alvéolo. O epitélio da superfície recobriu totalmente o alvéolo e iniciou sua queratinização. Tecido ósseo

neoformado foi encontrado na periferia proliferando em direção ao centro, de forma que, do quinto ao sétimo dia a margem do alvéolo já estava totalmente cercada por osso neoformado^{26,45}.

Fibras colágenas arranjaram-se entre osteoblastos e se espalharam no centro do reparo, formando um arcabouço no qual as trabéculas foram orientadas. Aproximadamente no décimo dia, o alvéolo estava 50% preenchido por osso neoformado. A partir do décimo sétimo dia o alvéolo dentário encontrava-se em fase de remodelação apresentando inúmeras linhas reversas e tanto osso trabecular quanto lamelar estavam presentes²⁶.

Durante esse processo dinâmico, as células ósseas não atuam isoladamente. Estas células são reguladas por interações sistêmicas, realizadas pelo sistema endócrino, por meio da liberação de diversos hormônios: hormônio da paratireóide (PTH), calcitonina, insulina, hormônio de crescimento, hormônios esteróides e da tireóide³⁸.

Localmente, certos fatores de crescimento foram identificados, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), IL-1, fator de crescimento fibroblástico (FGF), TGF- α e β , fator de crescimento epidérmico (EGF), entre outros. Os PDGFs induzem tanto fibroblastos quanto fibras musculares a proliferarem. Também são quimiotáticos para leucócitos e fibroblastos. A IL-1 estimula os fibroblastos a proliferarem e a produzirem colágeno e controla o crescimento das células endoteliais⁹⁴. Os FGFs são da família dos que estimulam o endotélio vascular, os fibroblastos e as fibras musculares lisas e induzem a formação de novos vasos. O TGF- α influencia o TGF- β quanto ao índice de proliferação de muitas células. O EGF é mitogênico para células mesenquimais (osteoblastos) e epiteliais^{86,94}.

No osso, o IGF-II é mais abundante, seguido do TGF- β e do IGF-I. O TGF- β aumenta a formação óssea e afeta tanto a proliferação celular quanto a diferenciação. É estimulado pelo estrógeno, andrógeno, vitamina D, TGF- β e FGF. Os IGF-I e II também aumentam a formação

óssea, sendo o IGF-I mais ativo do que o IGF-II. O estrógeno, hormônio do crescimento e paratohormônio promovem a produção do IGF-I⁸⁰.

Eingartner et al.³¹ verificaram por meio da técnica imunoistoquímica a presença de TGF- β 1 e IGF-I durante a formação óssea após distração osteogênica e sugerem que tais fatores estimulem a proliferação celular e a formação da matriz extracelular.

Okazaki et al.⁷¹ sugeriram que o IGF I está envolvido na proliferação e diferenciação de células mesenquimais, periosteais, osteoblastos e condroblastos em ação parácrina ou autócrina.

A experiência clínica em relação à alteração na reparação óssea causada pela osteoporose é inconsistente⁵⁸. Poucos estudos foram realizados sobre as diferenças entre a reparação óssea em indivíduos normais e com osteoporose e sugerem uma redução na capacidade de remodelação e de reparação desse tecido^{14,17,46,59,70}.

Walsh et al.⁹⁷ analisaram a reparação de fraturas em fêmures de ratas ovariectomizadas e normais. Os autores verificaram as propriedades mecânicas do reparo por meio de testes de tensão e torção. No experimento utilizaram cem ratas, aos três meses de idade, sendo que metade foi ovariectomizada e o restante formou o grupo controle. Os animais foram mantidos por seis semanas após a remoção dos ovários e em seguida sofreram uma nova cirurgia para a fratura do fêmur. Foram divididos em grupos de 16 ratas cada, sendo sete para o teste de flexão, sete para o de torção e duas para a análise histológica. Foram sacrificados decorridas duas, quatro e seis semanas após a última cirurgia. Do total de cem ratas, quatro foram separadas (duas ovariectomizadas e duas normais), sendo metade sacrificada um dia e as demais, dez dias após a fratura. Os resultados obtidos dos testes de propriedades mecânicas indicaram que, nos menores períodos de sacrifício, a ovariectomia alterou a reparação da fratura, o que foi confirmado pela análise histológica.

Kubo et al.⁵² também estudaram a influência da osteoporose na reparação de fraturas. Foram utilizadas ratas com osteoporose induzida por ovariectomia e o processo de reparação foi acompanhado por meio de análise radiográfica, histológica e biomecânica, por 12 semanas. Entretanto, os autores não encontraram diferenças entre o grupo ovariectomizado e o grupo controle, por meio de nenhuma das análises feitas, até as primeiras seis semanas. No entanto, foram observadas, 12 semanas após a fratura, alterações histológicas osteoporóticas e diminuição da densidade mineral óssea (DMO). Os autores sugeriram que a ovariectomia afeta a reparação óssea em seus períodos tardios e não interfere no processo em suas fases iniciais.

A influência da deficiência estrogênica na reparação óssea alveolar foi investigada por Tanaka et al.⁸⁹. Os autores estudaram o efeito da ovariectomia na reparação óssea alveolar e, para tanto, extraíram o primeiro molar superior sete dias após a remoção dos ovários. Verificaram que o osso neoformado no interior do alvéolo não foi influenciado pela deficiência estrogênica. Entretanto o suporte ósseo ao redor do alvéolo formado após a exodontia foi menor devido à maior reabsorção causada pela ovariectomia.

Kawamoto e Nagaoka⁴⁸ observaram que as alterações ósseas alveolares induzidas por oclusão traumática são agravadas pelos baixos níveis de estrógeno de ratas ovariectomizadas. Verificaram que a dinâmica óssea alveolar induzida pelo trauma oclusal foi aumentada pela deficiência estrogênica conseqüente à remoção dos ovários.

Shimizu et al.⁸² estudaram o processo de reparo ósseo pós exodontia em ratas com sessenta dias de ovariectomia, por microscopia eletrônica de varredura. Observaram que a ovariectomia estimulou a reabsorção óssea e que a reabsorção e formação óssea ocorreram em locais específicos da superfície óssea alveolar.

Hsieh et al.⁴¹ analisaram o efeito da ovariectomia no tecido ósseo ao redor de alvéolo pós exodontia. Os autores realizaram a

ovariectomia e a remoção do dente simultaneamente e verificaram que a deficiência estrogênica pode afetar a remodelação óssea pós exodontia.

Os efeitos da reposição hormonal com estrógeno na reparação óssea foram investigados por Blythe e Burchsbaum¹⁰. Os autores avaliaram o efeito do estrógeno na reparação de fraturas em fíbula de noventa ratas de seis semanas de idade. Os animais foram divididos em três grupos: ratas ovariectomizadas, tratadas com estrógeno e controle. Após uma semana de ovariectomia, as ratas sofreram fratura na fíbula, e cinco semanas após esta fratura foram sacrificados. A análise da resistência à tensão no local do reparo revelou que não houve diferença significativa entre os grupos, indicando que a reparação óssea da fíbula não foi alterada pela presença ou ausência do estrógeno.

Cao et al.¹⁶ investigaram os efeitos de inibidores de reabsorção óssea (estrógeno, raloxifeno e alendronato) no processo de reparo de fraturas em ratas ovariectomizadas. Em conclusão, o tratamento com alendronato induziu a formação de calo ósseo maior, mais resistente e com elevada mineralização, mas a remodelação deste foi atrasada pela supressão intensa da reabsorção. Por outro lado, tanto o estrógeno quanto o raloxifeno induziram supressão moderada da reabsorção, a qual não teve efeito na progressão do reparo e apresentaram resultados semelhantes aos dos animais falso-operados.

Para Maroulis⁶⁰ os estrógenos exercem muitos efeitos benéficos, porém podem provocar inúmeros efeitos indesejáveis, entre eles as neoplasias estrógeno-relacionadas e anormalidades no útero, mamas e sistema de coagulação. Segundo o autor, as terapias alternativas à reposição estrogênica são efetivas no tratamento de mulheres no climatério.

2.3 Isoflavonas da soja

Os sintomas relacionados à deficiência estrogênica e suas conseqüentes doenças podem ser tratados ou estabilizados com a terapia de reposição hormonal com 17β -estradiol ou outros estrógenos, em combinação ou não com progesterona. Porém, este tratamento tem apresentado efeitos indesejáveis como o aumento do risco de câncer de mama. Complicações vasculares como embolias e trombozes têm sido freqüentemente relatadas por mulheres que fazem uso dessa terapia¹⁰³.

Os fitoestrógenos ou fitohormônios constituem um grupo de compostos não esteróides encontrados em diversos vegetais³⁵. Grande parte desses compostos apresenta um anel fenólico em sua estrutura, responsável pela capacidade de ligação aos receptores hormonais, podendo agir como agonistas ou antagonistas dos estrógenos, dependendo do sítio de atuação^{2,100}.

Existem três tipos de fitoestrógenos: as isoflavonas (mais potentes), as cumestanas e as lignanas. As lignanas podem ser encontradas em grãos, frutas e vegetais e as cumestanas principalmente na semente de linhaça e na alfafa. As isoflavonas são encontradas principalmente na soja. Dentre as isoflavonas, a genisteína e a dadzeína são as mais investigadas e possuem mais propriedades estrogênicas^{35,68,103}.

Foi demonstrada a capacidade desses compostos competirem com o 17β -estradiol, embora a afinidade da genisteína por seus receptores β seja aproximadamente 36% quando comparada ao estrógeno⁵³. As isoflavonas parecem ser eficazes quando combinadas a estrógenos na TRH, pois têm demonstrado não antagonizar as ações estrogênicas⁶⁸.

Nos órgãos-alvo, tendem a formar ligações estáveis com os receptores hormonais, principalmente os do tipo beta. Apresentam,

porém, ação estrogênica pouco potente. Os fitoestrógenos são levados pelas mesmas proteínas transportadoras de esteróides do sangue e também se apresentam em sua forma livre².

O efeito biológico dependerá, entre outros, do tipo e da quantidade de receptores hormonais existentes em cada órgão-alvo: alfa, predominantes na mama, fígado e útero; beta, encontrados no trato urogenital, vasos sangüíneos, pulmões e ossos. No sistema nervoso central e nos ovários estão presentes ambos os receptores. As isoflavonas apresentam ligação preferencial aos receptores beta. A quantidade de hormônios produzidos pelo organismo e presentes na circulação, também determina o efeito biológico dos fitoestrógenos⁹⁶.

Kuiper et al.⁵³ investigaram a expressão de RNAm dos dois subtipos de receptores de estrógeno (α e β), em tecidos de ratos, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) comparando a especificidade de diversos compostos ligantes. A maioria das substâncias estrogênicas ou seus antagonistas competem com o 17 β -estradiol pelos dois subtipos apresentando afinidade bastante similar. Para o receptor α , o 17 β -estradiol apresentou maior afinidade que o tamoxifeno e a genisteína e estes últimos apresentando mesma especificidade. Para o receptor β , o 17 β -estradiol também mostrou maior afinidade, porém, a genisteína se mostrou mais específica para estes tipos de receptores do que o tamoxifeno. A distribuição dos receptores no tecido e os níveis de expressão do receptor α e β foram diferentes. A expressão no útero, ovário, e epidídimo, por exemplo, foi de moderada a alta para o receptor α e na próstata, ovário, pulmão, cérebro e útero para o receptor β . Estas diferenças na afinidade dos diversos compostos por esses receptores e na expressão dos dois subtipos podem contribuir para a ação seletiva agonista e antagonista nos diferentes tecidos.

As isoflavonas possuem também outras ações, além daquelas produzidas por meio da ligação com receptores estrogênicos.

Entre elas, pode-se citar primeiramente seus efeitos antioxidantes e conseqüente efeito protetor da parede vascular por diminuição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade, ou LDL-colesterol^{63,68}.

As isoflavonas também possuem ação como inibidoras de enzimas, por exemplo, da tirosina quinase, envolvida em uma série de eventos como, expressão de oncogenes, efeitos no transporte de glicose e de uma variedade de íons, ação na síntese de proteínas, na proliferação celular, na angiogênese, em fatores de crescimento, em células musculares lisas de vasos, atividade osteoclástica e agregação plaquetária. Atuam também em outras enzimas como a topoisomerase II. Além desses efeitos atuam sobre proteínas plasmáticas, estimulando sua síntese, resultando em um decréscimo da fração livre de estrógeno circulante^{63,68}. O aumento da atividade do TGF- β pode ser também um mecanismo de ação da genisteína⁵⁰.

Recentemente aumentou o interesse em relação às isoflavonas da soja e a sua influência em diversas atividades biológicas⁸, incluindo sua capacidade de alteração da concentração de colesterol²² e seus efeitos no tecido ósseo^{1,39}.

Sugere-se, baseado em estudos epidemiológicos, que a ingestão de fitoestrógenos está associada com uma DMO elevada em populações que consomem grandes quantidades de soja. Em roedores, estudos têm relatado um efeito benéfico protetor da perda óssea pós-ovariectomia e que as isoflavonas são eficientes em manter a massa óssea nesses modelos experimentais²³.

Arjmandi et al.⁶ relataram, ao utilizar um modelo de ratos com osteopenia, uma pequena reversão da perda óssea tanto pelo grupo que consumiu proteína de soja com isoflavonas quanto pelo grupo que consumiu sem as isoflavonas. Os autores verificaram também que a soja contendo maior quantidade de isoflavonas aumentou a expressão gênica de IGF-I.

Anderson et al.³ ao investigarem os efeitos individuais das isoflavonas, verificaram que tanto a genisteína quanto a daidzeína, possuem um importante papel na remodelação óssea. Foi utilizado um modelo de ratas lactantes ovariectomizadas, alimentadas com baixa ingestão de cálcio, e tratadas com isoflavonas ricas em genisteína (0,5; 1,6; 5mg/dia), por 14 dias. Observou-se que o tratamento foi eficaz por manter a estrutura óssea trabecular destas ratas, que apresentaram quantidade de massa óssea significativamente maior e menor quantidade de poros em comparação aos animais do grupo controle. Foi verificado também que a genisteína estimulou a atividade da fosfatase alcalina em células osteoblásticas, sugerindo um efeito positivo na formação óssea. Na baixa dose, a genisteína apresentou efeito modesto no osso, mas em doses elevadas foi ainda menos efetiva. Sugere-se como possível mecanismo de ação, sua atuação como estrógeno agonista nas doses mais baixas.

Fanti et al.³² verificaram que a genisteína (5mg/kg) foi eficiente na manutenção tanto da cortical quanto das trabéculas ósseas em ratas ovariectomizadas. A administração desse composto foi associada a uma elevada formação óssea e ao aumento do número de osteoblastos, sugerindo que, diferindo do estrógeno, o efeito protetor da genisteína depende principalmente do estímulo na formação óssea do que na supressão da reabsorção. Sua ação no tecido ósseo pode envolver a modulação da produção de citocinas.

Arjmandi⁴ relatou a realização de um estudo no qual o consumo diário de 40g de proteína de soja (90mg de isoflavonas) por um período de três meses, reduziu significativamente a excreção de deoxipiridinolina urinária, um marcador específico de reabsorção óssea. Do mesmo modo, a soja elevou significativamente a concentração de IGF-I em mulheres acima ou abaixo dos 65 anos de idade, independente da sua produção estrogênica.

Picherit et al.⁷⁶ investigaram os efeitos de uma dieta baseada em isoflavonas em ratas adultas ovariectomizadas. Afirmaram que o consumo diário de isoflavonas (zero, 20, 40 e 80mg/kg) preveniu perda óssea induzida por ovariectomia, tanto pela redução da reabsorção quanto pelo estímulo da atividade osteoblástica. Apenas a dose mais elevada apresentou efeito estrogênico no útero.

Em outro estudo, Picherit et al.⁷⁵ verificaram que as isoflavonas não reverteram a perda óssea em ratos, apenas a previnem. Para tanto utilizaram um modelo de estudo com ratas com osteopenia induzida por ovariectomia. Após oitenta dias da cirurgia de remoção dos ovários os animais foram tratados com isoflavonas nas doses zero, 20, 40 e 80mg/kg/dia. Foi observado que nesses animais, o consumo diário de isoflavonas diminuiu a remodelação, mas não reverteu a osteopenia já estabelecida.

Yamagishi et al.¹⁰⁴ analisaram o efeito da genisteína em culturas de células hematopoéticas da linhagem de monócitos e macrófagos de camundongo. O tratamento com a genisteína inibiu a formação de células osteoclásticas positivas para fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Os níveis de RNAm para RANKL (fator estimulador da diferenciação dos osteoclastos) nas células indiferenciadas foram também diminuídos com a ação da genisteína. Em contraste, os níveis de RNAm para OPG, também conhecido como fator inibidor da osteoclastogênese, foram aumentados. A genisteína, inibidora específica da topoisomerase II (topo II) e da proteína tirosina quinase, inibiu a formação dos osteoclastos, via inibição da enzima topo II, sugerindo um papel importante desta enzima na osteoclastogênese.

Chen et al.¹⁹ basearam seu trabalho na hipótese de que a expressão e produção de citocinas reguladoras da osteoclastogênese mediadas por isoflavonas, tais como a IL-6 e a OPG, são relacionadas a diferentes níveis de receptores de estrógeno, expressos em linhagens de osteoblastos diferentes. A expressão de RNAm para OPG foi aumentada

nas duas linhagens estudadas, quando tratadas com 17β -estradiol, genisteína e daidzeína, em comparação com o controle. Nas duas linhagens, a liberação de IL-6 foi inibida, enquanto a produção de OPG foi aumentada pelo tratamento com a isoflavona. Este aumento dependeu da dose utilizada do fitoestrógeno. Os efeitos desse composto desapareceram após a colocação de bloqueadores dos receptores de estrógeno. A inibição da produção de IL-6 e o aumento da produção de OPG pelas isoflavonas podem ser mediados, ao menos em parte, via adesão aos receptores de estrógenos e mecanismos de expressão gênica.

Cai et al.¹⁵ estudaram os efeitos da proteína da soja, das isoflavonas e do estrógeno no metabolismo ósseo e de cálcio em ratas ovariectomizadas. Os resultados mostraram um efeito protetor do estrógeno contra a perda óssea, mas tal efeito não foi observado nos grupos que receberam os componentes da soja.

Gallo et al.³⁴ estudaram a eficácia do extrato de isoflavonas (50 ou 100mg/kg/dia) comparado ao estrógeno no modelo experimental de ratas ovariectomizadas. Os autores analisaram a DMO, parâmetros bioquímicos de remodelação, citocinas envolvidas no processo, peso e aspectos histológicos do útero, receptores estrogênicos e níveis séricos de lipídios. Concluíram que o extrato testado tem um perfil conveniente na resposta tecidual, pois, é eficaz na prevenção de osteoporose experimental sem causar estímulo no útero nas doses efetivas para o osso.

Nakai et al.⁶⁹ avaliaram os efeitos da dieta de proteína da soja ou isoflavonas no osso e no trato reprodutivo de ratas pré-menopausa. Verificaram que as dietas com proteína da soja ou isoflavonas não apresentaram efeitos no osso e nos aspectos histológicos da vagina desses animais. Entretanto, durante o período da pré-menopausa podem promover efeitos adversos no útero.

Sugere-se que a soja e seus componentes tenham ao menos dois possíveis mecanismos para aumentar a formação óssea: estímulo da atividade osteoblástica por meio da ativação de receptores estrogênicos²¹ e estímulo da produção de IGF-I⁶.

Li e Yu⁵⁷ investigaram os efeitos da genisteína na diferenciação, citoesqueleto e função de osteoclastos de camundongo in vitro e no metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas. In vitro, osteoclastos foram isolados e expostos a diversas concentrações de genisteína. O número de células positivas para enzima TRAP foi contado e também a área de reabsorção óssea. In vivo, os autores avaliaram o peso dos animais, nível sérico de fosfatase alcalina, fosfatase ácida, osteocalcina, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e calcitonina. Também pesquisaram o nível de estradiol sérico, aspectos histológicos do útero e do fêmur. Os autores sugerem que a genisteína pode incrementar o metabolismo ósseo por promover aumento na formação óssea e prevenir a reabsorção óssea. Além disso, exibe um discreto efeito no útero e nos níveis de estradiol sérico comparada à terapia de reposição hormonal convencional. Por fim, a genisteína representa terapia viável contra as doenças caracterizadas por reabsorção óssea, como a osteoporose.

