



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**EFEITO DO TRATAMENTO COM ISOFLAVONAS DE SOJA
NO EIXO OPG/RANK/RANKL (OSTEOPROTEGERINA/
RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA
B/RANK LIGANTE) EM ANIMAIS NA MENOPAUSA**

FERNANDA ROSA GONÇALVES SANTOS

**São Luís
2019**

FERNANDA ROSA GONÇALVES SANTOS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ISOFLAVONAS DE SOJA
NO EIXO OPG/RANK/RANKL (OSTEOPROTEGERINA/
RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA
B/RANK LIGANTE) EM ANIMAIS NA MENOPAUSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Àrea de Concentração: Avaliação Clínica, Laboratorial e Experimental.

Linha de Pesquisa: Climatério.

Orientadora: Dr^a Maria Bethânia da Costa Chein.

Coorientadora: Dr^a Haissa Oliveira Brito.

Coordenadora do Programa: Dr^a Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luís
2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Gonçalves Santos, Fernanda Rosa.

EFEITO DO TRATAMENTO COM ISOFLAVONAS DE SOJA NO EIXO
OPG/RANK/RANKL OSTEOPROTEGERINA/ RECEPTOR ATIVADOR DO
FATOR NUCLEAR KAPPA B/RANK LIGANTE EM ANIMAIS NA MENOPAUSA
/ Fernanda Rosa Gonçalves Santos. - 2019.

89 f.

Coorientador(a): Haissa Oliveira Brito.

Orientador(a): Maria Bethânia da Costa Chein.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2019.

1. Experimentação Animal. 2. Menopausa. 3.
OPG/RANK/RANKL. I. da Costa Chein, Maria Bethânia. II.
Oliveira Brito, Haissa. III. Título.

FERNANDA ROSA GONÇALVES SANTOS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ISOFLAVONAS DE SOJA
NO EIXO OPG/RANK/RANKL (OSTEOPROTEGERINA/
RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA
B/RANK LIGANTE) EM ANIMAIS NA MENOPAUSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

(Orientadora) Prof^a. Dr^a Maria Bethânia da Costa Chein
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

(Coorientadora) Prof^a. Dr^a Haissa Oliveira Brito
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr^a Rosangela Maria Lopes de Sousa
Universidade CEUMA

Prof^a. Dr^a Maria do Socorro de Sousa Cartagenes
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr^a Luciane Maria Oliveira Brito
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof^a. Dr^a Rita da Graça Carvalhal Frazão Corrêa
Universidade Federal do Maranhão- UFMA

Ao senhor Deus, todo poderoso, criador dos céus e da terra, que até aqui tem me sustentado, que nos enxerga e derrama suas bênçãos sobre nós a todo instante; obrigada senhor por me sustentar e renovar minhas forças dia após dia.

Aos meus familiares pelo apoio e todos os ensinamentos.

Aos amigos anjos do senhor enviados para dividirem, angustias e alegrias, que mesmo de longe me fizeram companhia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o senhor de todas as coisas, por me conceder o dom da vida, por me sustentar a cada dia, por me fazer entender que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que o amam. Não tenho palavras pra agradecer, tua bondade, dia após dia me cercas, com fidelidade, nunca me deixes esquecer, que tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ser vem de ti, senhor.

A minha amada Mãe, Floripes Gonçalves (Fofinha), que me cobriu com amor incondicional ao longo de toda a minha caminhada, que não poupou esforços para me ver concretizando um mais sonho. Obrigada por todos os ensinamentos e apoio. Te amo.

Aos meus irmãos, Daniel Santos, Verônica Santos, Joselia Pacheco, Fideles Santos e Alisson Santos pelo apoio. Obrigada pelas boas risadas.

À Prof^a Haissa Oliveira Brito, pelas orientações, incentivo e principalmente pela paciência (até pelos puxões de orelha rsrs... que não foram poucos rsrs...) ao longo desses anos de trabalho árduo e gratificante. Agradeço a Deus pela sua vida e por ter me proporcionado tantos aprendizados ao seu lado.

À Prof^a Maria Bethânia da Costa Chein pelas oportunidades, orientações, incentivo e acolhimento ao longo dessa trajetória.

À Prof^a Marilene por me receber de maneira tão acolhedora no Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia, por não medir esforços para a realização deste estudo, obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos.

Aos meus tios, Mariano, Maria de Jesus, Alzira, Jerusa, Romário, Florita pelo carinho e afago de todo sempre.

As primas Monique Arouche, Mônica Arouche, Georlinda Ferro, Talita, pelo carinho e apoio.

A Dayanne Lima, presente de Deus enviado a minha vida, obrigada pela paciência, apoio e incentivo e acima de tudo por aturar todas as minhas chatices (rsrs...), medos e inseguranças, por cuidar de todos os detalhes que foram cruciais pra que eu estivesse bem, obrigada por tudo.

Aos meus amigos do mestrado em especial a Marineide Sodré, Fernanda

Lima, Katia Borges, Daniele Salgado, Joyce, Clíce, Gerusinete pelo apoio ao longo dessa caminhada.

Aos meus amigos Leonardo Soares, Michele Menezes, Mariluce Tayres, Larissa Costa, Lorena Neves, Tharcyla Barbosa, Elayne Costa, Amanda Castro, Daiane Sales, Dulciana Coelho, Adriana Montenegro, Chrystiane Viegas, Deusima Serra, Luana Reis, Marcela Sales, Michele, Marina Rocha, Maína, Gabriela Cirqueira, por escutarem meus lamentos e pelo apoio ao longo dessa jornada.

À Lenise, minha parceria de laboratório, acredite, sem você tudo teria sido mais pesado, obrigada por me incentivar, por sempre me falar as palavras certas, no momento certo.

Aos alunos, Sara, Carlos, Andressa, Ribamar, Helen e todos os alunos que contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa

À Profª Maria do Desterro, Sr. José, Sr. Emanuel e toda a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, pelo apoio e ajuda ao solucionarmos dificuldades ao longo de todo este percurso.

Ao corpo docente da Universidade Federal do Maranhão e do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, obrigada por todos os ensinamentos ao longo dessa jornada.

Ao apoio concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES.

A todos contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

“Quanto mais me aprofundo na Ciência mais
me aproximo de Deus”

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: A menopausa caracteriza-se pelo término permanente dos períodos menstruais, com declínio o da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona, a diminuição fisiológica da atividade ovariana causa mudanças desfavoráveis no metabolismo da mulher. A identificação molecular de reguladores da reabsorção e formação óssea acontece através de uma das principais vias de diferenciação e ativação dos osteoclastos e envolve o sistema, RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B)/RANKL (RANK ligante)/OPG (osteoprotegerina). O RANKL é uma molécula importante para a diferenciação das células hematopoiéticas progenitoras em osteoclastos maduros e desempenha seus efeitos através de sua ligação ao receptor RANK. Por outro lado, a osteoclastogênese é bloqueada na presença da OPG, uma vez que quando OPG está ligada ao RANKL, este não pode se ligar ao RANK, impossibilitando dessa forma que as células osteoprogenitoras se diferenciem em osteoclastos e não haja reabsorção óssea. **Objetivo:** O presente estudo objetiva avaliar os efeitos das isoflavonas de soja, no eixo OPG/RANK/RANKL em ratas na menopausa. **Métodos:** Foram utilizadas ratas Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, os animais foram submetidos a cirurugias de Falso-operado (SHAM) e ooforectomia (OOF), em seguida foram divididos em 4 grupos experimentais: Grupo 1: falso-operado tratado com solução salina, Grupo 2: Ooforectomizado tratado com solução salina, Grupo 3: Ooforectomizado tratado com estroprogestativo (EP), Grupo 4: Ooforectomizado tratado com isoflavonas de soja (ISO), via gavagem, durante dois meses. Foram determinados: peso corporal, tecido adiposo, peso uterino, parâmetros bioquímicos, dosagem hormonal, OPG e RANKL no soro, RANKL no fluido cerebrospinal (CSF), imunohistoquímica para imunomarcagem de receptores RANK e todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*. **Resultados:** Os tratamentos não reverteram o aumento de peso corporal induzido pelo hipoestrogenismo. O tecido adiposo dos animais não reduziu com os tratamentos, observou-se que a OOF ($0,28 \pm 0,05$ g) induziu atrofia do útero, comparado com o grupo SHAM ($0,88 \pm 0,07$ g). O cálcio sérico do grupo OOF diminuiu ($15,5 \pm 2,6$ mg/dL). O grupo EP restabeleceu os valores de cálcio. Os níveis plasmáticos de magnésio permaneceram iguais em todos os grupos. Os níveis de estradiol não aumentaram com os tratamentos, verificou-se que a progesterona foi restabelecida nos grupos EP e ISO quando comparados com o grupo OOF. Os níveis de RANKL no CSF, RANKL e OPG no soro diminuíram com os tratamentos. A expressão de RANK no útero aumentou com os tratamentos, no colo do útero o tratamento com ISO aumentou a expressão de RANK e na glândula mamária esta expressão apresentou-se de forma igual em todos os grupos. **Conclusão:** Sugere-se que as ISOs possuem efeito na regulação do eixo OPG/RANK/RANKL uma vez que o tratamento com esse composto diminui níveis de RANKL no soro dos animais e aumentou a expressão do receptor nos tecidos analisados.

Palavra-chave: Experimentação animal. Menopausa. OPG/ RANK/ RANKL.

ABSTRACT

Introduction: Menopause is characterized by the permanent end of the menstrual periods, with a decline in the secretion of estrogen and progesterone hormones, the physiological decrease of ovarian activity causes unfavorable changes in the metabolism of women. The molecular identification of regulators of bone resorption and formation occurs through one of the major pathways of osteoclast differentiation and activation, and involves the RANK (RANK) / RANK (RANK ligand) / OPG (osteoprotegerin) system. RANKL is an important molecule for the differentiation of progenitor hematopoietic cells into mature osteoclasts and performs its effects through its binding to the RANK receptor. On the other hand, osteoclastogenesis is blocked in the presence of OPG, since when OPG is bound to RANKL, it can not bind to RANK, thus making it impossible for osteoprogenitor cells to differentiate into osteoclasts and there is no bone resorption. **Objective:** This study aims to evaluate the effects of soy isoflavones on the OPG / RANK / RANKL axis in menopausal rats. **Methods:** Wistar rats of the *Rattus norvegicus* species were used, the animals were submitted to False Surgery (SHAM) and oophorectomy (OOF), divided into 4 experimental groups: Group 1: False-operated with saline solution, Group 2: Oophorectomy treated with solution saline, Group 3: Oophorectomy treated with estroprogestative (EP), Group 4: Oophorectomized treated with soy isoflavones (ISO), via gavage, for two months. Body weight, adipose tissue, uterine weight, biochemical parameters, hormonal dosage, OPG and RANKL in serum, RANKL in cerebrospinal fluid (CSF), immunohistochemistry for immunoblotting of RANK receptors and all statistical calculations were performed using the statistical program *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*. **Results:** The treatments did not revert the increase in body weight induced by hypoestrogenism. The adipose tissue of the animals did not decrease with the treatments, it was observed that OOF (0.28 ± 0.05 g) induced atrophy of the uterus, compared to the SHAM group (0.88 ± 0.07 g). The serum calcium of the OOF group decreased (15.5 ± 2.6 mg / dL). The EP group reestablished the calcium values. Plasma magnesium levels remained the same in all groups. The levels of estradiol did not increase with the treatments, it was verified that the progesterone was reestablished in the EP and ISO groups when compared with the OOF group. RANKL levels in CSF, RANKL and serum OPG decreased with the treatments. The expression of RANK in the uterus increased with the treatments, in the cervix the treatment with ISO increased the expression of RANK and in the mammary gland this expression was presented in the same way in all groups. **Conclusion:** It is suggested that ISOs have an effect on the regulation of the OPG / RANK / RANKL axis since treatment with this compound decreases RANKL levels in the serum of the animals and increased the expression of the receptor in the tissues analyzed.

Keywords: Animal experimentation. Menopause. OPG / RANK / RANKL.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fisiologia do eixo OPG/ RANK/RANKL	16
Figura 2	Resumo das ações do estrogênio no sistema nervoso central, fígado, adipócitos, músculo esquelético e células β pancreáticas e de como a deficiência de estrogênio nesses tecidos contribui para a disfunção metabólica, como síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e obesidade	21
Figura 3	Eixo OPG/ RANK/ RANKL na diferenciação de osteoclastos no tecido ósseo	24
Figura 4	Unidade estrutural básica das isoflavonas de soja	30
Figura 5	Estrutura geral das isoflavonas de soja e do estradiol	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA	Albumina de soro bovino
Cbfa1	Fator de transcrição nuclear de ligação do fator $\alpha 1$
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
E2	Estradiol
EP	Estroprogestativo
ER	Receptor Estrogênico
ERs	Receptores Estrogênicos
ER α	Receptor Estrogênico alfa
ER β	Receptor Estrogênico beta
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FSC-GM	Fator estimulante de colônias granulocítica-macrofágica
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Liberção de gonadotrofinas
HPG	hipotálamo-hipófise-gonadal
ISO	Isoflavona
ISOs	Isoflavonas de soja
IL-1	Interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-11	Interleucina 11
LH	Hormônio Luteinizante
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NF-IL6	Fator nuclear interleucina 6
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RANKL	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B Ligante
ODF	Fator de diferenciação osteoclástica
OOF	Ooforectomia
O-DMA	O-des-metil-angolensina

OPG	Osteoprotegerina
P55	Proteína 55
PBS	Soro fisiológico tamponado com fosfato
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína C-quinase
PTH	Paratormônio
PTHrP	Proteína relacionada ao hormônio da paratireóide
SERMs	Moduladores seletivos de receptores estrogênicos
SHAM	Falso operado
SNC	Sistema Nervoso Central
STRAW	Oficina do Envelhecimento do sistema Reprodutivo
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
V.O.	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral	18
2.2. Específicos	18
3 REFERENCIAL TEORICO.....	19
3.1 Hormônios sexuais e suas implicações no metabolismo feminino	19
3.1.1 Receptor estrogênico α e β	20
3.2 Metabolismo ósseo	21
3.3 Menopausa e suas implicações.....	24
3.4 Terapia de reposição hormonal e sua influência na menopausa	27
3.4.1 Isoflavona de soja como terapia alternativa de reposição hormonal	29
4. ARTIGO I	33
5. ARTIGO II	43
6. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	88

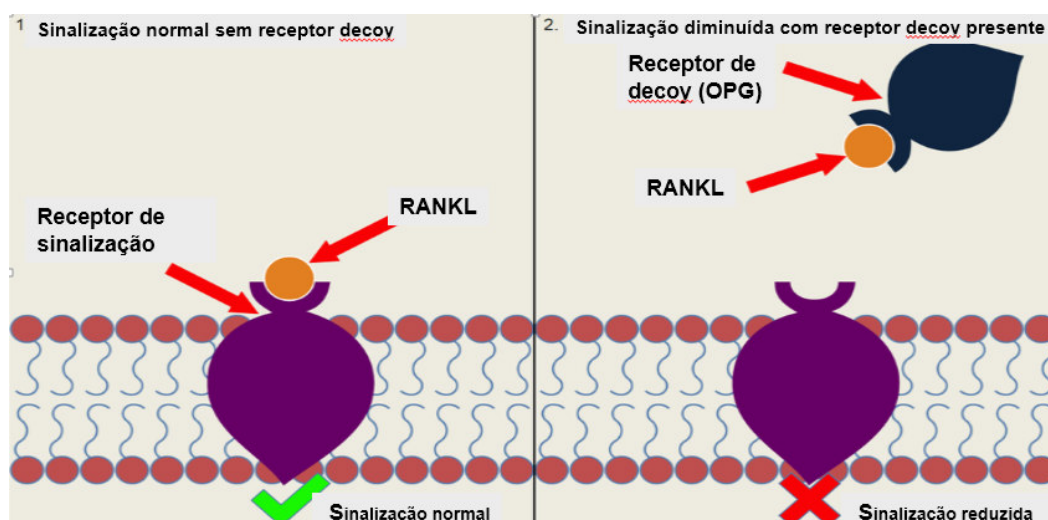
1 INTRODUÇÃO

A menopausa é caracterizada com o término permanente dos períodos menstruais, decorrente da falência ovariana fisiológica (WHO, 1996). Com o declínio da secreção dos hormônios estrogênio e progesterona, a diminuição fisiológica da atividade ovariana causa mudanças desfavoráveis no metabolismo da mulher, incluindo alterações no metabolismo dos lipídeos, da glicose e insulina, na distribuição da composição corpórea, ondas de calor, tonturas, palpitações, depressão, irritabilidade, diminuição da libido e maior chance de surgimento de osteoporose (LINDAHL, 2014; MOREIRA *et al.*, 2014).

A diminuição da secreção do hormônio estrogênio na menopausa é fator determinante e responsável pela gênese da osteoporose após a menopausa; com a redução deste hormônio, ocorre o aumento da atividade metabólica do osso, resultando em um maior ritmo na remodelação óssea (BANDEIRA, 2000).

A identificação molecular de reguladores da reabsorção e formação óssea acontece através de uma das principais vias de diferenciação e ativação dos osteoclastos e envolve o sistema RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B)/ RANKL (RANK ligante)/ OPG (osteoprotegerina). O RANKL é uma molécula importante para a diferenciação das células hematopoiéticas progenitoras em osteoclastos maduros e desempenha seus efeitos através de sua ligação ao receptor RANK. Por outro lado, a osteoclastogênese é bloqueada na presença da OPG, uma vez que, quando OPG está ligada ao RANKL, este não pode se ligar ao RANK, impossibilitando dessa forma que as células osteoprogenitoras se diferenciem em osteoclastos e não haja reabsorção óssea. O desequilíbrio desse sistema RANK/RANKL/OPG é observado na osteoporose. Além do osso, essas substâncias também estão relacionadas a efeitos em outros tecidos como cérebro e mama (Figura 1) (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003).

Figura 1. Fisiologia do Eixo OPG-RANK-RANKL.



Fonte: Adaptado de Ashkenazi (2002).

A terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido objeto de muita discussão e especulação desde a década de 1960, período no qual se prescrevia estrogenoterapia isolada para todas as mulheres menopausadas, dando origem a complicações principalmente em nível de endométrio (ROZENBERG; VANDROMME; ANTOINE, 2013).

Várias mulheres apresentam contraindicações a TRH com estrógenos. Sendo assim, tem-se então estudado os fitoestrógenos que se referem a uma classe de compostos derivados de plantas que possuem atividade estrogênica. Centenas de alimentos possuem estes compostos e a maioria pertence a uma das seguintes classes de fitoestrógenos: isoflavonas (ISOs), lignanas e coumestanos (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013).

A soja (*Glycine max*) é uma das principais fontes de ISOs, de algumas vitaminas do complexo B, como a riboflavina e a niacina, e também de vitamina C. Contém apreciável teor de minerais, dentre os quais estão o potássio, o cálcio, o magnésio, o fósforo, o cobre e o zinco (EMBRAPA, 2014)

A TRH à base de ISOs se mostra adequada na diminuição sintomas da menopausa, uma vez que as mulheres que consomem soja apresentam aproximadamente 90% de redução desses sinais, evidenciando que a soja e seus princípios ativos, podem ser considerados uma alternativa eficaz na reposição

hormonal no período da menopausa (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013; SIRIWARDHANA *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2014).

Uma variedade de efeitos farmacológicos é atribuída às ISOs. Efeitos que variam desde a prevenção de doenças crônicas como o câncer de mama, de cólon, de útero e da próstata, doenças cardiovasculares, osteoporose (CASSIDY *et al.*, 2006) e sintomas da menopausa (SIRIWARDHANA *et al.*, 2013).

Em relação à osteoporose, os diversos estudos epidemiológicos sugerem que as populações que possuem dieta rica em soja apresentam redução do turnover ósseo e consequentemente, menor incidência de osteoporose (POTTER *et al.*, 1998; ALEKEL *et al.*, 2010; PATISAUL; JEFFERSON, 2010).

Em relatos da literatura, Park e colaboradores (2014) descrevem que o tratamento com isoflavonas de soja estimula a secreção de OPG e inibe a diferenciação de osteoclasto induzida pelo RANKL, através da supressão da ativação de um fator nuclear ativado por células T, sugerindo então a participação indireta da soja no metabolismo ósseo através do eixo OPG/RANK/RANKL.

Portanto, é importante ressaltar que mais estudos são necessários a fim de elucidar os efeitos dessas isoflavonas de soja, amplamente utilizadas no mercado, no eixo OPG/RANK/RANKL, não somente no osso, mas também em outros órgãos como cérebro, mama e útero, durante um período significativo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com isoflavonas de soja no eixo OPG/RANK/RANKL em modelo experimental de menopausa.

2.2. Específicos

- Determinar o efeito das isoflavonas de soja e de estroprogestativos no peso corporal, peso uterino e percentual de tecido adiposo de ratas ooforectomizadas;
- Avaliar os níveis hormonais, concentrações séricas de cálcio e magnésio e OPG/RANKL no sangue de ratas ooforectomizadas tratadas com isoflavonas de soja e estroprogestativos;
- Avaliar os níveis de RANKL no fluido cerebrospinal de ratas ooforectomizadas tratadas com isoflavonas de soja e estroprogestativos;
- Avaliar a expressão do receptor RANK em tecidos uterinos e mamários de ratas ooforectomizadas submetidas ao tratamento crônico com isoflavonas de soja e estroprogestativos.
- Elaborar dois artigos: um na modalidade de Revisão de Literatura com abordagem relacionando o eixo OPG/RANK/RANKL na menopausa e outro original a partir dos dados coletados no presente estudo.

3 REFERENCIAL TEORICO

3.1 Hormônios sexuais e suas implicações no metabolismo feminino

Os hormônios sexuais estão diretamente envolvidos em diversos processos fisiológicos ao longo das diferentes fases da vida das mulheres. Desde a menarca até a menopausa e todas as etapas intermediárias, as mulheres experimentam oscilações nos níveis de progesterona, estradiol, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) entre outros. Tais oscilações afetam o metabolismo feminino como um todo, ocasionando efeitos em alguns órgãos específicos, como no útero, mama, cérebro, tecido adiposo e osso (DEL RIO *et al.*, 2018).

