

Efeito de um novo produto fermentado de soja, enriquecido com isoflavonas e cálcio, sobre o tecido ósseo de ratas

Raquel Bedani, Elizeu Antonio Rossi, José Salvador Lepera, Charles Chenwei Wang, Graciela Font de Valdez

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, SP, Brasil.
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

RESUMO. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da ingestão de um produto a base de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti*, enriquecido com isoflavonas e cálcio sobre o peso corpóreo e sobre o tecido ósseo de ratas maduras ovariectomizadas. Os animais foram divididos em 5 grupos: pseudo-ovariectomizados, ovariectomizados, ovariectomizados que ingeriram produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio, ovariectomizados que ingeriram produto fermentado de soja enriquecido com cálcio e ovariectomizados que ingeriram produto não fermentado enriquecido com cálcio. Tíbias e fêmures foram utilizados para análise do comprimento ósseo; ensaio mecânico de flexão de três pontos; densidade óssea (princípio de Arquimedes); conteúdo mineral ósseo; conteúdo de cálcio ósseo e medida das larguras das trabéculas. A ingestão do produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio apesar de não ter exercido efeitos nos parâmetros como comprimento, densidade, conteúdo mineral, conteúdo de cálcio e carga máxima suportada, foi capaz de evitar o aumento de peso corpóreo causado pela ovariectomia, além de ter demonstrado uma tendência à proteção das trabéculas, prevenindo a redução da largura das mesmas ocasionada pela castração.

Palavras chave: Produto fermentado de soja; isoflavonas; cálcio, tecido ósseo.

SUMMARY. Effect of a novel soy fermented product enriched with isoflavones and calcium on bone tissue of rats. The objective was to evaluate the effect of soy fermented product intake on the corporal weight and bone tissue of ovariectomized mature rats. This product was fermented with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus jugurti* and enriched with isoflavones and calcium. The animals were divided in 5 groups: sham-ovariectomized; ovariectomized; ovariectomized treated with soy fermented product enriched with isoflavones and calcium; ovariectomized treated with soy fermented product enriched with calcium and ovariectomized treated with non-fermented product enriched only with calcium. In order to evaluate the effect of the tested product on bone tissue (femur and tibia), the following parameters were analyzed: length; mechanical assay of three points; density (Archimedes principle); mineral content; calcium content; measure of the trabecular widths. The corporal weight of group treated with soy fermented product containing isoflavones and calcium showed no statistical difference from sham-ovariectomized group and trabecular widths tended to have larger than ovariectomized group. However, there was no significant difference to the other evaluated parameters in result of the diverse treatments. Thus, soy fermented product enriched with isoflavones and calcium inhibited the increasing of corporal weight caused by ovariectomy and revealed a tendency to trabecular protection after castration.

Key words: Soy fermented product; isoflavones; calcium; bone tissue.

INTRODUÇÃO

A menopausa está associada ao aumento da incidência de várias doenças crônicas como a obesidade, doenças cardiovasculares e osteoporose (1). A prevalência dessas doenças em idosos são, principalmente, decorrentes de alterações no metabolismo lipídico e mudanças na composição corporal que inclui a diminuição de massa óssea (1).

Suplementos de cálcio são prescritos para mulheres na pós-menopausa com massa óssea reduzida e ou histórico de fratura, em associação à Terapia de Reposição Hormonal (TRH). Estudos sugerem que o alto consumo de cálcio aumenta o efeito protetor da TRH nos ossos (2,3). Embora a TRH diminua o risco de desenvolver osteoporose, ela aumenta o risco para os cânceres de endométrio, ovário e mama (4). Como forma de evitar os efeitos adversos decorrentes da administração de

estrogênios, os fitoestrógenos em especial, as isoflavonas, têm sido propostos como alternativa segura para diminuir a perda de massa óssea que ocorre com a menopausa. As isoflavonas são encontradas principalmente na soja e apresentam estrutura e função similares ao 17 β -estradiol (5).

Estudos usando roedores ovariectomizados mostram que as isoflavonas, isoladas ou associadas à proteína de soja, reduzem a perda de massa óssea que ocorre após a ovariectomia (6,7). Em humanos, alguns estudos mostram que as isoflavonas atenuam a perda óssea que ocorre durante e depois da menopausa (8-10). Há evidências epidemiológicas e clínicas apontando para uma relação positiva entre o consumo de isoflavonas e a densidade mineral óssea.