Em relação ao papel das isoflavonas da soja na reparação óssea, os estudos são limitados. Silveira⁸³ analisou os efeitos da ovariectomia e o tratamento com as isoflavonas da soja isoladas e associadas ao estrógeno, na reparação ósseas em tíbias de ratas ovariectomizadas. Observou que o tratamento com estrógeno reduziu a remodelação e a sua associação com as isoflavonas da soja foi eficaz em reverter os efeitos da ovariectomia na reparação óssea. No entanto, as isoflavonas isoladamente não influenciaram o processo de reparo ósseo.

2.4 Efeitos das isoflavonas no útero

Acredita-se que a soja e seus constituintes ofereçam proteção contra o câncer, embora outros pesquisadores sugiram que estes compostos tenham a capacidade de aumentar o risco de aparecimento de neoplasias malignas⁸.

Estudos em várias espécies animais têm demonstrado evidências de que níveis elevados de fitoestrógenos podem produzir efeitos adversos no sistema reprodutor, incluindo alterações na fertilidade²⁵. Segundo Wuttke et al.¹⁰³, a soja, dentre outras, foi capaz de estimular o útero em estudos recentes com animais. Se este evento for semelhante nas mulheres, este fitoestrógeno apresentará um importante efeito indesejável, tal como na TRH convencional.

Tansey et al.⁹¹ para demonstrar a eficácia de uma dieta rica em fitoestrógenos derivados da soja no trato reprodutor de ratas fêmeas, conduziram um experimento no qual administraram preparados de fitoestrógenos e estrógenos conjugados com dosagens variadas, associadas ou não à dieta de ratas ovariectomizadas. Durante o estudo foi realizada citologia vaginal. Ao final, os animais foram sacrificados, e, foram observados os pesos uterino e corpóreo, o epitélio luminal uterino e realizada a análise imunoistoquímica para detecção de antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA), lactoferrina e apoptose. Os autores relataram que o peso uterino e a citologia vaginal não foram afetados pelos fitoestrógenos. Além destes resultados, não foi encontrado nenhum efeito estrogênico, nas doses de fitoestrógenos usadas, na análise imunoistoquímica do PCNA, lactoferrina, apoptose e no epitélio luminal uterino. Não houve evidência de que a interação entre o estrógeno e o fitoestrógeno possui efeito sinérgico. Ao contrário, a altura do epitélio luminal uterino apresentou resposta à baixa dose de estrógenos, sendo reduzida pelas doses elevadas de isoflavonas. A lactoferrina induzida pelo

estrógeno foi reduzida na presença de doses elevadas de fitoestrógenos. Os autores sugerem que os efeitos produzidos pelo estrógeno podem ser antagonizados por altas doses do fitoterápico, o que pode ser benéfico para reduzir a estimulação do endométrio pelo estrógeno, diminuindo o risco de hiperplasia ou câncer endometrial.

Ishimi et al.⁴³ compararam o efeito no útero e no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, da administração de diferentes doses de genisteína (0,4, 0,7 e 5mg/dia), via subcutânea. O tratamento com genisteína a 0,7mg/dia preveniu perda óssea trabecular, porém não provocou nenhum efeito hipertrófico no útero, enquanto a administração de genisteína a 5mg induziu hipertrofia uterina. Os resultados sugerem que existe diferença entre as doses de genisteína que protegem o esqueleto da perda óssea e que induzem hipertrofia uterina.

Arjmandi et al.⁷ observaram que as isoflavonas da soja podem promover absorção de cálcio de maneira análoga aos estrógenos, porém sem exercerem efeitos uterotróficos.

Diel et al.²⁸ verificaram a possibilidade da genisteína, comparada ao estrógeno, regular a proliferação do tecido uterino de ratas. Os autores observaram que a administração de genisteína resulta em menor indução da proliferação quando comparada ao estrógeno. Portanto, acredita-se que a genisteína pode representar uma substância importante no desenvolvimento de medicamentos alternativos à terapia de reposição hormonal.

Eason et al.³⁰ avaliaram a influência de dietas ricas ora em proteína da soja, ora em genisteína no epitélio uterino. Os resultados mostraram que a ingestão de componentes da soja não alterou o fenótipo da célula uterina em ratas jovens. A genisteína aumentou a apoptose das glândulas endometriais in vivo e in vitro, portanto, pode conferir proteção contra o carcinoma de útero.

McCarty⁶¹ sugere que a concentração sérica de genisteína alcançada com uma ingestão elevada de isoflavonas da soja

não é suficiente para provocar efeitos via receptor estrogênico alfa, devido à sua baixa afinidade pelo mesmo. Portanto, tal concentração pode ser segura para o endométrio uterino, já que os efeitos uterotróficos dos estrógenos parecem ser mediados apenas pelos receptores α . No entanto, quando ratos são alimentados com genisteína em doses elevadas, consideradas farmacológicas, uma atividade uterotrófica pode ser vista. Esse achado é consistente com a resposta dos receptores α a elevadas concentrações de genisteína. Portanto, doses de genisteína que excedem a faixa nutricional não devem ser consideradas seguras em relação ao risco de câncer endometrial.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos efeitos iniciais da ovariectomia e do tratamento com estrógeno e isoflavonas da soja, isolados e associados, no processo de reparação óssea alveolar de ratas e na taxa de aposição mineral no osso alveolar. Avaliou-se também o efeito destes tratamentos na imunomarcagem do fator de crescimento transformante- β (TGF- β).

Propôs-se ainda analisar a influência desses tratamentos nos aspectos histológicos do útero.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Para este trabalho foram utilizadas 120 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com noventa dias de idade, peso aproximado de 300g, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, e alimentadas com ração comercial e água destilada *ad libitum*. A quantidade de ração ingerida por dia foi pré-determinada e controlada para assegurar o mesmo volume de alimento para todos os grupos. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, sob o protocolo 029/2004/PA-CEP (Anexo A). Apoio: CNPq (processo 475681/2004-5)

4.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia ou cirurgia *sham*

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando-se instrumentais devidamente esterilizados e descartáveis.

Para anestesia geral foi utilizada solução de 13 mg/Kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun - Bayer do Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 33 mg/Kg de Ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil Ltda), anestésico geral, via intramuscular.

Os animais foram aleatoriamente divididos em:

- a) ovariectomizados - constituído por 96 animais, os quais foram submetidos a ovariectomia;
- b) Sham - constituído por 24 animais, os quais foram falsamente operados.

Ao iniciar o experimento todas as ratas foram pesadas. A pesagem dos animais foi repetida no dia do sacrifício. Os animais do grupo ovariectomizado foram anestesiados, fez-se a depilação da região lateral do corpo, ao nível dos rins e abaixo da costela mais inferior e anti-sepsia com álcool iodado. Realizou-se incisão longitudinal, com extensão de 1 cm em média, na pele, com lâmina de bisturi nº15. Em seguida, foi feita a divulsão do tecido subcutâneo e posterior incisão da musculatura. O ovário foi exposto e confeccionou-se uma ligadura logo abaixo do mesmo para a contenção da hemorragia e posterior remoção deste, juntamente com parte do útero e tecidos moles circundantes, sendo este procedimento feito bilateralmente (Figura 1).

Nos animais do grupo SHAM, foi realizada a falsa ovariectomia ou cirurgia *sham*, na qual foram feitos os mesmos procedimentos, incluindo a exposição dos ovários, com exceção da ligadura e remoção dos mesmos.

Ao fim dos procedimentos a camada muscular foi suturada com fio reabsorvível Categute nº4 (Cirumédica-Brasil), em seguida, realizou-se a sutura da pele com fio de seda 4.0 (Ethicon-Johnson & Johnson), e por fim nova antissepsia com álcool iodado na região operada.

4.3 Grupos experimentais e tratamento

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

- a) Grupo isoflavonas (OVZ-I) – constituído por 24 ratas, as quais receberam 15 mg/Kg/dia, de isoflavonas via oral;
- b) Grupo Estrógeno (OVZ-E) - constituído por 24 ratas, as quais receberam 1 mg/kg/dia de valerato de 17 β -estradiol via oral;
- c) Grupo Associação (OVZ-A) - constituído por 24 ratas, as quais receberam 1mg/kg/dia de valerato de 17 β -estradiol associado a 15 mg/Kg/dia de isoflavonas via oral;
- d) Grupo Ovariectomizado placebo (OVZ) - constituído por 24 ratas, as quais receberam placebo (água), via oral.

Os 24 animais do grupo SHAM também receberam placebo (água) via oral, diariamente.

O tratamento iniciou-se no segundo dia após a ovariectomia. Os medicamentos utilizados foram o valerato de 17 β -estradiol, drágeas de 1 mg (Primogyna – Shering S.A.) e o extrato de isoflavonas da soja a 40% cedido gentilmente pelo Laboratório Botânico Herbarium. Ambos foram administrados via oral, por gavage (Figura 2).

4.4 Exodontia

Tanto nos animais do grupo ovariectomizado, quanto nos animais do grupo SHAM, foi realizada a exodontia dos primeiros molares inferiores, bilateralmente, quinze dias após a ovariectomia ou cirurgia

sham. Para tanto, fez-se a sindesmotomia, luxação e o dente foi removido (Figura 3). Ao final do procedimento, a região do alvéolo foi suturada com ponto simples usando fio de seda nº 4.0. Todos os animais receberam dose de 1 mg/kg de antiinflamatório (diclofenaco sódico 75 mg, Voltaren injetável- Geigy) e 0,1 ml da solução do antibiótico (Pentabiótico – Fort Dodge Ltda.).

Administrou-se tetraciclina (Terramicina, Pfizer), na dose de 20 mg/kg, intramuscular, 24 h após a exodontia e 48 h antes do sacrifício, com seringas de insulina descartáveis. A tetraciclina foi utilizada como marcador para análise histomorfométrica dinâmica, com a finalidade de se verificar a taxa de aposição mineral diária⁷³.

Os animais receberam, após as exodontias, duas opções de ração, em grãos (padrão) ou moída, por dois dias.

4.5 Sacrifício dos animais

Os animais foram pesados antes do sacrifício, e de cada grupo de 24 ratas, oito foram sacrificadas após sete dias das exodontias, oito sacrificadas após 21 dias, enquanto as oito restantes foram sacrificadas decorridos 45 dias após as extrações dentárias. Para o sacrifício, os animais foram anestesiados e sacrificados na guilhotina. A mandíbula e o útero foram removidos, dissecados e fixados em solução de formol a 10% durante o tempo mínimo de 48 horas. A hemi-mandíbula direita foi submetida à análise histológica, imunoistoquímica enquanto a hemi-mandíbula esquerda foi submetida à análise histomorfométrica estática e dinâmica, além de análise por microscopia eletrônica de varredura no modo de elétrons retroespalhados (BSE). O útero foi submetido à análise histológica.



FIGURA 1 - Ovariectomia: A) região a ser incisada; B) exposição do ovário e tecido circundante.

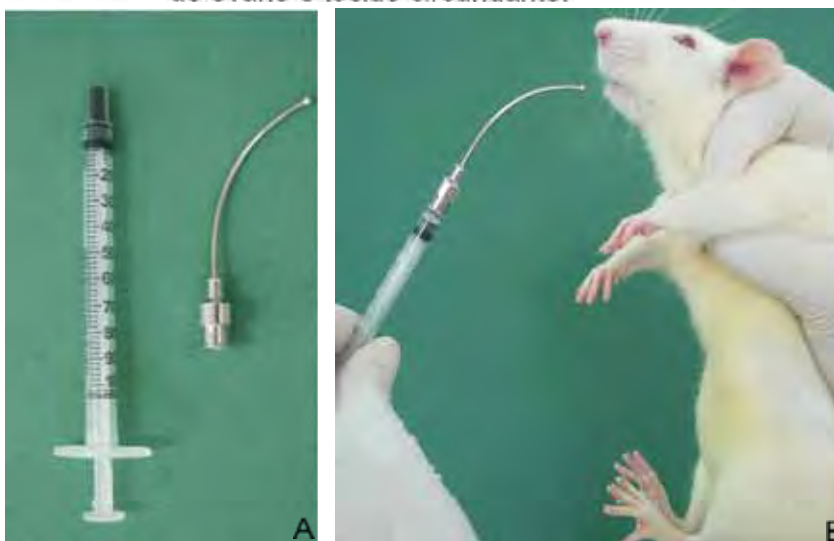


FIGURA 2 - Gavage: A) seringa e agulha de gavage; B) administração do medicamento.



FIGURA 3 - Exodontia: A) Luxação do primeiro molar inferior; B) remoção do dente.

No quadro a seguir (Quadro 1) verifica-se a distribuição dos grupos experimentais conforme o tratamento e o tempo de sacrifício.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais e tratamento nos três períodos de observação

Tratamento:	Ovariectomizados			Sham-operados		
	7 dias	21 dias	45 dias	7 dias	21 dias	45 dias
Estrógeno	OVZ-E7	OVZ-E21	OVZ-E45	–	–	–
Isoflavonas	OVZ-I7	OVZ-I21	OVZ-I45	–	–	–
Associação	OVZ-A7	OVZ-A21	OVZ-A45	–	–	–
Água	OVZ7	OVZ 21	OVZ45	SHAM7	SHAM21	SHAM45

4.6 Tecido ósseo

4.6.1 Processamento tecidual sem desmineralização

As oito hemi-mandíbulas esquerdas de cada subgrupo foram submetidas às seguintes etapas de processamento:

- Imersão em concentrações crescentes de álcool, durante 1 hora cada, até álcool absoluto;
- Imersão em álcool absoluto por quatro dias;
- Imersão em Xilol por três dias;
- Imersão em Solução A (85% de metilmetacrilato e 15% de dibutilftalato) por três dias;
- Imersão em Solução A, adicionada a 1 g de peróxido de benzoíla por quatro dias, em geladeira.

A inclusão do fragmento foi realizada em uma pré-base, composta por Solução A adicionada a 3 g de peróxido de benzoíla já

polimerizada, em estufa à 37°C, contida em um frasco de vidro de 30 ml com tampa. O espécime foi posicionado sobre a pré-base, seguido de preenchimento do frasco com a Solução A adicionada a 3 g de peróxido de benzoíla, ficando, dessa maneira, o espécime suspenso do fundo do frasco, totalmente imerso na resina. O frasco foi levado à estufa à 37°C por 48 h para a polimerização final.

O frasco de vidro foi então quebrado e o bloco encaminhado para corte no longo eixo da mandíbula, perpendicular às raízes, sendo, portanto os ápices radiculares a superfícies de corte. Os cortes foram feitos com o aparelho de corte Labcut 1010 (Extec), utilizando-se disco diamantado de três polegadas de diâmetro. Obtiveram-se dois cortes na região apical que em seguida foram colados em lâminas de plaxiglass incolor e estas fixadas em um dispositivo para desgaste. O desgaste foi realizado em politriz Labpol 8-12 (Extec), usando seqüência crescente de lixas d'água (800 e 1200), buscando a mínima espessura com o máximo de detalhes (Figura 4). Ao final do procedimento foram encaminhados para análise em microscopia eletrônica de varredura no modo de elétrons retroespalhados (BSE), análise em microscopia de luz para a histomorfometria com parâmetros estáticos e em microscópio de fluorescência para a histomorfometria óssea com parâmetros dinâmicos.

4.6.2 Processamento tecidual com desmineralização

Após a fixação, as oito hemi-mandíbulas direitas de cada subgrupo foram encaminhadas para desmineralização em solução de 100 g de ácido etilenodinitrilotetracético (EDTA), 10 g de hidróxido de sódio P.A. e água destilada em quantidade suficiente para completar 1000 ml.

Após descalcificadas, foram lavadas em água corrente removendo assim toda a solução desmineralizadora. Em seguida, foram submetidas à técnica histológica de rotina, incluídas em parafina e cortadas no sentido do longo eixo da mandíbula, sendo coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) ou submetidas à técnica imunoistoquímica.

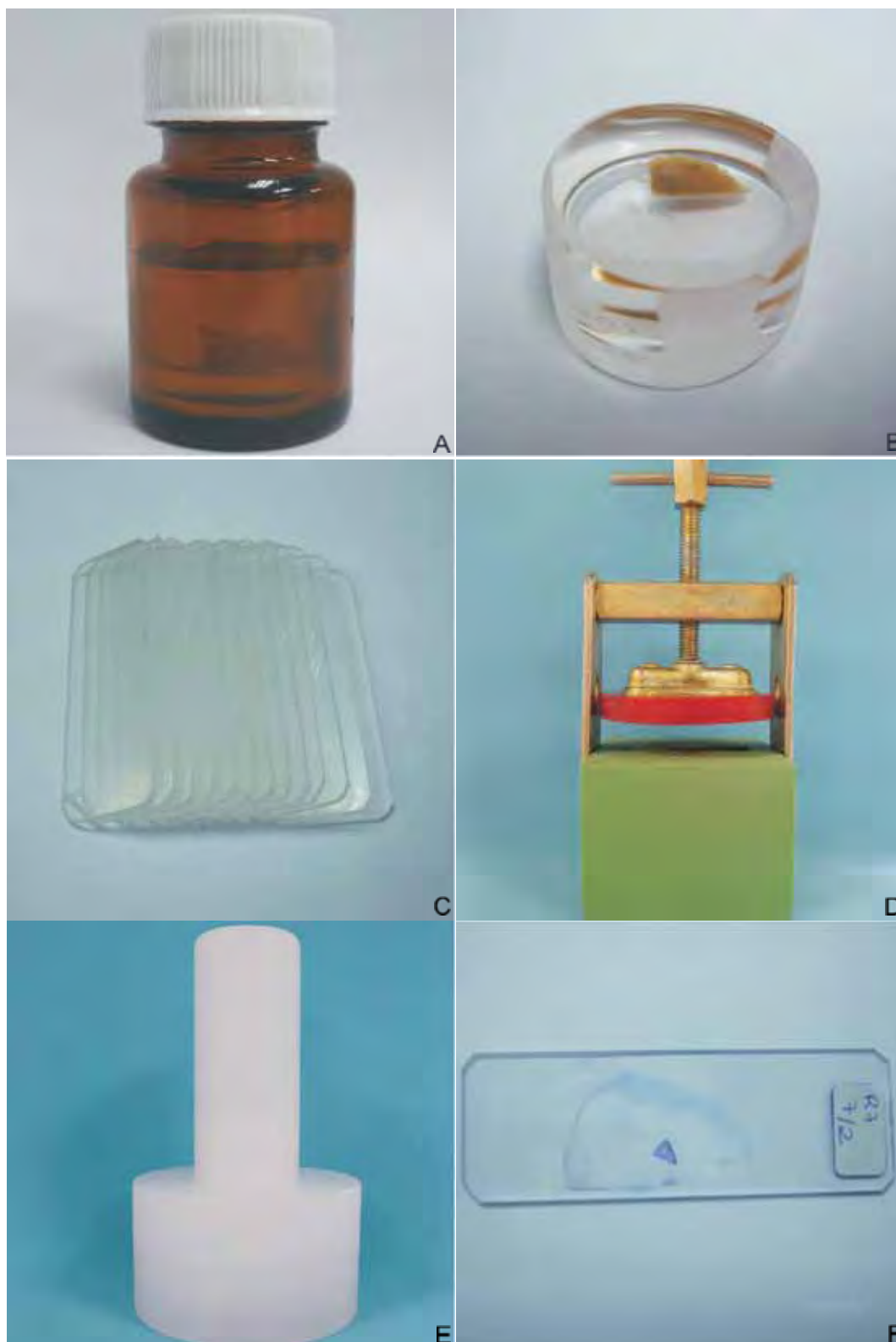


FIGURA 4 - Preparo tecidual sem desmineralização: A) espécime imerso em resina; B) aspecto final do bloco; C) lâminas para colagem do corte; D) dispositivo para prensagem durante a colagem; E) dispositivo para desgaste; F) processamento finalizado.

4.6.3 Análise histológica

Tanto os cortes desmineralizados corados em HE quanto os cortes não desmineralizados corados por azul de toluidina foram submetidos à análise histológica em microscópio de luz para avaliação qualitativa do tecido ósseo neoformado (n=8).