As funções biológicas do hormônio estrogênio são mediadas pela sua ligação aos receptores de estrogênio (ER) α e β , que são amplamente expressos numa variedade de tecidos e tipos de células, como no tecido do fígado, coração, células epiteliais da mama, células ovarianas e células endoteliais (LINDGREN *et al.*, 2004).

O sistema OPG/ RANK/ RANKL sofre influência dos hormônios esteróides sexuais: o estrogênio estimula a biossíntese de mRNA e de proteínas OPG em células da linhagem osteoblástica *in vitro* (BORD *et al.*, 2003; HOFBAUER *et al.*, 1999 ; SAIKA *et al.*, 2001), bem como em humanos (KHOSLA *et al.*, 2002). Embora a estimulação de OPG mediada por estrogênio possa contribuir para a inibição da reabsorção óssea, (HOFBAUER *et al.*, 2002; KHOSLA *et al.*, 2002), poucas são as evidências de que o estrogênio inibe a expressão de RANKL.

Além de efeitos no osso, estudos utilizando camundongos, retratam que o RANKL pode funcionar como um importante efector parácrino da ação mitogênica da progesterona no epitélio mamário, além de desempenhar um papel na expansão dependente de hormônio ovariano e no potencial regenerativo das células-tronco mamárias (DOUGALL, 2012).

A expressão de RANKL é bastante aumentada nas células epiteliais mamárias lumbais durante a gestação e pode ser induzida por fatores como prolactina, proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP) e progesterona (FATA *et al.*, 2000).

Em camundongos, a expressão de RANK é observada em baixos níveis nas células luminal e basal do epitélio mamário e torna-se mais altamente expressa na gestação, mais seletivamente nos pontos de ramificação ductal (GONZALEZ-SUAREZ *et al.*, 2007).

3.1.1 Receptor estrogênico α e β

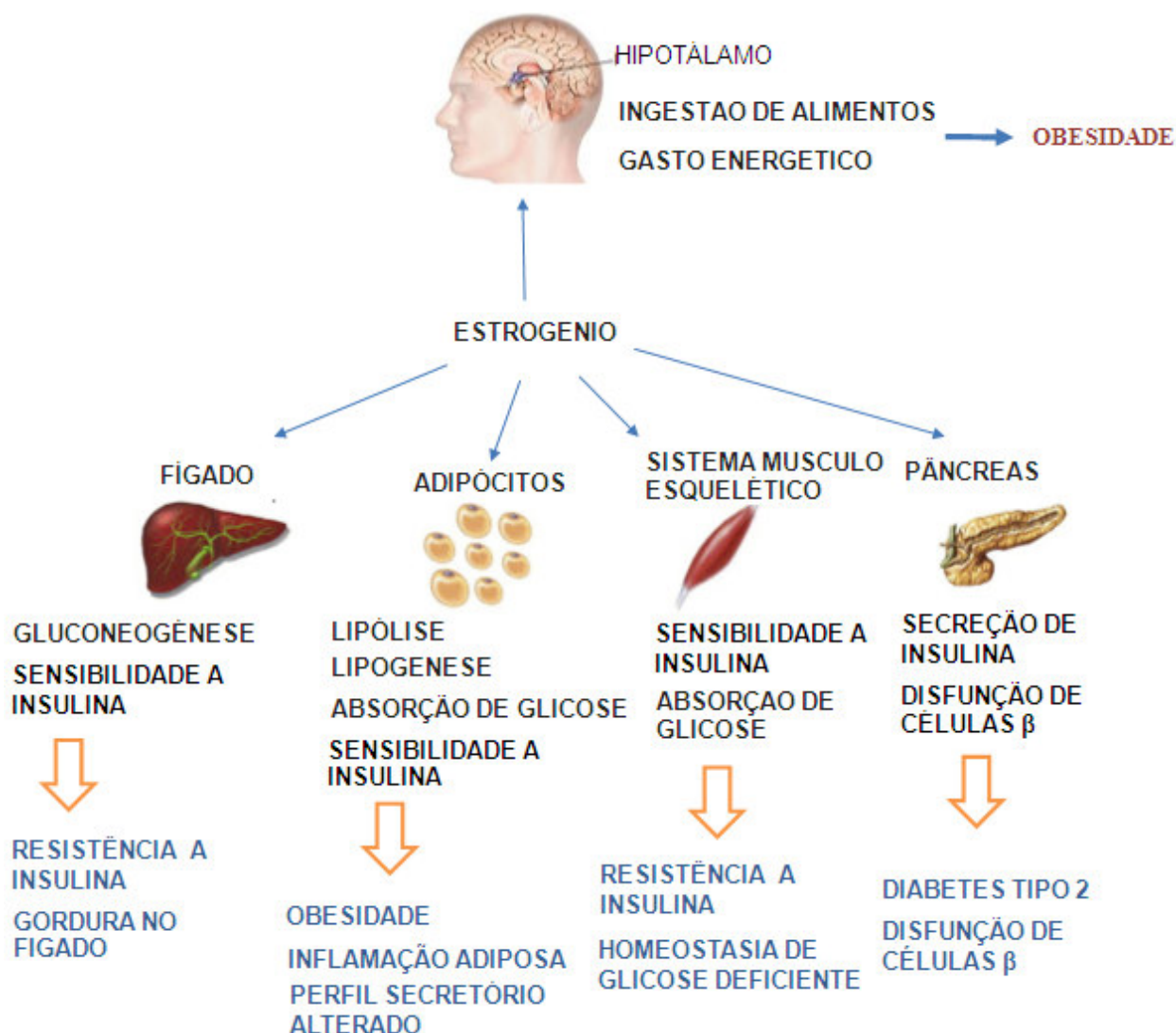
Os receptores de estrogênio alfa (ER α) e beta (ER β) são fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação de muitos processos fisiológicos complexos em humanos, o ER é responsável por desempenhar um papel central na regulação de muitos processos vitais, incluindo desenvolvimento, reprodução e fisiologia normal (Figura 3), além de vários tipos de doenças malignas dependentes de esteróides como cânceres hormônio dependente (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015).

O estradiol (E2) hormônio esteroide, é crucial para o desenvolvimento e diferenciação celular em organismos adultos para manutenção de homeostase (LUBAHN *et al.*, 1993).

No sistema nervoso de mamíferos os ER expressam-se por todo o cérebro e medula espinhal (LAFLAMME *et al.*, 1998; SHUGHRUE; SCRIMO; MERCHENTHALER, 1998). Além da expressão em neurônios, a presença de ambos os ERs foi descrito em células gliais, em particular após lesão cerebral (GARCIA-OVEJERO *et al.*, 2002). A extensa expressão de ERs no sistema nervoso central (SNC) é o correlato molecular do conhecido papel fundamental de E2 em uma infinidade de funções cerebrais (BÖTTNER; THELENB; JARRY, 2013).

Em ambos os sexos a secreção hormonal, desenvolvimento e crescimento de células germinativas é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG); o ER é imprescindível no controle da secreção hormonal, liberação de gonadotrofinas (GnRH) e modulação do comportamento sexual (FESTER *et al.*, 2012; HANDA *et al.*, 2012). A secreção das gonadotrofinas da hipófise é dirigida pelos neurônios GnRH. Na mulher, o traço característico do Eixo HPG é a interação de feedback negativo e positivo de E2 para acionar o aumento do hormônio luteinizante (LH) que desencadeia a ovulação (WINTERMANTEL *et al.*, 2006).

Figura 2. Resumo das ações do estrogênio no sistema nervoso central, fígado, adipócitos, músculo esquelético e células β pancreáticas e de como a deficiência de estrogênio nesses tecidos contribui para a disfunção metabólica, como síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e obesidade.



Fonte: Adaptado de Jia, Dahlman-Wright e Gustafsson (2015).

3.2 Metabolismo ósseo

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado composto por duas partes: inorgânica (cristais de hidroxiapatita - 65%) e orgânica (35%). O componente inorgânico proporciona força, rigidez e funciona como depósito de íons importantes como cálcio, fósforo e magnésio. O componente orgânico por sua vez, inclui as células

ósseas, como as osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos e as proteínas da matriz, como colágeno tipo 1, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e proteoglicanas (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

As células tronco-mesenquimais pluripotentes, também conhecidas como células progenitoras estão localizadas na superfície óssea e quando estimuladas sofrem divisão celular e se diferenciam em osteoblastos. A diferenciação osteoblástica é iniciada e dirigida pelo fator de transcrição nuclear de ligação do fator a1 (cbfa1) que ativa a expressão do gene osteoblasto-específico. Os osteoblastos são células que armazenam diversas proteínas e iniciam o processo de mineralização óssea. Eles expressam receptores celulares de superfície que se ligam a diversos hormônios, citocinas, fatores de crescimento e proteínas extracelulares da matriz (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea. São derivadas de células progenitoras hematopoiéticas de linhagem monocítica-macrofágica (AESCHLIMANN; EVANS, 2004). A maturação e diferenciação dos osteoclastos dependem de citocinas e fatores de crescimento; em humanos estão inclusos: interleucina-1 (IL-1), IL-3, IL-6, IL-11, TNF, fator estimulante de colônias granulocítica-macrofágica (FSC-GM) e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A homeostase óssea está sob a influência de diversos fatores sistêmicos e locais. Dentre os fatores sistêmicos, o hormônio estrógeno está diretamente relacionado à inibição de reabsorção óssea. Deste modo, tem sido amplamente utilizado para tratamento e prevenção da osteoporose. Os mecanismos de ação do estrógeno na reabsorção óssea não estão completamente elucidados. Tendo em vista que os níveis de ER- α e β em osteoclastos são muito baixos, sugere-se que o estrógeno atua na via RANK/RANKL/OPG. Como osteoblastos também expressam ER- α e ER- β , o estrogênio pode ligar-se diretamente aos seus receptores, iniciando sinais para regular um número de respostas celulares de osteoblastos, tal como a proliferação, a diferenciação, a formação da matriz calcificada e a secreção de mediadores osteoclásticos (OKAZAKI *et al.*, 2002). Além disso, tem sido demonstrado

que esse hormônio promove a apoptose de osteoclastos, diminuindo a reabsorção óssea e inibindo proteases produzidas por osteoclastos (FALONI; CERRI, 2007).

Além de estimulação a proliferação celular, os fatores de crescimento podem desenvolver efeitos na locomoção, contratilidade, diferenciação e angiogênese celulares. Estes fatores de crescimento atuam na osteoclastogênese através fatores parácrinos ou estimulação de células progenitoras, essenciais para o metabolismo ósseo, onde os osteoblastos e células progenitoras desempenham um papel central por meio de mediadores como RANK, RANKL e OPG (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

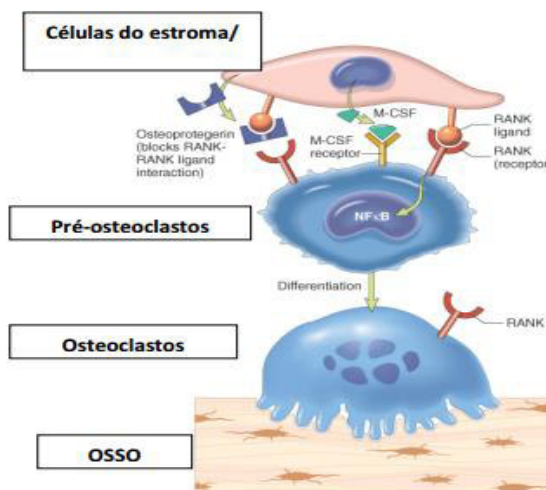
O osso é um tecido permanentemente remodelado por um mecanismo intrínseco que integra estímulos externos químicos, hormonais e biomecânicos. Em nível celular, a remodelação óssea possibilita uma sequência de ciclos repetitivos de reabsorção óssea por osteoclastos derivados de células de linhagem macrofágica, seguido por formação óssea guiadas por células-tronco mesenquimais. A maioria das doenças ósseas é causada por um distúrbio no número e atividade das células osteoclásticas, resultando em inapropriada perda óssea excedendo a capacidade compensatória dos osteoblastos. (AESCHLIMANN; EVANS, 2004; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; KHOSLA, 2001; VEGA; MAALOUF; SAKHAEI, 2007). O aumento da atividade osteoclástica é observado em numerosas desordens osteopênicas, a exemplo a osteoporose pós menopausa, Doença de Paget, metástases ósseas e artrite reumatóide, entre outras (FUKADA *et al.*, 2009).

Os osteoblastos desempenham um papel central no controle hormonal da osteoclastogênese e na reabsorção óssea (BAUD'HUIN *et al.*, 2007; DOUGALL; CHAISSON, 2006; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KHOSLA, 2001). Em resposta a diversos fatores osteotrópicos, os osteoblastos induzem a expressão do fator de diferenciação osteoclástica (ODF), ou RANKL, uma citocina de membrana. Os pré-osteoclastos reconhecem o RANKL nos osteoblastos e, por meio de uma interação célula-célula e diferenciam-se em osteoclastos (Figura 3) (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002; KHOSLA, 2001).

Citocinas, hormônios e outros fatores osteotrópicos que regulam a formação e ativação osteoclástica e por extensão a remodelação óssea normal incluem M-CSF,

TNF, prostaglandinas (PGs), paratormônio (PTH), proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP) e ILs-1, 6, 11. O mecanismo pelo qual estes fatores regulam a osteoclastogênese é via super expressão de RANKL nos osteoblastos, e/ou pela diminuição da expressão de OPG (DOUGALL; CHAISSON, 2006).

Figura 3. Eixo OPG/ RANK/ RANKL na diferenciação de osteoclastos no tecido ósseo.



Fonte: Adaptado de Kumar, Abbas e Fausto (2005).

3.3 Menopausa e suas implicações

O processo de envelhecimento das mulheres coincide ao encerramento da fase reprodutiva feminina. O desequilíbrio nos níveis de hormônios no organismo feminino pode produzir efeitos desagradáveis. De acordo com os Estágios amplamente aceitos pela Oficina do Envelhecimento do sistema Reprodutivo (STRAW) a perimenopausa compreende três estágios: o primeiro é a transição menopausica (também conhecido como perimenopausa precoce), caracterizada pela irregularidade persistente do ciclo menstrual; o segundo transição tardia da menopausa (também conhecida perimenopausa tardia), caracterizada por um intervalo de amenorreia igual ou superior a 60 dias nos 12 meses anteriores; e o terceiro a pós-menopausa precoce, que é o primeiro ano após o período menstrual final (HARLOW *et al.*, 2012).

Na Perimenopausa as flutuações nos níveis de hormônios sexuais, são maiores que as decorrentes durante a fase folicular e lútea do ciclo menstrual, e decorre de

alterações neuroquímicas dentro do sistema nervoso central (SNC) (WOODS; MITCHELL, 2005). Por outro lado, na pós-menopausa, são evidenciados efeitos de privação de estrogênio a longo prazo, entre eles a atrofia urogenital, envelhecimento da pele, osteoporose, distúrbio no metabolismo dos lipídeos e da glicose, depressão, ansiedade, irritabilidade, fogachos entre outros. Na menopausa, a diminuição da biossíntese de hormônios resulta em alterações estruturais e fisiológicas, principalmente no trato geniturinário, não se limitando a alterações anatômicas da parede vaginal, clitoriana, uretral e tecidos da bexiga (PORTMAN; GASS, 2014; STENBERG; HEIMER; ULMSTEN, 1995; CARUSO *et al.*, 2011).

A literatura demonstra o possível envolvimento de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) na perda óssea ligada a deficiência de estrogênio. Alguns autores sugerem que menopausa natural ou cirúrgica elevam o nível de IL-1, IL-6, TNF α (PACIFICI, 1996).

A ação do estrogênio é mediada por IL-6, estudo realizado em camundongos, observou-se que a ooforectomia aumenta o recrutamento de osteoclastos, sendo esse efeito revertido com estrogênio e anticorpo anti-IL-6. Deste modo, sugerem que IL-6 estimula a osteoclastogênese nos estados de déficit de estrogênio, além disso, a ooforectomia aumenta não só a produção, mas também a resposta de precursores de osteoclasto à IL-6 (JILKA *et al.*, 1992).

Poli *et al.* (1994), em estudo utilizando camundongos transgênicos com deleção do gene para IL-6, verificaram um volume de osso trabecular normal após ooforectomia, reforçando os resultados apresentados anteriormente sobre o papel de IL-6 como mediador do aumento da reabsorção óssea no déficit estrogênico.

Entretanto esses resultados são controversos e não confirmados por outros autores que não observaram um efeito do estrogênio sobre a produção de citocinas em culturas de medula óssea. Chaudhary, Spelsberg e Riggs (1992) sugerem que o estrogênio não altera a produção de IL-6 basal ou após estimulação com IL-1 ou TNF em células humanas. Utilizando outro modelo de estudo, estes pesquisadores, encontraram um perfil de citocinas semelhante em medula óssea de mulheres tratadas com estrogênio, comparadas às não tratadas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Esses resultados indicam a ausência do efeito do estrogênio sobre a produção de IL-6 em diferentes modelos de estudo.

Essas divergências entre resultados, observadas em diversos estudos podem ser em virtude das diferenças dos sistemas *in vitro*, dificuldade de reprodução dos modelos de estudo, níveis basais heterogêneos na produção de citocinas, variabilidade na resposta dessas culturas primárias ao estradiol e diferenças entre espécies; por exemplo, o efeito do estrógeno na produção de IL-6 pelas células estromais foi evidenciado em animais, porém não em célula do estroma/ osteoblasto humano (CHAUDHARY, SPELSBERG, RIGGS 1992). Beresford e cols. (1994) relataram várias diferenças entre células estromais em ratos e humanos, que poderiam explicar a divergência de resultados.

Além da IL-6, outras citocinas produzidas por células do estroma/osteoblasto devem ter um papel na osteoporose pós-menopausa. O estradiol parece influenciar a secreção de IL-1 e TNF- α dos osteoblastos humanos. Monócitos periféricos circulantes de pacientes ooforectomizados produzem níveis elevados de IL-1 e TNF- α , sendo esse efeito antagonizado pela reposição estrogênica (RAMALHO *et al.*, 2000).

Cohen-Solal e cols. (1993) descrevem que a cultura de monócitos periféricos de mulheres na pós-menopausa tem atividade reabsortiva aumentada *in vitro*, a mesma era bloqueada pelos anticorpos: anti IL-1 e TNF. Manolagas (1995), por outro lado, sugere que o aumento de IL-1 e TNF em animais ooforectomizados é consequência da remoção do efeito inibidor do estrógeno sobre IL-6, deste modo, IL-1 e TNF diferentemente de IL-6, não seriam diretamente suprimidos pelo estrógeno.

Tendo em vista a demonstração da expressão de receptores de estrógeno em células do estroma/ osteoblasto e não em osteoclasto, sugere-se um modelo para explicar o mecanismo de ação do estrógeno no osso: o aumento da reabsorção óssea decorrência da ausência estrogênica, pode ser consequente a um aumento da secreção pelos osteoblastos ou pelas células do estroma da medula óssea de fatores, como as citoquinas, capazes de estimular a osteoclastogênese e um aumento da reabsorção óssea (SARMA *et al.*, 1998).

O estrógeno também atua sobre as células T, tendo em vista que, após a ovariectomia, ocorre aumento da produção de TNF- α por essas células. Ao se ligar ao receptor p55-TNF- α , o TNF- α induz a liberação de M-CSF e RANKL, fatores que

promovem a fusão dos progenitores de osteoclastos (CENCI *et al.*, 2000).

No modelo de ovariectomia bilateral se reproduz à perda óssea acelerada que ocorre em mulheres na pós-menopausa, que é produzida a partir da deficiência de estrogênio (FOLWARCZNA; ZYCH; TRZECIAK, 2010). Os animais ovariectomizados apresentam um aumento na reabsorção óssea osteoclástica e formação óssea osteoblástica reativa com o resultado líquido de uma perda de massa óssea (FREITAS *et al.*, 2011). Durante o período de menopausa os níveis de OPG diminuem, contribuindo para uma maior ligação entre RANKL e RANK, aumentando deste modo a diferenciação de pré osteoclastos em osteoclastos maduros, consequentemente reabsorção óssea progressiva. Quando a expressão de RANKL e OPG é comparável ou a expressão de OPG é maior que a de RANKL, a neoformação óssea ocorre potencialmente (FREEMANTLE *et al.*, 2013; LACEY *et al.*, 1998). Particularmente, o efeito protetor de OPG no osso, não ocorre através da indução da formação óssea para homeostasia ou melhora da microarquitetura, mas através da inibição da reabsorção óssea e aumento da composição mineral (VALENTA *et al.*, 2005; ULRICH-VINTHER; ANDREASSEN, 2005; ULRICH-VINTHER *et al.*, 2005).

As várias funções desta tríade molecular não se limitam ao tecido osseo, embora a literatura seja vasta em relação a este órgão específico; estudos recentes descrevem que o eixo RANK / RANKL / OPG participam de distintas áreas do sistema nervoso central onde desempenha papel no acidente vascular cerebral isquêmico e termoregulação (aspectos observados no período da menopausa), imunidade e tecido mamário, porém mais estudos precisam ser realizados a fim de elucidar os efeitos do eixo RANK/ RANKL / OPG, nos demais tecidos acima mencionados (HANADA *et al.*, 2009; SHIMAMURA *et al.*, 2014).

3.4 Terapia de reposição hormonal

Estudos descrevem que a terapia de reposição hormonal (TRH) é utilizada desde de 1950 e demonstra-se eficaz no alívio da sintomas da menopausa, no entanto, a longo prazo, a utilização deste tipo de tratamento pode trazer algumas complicações para as mulheres, como por exemplo, trombose, e alguns tipos de

câncer, sendo o mais comum o da mama (REMPORT; BLÁZOVICS, 2017).

