

EFEITO DO EXTRATO DE ISOFLAVONAS NO ÍNDICE PROLIFERATIVO DA MUCOSA LINGUAL COMPARADO AO EPITÉLIO UTERINO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS. Tamara Nishijima Pupo Massagardi, Vanessa Ávila Sarmento Silveira, Renata Falchete do Prado, Yasmin Rodarte Carvalho. – Odontologia – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia – UNESP – São José dos Campos.

Compreende-se como climatério a fase da vida na qual as gônadas cessam sua função. O último sangramento cíclico é designado por menopausa. O período precedente à menopausa é identificado como pré-menopausa e o período subsequente como pós-menopausa (BYDLOWSKI, 2002).

O climatério é um processo caracterizado pelo declínio na secreção de estrógeno pelos ovários, responsável por uma série de modificações no corpo feminino. Alguns sintomas característicos deste período se manifestam de forma mais grave se o estrógeno for removido de forma abrupta como nas ovariectomia (BYDLOWSKI, 2002).

O tratamento mais utilizado para reduzir essas alterações é a TRH, com administração de estrógenos ou estrógenos associados a progesterona. Estudos têm mostrado efeitos indesejáveis relacionados a essa terapia, pois o estrógeno estimula as células endometriais aumentando o risco de aparecimento de hiperplasias e carcinomas (VINCENT & FITZPATRICK, 2000).

Os hormônios ovarianos também agem na mucosa bucal, devido à presença de receptores específicos, detectados em tecido gengival por meio de métodos imunoistoquímicos (LEIMOLA et al., 2000). A deficiência de estrógeno possivelmente causa alterações teciduais na mucosa bucal, uma vez que afeta a proliferação, diferenciação e queratinização do epitélio gengival e estimula a proliferação de fibroblastos (SEKO et al., 2005; VITTEK et al. 1982).

Alguns autores acreditam que a deficiência dos hormônios ovarianos tem relação com a síndrome da ardência bucal (SAB), chamada também de desconforto oral (FORABOSCO et al. 1992; WALDROP et al. 1989). A SAB representa uma condição caracterizada por boca seca, com uma sensação de queimação. Atrofia gengival e ulcerações na mucosa bucal também podem fazer parte do quadro clínico (FORABOSCO et al. 1992).

Seko et al. (2005) avaliaram o efeito do estrógeno e de sua deficiência na mucosa bucal de ratas ovariectomizadas. Os resultados mostraram que nos animais ovariectomizados a espessura do epitélio da mucosa e da camada córnea foi significativamente menor e que o período de renovação epitelial foi prolongado. A diferença foi mais evidente no ápice da língua.

A TRH tem apresentado efeitos indesejáveis como o aumento do risco de câncer de mama e complicações vasculares, como embolias e trombozes, relatados em mulheres que fazem uso dessa terapia. Como consequência, houve um aumento na busca de terapias alternativas (WUTTKE et al. 2002).

Uma das alternativas terapêuticas são os fitohormônios, ou fitoestrógenos, um grupo de compostos não-esteróides encontrados em diversos vegetais (GLAZIER & BOWMAN 2001; AXELSON et al., 1984). Grande parte desses compostos apresenta um anel fenólico, responsável por sua capacidade de ligação aos receptores hormonais, podendo agir como agonistas ou antagonistas dos estrógenos, dependendo do sítio de atuação (ALVES & SILVA, 2002; WILLIAMS & STANGEL, 1996).

Existem três tipos de fitoestrógenos: as isoflavonas (mais potentes) encontradas principalmente na soja, as lignanas encontradas em grãos, frutas e vegetais e as cumestanas na semente de linhaça e alfafa (VINCENT & FITZPATRICK, 2000). Dentre essas, a genisteína e a daidzeína são as mais investigadas e possuem propriedades estrogênicas (NAFTOLIN & STANBURY, 2002; WUTTKE et al. 2002; GLAZIER & BOWMAN, 2001).

Nos órgãos-alvo, os fitoestrógenos tendem a formar ligações estáveis com os receptores hormonais. Tais compostos são levados pelas mesmas proteínas transportadoras de esteróides do sangue e como apresentam baixa afinidade pelas proteínas transportadoras, são encontrados em maiores quantidades na sua forma livre que os estrógenos naturais ou sintéticos (ALVES & SILVA, 2002).

O efeito biológico dependerá do tipo e da quantidade de receptores hormonais existentes em cada órgão-alvo, além da quantidade de hormônios produzidos pelo organismo e presentes na circulação (VINCENT & FITZPATRICK, 2000).

Não foram encontrados na literatura, até o presente momento, estudos sobre os efeitos das isoflavonas no epitélio bucal de ratas ovariectomizadas. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da ovariectomia e do tratamento com extrato de isoflavonas da soja no índice de proliferação do epitélio lingual comparado ao epitélio uterino de ratas, por meio de análise imunoistoquímica.

