

**ANÁLISE DO CONSUMO DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA
NA QUALIDADE DO TECIDO ÓSSEO DE RATOS JOVENS ADULTOS**Carolina de Matos Figueiredo de Andrade¹Luis Carlos Nobre de Oliveira²Mário Jefferson Quirino Louzada³**RESUMO**

Introdução: A soja é uma leguminosa rica em proteínas, fonte de cálcio e isoflavonas. Um dos possíveis efeitos das isoflavonas é de reduzir a perda óssea quando há uma deficiência de estrogênio. Objetivo: analisar a influência da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) na massa óssea de ratos adultos jovens de ambos o sexo. Materiais e métodos: Foram utilizados 40 ratos *Novergicus Albinus* linhagem Wistar adultos jovens e saudáveis, sendo 20 machos e 20 fêmeas. Aleatoriamente, foram separados em quatro grupos: macho controle (MC), macho suplementado (MS), fêmea controle (FC) e fêmea suplementada (FS) que permaneceram por 11 semanas em gaiola comum recebendo 500 ml de água e 300g de ração diariamente, e os grupos suplementado (MS e FS), ao qual foi oferecido além de água e ração, 500 ml de leite a base de soja, durante o mesmo período experimental do controle. Durante o período experimental o consumo de ração e ingestão de líquidos foram mensurados. Ao final do período experimental foi feita extração dos ossos. Os ossos foram submetidos à densitometria óssea – DXA e ensaio mecânico, para avaliação da densidade mineral óssea - DMO (g/cm²), Força Máxima (N) e Rigidez (kN/m). Resultados: O consumo de EHS provocou diminuição da DMO no grupo MS, porém não houve alteração nas propriedades biomecânicas, força máxima e rigidez. Conclusão: O extrato hidrossolúvel de soja influenciou negativamente o conteúdo mineral ósseo de ratos machos jovens adultos sem alterar as características mecânicas.

Palavras-chave: Densitometria. Distúrbios do Metabolismo do cálcio. Leite de Soja.

1-Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba-SP, Brasil.

ABSTRACT

Analysis of the consumption of soybean soybean extract in the quality of bone tissue of young adult rats

Introduction: Soy is a legume rich in protein, source of calcium and isoflavones. One of the possible effects of isoflavones is to reduce bone loss when there is an estrogen deficiency. Objective: to analyze the influence of diet supplemented with soybean water extract (EHS) on the bone mass of young adult rats of both sexes. Materials and methods: A total of 40 *Novergicus Albinus* rats Wistar young and healthy adults were used, 20 males and 20 females. They were randomly divided into four groups: control male (MC), supplemented male (MS), control female (FC) and supplemented female (FS) who remained for 11 weeks in a common cage receiving 500 ml of water and 300g of feed daily, and the supplemented groups (MS and FS), to which 500 ml of soy milk were offered in addition to water and feed, during the same experimental period of control. During the experimental period feed intake and fluid intake were measured. At the end of the experimental period the bones were extracted. Bone densitometry - DXA and mechanical test for bone mineral density - BMD (g / cm²), Maximum Strength (N) and Rigidity (kN / m) were used. Results: EHS consumption caused a decrease in BMD in the MS group, but there was no change in biomechanical properties, maximum strength and stiffness. Conclusion: The water soluble soybean extract negatively influenced the bone mineral content of young adult male rats without altering the mechanical characteristics.

Key words: Densitometry. Calcium metabolism disorders. Soy milk.

INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max*, é uma leguminosa da família *Fabaceae*. Soja e seus derivados têm sido utilizados há séculos nos países orientais como alimento básico da dieta, além disso, é ingrediente para produtos industrializados no ocidente (Deliza e colaboradores, 2002).

Os produtos de soja mais utilizados no ocidente são o leite de soja, tofu e tempeh. Além disso, a soja encontra-se em 60 % de alimentos processados.

Proteína texturizada de soja (50-70% de proteína de soja) é um substituto da carne encontrado em cachorros-quentes, hambúrgueres, salsichas e outros produtos à base de carne, enquanto proteína isolada de soja (90% de proteína de soja) é usado para enriquecer barras energéticas, bebidas esportivas, fórmulas infantis, cereais, barras de granola, imitação de produtos lácteos, sorvetes e queijos.

Além disso, proteína texturizada de soja é usada para fortificar inúmeros produtos no café da manhã escolar e programas de almoço, bem como outros programas de assistência federais americanas (Patisaul, Jefferson, 2010).

Grãos de soja são sementes ricas em proteínas, considerados boas fontes de cálcio e também a mais importante fonte alimentar de isoflavonas (Coward e colaboradores, 1993).

Estudos em seres humanos, animais, e cultura de células sugerem que fitoestrógenos na dieta desempenham um papel importante na prevenção dos sintomas da menopausa, osteoporose, câncer e doenças cardíacas

Fitoestrógenos são compostos presentes naturalmente em plantas e apresentam estruturas e funções similares ao estrogênio e suas atividades metabólicas. A definição clássica de fitoestrógenos refere-se a compostos que exercem efeitos estrogênicos no sistema nervoso central (Lieberman, 1996).

É importante ressaltar que isoflavonas mostram padrões similares de metabolismo e disposição em animais e humanos, sofrem metabolismo significativo através bactérias no trato gastrointestinal (Setchell, Adlercreutz, 1988).