4.6.4 Análise por microscopia eletrônica de varredura (BSE)

Foi selecionado um corte na região apical do material não desmineralizado de um animal por grupo para a realização desta análise (n=1). Analisaram-se qualitativamente as imagens obtidas por meio do BSE, observando a microarquitetura óssea e a conectividade trabecular.

4.6.5 Análise histomorfométrica com parâmetros estáticos

Os cortes obtidos sem desmineralização foram submetidos à análise histomorfométrica. Para tanto, foram corados com azul de toluidina e posteriormente avaliados em microscópio de luz (n=7).

Foram selecionadas aleatoriamente 10 regiões (campos) dos dois cortes na região apical do alvéolo mesial ou distal de cada animal e a quantificação do volume trabecular e do volume osteóide foi avaliada por meio de planimetria por contagem de pontos. Para tanto, utilizou-se um retículo composto por setenta pontos resultantes das interseções entre linhas verticais (7) e horizontais (10), posicionado sobre a imagem histológica para a contagem. As imagens de cada campo foram selecionadas em microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com ocular de 10x e objetiva de 40x. Em seguida, as imagens foram obtidas por câmera digital Sony (modelo Cybershot), acoplada ao microscópio. As imagens arquivadas foram

submetidas à análise histomorfométrica, com utilização do programa computacional NIH *image-J* (versão *Windows*), de domínio público. Tal programa possibilitou a confecção do retículo e seu posicionamento sobre a imagem histológica. Observaram-se os seguintes parâmetros⁷³:

- a) volume trabecular: volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas.
- b) volume osteóide: volume ocupado pelo osso não mineralizado, expresso como porcentagem do volume ocupado pelo osso trabecular mineralizado e não mineralizado.

Essa relação (volume trabecular e volume osteóide) corresponde à proporção da estrutura analisada⁹⁹.

Observou-se ainda o número de mastócitos encontrados por campo analisado. O número de mastócitos por animal correspondeu à média dos valores obtidos nos 10 campos analisados.

4.6.6 Análise imunoistoquímica

Nas reações imunoistoquímicas, os cortes histológicos, após desparafinização em xilol e reidratação em série decrescente de etanol, seguiram-se os seguintes passos:

- a) eliminação de pigmentos formólicos pelo tratamento em hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°;
- b) lavagem em água corrente e água destilada;
- c) digestão enzimática em pepsina 0,4% em ácido clorídrico para a recuperação antigênica;
- d) incubação com peróxido de hidrogênio a 6% e metanol 1:1, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena tecidual;

- e) lavagem em água corrente e água destilada e imersão por duas vezes em tampão Tris (pH 7,4), durante cinco minutos cada;
- f) incubação com o anticorpo primário diluído em tampão Tris acrescido de soroalbumina bovina (BSA) a 1% *overnight* a 4°C.

Todos os procedimentos a seguir foram precedidos de duas lavagens em Tris (pH 7,4), durante cinco minutos cada:

- a) incubação com o anticorpo secundário biotinilado (DAKO LSAB kit, Peroxidase), por 30 minutos à temperatura ambiente;
- b) lavagem;
- c) exposição ao complexo terciário streptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB kit, Peroxidase), por 30 minutos à temperatura ambiente;
- d) lavagem;
- e) incubação com solução de diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB), por 30 minutos;
- f) lavagem em água corrente e água destilada;

Posteriormente, realizou-se a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer, desidratação em etanol, clareamento em xilol e montagem com Permount.

Controles positivos e negativos foram utilizados. Foram selecionados cortes de três animais por grupo (n=3) para avaliação qualitativa da imunomarcção do TGF- β .

4.6.7 Análise histomorfométrica com parâmetro dinâmico

Nos cortes sem descalcificação não corados obteve-se a distância entre as duas marcações de tetraciclina na região ao redor do alvéolo do primeiro molar. Essa foi dividida pelo intervalo de tempo entre os dois períodos de administração do marcador ósseo, para obter a taxa de aposição mineral, expressa em micrômetros por dia ($\mu\text{m}/\text{dia}$).

Foram selecionadas 10 regiões (campos) ao redor do alvéolo nos dois cortes da região apical de cada animal ($n=7$). Os campos foram selecionados em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha), com ocular de 10x e objetiva de 40x. Em seguida, as imagens foram obtidas por câmera digital Sony (modelo Cybershot), acoplada ao microscópio, sendo submetidas à análise histomorfométrica, com utilização do programa computacional NIH *image-J* (versão *Windows*), de domínio público. Realizaram-se três medidas lineares de cada campo, obtendo-se um valor médio. A taxa de aposição mineral por rata correspondeu à média dos valores nos 10 campos analisados.

Em todas as análises as imagens possuíam código que não permitia a identificação do grupo experimental ao qual pertenciam.

4.7 Útero

Os úteros das ratas foram removidos, dissecados e fixados em solução de formol a 10% durante o tempo mínimo de 48 horas. O tecido fixado foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Os blocos seguiram para processamento histológico de rotina e coloração em Hematoxilina e Eosina (HE). Os úteros foram submetidos à análise histológica para avaliação qualitativa de seus aspectos morfológicos ($n=8$).

4.8 Análise estatística

Os valores do peso dos animais no início e no fim do experimento foram submetidos à análise estatística (n=8). Para tanto, foi calculado o ganho do peso corporal, em porcentagem, por meio da aplicação da fórmula: $\text{ganho de peso (\%)} = [(F - I) / I] \times 100$, sendo F, peso final e I, peso inicial. Em seguida aplicou-se o teste de análise de variância (ANOVA, dois fatores) e o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) nos dados obtidos.

Os dados de ganho de peso e os da reparação óssea (volume trabecular, volume osteóide e número de mastócitos), além dos dados da taxa de aposição mineral ao redor do alvéolo (n=7), foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva e inferencial segundo duas abordagens.

Na primeira abordagem, foram considerados os efeitos dos fatores: ovariectomia (presença ou ausência de hormônios ovarianos) e do tempo de sacrifício (sete, 21 e 45 dias), comparando-se os grupos OVZ e SHAM. Foram efetuados o teste de análise de variância (ANOVA, dois fatores) e o teste de comparação múltipla de Tukey (5%).

Na segunda abordagem, foram considerados os efeitos dos fatores: tratamento (placebo, estrógeno, isoflavonas, associação) e do tempo de sacrifício (sete, 21 e 45 dias) nas ratas ovariectomizadas, comparando-se os grupos OVZ, OVZ-E, OVZ-I e OVZ-A. Para esses dados foi efetuado, como na primeira abordagem, o teste de análise de variância (ANOVA, dois fatores) e o teste de comparação múltipla de Tukey (5%).

Por fim, quando necessário, compararam-se os valores do grupo SHAM e os grupos ovariectomizados que apresentaram efeito significativo utilizando-se o teste de Dunnett (5%).

5 RESULTADOS

A comprovação do sucesso da ovariectomia foi feita pela observação, no momento do sacrifício, da intensa atrofia uterina dos animais do grupo OVZ, diferindo, portanto, o volume do útero desses animais quando comparado ao volume uterino dos animais do grupo SHAM.

5.1 Peso dos animais

Os valores de ganho de peso estão apresentados no Apêndice A. Os valores de ganho do peso corporal, em porcentagem, referentes à estatística descritiva estão apresentados na Tabela 1 mostrada a seguir.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos valores de ganho do peso em percentagem

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	5,59	7,17	20,09
	DP	14,87	5,80	12,14
OVZ	Média	14,26	16,56	25,58
	DP	5,35	10,53	10,61
OVZ-E	Média	3,69	4,62	10,59
	DP	16,23	5,72	7,96
OVZ-I	Média	2,79	16,07	21,3
	DP	3,52	4,49	7,70
OVZ-A	Média	-2,22	2,31	11,11
	DP	3,13	3,922	4,274

Ao analisarmos a Tabela 1 verificou-se que as médias de ganho do peso aumentaram com o decorrer do tempo (Figura 5).

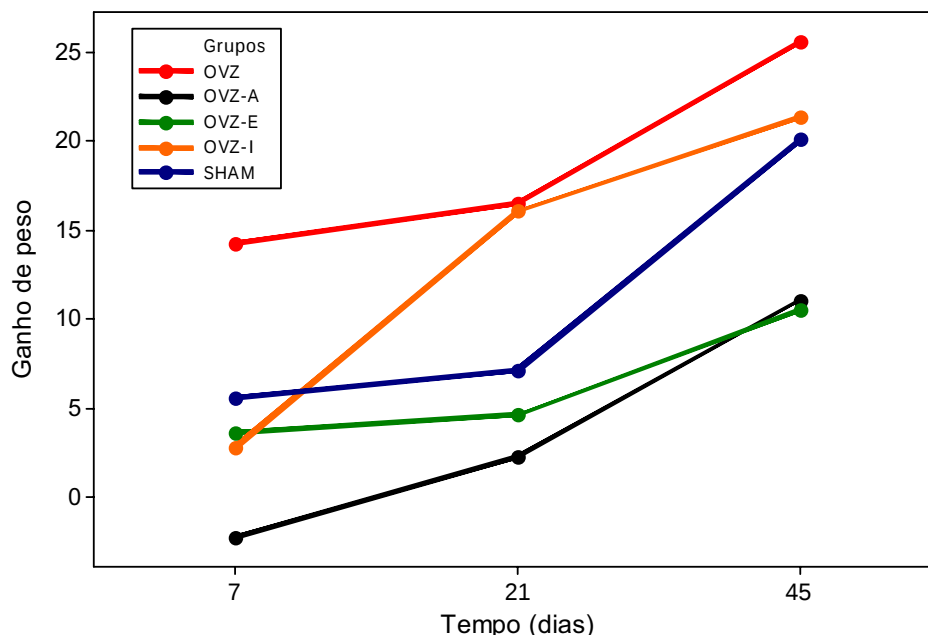


FIGURA 5 – Gráfico das médias de ganho do peso corporal dos grupos experimentais, no tempo de sacrifício de sete e 21 e 45 dias.

Diante do comportamento das médias do gráfico anterior, pode-se observar que o grupo Sham apresentou nos três períodos observados médias menores de peso corporal quando comparadas ao grupo OVZ.

Comparando-se os dados dos grupos OVZ e SHAM por meio da análise de variância (ANOVA), observou-se como efeitos significantes a ovariectomia ($p=0,013$) e o tempo de sacrifício ($p=0,002$).

Em seguida, comparando-se os grupos ovariectomizados entre si, verificou-se que os resultados possibilitam rejeitar a hipótese de igualdade referente aos efeitos principais: tratamento ($p=0$) e tempo de sacrifício ($p=0$).

Efetuiu-se o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) entre os grupos OVZ e SHAM (Tabela 2).

Tabela 2 – Teste de Tukey para os dados de ganho do peso corporal nas seis condições experimentais

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
OVZ	7	14,00	AB
OVZ	21	16,37	AB
OVZ	45	25,00	A
SHAM	7	5,50	B
SHAM	21	6,75	B
SHAM	45	19,50	AB

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

O grupo OVZ no período de 45 dias foi aquele que apresentou a maior porcentagem de ganho de peso, diferindo do grupo SHAM aos sete e aos 21 dias. Embora o grupo OVZ tenha apresentado maiores médias nos três períodos estudados, não houve diferença significativa entre a média de ambos os grupos em cada período.

Aplicando-se o teste de Tukey para as médias dos grupos ovariectomizados entre si, verificou-se quanto ao efeito tempo de sacrifício que com o decorrer do tempo houve maior ganho de peso corporal pelos animais (Tabela 3).

Tabela 3 – Teste de Tukey (5%) para ganho de peso nos três períodos de observação

Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos
7	4,63	A
21	9,891	B
45	17,156	C

Quanto ao efeito tratamento, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%), pode-se afirmar que o grupo OVZ-A foi aquele que apresentou menor ganho de peso, não diferindo do grupo OVZ-E (Tabela 4).

Tabela 4 - Formação de grupos de mesmo desempenho, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%)

Tratamento	Média	Grupos homogêneos
OVZ	18,800	B
OVZ-I	13,403	B
OVZ-E	6,299	A
OVZ-A	3,735	A

5.2 Análise Histológica

O padrão histológico encontrado foi, de maneira geral, semelhante nos grupos experimentais entre si, apresentando diferenças marcantes quanto ao período de observação. Portanto, essas características foram descritas de acordo com os tempos de sete, 21 e 45 dias. Diferenças observadas em alguns grupos foram assinaladas de acordo com o período.

5.2.1 Período de sete dias

Na região apical alveolar do primeiro molar podiam ser distinguidos facilmente dois alvéolos correspondentes às raízes mesial (Figura 6A) e distal. No alvéolo mesial notava-se contorno da cortical alveolar bem definido e em remodelação e intensa neoformação óssea, de aspecto esponjoso, originada da periferia em direção ao centro (Figura 6A e B). A porção central encontrava-se preenchida por tecido de granulação em maturação, caracterizado pela presença de fibroblastos jovens, vasos sanguíneos neoformados, e feixes de fibras colágenas delicados. O alvéolo distal possuía contorno irregular de difícil delimitação, já que os septos interdental e inter-radicular encontravam-se em intensa remodelação. Da mesma forma que no alvéolo mesial, notavam-se evidente neoformação óssea trabecular centrípeta e tecido de granulação no centro do alvéolo. Quantidade variada de remanescentes de coágulo em organização foi observada.

O tecido ósseo neoformado era imaturo, desorganizado, contendo osteócitos volumosos e lacunas amplas. Observaram-se osteoblastos, em sua maioria, colunares (Figura 6C), com núcleo polarizado, arranjados em fileira contornando as trabéculas ósseas neoformadas. Notaram-se ainda, áreas de trabéculas delicadas, formadas por material de aspecto osteóide (Figura 6C e D). Estas diferiam das trabéculas localizadas na margem, que demonstravam um padrão mais maduro.

No terço médio da região alveolar, notavam-se, além dos alvéolos mesial e distal já bastante definidos e facilmente distinguidos, os alvéolos correspondentes às raízes médio-vestibular e médio-lingual. Esquírolas ósseas, contornadas por tecido osteóide e por osteoblastos foram por vezes observados nos três terços da região alveolar. Quando presentes na região cervical, algumas eram contornadas ora por osteóide e osteoblastos, ora por osteoclastos sobre uma superfície reabsorvida.

Ao redor dos alvéolos, trabéculas ósseas delimitando espaços medulares preenchidos ora por medula óssea hematopoiética, ora por tecido de granulação em fase de maturação foram vistas. Áreas de reabsorção caracterizadas por linhas reversas basofílicas e trabéculas ósseas apresentando superfícies irregulares, com lacunas contendo ou não células gigantes multinucleadas sugestivas de osteoclastos, também foram notadas.

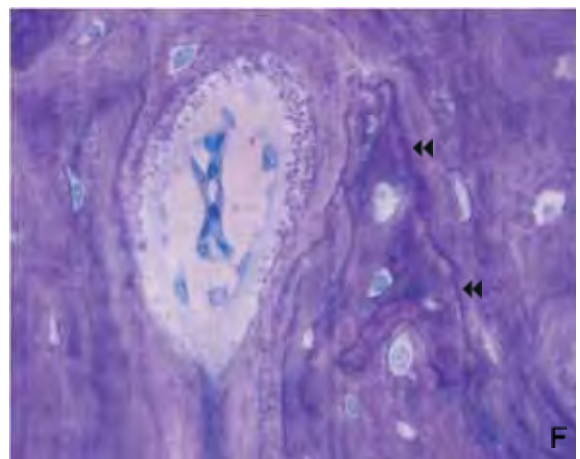
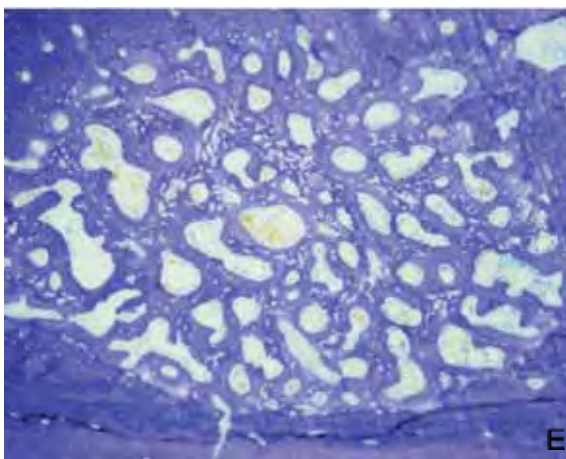
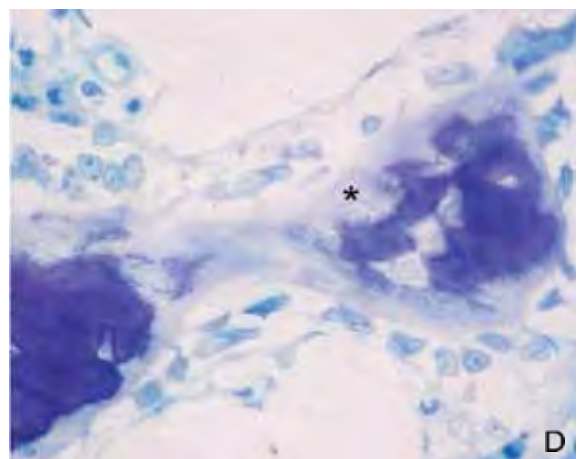
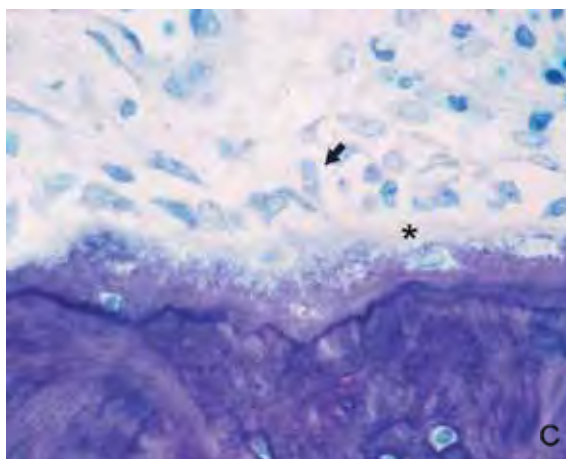
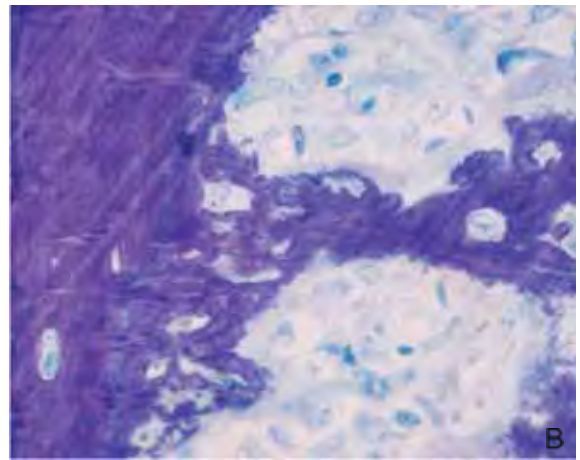
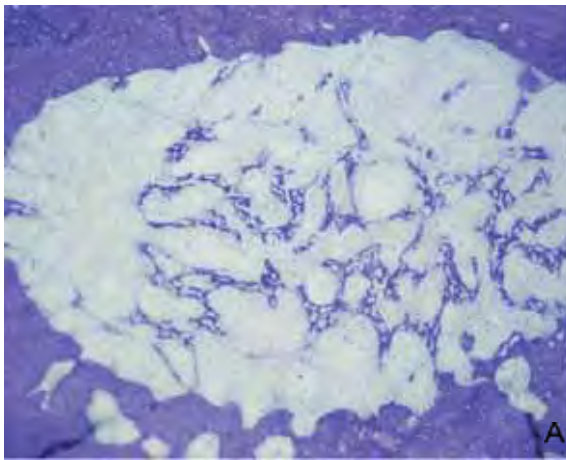
Neoformação óssea periosteal na superfície externa da cortical óssea lingual e vestibular foi observada, a qual muitas vezes mostrava continuidade com a região do reparo do alvéolo mesial no terço cervical. Nesse terço, verificou-se extensa reabsorção óssea ao redor do alvéolo, predominando sobre a neoformação óssea no interior do mesmo. Por vezes, observou-se recobrimento parcial do processo alveolar por epitélio pavimentoso estratificado. Infiltrado inflamatório composto por células polimorfonucleares e mononucleares também foi encontrado. Na região, freqüentemente observou-se fratura da cortical óssea, seqüela da exodontia. Como consequência, nessas áreas, notou-se atraso do processo de reparação.