Cerca de cinquenta por cento da perda óssea relacionada a idade ocorre nos 8-10 anos seguintes à instalação da menopausa. A perda está diretamente ligada à diminuição de estrógeno; isso é bem estabelecido e comprovado pela terapia de reposição hormonal, porém o mecanismo de ação anti-reabsortivo ósseo do estrógeno ainda não está elucidado (RAMALHO *et al.*, 2000)

Conforme já evidenciado, o estrógeno reduz o recrutamento de osteoclasto e/ou seus precursores. Algumas pesquisas sugerem que o efeito do estrógeno seria decorrente de um incremento no apoptose de osteoclasto (JILKA *et al.*, 1992; SARMA *et al.*, 1998). Hughes e cols. (1996) verificaram que 17 β -estradiol promove um incremento na apoptose de osteoclastos em camundongos e que esse efeito é mediado por fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). No entanto, a apoptose de osteoclastos e/ou seus precursores foi avaliada em animais, sendo necessários mais estudos em humanos para elucidação desse efeito.

A família de fatores de transcrição, factor nuclear kappa B (NF-kB) regula a expressão de uma série de genes envolvidos no desenvolvimento e imunidade. Proteínas NF-kB podem ter um papel relevante na osteoporose pós-menopausa regulando a produção de citocinas. Existem evidências de que o estrógeno inibe a produção de IL-6 pelos osteoblastos via receptor de estrógeno, que previne a ligação dos fatores de transcrição NF-kB e NF-IL6 com seus respectivos elementos (ABU-AMER; TONDRAVI, 1997)

Sun e cols. (1998) observaram que o tratamento com estrógeno inibe a degradação protéica, inativando NF-kB. Evidenciaram o efeito da via PKC (proteína C-quinase) para biossíntese e secreção de IL-6 em diferentes células, inclusive em células do estroma de medula óssea humana.

A compreensão sobre o mecanismo de ação do estrógeno poderá elucidar também o mecanismo de ação dos moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs). SERMs são uma nova classe de moléculas não hormonais que se ligam aos receptores de estrogênio e podem funcionar como agonista ou antagonista do estrógeno na dependência do tecido-alvo. O conceito de SERM nasceu a partir de constatações feitas com o tamoxifeno. Alguns estudos demonstraram que o tamoxifeno

previne parcialmente a perda óssea nas mulheres menopausadas, além de promover uma redução sérica do colesterol, mas a utilização prolongada desse medicamento aumenta o risco de câncer de endométrio (LOVE *et al.*, 1992; POWLES; DAVEY; MCKINNA, 1998).

3.4.1 Isoflavona de soja como terapia alternativa de reposição hormonal

O termo fitoestrógenos, compreende uma classe de compostos vegetais, identificados a partir de 300 plantas de 16 famílias diferentes (ADLERCREUTZ, 2002), capazes de exercer efeitos estrogênicos. Nas plantas, esses compostos agem como fungicidas, detêm a herbivoria, regulam os hormônios vegetais e protegem as plantas contra os raios ultravioletas, além disso, funcionam como antioxidantes (BARRET, 1996).

Centenas de alimentos possuem estes compostos, que podem ser agrupados em três classes: as isoflavonas (ISOs), os coumestanos e os lignanos (BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013).

Adlercreutz (2002) descreve a quarta classe de fitoestrógenos que se refere aos micoestrógenos (lactonas do ácido resorcílico), representados pela zeaxalenona e zeaxalenol. Porém as isoflavonas ganham destaque como sendo uma das mais importantes, em virtude de seu consumo elevado por diversos povos que utilizam os grãos como principal fonte alimentar (SETCHELL; CASSIDY, 1999).

São atribuídos a esta classe de princípios ativos naturais uma variedade de efeitos farmacológicos, ressalta-se principalmente a eficácia em aliviar efeitos da menopausa e da tensão pré-menstrual, isso se deve em virtude da semelhança estrutural destes compostos com o hormônio sexual feminino estradiol (VITALE *et al.*, 2012; BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2013).

As ISOs são compostos difenólicos pertencem a uma subfamília dos flavonóides e são encontrados em maior quantidade na soja (*Glycine max*), em produtos a base de soja e em outros tipos de alimentos, como as leguminosas (REINLI; BLOCK, 1996). As concentrações de ISOs e em seus derivados varia e inúmeros fatores são responsáveis por esta variação, incluindo o tipo de alimento

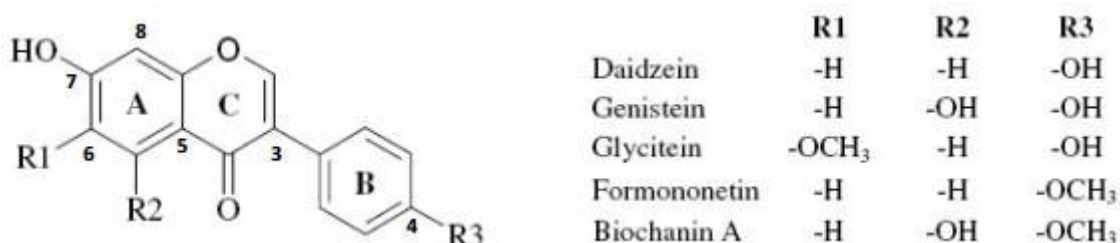
(WANG; MURPHY, 1994a), a localização geográfica do cultivo, a variedade da soja, o ano de colheita, entre outros (WANG; MURPHY, 1994b).

A estrutura química das ISOs possui semelhança com a do 17 β -estradiol. Esses compostos conseguem se ligar com maior afinidade aos receptores estrogênicos do tipo β (ER β). Já os estrógenos apresentam maior afinidade pelos receptores ER α (KUIPER et al., 1998). As ISOs estão presentes nos alimentos e podem se apresentar na forma não-conjugada (aglicona), conjugada (glicosilada), acetilglicosilada e malonilglicosilada, além disso são predominantemente encontradas daidzina e genistina e em menor quantidade, a biocanina A e a formononetina, juntamente com pequenas concentrações de glicetina (MURPHY et al., 1999; SOUKUP et al., 2016).

A unidade estrutural básica das ISOs compreende dois anéis benzênicos (A e B), unidos por um anel pirrólico heterocíclico (C) (Figura 4). Difere-se dos demais componentes do grande grupo dos flavonóides pela posição da ligação entre o anel B e C. Devido à capacidade de estabelecer inúmeras ligações, são conhecidas mais de 370 moléculas de ISOs (RIMBACH et al., 2008).

A soja (*Glycine max*) é uma das principais fontes de ISOs, pois produz três tipos desses compostos, em suas formas livres. Como cada uma das agliconas apresenta quatro formas isoméricas, a soja produz nove diferentes ISOs: as agliconas daidzeína, genisteína e gliciteína; os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; e os derivados glicosilados acetilados 6'' – O – acetildaidzina, 6'' – O – acetilgenistina, 6'' – O – malonilglicitina (FLEURY et al., 1992; WANG; MURPHY, 1994; WANG et al., 1998; GRUN et al., 2001) (Figura 4).

Figura 2. Unidade estrutural básica das isoflavonas de soja.

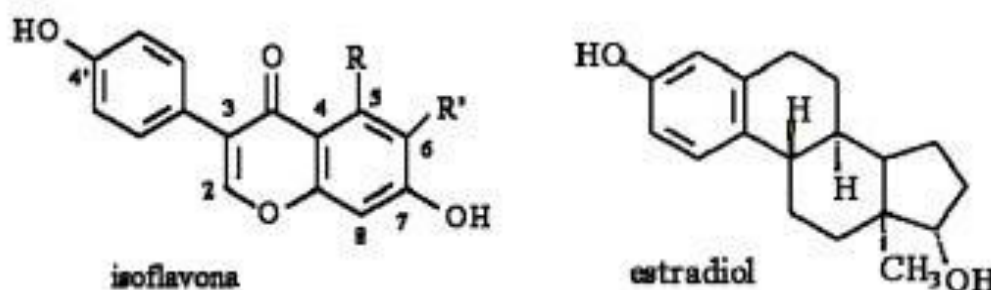


Fonte: Rimbach et al. (2008).

Estas moléculas bioativas, quando estão na forma de agliconas, possuem

estrutura química similar ao estrógeno, principal hormônio sexual feminino. A característica principal que confere similaridade entre esses compostos é a presença do anel fenólico, imprescindível para que haja ligação com o receptor estrogênico (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000; CHOI *et al.*, 2008) (Figura 5).

Figura 3. Estrutura geral das isoflavonas de soja e do estradiol.



Fonte: Adaptado de Cassidy *et al.* (2000).

A biodisponibilidade das ISOs ocorre no lúmen intestinal; enzimas bacterianas, principalmente as β -glicosidases, convertem grande parte dessas moléculas em agliconas. As agliconas atravessam a membrana plasmática dos enterócitos e são absorvidas rapidamente (MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012). Entretanto, esse processo, pode variar em virtude da microbiota intestinal apresentar diferença entre os indivíduos (BECK; ROHR; JUNGBAUER, 2005). Compostos como a daidzina é biotransformada em daidzeína e então em diidrodaidzeína, em seguida, em O-des-metil-angolensina (O-DMA) e equol, principal metabólito ativado de ISOs. O equol não é metabolizado igualmente em humanos, a capacidade individual de transformar ISOs em equol pode oferecer uma explicação para a variedade de resultados dos benefícios da dieta rica em ISOs (SETCHELL; CASSIDY, 1999; SETCHELL; BROWN; LYDEKING-OLSEN, 2002). Por sua vez, a genistina é biotransformada em genisteína, posteriormente em diidrogenisteína e então em 6-hidroxi-O-DMA- e p-etilfenol (composto inerte) (SETCHELL; BROWN; LYDEKING-OLSEN, 2002; MASILAMANI; WEI; SAMPSON, 2012).

Concentrações plasmáticas das ISOs nos indivíduos elevam-se lentamente atingindo valores máximos em aproximadamente 5 e 6 horas, se tratando das agliconas genisteína e daidzeína respectivamente. A biodisponibilidade sistêmica da

genisteína (AUC média = 4,54 mg/mL/h) é maior do que a daidzeína (AUC média = 2,94 mg/mL/h). A meia-vida da genisteína é de aproximadamente 3,8 horas, enquanto que a daidzeína apresenta valores de meia-vida em torno de 7,7 horas (SHELNUTT *et al.*, 2002).

Uma pequena parte destas moléculas é eliminada pelas fezes (cerca de 1-2%), o maior volume dessas substâncias é excretado através da urina, após a conjugação com glicuronídeos, sulfatos e acetatos no fígado (HENDRICH *et al.*, 1994; IRVINE *et al.*, 1998).

O tipo de alimento ou suplemento ingerido influencia diretamente as concentrações plasmáticas das ISOs (CASSIDY; HANLEY; LAMUELA-RAVENTOS, 2000; GENOVESE; LAJOLO, 2002; PINTO; LAJOLO; GENOVESE, 2005); os grãos de soja *in natura* são os que apresentam maior concentração de ISOs. Contudo, é importante considerar a época, região e as condições do plantio.

Estudos que analisaram concentrações de ISOs em 14 variedades de soja desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). O conteúdo de ISOs divergiu consideravelmente entre as variedades, os valores encontrados estão entre 57 e 188 mg de ISOs/100g de grãos de soja, valores que correspondem a aproximadamente 82 - 91% do total de ISOs presentes no grão (GENOVESE; HASSIMOTTO; LAJOLO; 2005). Em contrapartida a farinha de soja apresenta alto valor nutricional, tendo em vista a eliminação de fatores antinutricionais e aumento da digestão proteica (COWARD *et al.*, 1993). Entretanto, o aquecimento reduz significativamente a concentração de ISOs (VISSER; THOMAS, 1987).

4. ARTIGO I

Revista Climacteric

Webqualis B1

Qualis Medicina II

Fator de impacto: 2.807

Modalidade: Artigo de Revisão de Literatura/ Shat Communication

O EIXO RANK/ RANKL/OPG EM CONDIÇÕES DE MENOPAUSA

THE RANK / RANKL / OPG AXIS IN MENOPAUSE CONDITIONS

Fernanda Rosa Gonçalves Santos^a, Lenise Josy Costa Mendes^a, Marilene Oliveira Rocha Borges ^a, Haissa Oliveira Brito^a, Maria Bethânia da Costa Chein^b

^a Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão

^b Department of Medicine III, Federal University of Maranhão

* Corresponding author and reprint requests

Fernanda Rosa Gonçalves Santos

Federal University of Maranhão

Avenida dos Portugueses, 1966. Prédio do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

Campus do Bacanga

CEP. 65080-805

São Luis, Maranhão, Brasil

Tel.:+55 41 (98) 98886-5494

Email: nandarosa6@hotmail.com

RESUMO

O receptor ativador do fator nuclear Kappa B RANK, também conhecido como fator de necrose tumoral(TNF) receptor de citocina induzido por ativação ou receptor de TNF pertencente a superfamília 11A (TNFRSF11A), é uma proteína transmembrana homotrimérica do tipo I, expressa por vários tecidos tais como músculo esquelético, medula óssea, timo, gânglios linfáticos, fígado, cólon, glândulas, próstata, pâncreas, cérebro, rim, pele e células da linhagem monócito/ macrófago. RANKL (Recetor ativador do fator nuclear kappa B- ligante) pertence a superfamília TNF, é uma

proteína de membrana tipo II; embora 3 isoformas de RANKL 1, 2 e 3; tenham sido identificadas, apenas a tipo II homotrimérico transmembrana pode regular diferencialmente osteoclastogênese, RANKL pode ser encontrado como um solúvel e uma forma membranosa. A OPG (osteoprotegerina) é produzida como um receptor solúvel por células estaminais mesenquimatosas (MSCs), células de osteoblastos e vários outros tipos de células e tem demonstrado função inibitória para a sinalização RANKL-RANK, fornecendo equilíbrio no processo de remodelação óssea. As atividades opostas de OPG e RANKL podem ser moduladas pelo hormônio estradiol (E2) , o mesmo influencia osteoclastogênese, medeia o tempo de vida dos osteoblastos e osteoclastos, aumentando o nível de OPG em relação ao RANKL. Estudos sugerem que o tratamento com E2 apresentou ação inibitória da capacidade das células hematopoiéticas para formar osteoclastos maduros e diminuiu a produção de RANKL nas células da medula óssea. Essas mudanças observadas no potencial osteoclástico das células da medula óssea estão provavelmente envolvidas com a capacidade do E2 para regular a massa óssea. Os estudos que relatam efeitos da soja, ainda são escassos, em um dos poucos trabalhos relatados na literatura, descrevem que o tratamento com isoflavonas de soja estimulam a secreção de OPG e inibe a diferenciação de osteoclasto induzida pelo RANKL, através da supressão da ativação de um fator nuclear ativado por células T, sugerindo então a participação indireta da soja no metabolismo ósseo através do eixo OPG/RANK/RANKL.

Palavras-chave: MENOPAUSA. RANK. RANKL. OPG. ISOFLAVONA DE SOJA. ESTROPROGESTATIVO.

ABSTRACT

The nuclear factor activating receptor Kappa B RANK, also known as TNF (tumor necrosis factor) receptor-induced cytokine receptor or TNF receptor belonging to the superfamily 11A (TNFRSF11A), is a type I homotrimeric transmembrane protein expressed by several tissues such as skeletal muscle, bone marrow, thymus, lymph nodes, liver, colon, glands, prostate, pancreas, brain, kidney, skin and cells of the monocyte / macrophage lineage. RANKL (nuclear activator receptor kappa B-linker)

belongs to the superfamily TNF, is a membrane protein type II; although 3 isoforms of RANKL 1, 2 and 3; have been identified, only Type II homotrimer transmembrane can regulate differentially osteoclastogenesis, RANKL can be found as a soluble and a membranous form. OPG is produced as a soluble receptor by mesenchymal stem cells (MSCs), osteoblast cells and several other cell types and has demonstrated an inhibitory role for RANKL-RANK signaling, providing balance in the bone remodeling process. Opposing activities of OPG and RANKL can be modulated by the hormone estradiol (E2), the same influence osteoclastogenesis, mediates the life span of osteoblasts and osteoclasts, increasing the level of OPG in relation to RANKL. Studies suggest that treatment with E2 showed an inhibitory action on the ability of hematopoietic cells to form mature osteoclasts and decreased the production of RANKL in bone marrow cells. These changes observed in the osteoclastic potential of bone marrow cells are probably involved with the ability of E2 to regulate bone mass. Studies reporting the effects of soy are still scarce in one of the few papers reported in the literature to describe that treatment with soy isoflavones stimulates OPG secretion and inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation by suppressing the activation of a nuclear factor activated by T cells, thus suggesting the indirect participation of soybean in bone metabolism through the OPG / RANK / RANKL axis.

Keyword: MENOPAUSE. RANK. RANKL. OPG. SOYBEAN ISOFLAVONE. ESTROPROGESTATIVO

RANK/ RANKL/ OPG

O receptor ativador do fator nuclear Kappa B RANK, também conhecido como TNF (fator de necrose tumoral) receptor de citocina induzido por ativação ou receptor de TNF pertencente a superfamília 11A (TNFRSF11A), é uma proteína transmembrana homotrimérica do tipo I, expressa por vários tecidos tais como músculo esquelético, medula óssea, timo, gânglios linfáticos, fígado, cólon, glândulas, próstata, pâncreas, cérebro, rim, pele e células da linhagem monócito/ macrófago (precursores e osteoclastos maduros, células B e T, células dendríticas, fibroblastos e

condrócitos articulares)¹⁻⁴.

RANKL (Receptor ativador do fator nuclear kappa B- ligante) pertence a superfamília TNF, é uma proteína de membrana tipo II⁵⁻⁶; embora 3 isoformas de RANKL 1, 2 e 3; tenham sido identificadas, apenas a tipo II homotrimérico transmembrana pode regular diferencialmente osteoclastogênese, RANKL pode ser encontrado como um solúvel e uma forma membranosa. A forma solúvel possui baixa capacidade para originar osteoclastos⁷.

Tnfsf11 é o gene que codifica a proteína RANKL, se localiza no cromossoma humano 13q14 e em rato no cromossoma 14⁸.

No camundongo RANKL possui comprimento total 316 aminoácidos, 83% de homologia de sequência com RANKL humano, além de homologia próxima com os membros TNFSF, TRAIL, FasL e TNF- α ⁷; consiste num domínio C-terminal de interação com o receptor extracelular e um domínio transmembranar⁹; no tecido ósseo RANKL é expresso principalmente em osteoblastos, células sinoviais e sua expressão pode ser induzida por IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17, TNF α , vitamina D3, prostaglandina E₂ (PGE₂), hormônio paratiroide (PTH)¹⁰, TGF- β ¹¹, ligantes de Wnt¹² e LPS¹³ entre outros diversos fatores¹⁰.

Anteriormente a descoberta do RANKL, foi identificado que fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) é necessário para bloquear a apoptose de progenitores de osteoclastos, sendo necessária para o desenvolvimento dos osteoclastos¹⁴ M-CSF apoia a proliferação e sobrevivência dos osteoclastos precursores através da ligação de seu receptor, c-Fms e recrutamento a proteína 2 ligada ao receptor do fator de crescimento, Fosfatidilinositol 3K / Akt e fosfolipase C γ (PLC γ)¹⁵.

Estas duas citocinas em conjunto com RANKL, são fatores necessários para os osteoblastos induzirem os precursores de osteoclastos a se diferenciarem em osteoclastos maduros: O M-CSF atua como fator de sobrevivência dos progenitores, enquanto RANKL-RANK fornece sinal instrutivo de linhagem de osteoclastos¹⁶.

RANKL possui dois receptores, o RANK, e a OPG (osteoprotegerina) ou TNFRSF11B. A OPG é produzida como um receptor solúvel por células estaminais mesenquimatosas (MSCs), células de osteoblastos e vários outros tipos de células e

tem demonstrado função inibitória para a sinalização RANKL-RANK, fornecendo equilíbrio no processo de remodelação óssea^{14,17,18}.

A identificação molecular de reguladores da reabsorção e formação óssea acontece através de uma das principais vias de diferenciação e ativação dos osteoclastos e envolve o sistema, RANK/ RANKL/ OPG. O RANKL é uma molécula importante para a diferenciação das células hematopoiéticas progenitoras em osteoclastos maduros e desempenha seus efeitos através de sua ligação ao receptor RANK. Por outro lado, a osteoclastogênese é bloqueada na presença da OPG, uma vez que quando OPG está ligada ao RANKL, este não pode se ligar ao RANK, impossibilitando dessa forma que as células osteoprogenitoras se diferenciem em osteoclastos e não haja reabsorção óssea¹⁹. O desequilíbrio desse sistema RANK/RANKL/OPG é observado na osteoporose. Além do osso, essas substâncias também estão relacionadas à efeitos em outros tecidos como cérebro e mama²⁰.

As várias funções desta triade molecular não se limitam aos ossos. Estudos recentes descrevem que o sistema RANK / RANKL / OPG participam de distintas áreas do sistema nervoso central onde desempenha papel no acidente vascular cerebral isquêmico e termoregulação, imunidade e tecido mamário^{21,22}. Além disso, a expressão e função do metabolismo RANK / RANKL / OPG é fortemente influenciada por hormônios sexuais femininos, enquanto algumas de suas funções podem ser observadas no gênero masculino e feminino, outras ocorrem especificamente na fisiologia feminina e serão discutidas durante o decorrer deste artigo.

Eixo RANK/ RANKL/ OPG X EFEITOS NA MENOPAUSA

Vários hormônios e citocinas regulam as expressões de RANK, RANKL e OPG bloqueando ou removendo a formação de osteoclastos em diferentes fases de proliferação^{23,24}. O estrogênio possui um papel crítico na homeostase do osso, através da ação de dois tipos de células principais do osso, osteoblastos responsáveis pela formação óssea e os osteoclastos por reabsorção óssea²⁵.