Um dos possíveis efeitos das isoflavonas é de reduzir a perda óssea na

menopausa. Essa hipótese ganha força em estudos populacionais e alguns modelos animais de osteoporose. Porém os estudos ainda são controversos (Kreijkamp-Kaspers e colaboradores, 2004; Nikander e colaboradores, 2004).

Para muitas pessoas o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) – “leite” de soja – pode substituir o leite de vaca. A substituição do leite de vaca pelo EHS seria perfeita nutricionalmente se referisse-se apenas à quantidade de proteína, porém ao considerarmos a quantidade dos micronutrientes, como por exemplo, o cálcio, o “leite” de soja não se torna um adequado substituto para o leite bovino, cujo conteúdo de cálcio é de 123mg/100 ml de leite, sendo a maior fonte e de melhor absorção do mineral. Autores sugerem que, para atingir uma equivalência entre os dois leites, seria necessário que o de soja fosse enriquecido com 500mg de Ca/porção e não apenas com as atuais 300mg/porção referida pela maioria dos fabricantes (Heaney e colaboradores, 2000).

Com a mudança dos costumes e necessidades dietéticas das populações, pessoas optando por dietas vegetarianas exclusivas (vegan) e a maior incidência de pessoas com intolerância à lactose ou a alergia à proteína do leite de vaca.

A deficiência de cálcio pode vir aparecer com maior frequência podendo acarretar além da perda da massa óssea, problemas como câibras e irritabilidade, por ser um mineral necessário na transmissão nervosa e na regulação dos batimentos cardíacos. O consumo adequado de cálcio durante a vida é um pré-requisito para a saúde dos ossos (Kroeze, 1990).

Dados estatísticos mostram 5% da população adulta Americana é vegetariana, e 2 % adotam a dieta vegan, onde não consomem carne, peixe, frango, leites e derivados e ovos. Esse número corresponde a aproximadamente 5 milhões de pessoas (Le e Sabaté, 2014).

Outra informação importante é que número de pessoas com alergia a proteína do soro do leite, intolerância a lactose e hipolactasia vem aumentando (Kull, Kallikorm, Lember, 2009).

A frequência de intolerância à lactose varia de 2% na Escandinávia a 20 - 40% em populações brancas na Europa Central e nos

Estados Unidos, e aumenta para 53% entre os mexicanos-americanos para cerca de 80% em negros e de quase 100% em populações do Sudeste Asiática (Obermayer e colaboradores, 2004).

Estudos sugerem que a hipolactasia desempenha um papel na determinação de riscos de algumas doenças ou condições.

Hipolactasia por si só não tem um efeito direto sobre o metabolismo do osso, mas pode influenciar indiretamente através da diminuição da ingestão de cálcio, tal como pacientes com hipolactesia e a intolerância à lactose tendem a reduzir a sua ingestão de produtos lácteos. Por exemplo, uma comparação entre mulheres tolerantes ao leite e intolerantes ao leite demonstrou uma diferença superior a 200 mg na ingestão média diária de cálcio.

Baixa ingestão de cálcio pode influenciar o metabolismo ósseo independentemente da idade e sexo e causa aumento na remodelação osséa e nos níveis séricos do hormônio da paratiroide (PTH), levando a diminuição da massa óssea (Honkanen e colaboradores, 1996; Porro, 2009).

A osteoporose é definida como “uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo” (Anonymous, 1990).

Sendo uma doença osteometabólica que possui um grande impacto na qualidade de vida e na sobrevivência. Acomete a ambos os sexos, sendo mais frequente na mulher, já que, no climatério, a diminuição dos níveis estrogênicos precipita as perdas de massa óssea. A ocorrência de fraturas osteoporóticas aumenta sensivelmente a morbimortalidade e a perda funcional do indivíduo acometido, em qualquer período da vida (Yazbek, Marques Neto, 2008).

Recentemente, o estudo *Brazilian Osteoporosis Study* (BRAZOS) mostrou que cerca de 6% da população brasileira com mais de 40 anos referia ter o diagnóstico médico de osteoporose. No entanto, fratura por baixo impacto foi relatada por 15,1% das mulheres e 12,8% dos homens (Pinheiro e colaboradores, 2009).

Um dos mais importantes determinantes do risco de desenvolver osteoporose na vida adulta depende especialmente da quantidade de massa

esquelética adquirida durante a infância e adolescência.

Diversos estudos mostram que a otimização da massa óssea ocorre na infância e adolescência. Um estudo americano transversal com 247 meninas e mulheres adultas com idades entre 11 e 32 anos, mostrou que aproximadamente 90% do conteúdo mineral ósseo é alcançado aos 17 anos, 95% aos 19 anos e 99% aos 22 anos (Teegarden e colaboradores, 1995).

Maximizar a massa óssea nesta faixa etária é extremamente importante para proteger contra fraturas. Podemos assim afirmar que o cálcio é necessário para o desenvolvimento ósseo durante o crescimento e para a manutenção da integridade do esqueleto durante toda a vida adulta (Lanzillotti e colaboradores, 2003).

Existe uma carência de evidências bibliográficas sobre a ação da soja em homens e animais machos. O grande foco das pesquisas realizadas nessas áreas é direcionado a mulheres, que sustentam 40-50% fraturas osteoporóticas em suas vidas (Chrischilles e colaboradores, 1991).

Apesar da existência do reconhecimento de fraturas osteoporóticas em homens, continua havendo negligência dessa doença no sexo masculino (Feldstein e colaboradores, 2006; Gennari, Seeman, 2001).