Diversos estudos mostram que o sistema imune possui um papel importante no remodelamento ósseo, particularmente em relação à influência das citocinas na regulação autócrina e

parácrina da atividade das células ósseas (11,12).

Considerando que o produto a base de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus jugurti* apresenta significativa capacidade de estimulação de vários parâmetros imunológicos (13), o presente estudo teve por objetivo avaliar a ação deste produto, quando enriquecido com isoflavonas e cálcio, sobre o desenvolvimento do peso corpóreo e sobre o tecido ósseo de ratas maduras ovariectomizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Constituído por amostras de produto a base de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *L. jugurti* 416 e enriquecido com isoflavonas e cálcio.

Obtenção das amostras

O produto fermentado de soja, popularmente denominado de “iogurte” de soja, foi obtido a partir do extrato aquoso (“leite” de soja), processado pela Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja – UNISOJA, instalada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, segundo a metodologia descrita por Rossi et al. (14) A partir desse produto, o enriquecimento com isoflavonas foi feito utilizando-se um produto comercial constituído de 43,8% de isoflavonas, sendo 14,6% de genisteína; 5,4% de genistina; 8,6% de daidzeína; 12% de daidzina; 2,4% de glicetina e 0,8% de gliciteína (Isoflavin®, Galena Química e Farmacêutica Ltda, Brasil). O isoflavin, dissolvido em sorbitol (Synth, Brasil), foi adicionado em quantidade suficiente para fornecer uma concentração de 0,7 mg de isoflavonas/mL de produto fermentado de soja, similar à concentração média de isoflavonas verificada no grão de soja *in natura*. Foi também processado um produto não fermentado, de composição idêntica ao do fermentado, apenas sem os microrganismos, e, portanto, acidificado com ácido láctico até pH 4,3. O enriquecimento com cálcio foi 0,6 mg de cálcio elementar/mL de produto fermentado e não fermentado, utilizando-se o citrato tribásico de cálcio (Montedison Farmacêutica, Brasil), segundo metodologia descrita por Umbelino et al (15).

Animais e protocolo experimental

Foram utilizadas 45 ratas da raça Wistar, com 12 semanas de idade, nulíparas, peso inicial aproximado de 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (Todos os procedimentos quanto ao manuseio dos animais estão de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA). Os animais foram mantidos sob fotoperíodo controlado (10 horas claro/14 horas escuro), em temperatura entre 20°C a 24°C, alimentados *ad libitum* com ração comercial para ratos, marca Purina, contendo

23% de proteína; 46% de carboidrato; 11% de lipídeos; 5% de fibras e 10% de cinzas. As ratas foram divididas, aleatoriamente, em 5 grupos (n=9). O primeiro grupo foi constituído de animais pseudo-ovariectomizados (grupo I), cujos ovários foram manuseados, porém não removidos, e os outros 4 grupos foram ovariectomizados, segundo o modelo proposto por Kalu (16). A ovariectomia bilateral foi realizada segundo metodologia descrita por Zarrow et al. (17) Todas as cirurgias foram realizadas na 12ª semana de vida dos animais.

Dentre os grupos que sofreram a ovariectomia, o grupo II foi constituído de ratas alimentadas apenas com ração comercial; o grupo III, além da ração, recebeu uma dose 4mL/kg de peso corpóreo por dia de produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio; o grupo IV constitui-se de indivíduos alimentados com ração padrão e 4mL/kg de peso corpóreo por dia de produto fermentado de soja enriquecido com cálcio; o grupo V, com animais alimentados com ração padrão e 4mL/kg de peso corpóreo por dia de produto não fermentado, acidificado com ácido láctico até pH 4,3 e enriquecido com cálcio. Durante o período de experimentação (3 meses), os animais foram submetidos à avaliação semanal do peso corpóreo.

Após 3 meses de tratamento, os animais foram sacrificados com a utilização de câmara de gás carbônico, sendo, em seguida, retirados os fêmures e tíbias esquerdos e direitos. Os ossos foram mantidos em solução salina a 0,9% na temperatura de -20°C até o momento da análise.