Aos sete dias a alteração mais marcante foi observada nos grupos OVZ-E e SHAM, os quais apresentaram as características descritas anteriormente, no entanto, mostraram cortical alveolar mais evidente, compacta, delimitando o alvéolo mesial.

5.2.2 Período de 21 dias

Neste período, a característica mais acentuada foi o preenchimento completo do alvéolo por osso trabecular no terço médio (Figura 6E), sendo que no terço apical notava-se ainda presença de tecido conjuntivo fibroso no centro do alvéolo, porém em menor quantidade quando comparado ao período anterior.

FIGURA 6 – Análise histológica da reparação óssea alveolar: A) trabéculas ósseas delicadas originadas da margem do alvéolo aos sete dias. Grupo SHAM. Aumento original 100x; B) tecido ósseo formado sobre arcabouço de fibras colágenas (↓). Grupo OVZ-I aos sete dias. C) osteoblastos colunares (→) arranjados em fileira e camada de osteóide (*), no período de sete dias. Grupo SHAM. Aumento original 1000x; D) osteóide originado a partir do osso preexistente envolvendo tecido ósseo recém mineralizado, aos sete dias. Grupo SHAM. Aumento original 1000x; E) alvéolo preenchido por trabéculas ósseas neoformadas aos 21 dias. Grupo SHAM. Aumento original 100x; F) linhas reversas basofílicas (⊙) caracterizando atividade de remodelação óssea aos 21 e 45 dias. Grupo OVZ45. Aumento original 1000x. Azul de Toluidina.



No interior do alvéolo, o tecido ósseo apresentava-se em maior quantidade, mais maduro e organizado, sendo que grande parte das trabéculas apresentava numerosas linhas reversas basofílicas, evidenciando a fase de remodelação óssea (Figura 6F).

Osteoblastos achatados ou colunares, arranjados em fileira contornando algumas trabéculas foram observados. Tecido ósseo não mineralizado, de aspecto osteóide, ao redor das trabéculas ósseas neoformadas foi encontrado.

A cortical alveolar, que no período anterior apresentava-se em intensa fase de remodelação, apresentou-se mais espessa, densa e compacta, e o trabeculado ósseo neoformado delimitava espaços medulares pequenos, ainda preenchidos por tecido conjuntivo fibroso.

A neoformação periosteal da superfície externa do osso cortical também apresentava aspecto mais maduro, com trabéculas mais densas e compactas do que aquelas do período de sete dias. No processo alveolar, espaços medulares preenchidos tanto por tecido de granulação, quanto por medula hematopoética foram notados.

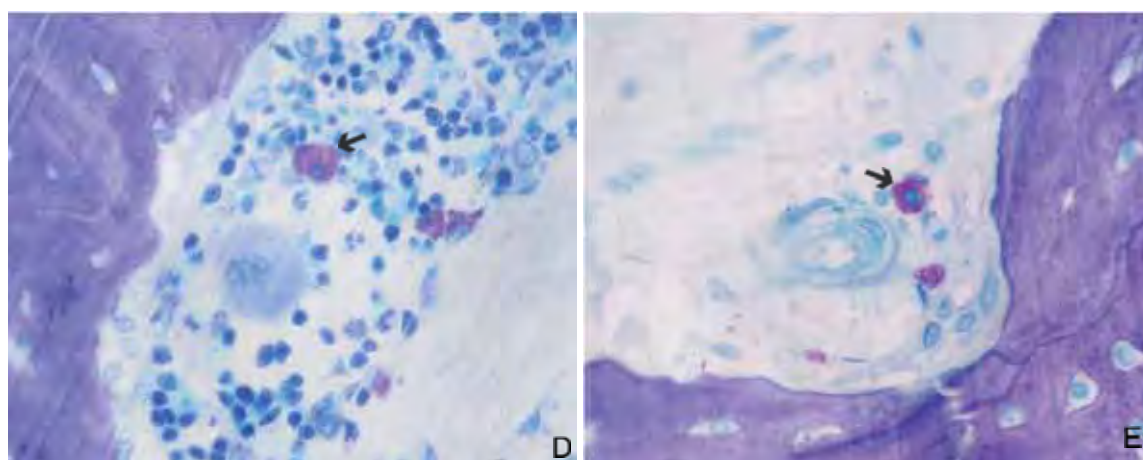
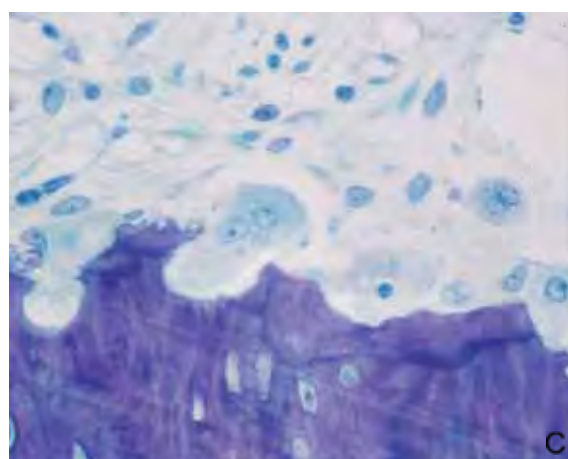
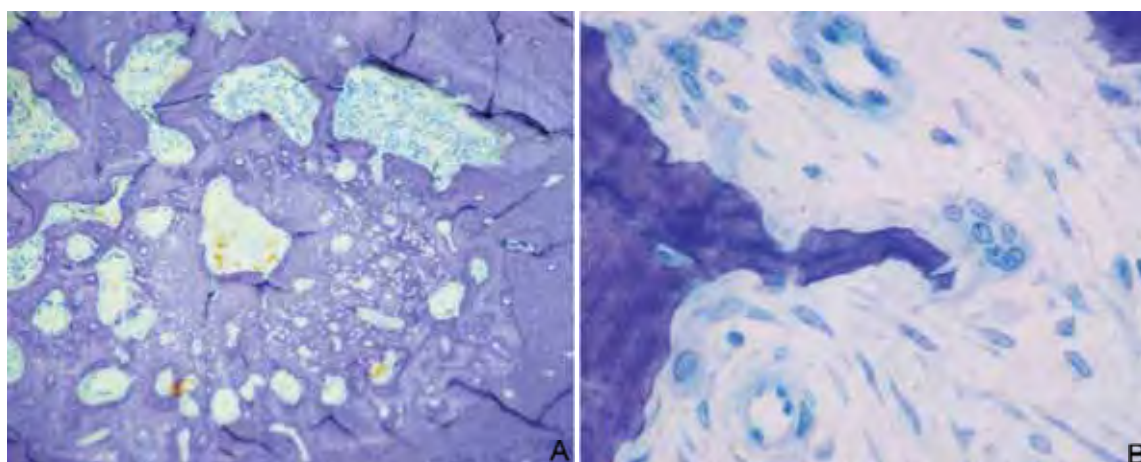
5.2.2 Período de 45 dias

Nesse período, toda a região alveolar encontrava-se preenchida por trabeculado ósseo (Figura 7A) e na maioria dos animais não se observava tecido conjuntivo fibroso no centro dos alvéolos.

Os alvéolos eram mal delimitados, pois a distinção das corticais alveolares tornou-se difícil devido à intensa remodelação ocorrida no local.

As trabéculas, mais espessas e densas, apresentavam osteócitos pouco volumosos em lacunas pequenas, além de pequena quantidade de osteóide ao redor. Células gigantes multinucleadas sugestivas de osteoclastos foram observadas (Figura 7B e C). A maioria dos osteoblastos apresentava-se achatada, arranjados em fileira.

FIGURA 7 – Análise histológica da reparação óssea alveolar: A) trabéculas em fase de remodelação aos 45 dias. Espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo ou medula hematopoética. Grupo SHAM. Aumento original 100x; B) osteoclasto reabsorvendo espícula óssea da margem do alvéolo. Grupo SHAM aos 7 dias. Aumento original 1000x; C) osteoclastos no interior de lacunas de reabsorção. Grupo SHAM aos 7 dias. Aumento original 1000x; D) espaços medulares contendo medula hematopoética e mastócitos (▼). Grupo SHAM aos 45 dias. Aumento original 1000x. E) espaços medulares contendo tecido conjuntivo e mastócitos (▼). Grupo OVZ aos 45 dias. Aumento original 1000x. Azul de Toluidina.



Nos espaços medulares notou-se medula hematopoiética. Mastócitos caracterizados por núcleo arredondado e citoplasma granular, com metacromasia evidente à coloração por Azul de Toluidina, foram vistos dispersos pelo tecido no interior e ao redor do alvéolo em todos os grupos, sendo que no grupo OVZ sua presença foi bastante expressiva (Figura 7D e E).

O tecido ósseo neoformado na superfície externa da cortical óssea estava remodelado e não era possível sua diferenciação do osso preexistente.

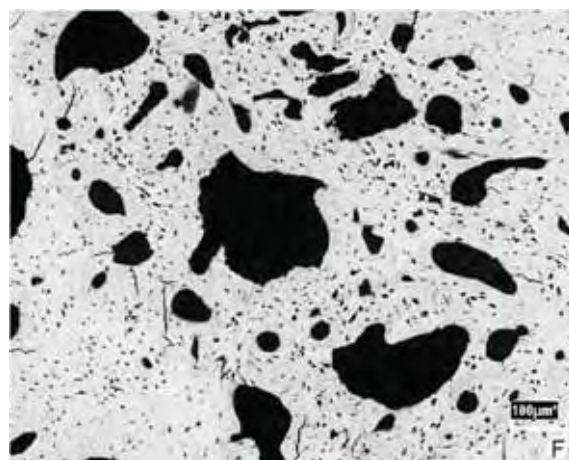
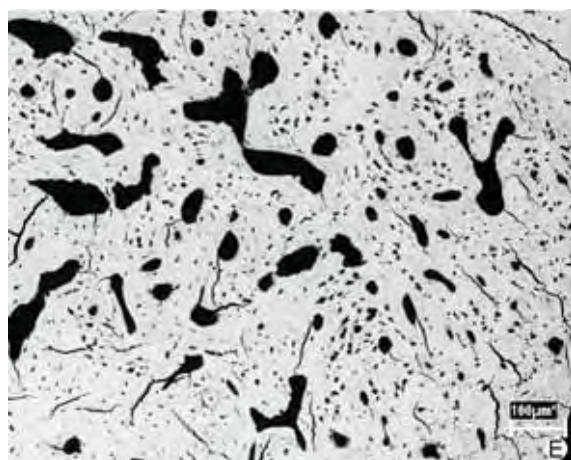
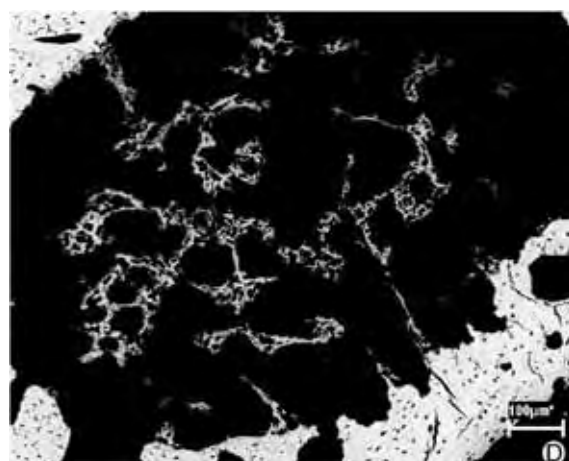
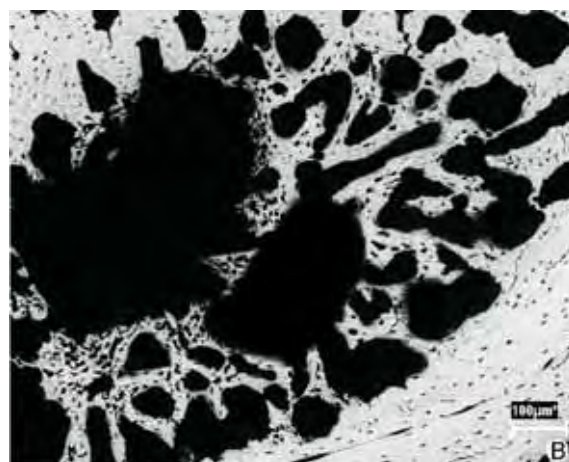
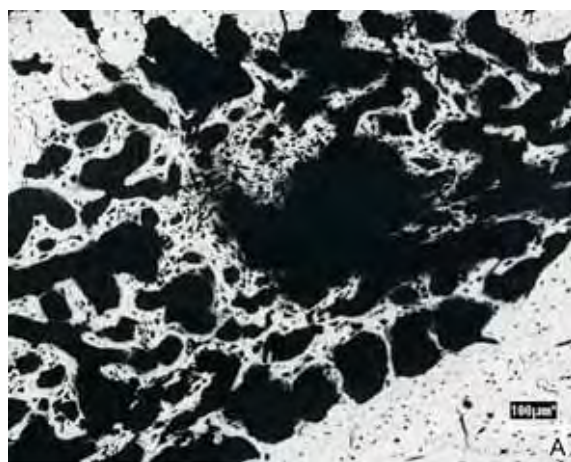
O Grupo OVZ apresentou menor largura da mandíbula na região estudada, evidenciando maior reabsorção óssea no local, além de espaços medulares maiores, alterando a microarquitetura óssea quando comparado ao grupo SHAM. O tecido conjuntivo do centro do reparo ósseo apresentava-se com fibras colágenas mais delicadas do que os demais grupos.

5.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura (BSE)

Aos sete dias foi observado tecido ósseo neoformado originado da margem do alvéolo, caracterizado por trabéculas delicadas e osteoplastos amplos. O trabeculado preenchia parcialmente o local e a intensidade da neoformação variou de acordo com o animal, sendo evidente no grupo SHAM e discreta no grupo OVZ-I.

No período de 21 dias notaram-se trabéculas espessas e espaços medulares menores. Tais espaços apresentaram tamanho ainda mais reduzido no período de 45 dias. Aparentemente no grupo OVZ os espaços medulares eram maiores, conferindo uma diferença na microarquitetura óssea quando comparada a dos demais grupos (Figura 8).

FIGURA 8 – Análise da reparação óssea alveolar por MEV/BSE: A e E) grupo SHAM. B e F) grupo OVZ: C) grupo OVZ-E. D) grupo OVZ-I. A – D) neoformação óssea de intensidade variada segundo o grupo, caracterizada por trabéculas ósseas delicadas preenchendo parcialmente o alvéolo aos sete dias; E – F) preenchimento completo do alvéolo por trabéculas espessas e em remodelação aos 45 dias, com diferença na microarquitetura óssea nesse período. Aumento original 200x.



5.4 Análise histomorfométrica com parâmetros estáticos

5.4.1 Volume trabecular

Os dados originais estão apresentados no Apêndice B. A estatística descritiva desses dados encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Estatística descritiva referente ao volume trabecular em porcentagem

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	46,41	70,88	81,39
	DP	3,640	4,546	4,235
OVZ	Média	42,08	66,20	78,84
	DP	6,578	4,743	3,229
OVZ-E	Média	39,31	68,44	75,86
	DP	4,955	4,292	3,131
OVZ-I	Média	35,93	69,30	75,46
	DP	6,158	5,254	4,088
OVZ-A	Média	38,45	71,81	85,63
	DP	3,392	6,635	3,986

Observando os dados da Tabela 5 nota-se, comparando-se os grupos SHAM e OVZ, que o volume trabecular aumentou com o decorrer do tempo, e o mesmo foi observado entre os grupos ovariectomizados e tratados entre mostrando que todos os grupos experimentais apresentaram comportamento semelhante (Figura 9).

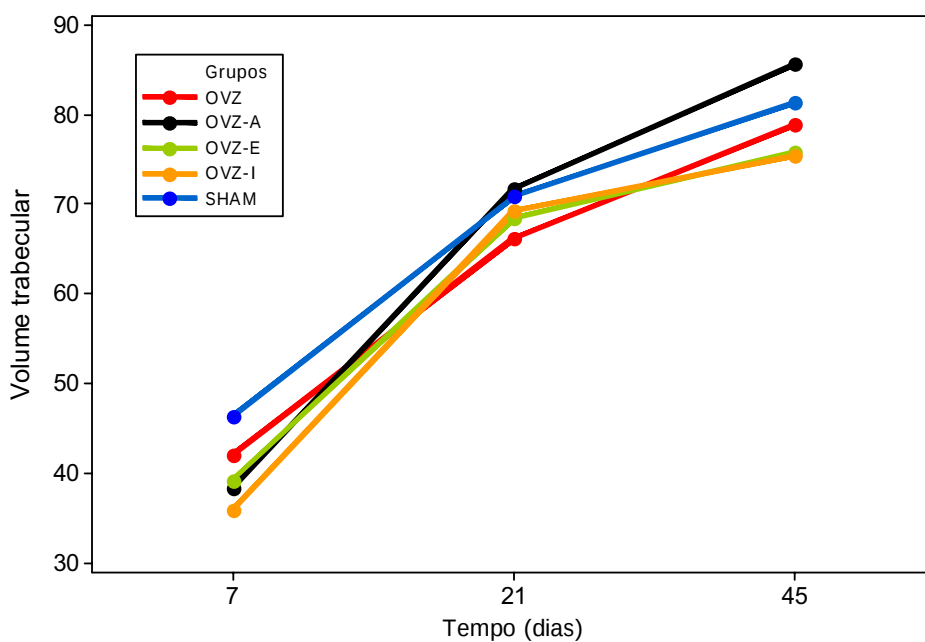


FIGURA 9 - Gráfico das médias de volume trabecular dos grupos experimentais aos sete, 21 e 45 dias.

Os dados dos grupos OVZ e SHAM, quando submetidos ao teste ANOVA, mostraram, como efeito significativo, o tempo de sacrifício ($p=0$) e a ovariectomia ($p=0,011$).

Ao analisarem-se os dados dos grupos ovariectomizados, o teste ANOVA revelou como efeitos significativos o tempo de sacrifício ($p=0$), o tratamento ($p=0,008$), bem como a interação entre ambos ($p=0,014$).

Aplicando-se o teste de Tukey para as médias dos grupos OVZ e SHAM, verificou-se quanto ao efeito tempo de sacrifício que com o decorrer do tempo houve aumento do volume trabecular (Tabela 6).

Tabela 6 – Teste de Tukey para volume trabecular nos três períodos de observação

Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos
7	44,245	A
21	68,541	B
45	80,116	C

Quanto ao efeito ovariectomia, após o teste de comparação múltipla de Tukey, pode-se afirmar que o grupo OVZ apresentou menor volume trabecular que o grupo SHAM (Tabela 7).

Tabela 7 - Formação de grupos de mesmo desempenho, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%)

Tratamento	Média	Grupos homogêneos
OVZ	62,376	A
SHAM	66,224	B

O teste de comparação múltipla de Tukey indicou semelhança entre os grupos Sham e OVZ no mesmo período de observação (Tabela 8).

Tabela 8 – Teste de Tukey para os dados referentes ao volume trabecular

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
OVZ	7	42,082	A
OVZ	21	66,204	B
OVZ	45	78,844	C
SHAM	7	46,408	A
SHAM	21	70,878	B
SHAM	45	81,388	C

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

O teste de comparação múltipla de Tukey para os grupos ovariectomizados mostrou que o grupo OVZ-A, aos 45 dias, apresentou média superior à dos grupos OVZ-E e OVZ-I, e, embora não diferindo do grupo OVZ tendeu a apresentar maior quantidade de volume trabecular (Tabela 9).

Tabela 9 – Teste de Tukey para os dados referentes ao volume trabecular para os grupos ovariectomizados e tratados em porcentagem

Tratamento	Tempo	Média	Grupos homogêneos*
OVZ	7	42,082	A
OVZ-E	7	39,310	A
OVZ-I	7	35,935	A
OVZ-A	7	38,453	A
OVZ	21	66,204	B
OVZ-E	21	68,443	BC
OVZ-I	21	69,300	BC
OVZ-A	21	71,810	BCD
OVZ	45	78,844	DE
OVZ-E	45	75,865	CD
OVZ-I	45	75,458	CD
OVZ-A	45	85,629	E

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

5.4.2 Volume osteóide

Os dados de cada animal estão apresentados no Apêndice C. A estatística descritiva desses dados encontra-se na tabela a seguir (Tabela 10).