Esta negligência ainda em curso inadequado como já foi evidenciada 25-33% dos homens em algumas populações vai sustentar fraturas osteoporóticas em sua vida (Nguyen e colaboradores, 1996).

A proposta do estudo foi analisar e comparar a influência da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja na massa óssea em animais jovens adultos, saudáveis de ambos os sexos.

Assim analisando também o papel da soja como suficiente fonte de cálcio e a ação dos fitoestrógenos. Contribuindo para a falta de pesquisas nessa população.

Analisar a ação da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja na massa óssea de animais adultos jovens machos e fêmeas saudáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS**Amostra**

Foram utilizados no total 40 ratos sendo; 20 ratos machos, com 4 meses de idade, da raça *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Araçatuba), escolhidos aleatoriamente.

Os animais foram mantidos em ambiente climatizado ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), no Biotério da FMVA/UNESP/Araçatuba.

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos da Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – Protocolo 2012-02399.

Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo de Macho Controle (MC), grupo de macho Suplementado (MS), grupo de fêmea controle (FC) e grupo de fêmea suplementado (FS) – contendo 10 animais cada, mantidos em caixas próprias para animais experimentais (5 animais por caixa).

Massa corporal

A massa corporal dos animais foi mensurada uma vez por semana utilizando-se balança digital de precisão Toledo® sendo a primeira determinação no início do experimento e a última mensuração no dia do sacrifício dos animais.

Consumos de ração e ingestão de líquidos e tratamento

Para os grupos MC e FC foi ofertado bebedouro contendo água (500 mL) e ração (300g) Presence®, Paulínia, SP, Brasil, cujas informações nutricionais estão presentes na Figura 2.

Para os grupos MS e FS foi ofertado bebedouro contendo água (500mL), outro contendo EHS (500mL) cuja informações nutricionais estão presentes na Figura 1, e ração (300g).

Durante o período experimental, a ingestão de líquidos e o consumo de ração foram mensurados diariamente, no mesmo horário (9h).

O consumo de ração foi encontrado pela diferença entre os colocados inicialmente e as sobras. O mesmo ocorreu para o controle de ingestão de água e EHS. As sobras foram desprezadas, fazendo-se reposição de água, EHS e da ração.

Após 11 semanas todos os valores de consumo foram analisados, obtendo-se a média semanal do consumo por animal.

Tabela 1 - Informações nutricionais do extrato hidrossolúvel de soja.

Informações nutricionais					
Porção de 200 ml (1copo)		%VD*	Porção de 200 ml (1copo)		%VD*
Valor energético	77 kcal - 323 KJ	4%	Sódio	190 mg	8%
Carboidratos, dos quais:	7,4 g	3%	Cálcio	240 mg	24%
Lactose	0 g	**	Zinco	1,1 mg	15%
Açúcares	6,5 g	**	Vitamina C	6,8 mg	15%
Proteínas	5,1 g	7%	Vitamina E	1,5 mg	15%
Gorduras totais, das quais:	3 g	6%	Vitamina B ₆	0,20 mg	15%
Gorduras saturadas	0,4 g	2%	Vitamina A	90 µm	15%
Gorduras trans	0 g	**	Ácido fólico	36 µm	15%
Gorduras monoinsaturadas	0,8 g	**	Vitamina D	2,0 µm	40%
Gorduras poliinsaturadas	1,8 g	**	Vitamina B ₁₂	1,0 µm	40%
Colesterol	0 mg	**	Vitamina B ₂	0,20 mg	40%
Fibra alimentar	0,7 g	3%			

Fonte: Site do fabricante, <http://www.adex.com.br/produtos/detalhe/645217/adex-original-11>.

Tabela 2 - Informações nutricionais da ração.

Informações nutricionais			
Magnésio	0,006 mg	Pantotenato de cálcio	90 mg
Ferro	180 mg	Tiamina	11 mg
Cobre	30 mg	Riboflavina	12 mg
Zinco	110 mg	Piridoxina	vit. B6 HCl
Manganês	110 mg	Antioxidante	200 mg
Iodo	1 mg	Ácido propiônico	1.486 mg
Selênio	0,2 mg	Carboidratos	55%
Cobalto	2 mg	Umidade máxima	13%
Vitamina A	25.577 UI	Proteína bruta (min.)	23%
Vitamina D3	4.000 UI	Extrato etéreo (min.)	4%
Vitamina E	82 mg	Matéria fibrosa (max.)	7%
Vitamina K	6,40 mg	Matéria mineral (max.)	10%
Ácido Fólico	13 mg	Cálcio (min.)	1,20%
Biotina	0.16 mg	Cálcio (máx.)	1,30%
Colina	2.800 mg	Fósforo (min.)	0,85%
Niacina	220 mg		

Fonte: Fornecidas pelo fabricante, Nutrimentos Presence®, via email.

Eutanásia

Os animais foram anestesiados com Ketamina (80mg/Kg) e Xilazina 2% (10mg/Kg) intraperitoneal, para que pudesse ser realizada a punção cardíaca.

Densitometria óssea

A avaliação densitométrica foi realizada após a eutanásia dos animais. As tíbias e os fêmures direitos foram desarticulados e dissecados, e submersos em recipiente plástico contendo água a 2 cm de profundidade (para simular tecido mole), alinhados corretamente e em seguida scaneados, capturando sua imagem por absorciometria de raios X de dupla energia (DXA) por meio de densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR, com software especial para pequenos animais com alta resolução.