Foram utilizadas 45 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com 90 dias de idade, peso aproximado de 300g, mantidos em gaiolas à temperatura ambiente, alimentados com ração e água *ad libitum*, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP.

Os animais foram divididos aleatoriamente em grupo ovariectomizado (30 animais) e grupo Sham (15 animais). Nos animais do grupo ovariectomizado foi realizada a remoção do ovário juntamente com parte do útero e tecidos moles circundantes, sendo este procedimento feito bilateralmente.

Nos animais do grupo Sham, foi feita a exposição dos ovários sem a remoção dos mesmos.

Os animais foram então subdivididos de acordo com o tratamento recebido:

- Grupo ISO: constituído por 15 ratas que receberam 15mg/kg/dia, de isoflavonas;
- Grupo OVZ: constituído por 15 ratas ovariectomizadas que receberam água como placebo;
- Grupo Sham: constituído por 15 ratas falso-operadas (sham) que receberam água como placebo.

O medicamento utilizado foi o extrato de isoflavonas da soja a 40%, cedido pelo Laboratório Botânico Herbarium, administrado via oral, por gavage.

De cada grupo de 15 ratas, cinco foram sacrificadas 3 semanas após a cirurgia, cinco após 5 semanas, e as cinco restantes foram sacrificadas 8 semanas após a cirurgia. Os animais foram anestesiados e sacrificados na guilhotina, a língua e o útero de cada animal foram removidos e imediatamente fixados em solução de formol a 10%, para análise histológica e imunoistoquímica.

Para análise histológica, as línguas e o útero foram fixados pelo tempo mínimo de 24 horas e incluídos em parafina. Parte do material foi cortado e corado pela técnica da hematoxilina-eosina, e submetidos à análise qualitativa em microscopia de luz.

Para a análise imunoistoquímica foi utilizada a técnica da streptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB kit, Peroxidase) para evidênciação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). O índice proliferativo foi obtido pela contagem das células marcadas positivamente pelo anticorpo PC10 (anti-PCNA). Foram feitas três lâminas de útero e três de língua para cada rata, com cortes em diferentes planos. Foram contadas 300 células de útero e 300 células de língua de cada rata.

Os dados referentes ao índice proliferativo das 45 ratas foram avaliados por meio do teste ANOVA, dois fatores e o teste de comparação múltipla de TUKEY, desejando-se saber se:

- a) houve alguma relação entre o índice proliferativo e a deficiência estrogênica
- b) houve alguma diferença significativa entre os índices de PCNA comparando-se as diferentes condições de tratamento.

Foi considerado como nível de significância o valor convencional de 5%.

Não foi observado efeito da deficiência estrogênica sobre os aspectos morfológicos do ápice da língua, bem como sobre o índice proliferativo da camada basal do epitélio, embora o grupo OVZ tenha apresentado menores médias de células PCNA positivas nos três períodos de sacrifício (Gráfico 1). Uma limitação do PCNA relaciona-se ao seu tempo de meia-vida de aproximadamente vinte horas. Tal fato torna possível a detecção dessa proteína em células que tenham deixado recentemente o ciclo celular (Hall et al., 1990). Os nossos resultados devem ser interpretados levando-se em consideração essa restrição.

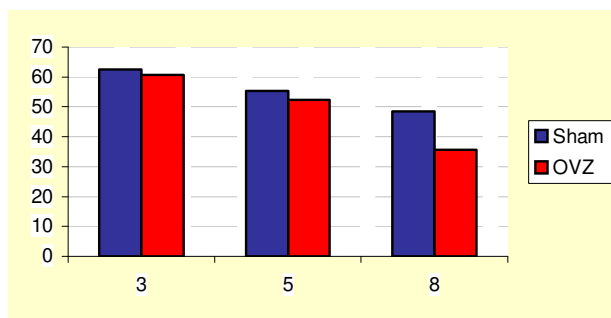


GRÁFICO 1 - médias das porcentagens de células marcadas, considerando os efeitos ovariectomia e tempo de sacrifício.

Durante o sacrifício, notou-se que a deficiência estrogênica ocasionou uma evidente diminuição do volume do útero, resultado confirmado pela análise histológica e imunoistoquímica.

Na análise histológica foi observado que no grupo Sham, o epitélio de revestimento apresentou-se como epitélio simples, ora colunar baixo, ora colunar alto e um caso com metaplasia escamosa. O estroma subjacente apresentou intensa infiltração inflamatória eosinofílica. Já nos grupos OVZ e ISO, o epitélio de revestimento apresentou-se como epitélio cúbico simples e o estroma subjacente exibiu menor espessura que o grupo Sham.

Os eosinófilos desempenham importante papel na preparação do endométrio para implantação do óvulo na fase estro do ciclo menstrual de ratas e outros mamíferos (Koshi et al., 2005). Portanto, conclui-se que todas as ratas do grupo Sham encontravam-se nessa fase do ciclo.