Comprimento ósseo

Os comprimentos ósseos da tíbia e fêmur esquerdos foram medidos em milímetros, com precisão de 0,01, por meio de um paquímetro (Mitutoyo, Japão).

Ensaio mecânico de flexão de três pontos

Foi realizado o teste biomecânico (flexão óssea) nas tíbias direitas. Os ensaios mecânicos foram realizados em dinamômetro (Instron, modelo 4444, E.U.A.), em temperatura ambiente, segundo Peng et al. (18).

Densidade óssea

As tíbias esquerdas, após hidratação (19), foram pesadas imersas em água à temperatura ambiente, suspensas individualmente por um fio de cobre e determinado o peso imerso (Pi). Em seguida, as tíbias foram enxutas e pesadas no ar para a determinação do peso ósseo (P).

Com os valores obtidos de peso ósseo imerso e peso ósseo foi possível calcular o volume ósseo (V) e a densidade óssea (d) segundo o Princípio de Arquimedes (20).

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

Conteúdo mineral ósseo (CMO)

Foi calculado segundo Kenney et al. (21), pelas fórmulas: $CMO = 100 \times (Pm/P)$ (amostra integral) e $CMO = 100 \times (Pm/Ps)$ (amostra seca).

Para tanto, as tíbias esquerdas foram secas ($100^{\circ}C/24h$), sendo obtido o peso da amostra desidratada (Ps). Todas as medidas foram realizadas em balança analítica com sensibilidade de 0,0001 (Boeco, Alemanha).

Após secagem, as amostras foram calcinadas ($600^{\circ}C/24h$) para obtenção da matriz óssea mineral (Pm). As cinzas de cada tíbia foram pesadas individualmente em balança analítica com sensibilidade de 0,0001 (Boeco, Alemanha).

Conteúdo de cálcio ósseo

Cerca de 50 mg das cinzas resultantes de cada fêmur direito foram dispersas em 2 mL de ácido clorídrico concentrado (E. Merck PA, 32%, $d = 1,19$, Alemanha) e quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 100 mL, ajustando-se o volume com água deionizada. Uma alíquota de 2 mL da amostra diluída na razão de 1:10 foi misturada a 6 mL de cloreto de lantânio 0,2% (Vetec, Brasil), homogeneizada e analisada em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer 3110, E.U.A.).

Análise de superfície óssea trabecular por microscopia eletrônica de varredura

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

As amostras foram tratadas para serem observadas ao microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM – T330A, Japão).

Foi utilizado o aumento de 50 vezes da amostra para a caracterização da região dos côndilos femorais. Observou-se qualitativamente a conectividade entre as trabéculas e as alterações da arquitetura trabecular (22).

Após a captação, as micrografias eletrônicas foram transferidas para o programa de análise digital Image-Pro Plus (versão 4.0). Foi possível selecionar trabéculas e efetuar a medida de suas larguras, a fim de comparar os diferentes grupos experimentais (22).

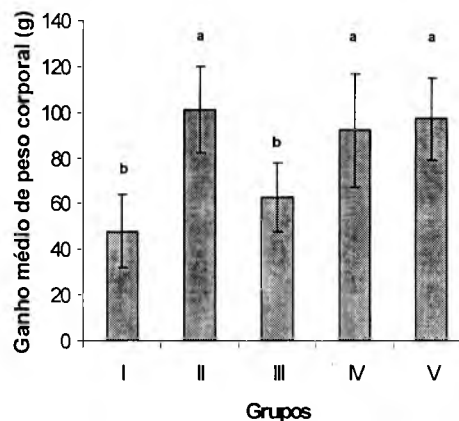
Análise estatística dos dados

Todos os resultados representaram médias dos valores individuais relativos aos animais pertencentes a cada grupo, as quais foram submetidas à análise de variância e ao teste de médias de Tukey para a comparação entre grupos utilizando o software Jandel Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, E.U.A.). Diferenças significativas foram assumidas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na Figura 1 estão apresentados os valores do ganho médio de peso corporal dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

FIGURA 1
Ganho médio de peso corporal (g) dos diferentes grupos experimentais (N=45)