Posteriormente, as imagens foram manualmente contornadas para obtenção dos valores de área (cm²), conteúdo mineral ósseo – CMO (g) e densidade mineral óssea areal – DMO_A (g/cm²).

Ensaio biomecânicos

As tíbias direitas foram submetidas ao ensaio de flexão à três pontos e os fêmures aos ensaios de compressão da cabeça e terço médio. Realizados em máquina universal EMIC®, modelo DL 3000, com carga aplicada à velocidade de 5 mm/min e força de 2000N. Os resultados foram registrados em sistema computacional pertencente ao próprio equipamento. Foi registrada a força máxima admitida. Com a curva força x deslocamento calculou-se a rigidez (inclinação da curva na fase elástica).

Estatística

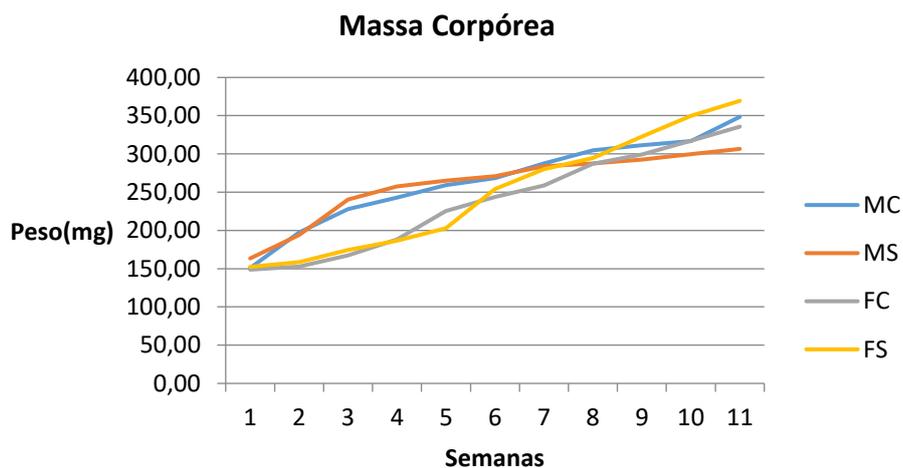
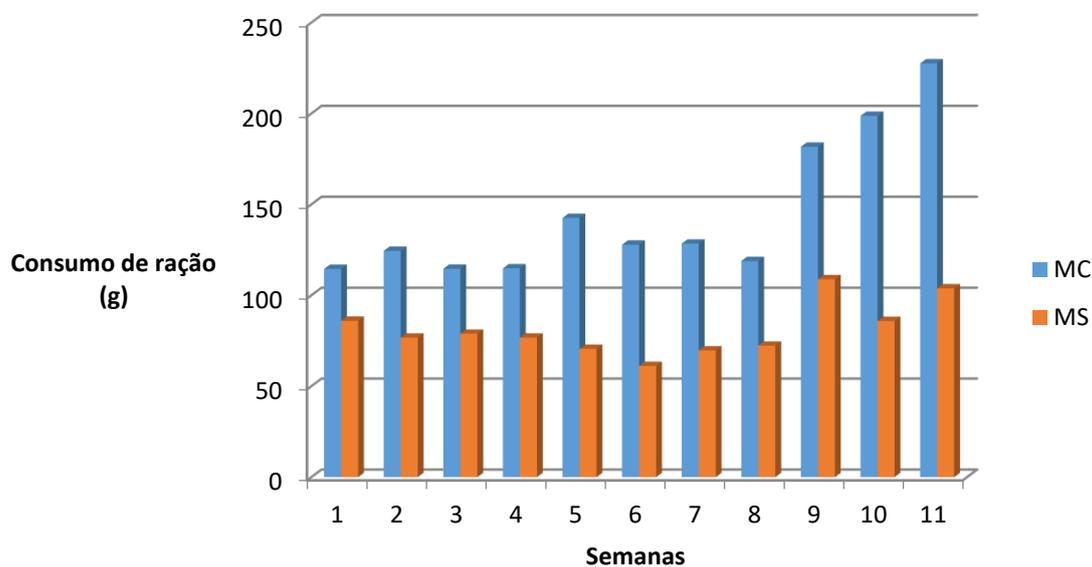
Os dados obtidos foram apresentados como média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 6.0., o teste t de Student não pareado sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Os dados de massa corpórea e ingestão de ração estão apresentados na figura 3, 4 e 5 e na tabela 3.

Tabela 3 - Média e erro padrão da média na massa corpórea e do consumo de ração semanal, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).

Grupos	MC	MS	FC	FS
Massa corpórea (g) 1ª semana	150,91 ± 2,78	163,4 ± 4,82	148,74 ± 2,57	152,41 ± 2,37
Massa corpórea (g) 11ª semana	348,55 ± 2,03	306,6 ± 2,65	335,62 ± 1,64	369,41 ± 4,06
Consumo de ração semanal (g)	144,91 ± 11,8	80,96 ± 4,36	152,12 ± 8,83	79,49 ± 3,67

**Figura 1** - Gráfico do ganho de massa corpórea por semana dos grupos MC, MS, FC e FS.**Figura 2** - Gráfico do consumo de ração por semana dos grupos MC e MS.