Tabela 10 - Estatística descritiva referente ao volume osteóide em porcentagem

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	7,043	7,109	2,005
	DP	1,437	0,800	0,854
OVZ	Média	2,936	7,789	3,899
	DP	0,684	1,859	0,800
OVZ-E	Média	20,656	7,574	2,897
	DP	6,272	1,868	0,744
OVZ-I	Média	4,182	7,460	3,193
	DP	1,014	1,751	1,517
OVZ-A	Média	15,714	4,746	0,022
	DP	1,896	1,491	0,010

Comparando-se os grupos SHAM e OVZ, nota-se que o volume osteóide aumentou do período de sete para o período de 21, principalmente no grupo OVZ, decrescendo no período de 45 dias, sendo que o mesmo ocorreu no grupo OVZ-I. Mas, os grupos OVZ-E e OVZ-A apresentaram médias superiores aos sete dias que decresceram com o decorrer do tempo.

Observando a Figura 10 pode-se notar que os grupos SHAM, OVZ e OVZ-I apresentaram comportamento semelhante nos três períodos de observação. Entretanto, os grupos OVZ-E e OVZ-A apresentaram comportamento diverso aos sete dias.

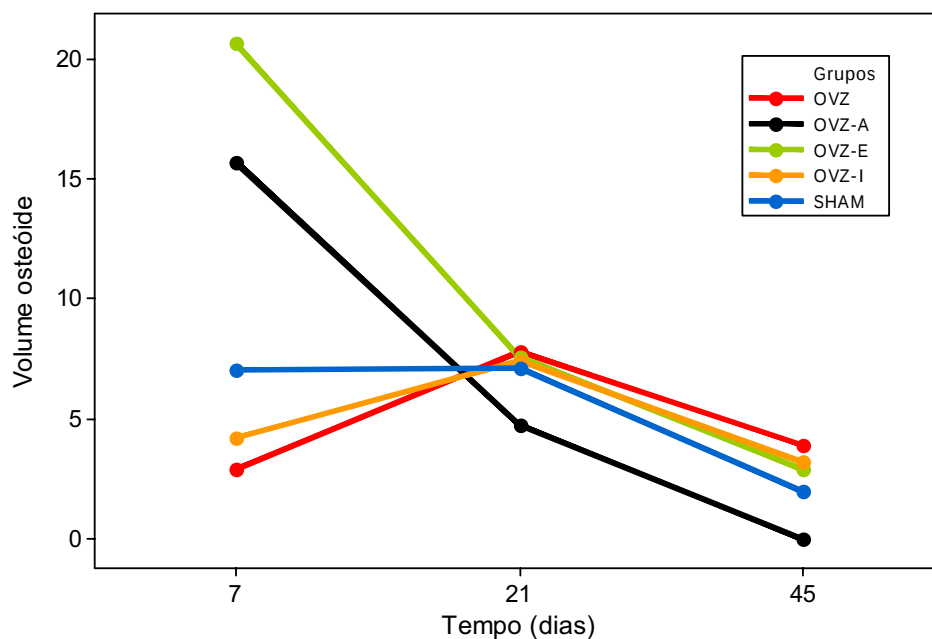


FIGURA 10 - Gráfico das médias de volume osteóide dos grupos experimentais nos períodos de observação sete, 21 e 45 dias.

Os dados dos grupos OVZ e SHAM, quando submetidos ao teste ANOVA, mostraram, como efeito significativo, o tempo de sacrifício ($p=0$) e sua interação com o efeito ovariectomia ($p=0$).

O teste ANOVA, comparando-se os grupos ovariectomizados, revelou como efeitos significativos o tempo de sacrifício ($p=0$), o tratamento ($p=0$), bem como a interação entre ambos ($p=0$).

O teste de comparação múltipla de Tukey mostrou que os grupos SHAM e OVZ apresentaram diferença significativa no período de sete e 45, sendo semelhantes no período de 21 dias (Tabela 11).

Tabela 11 – Teste de Tukey para os dados referentes ao volume osteóide dos grupos SHAM e OVZ

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
OVZ	7	2,9356	BC
OVZ	21	7,7892	A
OVZ	45	3,8990	B
SHAM	7	7,0434	A
SHAM	21	7,1087	A
SHAM	45	2,0054	C

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

As médias de volume osteóide dos grupos ovariectomizados ao serem submetidas ao teste de comparação múltipla de Tukey indicaram diferença entre os grupo OVZ-A e OVZ-E aos sete dias, diferindo dos demais. Os grupos OVZ e OVZ-I foram semelhantes em todos os tempos de sacrifício e não diferiram dos grupos OVZ-A e OVZ-E aos 21 dias, sendo, portanto, todos semelhantes neste período. Aos 45 dias o grupo OVZ-A apresentou a menor média, embora todos tenham sido estatisticamente semelhantes nesse período (Tabela 12).

Tabela 12 – Teste de Tukey para os dados referentes ao volume osteóide para os grupos ovariectomizados e tratados entre si

Tratamento	Tempo	Média	Grupos homogêneos*
OVZ	7	2,936	DE
OVZ-E	7	20,656	A
OVZ-I	7	4,182	CD
OVZ-A	7	15,714	B
OVZ	21	7,789	C
OVZ-E	21	7,574	C
OVZ-I	21	7,460	C
OVZ-A	21	4,746	CD
OVZ	45	3,899	CDE
OVZ-E	45	2,897	DE
OVZ-I	45	3,193	DE
OVZ-A	45	0,022	E

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

Para a comparação dos grupos OVZ-E, OVZ-A e SHAM, no período de sete dias, utilizou-se o teste de Dunnett. Verificou-se diferença estatística entre esses grupos e o grupo SHAM, sendo que a maior média foi a do OVZ-E (Tabela 13).

Tabela 13 – Teste de Dunnett para a comparação dos grupos OVZ-E, OVZ-A com o grupo SHAM, no período de sete dias

Grupos	Médias	Diferença de médias SHAM (7.043)	SE da diferença	t*	p
OVZ-E	20,66	13.613 (8,014 a 19,21)	2,347	5,800	0,0000
OVZ-A	14,4021	7,359 (1,937 a 12,78)	2,273	3,238	0,0081

5.4.3 Número de mastócitos

Os dados de cada animal estão apresentados no Apêndice D. A estatística descritiva desses dados encontra-se na tabela a seguir (Tabela 14).

Tabela 14 - Estatística descritiva referente à média do número de mastócitos de cada grupo experimental

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	0,0143	1,3048	0,8571
	DP	0,0378	0,7374	0,6579
OVZ	Média	0,0600	1,3429	1,6635
	DP	0,0566	1,6821	1,4414
OVZ-E	Média	0,0633	0,3000	0,6861
	DP	0,1172	0,3317	0,6301
OVZ-I	Média	0,0000	1,2171	0,9102
	DP	0,0000	1,1213	0,6545
OVZ-A	Média	0,2365	1,0071	0,7171
	DP	0,1945	0,9185	1,2753

Observando as médias dos grupos experimentais nota-se que os grupos OVZ e OVZ-E apresentaram aumento do número de mastócitos com o decorrer do tempo. O mesmo não foi verificado nos demais grupos, os quais apresentaram maior número de mastócitos aos 21 dias e um decréscimo no período seguinte.

Observando a Figura 11 pode-se notar que os grupos experimentais mostraram comportamento semelhante aos sete e 21 dias. Aos 45 dias, os grupos OVZ e OVZ-E apresentaram comportamento diferente dos demais devido ao aumento do número de mastócitos, enquanto os demais tiveram as médias diminuídas no período.

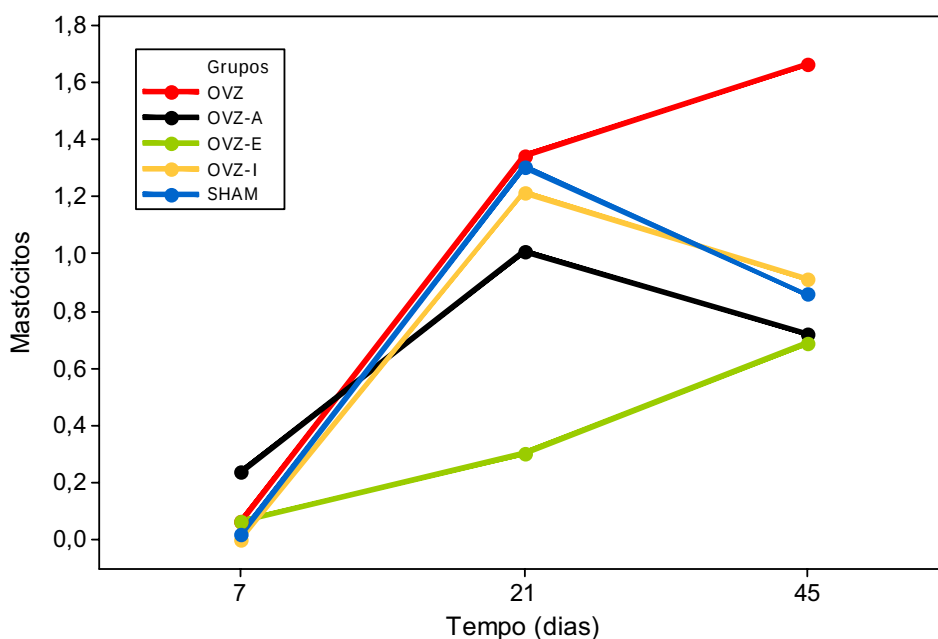


FIGURA 11 - Gráfico das médias dos grupos experimentais aos sete, 21 e aos 45 dias.

O teste ANOVA para os grupos OVZ e SHAM, revelou, como efeito significativo, o tempo de sacrifício ($p=0,002$).

Comparando-se os grupos ovariectomizados tratados entre si, o teste ANOVA revelou como efeito significativo também apenas o tempo de sacrifício ($p=0$).

O teste de comparação múltipla de Tukey mostrou que o grupo OVZ apresentou média diferente estatisticamente ao comparar-se o período de sete e 45 dias. O mesmo não ocorreu nos demais grupos experimentais, mostrando, portanto, um aumento significativo dos mastócitos com o decorrer do tempo no grupo OVZ (Tabela 15).

Tabela 15 – Teste de Tukey para os dados referentes ao número de mastócitos dos grupos SHAM e OVZ

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
OVZ	7	0,0600	B
OVZ	21	1,3429	AB
OVZ	45	1,6635	A
SHAM	7	0,0143	B
SHAM	21	1,3048	AB
SHAM	45	0,8571	AB

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

Quanto ao efeito tratamento não houve diferença significativa entre os grupos ovariectomizados ao ser aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey (Tabela 16).

Tabela 16 - Formação de grupos de mesmo desempenho, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%)

Tratamento	Média	Grupos homogêneos
OVZ	1,0221	A
OVZ-E	0,3498	A
OVZ-I	0,7091	A
OVZ-A	0,6536	A

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

Quanto ao efeito tempo de sacrifício, foi verificado que o período de sete dias foi aquele que apresentou menor média (Tabela 17).

Tabela 17 – Teste de Tukey (5%) para o número de mastócitos nos três períodos de observação

Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos
7	0,0899	A
21	0,9668	B
45	0,9942	B

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

5.5 Análise imunoistoquímica

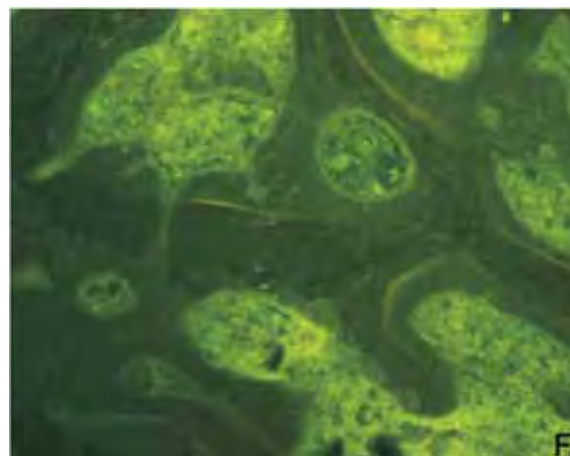
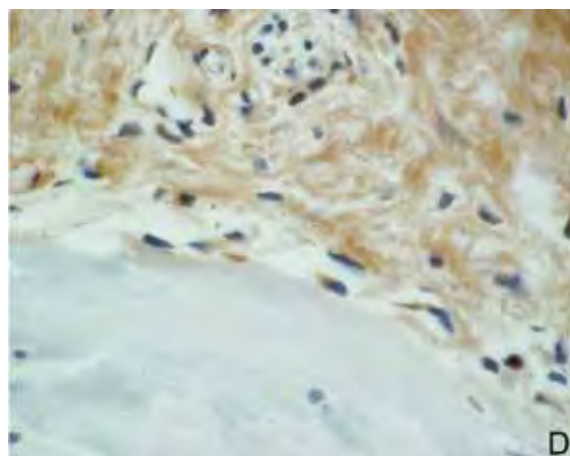
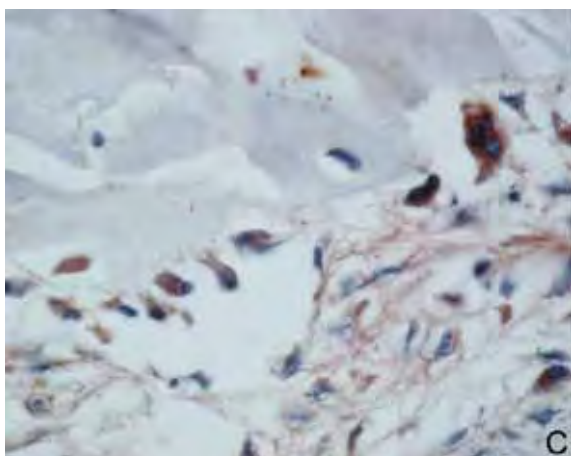
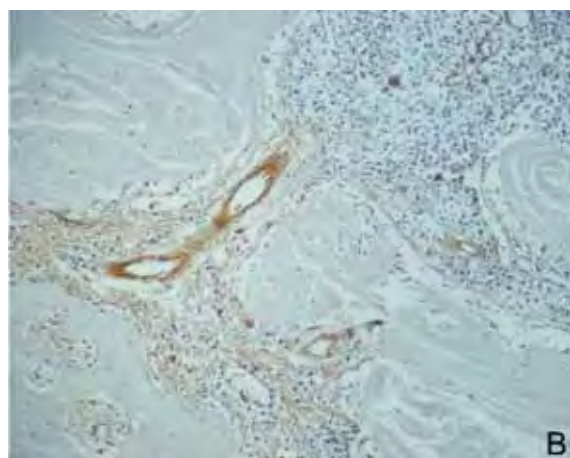
A expressão do TGF- β foi observada aos sete, 21 e 45 dias de reparação óssea. Aos sete dias notou-se marcação positiva nos osteoblastos, que em sua maioria apresentavam-se colunares. Alguns osteócitos também exibiram marcação positiva, bem como o tecido de granulação visto no centro do alvéolo. Tal tecido, em fase de maturação era formado por fibras colágenas delicadas e por fibroblastos, ambos com expressão positiva para TGF- β .

Aos 21 dias, os osteoblastos, ora colunares, ora cúbicos apresentaram-se em sua maioria marcados. O tecido de granulação, formado por fibras de maior espessura quando comparada ao período anterior, continuou exibindo intensa marcação do fator de crescimento.

No período de 45 dias apenas alguns osteoblastos apresentaram-se marcados, sendo que no tecido conjuntivo fibroso ainda observava-se expressão do anticorpo.

Nos três períodos de observação, a matriz óssea exibiu discreta marcação, enquanto que a medula hematopoiética apresentou marcação negativa, exceto os megacariócitos que serviram de controle positivo. Os osteoclastos apresentaram forte expressão do TGF- β (Figura 12).

FIG 12 -A -D) Imunoistoquímica, TGF- β . E -F) Fluorescência: A) expressão do TGF- β no tecido de granulação no centro do reparo ósseo. Grupo OVZ-E aos 7 dias. Aumento original 100x; B) ausência de marcação na medula hematopoiética. Grupo OVZ-E aos 7 dias. Aumento original 200x; C) expressão positiva do TGF- β nos osteoblastos colunares e osteoclastos. Grupo OVZ-E aos 7 dias. Aumento original 1000x; D) osteoblastos achatados no período de 45 com marcação para TGF- β . Grupo OVZ aos 45 dias. Aumento original 1000x; E) marcação fluorescente da tetraciclina aos sete dias. Grupo OVZ-E. Aumento original 400x; F) marcação fluorescente da tetraciclina aos 45 dias. Grupo OVZ-E.



5.6 Taxa de aposição mineral

Ao redor do alvéolo, observou-se a presença de duas linhas fluorescentes em algumas trabéculas. Mediu-se a distância entre as duas marcações de tetraciclina nos três períodos de observação (Figura 12). Os dados originais estão apresentados no Apêndice E. A estatística descritiva desses dados encontra-se na Tabela 18.

Tabela 18 - Estatística descritiva referente à taxa de aposição mineral diária dos grupos experimentais ($\mu\text{m}/\text{dia}$).

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	4,82	2,32	1,33
	DP	0,88	0,54	0,34
OVZ	Média	4,08	2,54	1,00
	DP	1,30	0,36	0,14
OVZ-E	Média	5,59	1,88	1,02
	DP	0,36	0,52	0,27
OVZ-I	Média	5,09	2,44	0,70
	DP	0,84	0,65	0,26
OVZ-A	Média	3,63	1,81	1,07
	DP	0,75	0,20	0,29

Observando a os dados da Tabela 8 nota-se que os valores de todos os grupos experimentais no período de sete dias foram superiores aos demais períodos de observação.

Observou-se por meio da Figura 13 que as médias de todos os grupos experimentais apresentaram comportamento semelhante e decresceram com o decorrer do tempo.

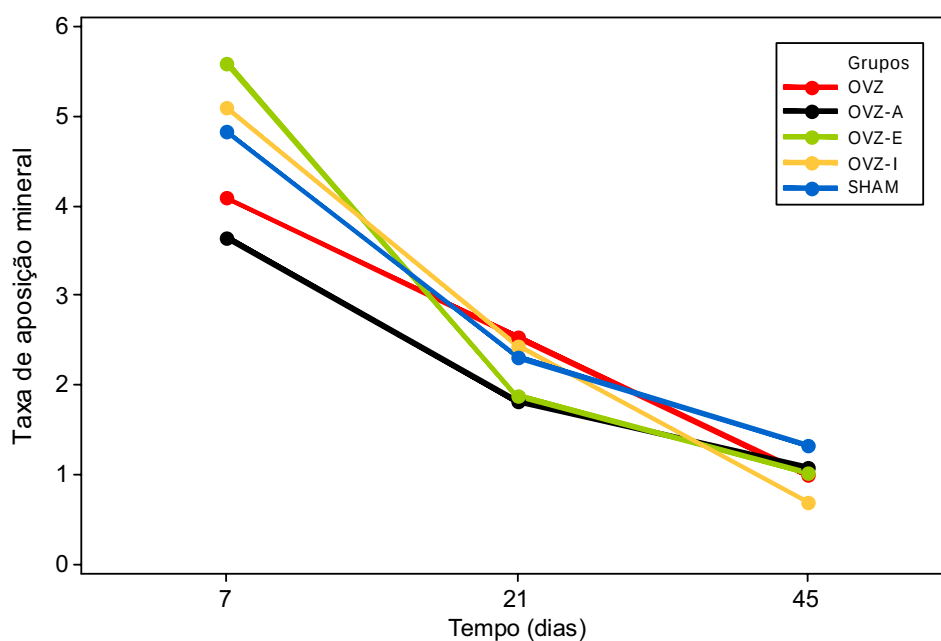


FIGURA 13 – Gráfico das médias da taxa de aposição mineral no tempo de sacrifício de sete, 21 e 45 dias.

Os dados dos grupos SHAM e OVZ, quando submetidos ao teste ANOVA, mostraram, como efeito significativo, o tempo de sacrifício ($p=0$).