A perda E2 que ocorre durante o período da menopausa provoca perda óssea grave, elevando a ocorrência de fraturas ósseas e osteoporose. Além disso ocorre

uma regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias IL1, IL6 e TNF- α e diminuição no TNF- β , ocorrendo deste modo aumento da atividade osteoclástica e consequentemente perda óssea²⁶.

As atividades opostas de OPG e RANKL podem ser moduladas pelo hormônio estradiol (E2), o mesmo influencia osteoclastogênese, medeia o tempo de vida dos osteoblastos e osteoclastos, aumentando o nível de OPG em relação ao RANKL^{27,28}.

As patologias ósseas mais comuns causadas diretamente por lesões genéticas ao sistema RANK-RANKL-OPG surgem devido a desregulação homeostática e alterações hormonais, por exemplo a osteoporose pós-menopausa, caracterizada pelo enfraquecimento dos ossos e propensão a fraturas em decorrência da perda óssea provocada por um desequilíbrio na formação do tecido ósseo^{29,30}.

De acordo com achados de Taxel e colaboradores³¹, o tratamento com E2 apresentou ação inibitória da capacidade das células hematopoiéticas para formar osteoclastos maduros e diminuiu a produção de RANKL nas células da medula óssea. Essas mudanças observadas no potencial osteoclástico das células da medula óssea estão provavelmente envolvidas com a capacidade do E2 para regular a massa óssea.

RANK/ RANKL/ OPG X TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL X SOJA

A terapia de reposição hormonal (TRH), em uma combinação de estrogênio e progesterona ou estrogênio isolado, tem mostrado efeito positivo na inibição da atividade dos osteoclastos e restauração da massa óssea²⁶.

Estudo realizado por Rahnama e colaboradores³² demonstraram que a TRH possui efeito benéfico na densidade mineral óssea (DMO) de pacientes após a menopausa. Os dados sugerem que pode haver uma correlação entre as concentrações de RANKL / OPG e DMO. Além disso os resultados obtidos indicam que houve aumento nas concentrações OPG e diminuição do RANKL. Mas ressaltam a necessidade de pesquisas futuras realizadas em um grupo mais amplo de pacientes para confirmar estes achados.

Contudo, o tratamento prolongado com estrogênio aumenta o surgimento de efeitos colaterais, como o desenvolvimento de câncer de mama, complicações a nível

de encefalopatia, demência, ataque cardíaco e acidente vascular cerebral^{21,22}.

Várias mulheres apresentam contraindicações a TRH com estrógenos, os fitoestrógenos que se referem a uma classe de compostos derivados de plantas que possuem atividade estrogênica. Centenas de alimentos possuem estes compostos a maioria pertence a uma das três classes de fitoestrógenos seguintes: isoflavonas (ISOs), lignanas e coumestanos³³.

A terapia de reposição hormonal (TRH) a base de ISOs tem se mostrando eficaz diminuindo sintomas da menopausa, uma vez que as mulheres que consomem soja apresentam aproximadamente 90% de redução desses sinais, evidenciando que a soja e seus princípios ativos, podem ser consideradas uma alternativa eficaz na reposição hormonal, no período da menopausa³³⁻³⁵.

Os estudos que relatam efeitos da soja no eixo RANK/RANKL/OPG ainda são escassos, destacando-se Park e colaboradores³⁶ descrevendo que o tratamento com isoflavonas de soja estimulam a secreção de OPG e inibe a diferenciação de osteoclasto induzida pelo RANKL, através da supressão da ativação de um fator nuclear ativado por células T, sugerindo então a participação indireta da soja no metabolismo ósseo através deste eixo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o presente momento são escassos os estudos relacionados ao período da menopausa e o metabolismo OPG/RANK/RANKL, são necessários que mais estudos sejam realizados abordando esta problemática, tendo em vista que os efeitos desta tríade são descritos em vários órgãos afetados durante esse período, no entanto a fisiologia ainda não está bem descrita (em todos esses tecidos), além disso vale ressaltar o crescente número de mulheres que são acometidas com as desordens ocasionadas pelo desequilíbrio deste eixo, compreendendo os mecanismos de ação dessas substâncias nos tecidos alvos, pode ser possível a criação de novos alvos terapêuticos que possibilitem o equilíbrio dos efeitos exacerbados que podem ocorrer em condições patológicas.

REFERÊNCIAS

1. Tat ST, Pelletier JP, Velasco CR, *et al.* New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio J Med* 2009;58:29-40.
2. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:139-146.
3. Lopes CJ, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port* 2007;32:103-110.
4. Geusens P. Emerging treatments for postmenopausal osteoporosis – focus on denosumab. *Clin. interv. aging* 2009;4:241-250.9.
5. Lam, J., Nelson CA., Ross, F.P. *et al.* Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J. Clin. Invest.* 2001;108:971–979.
6. Ito, S, Wakabayashi K, Ubukata, *et al.* Crystal structure of the extracellular domain of mouse RANK ligand at 2.2-Å resolution. *J. Biol. Chem* 2002; 277: 6631–6636.
7. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, *et al.* Protein expression and functional difference of membranebound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:768-775.
8. Wong BR, Josien R, Lee SY, *et al.* TRANCE (tumornecrosisfactor [TNF]-related activation induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997;186(12):2075–2080.
9. Silva I, Branco JC. RANK / RANKL / OPG: literature review. *Acta Reumatol Port* 2011;36(3):209–218.
10. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1143, 123–150.
11. Murakami T, Yamamoto M, Ono K, *et al.* Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 252(3):747–752. 9723
12. Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, *et al.* Regulatory mechanism of

osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:21–30.

13. Nagasawa T, Kobayashi H, Kiji M, *et al.* LPS stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. *Clin Exp Immunol* 2002;130(2):338–44.

14. Lacey DL, Timms E, Tan HL, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93: 165–176.

15. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis – current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008;8: 204–216.

16. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, *et al.* RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006; 12: 17–25

17. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309–319.

18. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocr* 1998; 139: 1329–1337.

19. Nardone, V, Asta, F, Brandi, M. L. Pharmacological management of osteogenesis. *Clinics* 2014; 69(6):438–446

20. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v.15, p. 337–342, May/2003.

21. Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T *et al.* Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature* 2009; 462: 505–509.

22. Shimamura M, Nakagami H, Osako MK *et al.* OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2014; 111: 8191–8196.

23. Evelyn RS, Bonomo A, Schneider HG *et al.* Structural requirements for the action of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) on bone resorption by isolated osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 85–93.

24. Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, *et al.* Induction of calcitonin receptors by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. *Endocr* 1988; 123: 1504–1510.

25. Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL *et al.* The actions and interactions of sex steroids and growth factor/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* 13: 819-828, 1999.
26. Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1068: 173–179.
27. Bord S, Ireland DC, Beavan SR *et al.* The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 2003; 32: 136–141.
28. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR *et al.* Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocr* 1999; 140: 4367–4370.
29. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev* 2007;65(12 Pt2):147–51.
30. Raisz LG, Rodan GA. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003 32(1):15–24.
31. Taxel P, Kaneko H, Lee SK, *et al.* Estradiol rapidly inhibits osteoclastogenesis and RANKL expression in bone marrow cultures in postmenopausal women: a pilot study. *Osteoporos Int* 2008;19:193–199.
32. Rahnema M, Jamrogiewicz IJ, Jamrogiewicz R, *et al.* Influence of Hormone Replacement Therapy on Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Concentrations in Menopausal Women. *J Interferon Cytokine Res* 2013;33(9):485-492.
33. Bedell S, Nachtigall M, Naftolin F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;31(4): 400-419.
34. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, *et al.* Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J Nutr Biochem* 2013;24(4): 613- 623.
35. Moreira AC, Silva AM, Santos MS, *et al.* Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 2014;143:61- 71.
36. Park K, Ju W, Yeo J, *et al.* Increased OPG/RANKL ratio in the conditioned medium of soybean-treated osteoblasts suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. *Int J Mol Med* 2014;33:178-184.

5. ARTIGO II

Revista Biomedicine & Pharmacotherapy

Webqualis B1

Qualis Medicina II

Fator de impacto: 3.457

Modalidade: Artigo Original

EFEITO DO TRATAMENTO COM ISOFLAVONAS DE SOJA NO EIXO OPG/RANK/RANKL (OSTEOPROTEGERINA/ RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA B/RANK LIGANTE) EM ANIMAIS NA MENOPAUSA

EFFECT OF TREATMENT WITH ISOFLAVONES OF OPG / RANK / RANKL AXIS (OSTEOPROTEGERINA / ACTIVATOR RECEIVER OF KAPPA B NUCLEAR FACTOR / RANK LIGANTE) IN ANIMALS IN THE MENOPAUSE

Fernanda Rosa Gonçalves Santos^a; Lenise Josy Costa Mendes^b; Carlos Alvaro Almeida Pessoa^c; Letícia Prince Pereira^d; Katia Regina Assunção Borges^e; Marilene Oliveira Rocha Borges^f; Ana Paula Silva de Azevedo^g; Melaine Mont' Alverne Lawall Silva^h; Haissa Oliveira Britoⁱ; Maria Bethânia da Costa Chein^j;

^a Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto- Universidade Federal do Maranhão-UFMA.

Autor Correspondente: Endereço: Alameda 6, bloco C, Ap 203, Condomínio Bienen Vista, Bequimão, São Luís- MA. CEP: 65061-550. Brasil. Email: nandarosa6@hotmail.com.

^b Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto-Universidade Federal do Maranhão-UFMA.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966. Prédio do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus do Bacanga, São Luís- MA. CEP:65080-805. Brasil. Email: lenisenutri@gmail.com.

^c Laboratório de pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia (LPPF)- Universidade Federal do Maranhão- UFMA.

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís – MA. CEP: 65080-805.

Brasil. Email: carlospessoa15@hotmail.com

^d Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (LIAC)- Universidade Federal do Maranhão- UFMA.

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís – MA. CEP: 65080-805. Brasil. Email: leticiaprince22@hotmail.com

^e Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto-Universidade Federal do Maranhão-UFMA.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966. Prédio do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus do Bacanga, São Luis- MA. CEP:65080-805. Brasil. Email: kareborges@gmail.com.

^f Departamento de Ciências Fisiológicas- Universidade Federal do Maranhão- UFMA. Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís – MA. CEP: 65080-805. Brasil. Email:morborges@yahoo.com.br

^g Departamento de Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Maranhão- UFMA. Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís – MA. CEP: 65080-805. Brasil. Email: apsazevedo@yahoo.com.br

^h Departamento de Morfologia- Universidade Federal do Maranhão- UFMA. Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís – MA. CEP 65080-805. Brasil. Email:melainelawall@yahoo.com.br

ⁱ Departamento de Ciências Fisiológicas- Universidade Federal do Maranhão- UFMA. Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís – MA. CEP: 65080-805. Brasil. Email:haissabrito@gmail.com

^j Departamento de Medicina III- Universidade Federal do Maranhão- UFMA. Endereço: Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís – MA. CEP: 65080-805. Brasil. Email: mbccheingmail.com

RESUMO

O presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos das isoflavonas de soja, no eixo OPG/RANK/RANKL em ratas na menopausa. Foram utilizadas ratas Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, os animais foram submetidos a cirurgias de falso-operado (SHAM) e ooforectomia (OOF), em seguida foram divididos em 4 grupos experimentais: Grupo 1: falso-operado tratado com solução salina, Grupo 2:

Ooforectomizado tratado com solução salina, Grupo 3: Ooforectomizado tratado com estroprogestativo (EP), Grupo 4: Ooforectomizado tratado com isoflavonas de soja (ISO), via oral, durante dois meses. Foram determinados: peso corporal, tecido adiposo, peso uterino, parâmetros bioquímicos, dosagem hormonal, OPG e RANKL no soro, RANKL no fluido cerebrospinal (CSF), imunohistoquímica para imunomarcagem de receptores RANK e todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, San Diego, California, E.U.A. Os tratamentos não reverteram o aumento de peso corporal induzido pelo hipoeestrogenismo. O tecido adiposo dos animais não reduziu com os tratamentos, observou-se que a OOF ($0,28 \pm 0,05$ g) induziu atrofia do útero, comparado com o grupo SHAM ($0,88 \pm 0,07$ g). O cálcio sérico do grupo OOF diminuiu ($15,5 \pm 2,6$ mg/dL). O grupo EP restabeleceu os valores de cálcio. Os níveis plasmáticos de magnésio permaneceram iguais em todos os grupos. Os níveis de estradiol não aumentaram com os tratamentos, verificou-se que a progesterona foi restabelecida nos grupos EP e ISO quando comparados com o grupo OOF. Os níveis de RANKL no CSF, RANKL e OPG no soro diminuíram com os tratamentos. A expressão de RANK no útero aumentou com os tratamentos se assemelhando ao grupo SHAM, no colo do útero o tratamento com ISO aumentou a expressão de RANK e na glândula mamária esta expressão apresentou-se de forma igual em todos os grupos. Sugere-se que as ISOs possuem efeito na regulação do eixo OPG/RANK/RANKL uma vez que o tratamento com esse composto diminui níveis de RANKL e aumenta a expressão do receptor RANK em tecidos chegando a se assemelhar com condições basais.

Palavra-chave: MENOPAUSA. OPG/RANK/RANKL. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effects of soy isoflavones on the OPG / RANK / RANKL axis in menopausal rats. Wistar rats of the *Rattus norvegicus* species were used, the animals were submitted to False-operated Surgery (SHAM) and oophorectomy (OOF), then divided into 4 experimental groups: Group 1: False-operated treated with saline solution, Group 2 : Oophorectomy treated with saline solution, Group 3: Oophorectomy treated with estroprogestative (EP), Group 4: Oophorectomized treated with soy isoflavones (ISO), orally, for two months. Body weight, adipose tissue, uterine weight, biochemical parameters, hormonal dosage, OPG and RANKL in serum, RANKL in cerebrospinal fluid (CSF), immunohistochemistry for immunoblotting of RANK receptors and all statistical calculations were performed using the statistical program *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, San Diego, California, E.U.A. Treatments did not reverse the increase in body weight induced by hypoeestrogenism. The adipose tissue of the animals did not reduce with the treatments, it was observed that the OOF (0.28 ± 0.05 g) induced atrophy of the uterus, compared to the SHAM group (0.88 ± 0.07 g). The serum calcium of the OOF group decreased (15.5 ± 2.6 mg / dL). The EP group reestablished the values of calcium. Plasma magnesium levels remained the same in

all groups. The levels of estradiol did not increase with the treatments, it was verified that the progesterone was reestablished in the EP and ISO groups when compared with the OOF group. RANKL levels in CSF, RANKL and serum OPG decreased with the treatments. The expression of RANK in the uterus increased with treatments resembling the SHAM group, in the cervix the treatment with ISO increased the expression of RANK and in the mammary gland this expression appeared equally in all groups. It is suggested that the ISOs have an effect on the regulation of the OPG / RANK / RANKL axis since treatment with this compound decreases RANKL levels and increases the expression of the RANK receptor on tissues, even if it is characterized by basal conditions.

Keyword: MENOPAUSE. OPG/RANK/RANKL. ANIMAL EXPERIMENTATION

Introdução

A Menopausa está associadas à diminuição da biossíntese de hormônios esteroides sexuais, caracteriza-se pelo término permanente dos períodos menstruais, em espaço de tempo igual ou superior a doze meses, resultando em problemas estruturais e fisiológicos, como distúrbios no metabolismo relacionados a alterações de peso, distribuição da composição corpórea, cardiovasculares, musculoesqueléticas, osteoporose, disfunção dos lipídeos, da glicose e insulina, ondas de calor, tonturas e palpitações, depressão e irritabilidade, diminuição da libido, alterações no trato genituario, nos tecidos vulvar, clitoriano, parede vaginal uretral, periuretral, tecidos da bexiga, entre outros¹⁻⁷.

A identificação molecular de reguladores da reabsorção e remodelação óssea ocorre através de uma das principais vias de diferenciação e ativação dos osteoclastos. A proteína Recetor ativador do fator nuclear kappa B Ligante (RANKL) é o fator chave para separação e demarcação dos osteoclastos, fusão em osteoclastos multinucleares e ativação de suas formas maduras, além de inibição de apoptose de osteoclastos⁸. O RANK (Recetor ativador do fator nuclear kappa B) e o receptor de RANKL se ligam e como resultado ocorre a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, o aumento da atividade dos osteoclastos e inibição da atividade osteoclástica está diretamente relacionada ao equilíbrio destas ligações⁹.

A osteoprotegerina (OPG), uma citocina dimérica e solúvel produzida nos osteoblastos ativados, funciona como uma "armadilha de receptores" para RANKL, consequentemente, inibe a diferenciação de pré- osteoclastos em osteoclastos maduros. Nesse mecanismo, OPG desempenha papel de inibidor de reabsorção óssea, bem como o fator de regulação da massa óssea, supressor da diferenciação dos osteoclastos, bloqueio de sua atividade e indução de apoptose de osteoclastos¹⁰.

O hormônio estrógeno atua sobre a via RANK/RANKL/OPG, descoberta a priori com efeitos relacionados ao osso (formação de osteoclastos), porém seus efeitos estão relacionados a outros tecidos como cérebro, mama, sistema imunológico entre outros^{11,12}. Ao agir sobre células mesenquimais osteoprogenitoras/osteoblastos, o estrógeno promove redução dos níveis de RANKL e aumento da produção de OPG¹³. Deste modo, OPG que apresenta níveis aumentados¹⁴, liga-se ao RANKL e impede a interação deste com o RANK (presente em precursores de osteoclastos), inibindo, consequentemente, a diferenciação de osteoclastos maduros¹⁵.

Protocolos de terapia de reposição hormonal (TRH) para mulheres na menopausa, ou aquelas em início de pós-menopausa, foram desenvolvidos para melhorar sintomas e prevenir doenças relacionadas ao declínio da secreção hormonal. A TRH pode ser administrada através de uma formulação combinada (estrogênio + progesterona) estroprogestativo, ou somente com estrogênio^{16,17}. Entretanto, a prescrição de TRH pode estar associada a maior incidência de cânceres estrogênio dependente, doenças cardíacas, derrame, tromboembolismo, entre outros efeitos colaterais. Deste modo, é apropriado ressaltar os riscos ao aconselhar mulheres na menopausa¹⁸.

Estudos tem demonstrados os benefícios da TRH a base de ISOs, uma vez que as mulheres que consomem soja apresentam aproximadamente 90% de redução das alterações vivenciadas a menopausa, deste modo evidencia-se que a soja e seus princípios ativos, podem ser consideradas uma alternativa eficaz na reposição hormonal, no entanto, no que diz respeito ao eixo OPG/RANK/RANKL, os dados ainda são escassos, porém sugere-se a participação indireta da soja no metabolismo ósseo, através da regulação do eixo acima mencionado^{19,20,3,21}.

Diante do exposto, faz-se necessário que mais estudos sejam realizados a fim

de elucidar os efeitos das isoflavonas de soja, amplamente utilizadas no mercado como fitoestrogenos no tratamento da menopausa, no eixo OPG/RANK/RANKL em órgãos acometidos durante esse período como: osso, cérebro, mama e útero.

Metodologia

Drogas

Foram utilizados o estrogênio conjugado 0,45 mg associado com acetato de medroxiprogesterona 1,5 mg, em forma de comprimido com o nome comercial *Selecta*. As Isoflavonas de soja foram obtidas na forma de cápsulas, com o nome comercial *Glicyne Max* na concentração de 250 mg.

Animais

Foram utilizadas ratas Wistar da espécie *Rattus norvegicus*, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), com pesos variando entre 250 e 300 gramas, com acesso *ad libitum* à ração e água, mantidas em ciclos alternados de luminosidade de 12 horas, com temperatura de 20 a 25° C. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para o cuidado com animais de laboratório e com as considerações éticas descritas nos protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais UFMA e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), certificado de aprovação nº 23115.003778/2017-35 (anexo 1).

Os animais foram distribuídos em 4 grupos: *Grupo 1 – Falso operado (sham operated) e tratado com solução salina (veículo)*- Constituído por ratas submetidas a uma falsa cirurgia tratadas com solução salina 0,9% que foi o veículo utilizado para a solubilização e diluição dos hormônios (efeito placebo), em volume de 0,1 ml/ 100g de peso dos animais. *Grupo 2 – Ooforectomizado e tratado com solução salina (veículo)*- Os animais foram tratados com solução salina 0,9%. *Grupo 3 – Ooforectomizado e tratado com estrogênio conjugado associado com acetato de medroxiprogesterona (estroprogestativos)*- Após 30 dias da ooforectomia as ratas foram tratadas com o

hormônio na dose de 20 µg/Kg de peso do animal. *Grupo 4 - Ooforectomizado e tratado com isoflavonas de soja*- Após 30 dias da ooforectomia as ratas foram tratadas, com o fitohormônio na dose de 250 mg /Kg de peso do animal. Todos os tratamentos foram realizados diariamente, via gavagem, por um período de dois meses.

Cirurgias de Falso-Operado (Sham- opereted) e Ooforectomia

Para realizar este procedimento, as ratas foram submetidas e mantidas com anestesia por uma solução contendo soro fisiológico e cetamina/xilasina (2,5/ 1,5/ 0,5 ml/kg, intraperitoneal) durante todo o período cirúrgico. Foi realizada a assepsia da região ventral dos animais (supra-púbica) para posterior laparotomia de aproximadamente 2cm na linha mediana. Os ovários e as trompas foram identificados. As trompas foram ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Posteriormente a incisão foi suturada. Animais falso-operados (sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, mas os ovários e as trompas permaneceram intactos²².

Determinação do peso corporal dos animais

Durante todo o período de tratamento foi realizado o controle de peso corporal das ratas, os animais foram pesados diariamente para a determinação do volume das drogas administradas.

Determinação do tecido adiposo e peso uterino

Após a exsanguinação das ratas, o intestino foi rebatido para melhor exposição do tecido adiposo e dos cornos uterinos que foram isolados em conjunto e retirados em toda sua extensão para determinação do peso úmido em balança analítica.