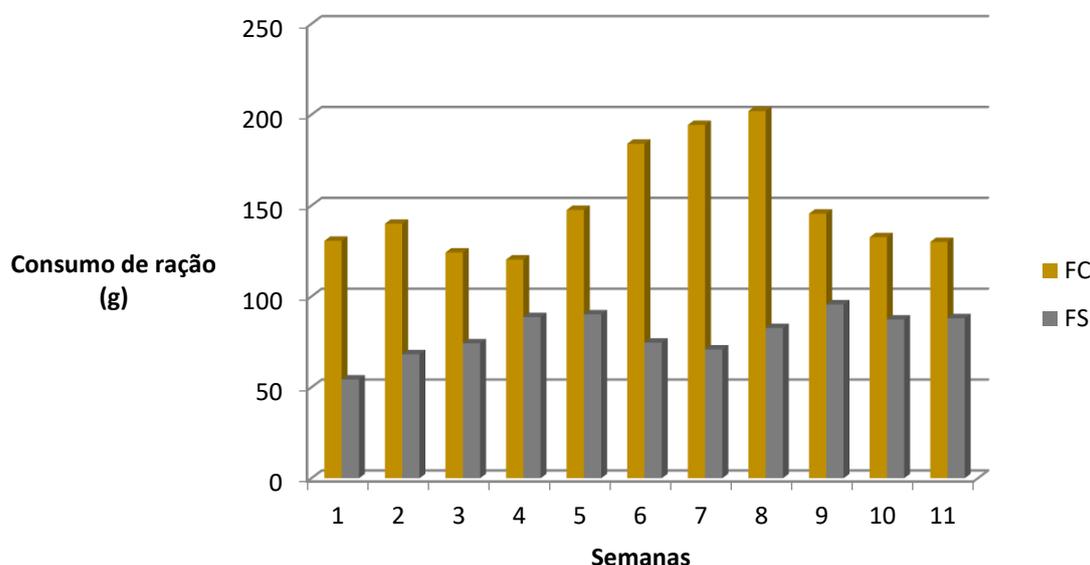


Figura 3 - Gráfico do consumo de ração por semana dos grupos FC e FS.

Tabela 4 - Média e erro padrão da média das variáveis: densitometria óssea e ensaios biomecânicos dos fêmures, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).

Grupos	Fêmures			Fêmures		
	MC	MS	P	FC	FS	P
CMO (g)	0,3652 ± 0,015	0,3276 ± 0,017	0,1261	0,295 ± 0,010	0,287 ± 0,015	0,6577
Área (cm ²)	2,122 ± 0,062	2,204 ± 0,051	0,3264	1,653 ± 0,034	1,713 ± 0,0310	0,2140
DMO _A (g/cm ²)	0,1716 ± 0,003	0,1489 ± 0,007	0,0097	0,1785 ± 0,005	0,1671 ± 0,008	0,1892
Força máxima cabeça (N)	142,4 ± 7,542	125,8 ± 5,637	0,0946	106,9 ± 6,128	117,5 ± 4,232	0,1606
Rigidez cabeça (10 ³ N/m)	262,4 ± 24,6	318,6 ± 14,50	0,0670	345,7 ± 41,34	379,3 ± 28,24	0,4982
Energia(mJ) cabeça	77,69 ± 10,39	60,61 ± 6,379	0,1832	58,56 ± 12,26	55,1 ± 7,815	0,6750
Força máxima terço médio (N)	144,4 ± 7,761	138,3 ± 3,262	0,4728	101,9 ± 3,527	113,4 ± 4,396	0,0535
Rigidez terço médio (10 ³ N/m)	264,7 ± 13,73	268,3 ± 12,66	0,8510	224,1 ± 8,790	235,5 ± 11,74	0,4468
Energia (mJ) terço médio	72,97 ± 7,038	69,63 ± 4,163	0,6883	41,69 ± 3,480	47,85 ± 2,763	0,1826

Tabela 5 - Média e erro padrão da média das variáveis: densitometria óssea e ensaios biomecânicos das tíbias, referentes ao grupo fêmea controle (FC), grupo fêmea suplementado com EHS (FS, grupo macho controle (MC) e ao grupo macho suplementado com EHS (MS).

Grupos	Tíbias			Tíbias		
	MC	MS	P	FC	FS	P
CMO (g)	0,2502 ± 0,0100	0,2129 ± 0,015	0,0602	0,2155 ± 0,0087	0,2080 ± 0,013	0,6320
Área (cm ²)	1,769 ± 0,0497	1,813 ± 0,038	0,4955	1,462 ± 0,028	1,523 ± 0,031	0,2392
DMOA (g/cm ²)	0,1412 ± 0,003	0,1167 ± 0,006	0,0050*	0,1478 ± 0,005	0,1362 ± 0,007	0,2050
Força máxima (N)	73,01 ± 4,263	78,98 ± 2,850	0,2612	63,08 ± 2,249	68,96 ± 4,359	0,2459
Rigidez (10 ³ N/m)	94,52 ± 6,438	110,8 ± 7,476	0,1182	113,7 ± 6,922	122,1 ± 11,5	0,9705
Energia(mJ)	35,28 ± 2,636	32,45 ± 1,848	0,3971	23,23 ± 1,752	23,97 ± 1,774	0,7679

Os resultados do teste de densitometria óssea e ensaios mecânicos estão apresentados na tabela 4 e na tabela 5, com média e erro padrão da média. Foram comparados os grupos MC com MS e FC e FS. Não houve comparação entre gêneros.