Colunas com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados

II – Grupo de animais ovariectomizados

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

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

V – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto não fermentado suplementado com cálcio

Embora os animais dos diferentes grupos de estudo não tenham diferido entre si quanto ao peso inicial e quanto ao consumo de ração ao longo do experimento, ao se comparar o ganho de peso dos animais do grupo I e II constata-se claramente que a ovariectomia provocou um aumento significativo no peso corpóreo, aumento esse que não pôde ser evitado nos animais do grupo IV e V, demonstrando que os tratamentos que esses grupos receberam não foram eficazes no sentido de impedir tal aumento. Por outro lado, o tratamento do grupo III (ingestão do produto fermentado enriquecido com isoflavonas e cálcio) foi capaz de manter o peso dos animais sem diferença significativa daqueles pertencentes ao grupo I, os quais não sofreram ovariectomia. Esse resultado pode ser atribuído à presença das isoflavonas, uma vez que os tratamentos do grupo III e IV diferem apenas quanto à presença desses fitoestrógenos.

Na Tabela 1, pode-se observar que todos os parâmetros ósseos não diferiram entre si ($p > 0,05$) em relação aos diferentes grupos experimentais. A partir desses resultados, constata-se que nem a ovariectomia, nem a ingestão dos

produtos a base de soja foram capazes de provocar alterações nos parâmetros em questão, tanto das tíbias quanto dos fêmures, sugerindo que, nas condições de estudo, não foram

adequados para se observar os efeitos da ovariectomia e dos diferentes tratamentos pelos quais as ratas foram submetidas.

TABELA 1
Parâmetros ósseos relativos aos diferentes grupos experimentais (N=45)

Parâmetros	I	II	Grupos III	IV	V
Comprimento (mm)					
Tíbia	38,88 ± 0,78 ^a	38,36 ± 0,91 ^a	39,79 ± 0,34 ^a	38,76 ± 1,05 ^a	38,77 ± 0,83 ^a
Fêmur	36,27 ± 1,27 ^a	36,51 ± 1,18 ^a	36,25 ± 0,43 ^a	35,90 ± 1,00 ^a	35,91 ± 1,04 ^a
Densidade (g/cm ³)	1,55 ± 0,07 ^a	1,60 ± 0,04 ^a	1,57 ± 0,03 ^a	1,59 ± 0,03 ^a	1,65 ± 0,11 ^a
Conteúdo mineral (%) (amostra integral)	67,06 ± 1,37 ^a	65,48 ± 1,32 ^a	68,21 ± 2,99 ^a	66,64 ± 1,19 ^a	67,33 ± 2,35 ^a
Conteúdo mineral (%) (amostra seca)	48,85 ± 3,11 ^a	44,30 ± 1,88 ^a	45,88 ± 2,83 ^a	46,49 ± 2,33 ^a	44,27 ± 2,73 ^a
Conteúdo de cálcio (mg/g de cinzas)	380 ± 10,00 ^a	380 ± 10,00 ^a	370 ± 0,00 ^a	380 ± 10,00 ^a	380 ± 10,00 ^a

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

I – Grupo de animais pseudo-ovariectomizados

II – Grupo de animais ovariectomizados

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

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

V – Grupo de animais OVX que ingeriram o produto não fermentado suplementado com cálcio

Ainda em relação ao conteúdo mineral, observa-se na tabela I que o grupo II apresenta valores absolutos mais baixos, podendo ser um indicativo de tendência de redução dos valores desse parâmetro; tendência essa que provavelmente poderia ter sido confirmada estatisticamente caso o tempo de experimentação tivesse sido maior.

De acordo com a Figura 2, pode-se perceber que os cinco grupos experimentais não diferiram entre si (p>0,05) com relação à carga máxima suportada até o momento de ruptura da tíbia, mostrando que nem a ovariectomia, nem o consumo do produto fermentado foram capazes de provocar alterações na resistência óssea à fratura.