Para comparação dos grupos ovariectomizados, os dados foram submetidos ao teste ANOVA, sendo observado que o efeito tratamento ($p=0,003$) e tempo de sacrifício ($p=0$) foram significativos e também a interação entre os mesmos ($p=0$).

O teste de comparação múltipla de Tukey efetuado em seguida indicou semelhança entre os grupos SHAM e OVZ no mesmo período de observação (Tabela 19).

Tabela 19 – Teste de Tukey para os dados referentes a taxa de aposição mineral diária nas seis condições experimentais

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
OVZ	7	4,08	A
OVZ	21	2,54	B
OVZ	45	1,00	D
SHAM	7	4,82	A
SHAM	21	2,32	BC
SHAM	45	1,33	CD

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

O teste de comparação múltipla de Tukey efetuado em seguida para os grupos ovariectomizados indicou que o grupo OVZ-E aos 07 dias apresentou maior taxa de aposição mineral diária diferindo dos grupos OVZ e OVZ-A. O grupo OVZ-I apresentou comportamento intermediário (Tabela 20).

Tabela 20 – Teste de Tukey para os dados referentes a taxa de deposição mineral dos grupos ovariectomizados

Tratamento	Tempo	Média	Grupos homogêneos
OVZ	7	4,08	BC
OVZ-E	7	5,59	A
OVZ-I	7	5,09	AB
OVZ-A	7	3,63	C
OVZ	21	2,54	D
OVZ-E	21	1,88	DE
OVZ-I	21	2,44	D
OVZ-A	21	1,81	DE
OVZ	45	1,00	EF
OVZ-E	45	1,02	EF
OVZ-I	45	0,70	F
OVZ-A	45	1,07	EF

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

5.7 Análise histológica do útero

O útero é formado pelo endométrio e pelo miométrio. O endométrio é a mucosa que reveste a cavidade uterina, sendo composto por epitélio e estroma subjacente. O miométrio representa uma camada muscular responsável pela contração uterina.

Os grupos OVZ-E e OVZ-A apresentaram aspectos morfológicos semelhantes aos do grupo SHAM, portanto, serão descritos em conjunto. Entretanto, diferenças evidentes foram observadas ao comparar-se tais grupos e os grupos OVZ e OVZ-I, também descritos em conjunto a seguir.

5.7.1 Grupos SHAM, OVZ-E e OVZ-A

O epitélio de revestimento apresentou-se como epitélio simples, ora colunar baixo, ora colunar alto e um caso do grupo SHAM com metaplasia escamosa. O epitélio colunar baixo era caracterizado pela presença de células poligonais, núcleos ovais ou arredondados e citoplasma eosinofílico, por vezes com polarização basal dos núcleos. O epitélio colunar alto exibia células de citoplasma claro, núcleos ovais, alguns lembrando epitélio pseudo-estratificado e outros em paliçada. Alguns animais apresentaram epitélio misto. Nesses grupos notou-se aspecto papífero do epitélio, apresentando diversas evaginações para o lúmen, característica evidente principalmente nos animais OVZ-E e OVZ-A. Na interface do epitélio com o tecido conjuntivo do estroma observaram-se numerosas células de citoplasma claro e núcleo arredondado.

O estroma subjacente, formado por tecido conjuntivo fibroso ricamente celularizado, apresentava fibroblastos com núcleos ovalados, numerosos vasos sanguíneos e de permeio intensa infiltração

inflamatória eosinofílica. Foram observadas glândulas endometriais do tipo tubular simples compostas por células mucosas. Adjacente ao estroma observou-se a camada muscular lisa do miométrio (Figura 14).

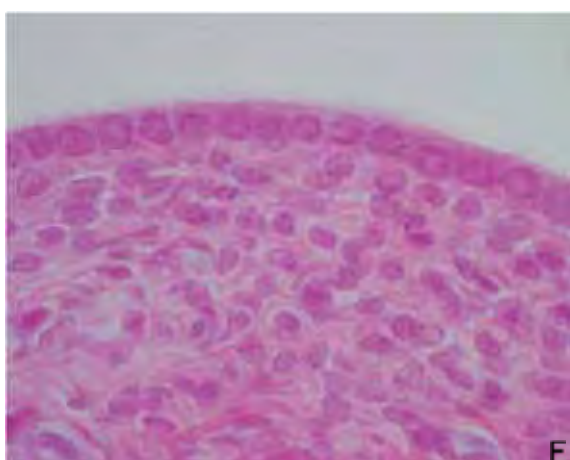
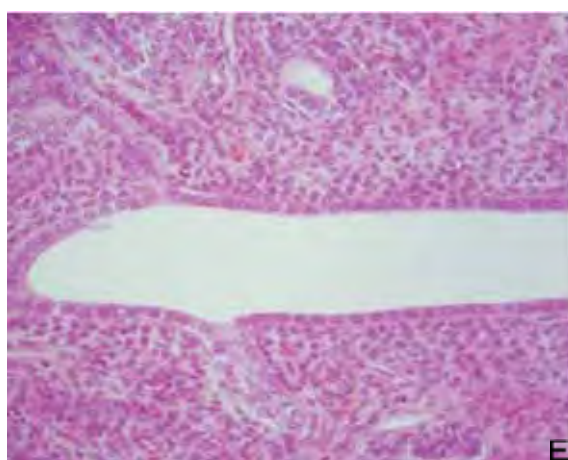
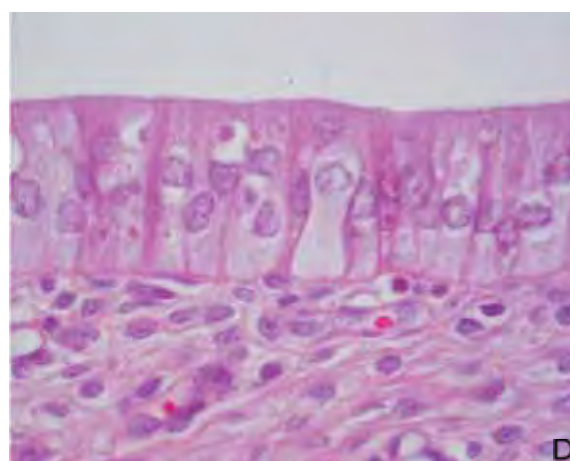
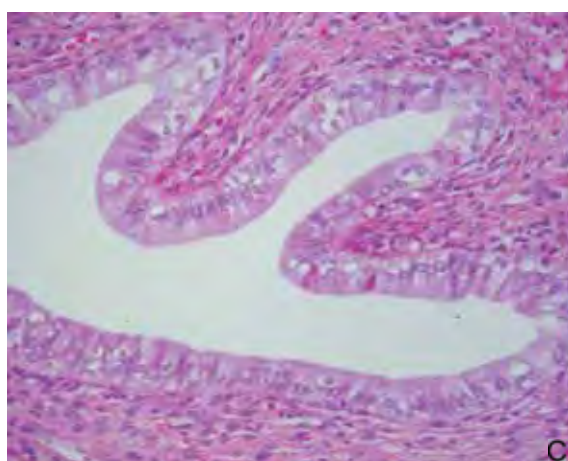
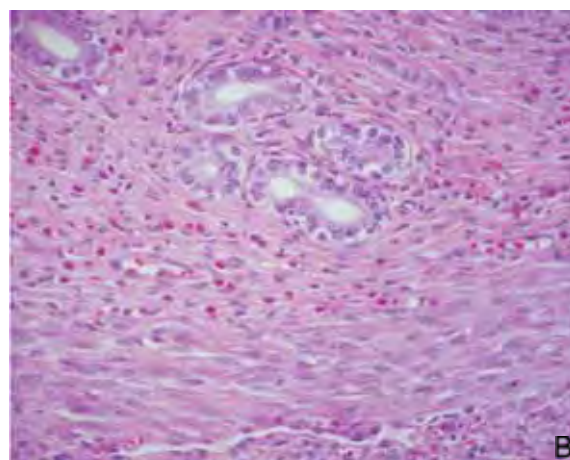
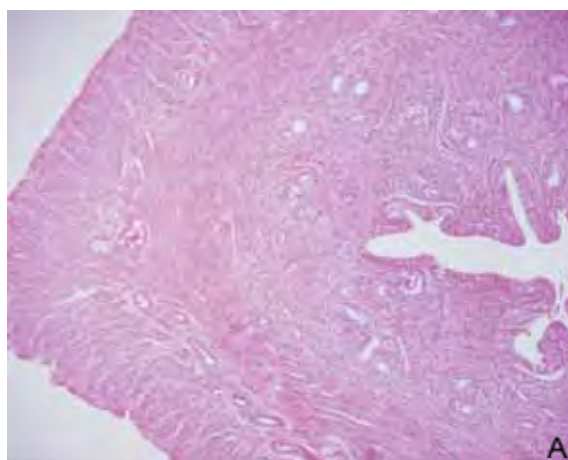
5.7.2 Grupos OVZ e OVZ-I

O epitélio de revestimento apresentou-se predominantemente como epitélio cúbico simples, com células poligonais de núcleos arredondados, por vezes em paliçada.

O estroma subjacente exibiu menor espessura do que o grupo SHAM, sendo formado por tecido conjuntivo fibroso ricamente celularizado. Alguns animais desses grupos apresentavam fibroblastos, com núcleos achatados. Foram observadas glândulas endometriais do tipo tubular simples compostas por células mucosas. Adjacente ao estroma observou-se a camada muscular lisa do miométrio (Figura 14).

A interface do epitélio com o tecido conjuntivo apresentou-se plana, não sendo observado o aspecto papilífero descrito nos demais grupos. Também notaram-se raras células de citoplasma claro na região de interface (Figura 14).

FIGURA 14 – Análise histológica do útero: A) aspecto panorâmico do miométrio e endométrio. Grupo SHAM aos sete dias. Aumento original 100x; B) infiltração eosinofílica no estroma do endométrio. Grupo SHAM aos sete dias. Aumento original 400x; C) aspecto papilífero do epitélio uterino. Grupo SHAM aos sete dias. Aumento original 400x; D) células epiteliais colunares em detalhe. Grupo SHAM aos sete dias. Aumento original 1000x; E) interface plana entre o epitélio e o estroma. Grupo OVZ aos 45 dias. Aumento original 400x; F) células epiteliais cúbicas em detalhe. Grupo OVZ aos 45 dias. Aumento original 1000x. HE.



6 DISCUSSÃO

A rata ovariectomizada é um modelo útil devido ao fato de apresentar características de perda óssea similares às ocorridas na osteoporose em mulheres pós-menopausa. As ratas aos três meses de idade, período no qual estão em fase de reprodução, respondem apropriadamente à deficiência de hormônios sexuais, adquirida como seqüela da ovariectomia⁴⁷. Nesse modelo experimental, além da perda óssea, ocorrem aumento do nível plasmático e urinário de marcadores da remodelação óssea, decréscimo da absorção de cálcio e efeito protetor da obesidade sobre a perda óssea decorrente da deficiência estrogênica¹⁰².

O aumento de massa corpórea está relacionado ao aumento da densidade óssea podendo reduzir o risco de fraturas osteoporóticas¹³. Com intuito de evitar tal efeito protetor nos animais deste estudo, realizou-se um controle da quantidade de ração ingerida. Ao analisar-se os dados referentes ao ganho de peso verificou-se que não houve diferença significativa entre os animais SHAM e OVZ no mesmo período. Na literatura, muitos autores realizam controle da dieta das ratas ovariectomizadas vinculado à quantidade de ração ingerida pelos animais Sham-operados. Deyhim et al.²⁷ utilizou essa metodologia, porém, verificou aumento no peso dos animais, que consideraram ser decorrente de um decréscimo no metabolismo das ratas ovariectomizadas e não decorrente de um aumento na ingestão do alimento. Nesse estudo observou-se que os animais OVZ apresentaram maiores médias de ganho de peso que as do grupo SHAM, embora não diferentes estatisticamente em cada período, o que poderia ser reflexo do decréscimo no metabolismo sugerido por Deyhim²⁷.

Entretanto, Fanti et al.³², ao registrarem o consumo diário de ração das ratas do estudo, observaram que houve aumento na ingestão do alimento e conseqüente ganho de peso nas ratas ovariectomizadas.

Em relação à influência da deficiência estrogênica na reparação óssea, a maioria dos autores sugere uma redução na capacidade de reparação do tecido^{14,17,46,59,70}. Na literatura existem alguns trabalhos que investigam o reparo ósseo alveolar pós ovariectomia^{41,49,81,82,89,93,107}. Nesses estudos, a exodontia foi realizada em diferentes períodos após a ovariectomia. No presente trabalho objetivou-se avaliar os efeitos iniciais da ovariectomia no reparo ósseo alveolar, sendo a exodontia realizada 15 dias após a ovariectomia. Esse período foi escolhido porque Wronski et al.¹⁰¹ observaram osteopenia e aumento do índice de reabsorção óssea aos 14 dias após a cirurgia, que se tornou gradualmente mais pronunciada até se estabilizar por volta dos cem dias. Estes achados estão de acordo ainda com Lane et al.⁵⁴, que verificaram os efeitos da ovariectomia cinco e oito dias após a cirurgia.

Analisando-se o efeito inicial da deficiência estrogênica sobre o volume trabecular não se observou diferenças significativas entre as ratas OVZ e SHAM do mesmo período. Tanaka et al.⁸⁹ ao estudar a reparação óssea alveolar, realizou a exodontia sete dias após a ovariectomia, e também não observou diferenças entre os animais ovariectomizados e Sham-operados com relação à formação óssea no interior do alvéolo. Teófilo et al.⁹³, realizou a exodontia do incisivo superior 15 dias após a remoção do ovários e observou atraso no reparo ósseo dos animais ovariectomizados, com menor volume ósseo em todos os tempos de observação e a presença de coágulo remanescente até no período mais tardio, além de profusão de osteoclastos na superfície do osso trabecular neoformado. Tal discordância entre esses trabalhos pode ser justificada por uma diferença na metodologia. No trabalho de Teófilo et al.⁹³, as ratas ovariectomizadas foram alimentadas com ração com baixo

teor de cálcio. Os autores basearam-se em investigações prévias⁹², nas quais verificaram que a associação entre a ovariectomia e a dieta com baixo teor de cálcio promoveu perda óssea no osso da maxila, perda óssea não observada no grupo ovariectomizado que recebeu a ração padrão. Os autores sugeriram que a ingestão normal de cálcio diminui a sensibilidade do osso aos efeitos da ovariectomia. Hara et al.³⁶ estudaram tíbias, mandíbulas e maxilas por meio de análise histomorfométrica. Os autores verificaram que os efeitos da deficiência em cálcio são mais acentuados quando comparados com os da deficiência estrogênica. A dinâmica óssea foi alterada pela ovariectomia na mandíbula e na tíbia, pela deficiência em cálcio independentemente da ovariectomia na tíbia, mandíbula e maxila.

Por conseguinte, supõe-se que não só o processo de remodelação, mas também o processo de reparação são influenciados pela redução da absorção de cálcio. Estudos que confirmem essa relação estão sendo desenvolvidos paralelamente a essa pesquisa por nosso grupo de estudo.

Zecchin et al.¹⁰⁷ e Shimizu et al.⁸¹ também observaram diferenças entre os grupos OVZ e SHAM. Zecchin et al.¹⁰⁷ avaliaram os efeitos da ausência de estrógeno na expressão de metaloproteinases (MMP) 2 e 9 e na expressão do colágeno I e III no tecido de granulação de ratas após exodontia, realizada 21 dias após a ovariectomia. As ratas ovariectomizadas apresentaram decréscimo da atividade e expressão de ambas MMPs e também do colágeno I e III. Os autores sugeriram que a ausência de estrógeno, possivelmente, contribui para o atraso na reparação alveolar, interferindo na matriz extracelular.

Shimizu et al.⁸¹ estudaram o reparo ósseo em alvéolos de dentes extraídos 60 dias após a cirurgia de ovariectomia em ratas. Avaliaram a quantidade óssea na região vestibular do alvéolo dental e do tecido no interior do alvéolo. Na análise do osso do interior do alvéolo, sete dias após a extração, os grupos SHAM e OVZ foram semelhantes na

neoformação óssea, contudo, 30 e 60 dias após, havia mais osso no alvéolo dos animais SHAM. Segundo os autores, a neoformação óssea foi diminuída pela deficiência estrogênica.

Tais autores encontraram resultados diferentes daqueles encontrados na análise histomorfométrica desse trabalho, provavelmente pelo maior tempo que aguardaram após a ovariectomia. Portanto, sugere-se que os efeitos iniciais da ovariectomia não alterem o reparo ósseo alveolar, podendo ser evidenciados em associação a dieta com baixo teor de cálcio, sendo necessários novos estudos para confirmar tal relação.

Contudo, na análise histológica do grupo OVZ aos 45 dias, observou-se osso neoformado de aspecto menos compacto quando comparado ao grupo SHAM com espaços medulares maiores, características também observadas por meio do BSE. Embora tal característica não tenha sido detectada na análise histomorfométrica, está de acordo com Shimizu et al.⁸¹ que também observou diferenças entre esses grupos nos períodos de 30 e 60 dias de reparo.

A análise histomorfométrica foi realizada no aumento de 400x com intuito de facilitar a visualização do osteóide e permitir a avaliação da qualidade das trabéculas ósseas neoformadas. Pode ser que devido ao aumento escolhido não tenha sido possível quantificar o parâmetro que pela análise histológica e pelo BSE, foi o mais alterado: a microarquitetura óssea aos 45 dias.

Na análise dos resultados da segunda abordagem, na qual comparamos os dados de volume trabecular entre os grupos ovariectomizados, não se verificou diferenças significativas nos animais tratados com isoflavona e tratados com estrógeno do grupo OVZ. Portanto, sugere-se que o tratamento utilizado não influenciou o aumento do volume trabecular, seja na fase inicial, formadora, ou em uma fase posterior, de remodelação do reparo.

Em trabalho anterior⁸³, entretanto, ao analisar a reparação de defeitos ósseos de tíbias, verificou-se que no período de 21 dias os

valores de neoformação óssea do grupo tratado com estrógeno superaram os do grupo SHAM, sendo, portanto, capaz de diminuir a remodelação óssea em uma fase mais tardia⁸³. Na literatura, há relatos de que a ligação desse hormônio ou de seus análogos aos receptores dos osteoblastos, inibe a liberação de fatores estimuladores dos osteoclastos ou aumenta a atividade dos fatores inibidores dos mesmos⁸⁵. De acordo com Turner et al.⁹⁵ o fator mais influenciado pelo estrógeno é o TGF- β , que também é produzido pelos osteoblastos e atua sobre os osteoclastos diminuindo seu recrutamento e sua atividade reabsortiva. Hughes et al.⁴² verificaram que o 17 β -estradiol promoveu apoptose em osteoclastos de ratos *in vitro* e *in vivo*. Steeve et al.⁸⁴ verificaram que os estrógenos aumentam a produção de OPG, diminuindo conseqüentemente a diferenciação e ativação dos osteoclastos, bem como induzindo a apoptose destas células.

Nossos resultados, portanto, discordam da literatura, provavelmente por analisarmos a reparação óssea alveolar, que apresenta características peculiares, diferindo da reparação em ossos longos. Para realizarmos quaisquer inferências sobre o efeito do tratamento com estrógenos na reparação óssea alveolar, novos estudos devem ser realizados. Não foram encontrados na literatura até o presente momento, estudos que avaliem essa relação.

Quanto ao tratamento com as isoflavonas da soja, também não foi verificado efeito desse tratamento sobre o volume trabecular em nenhum dos períodos de observação.

Não há na literatura trabalhos que avaliam o efeito do tratamento com a isoflavona na reparação óssea. Na pesquisa anterior, também não se verificou influência no tratamento das isoflavonas da soja na reparação óssea em tíbias de ratas, tanto na fase de formação quanto na fase de remodelação do processo de reparo. Em virtude da dose ideal de isoflavona não estar estabelecida, sugerimos dose maior do que a utilizada (5mg/Kg/dia). Conseqüentemente, no presente trabalho

administramos 15mg/Kg/dia de isoflavonas na tentativa de encontrarmos o efeito biológico desejado, o que não aconteceu. Os resultados indicam que as isoflavonas da soja, isoladamente, possam não apresentar efeito na reparação óssea.