A DMO das regiões ósseas trabeculares e corticais, parâmetros histológicos, e micro tomografia computadorizada ainda estão em análise.

DISCUSSÃO

As análises ósseas de ratos de ambos os sexos *Wistar* submetidos à dieta suplementada com EHS foram comparados aos de animais controle sendo evidenciada a influência deste alimento diretamente no metabolismo ósseo.

Foi evidenciado, a mudança no comportamento alimentar nos animais dos grupos MS e FS que reduziram o consumo de ração e água e passaram a ingerir o EHS, que de acordo com Sclafani e Xenakis (1984) e Noveli e colaboradores (2007) pode ser explicada pela elevada palatabilidade do EHS.

No presente trabalho, realizou-se a densitometria óssea do osso inteiro ao final do experimento. Quando comparadas as variáveis CMO e área das tíbias e fêmures observaram-se que não ocorreu diferenças significantes entre os grupos MC e MS, no entanto foi acusada diferença na variável DMO nos ratos machos.

Podendo dizer que o consumo de EHS afetou de forma significativa a densidade óssea de ratos machos, causado uma perda mineral no grupo suplementado.

Esse resultado vem de encontro com o estudo realizado em nosso laboratório, que utilizou ratos machos de 30 dias suplementados com EHS os dados achados de Gaffne-Stomberg e colaboradores (2014), afirmam que por ter uma estrutura semelhante ao estrógeno, a isoflavona da soja acarretou na perda de massa óssea de ratos machos orquiectomizados.

Porém em alguns estudos já realizados com soja em ratos machos apresentaram resultados contraditórios mostrando aumento na DMO em ratos machos (Fujioka e colaboradores, 2007; Kalil e Lucas, 2005).

Como ainda há um déficit de publicações sobre a ingestão de EHS por machos jovens. Encontramos na literatura alguns estudos de resultados não positivos do consumo de isoflavona no metabolismo ósseo (Fujioka e colaboradores, 2007; Ikeda e colaboradores, 2010).

Os ratos apesar de serem seres quadrúpedes, dividem muitas similaridades com os humanos no que diz a respeito o comportamento de seu esqueleto: formação rápida de ossos e a mineralização acontece durante os primeiros meses de vida, e esse

processo continua acontecendo até o primeiro ano de vida (Mardon e colaboradores, 2008).

De fato, Schapira e colaboradores (1991) mostrou que, em ratos *Wistar*, a construção de massa óssea acontece no primeiro ano de vida, a densidade mineral óssea e o pico de mineralização acontece até os 12 meses de idade e a maioria dos valores estão atingidos na idade de 8 meses.

Essa informação tem grande relevância, pois os ratos analisados começaram a receber o tratamento com EHS no momento em que atingiriam seu pico máximo de massa óssea.

Os resultados apresentados na análise de densitometria óssea nos grupos FC e FS mostrou sem diferenças estatísticas. O uso de EHS não influenciou na densidade mineral óssea das fêmeas.

Esse efeito foi também observado por Mardon e colaboradores (2007), onde foi analisado o efeito da dieta rica em isoflavonas em ratos do sexo feminino do nascimento ou envelhecimento.

As variáveis biomecânicas advindas dos testes de flexão da tíbia, flexão da cabeça e terço médio do fêmur, não apresentaram diferença estatística entre os grupos como o encontrado na densitometria óssea. As variáveis do ensaio mecânico fornecem informações sobre as propriedades ósseas (Turner e Burr, 1993).

As tíbias e os fêmures nas análises de força máxima, rigidez e energia, dos animais do Grupo MS não mostraram alteração significativa nas variáveis analisadas quando comparados ao grupo MC. Quando comparado os resultados dos grupos FC e FS também não encontramos diferença significativa. Esses resultados nos levam a afirmar que o consumo de EHS não influenciou as características biomecânicas dos fêmures e tíbias de ratos independente do gênero.

Na literatura é encontrado estudo com ratos machos expostos a isoflavonas que, também, não apresentaram efeitos benéficos para o fêmur e vértebra lombar dos animais. Sugerindo que o efeito da exposição precoce a isoflavonas pode ser determinado pelo sexo (Kadudjerovic e Ward, 2009).

No entanto, a prole feminina quando exposta a isoflavonas da soja apresentaram maior DMO_A e melhor estrutura do fêmur e vértebras lombares (Piekarz e Ward, 2007).

Com relação à massa corpórea e consumo de ração foi possível observar comparando os quatro grupos, o maior ganho de peso do grupo FS e o menor do MS. E o grupo que na média consumiu mais ração foi o FC.

A densidade óssea é o principal determinante da resistência mecânica do osso e do risco de fraturas (Melton, Riggs, 1983). Outros fatores como exposição a traumas, qualidade e geometria óssea são também importantes (Cummings e colaboradores, 1993).

Embora DXA seja padrão ouro para diagnóstico de osteoporose, o índice de rigidez pode indicar e selecionar indivíduos com osteoporose. Foi registrado o declínio do índice de rigidez com o envelhecimento, sendo maior em homens do que em mulheres (Kyung-Ae e colaboradores, 2015; Kruger e colaboradores, 2013).

A qualidade óssea ou microarquitetura trabecular é responsável por cerca de 30 a 50% da resistência mecânica do osso.

Por esse motivo, verifica-se em idosos reduções maiores da resistência óssea que a esperada pela simples perda de densidade óssea, pois a perda de volume ósseo observada com a idade é acompanhada por mudanças estruturais que também diminuem a resistência óssea (Mosekilde, Mosekilde, Danielsen, 1987).