Coleta de sangue para determinar parâmetros bioquímicos, dosagem hormonal, OPG e RANKL

Amostras de sangue foram coletadas a partir da artéria aorta abdominal utilizando escalpe nº 21, o plasma foi imediatamente separado por centrifugação a 3500 rpm, a temperatura ambiente durante 10 min. Os níveis plasmáticos de cálcio e magnésio, foram dosados por calorimetria (Bioclin K051, Bioclin K116) e a reação foi realizada de acordo com instruções do fabricante, foram dosados hormônios estradiol, progesterona pelo método ELISA (Monobind Inc. E.U.A) e OPG, RANKL pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Abbott Laboratories, Illinois, E.U.A.) e a reação foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes.

Coleta de fluido cerebroespinal para quantificação de RANKL

O líquido cerebroespinal (CSF) foi aspirado diretamente através de um escalpe tamanho 21 com acesso à cisterna magna e o volume coletado variou entre 50 a 100 µl. As amostras foram coletadas em tubos sob gelo e posteriormente foram armazenadas em -80°C para posterior análise. Os níveis de RANKL foram quantificados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (ELISA, Cayman Chemicals Company, Ann Arbor, E.U.A)

Reações para imunohistoquímica por peroxidase para imunomarcação de receptores RANK

Secções (5 mm) de tecidos (útero, colo do útero e mama) previamente fixados em ALFAC e embebidas em parafina foram colocados em lâminas de vidro e silanizados duas vezes com xileno, seguido de re-hidratação através de um banho de álcool crescente. Para bloquear radicais aldeídicos, cada secção foi tratada com glicina (0,1 M) e com 3% de peróxido de hidrogênio em metanol para bloquear a peroxidase endógena. As fatias foram tratadas com 1% de albumina de soro bovino (BSA) em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) para diminuir a coloração não específica. Os cortes foram então incubados com anticorpos anti-RANK (com diluição

de 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA) em PBS / BSA a 1% em temperatura ambiente sob câmara úmida durante 2 hs e lavou-se com PBS / BSA a 1%. Em seguida, as secções foram incubadas utilizando um secundário IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA), 1:50 diluída em PBS / BSA a 1% à temperatura ambiente em câmara úmida durante 1 h. Os locais de ligação de peroxidase foram detectadas por coloração com Kit DAB substrato (BD Bioscience, Califórnia, EUA), e incubados durante 15 min. Finalmente, as fatias foram contrastadas com hematoxilina de Mayer e, em seguida, desidratadas e montadas.

Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA One-Way) de duas vias (Two-way) para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni, para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p=0,05$). Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, San Diego, California, E.U.A.

RESULTADOS

Efeito do tratamento com Estroprogestativos e Isoflavonas de soja sobre o peso corporal

O peso corporal dos animais do grupo falso-operado (SHAM), apresentaram desenvolvimento regular durante o período do experimento, com o peso final de (269,0 $\pm$ 3,4 g). A ooforectomia induziu um aumento de 17% no peso dos animais na 8ª semana. Os tratamentos com Estroprogestativo (EP) e Isoflavonas de soja (ISO) não alteraram significativamente o aumento de peso induzido pelo hipoestrogenismo.

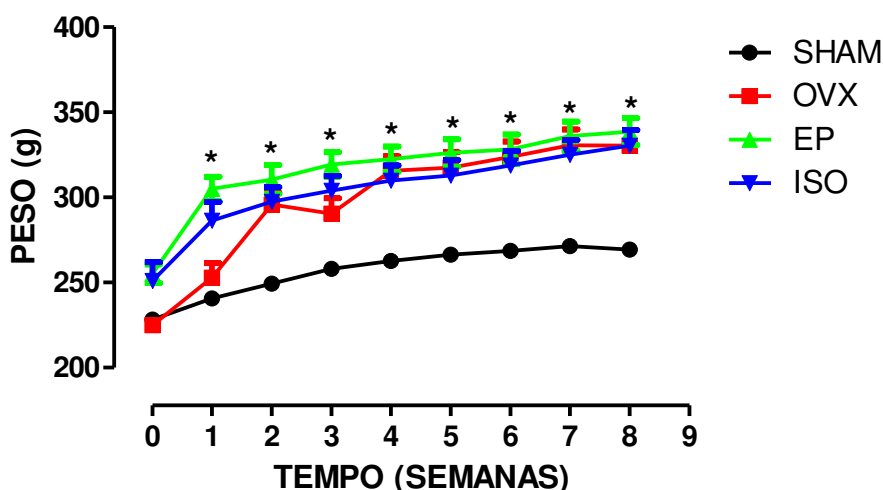


Figura 3. Peso corporal de ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM), ooforectomizadas (OOF), que receberam NaCl 0,9%, ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem) e ooforectomizadas tratadas com Isoflavonas de Soja (ISO, 250 mg/Kg, via gavagem). Cada linha e símbolo representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=8-12$). Os valores foram considerados diferentes com $*p < 0,05$ em relação ao grupo SHAM (One-way ANOVA, Bonferroni).

Efeito do tratamento com Estroprogestativos e Isoflavonas de soja em ratas ooforectomizadas sobre o peso do Tecido adiposo e do útero

Os animais submetidos a ooforectomia (OOF, EP e ISO) apresentaram percentuais de tecido adiposo aumentados em relação ao grupo SHAM, porém não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O tecido adiposo dos animais do grupo OOF apresentou aumento de 52% em relação ao grupo SHAM ($3,23 \pm 0,35$ g%). No que diz respeito ao peso do útero, verificamos que a ooforectomia induziu a diminuição de aproximadamente 75 % do órgão, sendo está redução evidenciada pelo peso do útero no grupo OOF ($0,28 \pm 0,05$ g), comparado ao grupo SHAM ($0,88 \pm 0,07$ g). Nos grupos tratados com Isoflavona de soja e estropogestativo não houve aumento da massa uterina quando comparados com o OOF tratado com veículo.

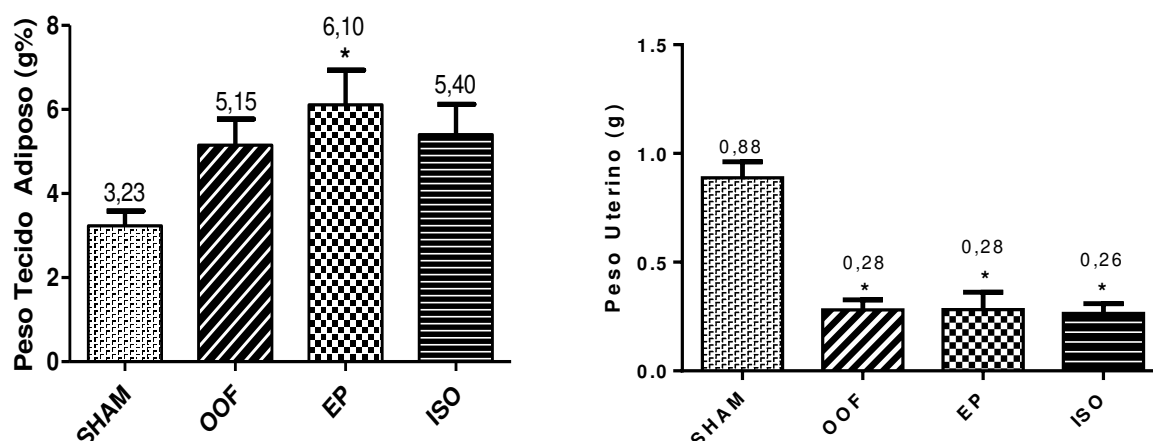


Fig 04. Efeito do tratamento de 8 semanas na determinação do tecido adiposo e peso uterino de ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, ooforectomizadas (OOF) administradas com NaCl 0,9%, ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem) e ooforectomizadas tratadas com Isoflavonas de Soja (ISO, 250 mg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias $\pm$ erro padrão das médias (n=11-15; n=9-15). * $p < 0,05$ em relação ao SHAM (ANOVA/ Bonferroni).

Efeito do tratamento com Estroprogestativos e Isoflavonas de soja em ratas ooforectomizadas sobre os níveis Plasmáticos de Cálcio e Magnésio

Os níveis séricos de cálcio foram diminuídos nos animais submetidos a cirurgia de ooforectomia ($12,46 \pm 1,8$ ml/dL). O grupo ISO, não apresentou diferença ($13,86 \pm 2,9$ ml/dL) quando comparado ao grupo OOF, porém o cálcio dos animais do grupo tratado com EP apresentaram valores aumentados ($22,95 \pm 2,22$ ml/dL), em relação ao grupo OOF e semelhantes ao do grupo SHAM. Os níveis séricos de magnésio dos animais submetidos aos tratamentos propostos no presente estudo, não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

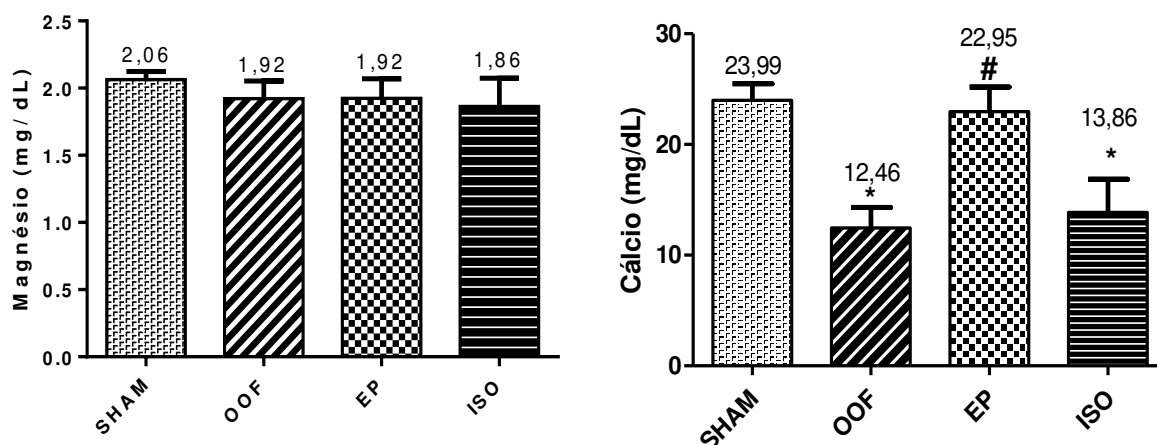


Fig 05. Efeito do tratamento de 8 semanas na determinação dos níveis plasmáticos de cálcio e magnésio de ratas Wistar do grupo Falso- operado (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, ooforectomizadas (OOF) administradas com NaCl 0,9%, ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem) e ooforectomizadas tratadas com Isoflavonas de Soja (ISO, 250 mg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias $\pm$ erro padrão das médias (n=11-14). * diferença em relação ao grupo SHAM; # diferença em relação ao EP ($p < 0,0003$ ANOVA/ Bonferroni), ($p > 0,05$ ANOVA/ Bonferroni).

Efeito do tratamento com Estroprogestativos e Isoflavonas de soja em ratas ooforectomizadas sobre os níveis de Estradiol e Progesterona

Os animais submetidos aos tratamentos (EP e ISO) não apresentaram aumento nos níveis de estradiol ($29,20 \pm 2,9$ pg/ml; $23,40 \pm 3,1$ pg/ml) quando comparados ao grupo SHAM ($44,50 \pm 5,5$ pg/ml). Observou-se que os níveis plasmáticos de progesterona apresentaram discreto aumento nos grupos submetidos aos tratamentos propostos (EP e ISO) respectivamente ($16,03 \pm 2,1$ pg/ml; $16,34 \pm 2,8$ pg/ml), quando comparados ao grupo OOF ($11,97 \pm 1,1$ pg/ml) no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

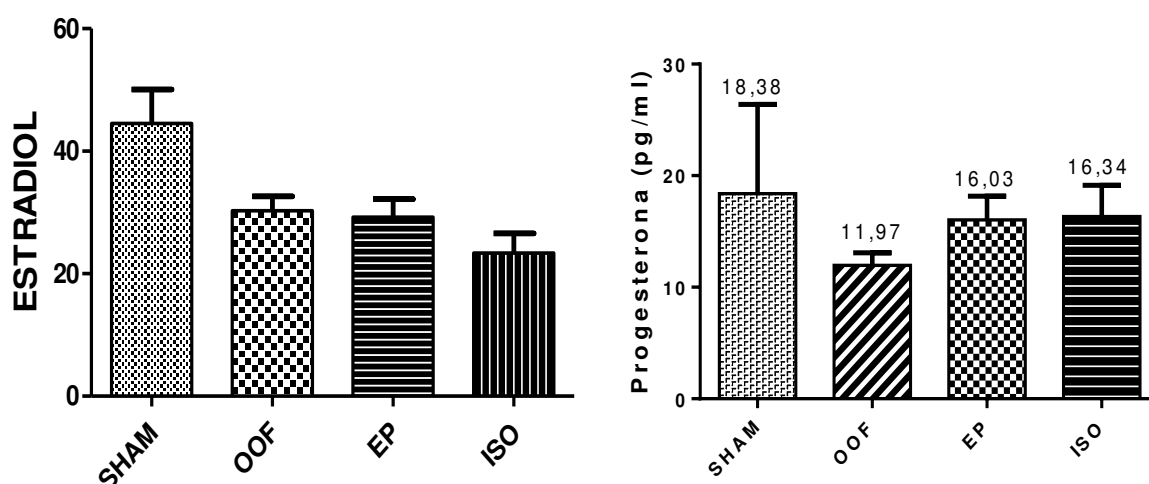


Fig 06. Efeito do tratamento de 8 semanas na determinação dos níveis plasmáticos de estradiol e progesterona de ratas Wistar do grupo Falso-operadas (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, ooforectomizadas (OOF) administradas com NaCl 0,9%, ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem) e ooforectomizadas tratadas com Isoflavonas de Soja (ISO, 250 mg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias $\pm$ erro padrão das médias ($n=05-06$). *diferença em relação ao grupo SHAM ($p < 0,0105$ ANOVA/ Bonferroni), ($p > 0,05$ ANOVA/ Bonferroni).

Efeito do tratamento com Estroprogestativos e Isoflavonas de soja em ratas ooforectomizadas sobre os níveis de RANKL no fluido cerebroespinal

Os animais submetidos aos tratamentos propostos no presente estudo, não apresentaram diferença estatisticamente significativa no que diz respeito aos níveis de RANKL no fluido cerebroespinal, entretanto o grupo SHAM apresentou leve aumento de concentração quando comparado aos demais conforme Figura 07.

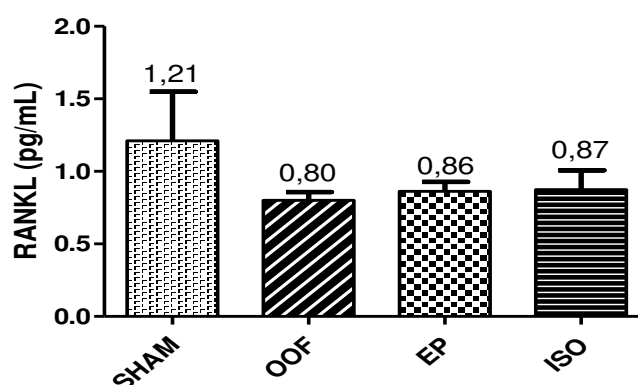


Fig 07. Efeito do tratamento de 8 semanas na determinação dos níveis de RANKL no fluido cerebroespinal de ratas Wistar do grupo Falso-operadas (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, ooforectomizadas (OOF) administradas com NaCl 0,9%, ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem) e ooforectomizadas tratadas com Isoflavonas de Soja (ISO, 250 mg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias $\pm$ erro padrão das médias (n=11-13). ($p>0,05$ ANOVA/ Bonferroni).

Efeito do tratamento com Estroprogestativos e Isoflavonas de soja em ratas ooforectomizadas sobre os níveis de RANKL e OPG no soro

Os animais submetidos aos tratamentos propostos (EP e ISO) no presente estudo, apresentaram redução dos níveis de RANKL e dos níveis de OPG, respectivamente ($302 \pm 125,5$ pg/ml; $322,50 \pm 90,94$ pg/ml) e ($703,2 \pm 90,94$ pg/ml; $713,5 \pm 29,63$ pg/ml).

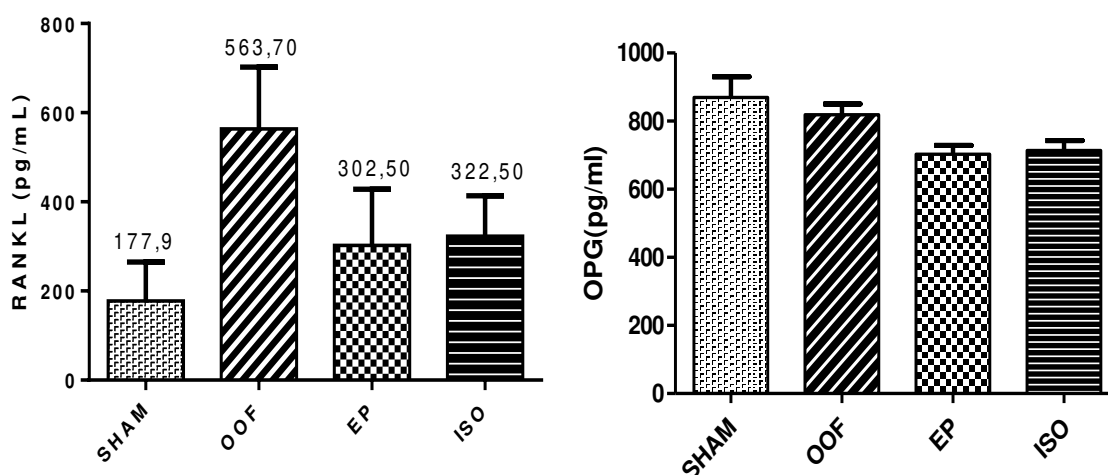


Fig 08. Efeito do tratamento de 8 semanas na determinação dos níveis de RANKL no soro de ratas Wistar do grupo Falso-operadas (SHAM) que receberam NaCl 0,9%, ooforectomizadas (OOF) administradas com NaCl 0,9%, ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo (EP, 20 µg/Kg, via gavagem) e ooforectomizadas tratadas com Isoflavonas de Soja (ISO, 250 mg/Kg, via gavagem). As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias $\pm$ erro padrão das médias (n=11-13). ($p<0,05$ ANOVA/ Bonferroni), ($p>0,05$ ANOVA/ Bonferroni).

Imunohistoquímica por peroxidase para imunomarcção do receptor RANK no útero de ratas ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo e Isoflavonas de soja

O estudo imunohistoquímico da expressão do RANK revelou a sua presença em células do endométrio, exibindo um padrão predominantemente citoplasmático difuso, tanto a nível do epitélio de superfície e das glândulas endometriais (seta) como a nível do estroma (asterisco), no corpo do útero normal (Figura 09 A). Os animais ooforectomizados mantiveram expressão do RANK a nível do epitélio endometrial (seta), mas a sua expressão no estroma (asterisco) foi marcadamente reduzida (Figura 09 B). Nos grupos tratados com isoflavonas e com estroprogestativo ambos os compartimentos apresentaram imunomarcação para o RANK (Figura 09 C, D).

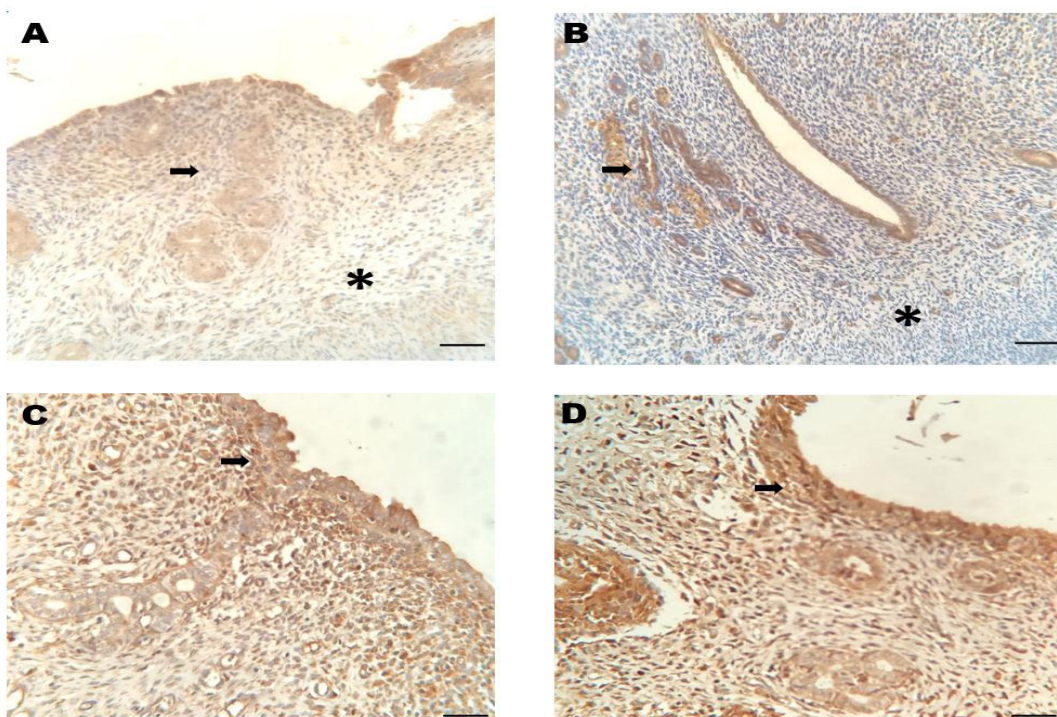


Figura 09. Corpo do útero (endométrio). A- animal controle “Sham”, coloração positiva para RANK variando de clara a moderada. B- animal ooforectomizado, coloração positiva para RANK forte. C- animal ooforectomizado tratado com estrogénio e progesterona, coloração positiva para RANK variando de clara a moderada. D- animal ooforectomizado tratado com isoflavonas de soja, coloração positiva para RANK variando de moderada a forte. 200x, DAB – hematoxilina. A expressão de RANK é observada no epitélio de superfície, glândulas endometriais e estroma endometrial em todos os grupos exceto no B, onde se observa redução da expressão a nível do estroma.