O grupo OVZ-A apresentou maior volume trabecular, embora semelhante estatisticamente do grupo OVZ, no período de 21 e, de maneira mais evidente aos 45 dias. Tais resultados foram encontrados em trabalho anterior que mostrou, por meio da análise da densidade radiográfica, que no período de 21 dias, o grupo que recebeu essa associação apresentou resultados mais favoráveis do que os animais que receberam isoflavonas isoladamente. Na análise histomorfométrica verificou-se que tanto o grupo que foi tratado com estrógeno quanto o que recebeu a associação deste com as isoflavonas, mostraram melhora na reparação óssea⁸³.

Entretanto, os resultados dessa pesquisa são contraditórios aos do trabalho anterior, pois aos sete dias não foi verificado nenhum efeito na reparação óssea, enquanto que anteriormente notou-se que o tratamento com a associação de estrógeno e isoflavonas foi eficaz na reparação de defeitos ósseos em tíbias, por causar aumento da densidade radiográfica e da porcentagem de trabéculas ósseas, quando comparado aos demais grupos de animais ovariectomizados, nesse período⁸³.

Ao analisar-se o volume osteóide, verificou-se diferença significativa entre os grupos SHAM e OVZ aos sete dias. Entretanto, como já foi dito não houve diferença do volume trabecular entre esses grupos. Como o volume trabecular é a somatória do volume de osso trabecular mineralizado e não mineralizado, conclui-se que houve maior quantidade de tecido mineralizado nesse período no grupo OVZ.

Na remodelação, após a deposição da matriz óssea pelos osteoblastos ocorrem ligações cruzadas de suas fibras colágenas e outras alterações que preparam a matriz para a mineralização. Devido à

necessidade dessas alterações, conhecidas como maturação, há uma separação espacial e temporal entre a aposição da matriz e aposição mineral, que se manifesta como tecido osteóide. Dessa forma, o processo de mineralização não é contínuo, havendo intervalo entre a formação da matriz e a subsequente mineralização desta⁷⁴. No grupo OVZ observou-se menor volume osteóide, sugerindo uma fase de maturação mais curta. Sendo assim, acredita-se que o maior volume de tecido mineralizado no grupo OVZ seja devido à redução do intervalo de maturação.

Observando o efeito do tratamento verificou-se diferença significativa entre os grupos OVZ e OVZ-E, sendo que o último apresentou maior volume osteóide, superando os resultados do grupo SHAM. Acredita-se, portanto que os tratamentos promoveram aumento do intervalo de maturação.

Em trabalho anterior não foi verificada influência do estrógeno no período de sete dias da reparação de ossos longos. Entretanto, a dose administrada do mesmo medicamento foi três vezes menor quando comparada a esse estudo⁸³.

Segundo Willians e Stangel¹⁰⁰ para algumas respostas mais complexas, como o crescimento ósseo, as propriedades farmacocinéticas dos estrógenos exigem que determinado número de receptores celulares seja ocupado e por um período prolongado de tempo, não sendo suficiente a ocupação do receptor por um período curto e transitório. Dessa forma, podemos refletir se a falta de resposta na formação óssea observada no trabalho anterior⁸³ teria sido causada por uma subdose. Entretanto, esperava-se verificar também efeito desse tratamento no volume trabecular no período de 45 dias, o que não foi observado.

Não foi observado nenhum efeito do tratamento com as isoflavonas da soja administradas isoladamente nos três tempos de sacrifício. Embora, existam diversos artigos que relatem efeitos positivos

desses compostos no tecido ósseo^{5, 6, 72, 75, 77}, alguns autores encontraram nenhum efeito^{6, 27, 76} ou até mesmo efeitos negativos nesse tecido⁵⁵.

Arjmandi et al.⁶ e Picherit et al.⁷⁶ administraram isoflavonas na dieta com o objetivo de analisar o efeito desses compostos na reversão de osteopenia já estabilizada e não encontraram nenhum efeito significativo. Deyhim et al.²⁷ não observaram efeitos positivos das isoflavonas na DMO de ratas ovariectomizadas. Lees e Ginn⁵⁵ concluíram, a partir de estudo em um modelo animal com macacas ovariectomizadas, que a isoflavona isolada não apresentou efeitos positivos no osso, ao contrário, aumentou a remodelação óssea quando comparada ao grupo controle.

Anderson et al.³ acrescentaram preparações de genisteína na dieta de ratas lactantes ovariectomizadas e observaram efeito bifásico: doses pequenas (0,5mg/dia) apresentaram efeitos estrógeno-agonistas e doses elevadas (5mg/dia) foram menos eficazes podendo mostrar efeitos adversos no osso.

O tratamento com a associação das isoflavonas e do estrógeno apresentou efeitos significativos no volume osteóide aos sete dias, ultrapassando os resultados do grupo SHAM. Não é possível afirmar se os efeitos observados na formação óssea foram causados apenas pela ação do estrógeno, ou se as isoflavonas também possuem influência nessa fase quando em associação.

Diversos estudos^{39, 75, 98} sugerem que a soja ou seus componentes aumentem a taxa de formação óssea e simultaneamente, exerça um efeito inibidor na reabsorção óssea. Em ratas ovariectomizadas, as isoflavonas têm mostrado reduzir a excreção de deoxipiridinolina⁷⁶.

Porém outros autores^{5, 32, 37} sugerem que os efeitos benéficos da proteína da soja resultam mais do estímulo à formação óssea do que da supressão da reabsorção óssea, já que não foi

observado decréscimo nos níveis de marcadores ósseos de reabsorção nesses estudos.

Aos 21 dias todos os grupos apresentaram volume osteóide semelhante que diminui com o decorrer do tempo. Aos 45 dias, o tecido ósseo neoformado encontrava-se em fase de remodelação, sendo esperado, portanto, menor volume osteóide.

A proximidade dos mastócitos com as superfícies em remodelação e a produção por essa célula de mediadores químicos que podem induzir reabsorção óssea^{12, 29, 67} indica um possível papel dessa célula na patogênese da osteoporose.

Após a quantificação do número de mastócitos neste trabalho, observou-se que o grupo OVZ aos 45 dias apresentou maior número de mastócitos do que o grupo SHAM, embora não significativo estatisticamente. Além disso, apresentou comportamento diferente, mostrando uma tendência de aumentar o número destas células, enquanto o oposto foi verificado no grupo SHAM. Pode-se aludir que os mastócitos tenham também um papel na fase de remodelação do reparo ósseo. Nesse sentido, pode-se sugerir que o tratamento com as isoflavonas isoladas e associadas ao estrógeno possa ter algum efeito sobre essas células, já que os animais tratados apresentaram médias com comportamento similar ao grupo SHAM. O grupo OVZ-E embora tenha apresentado comportamento diferente do grupo SHAM, apresentou o menor número de mastócitos no período de 45 dias.

Banovac et al.⁹ estudaram a reparação de fraturas em fêmures e observaram que os mastócitos e suas enzimas desempenham papel na formação da matriz extracelular do calo ósseo. Segundo os autores no período inicial do reparo, tais células podem estar envolvidas na formação do tecido conjuntivo frouxo. Nos estágios avançados, podem atuar, em conjunto com outras células, na substituição do tecido conjuntivo pela matriz óssea. No presente estudo os mastócitos foram observados de maneira evidente, apenas aos 45 dias. Entretanto, durante

a reparação óssea alveolar não ocorre a formação de calo ósseo, podendo estas células estarem envolvidas em outros eventos do processo de reparo.

O TGF- β foi encontrado em diversas células do tecido ósseo, tais como: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, bem como em fibroblastos. Sua expressão foi semelhante em todos os grupos, não permitindo nenhuma correlação entre tal fator de crescimento com a ovariectomia ou com o tratamento. Contudo, correlacionou-se a expressão do TGF- β com a evolução do processo de reparação, pois nos períodos iniciais sua marcação era intensa e na maioria das células, enquanto aos 45 dias, além dos osteoclastos e das fibras colágenas, apenas poucos osteoblastos apresentavam-se marcados.

O TGF é uma família de polipeptídeos, sendo um dos fatores de crescimento mais prevalentes na matriz óssea⁶⁷. Desempenha importante papel na regulação de muitos processos biológicos fundamentais, como crescimento celular, diferenciação, reparo tecidual e apoptose²⁰. No tecido ósseo, o TGF- β aumenta a formação óssea, principalmente na ossificação intramembranosa. Afeta proliferação e diferenciação de células ósseas⁸⁰.

No reparo ósseo foi demonstrada a presença de TGF- β nos osteoblastos e fibroblastos na formação do calo ósseo na distração osteogênica³¹. Chen et al.¹⁸ sugeriram que o TGF- β possa desempenhar importante papel como quimiotático e mitogênico no recrutamento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas na reparação de defeitos ósseos em ratos.

Analisando os resultados da taxa de aposição mineral ao redor do alvéolo não se observou diferença significativa entre os grupos SHAM e OVZ em nenhum dos tempos de sacrifício. Alguns autores encontraram resultados diferentes, nos quais constataram que a deficiência estrogênica aumentou a reabsorção causada pelo trauma^{41, 82}.

Shimizu et al.⁸² estudaram o tecido ósseo ao redor de alvéolos de dentes extraídos 60 dias após a cirurgia de ovariectomia em ratas. Verificaram que a ovariectomia estimulou neoformação óssea no período inicial de 4 dias e reabsorção ao longo dos períodos de observação de 7, 30 e 60 dias, em comparação com o grupo Sham. Observaram também que a reabsorção e formação óssea ocorreram em locais específicos da superfície óssea alveolar. Hsieh et al.⁴¹, ao analisar o efeito da ovariectomia ao redor de alvéolos dentários em ratas, também verificaram que a deficiência estrogênica pode afetar a remodelação óssea pós-exodontia. Por analogia, os autores consideram que a reabsorção da crista óssea residual pode ser maior em mulheres que sofrem extração após a menopausa.

Embora a ovariectomia não tenha produzido efeito significativo, os aspectos morfológicos do tecido indicaram que houve intensa remodelação pós-exodontia do osso alveolar, desencadeada pelo trauma, que se estabilizou com o decorrer do tempo.

Considerando o tratamento, foi observado que o grupo OVZ-E apresentou maior taxa de aposição mineral aos sete dias, diferindo do grupo OVZ. Nos demais períodos nenhuma diferença significativa foi encontrada.

O determinante biológico da mineralização é a atividade remodeladora. O osteóide depositado é mineralizado após um intervalo de tempo. Essa mineralização inicial consiste na aposição mineral primária. Após o completo preenchimento da unidade básica estrutural uma segunda fase de mineralização se inicia, a aposição mineral secundária. No adulto a taxa de mineralização depende da remodelação óssea. Quando há aumento no ritmo de remodelação óssea, há uma diminuição do tempo para a mineralização, pois, os osteoclastos iniciam em seguida uma nova seqüência de reabsorção. Portanto, quanto maior freqüência de ativação da remodelação óssea, menor o grau de mineralização do tecido ósseo⁶².

O tratamento com estrógenos apresentou efeitos positivos no osso alveolar aumentando a taxa de aposição mineral. Baseado no exposto pode-se dizer que o grupo tratado com estrógenos apresentou redução da taxa de remodelação aumentada pelo trauma da exodontia.

No presente estudo verificou-se, durante o sacrifício, que a deficiência estrogênica ocasionou uma evidente diminuição do volume do útero, resultado confirmado pela análise histológica. Observou-se que nos animais tratados esse volume era maior. Por meio da análise histológica notou-se que o tratamento com estrógenos e associação promoveu alterações morfológicas tornando esses grupos semelhantes ao grupo SHAM. O tratamento com isoflavonas não provocou efeitos uterinos evidentes.

Ao exame microscópico notou-se que numerosos eosinófilos distribuíam-se difusamente pelo endométrio de todos os animais do grupo SHAM. Tais células desempenham importante papel na preparação do endométrio para implantação do óvulo na fase estro do ciclo estral de ratas e outros mamíferos⁵¹. Esse achado indica que todas as ratas encontravam-se nessa fase do ciclo.

Mosquete et al.⁶⁵ avaliaram o efeito das isoflavonas da soja no miométrio de ratas e observaram grande número de eosinófilos, em especial nas áreas mais próximas ao miométrio, em ratas que receberam grande concentração do extrato de soja. Segundo os autores a eosinofilia induzida pelo estrógeno é difícil de ser explicada, porém, os estrógenos, ao que parece, teriam forte efeito de dilatação nos vasos uterinos, acelerando o crescimento do miométrio e do endométrio, o que faz supor que a sua presença no útero se correlaciona com o crescimento e remodelação deste órgão.

Observou-se que o tratamento com estrógenos alterou o epitélio uterino quando comparado ao grupo OVZ. Na literatura encontram-se relatos de efeitos adversos no útero e mama, órgãos-alvo desses hormônios¹⁰³.

O grupo OVZ-A também exibiu os mesmos efeitos do grupo estrógeno. Não se sabe se essas alterações foram provocadas apenas pelo estrógeno ou pela sua associação com as isoflavonas. As isoflavonas administradas isoladamente não produziram os mesmo efeitos que os grupos OVZ-A e OVZ-E.

Alguns autores concordam com nossos resultados, uma vez que também não verificaram efeitos uterotróficos do tratamento com as isoflavonas da soja^{28, 43}. Diel et al.²⁸ observaram que a administração de genisteína resulta em menor indução da proliferação quando comparada ao estrógeno.

Ishimi et al.⁴³ observaram que a administração de genisteína a 0,7mg/dia preveniu perda óssea trabecular, porém não provocou nenhum efeito hipertrófico no útero, enquanto a administração de genisteína a 5mg induziu hipertrofia uterina. Os autores sugeriram que existe diferença entre as doses de genisteína que protegem o esqueleto da perda óssea e que induzem hipertrofia uterina.

Eason et al.³⁰ acreditam que os componentes da soja não alteraram o fenótipo da célula epitelial uterina em ratas jovens. A genisteína aumentou a apoptose das glândulas endometriais in vivo e in vitro, sugerindo papel protetor contra o carcinoma de útero.

Tansey et al.⁹¹ não encontraram efeito estrogênico, nas doses de fitoestrógenos usadas, na análise imunoistoquímica do PCNA, lactoferrina e apoptose no epitélio luminal uterino. Entretanto, os autores afirmaram não haver evidência mostrando que a interação entre o estrógeno e o fitoestrógeno possui efeito sinérgico. Ao contrário, a altura do epitélio luminal uterino apresentou resposta à baixa dose de estrógenos, sendo reduzida pelas doses elevadas de isoflavonas. A lactoferrina induzida pelo estrógeno foi reduzida na presença de doses elevadas de fitoestrógenos. Os autores sugerem que os efeitos produzidos pelo estrógeno podem ser antagonizados por altas doses do fitoterápico, o que pode ser benéfico para reduzir a estimulação do

endométrio pelo estrógeno, diminuindo o risco de hiperplasia ou câncer endometrial. Não se encontrou, no presente estudo efeitos antagônicos das isoflavonas, na análise histológica.

De acordo com Mosquete et al.⁶⁵ o extrato de soja em altas concentrações pode estimular o crescimento do miométrio de ratas adultas castradas, à semelhança do estrógeno, porém, em menor intensidade. Os autores acreditam que, se extrapolado para a espécie humana, o ginecologista deverá ser cauteloso quanto à dose de isoflavona ministrada, bem como também com a duração da terapia.

McCarty⁶¹ sugere que a genisteína em doses elevadas, consideradas farmacológicas pode promover uma atividade uterotrófica. Novos estudos são necessários para definir os possíveis efeitos uterotróficos das isoflavonas da soja.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados, sob as condições experimentais utilizadas, possibilitou concluir que:

- a) o efeito inicial da ovariectomia não provocou alterações evidentes na fase formadora do reparo ósseo alveolar;
- b) na fase de remodelação do reparo a microarquitetura óssea foi alterada pela deficiência estrogênica;
- c) o tratamento com estrógenos, isolados e associados às isoflavonas promoveu efeito na fase formadora do reparo influenciando o volume osteóide ;
- d) o tratamento com as isoflavonas da soja, na dose utilizada, não influenciou o processo de reparação;
- e) os estrógenos influenciaram a taxa de aposição mineral do osso alveolar após trauma provocado por exodontia;
- f) a expressão imunoistoquímica do TGF- β não foi alterada pela ovariectomia ou tratamento, sendo correlacionada com a evolução do processo de reparação;
- g) o tratamento com estrógenos, isolados e associados às isoflavonas reverteu os efeitos da ovariectomia no epitélio luminal uterino;
- h) as isoflavonas da soja, na dose utilizada, não apresentaram efeitos uterotróficos.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2000 Sept.; 72(3): 679-80.
- 2 Alves DL, Silva RC. Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2002. 105p.
- 3 Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998 Mar.; 217(3): 345-50.
- 4 Arjmandi BH. The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency. *J Am Coll Nutr.* 2001 Oct.; 20(5): 398-402.
- 5 Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr.* 1996 Jan.; 126(1): 161-7.

*Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 6 Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hasler CM, Juma S et al. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *Am J Clin Nutr.* 1998 Dec.; 68(6): 1358-63.
- 7 Arjmandi BH, Khalil DA, Hollis BW. Soy protein: its effects on intestinal calcium transport, serum vitamin D, and insulin-like growth factor-I in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 2002 June; 70(6): 483-7.
- 8 Arjmandi BH, Smith B. Soy isoflavones' osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action. *J Nutr Biochem.* 2002 Mar.; 13(3): 130-137.
- 9 Banovac K, Renfree K, Makowski AL, Latta LL, Altman RD. Fracture healing and mast cells. *J Orthop Trauma.* 1995; 9(6): 482-90.
- 10 Blythe JG, Buchsbaum HJ. Fracture healing in estrogen-treated and castrated rats. *Obstet Gynecol.* 1976 Sept.; 48(3): 351-2.
- 11 Borelli A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: Carvalho Filho ET, Papaléo Netto M. *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica.* São Paulo: Atheneu; 1998.p. 297-308.
- 12 Brumsen C, Papapoulos SE, Lentjes EG, Kluin PM, Hamdy NA. A potential role for the mast cell in the pathogenesis of idiopathic osteoporosis in men. *Bone.* 2002 Nov.; 31(5): 556-61.

- 13 Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology*. 2001 Aug.; 142(8): 3546-53.
- 14 Burr DB, Forwood MR, Fyhrie DP, Martin RB, Schaffler MB, Turner CH. Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J Bone Miner Res*. 1997 Jan.; 12(1): 6-15.
- 15 Cai DJ, Zhao Y, Glasier J, Cullen D, Barnes S, Turner CH et al. Comparative effect of soy protein, soy isoflavones, and 17 β -estradiol on bone metabolism in adult ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2005 May; 20(5): 828-39.
- 16 Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the process of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2002 Dec.; 17(12): 2237-46.
- 17 Cesnjaj M, Stavljenic A, Vukicevic S. Decrease osteoinductive potential of bone matrix from ovariectomized rats. *Acta Orthop Scand*. 1991 Oct.; 62(5): 471-5.
- 18 Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, Kuo YR, Yang KD, Huang HC, et al. Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res*. 2004 May; 22(3): 526-34.

- 19 Chen XW, Garner SC, Anderson JJB. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 July; 295(2): 417-22.
- 20 Cheng J, Grande JP. Transforming growth factor-beta signal transduction and progressive renal disease. *Exp Biol Med* (Maywood). 2002 Dec.; 227(11): 943-56.
- 21 Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry*. 2001 Apr.; 56(7): 733-9.
- 22 Clarkson TB, Anthony MS, Williams JK, Honore EK, Cline JM. The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998 Mar.; 217(3): 365-8.
- 23 Committee on toxicity of chemicals in food, consumer products and the environment. *Phytoestrogens and Healthy*. London; 2003.
- 24 Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev*. 2001 Jan.; 81(1): 419-447.
- 25 Coxam V. Prevention of osteopaenia by phyto-oestrogens: animal studies. *Br J Nutr*. 2003 June; 89(1): 75-85.
- 26 Devlin H, Hoyland J, Newall JF, Ayad S. Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. *Bone Miner Res*. 1997 Dec.; 12(12): 2061-7.