A pesquisa sobre a relação dos fitoestrogênios com saúde óssea da mulher parece estar mais bem colocada e muito mais avançada, quando no que se diz a respeito da relação desse componente no comportamento ósseo dos homens.

Algumas linhas de pesquisas vêm apresentadas de resultados positivos das isoflavonas nas propriedades ósseas em ratos machos orquiectomizados (Fanti e colaboradores, 1998; Wu e colaboradores, 2003).

Ao fazer uma analogia aos humanos conclui-se a soja entra como uma forma de tratamento a osteoporose. Ou seja, quando já existe uma deficiência na função óssea, a isoflavona possui uma ação positiva (Setchell, Lydeking, 2003).

Ainda está incerta a posição da soja como uma forma de prevenção a osteopenia e fraturas ou se o consumo de uma forma crônica de fitoestrogênios pode causar efeitos

no metabolismo ósseo em indivíduos saudáveis.

CONCLUSÃO

O consumo de EHS provocou diminuição significativa dos valores das propriedades ósseas de ratos adultos jovens machos, como a densidade.

Além disso, observou-se que o consumo de EHS não alterou propriedades mecânicas independente do gênero de ratos adultos jovens.

Nossas observações indicam a necessidade de estudos adicionais principalmente com relação ao consumo de soja e fitoestrogênios e as propriedades ósseas.

REFERÊNCIAS

- 1-Anonymous. Consensus development conference: Pro-phylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med. Vol. 90. 1990. p.107-110.
- 2-Chrischilles, E.A.; Butler, C.D.; Davis, C.S.; Wallace, R.B. A model of lifetime osteoporosis impact. Arch Intern Med. Vol. 151. 1991. p. 2026-2032.
- 3-Coward, L.; Barnes, N.C.; Setchell, K.D.R.; Barnes, S. Genistein, daidzein, and their glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. J. Agric. Food Chem. Vol. 41. 1993. p. 1961-1967.
- 4-Cummings, S.R.; Browner, D.M.; Black, D.M. Risk factors for hip fracture: New Findings New Questions. In: Proceedings from the Fourth International Symposium on Osteoporosis, Christiansen C and Riis BR, Eds. Hong Kong. 1993. p.73-74.
- 5-Deliza, R.; Saldivar, S.S.; Germani, R.; Benassi, V.T.; Cabral, L.C. The effects of colored textured soybean protein (TSP) on sensory and physical attributes of ground beef patties. Journal of Sensory Studies. Vol. 17. Num. 2. 2002. p. 121-132.
- 6-Fanti, P.; Monier-Faugere, M.C.; Geng, Z. The phytoestrogen genistein reduces bone

- loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos.* Vol. 8. Num. 3. 1998. p. 274-281.
- 7-Feldstein, A.C.; Nichols, G.; Orwoll, E.; Elmer, P.J.; Smith, D.H.; Herson, M. The near absence of osteoporosis treatment in older men with fractures. *Osteoporos Int.* Vol. 16. 2005. p. 953-962.
- 8-Fujioka, M.; Sudo, Y.; Okumura, M.; Wu, J. Differential effects of isoflavones on bone formation in growing male and female mice, *Metabolism Clinical and Experimental.* Vol. 56. Num. 8. 2007. p. 1142-1148.
- 9-Gaffney-Stomberg, E.; Cao, J.J.; Lin, G.G. Dietary protein level and source differentially affect bone metabolism, strength, and intestinal calcium transporter expression during ad libitum and food-restricted conditions in male rats. *J. Nutr.* Vol. 144. 2014. p.821-829.
- 10-Gennari, C.; Seeman, E. Introduction: The first international conference on osteoporosis in men Siena, Italy. *Calcif Tissue.* Vol. 69. 2001. p. 177-178.
- 11-Heaney, R.P.; Dowell, M.S.; Rafferty, K.; Bierman, J. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. *Am J Clin Nutr.* Vol. 71. Num. 5. 2000. p.1199-1209.
- 12-Honkanen, R.; Pulkkinen, P.; Jarvinen, R. Does lactose intolerance predispose to low bone density? A population-based study of perimenopausal Finnish women. *Bone.* Vol. 19. 1996. p. 23-28.
- 13-Ikeda, Y.; Iki, M.; Morita, A. Intake of fermented soybeans, Natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese population-based osteoporosis study. *J. Nutr.* Vol. 31. 2010. p. 400-419.
- 14-Kadudjerovic, J.; Ward, W.E. Neonatal exposure to daidzein, genistein, or the combination modulates bone development in female CD-1 mice. *J. Nutr.* Vol.139. 2009. p. 467-473.
- 15-Kalil, D.A.; Lucas, E.A. Soy isoflavones may protect against orchidectomy-induced bone loss in aged male rats, *Calcified Tissue International.* Vol. 76. 2005. p. 56-62.
- 16-Kreijkamp-Kaspers. S.; Kok, L.; Grobbee, D.E. Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA.* Vol. 292. Num. 1. 2004. p. 65.
- 17-Kroeze, J.H.A. The perception of complex taste stimuli. In: McBride, R.L.; Mascie, H.J.H. *Psychological basis of sensory evaluation.* Elsevier Applied Science. London. 1990. p. 41-68.
- 18-Kruger, M.C.; Todd, J.M.; Schollum, L.M. Bone health comparison in seven Asian countries using calcaneal ultrasound. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013. p. 14-81.
- 19-Kull, M.; Kallikorm, R.; Lember, M. Impact of molecularly defined hypolactasia, self-perceived milk intolerance and milk consumption on bone mineral density in a population sample in Northern Europe. *Scand J Gastroenterol.* Vol. 44. 2009. p.415-421.
- 20-Kyung-Ae, P.; Park, R.N.; Min-Hee, S.U.H. Lifestyle and Genetic Predictors of Stiffness Index in Communitydwelling Elderly Korean Men and Women. *Asian Nursing Research.* Vol. 9. 2015. p. 251-258.
- 21-Lanzillotti, H.S.; Lanzillotti, R.S.; Trotte, AP. R. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. *Rev Nutr.* Vol. 16. Num. 2. 2003. p.181-193.
- 22-Le, L. T.; Sabaté, J. Beyond Meatless, the Health Effects of Vegan Diets: Findings from the Adventist Cohorts. *Nutrients.* Vol. 6. Num. 6. 2014. p. 2131-2147.
- 23-Lieberman, S. Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or synthetic, merely semantical? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996. p. 81850.
- 24-Mardon, J.; Mathey, J.; Kati-Coulibaly, S. Influence of Lifelong Soy Isoflavones Consumption on Bone Mass in the Rat *Exp Biol Med (Maywood).* Vol. 233. Num. 2. 2008. p. 229-237.
- 25-Melton, L.J.; Riggs, B.L. Epidemiology of age-related fractures. Avioli LV., Ed. *The*