Numa primeira análise qualitativa, as amostras dos animais pseudo-ovariectomizados (grupo I) apresentaram predominância de estruturas trabeculares interconectadas (Figura 3a). Verificou-se, no grupo II (Figura 3b), que a ovariectomia provocou diminuição do volume tecidual na porção média entre os côndilos femorais, com alterações da arquitetura óssea trabecular ocorrendo maior espaçamento entre as trabéculas. As trabéculas mais largas foram substituídas por trabéculas mais finas, que apresentaram perda de conectividade com outras trabéculas vizinhas. No entanto, o grupo de animais que recebeu produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio (grupo III) (Figura 3c) mostrou-se com menos escavações entre as trabéculas, além de

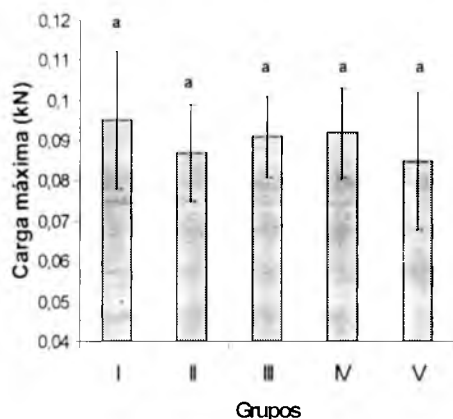
apresentarem trabéculas aparentemente mais grossas do que aquelas encontradas no grupo II (Figura 3b). Portanto, apenas através da análise qualitativa das micrografias eletrônicas de varredura dos animais pode-se sugerir que a ingestão do produto fermentado enriquecido com isoflavonas e cálcio (grupo III) permitiu que as interconectividades trabeculares fossem mantidas em condições semelhantes àquelas observadas para o grupo I (pseudo-ovariectomizado) e em condições melhores àquelas verificadas para o grupo II, IV e V.

O afinamento das trabéculas observado na análise qualitativa das micrografias eletrônicas (Figura 3b) para o grupo ovariectomizado (grupo II) pôde ser também verificado pela medida da largura das trabéculas (Figura 4).

Vale destacar que não foi realizado tratamento estatístico desse parâmetro pelo fato das trabéculas terem sido determinadas aleatoriamente e pelo número reduzido de amostras utilizadas na análise. É importante ressaltar que com a realização da criofatura não foi possível obter o mesmo corte, na mesma região óssea. No entanto, ao analisar os valores médios obtidos para a largura das trabéculas nota-se uma tendência de diminuição das mesmas no grupo de animais ovariectomizados (grupo II). Todavia, os fêmures dos animais que receberam o produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio (grupo III) e os animais pseudo-ovariectomizados (grupo I) apresentaram uma tendência a larguras trabeculares maiores.

FIGURA 2

Carga máxima suportada (kN) até o momento de ruptura das tíbias direitas dos diferentes grupos experimentais (N=45)

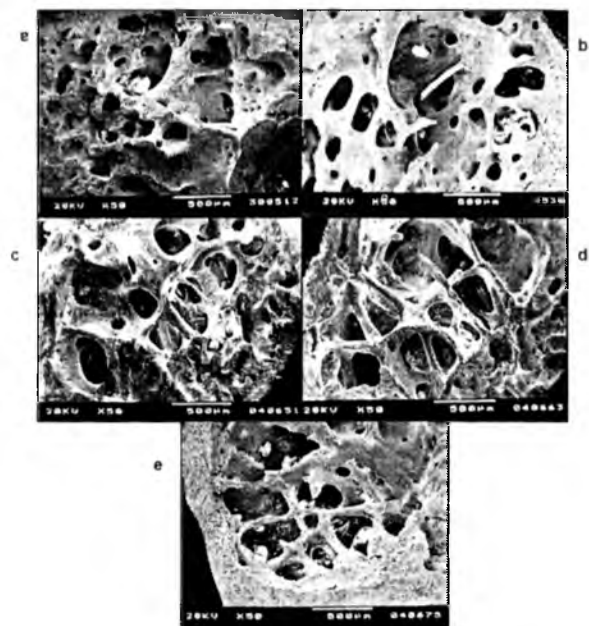


Colunas com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

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

FIGURA 3

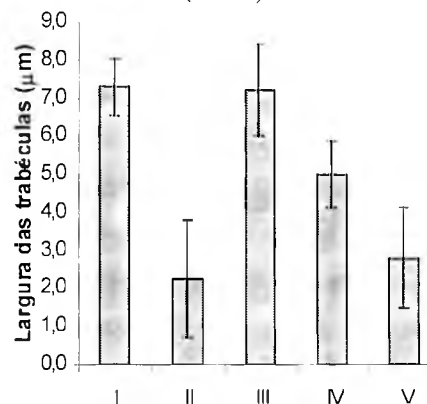
Micrografias eletrônicas de varredura (aumento 50 vezes) do fêmur esquerdo (N=20)