- 27 Deyhim F.; Stoecker BJ; Brusewitz GH; Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutrit Res.* 2003 Jan.; 23(1): 123-30.
- 28 Diel P, Geis RB, Caldarelli A, Schmidt S, Leschowsky UL, Voss A et al. The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 June; 221(1): 21-32.
- 29 Dobigny C, Saffar JL. H1 and H2 histamine receptors modulate osteoclastic resorption by different pathways: evidence obtained by using receptor antagonists in a rat synchronized resorption model. *J Cell Physiol.* 1997 Oct.; 173(1): 10-8.
- 30 Eason RR, Till SR, Velarde MC, Geng Y, Chatman L Jr, Gu L et al. Uterine phenotype of young adult rats exposed to dietary soy or genistein during development. *J Nutr Biochem.* 2005 Oct.; 16(10): 625-32.
- 31 Eingartner C, Coerper S, Fritz J, Gaissmaier C, Koveker G, Weise K. Growth factors in distraction osteogenesis. Immuno-histological pattern of TGF- β 1 and IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis. *Int Orthop.* 1999; 23(5): 253-9.
- 32 Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D et al. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 1998; 8(3): 274-81.

- 33 Finkelman RD, Bell NH, Strong DD, Demers LM, Baylink DJ. Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor β in rat bone: Implications for estrogen deficiency-associated bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec.; 89(24): 12190-3.

- 34 Gallo D, Zannoni GF, Apollonio P, Martinelli E, Ferlini C, Passetti G et al. Characterization of the pharmacological profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: effects on bone, uterus, and lipid profile. *Menopause* 2005; 12(15): 589-600.

- 35 Glazier MG, Bowman MA. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Arch Intern Med*. 2001 May; 161(9): 1161-72.

- 36 Hara T, Sato T, Oka M, Mori S, Shirai H. Effects of ovariectomy and/or dietary calcium deficiency on bone dynamics in the rat hard palate, mandible and proximal tibia. *Arch Oral Biol*. 2001 May; 46(5): 443-51.

- 37 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 (Tokyo)*. 1998 Apr.; 44(2): 257-68.

- 38 Hollinger J, Wong MEK. The integrated processes of hard tissue regeneration with especial emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1996 Dec.; 82(6): 594-606.

- 39 Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H, Orimo H. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal japanese women. *Osteoporos Int.* 2000; 11(8): 721-4.
- 40 Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science.* 1993 Apr.; 260(5108): 626-7.
- 41 Hsieh YD, Devlin H, Mccord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol.* 1995 June; 40(6): 529-31.
- 42 Hughes DE, Dai A, Tiffie JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med.* 1996 Oct.; 2(10): 1132-6.
- 43 Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C et al. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Aug.; 274(3): 697-701.
- 44 Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab,* 2003; 21(6): 388-95.
- 45 Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat. A histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand.* 1970 Aug.; 28(4): 441-61.

- 46 Junqueira JC, Mancini MN, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. *J Oral Sci.* 2002 Dec.; 44(4): 117-24.
- 47 Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991 Dec.; 15(3): 175-91.
- 48 Kawamoto S, Nagaoka E. The effect of oestrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. *J Oral Rehabil.* 2000 July; 27(7): 587-94.
- 49 Kawane T, Takahashi S, Saitoh H, Okamoto H, Kubodera N, Horiuchi N. Anabolic effects of recombinant human parathyroid hormone (1 - 84) and synthetic human parathyroid hormone (1 - 34) on the mandibles of osteopenic ovariectomized rats with maxillary molar extraction. *Horm Metab Res.* 2002 June; 34(6): 293-302.
- 50 Kim H, Peterson TG, Barnes S. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor β signaling pathways. *Am J Clin Nutr.* 1998 Dec.; 68(6): 1418-25.
- 51 Koshi R, Coutinho-Silva R, Cascabulho CM, Henrique-Pons A, Knight GE, Loesch A, et al. Presence of the P2X(7) purinergic receptor on immune cells that invade the rat endometrium during oestrus. *J Reprod Immunol.* 2005 Aug.; 66(2): 127-40.

- 52 Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 Mar.; 68(6): 197-202.
- 53 Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997 Mar.; 138(3): 863-70.
- 54 Lane NE, Thompson JM, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Acute changes in trabecular bone connectivity and osteoclast activity in the ovariectomized rat in vivo. *J Bone Miner Res.* 1998 Feb.;13(2):229-36.
- 55 Lees CJ, Ginn TA. Soy protein isolate diet does not prevent increased cortical bone turnover in ovariectomized macaques. *Calcif Tissue Int.* 1998;62:557-8.
- 56 Lemos C. et al. Sistema ósteo-articular In: BRASILEIRO FILHO, G. et al. *Patologia.* 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 1243 p.
- 57 Li B, YU S. Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. *Biol Pharm Bull.* 2003 June; 26(6): 780-6.

- 58 Lill CA, Hessel J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res*. 2003 Sept.; 21(5): 836-42.
- 59 Marie PJ, Sabbagh A, de Vernejoul MC, Lomri A. Osteocalcin and deoxyribonucleic acid synthesis in vitro and histomorphometric indices of bone formation in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989 Aug.; 69(2): 272-9.
- 60 Maroulis GB. Alternatives to estrogen replacement therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Apr.; 90(18): 413-415.
- 61 McCarty MF. Isoflavones made simple: genistein`s agonist activity for the beta-type estrogen receptor mediates their health benefits. *Med Hypotheses*. 2006; 66(6): 1093-114.
- 62 Meunier PJ, Boivin G. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. *Bone*. 1997 Nov.; 21(5): 373-7.
- 63 Montalbán EB Interés terapéutico de los fitoestrógenos en ginecología. *Anais do 2º Congreso de Fitoterapia, 2ª Reunión de la AEMN, 23ª Reunión de la Sefit*; 2003; Granada. ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE MÉDICOS NATURISTAS.
- 64 Moreira C. Osteoporose. In: Rocha MOC, Pedroso ERP, Fonseca JGM, Silva AO. *Terapêutica Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. Cap. 67, p.588-604.

- 65 Mosquette R, Campos MP, Gomes L, Simões RS, Haidar MA, Simões MJ, et al. Efeitos das isoflavonas sobre o miométrio de ratas adultas Rev Bras Ginecol Obstet. 2006; 28(4): 227-31.
- 66 Most W, van der Wee-Pals L, Ederveen A, Papapoulos S, Lowik C. Ovariectomy and orchidectomy induce a transient increase in the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in the mouse. Bone. 1997 Jan.; 20(1): 27-30.
- 67 Mundy GR, Martin TJ, editors. Physiology and pharmacology of bone. Berlin: Springer-Verlag; 1993. 761p.
- 68 Naftolin F, Stanbury MG. Phytoestrogens: are they really estrogen mimics? Fertil Steril. 2002 Jan.; 77(1): 15-7.
- 69 Nakai M, Cook L, Pyter LM, Black M, Sibona J, Turner RT et al. Dietary soy protein and isoflavones have no significant effect on bone and a potentially negative effect on the uterus of sexually mature intact Sprague-Dawley female rats. Menopause. 2005 May; 12(3): 291-8.
- 70 Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. Bone. 2001 Jan.; 28(1): 80-6.
- 71 Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Sakai H, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. J Orthop Res. 2003 May; 21(3): 511-20.

- 72 Omi N, Ezawa I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone*. 1995 Oct.; 17(4): 163-8.
- 73 Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987 Dec.; 2(6): 595-610.
- 74 Parfitt AM, Han ZH, Palnitkar S, Rao DS, Shih MS, Nelson D. Effects of ethnicity and age or menopause on osteoblast function, bone mineralization, and osteoid accumulation in iliac bone. *J Bone Miner Res*. 1997 Nov.; 12(11): 1864-73.
- 75 Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Barlet JP. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr*. 2001 Mar.; 131(3): 723-8.
- 76 Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco J, Lebecque P, Barlet JP, et al. Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomised rat. *Br J Nutr*. 2001 Mar.; 85(3): 307-16.
- 77 Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, et al. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr*. 2000 July; 130(7): 1675-81.

- 78 Poian AT, Carvalho-Alves PC. Introdução à ação hormonal. In:_. Hormônios e metabolismo: integração e correlações clínicas. Rio de Janeiro: Atheneu; 2003.p. 1-23.
- 79 Ruggiero RJ, Likis FE. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. J Midwifery Womens Health. 2002 May; 47(3): 130-8.
- 80 Seino Y. Cytokines and growth factors which regulate bone cell function. Acta Astronaut. 1994 July; 33: 131-6.
- 81 Shimizu M, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. Anat Rec. 2000 May; 259(1): 76-85.
- 82 Shimizu M, Sasaki T, Ishihara A, Furuya R, Kawawa T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. J Electron Microsc (Tokyo). 1998; 47(5): 517-26.
- 83 Silveira VAS. Efeito das isoflavonas, da terapia de reposição hormonal estrogênica e da associação de ambos na reparação óssea de ratas ovariectomizadas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 84 Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev. 2004 Feb.; 15(1): 49-60.

- 85 Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. 1995 Aug.; 17(2): 87-91.
- 86 Szachowicz EH. Facial bone wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995 Oct.; 28(5): 865-80.
- 87 Szejnfeld VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000. 406p.
- 88 Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res*. 2002 Apr.; 37(2): 161-5.
- 89 Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat Rec*. 2001 Feb.; 262(2): 203-12.
- 90 Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Ejiri S. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Apr.; 95(4): 495-502.
- 91 Tansey G, Hughes CL Jr, Cline JM, Krummer A, Walmer DK, Schmoltzer S. Effects of dietary soybean estrogens on the reproductive tract in female rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998 Mar.; 217(3): 340-4.

- 92 Teófilo JM, Azevedo AC, Petenusci SO, Mazaro R, Lamano-Carvalho TL. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Oct.; 17(4): 302-6.
- 93 Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol.* 2004 Sept.; 49(9): 755-62.
- 94 Trowbridge HO, Emling RC. Reparo: regeneração e cicatrização. In:_. *Inflamação: uma revisão do processo.* São Paulo: Quintessence; 1996. Cap. 8, p.137-152.
- 95 Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Rev.* 1994 June; 15(3): 275-300.
- 96 Vincent A., Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: are they useful in menopause? *Mayo Clin Proc* 2000 Nov.; 75(11): 1174-84.
- 97 Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Sept.; (342):218-27.
- 98 Wangen KE, Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Marcus R, Phipps WR, et al. Effects of soy isoflavones on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sept.; 85(9): 3043-8.
- 99 Weibel ER. Stereological principles for morfometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol.* 1969; 26: 235-302.

- 100 Williams CL, Stangel GM. Estrógenos e progestogênios. In: Goodman LS, Gilman A. As bases farmacológica da terapêutica. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 1996. Cap. 57, p. 1045-67.
- 101 Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1988 Sept.; 43(3): 179-83.
- 102 Wronski TJ, Schenck PA, Cintrón M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1987 Mar.;40(3):155-9.
- 103 Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D. Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas.* 2003 Mar.; 44 (Suppl 1): 9-20.
- 104 Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology.* 2001 Aug.; 142(8): 3632-7.
- 105 Yang J, Farnell D, Devlin H, Horner K, Graham J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *J Dent.* 2005 Feb.; 33(2): 123-9.
- 106 Yang J, Pham SM, Crabbe DL. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dentomaxillofac Radiol.* 2003 July; 32(4): 247-51.

- 107 Zecchin KG, Pereira MC, Coletta RD, Graner E, Jorge J. Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. *Calcified Tissue Int.* 2005; 76:136-45.

APÊNDICE A – Dados originais de ganho de peso

Tabela 21 – Médias originais de ganho de peso das ratas em porcentagem

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-A	OVZ-A	OVZ-A
7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45	
25,49	1,85	17,85	6,25	0,00	26,86	-1,96	5,66	4,00	3,92	19,23	15,90	-3,57	5,26	10,00	
6,97	4,83	10,16	15,09	20,00	42,59	3,92	-3,84	3,50	1,66	8,00	18,75	-4,44	0,00	8,51	
30,61	7,01	17,85	12,72	31,37	17,64	30,76	-3,50	4,08	3,77	20,00	34,88	1,85	7,27	7,40	
0,00	11,32	8,92	13,20	24,00	7,40	24,52	3,70	22,41	-3,17	12,28	18,36	0,00	0,00	10,41	
-10,20	0,00	9,25	19,23	20,00	21,05	-5,55	5,76	15,09	7,14	20,00	20,00	-7,40	5,88	10,89	
2,08	17,30	38,46	12,24	5,66	25,86	-18,51	9,80	20,33	0,00	15,00	10,00	-4,16	4,25	20,51	
-4,34	11,36	19,56	11,36	22,22	29,31	-3,70	7,40	3,44	1,75	14,03	27,90	0,00	0,00	13,46	
-5,88	3,63	38,63	24,00	9,25	33,92	0,00	12,00	11,86	7,27	20,00	25,00	0,00	-4,16	7,69	

APÊNDICE B – Dados originais do volume trabecular

Tabela 22 – Médias originais de volume trabecular na reparação óssea alveolar em porcentagem

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-A	OVZ-A	OVZ-A
7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45
52,57	64,57	79,42	45,85	63,14	72,28	37,00	72,14	75,14	44,71	61,57	74,42	42,57	68,42	91,57
44,14	72,00	80,85	47,42	71,42	78,85	33,45	67,85	75,17	44,14	72,42	79,71	37,14	83,57	83,71
45,28	75,28	79,14	47,71	71,42	77,61	41,00	74,85	81,42	32,57	67,42	72,85	37,45	75,00	84,68
49,57	74,85	79,57	40,85	62,28	80,28	34,57	65,10	74,60	35,42	76,28	73,06	34,14	65,23	89,14
41,71	73,14	83,42	44,00	60,14	79,85	45,85	70,00	78,57	30,60	74,48	75,42	35,57	66,42	87,71
46,85	64,42	90,00	39,85	64,71	80,85	45,42	67,00	72,00	29,51	67,00	70,57	43,14	76,00	80,57
44,71	71,85	77,28	28,85	70,28	82,14	37,85	62,14	74,12	34,57	65,89	82,14	39,14	68,00	82,00

APÊNDICE C – Dados originais do volume osteóide

Tabela 23 – Médias originais de volume osteóide na reparação óssea alveolar em porcentagem

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-A	OVZ-A	OVZ-A
7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45
8,21	7,05	2,87	3,84	6,78	4,54	23,33	9,30	2,66	5,45	7,65	5,18	18,84	5,21	0,03
6,60	6,34	1,41	2,91	9,40	4,52	20,04	4,84	3,25	3,11	9,66	2,86	15,42	3,76	0,02
6,84	6,26	2,88	3,73	8,60	3,27	19,52	7,44	2,61	3,77	8,89	2,74	17,32	5,14	0,01
9,22	6,36	1,43	2,41	7,37	2,84	11,42	6,89	2,00	3,20	5,05	0,55	13,17	4,37	0,03
7,33	7,82	2,91	3,13	9,02	3,22	27,14	7,34	3,63	5,45	5,70	4,54	14,33	3,44	0,02
6,36	8,09	1,58	2,47	4,19	3,95	28,57	6,60	3,96	3,57	8,74	3,84	15,99	7,70	0,01
4,70	7,81	0,92	2,03	9,14	4,92	14,54	10,57	2,14	4,69	6,50	2,60	14,88	3,57	0,02

APÊNDICE D – Dados originais referentes ao número de mastócitos

Tabela 24 – Médias originais do número de mastócitos

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-A	OVZ-A	OVZ-A
7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45
0,00	1,50	1,10	0,10	0,30	1,11	0,00	0,50	1,00	0,00	1,44	0,70	0,10	2,70	0,10
0,00	2,44	0,40	0,10	0,30	1,90	0,14	0,80	0,25	0,00	0,00	0,20	0,40	0,60	0,14
0,00	0,50	0,40	0,00	2,90	4,66	0,00	0,60	0,00	0,00	1,10	1,57	0,55	0,20	1,00
0,10	1,44	0,00	0,00	0,60	0,40	0,00	0,00	1,88	0,00	1,90	0,40	0,10	0,60	0,00
0,00	1,90	1,10	0,10	0,20	1,90	0,30	0,20	0,28	0,00	0,00	1,20	0,00	0,25	0,00
0,00	0,44	2,00	0,12	0,60	1,00	0,00	0,00	0,60	0,00	3,20	1,90	0,20	1,80	0,28
0,00	0,90	1,00	0,00	4,50	0,66	0,00	0,00	0,77	0,00	0,87	0,40	0,30	0,90	3,50

APÊNDICE E – Dados originais da taxa de aposição mineral

Tabela 25 – Médias originais da taxa de aposição mineral no tecido ósseo ao redor do alvéolo (mdia)

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-E	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-I	OVZ-A	OVZ-A	OVZ-A
7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45	7	21	45
4,91	2,63	1,29	6,82	2,86	1,13	5,66	2,41	0,70	5,26	1,74	0,86	2,97	1,57	0,52
4,13	2,48	1,09	3,49	2,03	0,96	5,80	1,74	1,20	5,54	3,08	1,06	3,51	1,77	1,18
4,15	2,87	1,07	4,04	2,91	0,81	5,91	1,22	1,03	4,00	2,84	0,65	3,85	2,13	1,05
6,64	1,22	1,11	2,73	2,51	0,99	5,81	2,49	0,84	4,99	2,47	0,81	5,24	2,02	1,43
5,07	2,04	1,32	3,51	2,07	0,87	5,37	1,21	1,18	6,19	2,36	0,25	3,37	1,87	1,21
4,64	2,52	2,06	4,37	2,84	1,05	4,85	2,14	0,75	5,68	3,19	0,50	3,40	1,64	0,89
4,20	2,49	1,40	3,63	2,58	1,23	5,74	1,96	1,45	3,97	1,45	0,83	3,13	1,72	1,27

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa – São José dos Campos/UNESP



Av. São Francisco José Lages, 777 – Jd. São Diniz
CEP 12201-070 – F: (12) 3947-0024
Fax: (12) 3947-9010 / e-mail: diretor@fmg.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **029/2004-PA/CEP**, sobre **“Efeito da genisteína isolada ou associada ao estrógeno na reparação óssea alveolar de ratas ovariectomizadas”**, sob a responsabilidade de **VANESSA ÁVILA SARMENTO SILVEIRA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 09 de novembro de 2004.



Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Silveira, VAS. *Acute effects of ovariectomy and the treatment with estrogen and soy isoflavones, isolated and associated, on alveolar bone repair and uterus of rats [thesis]* São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, São Paulo State University; 2007.

ABSTRACT

Due to the adverse effects of estrogen, new therapies have been proposed, such as soy isoflavones. However, their effects on bone repair and uterus epithelium remain unclear. The aim of this work was to study the acute effects of ovariectomy and treatment with estrogen and soy isoflavones, isolated or in association, on rat bone repair and uterus epithelium. 120 rats were used; 96 ovariectomized and 24 Sham-operated (SHAM). The ovariectomized rats were divided into 4 groups, receiving orally: 1 mg/kg/day of 17 β -estradiol valerate (OVZ-E); 15mg/kg/day of isoflavones (OVZ-I); associated treatments (OVZ-A); and vehicle (OVZ). SHAM rats received vehicle. Treatment began on the ovariectomy day. The lower first molar was removed on both sides 15 days after ovariectomy. The rats received the treatment until sacrificed, which occurred at seven, 21 and 45 days after dental extraction. The uterus was submitted to histological analyses and the mandible to histological, histomorphometric, backscattered electron microscopy (BSE) and immunohistochemistry analyses. Concerning bone repair, no difference was observed in trabecular volume between the OVZ and SHAM groups for each period. Histological analysis and BSE revealed changes in bone microarchitecture after 45 days. Verification showed that the SHAM group presented a higher mean osteoid volume at seven days compared to the OVZ and OVZ-E groups and that the OVZ-A group showed the highest mean for this period. The number of mast cells tended to be higher in the OVZ group at 45 days. Strong expression of TGF- β was observed at seven days, which diminished over time. The OVZ-E group presented the lowest mineral apposition rate at seven days. No difference was observed for the remaining periods. The SHAM, OVZ-E and OVZ-A groups showed similar aspects in the uterus, differing from the OVZ and OVZ-I groups. In conclusion, ovariectomy did not provoke any obvious early effect and treatment with estrogen and in association with isoflavones showed an effect on osteoid volume. Additionally, estrogen increased the mineral apposition rate and reduced the bone turnover increase caused by post-extraction trauma.

KEYWORD: *isoflavones, osteopenia, osteoporosis, bone repair, estrogen replacement therapy.*