osteoporotic syndrome. New York: Grune and Stratton. Vol. 75. Num. 6. 1983 p. 45-72.

26-Mosekilde, L.I.; Mosekilde, L.E.; Danielsen, C.C. Biochemical competence of vertebral trabecular bone in relation to ash density and age in normal individuals. *Bone*. Vol. 8. 1987. p. 79-85.

27-Nguyen, T.V.; Eisman, J.A.; Kelly. Risk factors for osteoporotic fractures in elderly men. *Am J Epi- demiol*. Vol. 144. Num. 3. 1996. p. 255-263.

28-Nikander, E.; Metsä-Heikkilä, M.; Ylikorkala, O. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. Vol. 89. Num. 3. 2004. p.1207-1212.

29-Novelli, M.; D'aleo, V.; Lupi, R. Reduction of oxidative stress by a new low-molecular-weight antioxidant improves metabolic alterations in a no obese mouse diabetes model. *Pancreas*. Vol. 35. 2007. p. 10-17.

30-Obermayer-Pietsch, B.M.; Bonelli, C.M.; Walter, D.E. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. *J Bone Miner Res*. Vol. 19. 2004. p. 42-47.

31-Patisaul, H.B.; Jefferson, W. The pros and cons of phytoestrogens, *Neuroendocrinol*. Vol. 31. Num. 4. 2010. p. 400-419.

32-Piekarz, A.V.; Ward, W.E. Effect of neonatal exposure to genistein on bonemetabolism in mice at adulthood. *Pediatr. Res*. Vol. 61. 2007. p. 48-53.

33-Pinheiro, M.M.; Ciconelli, R.M.; Martini, L.A. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporos Int*. Vol. 20. Num. 3. 2009. p. 399-408.

34-Porro, G. B. This month in the Scandinavian Journal of Gastroenterology. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Vol. 44. Num. 4. 2009. p. 388-389.

35-Setchell, K.; Adlercreutz, H. Mammalian lignans and phytoestrogens: recent studies on their formation, metabolism and biological role

in health and disease. in: Rowland I.R. (Ed.) *Role of the Gut Flora, Toxicity and Cancer*. Academic Press. London. 1988. p. 315-345.

36-Sclafani, A.; Xenakis, S. Sucrose and polysaccharide induced obesity in the rat. *Physiol. Behav*. Vol. 32. 1984. p. 169-174.

37-Schapira, D.; Lotan-Miller, R.; Barzilai, D. The rat as a model for studies of the aging skeleton. *Cells Mater Suppl*. Vol. 1. 1991. p. 181-188.

38-Setchell, K.D.; Lydeking-Olsen, E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr*. Vol. 78. 2003. p. 593S-609S.

39-Teegarden, D.; Proulx, W.R.; Martin, B.R. Peak bone mass in young women. *J Bone Min Res*. Vol. 10. 1995. p. 711-715.

40-Turner, C.H.; Burr, D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. Vol. 14. 1993. p. 595-608.

41-Wu, J.; Wang, X.X.; Chiba, H. Combined intervention of exercise and genistein prevented and rogen deficiency-induced bone loss in mice. *J Appl Physiol*. Vol. 94. 2003. p. 335-342.

42-Yazbek, M. A.; Marques Neto, J.F. Osteoporose e outras doenças osteometabólicas no idoso. *Einstein*. Vol. 6. 2008. p. 74-78.

2-Universidade de Franca-UNIFRAN, Franca-SP, Brasil; Professor no Centro Universitário Toledo-UniToledo; Araçatuba-SP Brasil; Doutorando em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba-SP, Brasil.

3-Programa de Engenharia Biomédica da UNICAMP, Campinas-SP, Brasil; Professor no Centro Universitário Católico Auxilium Salesiano (UniSALESIANO), Araçatuba-SP, Brasil.

Recebido para publicação em 18/02/2018

Aceito em 02/04/2018