a) grupo de animais pseudo-ovariectomizados. b) grupo de animais ovariectomizados. c) grupo de animais ovariectomizados que ingeriu produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio. d) grupo de animais ovariectomizados que ingeriu produto fermentado de soja enriquecido com cálcio. e) grupo de animais ovariectomizados que ingeriu produto não fermentado de soja.

FIGURA 4

Largura média das trabéculas (μm) da porção média distal dos fêmures esquerdos dos diferentes grupos experimentais (N=20)



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

DISCUSSÃO

Estudos mostram que o aumento de peso corpóreo pode estar relacionado à ovariectomia. De acordo com Arjmandi et al. (6) e Danielsen et al. (23), o ganho médio de peso corpóreo é maior em ratas ovariectomizadas, mesmo quando o consumo é similar ao de ratas intactas. Thompson et al. (24), num estudo a longo prazo com ratas, relataram um peso corporal maior em animais após 12 meses de ovariectomia e verificou também que o aumento da massa corporal foi devido inteiramente a um aumento no acúmulo de tecido adiposo, sem o aumento da massa de outros tecidos corporais.

O aumento de peso observado em ratas maduras também ocorre em mulheres no período pós-menopáusicas como consequência da falta de estrogênio (25). Trabalhos realizados com humanos têm demonstrado que as isoflavonas podem se apresentar como uma alternativa para o controle do metabolismo lipídico e da obesidade (8).

Arjmandi et al. (6), Deyhim et al. (26) e Breitman et al. (27), todos usando o modelo da rata madura, mas com diferentes períodos experimentais (35 dias, 40 dias e 2 meses, respectivamente) também não verificaram efeito da ovariectomia sobre o comprimento ósseo de fêmures. Entretanto, para tíbias, Deyhim et al. (26) verificaram um aumento no comprimento ósseo das ratas ovariectomizadas em relação ao grupo pseudo-ovariectomizado.

Em se tratando de conteúdo de cálcio ósseo, resultados semelhantes aos encontrados em nosso trabalho também foram encontrados por Deyhim et al. (26) e Arjmandi et al. (6). Eles

estudaram ratas ovariectomizadas com 3 meses de idade e submetidas a um período de experimentação de 40 e 30 dias, respectivamente. Por outro lado, Picherit et al. (28) mostraram uma relação linear positiva entre o conteúdo mineral do fêmur e o seu conteúdo de cálcio. Vale ressaltar que esse estudo teve duração de 3 meses, e que as ratas só foram ovariectomizadas com 12 meses de idade. Em vista disso, fica claro que esses animais sofreram, por um período maior, a ação dos agentes causadores de osteopenia. Portanto, uma possível explicação para a não detecção de alterações no conteúdo mineral e conteúdo de cálcio em nosso estudo pode estar relacionada ao tempo de experimentação.

O aumento do peso corporal médio das ratas ovariectomizadas (grupo II) pode ter contribuído para a não verificação de alterações no conteúdo mineral e conteúdo de cálcio ósseo se comparado ao grupo de animais pseudo-ovariectomizados (grupo I). O ganho de peso corpóreo protege as ratas do desenvolvimento da osteopenia após ovariectomia (29), entretanto essa proteção é restrita a ossos longos (30). Vale ressaltar que os ossos utilizados para a realização de todos os parâmetros estudados foram ossos longos, particularmente tíbias e fêmures. Portanto, em nosso trabalho, o aumento do peso corporal das ratas causado pela ovariectomia pode ter proporcionado uma proteção contra a perda óssea, principalmente da porção mineral das tíbias e fêmures.