Imunohistoquímica por peroxidase para imunomarcação do receptor RANK no colo do útero de ratas ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo e Isoflavonas de soja

Nas preparações histológicas de alguns animais experimentais de controle ou tratados com isoflavonas, foi possível localizar o colo do útero. Os animais do grupo controle exibiram imunomarcacão muito reduzida para o RANK no epitélio e estroma cervicais (Figura 10 A). Já os animais tratados com isoflavonas exibem marcada expressão a nível do estroma, mas não a nível de epitélio cervical (Figura 10 B). A Figura 10 pretende demonstrar a diferença entre o epitélio cervical padrão estratificado escamoso (asterisco) com fraca expressão de RANK e a zona de transição para o endométrio (seta), ja com intensa expressão de RANK.

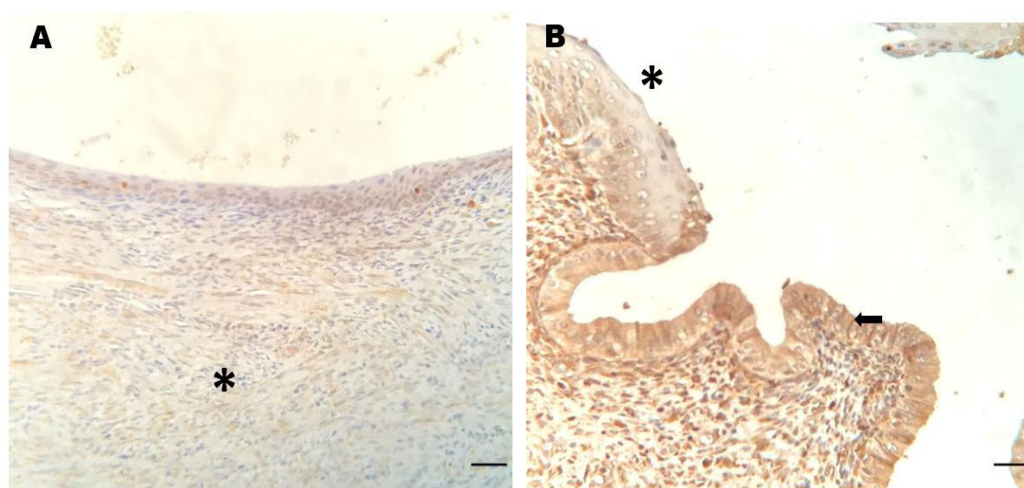


Figura 10. Colo do útero. A- animal controle “sham”. B- animal tratado com isoflavonas de soja. Zona de transição entre cérvix e endométrio. 200x, DAB – hematoxilina. Observa-se fraca a expressão de RANK no epitélio e estroma cervicais, mas elevada expressão na transição para o endométrio.

Imunohistoquímica por peroxidase para imunomarcacão do receptor RANK na glândula mamária de ratas ooforectomizadas tratadas com Estroprogestativo e Isoflavonas de soja

Na glândula mamária normal, a expressao do RANK foi observada apenas no epitélio glandular (seta), exibindo um padrão de imunomarcacão predominantemente citoplasmico difuso (Figura 11 A). Os grupos restantes (OOF, EP e ISO) exibiram um padrão de marcação semelhante (Figuras 11 B, C, D).

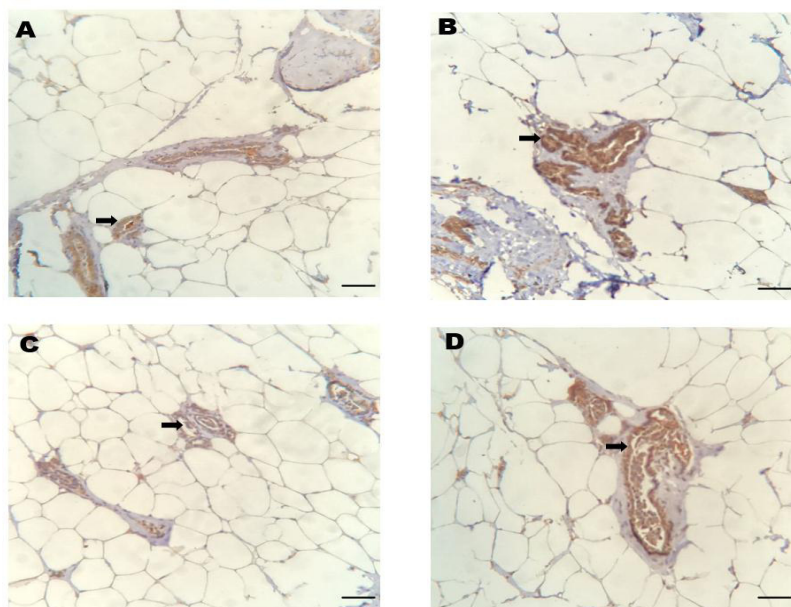


Figura 11. Glândula mamária. A- animal controle “sham” coloração positiva para RANK em cor clara. B- animal ooforectomizado, coloração positiva para RANK variando de clara a intensa. C-animal ooforectomizado tratado com estrogênio e progesterona coloração positiva para RANK variando de clara a moderada. D- animal ooforectomizado tratado com isoflavonas de soja coloração positiva para RANK intensa. 200x, DAB – hematoxilina. Observou-se a marcada expressão de RANK no epitélio glandular em todos os grupos.

DISCUSSÃO

O tratamento de oito semanas aumentou o peso corpóreo do Grupo Estroprogestativo (EP) em relação aos demais, entretanto os outros grupos ooforectomizados aumentaram de peso normalmente sem diferença entre si, porém, quando comparados ao grupo falso operado (SHAM) observou-se diferença entre os grupos.

A cirurgia de ooforectomia (OOF) em animais é um modelo bem estabelecido para o estudo da menopausa e ganho de peso corporal (obesidade), após a remoção completa dos ovários, os animais apresentam aumento do consumo de alimentos e ganho de peso corporal^{23,24}.

A deficiência de estrogênio que ocorre no período da menopausa é conhecida por induzir a obesidade, este hormônio atua sobre a inibição da ingestão de alimentos através do hipotálamo²⁵; supressão da produção de glicose hepática e acumulação de lipídio²⁶; inibição da lipogênese e a inflamação do tecido adiposo²⁷,

consequentemente a modificação da composição corporal, o acúmulo de gordura e o aumento de peso corporal estão diretamente relacionados a este déficit²⁸⁻³⁰.

Chen et al³¹, em estudo com animais submetidos a ooforectomia, verificaram que o grupo OOF exibiram ganho de peso significativamente maior que grupo SHAM, estes dados corroboram com os achados do presente estudo, evidenciando o sucesso da cirurgia, que além de ser um modelo utilizado para estudar menopausa, também é empregado para o estudo de obesidade em animais.

Litwak et al³² observaram que animais submetidos a menopausa apresentaram hiperfagia ou gasto energético reduzido, fatores estes não totalmente responsáveis por alterações no metabolismo e desenvolvimento da obesidade pós-menopausa.

No presente estudo, o grupo tratado com EP, apresentou aumento de peso, sugere-se que este aumento possa estar relacionado a retenção hídrica causada pela progesterona³³.

Em estudo realizado por Silva³⁴ os animais tratados com EP, apresentaram redução do peso corporal, divergindo das observações realizadas no presente estudo.

Estudo realizado por Kurrat et al³⁵ descreve a relação entre peso corpóreo e dieta com isoflavonas (ISOs), os autores observaram que as ratas adultas OOF tratadas com ISOs a longo prazo podem reverter o quadro pós-cirúrgico de ganho de peso, bem como acúmulo de lipídios abdominais, estes dados divergem dos achados do presente estudo, uma vez que o aumento de peso ocasionado pela OOF não foi inibido pela administração crônica de ISOs, entretanto esses efeitos estes podem sofrer alterações em virtude da dose utilizada e tempo de tratamento; a literatura sugere que o uso deste fitoestrógeno pode ser uma estratégia para melhorar as anormalidades no metabolismo dos lipídeos nas mulheres pós-menopausadas.

No que diz respeito ao tecido adiposo, os animais do grupo OOF apresentaram aumento em relação ao grupo SHAM. As ratas submetidas a ooforectomia (OOF, EP e ISO) apresentaram percentuais de tecido adiposo aumentados em relação ao grupo SHAM, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa.

O tecido adiposo exerce papel ativo como um órgão endócrino secretor, envolvido na regulação homeostática do peso corporal³⁶. Uma das funções dos

adipócitos é secretar a leptina, um hormônio que atravessa a barreira sanguínea do cérebro para atuar como um sinal de saciedade alimentar, no sistema nervoso central. Os receptores de leptina são encontrados dentro de regiões do hipotálamo, a ativação dos receptores é responsável por controlar a ingestão de alimentos e o gasto de energia, resultando na capacidade de regulação do peso corporal³⁷. Vias de sinalização da Leptina e de estrogênio interagem em núcleos hipotalâmicos que regulam o consumo de alimentos e do peso corporal³⁸

Em nossos achados o tecido adiposo abdominal foi maior no grupo tratado com EP. Silva³⁴ em seu estudo observou que o percentual de gordura abdominal dos animais tratados com EP, diminuiu consideravelmente, entretanto o desenho experimental (tempo de tratamento e dose utilizados), foram diferentes do presente estudo.

É provável que o tecido adiposo seja responsivo ao estrogênio e expresse receptores estrogênicos³⁹ que são responsáveis pela modulação da lipogênese neste tecido⁴⁰, entretanto esse efeito deve estar relacionado a uma relação dose resposta.

A literatura demonstra que as isoflavonas de soja aumentam o gasto de energia e regulação metabólica⁴¹.

Naaz et al⁴² observaram que a genisteína, constituinte das ISOs, tem efeito antilipogênico, diminuindo o tamanho do adipócito, podendo agir modulando a deposição da gordura em ratas tratadas, embora não se saiba se o efeito é semelhante em humanos.

Em estudo realizado por Chen et al³¹, o grupo de animais tratado com fitoestrógeno (equol/ genisteína), demonstraram inibição do acúmulo de gordura causado pela OOF, além disso, tiveram melhora das disfunções metabólicas dos lipídeos. Embora os animais tratados com ISOs no presente estudo, não demonstraram percentual de gordura diminuído, os valores encontrados foram menores que os animais tratados com EP, esta divergência de resultado pode ser atribuída ao tempo e dose as quais os animais foram submetidos.

Em nossos resultados referentes ao peso uterino das ratas Wistar, foram evidenciadas diferenças significativas entre o grupo SHAM e os demais grupos ooforectomizados e seus respectivos tratamentos. O grupo SHAM apresentou um

aumento uterino normalmente aceitável, tendo em vista que os animais possuem ovários que ciclaram adequadamente.

Com o objetivo de confirmar a eficácia OOF, o peso uterino é medido ao fim de cada experimento. Carmo et al⁴³ observou que peso uterino dos animais submetidos a OOF, foi significativamente reduzido em comparação com o grupo falso operado, corroborando com os dados encontrados no presente estudo.

Sabe-se que o estrogênio e a progesterona endógeno são hormônios responsáveis pela homeostase do tecido uterino⁴⁴. Entretanto, Maioral et al⁴⁵, em seus achados observaram que terapia estroprogestativa afetou profundamente o endométrio dos animais submetidos ao tratamento, estes dados divergem do presente estudo, tendo em vista que os animais tratados com EP permaneceram com o útero atrófico.

Corroborando com os achados do presente estudo, Jarić et al⁴⁶, em experimentos utilizando ratas submetidas a tratamento via subcutânea com daidizeína não observou alteração do peso do útero e características estereológicas dos principais compartimentos uterinos, o tratamento não promoveu eventos associados a proliferação celular do endométrio dos animais.

Russel et al⁴⁷ verificaram que as isoflavonas não alteram o peso uterino de ratas submetidas a menopausa. Estes autores sugerem que as isoflavonas exibem efeitos semelhantes ao do estradiol, através de vias estrogênicas, entretanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de elucidar a afinidade de ligação das isoflavonas ao ER α .

Achados de uma pesquisa desenvolvida por Chinigarzadeh et al (2014)⁴⁸ respectivamente, divergem dos dados encontrados no presente estudo, uma vez que, observaram o aumento do peso uterino de ratas OOF tratadas com genisteína diariamente, entretanto foram consideradas altas doses de ISOs (genisteína), sugerindo trofismo dose-dependente do útero e alterações hiperplásicas, reveladas por análises estereológicas e histomorfométricas.

Os níveis séricos de cálcio foram diminuídos nos animais submetidos a OOF, o tratamento com EP restaurou os níveis de cálcio (Ca).

A deficiência de estrogênio exerce papel importante na patogênese da

osteoporose pós-menopausa; este hormônio regula a remodelação óssea através da modulação da produção de citocinas e fatores de crescimento a partir da medula óssea e das células ósseas⁴⁹.

A remodelação óssea consiste em um processo fisiológico cujo a reabsorção do osso é mediada por osteoclastos, a medida que a formação ossea é induzida por osteoblastos, havendo promoção de minerais para o fluido extracelular, adaptação às forças de tensão e deformação, além de constantemente reparar microfraturas. Os osteoblastos são necessários para a ativação dos osteoclastos e, portanto, agentes que estimulam apenas a formação de osso também induzirão aumento da reabsorção⁵⁰.

As células osteoblasticas são importantes células do tecido ósseo, com papel fundamental na formação deste tecido, atuam através de fatores parácrinos na diferenciação dos osteoclastos, em decorrência do aumento na expressão do RANKL e de OPG. RANKL é uma proteína transmembrana expressa abundantemente na superfície de pré-osteoblastos, osteoblastos, células periosteais e osteócito. A ligação de RANKL é capaz de ativar a expressão do RANK, que está amplamente presente na membrana dos osteoclastos e seus precursores. Como efeito da ligação de RANKL em RANK, ocorre a estimulação a formação, atividade e sobrevivência dos osteoclastos, resultando na reabsorção óssea. A OPG, por sua vez, é um receptor solúvel produzido por osteoclastos e se liga a RANKL, impedindo a ligação de RANKL/RANK e inibindo, consequentemente, a osteoclastogênese. O eixo RANK/RANKL/OPG é regulado por várias citocinas (interleucina 1, 4, 6, 11, 17 e TNF- α), hormônios (glicocorticoides, vitamina D e estrógeno) entre outros fatores que determinam a atividade dos osteoclastos⁵¹.

Estudo realizado por Xu et al⁵², evidenciam que o modelo de ovariectomia também é utilizado para o estudo da osteoporose, além disso, verificaram que os níveis de cálcio no grupo SHAM, permaneceram maiores quando comparados com o grupo OOF, esses achados corroboram com os dados observados no presente estudo.

A TRH é conhecida por seus benefícios relacionados a prevenção do surgimento de osteoporose após a menopausa¹⁹.

Em estudo de revisão de literatura, desenvolvido por Li e wang⁴⁹, os autores descrevem que a TRH, com estrogênio e progesterona que se aplica principalmente a mulheres na pós-menopausa com alto risco de fratura, funciona como modulador de receptores de estrogênicos (ER), se ligando aos ER nas células ósseas, desempenham papel semelhante ao estrogênio endogeno para inibir a absorção óssea, aumentar a densidade óssea e reduzir o risco de fratura vertebral.

No presente estudo os animais submetidos ao tratamento com TRH, apresentaram valores de cálcio semelhantes ao grupo SHAM, demonstrando a eficácia deste tratamento para prevenção de fraturas advindas da osteoporose pós menopausa.

Entretanto, dados literários também sugerem que a TRH aumenta o risco de câncer estrogênio dependente (mama, endométrio), sangramento vaginal, doença coronariana, acidente vascular cerebral e tromboembolismo venoso, entre outros efeitos colaterais⁵³⁻⁵⁵.

Existe um intenso questionamento a cerca das isoflavonas de soja como terapia de reposição hormonal para a prevenção da osteoporose na pós-menopausa, estudos epidemiológicos e experimentais confirmaram que as isoflavonas possuem um efeito positivo sobre os ossos de mulheres na pós-menopausa⁵⁶⁻⁵⁸ e em modelos de ratos ooforectomizados^{59,60}.

KIM et al⁶¹ em estudo com animais OOF, observou que os animais suplementados com diferentes doses de ISO, obtiveram aumento sérico de cálcio quando comparados ao grupo controle (SHAM). Estudos realizados por Wang⁶² mostra que a suplementação de genisteína promove a mineralização óssea pelo aumento do cálcio ósseo, prevenindo a osteoporose. Qi e Zheng⁵⁵ relataram que a suplementação de genisteína, aumentou os níveis séricos de calcio em ratas OOF. Entretanto no presente estudo os níveis séricos de Ca dos animais tratados com ISO, não apresentaram diferença significativa quando comparado com o grupo EP.

Embora a literatura demonstre os efeitos das ISOs na homeostase óssea, sugere-se que esses efeitos são passíveis de modificações em virtude, do tempo de tratamento e doses utilizadas.

No que diz respeito aos níveis de magnésio (Mg) sérico dos animais

submetidos aos tratamentos propostos no presente estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais.

A formação óssea inclui diversos componentes, entre eles estão o sódio, cálcio, magnésio, potássio, zinco, fosforo e carbonato, associados à uma matriz protéica orgânica, constituída em maioria de fibras de colágeno tipo I e apenas 5% de proteoglicanos e proteínas não colagenosas⁶³.

O magnésio atua como catalisador para inúmeras enzimas, além de fornecer estrutura específica as mesmas⁶⁴. É fundamental para a função normal das glândulas paratireoides e para o metabolismo da vitamina D⁶⁵; sua deficiência está associada com a hipertensão, arritmia cardíaca, infarto do miocárdio, hipocalcemia e hipocalcemia⁶⁶.

A hipomagnesemia está associada a condições de menopausa, ou consumo inadequado (baixo), estudo realizado em ratos, demonstrou que a redução dietética de magnésio inferior a 50% das necessidades diárias do animal resultou em redução da massa óssea, esta deficiência quando associada à depleção de cálcio piora ainda mais esta condição. Os mecanismos sugeridos para a redução da massa óssea incluem a diminuição da formação e aumento da reabsorção óssea, e os fatores que contribuem incluem alterações no hormônio da paratireoide e na 1,25(OH)₂ vitamina D, aumento de citocinas inflamatórias, como o TNF e IL-1, bem como um aumento no RANKL e uma redução de OPG⁶⁷.

Além disso, a hipomagnesemia reduz a absorção de cálcio, devido a ativação da vitamina D, que necessita de uma enzima, a hidroxilase, que é dependente de magnésio⁶⁸⁻⁷⁰. Mulheres pós-menopausadas são encorajadas a consumir pelo menos 1000 mg de cálcio diariamente, entretanto, isto pode resultar em uma relação entre cálcio/magnésio na dieta de 4:1, a proporção recomendada é de 2:1, o que prejudica a absorção de magnésio e predispõe seu déficit⁷¹.

Estudos mostraram que a absorção de magnésio no intestino delgado ocorre por uma via transcelular⁷². As especificidades da absorção de magnésio pelo epitélio intestinal e o efeito de várias alterações hormonais associadas à menopausa na sua absorção, ainda não são bem esclarecidos. O rim desempenha um papel importante na regulação da homeostase do magnésio⁷³.

Sonu et al⁷⁴ relata que os níveis séricos de magnésio na urina, foram significativamente mais elevados em mulheres pós-menopausadas, quando comparadas com mulheres pré-menopausadas saudáveis. Os mecanismos detalhados responsáveis por isso ainda precisam ser elucidados. A hipermagnesúria observada pelos pesquisadores pode ser atribuída à diminuição da reabsorção renal secundária ocasionada pelo estrogênio reduzido, como observado em mulheres pós-menopausadas.

Considerando a diminuição dos níveis séricos de magnésio durante a menopausa, os dados do presente estudo divergem desses achados, uma vez que não houve diferença entre os grupos estudados. Sonu e colaboradores⁷⁴, observaram elevação nos níveis séricos de magnésio em mulheres pós-menopausadas, os autores sugerem que pode ser devido a uma alta ingestão alimentar nas mulheres do sul da Índia. Entretanto seriam necessários estudos detalhados a cerca da ingestão alimentar para elucidar esses resultados.

Em estudo realizado com a suplementação de um dos componentes presentes na ISO a genisteína, Wang⁶², observou que os níveis de magnésio sérico estavam aumentados e sugere que este constituinte tenha papel de prevenção da osteoporose. No entanto, os achados do presente estudo divergem dos dados da literatura expostos anteriormente.

O estradiol e progesterona diminuíram após a cirurgia de OOF, os tratamentos utilizados não aumentaram os níveis de estradiol, no entanto os níveis de progesterona dos grupos tratados com EP e ISO obtiveram aumento.

Em condições de menopausa a diminuição dos hormônios sexuais estrogênio e progesterona é condição esperada, esta circunstância ocasiona inúmeros sintomas defavoráveis que fazem parte da síndrome do climatério⁶.

Os hormônios estrogênio e progesterona regulam a proliferação e diferenciação das células endometriais. Esses hormônios também regulam a remodelação do útero para proporcionar um ambiente adequado para o desenvolvimento do embrião e manutenção da gravidez. Em um útero normal, a síntese de estradiol em cada estro ou ciclo menstrual resulta na proliferação de células epiteliais endometriais, além disso esses hormônios exercem efeitos em diversos

tecidos do organismo⁷⁵.

As isoflavonas de soja são bem conhecidas por suas propriedades terapêuticas relacionadas principalmente a sua estrutura semelhante a do 17 β estradiol, as ISOs podem se ligar a ERs, distribuídos em diferentes tecidos, no entanto a afinidade deste componente não é igual ao hormônio endógeno, portanto os efeitos podem demorar a ocorrer⁷⁶.