A porcentagem média de células PCNA positivas no útero das ratas do grupo OVZ no período de cinco semanas foi menor quando comparada à do período de três semanas. Entretanto, na oitava semana a porcentagem foi maior. Possivelmente essa variação se deva aos mecanismos de compensação hormonal que existem no organismo (Gráfico 2).

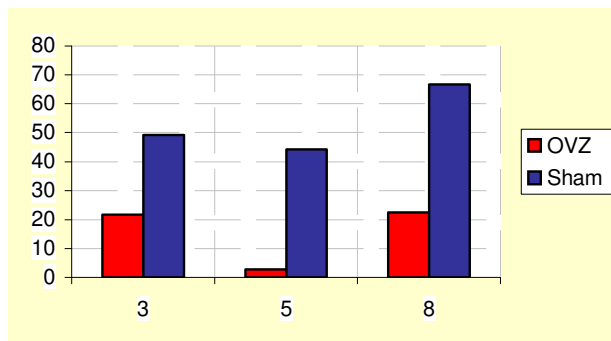


GRÁFICO 2 - médias das porcentagens de células marcadas no útero, considerando os efeitos ovariectomia e tempo de sacrifício.

Na língua o grupo ISO não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo OVZ, porém, no útero as médias foram superiores às do grupo OVZ, nos três períodos de sacrifício (Gráfico 3).

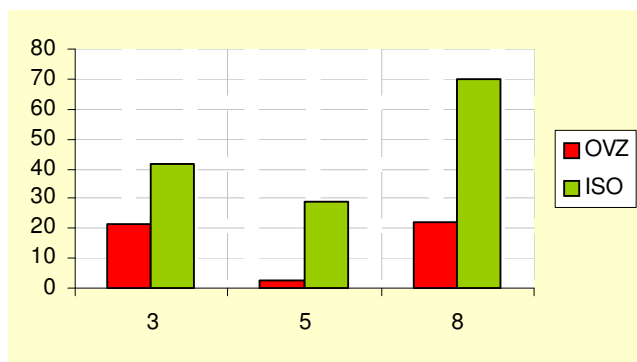


GRÁFICO 3 - médias das porcentagens de células marcadas no útero, considerando os efeitos ovariectomia e tratamento.

O tratamento com isoflavonas de soja foi responsável por um aumento significativo no índice de proliferação do epitélio uterino. Segundo Wuttke et al. (2003), a soja, dentre outras, foi capaz de estimular o útero em estudos recentes com animais. Se este evento for semelhante nas mulheres, este fitoestrógeno apresentará um importante efeito indesejável, tal como a TRH convencional.

Baseado nas condições experimentais desse trabalho, conclui-se que a deficiência estrogênica não influenciou o índice proliferativo do epitélio da língua de ratas, mas desempenhou efeito evidente no útero. O tratamento com as isoflavonas ocasionou efeitos uterotróficos.

Referências Bibliográficas:

- 1 ALVES, D.L.; SILVA, R.C. **Fitohormônios**: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2002. 105p.
- 2 BYDLOWSKI, S.P. Fisiologia da gônada feminina. In: DOUGLAS, C.R. **Tratado de fisiologia aplicada à saúde**. 5ed. São Paulo: Robe, 2002. Cap. 82. p. 1313-29.
- 3 FORABOSCO, A et al. Efficacy of hormone replacement therapy in postmenopausal women with oral discomfort. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 73, n. 5, p. 570-4, May 1992.
- 4 GLAZIER, M.G.; BOWMAN, M.A. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. **Arch Intern Med**, v. 161, n. 9, p. 1161-72, May 2001.
- 5 ISHIMI, Y. et al. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. **Bioch biophy Res Com**, v.274, n. 3, p. 697-01. 2000.
- 6 LEIMOLA-VIRTANEN, R. et al.; Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. **Maturitas**, v. 36, p. 131-137, Aug. 2000.
- 7 NAFTOLIN, F.; STANBURY, M.G. Phytoestrogens: are they really estrogen mimics? **Fertil Steril**, v. 77, n. 1, p. 15-7. Jan 2002.
- 8 SEKO, K. et al., Effects of ovariectomy and estrogen replacement on rat oral mucosa. **Maturitas**, v. 50, p. 44-51, Jan 2005.
- 9 TURNER, R.T.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine Rev**, v. 15, n. 3, p. 275-300, 1994.
- 10 VINCENT, A.; FITZPATRICK, L.A. Soy isoflavones: are they useful in menopause? **Mayo Clin Proc**, v. 75, n. 11, p. 1174-84, Nov 2000.
- 11 VITTEK, J. et al. Specific Estrogen Receptors in Human Gingiva. **J of Clinical Endocrinology and metabolism**, v. 54, n. 3, p. 608, 1982.
- 12 WILLIAMS, C.L.; STANGEL, G.M. Estrógenos e progestogênicos. In: GOODMAN. GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996. Cap.57, p. 1045-1067.
- 13 WUTTKE, W. et al. Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? **Maturitas**, v. 44, suppl. 1, p. 9s-20s, 2003.

Bolsa CNPq/PIBIC.