Resultados semelhantes foram verificados por Breitman et al. (27) em fêmures de ratas ovariectomizadas e pseudo-ovariectomizadas com 3 meses de idade, com um tempo de experimento de 2 meses. Todavia, quando este teste (flexão de três pontos) foi realizado em vértebras lombares (L5), a carga máxima suportada do grupo pseudo-ovariectomizado foi estatisticamente maior do que a do grupo ovariectomizado. Esses resultados sugerem que a diáfise da tíbia não é o sítio esquelético mais adequado para se verificar alterações na carga máxima suportada, pelo menos para um período de experimentação de 3 meses, podendo ser essa uma possível explicação para os resultados observados em nosso estudo.

É sabido que, as proporções de osso trabecular e cortical diferem nas regiões do fêmur e tíbia, enquanto que nas vértebras elas são mais homogêneas (27). Essas diferenças também podem explicar porque a carga máxima suportada pela tíbia e fêmur, observada nos estudos anteriormente citados, não foi afetada pela ovariectomia, ao contrário do que ocorreu nas vértebras lombares que tiveram sua carga máxima reduzida após a cirurgia. A relação superfície/volume do osso trabecular é substancialmente maior que a do osso cortical. Essa relação provavelmente explica o maior envolvimento do osso trabecular na osteoporose.

Shen & Wronski (31) verificaram que a osteopenia trabecular e cortical associada com um alto *turnover* ósseo (velocidade de remodelagem óssea) ocorre no fêmur proximal de ratas ovariectomizadas com 3 meses de idade, sendo que a

perda de osso trabecular ocorre nesse sítio esquelético nos primeiros 30 dias pós-ovariectomia, mas permanece relativamente moderada nos primeiros 90 dias antes de se tornar mais pronunciada no período subsequente. De acordo com os autores, a osteopenia cortical do fêmur proximal não foi observada antes do primeiro ano de pós-ovariectomia.

A partir desses resultados pode-se sugerir que o produto fermentado enriquecido com isoflavonas e cálcio apresentou uma tendência à proteção das trabéculas, prevenindo a redução da largura ocasionada pela ovariectomia.

Estudos realizados em mulheres na pós-menopausa e perimenopausa verificaram que o consumo de isoflavonas pode atenuar a perda de massa óssea que ocorre nesses períodos (8,9). Nessa linha, Chiechi et al. (32) compararam o efeito de uma dieta rica em soja e da Terapia de Reposição Hormonal sobre os principais biomarcadores de *turnover* ósseo e densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa. Os autores sugeriram que o consumo de produtos de soja podem ser efetivos na redução do risco de osteoporose.

Deyhim et al. (27), utilizando doses de isoflavonas semelhantes às empregadas em nosso trabalho, concluíram que baixas doses podem não ser capazes de exercer efeito de proteção óssea aparente, pelo menos com relação ao modelo de osteoporose utilizado (Modelo de ovariectomia da rata madura). No entanto, Picherit et al. (29) observaram que o consumo de daidzeína por ratas ovariectomizadas com 12 meses de idade e submetidas a um período de experimentação de 90 dias resultou na preservação da área da porção trabecular na região da metáfise distal do fêmur, quando comparada ao grupo ovariectomizado. Vale ressaltar que além das ratas utilizadas nesse estudo serem mais velhas, a dose de isoflavonas, no caso a daidzeína, usada foi muito maior do que aquela utilizada em nosso experimento.

CONCLUSÕES

O produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio foi capaz de evitar o aumento de peso corpóreo causado pela ovariectomia, além de apresentar uma tendência à proteção da estrutura trabecular, prevenindo a redução da largura das mesmas ocasionada pela castração. Entretanto, o referido produto não foi capaz de provocar alterações nos parâmetros: comprimento ósseo, densidade óssea, conteúdo mineral, conteúdo de cálcio ósseo e carga máxima suportada.

Os resultados observados neste trabalho fornecem embasamento para estudos futuros, os quais deverão estar centrados no efeito do produto fermentado enriquecido com isoflavonas e cálcio sobre sítios esqueléticos ricos em osso trabecular, como por exemplo, vértebras lombares. Além disso, é recomendável que períodos maiores de experimentação, doses mais elevadas de isoflavonas e outros parâmetros como densitometria óssea sejam considerados.

AGRADECIMENTOS

A Capes pela bolsa concedida e ao Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar pelo apoio na avaliação de determinados parâmetros.

REFERÊNCIAS

- Jensen LB, Vestegaard P, Hermann AP, Gram J, Eiken P, Abrahamsen B, et al. Hormone replacement therapy dissociates fat mass and bone mass, and tends to reduce weight gain in early postmenopausal women: A randomized controlled 5-year clinical trial of the Danish Osteoporosis Prevention Study. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 333-342.
- Nieves JW, Komar L, Cosman F, Lindsay R. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: review and analysis. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 18-24.
- Recker RR, Davies KM, Dowd RM, Heaney RP. The effect of low dose continuous estrogen and progesterone with calcium and vitamin D on bone in elderly women. *Ann Int Med* 1999; 130: 897-904.
- Zumoff, B. Does postmenopausal estrogen administration increase the risk of breast cancer? Contributions of animal, biochemical and clinical investigative studies to resolution of the controversy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 30-37.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998; 139: 4252-4563.
- Arjmandi HB, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, et al. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1364S-1368S.
- Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP, et al. Dose-dependent bone-sparing effects dietary isoflavones in the ovariectomized rat. *Br J Nutr* 2001; 85: 307-316.
- Potter SM, Baum JA, Teng H, Stilman RJ, Shay NF, Erdman JW. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 1375S-1379S.
- 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; 72: 844-852.
- Morabito N, Crissafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, et al. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1904-1912.
- Wallach S, Avioli LV, Feinblatt JD. Cytokines and bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 293-296.
- Roodman GD. Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 94S-98S.
- Carlos IZ, Rossi EA, Vendramini RC, Machado CO, Cyrillo RNS, Perrazo FF, et al. Avaliação do potencial alergênico de um novo produto fermentado de soja. *Rev Ciên Farm São Paulo* 2000; 21: 103-113.
- Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Oliveira MG, Valdez GF. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. *Arch Latinoam Nutr* 2003; 53: 47-51.
- Umbelino DC, Cardello HMAB, Rossi EA. Efeito de diferentes sais de ferro sobre as características sensoriais do "iogurte" de soja. *Arch Latinoam Nutr* 2001; 51: 199-203.
- Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15: 175-192.
- Zarrow MX, Yochim JM, McCarthy JL, Sanborn, RC. *Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques*. New York: Academic Press; 1964. p. 39-40.
- Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jämsä T, Väänänen HK. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone* 1994; 15: 523-532.
- Donahue HJ, Mazzeo RS, Horvath SM. Endurance training and bone loss in calcium-deficient and ovariectomized rats. *Metabolism* 1998; 37: 741-744.
- Mosekilde L. Normal age-related changes in bone mass, structure and strength – consequences of the remodeling process. *Dan Med Bull* 1991; 1: 175-192.
- Kenney MA, McCoy H, Williams L. Effects of magnesium deficiency on strength, mass, and composition of rat femur. *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 44-49.
- Zhou H, Chemecky R, Davies, JE. Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 367-374.
- Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, log-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 26-33.
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke, HZ. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 1995; 17: 125S-133S.
- Wing RR, Matthews KA. Weight gain at time of menopause. *Arch Int Med* 1991; 151: 97-102.
- Deyhim F, Stoecker BJ, Bruswitz GH, Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutr Res* 2003; 23: 123-130.
- Breitman PL, Fonseca D, Cheung AM, Ward WE. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. *Bone* 2003; 33: 597-605.
- Picherit C, Coxam MV, 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; 130: 1675-1681.
- Roudebush RE, Magee DE, Benslay DN, Bendele AM, Bryant HU. Effect of weight manipulation on bone loss due to ovariectomy and the protective effects of estrogen in the rat. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 61-64.
- Wronski TJ, Schenck PA, Clintron M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1987; 40: 155-159.
- Shen MLY, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1997; 20: 55-61.
- Chiechi LM, Secreto G, D'Amore M, Fanelli M, Venturelli E, Cantatore F, Valério T, Laselva G, Loizzi P. Efficacy of soy rich diet in preventing postmenopausal osteoporosis: the Menfis randomized trial. *Maturitas* 2002; 42: 295-300.

Recibido: 29-12-2005

Aceptado: 26-06-2006