Em estudo realizado por Huber, Imhof e Schmidt⁷⁷ os autores descrevem que os produtos de soja ricos em isoflavonas podem aumentar o estradiol em mulheres na pós-menopausa. No presente estudo os níveis de estradiol foram menores no grupo tratado com ISO, pode-se sugerir que esses efeitos se diferenciam do grupo tratado com EP pela afinidade aos ERs.

No que diz respeito aos níveis de progesterona o grupo tratado com ISOs apresentou aumento, esses achados corroboram com estudo *in vitro* realizado por XIÃO e colaboradores⁷⁶ no qual foi observado aumento da progesterona.

A regulação hormonal ocasionada pelo tratamento com fitoestrógenos pode contribuir para melhor qualidade de vida das mulheres no período de menopausa, uma vez que transtornos como fogachos, suor noturno, osteoporose, problemas cardiovasculares, mudanças na composição corporal e metabolismo dos lipídeos estão associadas a diminuição da secreção hormonal de estrogênio e progesterona^{76,7}.

RANKL e RANK são expressos no sistema nervoso central, possuem efeito na termorregulação. Estudos demonstram que camundongos fêmeas com deleção do gene RANK em neurônios e astrócitos apresentam aumento da temperatura corporal basal na fase escura, o que sugere que o sistema RANK também regula a temperatura fisiológica em mulheres⁷⁸. Em nossos achados observou-se que os animais OOF apresentaram diminuição dos níveis de RANKL, os dados corroboram com a literatura, uma vez que esta diminuição está associada ao aumento de temperatura corporal, que é descrita em condições de menopausa.

O Tratamento com ISOs, induziu um discreto aumento nos níveis de RANKL, sugerindo um efeito positivo, uma vez que os níveis basais são maiores que após a OOF.

Evidências substanciais demonstram que a regulação da homeostase óssea é dependente não apenas das células do osso, mas também dos estímulos neurais que ligam as células ósseas ao cérebro⁷⁹. O cérebro é um regulador importante de condições de normalidade na periferia dos tecidos, enquanto a regulação central da massa óssea representa um novo campo de estudo⁸⁰.

Em nossos achados referentes aos níveis de RANKL no soro dos animais, notamos um aumento discreto no grupo OOF.

Em modelos animais que possuem objetivo de estudar para desordens ósseas, os achados descrevem superexpressão de RANKL, além de níveis de RANKL sérico aumentado^{81,82}, dados estes que se relacionam ao presente estudo uma vez que um dos efeitos da OOF consiste no surgimento da osteoporose.

Corroborando com nossos achados Nurdiana et al⁸³, em seu estudo verificou que os níveis de RANKL nos animais submetidos a OOF foram maiores, quando comparados ao grupo SHAM.

O RANKL é responsável por ativar uma variedade de vias de sinalização, que no tecido ósseo resultam no aumento da osteoclastogênese e consequentemente na aceleração da perda óssea^{84,85}.

Yan, Pey e Song⁸⁶, verificaram que os níveis de RANKL aumentaram em condição patológica óssea, deste modo pode-se sugerir que o aumento de RANKL no presente estudo, pode estar associado a desordem metabólica ocorrida no tecido ósseo em virtude da condição de menopausa, no qual os animais foram submetidos.

Além das desordens osseas o RANKL costuma está aumentado no soro em condições de menopausa e patologias como câncer, glândula mamaria durante a gravidez⁷⁸.

Os níveis de osteoprotegerina (OPG), não apresentaram diferença entre os grupos avaliados.

Em estudo realizado por Li et al⁸⁷, os autores verificam que os animais ooforectomizados apresentaram níveis de OPG menores, quando comparados ao grupo SHAM, sugere-se que essa diminuição esteja relacionada a redução do hormônio estrogênio. Em nossos achados observou-se uma atenuação de OPG no grupo OOF de forma discreta.

Os tratamentos utilizados no presente estudo não induziram aumento nos níveis de OPG, conforme o esperado. Nurdiana et al⁸³, corrobora com os achados do presente estudo, uma vez que, não houve aumento nos níveis de OPG entre os grupos de tratamento (extrato de *L. pumila* extract em doses diferentes).

A dose e tempo de tratamento utilizados no presente estudo podem ser fatores responsáveis pelo efeito observado nos níveis de OPG.

A expressão do receptor RANK no corpo do útero está marcadamente observada no epitélio de superfície, glândulas endometriais e estroma endometrial, em todos os grupos de animais analisados no presente estudo a intensidade da coloração, varia em detrimento da diferença entre os tratamentos utilizados, além das condições fisiológicas a qual cada grupo está submetido.

Uma variedade de condições fisiológicas e patológicas estão relacionadas as moléculas RANK e RANKL, o estudo das mesmas tem ocorrido em especial com o interesse pela sua utilidade como alvos terapêuticos. Portanto a expressão e distribuição deste receptor e da proteína ligante são fatores críticos em relação à eficácia e segurança de anticorpos contra RANK ou RANKL que são considerados como potenciais agentes terapêuticos⁸⁸.

Gomes et al⁸⁹ investigou se a expressão de RANK estava relacionada com características clínico-patológicas de tumores endometriais primários. Os autores sugerem uma relação direta entre a expressão de RANK e o grau histológico do tumor. No entanto, são necessários mais estudos, a fim de esclarecer o papel o papel do RANK / RANKL como um marcador útil no câncer endometrial, se este papel for encontrado na gênese ou progressão do câncer de endométrio, a possibilidade de usar proteínas anti-RANKL pode abrir uma nova área na prevenção e tratamento deste tipo de câncer.

Em nossos achados a expressão do receptor RANK na glândula mamária, está marcada no epitélio glandular em todos os grupos.

RANKL e RANK possuem papel fundamental no desenvolvimento da glândula mamária e no aumento de células-tronco mamárias durante a gravidez⁹⁰. Através de efeito parácrino o RANKL possui ação mitogênica na progesterona no epitélio mamário, a expressão de RANKL oscila com progesterona sérica, tanto em tecidos

mamários normais como malignos⁹¹.

Estudos prévios descrevem que a expressão de RANK na glândula mamária pode variar em decorrência de condições fisiológicas, patológicas ou mesmo por diferenças na sensibilidade do teste utilizado⁹²⁻⁹⁴.

A expressão do receptor RANK na glândula mamária é menor quando comparado ao útero no presente estudo, sugere-se que essa diferença seja em virtude da influência dos hormônios sob os tecidos estudados, uma vez que o eixo RANKL/RANK parece ser mediado por fatores hormonais.

É importante ressaltar que os diferentes desenhos experimentais, vias de administração, horários e doses do tratamento (estroprogestativos ou ISOs), variações nas características dos sujeitos do estudo (animais/humanos), incluindo raça, idade e até mesmo status da flora intestinal podem ser responsáveis pelas discrepâncias observadas entre os dados da literatura e o presente estudo.

Limitações do estudo: Os equipamentos utilizados para a leitura dos testes realizados no presente estudo estavam sem uso e conseqüentemente sem calibração regular o que dificultou a leitura dos resultados. Os animais fornecidos pelo biotério central, foram liberados em quantidade limitada para o início dos experimentos, diante disso houve discrepância relacionada ao peso e idade dos animais.

Principais aspectos do artigo

Quadro 1. Resumo dos efeitos do tratamento com Estroprogestativo (EP) e Isoflavonas de Soja (ISOs) em ratas Ooforectomizadas (OOF) e falso operadas (SHAM).

FATORES ANALISADOS	SHAM	OOF	OOF TRATAMENTO COM EP	OOF TRATAMENTO COM ISOs
Peso corporal	↓	↑	↑ ↑	↑
Tecido adiposo	↓	↑	↑ ↑	↓
Peso uterino	↑	↓	↓	↓
Cálcio sérico	↑	↓	↑	↓
Magnésio sérico	≡	≡	≡	≡
Estrogênio	↑	↓	↓	↓
Progesterona	↑	↓	↑	↑
RANKL CSF	↑	↓	↓	↓
RANKL Soro	↓	↑	↓	↓
OPG Soro	↑	↓	↓	↓
RANK Útero	↑	↓	↑	↑
RANK Mama	≡	≡	≡	≡

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos do tratamento crônico com isoflavonas de soja no eixo OPG/RANK/RANKL em modelo experimental de menopausa foram positivos, uma vez que observou-se efeitos metabólicos a níveis centrais e periféricos de RANKL, além de expressão do RANK em níveis semelhantes ao controle negativo. Este tratamento ser utilizado como alvo terapêutico nas desordens ocasionadas pela desregulação do eixo acima mencionado como é o caso de condições que acometem mulheres em situação de menopausa. Sugerimos que mais estudos sejam realizados a fim de elucidar os mecanismos pelos quais as ISOs atuam sobre o metabolismo OPG/RANK/RANKL.

Padrões Éticos

O presente estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, certificado de aprovação nº 23115.003778/2017-35.

Conflito de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Financiamento

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES.

Agradecimentos

Os autores agradecem, ao Laboratório de Pós-Graduação em Farmacologia, ao Laboratório Bioanálise, ao Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer, aos animais disponibilizados pelo biotério central da Universidade Federal do Maranhão e a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Research on the menopause in the 1990s - Introduction. Research on the Menopause in the 1990s: report of a WHO scientific group 866 (1996) 1-107.
2. S.H. LINDAHL, Reviewing the options for local estrogen treatment of vaginal atrophy, International Journal of Women's Health 6 (2014) 307-312.
3. .A.C. Moreira, A.M. Silva, M.S. Santos, V.A. Sardão, Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 143 (2014) 61- 71.
4. D.J. Portman, M.L. Gass, Vulvovaginal Atrophy Terminology Consensus Conference Panel. Genitourinary syndrome of menopause: new terminology for vulvovaginal atrophy from the International Society for the Study of Women's Sexual Health and the North American Menopause Society. J Sex Med 11 (2014) 2865-2872.
5. A. Stenberg, G. Heimer, U. Ulmsten, The prevalence of urogenital symptoms in postmenopausal women. Maturitas 22 (1995) 17-20.
6. S. Caruso, A. Cianci, C. Malandrino, G. Cavallari, Ó. Gambadoro, L. Arena, *et al.*, Ultrastructural and quantitative study of clitoral cavernous tissue from living subjects. J Sex Med 8 (2011) 1675-1685.
7. P. Monteleone, G. Mascagni, A. Giannini, A.R. Genazzani, T. Simoncini,

Symptoms of menopause - global prevalence, physiology and implications. *Nat Rev Endocrinol* 14 (2018)199-215.

8. L.G. Raisz, Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and pro-spects. *J Clin Invest* 115 (2005) 3318–3325.

9. H. Uemura, T. Yasui, Y. Miyatanl, M. Yamada, M. Hiyoshi, K. Arisawa, *et al.*, Circulating profiles of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in postmenopausal women. *J Endocrinol Invest* 31 (2008) 161–168.

10. A.P. Trouvin, V. Goëb, Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 5 (2010) 345–354.

11. K. Väänänen, Mechanism of osteoclast mediated bone resorption – rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005) 959-971.

12. H. Kanzaki, M. Chiba, K. Arai, I. Takahashi, N. Haruyama, M. Nishimura, *et al.* Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Therapy* 13 (2006) 678-685.

13. S. Bord, D.C. Ireland, S.R. Beavan, J.E. Compston, The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts, *Bone* 32 (2003)136-141.

14. A. Rogers, G. Saleh, R.A. Hannon, D. Greenfield, R. Eastell. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002)4470-5.

15. S. Kawamoto, S. Ejiri, E. Nagaoka, H. Ozawa. Effects of estrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. *Arch Oral Biol* 47 (2002) 67-73.

16. C.E. Gleason, N.M. Dowling, W. Wharton, J.A.E. Manson, V.M. Miller, C.S. Atwood, *et al.*, Effects of hormone therapy on cognition and mood in recently postmenopausal women: findings from the randomized, controlled KEEPS-cognitive and affective study. *PLoS Med* 12 (2015) 1001833.

17. C.E. Gleason, C.M. Carlsson, S. Johnson, C. Atwood, S. Asthana, Clinical pharmacology and differential cognitive efficacy of estrogen preparations. *Ann N Y Acad Sci* 115 (2005) 93–115.

18. J.A.V. Pinkerton, F.S. Aguirre, J. Blake, F. Cosman, H. Hodis, S. Hoffstetter, *et al.*, The 2017 hormone therapy position statement of the North American Menopause Society. *Menopause* 24 (2017) 728–753.

19. S. Bedell, M. Nachtigall, F. Naftolin, The pros and cons of plant estrogens for menopause. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 31(2013) 400-419.

20. N. Siriwardhana, N.S. Kalupahana, M. Cekanova, *et al.*, Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J Nutr Biochem*; 24 (2013) 613-623.

21. K. Park, W. Ju, J. Yeo, J.Y. Kim, H.S. Seo, Y. Uchida *et al.* Increased OPG/RANKL ratio in the conditioned medium of soybean-treated osteoblasts suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. *Int J Mol Med* 33 (2014)178-184.

22. D.K. Khajuria, R. Razdan, D.R. Mahapatra. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol* 52 (2012) 462-470.

23. P. Hoegh-Andersen, L.B. Tanko, T.L. Andersen, C.V. Lundberg, Mo JA, A.M.

- Heegaard, *et al.* Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: Validation and application. *Arthr Res Ther* 6 (2004) R169–R180.
24. D.O. Larco, D.F. Cruthirds, M.J. Weiser, R.J. Handa, Wu TJ. The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. *Endocrine*; 42 (2012) 717–725.
25. J. Santollo, A.M. Torregrossa, L.A. Eckel. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. *Horm Behav* 60 (2011) 86-93.
26. Y. Sun, Q. Yu, Q. Shen, Bai W, J. Kang. Black Cohosh Ameliorates Metabolic Disorders in Female Ovariectomized Rats. *Rejuvenation Res* 19 (2016) 204-14.
27. T. Jelenik. M. Roden. How estrogens prevent from lipid-induced insulin resistance. *Endocrinology* 154 (2013) 989-992.
28. Kaaja RJ. Metabolic syndrome and the menopause. *Menopause Int*; 14 (2008) 21-5.
29. L. Zhu, F. Zou, Y. Yang, P. Xu, K. Saito, A. Othrell Hinton, Jr., *et al.* Estrogens prevent metabolic dysfunctions induced by circadian disruptions in female mice. *Endocrinology* 156 (2015) 2114-2123.
30. J. Jull, D. Stacey, S. Beach, A. Dumas, I. Strychar, L.A. Ufholz, *et al.* Lifestyle weight changes during the menopause transition: a systematic review. *J Obes* (2014) 824310.
31. C. Chen, Z Hongxing heng, Q. Shanshan. Genistein and Silicon Synergistically Protects Against Ovariectomy-Induced Bone Loss Through Upregulating OPG/RANKL Ratio. *Biol Trace Elem Res.* (2018) 1-10.
32. S.A. Litwak, J.L. Wilson, W. Chen, C. Garcia-Rudaz, M. Khaksari, M.A. Cowley, *et al.* Estradiol prevents fat accumulation and overcomes leptin resistance in female high-fat diet mice *Endocrinology*.155 (2014) 4447-4460.
33. C. Bulletti, D. Ziegler, V. Polli, L. Diotallevi, E. Del Ferro, C. Flamigni. *et al.* Uterine contractility during the menstrual cycle. *Hum Reprod.* 1 (2000) 81-89.
34. S.N. Silva, Atividade estrogênica de *Morus Nigra*, Moraceae em ratas ovariectomizadas. Tese (Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal) Universidade Federal do Maranhão. Maranhão. (2012) 101-109.
35. A. Kurrat, T. Blei, F.M. Kluxen, D.R. Mueller, M. Piechotta, S.T. Soukup *et al.* Lifelong exposure to dietary isoflavones reduces risk of obesity in ovariectomized Wistar rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 59 (2015) 2407–2418.
36. B.E. Wisse. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 15 (2004) 2792–2800.
37. S.C. Benoit, D.J. Clegg, R.J. Seeley, S.C. Woods. Insulin and leptin as adiposity signals. *Rec Prog Horm Res* 59 (2004) 267–285.
38. Q. Gao, G. Mezei, Y. Nie, Y. Rao, CS. Choi, I. Bechmann. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 13 (2007) 89–94.
39. P.S. Cooke, A. Naaz. Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function. *Experimental Biology and Medicine* 229 (2004) 1127-1135.
40. P.A. Heine, J.A. Taylor, G.A. Iwamoto, D.B. Lubahn, P.S. Cooke. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 97 (2000) 12729-34.

41. A. Jungbauer, S. Medjakovic. Phytoestrogens and the metabolic syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 139 (2014) 277–289.
42. A. Naaz, S. Yellayi, M.A. Zakroczymski, D. Bunick, D.R. Doerge, D.B. Lubahn *et al.* The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 144 (2003): 3315–3320.
43. J.M. Carmo, A.A. Silva, S.P. Moak, R. J. Browning, X. Dai, J. E. Hall. Increased sleep time and reduced energy expenditure contribute to obesity after ovariectomy and a high fat diet *Life Sciences* 212 (2018) 119–128.
44. M.V. Giordano, L.A. Giordano, R.C. Gomes, R.S. Simões, H.B. Nader, M.G. Giordano. *et al.* The evaluation of endometrial sulfate glycosaminoglycans in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 31 (2015) 278–281.
45. G.C.C.C. Maioral, R.C.T. Gomes, C. Verna., M.J. Simões, H.B. Nader, R. S. Simões. *et al.* Concentration of glycosaminoglycan in ovariectomized mice uterus after treatment with ovarian steroids *Gynecological Endocrinology* 13(2016) 1–5.
46. I. Jarić, J. Živanović, M. Miler, V. Ajdžanović, D. Blagojević, N. Ristić. *et al.* Genistein and daidzein treatments differently affect uterine homeostasis in the ovary-intact middle-aged rats, *Toxicology and Applied Pharmacology Toxicol Appl Pharmacol* 339(2018) 73–84.
47. A.L. Russell, J.M. Grimes, D.F. Cruthirds, J. Westerfield, L. Wooten, M. Keil. *et al.* Dietary Isoflavone-Dependent and Estradiol Replacement Effects on Body Weight in the Ovariectomized (OVX) Rat. *Horm Metab Res* 49 (2017) 457–465.
48. A. Chinigarzadeh, N. M Kassim, S. Muniandy, N. Salleh. Genistein-induced fluid accumulation in ovariectomised rats' uteri is associated with increased cystic fibrosis transmembrane regulator expression. *Clinics (Sao Paulo)*, 69 (2014), 111–119.
49. L. Li, Z. Wang. Ovarian Aging and Osteoporosis. *Adv Exp Med Biol* 1086 (2018) 199–215.
50. L. Cianferotti, F. D'asta, M.L. Brandi. A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 5 (2013) 127–139.
51. V. Nardone, F. Asta, M. L. Brandi. Pharmacological management of osteogenesis. *Clinics* 69 (2014) 438–446.
52. H. Xu, D. Yin, T. Liu, F. Chen, Y. Chenc, X. Wanga, *et al.* Tea polysaccharide inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells and ameliorates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 102 (2018) 539–548.
53. J.E. Rossouw, G.L. Anderson, R.L. Prentice, A.Z. Lacroix, C. Kooperberg, M.L. Stefanick, *et al.*, Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the So Mee Kim *et al.* 281 Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288 (2002) 321–333.
54. M. Gambacciani, M. Levancini. Hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Prz Menopauzalny* 13 (2014) 213–220.
55. S. Qi, H. Zheng. Combined effects of phytoestrogen genistein and silicon on ovariectomy-induced bone loss in rat. *Biol Trace Elem Res* 177 (2017) 281–287.
56. H.Y. Huang, H.P. Yang, H.T. Yang, T.C. Yang, M.J. Shieh, S.Y. Huang. One-year soy isoflavone supplementation prevents early postmenopausal bone loss but without

- a dose-dependent effect. *J Nutr Biochem* 17(2006) 509-517.
57. J. Mei, S.S. Yeung, A.W. Kung. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 5217-5221.
 58. X. Zhang, X.O. Shu, H. Li, G. Yang, Q. Li, Y.T. Gao. *et al.* Prospective cohort study of soy food consumption and risk of bone fracture among postmenopausal women. *Arch Intern Med* 165 (2005) 1890-1895.
 59. M.S. Kim, Y.S. Lee. Effects of soy isoflavone and/or estrogen treatments on bone metabolism in ovariectomized rats. *J Med Food* 8 (2005) 439-445.
 60. A. Bitto, B.P. Burnett, F. Polito, H. Marini, R.M. Levy, M.A. Armbruster. Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and estradiol. *Br J Pharmacol* 155 (2008) 896-905.
 61. S.M. Kim, H.S. Lee, J.I. Jung, S.M. Lim, J.H. Lim, W.H. Ha. Effect of isoflavone-enriched whole soy milk powder supplementation on bone metabolism in ovariectomized mice. *Nutrition Research and Practice* 12(2018) 275-282.
 62. H. Wang, P.A. Murphy. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42 (1994) 1666-1673.
 63. R. P. Heaney. Dairy and Bone Health. *J Am Col Nutr* 28(2009):82-90.
 64. R.K. Rude, M. E. Shils, Magnesium. In Shils ME (ed): *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins 223 (2006) 247.
 65. MARTINI, L. A. Magnesium supplementation and bone turnover. *Nutr Rev*, 57 (1999) 227-229.
 66. R.K. Rude. Magnesium deficiency: a heterogeneous cause of disease in humans. *J Bone Miner Res* 13 (1998) 749-758.
 67. R.K. Rude, F.R. Singer, H.E. Gruber. Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency. *J Am Coll Nutr* 28 (2009) 131-141.
 68. J. Traba, E. Froschauer, G. Wiesenberger. *et al.* Yeast mitochondria import ATP through the calcium-dependent ATP-Mg/Pi Carrier Sal1p, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose. *Mol Microbiol* 69 (2008) 570-585.
 69. H. Tahara, Y. Nishizawa. Hypomagnesemia and hypoparathyroidism. *Clin Calcium* 17 (2007) 1200-1204.
 70. W. Yuan, W. Pan, J. Kong, W. Zheng, F.L. Szeto, K.E. Wong, *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J Biol Chem* 282 (2007) 29821-29830.
 71. R. Swaminathan. Magnesium Metabolism and its Disorders. *Clin Biochem Rev*, 2003; 24:47-66
 72. S.F.G. Van, R.J. Bindels, J.G. Hoenderop. Physiology of epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 158 (2007) 77-160.
 73. M.J. Laires, C.P. Monteiro, M. Bicho. Role of cellular magnesium in health and human disease. *Front Biosci* 1 (2004) 262-276.
 74. Y. Sonu, S.S. Avinash, Sreekantha, K.A. Kumar, M. Malathi, A.R. Shivashankara. Effect of Oestrogen on Altering the Serum and Urinary Levels of Calcium, Phosphate and Magnesium in Hysterectomised Women Compared to Natural Menopausal South Indian Women: A Case Control Study. *Ind J Clin Biochem* 31 (2016) 326-331.
 75. D.Z. Yuan, L.L. Yu, T. Qu, S.M. Zhang, Y.B. Zhao, J.L. Pan. Identification and

- characterization of progesterone- and estrogen-regulated MicroRNAs in mouse endometrial epithelial cells. *Reprod Sci*. 22(2) (2015) 223-234.
76. Y. Xiao, S. Zhang, H. Tong, S. Shi. Comprehensive evaluation of the role of soy and isoflavone supplementation in humans and animals over the past two decades. *Phytother* 32(3) (2018) 384-394.
 77. J. Huber, M. Imhof, M. Schmidt. Effects of soy protein and isoflavones on circulating hormone concentrations in pre- and post-menopausal women: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 16 (2010) 110–111.
 78. R. Hanada, J.M. Penninger. Central regulation of body temperature by RANKL/RANK pathway. *Clin Calcium* 21(8) (2011) 1201-1208.
 79. F. Liu, F. Tan, W. Tong, Q. Fan, S. Ye, S. Lu, *et al*. Effect of Zuoguiwan on osteoporosis in ovariectomized rats through RANKL/OPG pathway mediated by β 2AR. *Biomed Pharmacother* 103 (2018) 1052-1060.
 80. A. Corr, J. Smith, P. Baldock, Neuronal control of bone remodeling, *Toxicol. Pathol.* 45 (7) (2017) 894–903.
 81. X. Zhao, P. Deng, R. Iglesias-Bartolome, *et al*. Expression of an active Galphas mutant in skeletal stem cells is sufficient and necessary for fibrous dysplasia initiation and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (2018) E428–437.
 82. S.K. Khan, P.S. Yadav, G. Elliott, D.Z. Hu, R. Xu, Y. Yang. Induced Gnas(R201H) expression from the endogenous Gnas locus causes fibrous dysplasia by up-regulating Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (2018)E418–427.
 83. N. Nurdiana, N. Mariati, N. Noorhamdani, B. Setiawan, N. Budhiparama , Z. Noor. Effects of *Labisia pumila* on bone turnover markers and OPG/RANKL system in rat model of pos-menopausal osteoporosis. *Clinical Nutrition Experimental* 20 (2018) 41-47.
 84. L. Danks, H. Takayanagi. Immunology and bone. *J Biochem* 154 (2013) 29–39.
 85. A. Leibbrandt, J.M. Penninger. RANK(L) as a key target for controlling bone loss. *Adv Exp Med Biol* 647 (2009)130–145.
 86. D. Yan, F. Pei. Y. Song. Serum levels of M-CSF, RANKL and OPG in rats fed with Kashin-Beck disease- affected diet. *J Orthop Surg Res* 9 (2014) 78.
 87. T. Li, S.M. Wu, X.U ZY, S. Ou-Yang. Rabbiteye blueberry prevents osteoporosis in ovariectomized rats. *J Orthop Surg Res* 9 (2014) 56.
 88. C.R. Taylor, D. Branstetter, E. Manna, W.C. Dougall, J. Bussiere, C.W. Johnson. Distribution of RANK and RANK Ligand in Normal Human Tissues as Determined by an Optimized Immunohistochemical Method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 25 (2017) 299-307.
 89. R. Gómez, A. Castro, J. Martínez, V. Rodríguez-García, O. Burgués, J.J. Tarín, *et al*. Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B (RANK) and Clinicopathological Variables in Endometrial Cancer: A Study at Protein and Gene Level. *Int J Mol Sci* 19 (2018) 1848.
 90. M.L. Asselin-Labat, F. Vaillant, J.M. Sheridan, B. Pal, D. Wu, E.R. Simpson, *et al*. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature* 465 (2010) 798–802.
 91. K. Rohrbach, L.Y. Huang, R. Soriano, G.K. Smyth, W.C. Dougall, J.E. Visvader *et al*. RANK ligand as a potential target for breast cancer prevention in BRCA1-mutation carriers. *SNat Med* 22 (2016) 933-9.

92. C.E. Wood, D. Branstetter, A.P. Jacob, J.M Cline, T.C Register, K. Rohrbach, *et al.* Progestin effects on cell proliferation pathways in the postmenopausal mammary gland. *Breast Cancer Res* 15 (2013) R62.
93. H. Hu, J. Wang, A. Gupta, A. Shidfar, D. Branstetter, O. Lee *et al.* RANKL expression in normal and malignant breast tissue responds to progesterone and is upregulated during the luteal phase. *Breast Cancer Res Treat* 146 (2014) 515–523.
94. H.A. Azim Jr, F.A .Peccatori, S. Brohée, D. Branstetter, S. Loi, G. Viale, *et al.* RANK-ligand (RANKL) expression in young breast cancer patients and during pregnancy. *Breast Cancer Res* 17 (2015) 24.

6. CONCLUSÕES

No que diz respeito aos efeitos das ISOs no peso corporal o tratamento não inibiu o ganho induzido pela ooforectomia, no entanto diminuiu o peso da gordura corporal e não aumentou o peso útero.

A intervenção com isoflavonas de soja não aumentou os níveis de estradiol, entretanto a progesterona apresentou níveis elevados em relação aos demais tratamentos, os níveis séricos de cálcio permaneceram baixos, os de magnésio foram iguais em todos os grupos experimentais, já os níveis de RANKL e OPG no soro se encontraram diminuídos. O RANKL no fluido cerebrospinal foi baixo.

A expressão do receptor RANK no grupo tratado com ISOs apresentou-se aumentada no útero aproximando-se a condições basais, na transição para o endométrio a expressão também foi elevada e na mama o padrão foi semelhante em todos os grupos do estudo.

Diante do exposto, as ISOs possuem efeito no eixo OPG/RANK/RANKL, no entanto são necessários a realização de outros estudos a fim de elucidar por quais mecanismos as ISOs podem agir sob o metabolismo acima descrito durante as condições de menopausa.

REFERÊNCIAS

- ABU-AMER Y, TONDRAVI MM. NF-Kb and Bone: The breaking point. **Nature Med**, v. 3, p. 1189-1190, 1997.
- ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **Lancet Oncology**, v. 3, p. 364-373, 2002.
- AESCHLIMANN, D.; EVANS, B.A.J. The vital osteoclast: how is it regulated? **Cell Death Differ**, v.11, p. S5-S7, 2004.
- ALEKEL, D. L.; VAN LOAN, M. D.; KOEHLER, K. J. *et al.* The Soy Isoflavones for Reducing Bone Loss (SIRBL) Study: a 3-y randomized controlled trial in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 218-230, 2010.
- ASHKENAZI A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 6, p. 420-430, 2002.
- BANDEIRA, F. *et al.* **Osteoporose**. 1 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 390p.
- BAUD'HUIN, M.; LAMOUREUX F.; DUPLOMB L.; *et al.* RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. **Cell Mol Life Sci**, v.64, p.2334-2350, 2007.
- BARRET, J. Phytoestrogens. Friends or foes? **Environmental Health Perspectives**, v. 104, p. 478-482, 1996.
- BERESFORD J.N, JOYNER C.J, DEVLIN. *et al.* The effects of dexamethasone and 1,25 hydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. **Arch Oral Biol**. v. 39, p. 941-7, 1994.
- BEDELL, S.; NACHTIGALL, M.; NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n.4, p. 400-419, 2013.
- BECK, V. B.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 5, p. 499-518, 2005.
- BÖTTNER, M.; THELENB, H. P.; JARRY. Estrogen receptor beta: Tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol**, v.139, p. 245-251, 2013.
- BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v.15, p. 337-342, May/2003.

CASSIDY, A.; ALBERTAZZI, P.; NIELSEN, I. L. et al. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post- menopausal women. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 1, p. 76-92, 2006.

CASSIDY, A.; HANLEY, B.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1044-1062, 2000.

CARUSO S.; CIANCI A.; MALANDRINO C.; et al. Ultrastructural and quantitative study of clitoral cavernous tissue from living subjects. **J Sex Med**, v. 8, p. 1675-1685, 2011.

CENCI S.; WEITZMANN M.N.; ROGGIA C.; et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . **J Clin Invest**, v. 106, p. 1229-1237, 2000.

CHOI, S. Y.; HA, T. Y.; AHN, J. Y. et al. Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships. **Planta Medica**, v. 74, n. 1, p. 25-32, 2008.

COHEN-SOLAL M, GRAULET A.M, DENNE M.A. et al. Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: involvement of cytokines. **J Clin Endocrinol Metab**, v.77, p. 1648-1653, 1993.

CHAUDHARY L.R.; SPELSBERG T.C.; RIGGS B.L. Production of various cytokines by normal human osteoblast-like cells in reponse to interleukin-1 and tumor necrosis factor- α : lack of regulation by 17 β - estradiol. **Endocrinology**, v.130, p. 2528-2534, 1992.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates - antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1961-1967, 1993.

DEL RÍO J. P.; ALLIENDE M. I.; MOLINA N.; et al. Steroid Hormones and Their Action in Women's Brains: The Importance of Hormonal Balance. **Front. Public Health**, v. 6 p. 1-15, 2018.

DOUGALL W. C. in Tumorigenesis and Metastasis Osteoclast-Independent Roles of the RANKL/RANK/OPG Pathway Molecular Pathways: Osteoclast-Dependent and. **Clin Cancer Res**, v 18, p. 326-335, 2012.

DOUGALL, W. C.; CHAISSON, M. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. **Cancer Metastasis Rev**, v. 25, p.541–549, 2006.

EMBRAPA. **EMBRAPA soja**. 2014a. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/soja>>. Acesso em: 19 Setembro. 2018.

FATA J. E.; KONG Y. Y.; LI J.; et al. The Osteoclast Differentiation Factor Osteoprotegerin-Ligand Is Essential for Mammary Gland Development. **Cell**, v. 103, p. 41–50, 2000.

FALONI A.P.S.; SÉRGIO P. C.; Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n.2, p. 181-188, 2007.

FESTER, L.; PRANGE-KIEL, J.; ZHOU, L. *et al.* Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: sexual dimorphism in vivo but not in vitro. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.131, p.24–29, 2012.

FLEURY, Y.; WELTI, D. H.; PHILIPPOSIAN, G. *et al.* Soybean (malonyl) isoflavones - characterization and antioxidant properties. **Acs Symposium Series**, v. 507, p. 98-113, 1992

FOLWARCZNA, J., ZYCH, M., TRZECIAK, H.I. Effects of curcumin on the skeletal system in rats. **Pharmacol Rep**, v. 62, p. 900–909, 2010;

FREEMANTLE, N.; COOPER, C.; DIEZ-PEREZ, A.; et al. Results of indirect and mixed treatment comparison of fracture efficacy for osteoporosis treatments: a meta-analysis. **Osteoporos Int**, v. 24, p. 209–217, 2013.

FREITAS, P.H.; HASEGAWA, T.; TAKEDA, S.; et al. Eldecalcitol, a second-generation vitamin D analog, drives bone minimodeling and reduces osteoclastic number in trabecular bone of ovariectomized rats. **Bone**, v. 49, p. 335–342, 2011.

FUKADA, S.Y.; et al. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, p. 25-31, 2009.

GARCIA-OVEJERO D, S.; VEIGA, L.M.; GARCIA-SEGURA, L.L. *et al.* Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. **Journal of Comparative Neurology**, v. 450, p.256–271, 2002.

GENOVESE, M. I.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M. Isoflavone profile and antioxidant activity of Brazilian soybean varieties. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 3, p. 205-211, 2005.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. A. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: Levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5987-5993, 2002.

GONZALEZ-SUAREZ E, BRANSTETTER D, ARMSTRONG A.; et al. RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-

controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. **Mol Cell Biol**, v.27, p. 1442–1454, 2007.

GRUN, I. U.; ADHIKARI, K.; LI, C. *et al.* Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2839-2843, 2001.

HANADA, R.; LEIBBRANDT, A.; HANADA, T. *et al.* Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. **Nature**. v.462, p.505-509, 2009.

HANDA, R.J.; OGAWA, S.; WANG, J.M. *et al.* A.E. Roles for oestrogen receptor in adult brain function. *Journal of Neuroendocrinology*. v. 24, p. 160–173, 2012.

HARLOW, S. D.; GASS M.; HALL J.E.; *et al.* Executive summary of the stages of JIA M.; DAHLMAN-WRIGHT K.; GUSTAFSSON JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v.29, n.4, p.557-568, 2015.

HENDRICH, S.; LEE, K. W.; XU, X. *et al.* defining food components as new nutrients. *Journal of Nutrition*, v. 124, n. 9, p. S1789- S1792, 1994.

HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **J Mol Med**, v. 79, p. 243–253, 2001.

HUGHES D.E.; DAI A.; TIFFEE J.C.; *et al.* Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-B. **Nature**, v. 2, p.1132-6, 1996.

IRVINE, C. H.; SHAND, N.; FITZPATRICK, M. G. *et al.* Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy- or dairy-based infant formulas. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6 p. 1462s-1465s, 1998. Supplement.

JILKA R.L.; HANGOC G.; GIRASOLE G. *et al.* Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by IL- 6. **Science**, v. 257, p. 88-911992.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Dis**, v. 8, p. 147–159, 2002.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. **Endocrinol**, v.142, n. 12, p.5050-5055, 2001.

KUIPER, G.G.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON. B. *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia** – Bases Patológicas da Doença- Robbins e Cotran. 5ª edição. Rio de Janeiro. Elsevier, 2005.

LAFLAMME, R.E.; NAPPI, G.; DROLET, C. *et al.* Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. **Journal of Neurobiology**, v. 36, p. 357–378, 1998.

LACEY, D.L.; TIMMS, E.; TAN, H.L. *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, p.165–176,1998.

LINDAHL, S. H. Reviewing the options for local estrogen treatment of vaginal atrophy. **International Journal of Women's Health**, v. 6, n. 1, p. 307-312, 2014.

LINDGREN, P. R.; CAJANDER, S.; BÄCKSTRÖM T. *et al.* Estrogen and progesterone receptors in ovarian epithelial tumors. **Molecular and Cellular Endocrinolog**. v. 221, p. 97–104, 2004.

LOVE R. R., MAZESS R. B, BARDEN H. S. *et al.* Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. **N Engl J Med**, v. 326, p. 852-856, 1992.

LUBAHN, D. B.; MOYER, J. S.; GOLDING, T. S. *et al.* Smithies, Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 11162–11166, 1993.

Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. **Bone**,v.17, p.635-675, 1995.

MASILAMANI, M.; WEI, J.; SAMPSON, H. A. Regulation of the immune response by soybean isoflavones. **Immunologic Research**, v. 54, n. 1-3, p. 95-110, 2012.

MOREIRA, A. C.; SILVA, A. M.; SANTOS, M. S.; SARDÃO, V. A. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, p. 61-71, 2014.

MURPHY, P. A.; SONG, T. T.; BUSEMAN, G. *et al.* Isoflavones in retail and institutional soy foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2697-2704, 1999.

OKAZAKI R.; INOUE D.; SHIBATA M.; *et al.* Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. **Endocrinology**, v. 143 p. 2349–2356, 2002.

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

PARK, K.; JU, W.; YEO, J. *et al.* Increased OPG/RANKL ratio in the conditioned medium of soybean-treated osteoblasts suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. **INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE**, v. 33, p.178-184, 2014.

PACIFICI R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v. 11, p.1043-1051, 1996.

POWLES T.J.; DAVEY J.B.; MCKINNA A. A feasibility trial of tamoxifen chemoprevention of breast cancer in Great Britain. **Cancer Invest**, v. 6, p.621-624, 1988.

PINTO, M. D.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and in vitro protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6340-6346, 2005.

POLI V, BALENA R, FATTORI E, *et al.* Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. **EMBO J.** v.13, p. 1189-1196, 1994.

PORTMAN, D.J.; GASS, M.L.; Vulvovaginal Atrophy Terminology Consensus Conference Panel. Genitourinary syndrome of menopause: new terminology for vulvovaginal atrophy from the International Society for the Study of Women's Sexual Health and the North American Menopause Society. **J Sex Med**, v.11, p. 2865-2872, 2014.

POTTER, S. M.; BAUM, J. A.; TENG, H. Y.; STILLMAN, R. J.; SHAY, N. F.; ERDMAN, J. W. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6, p. 1375S-1379S, 1998.

RAMALHO, A.C.R.; CASTRO, L.M.; SOLAL, C.E.M.; Por Que Estrógeno e Raloxifeno Melhoram a Densidade Mineral Óssea? Mecanismo de Ação do Estrógeno e de Um Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) no Osso. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 44, n. 6, p. 471-482, 2000.

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

RIMBACH, G.; BOESCH-SAADATMANDI, C.; FRANK, J. *et al.* Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease - A molecular perspective. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1308-1319, 2008.

REMPORT J, BLÁZOVICS A. Phytoestrogens in the treatment of menopause. **Orv Hetil**, v.158, n32, p.1243–1251, 2017.

ROZENBERG S., VANDROMME J., ANTOINE C. Postmenopausal hormone therapy: risks and benefits. **Nat Rev Endocrinol**. v.9, p.216-227, 2013.

SARMA U.; EDWARDS M.; MOTOYOSHI K.; et al. Inhibition of bone resorption by 17b-estradiol in human bone marrow cultures. **J Cel Physiol**, v. 175, p.99-108, 1998.

SETCHELL, K.D.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 758S-767S, 1999.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L. *et al*. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 447-453, 2002.

SHELNUTT, S. R.; CIMINO, C. O.; WIGGINS, P. A. *et al*. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 588-594, 2002.

SHIMAMURA M.; NAKAGAMI H.; OSAKO MK. *et al*: OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. **Proc Natl Acad Sci**, v.111, p. 8191–8196, 2014.

SHUGHRUE, P.J.; SCRIMO, P.J.; MERCHENTHALER, I. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain, **Endocrinology**, v.139, p. 5267–5270, 1998.

SIRIWARDHANA, N.; KALUPAHANA, N. S.; CEKANOVA, M.; LEMIEUX, M.; GREER, B.; MOUSTAID-MOUSSA, N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 613- 623, 2013.

SOUKUP, S. T., HELPPI, J., MULLER, D. R. *et al*. Phase II metabolism of the soy isoflavones genistein and daidzein in humans, rats and mice: a cross-species and sex comparison. **Arch Toxicol**, v. 90, n. 6, p.1335-1347, 2016.

SUN W.H.; KELLER E.T; STEBLER B.S. *et al*. Estrogen inhibits phorbol ester-induced Ikbα transcription and protein degradation. **Bioch Biophys Res Com**, v. 244, p. 691-695, 1998.

STENBERG A, HEIMER G, ULMSTEN U. The prevalence of urogenital symptoms in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 22 p. 17-20, 1995.

ULRICH-VINTHER, M.; ANDREASSEN, T.T. Osteoprotegerin treatment impairs remodeling and apparent material properties of callus tissue without influencing structural fracture strength. **Calcif Tissue Int**, v. 76, p. 280–286, 2005.

ULRICH-VINTHER, M.; SCHWARZ, E.M.; PEDERSEN, F.S. Gene therapy with human osteoprotegerin decreases callus remodeling with limited effects on biomechanical properties. **Bone**, v. 37, p. 751–758, 2005.

VALENTA, A.; ROSCHGER, P.; FRATZL-ZELMAN, N. *et al.* Combined treatment with PTH (1-34) and OPG increases bone volume and uniformity of mineralization in aged ovariectomized rats. **Bone**, v.37, p. 87–95, 2005.

VEGA, D.; MAALOUF, N. M.; SAKHAE, K. The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B (RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, n. 12, p. 4514–4521, 2007.

VISSER, A.; THOMAS, A. Review: Soya protein products-their processing, functionality, and application aspects. **Food Reviews International**, v. 3, n. 1-2, p. 1- 32, 1987.

VITALE, D. C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B. *et al.* Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 38, n. 1, p. 1-11, 2012.

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

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 1666-1673, 1994b.

WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRARD, M. S. *et al.* Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, n. 3, p. 337-341, 1998.

WINTERMANTEL, T.M.; CAMPBELL, R.E.; PORTEOUS, R.; *et al.* Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. **Neuron**, v. 52, p. 271–280, 2006.

WHO. Research on the menopause in the 1990s - Introduction. **Research on the Menopause in the 1990s**: report of a WHO scientific group, v. 866, p. 1-107, 1996.

WOODS, N. F.; MITCHELL, E. S. Symptoms during the perimenopause: prevalence, severity, trajectory, and significance in women's lives. **Am. J. Med. V**, v. 118, p.14–24, 2005.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA

CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito do tratamento com isoflavonas de soja no eixo OPG/RANK/RANKL (OSTEOPROTEGERINA/RECEPTOR ATIVADOR DO FATOR NUCLEAR KAPPA B/RANK LIGANTE) em animais na menopausa**” registrada com o nº **23115.003778/2017-35**, sob a responsabilidade de **Haissa Oliveira Brito**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	05/2017 à 05/2019
Espécie/linhagem/raça	Ratos (Wistar)
Nº de animais	60
Peso/Idade	200-220g/60 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMA