

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Biologia Básica e Oral

Caroline Machado Daros

Efeito do potencial estimulatório isolado e associado do polifenol isoflavona e do carotenoide licopeno na atividade funcional de células da linhagem osteoblástica

MC3T3-E1

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do título de Cirurgiã dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

Ribeirão Preto

2019

Dedicatória

*Aos meus pais, **Edilson e Lucia**, por sempre me incentivarem a buscar meus ideais, não medindo esforços para serem o apoio, o exemplo e a dedicação necessária. Por me permitirem viver distante e com isso contribuir para o meu aprendizado e autonomia. Por sempre estarem presentes na vida dos seus filhos nos mostrando os valores mais concretos de caráter, honestidade e respeito. À vocês o mérito exclusivo e merecedor da minha formação moral e profissional, pois são os grandes responsáveis por cada conquista em minha vida.*

*Aos meus irmãos, **Pedro e Vinícius**, por serem alegria em minha vida, por me ensinarem a paciência, pelo companheirismo e por serem possuidores do meu amor incondicional.*

*Aos meus **avós**, pelos ensinamentos, exemplos, histórias, pelo carinho e por me permitirem terem a infância que eu tive, formada pelas melhores lembranças.*

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado**, por me possibilitar a realização deste trabalho, possuindo grande valor para o alcance do meu conhecimento e formação profissional. O meu agradecimento sincero por toda dedicação e tempo destinado à mim, pelo incentivo, ensinamentos e confiança depositada. O seu exemplo como ser humano e a sua orientação merecem a minha valorização e admiração.*

Agradecimentos

*Agradecimento especial ao pós-graduando **Rodrigo Paolo Flores Abuna** por todo o auxílio durante o desenvolvimento do trabalho. Pelos ensinamentos científicos, pelas dificuldades compartilhadas, pelo incentivo e dedicação em contribuir para todo o desenvolvimento da pesquisa. Obrigada pela sua amizade e disponibilidade em todos os momentos em que precisei.*

*Ao técnico de laboratório **Roger Rodrigo Fernandes** por todo o apoio, paciência, atenção, auxílio e valiosa contribuição na realização deste trabalho. Os conhecimentos transmitidos por você foram de uma importância imensurável.*

*À pós-graduanda **Paula Katherine Vargas Sanchez** pelo valioso e fundamental auxílio.*

*Agradeço à **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo** por todo o conhecimento adquirido durante estes anos, por disponibilizar aos seus alunos recursos inestimáveis e pelas memórias eternas. Por ter sob sua atribuição professores com qualificação, capacidade e dignidade infindáveis e imensuráveis para a transmissão de saberes tão valiosos.*

*Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro por meio de uma Bolsa de Iniciação Científica (processo 2018/09571-4)*

Resumo

A terapia de substituição do estrogênio (ERT) tem sido muito prescrita para repor os níveis hormonais de forma a atenuar a ocorrência de alterações que ocorrem na menopausa, como a osteoporose. No entanto, esta pode aumentar o risco de doenças como câncer de mama e de útero, trombose venosa, acidente vascular cerebral, entre outros efeitos colaterais indesejáveis. Substâncias naturais antioxidantes como os polifenóis e os carotenoides, entre eles a isoflavona e o licopeno respectivamente, estão sendo utilizadas para melhorar o metabolismo ósseo e poderiam atuar como possíveis substitutos ou coadjuvantes na terapia contra a perda de massa óssea que ocorre na osteoporose. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito isolado e associado do composto de isoflavona 40% e do licopeno 10% na atividade funcional in vitro de células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1. As células foram cultivadas em garrafas em meio de cultura osteogênico até a subconfluência e plaqueadas em uma concentração de 2×10^4 células por poço em placas de cultura (n=5). Os grupos experimentais foram divididos em células controles (C), células tratadas com 10µg/mL de isoflavona a 40% diluída no meio de cultura (ISO), células tratadas com 30µg/mL de licopeno 10% diluído em meio de cultura (Lic), e células tratadas com a associação de isoflavona + licopeno (Iso + Lic). Após os tempos experimentais, foram avaliados os seguintes parâmetros: proliferação celular, detecção in situ de fosfatase alcalina (ALP), conteúdo de proteínas totais, além de detecção e quantificação de nódulos mineralizados, imunolocalização e expressão de genes associados à osteogênese. Os dados obtidos foram analisados por programas estatísticos adequados para $p \leq 0.05$, com o objetivo de encontrar dados estatisticamente significantes que demonstrem os efeitos benéficos isolados ou associados da isoflavona e do licopeno na atividade funcional de células

osteoblásticas. Os resultados mostraram que a administração dos antioxidantes de forma isolada se mostra mais efetiva para a atividade funcional celular do que a associação de ambos.

Abstract

Estrogen replacement therapy (ERT) has long been prescribed to restore levels of progesterone and estrogen in the body, in order to relieve the symptoms of menopause such as osteoporosis. However, ERT can increase the risk of breast and uterine cancer, venous thrombotic disease, stroke, among other undesirable side effects. Antioxidants like polyphenols and carotenoids are being used to improve bone metabolism and could be used as possible substitutes or adjuvants in the therapy against bone mass loss that occurs in osteoporosis. The aim of this study was to perform in vitro studies to evaluate the isolate and associated effect of isoflavone and lycopene in the functional activity of osteoblastic cells from MC3T3-E1 cell line. Cells were cultured in flasks in osteogenic medium until subconfluence and seeded at a concentration of 2×10^4 cells per well in culture plates ($n = 5$). Experimental groups were divided in control cells (C), treated with $1 \mu\text{mol/L}$ isoflavone 40% diluted in culture medium (ISO), treated with $1 \mu\text{mol/L}$ lycopene 10% diluted in culture medium (LIC) and treated with the association of isoflavone + lycopene (ISO+LIC). After the experimental period, the following parameters were evaluated: cell proliferation, alkaline phosphatase in situ detection as well as its immunolocalization, total protein content and quantification of mineralized nodules. The results were analyzed by statistical programs consistent with significance $p \leq 0,05$, with the goal of finding statistically significant data showing the beneficial effects of isoflavone and lycopene association. The obtained results showed that the isolated administration of lycopene and isoflavone is more effective for functional activity than their association.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	08
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS	35

1. Introdução

A osteoporose pós-menopausa é uma desordem caracterizada por uma progressiva perda de tecido ósseo que começa após a menopausa fisiológica ou cirúrgica e eleva o risco de fraturas dentro de 15-20 anos após a interrupção da função ovariana. Embora o desenvolvimento esquelético insuficiente e perda óssea relacionada à idade possam ser fatores contribuintes, a deficiência hormonal aumenta a reabsorção e acelera a perda de massa óssea nos primeiros 5-10 anos após o início da menopausa (Pacifci, 1998).

A osteoporose promove um aumento na reabsorção óssea e uma redução na sua formação, com alteração da microarquitetura da matriz extracelular, incapacitando a sua remodelação adequada pelos osteoblastos (Christiansen, 1993). Várias evidências sugerem que o estrógeno previne a perda óssea bloqueando a produção de citocinas pró-inflamatórias por células da medula e da matriz óssea (Pacifci, 1996). A principal consequência do aumento da produção de citocinas na microestrutura dos ossos é o aumento da formação de osteoclastos e prolongamento de sua vida útil (Roodman, 1996).

A terapia de substituição de estrogênio (ERT) tem sido amplamente usada para prevenir ou tratar a osteoporose pós-menopausa. No entanto, a ERT aumenta o risco de câncer de mama e útero, trombose venosa, acidente vascular cerebral e doença cardíaca coronária, além de ter outros efeitos colaterais indesejáveis. Prescrição e uso de terapia hormonal são ainda controversos e exigem avaliação dos benefícios do tratamento contra os riscos potenciais (Crandall, 2003; Barkhem et al., 1998; Chen et al., 2002). Assim, há o crescente interesse em descobrir ou desenvolver compostos que fornecem os benefícios da ERT mas não levam aos riscos da utilização do estrogênio e seus efeitos colaterais.

Nos últimos anos, moléculas que agem como estrogênio natural têm atraído atenção para seus potenciais papéis na prevenção e no tratamento da osteoporose, tal como a isoflavona do grão de soja (ISO), um composto com estruturas análogas ao estrogênio e candidatas a serem moduladores seletivos de seus receptores. Entre estes compostos estão a genisteína, a gliciteína e a daidzeína. A daidzeína é um dos fitoestrógenos de soja mais amplamente estudados, mostrando-se promissor como potencial agente contra a osteoporose. Estudos *in vitro* sugerem que a daidzeína pode promover a proliferação celular por meio da regulação positiva da expressão de BMP em células osteoblásticas (Jia et al., 2003), além de aumentar a diferenciação celular e a mineralização em osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 (Ge et al., 2006). Hu et al. (2016) observaram que a daidzeína promove a proliferação e diferenciação de osteoblastos em células OCT1 através da estimulação da ativação da via BMP-2/Smads. Estudos recentes têm sugerido que os efeitos das isoflavonas em várias doenças crônicas pode ser relacionado a suas habilidades de produzir equol, que é um metabólito da daidzeína. Este metabólito é produzido pela microflora intestinal e seu efeito na ativação dos receptores de estrogênio é tão forte quanto o da daidzeína (Setchell et al., 2005). Estudos *in vivo* como o de Kimira et al. (2012) relatam que a administração de equol diminuiu a perda de densidade mineral óssea no fêmur de ratas ovariectomizadas sem a ocorrência de hipertrofia uterina. Entre outros possíveis agentes bioativos com capacidade antioxidante está o licopeno, o carotenoide predominante nos tomates, já amplamente associado com diminuição da incidência de doenças cardiovasculares e do câncer de próstata (Palozza et al., 2010). Estudos prévios em nosso laboratório (Oliveira et al., 2019) mostraram que a administração *in vitro* de 1µmol/L de licopeno aumentou a expressão de genes associados ao metabolismo ósseo assim como *in vivo* impediu a perda óssea no fêmur de ratas

ovariectomizadas após administração de 10 mg/kg do carotenoide licopeno por 30 e 60 dias. Alguns estudos sugerem que a associação da ingestão diária de isoflavona e licopeno pode estar relacionada com menor risco de câncer de próstata, além de estudos *in vitro* mostrarem que esta associação pode induzir a apoptose e inibição da proliferação de linhagens de células cancerosas da próstata (Vaishampayan et al., 2007; Grainger et al., 2008). Um estudo mais recente de Bohn et al. (2013) mostrou que a ingestão diária por 8 semanas de um suco de tomate suplementado com extrato de soja (300 mL com 66 mg isoflavona e 22 mg licopeno) aumentou o HDL- C, diminuiu a razão de total-C/HDL-C e aumentou a resistência do VLDL+LDL-C à oxidação mediada por Cu²⁺. Estes resultados promissores foram investigados com foco em uma terapia anticarcinogênica. Com o objetivo de buscar trabalhos focados no metabolismo ósseo, encontramos um grupo de pesquisa que publicou dois artigos avaliando a combinação de isoflavona e outro carotenoide que é precursor da vitamina A, i.e., o betacaroteno. Um deles mostrou que esta combinação promoveu a diferenciação osteoblástica em células MC3T3-E1 por meio de aumento da atividade de ALP, apesar da ausência de resultados significantes na modulação de genes associados à osteogênese (Nishide et al., 2015). O outro trabalho deste grupo de pesquisa foi realizado em células de linhagem osteoclástica, sugerindo que esta mesma combinação promoveu um efeito supressor na maturação dos osteoclastos, indicando o benefício do efeito aditivo de substâncias funcionais no metabolismo ósseo e prevenção da osteoporose (Tadaishi et al., 2014). O potencial dessa associação está sendo investigado, mas ainda não existem dados na literatura demonstrando o efeito da associação da isoflavona e do carotenoide não precursor da vitamina A licopeno em células osteoblásticas e no metabolismo do tecido ósseo com os parâmetros propostos neste projeto. Assim, nossa hipótese de trabalho é a de que a

administração *in vitro* de isoflavona associado com o licopeno possa favorecer a atividade funcional de células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1.

2. Objetivo

O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito isolado e associado do polifenol isoflavona com o carotenoide licopeno na atividade funcional de células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 por meio dos seguintes parâmetros:

2.1. Ensaio bioquímicos e moleculares:

- proliferação celular (MTT)
- quantidade de proteínas totais
- detecção *in situ* de ALP
- detecção e quantificação de nódulos mineralizados
- expressão quantitativa de genes associados ao metabolismo ósseo

2.2. Ensaio de imunolocalização:

- adesão celular
- diferenciação celular por imunomarcagem para sialoproteína óssea (BSP)

3. Material e Métodos

3.1. Cultura Celular

A linhagem a ser utilizada neste projeto foi a MC3T3-E1. As células são conservadas em tubos criogênicos de 2 ml em tambores de nitrogênio líquido e, quando necessário, são descongeladas para obtenção de culturas.

Para o presente projeto, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³ com 10 ml de meio de cultura α -MEM, 10% de soro fetal bovino e 2,75ml de penicilina-estreptomicina. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada dois dias. Após a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA 1mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco), cultivadas em meio osteogênico (com a adição de 5 μ g/mL de ácido ascórbico e 7mM de β -glicerofosfato) em placas de 24 poços em uma concentração de 2 x10⁴ (n=5) e divididas em células controles (C), células tratadas com 30 μ g/mL de licopeno 10% diluído em meio de cultura (L), células tratadas com 10 μ g/mL de isoflavona a 40% diluída no meio de cultura (ISO), e células tratadas com a associação de isoflavona + licopeno (ISO + L).

3.2. Ensaio Bioquímicos

3.2.1 Proliferação celular

Aos 3, 7 e 10 dias de cultura, a proliferação foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma). Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com solução de MTT+MTS por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Passado esse período, o meio de cultura foi removido dos poços e, em seguida, adicionado 1mL de solução de isopropanol ácido (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150 μ L foram removidas dos poços e transferidas para uma placa de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (μ Quant, Bio-tek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) em comprimento de onda de 570nm.

3.2.2. Conteúdo de proteína total

Após 3, 7, 10 dias de cultura celular, o meio de cultura foi removido das placas e os poços foram lavados três vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C para remoção das células não aderidas e do meio de cultura sobressalente. Em seguida, os poços foram preenchidos com 1mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma) e deixados à temperatura ambiente (TA) por 30 minutos antes de iniciar os ensaios. A dosagem de proteína foi realizada seguindo o método de Lowry (Lowry et al., 1951). Para isso, 500µL da amostra contida em cada poço da placa de cultura foram transferidos ao respectivo tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 500µL do reagente de Lowry (Sigma). Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em T.A. por 20 minutos. Após este período, 250µL da solução de Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma) foi adicionado aos tubos, que após agitação, ficaram em T.A. por 30 minutos para desenvolvimento da coloração azul. Passado o tempo, a absorbância de cada tubo foi determinada em um espectrofotômetro (Bio-Tek), em comprimento de onda de 680nm. O conteúdo de proteína total de cada poço foi calculado com base na construção de uma curva padrão a partir de albumina bovina (Sigma).

3.2.3. Análise de fosfatase alcalina *in situ*

A análise da enzima fosfatase alcalina *in situ* foi realizada aos 10 e 12 dias. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS aquecido a 37°C. Trezentos e vinte miligramas do reagente Triz (Sigma) foram dissolvidos em 20mL de água deionizada e, adicionado 7mg do reagente Fast Red (Sigma). Foram desprezados 2mL desta solução e acrescidos 8mg de naftol (Sigma) diluídos em 2mL de dimetil formamida (Merck) formando a solução de trabalho. Um mililitro dessa solução foi adicionado em cada poço. A placa foi levada à incubadora

em uma atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi retirada dos poços e a placa foi seca à temperatura ambiente para posterior análise qualitativa.

3.2.4. Detecção e quantificação de matriz mineralizada

A detecção de matriz mineralizada foi avaliada ao final dos 17 dias de experimento. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados três vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C e adicionados 2mL de formalina 10% para fixação e mantidos a 4°C por 24 horas. A formalina foi removida e os poços desidratados à T.A. em séries crescentes de álcoois (30°, 50°, 70° e 100°) por um período de 1 hora para cada graduação alcoólica. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina a 2% pH 4,2 (Sigma) por 10 minutos e as áreas de mineralização ricas em cálcio evidenciadas pela coloração vermelha. Para quantificação da coloração segundo método de Gregory et al. (2004), 280µL de ácido acético a 10% (Labsynth, Lab Ltda, Diadema, SP, Brasil) foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi raspada com o auxílio de uma ponteira e a solução transferida para tubos eppendorf de 1,5mL, aquecida a 85°C por 10 minutos e transferida para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos. Um volume de 150µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning) e 40µL de hidróxido de amônia a 10% (Quimibras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram adicionados. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Tek) em um comprimento de onda de 405nm.

3.2.5. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Para avaliar a expressão dos genes sialoproteína óssea (*Bsp*), osterix/fator de transcrição *sp7* (*Osx*), osteopontina (*Opn*), *Runt-related transcription factor 2* (*Runx2*) e fosfatase alcalina (*Alp*) aos 3 dias de experimento o meio de cultura foi removido dos poços e adicionado o reagente Trizol LS (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) à T.A., sob agitação por pipetagem. As amostras foram transferidas para tubos eppendorf e armazenadas em freezer a -20°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado a partir de 1µL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320nm) e a integridade de cada amostra foi avaliada utilizando um chip, capaz de verificar amostras de RNA na concentração de 25 a 500ng/µL, no equipamento Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. As amostras do RNA total foram aliquotadas e aquecidas a 70°C por 2 minutos e, em seguida, mantidas no gelo até o momento da aplicação no gel. A matriz do gel, aplicada nos capilares do chip, contém uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos ao marcador e ao RNA resulta na emissão de fluorescência, que é quantificada, permitindo a separação do RNA ribossômico 18S e 28S e a verificação da integridade do RNA total a partir da atribuição de um número de integridade do RNA (RIN) que varia de 1 a 10. Foram consideradas amostras viáveis para realização do Real-time PCR aquelas que apresentaram valores de RIN superiores a 8. Depois de constatada a integridade do RNA, o passo seguinte foi a confecção da fita complementar de DNA (cDNA) a partir

de 1µg de RNA total. Este procedimento foi realizado no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Fort City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para as reações de Real-time PCR, foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems) para os genes-alvo em equipamento StepOne Plus (Life Technologies). As reações foram realizadas em quadruplicata utilizando 5µL de TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,5µL de sonda TaqMan para os genes de interesse (Tabela 2) e 4,5µL de cDNA (11,25ng), para um volume final de 10µL/reação. As reações de amplificação consistem em 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar, determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras. Como controle endógeno foi avaliada a expressão do gene para a betactina. Os níveis de expressão do controle endógeno foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene-alvo e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda TaqMan utilizada. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pela betactina.

3.2.6. Imunolocalização

Para os testes de adesão celular e de imunolocalização da sialoproteína óssea (BSP), as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro e após 24 horas e 3 dias de cultura foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta (De Oliveira e Nanci, 2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 minutos. O anticorpo primário para a proteína a ser avaliada foi diluído em concentrações de trabalho (1:200) e incubado por 1 hora, seguido de incubação de anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EUA), 1:200, por 50 minutos. Para a visualização dos limites celulares e dos núcleos de células aderidas à lamínula, foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200) e DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes-1:300). A substituição dos anticorpos primários por PB foi usada como controle negativo. Após montagem com lamínula de vidro com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes), as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica (Alemanha).

3.3. Análise dos resultados

Os dados obtidos dos ensaios foram submetidos a testes de avaliação de normalidade dos dados, sendo assim os dados paramétricos foram analisados com a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste para comparações múltiplas entre os grupos, e os dados não paramétricos foram analisados com o teste Kruskal-

Wallis seguido de pós teste. O nível de significância foi de 5%, com a utilização do software GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Proliferação celular

A proliferação das células osteoblásticas aumentou significativamente ao longo dos períodos experimentais, como pode ser visto na Figura 1, sugerindo que o tratamento com licopeno e isoflavona não promoveu toxicidade às células ao longo da cultura. Entre os grupos experimentais aos 3 dias, foi observada uma similaridade na proliferação celular. Já aos 7 dias, as células do grupo controle e só com o licopeno no meio de cultura mostraram uma proliferação significativamente maior quando comparado aos grupos que receberam isoflavona ou a associação dos dois antioxidantes. Aos 10 dias, o grupo controle foi o que mostrou maior proliferação quando comparado aos outros grupos. Entre os grupos com os antioxidantes no meio de cultura, as células com isoflavona mostraram maior proliferação.

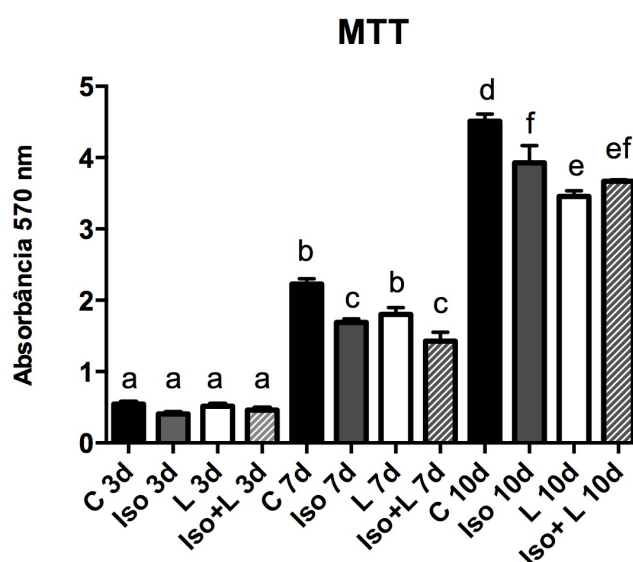


Figura 1 – Proliferação celular das células osteoblásticas nos períodos experimentais de 3, 7 e 10 dias. Teste estatístico ANOVA. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.2. Quantidade de proteína total

A quantidade de proteína total produzida pelas células osteoblásticas aumentou significativamente ao longo dos períodos experimentais, como pode ser visto na Figura 2. A análise dos grupos dentro de cada período mostrou que não houveram diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e os grupos que receberam os antioxidantes sozinhos ou em associação.

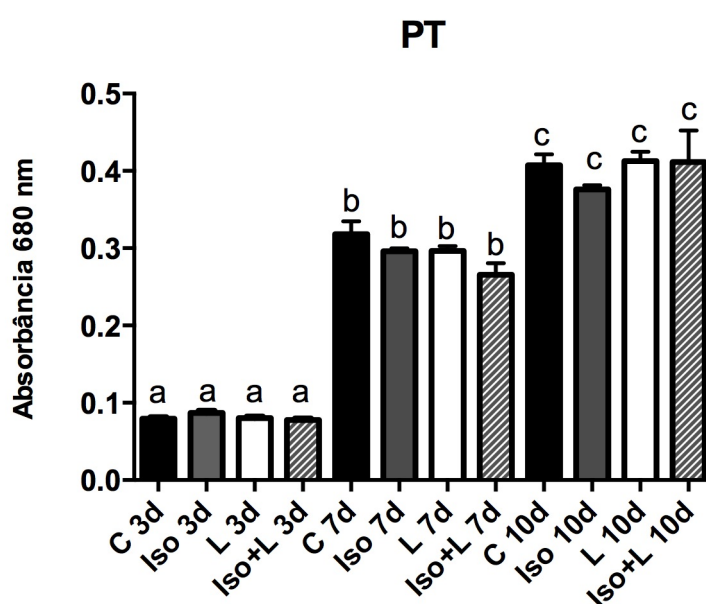


Figura 2 – Quantidade de proteína total produzida pelas células osteoblásticas nos períodos experimentais de 3, 7 e 10 dias. Teste estatístico ANOVA. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.3. Detecção *in situ* de ALP

A detecção *in situ* da fosfatase alcalina foi analisada de maneira qualitativa e quantitativa. De acordo com a figura 3 pudemos observar qualitativamente que todos os grupos experimentais permitiram a detecção da fosfatase na base dos poços de cultura, de maneira mais suave aos 10 dias e mais intensa aos 12 dias.

Observou-se pela análise quantitativa da fosfatase alcalina *in situ* de células osteoblásticas que no período experimental de 10 dias (figura 4) não houve diferença

estatisticamente significativa entre os grupos, porém o grupo controle e o grupo no qual foi administrado a isoflavona mostraram resultados similares no que se refere à produção da enzima fosfatase alcalina e estes ainda mostraram os maiores e mais expressivos resultados. Observou-se também diminuição na detecção da fosfatase alcalina para o grupo do licopeno. Identifica-se no gráfico ainda, que dentre os grupos tratados com os antioxidantes o que se administrou isoflavona apresentou os melhores resultados. O gráfico do período experimental de 12 dias (figura 5) difere-se em relação ao primeiro, devido ao fato de que o grupo controle e o grupo que recebeu a associação de isoflavona com licopeno mostrarem diferença estatisticamente significativa entre ambos, sendo que neste caso o grupo controle apresentou o maior resultado dentre todos os poços. Não houve diferença estatisticamente significativa no que concerne aos grupos controle, isoflavona e licopeno e nem quando se compara os grupos isoflavona e licopeno à sua associação. Distingue-se, do mesmo modo que no gráfico de 10 dias, que dos grupos em que os antioxidantes foram administrados, o poço que recebeu a isoflavona apresentou os melhores resultados.

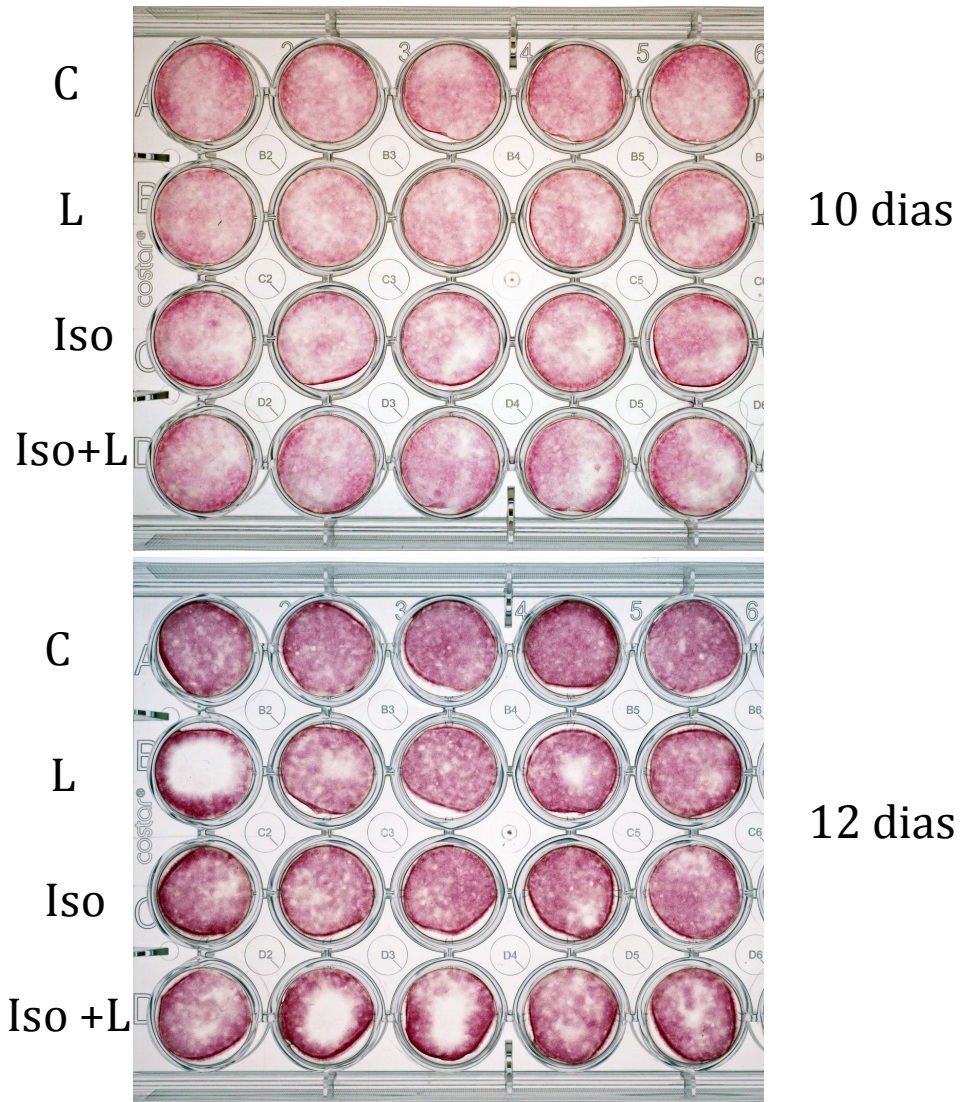


Figura 3 – Detecção da fosfatase alcalina *in situ* em células osteoblásticas MC3T3-E1 controles e cultivadas com isoflavona, licopeno e isoflavona + licopeno nos períodos experimentais de 10 e 12 dias.

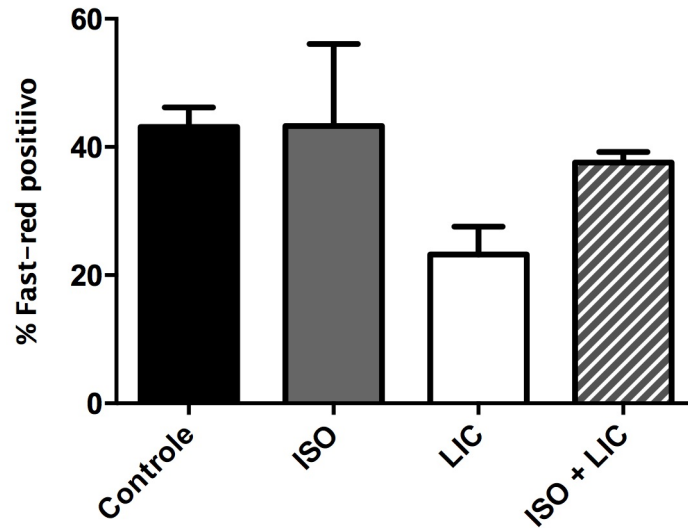


Figura 4 – Detecção quantitativa da fosfatase alcalina *in situ* em células osteoblásticas MC3T3-E1 controles e cultivadas com isoflavona, licopeno e isoflavona + licopeno no período experimental de 10 dias. Teste estatístico ANOVA. Ausência de significância estatística.

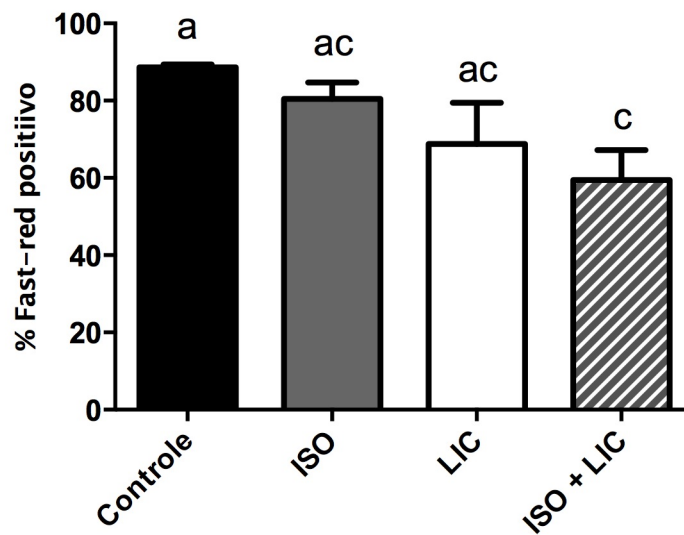


Figura 5 – Detecção quantitativa da fosfatase alcalina *in situ* em células osteoblásticas MC3T3-E1 controles e cultivadas com isoflavona, licopeno e isoflavona + licopeno no período experimental de 12 dias. Teste estatístico ANOVA. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.4. Mineralização

A análise da formação de nódulos aos 17 dias permitiu a sua observação e quantificação, mostrando que a mineralização aconteceu de forma similar entre os grupos experimentais (Figuras 6 e 7). Determina-se pelo gráfico de quantificação de nódulos de mineralização de células osteoblásticas no período de 17 dias de cultura celular que há ausência de significância estatística entre os grupos experimentais. O grupo em que se administrou licopeno apresentou o maior resultado, ainda que este mostre-se com uma diferença sutil em relação ao do controle e da isoflavona. O grupo que teve a administração conjunta dos antioxidantes mostrou-se como o menor resultado, ainda que esta diferença tenha sido discreta.

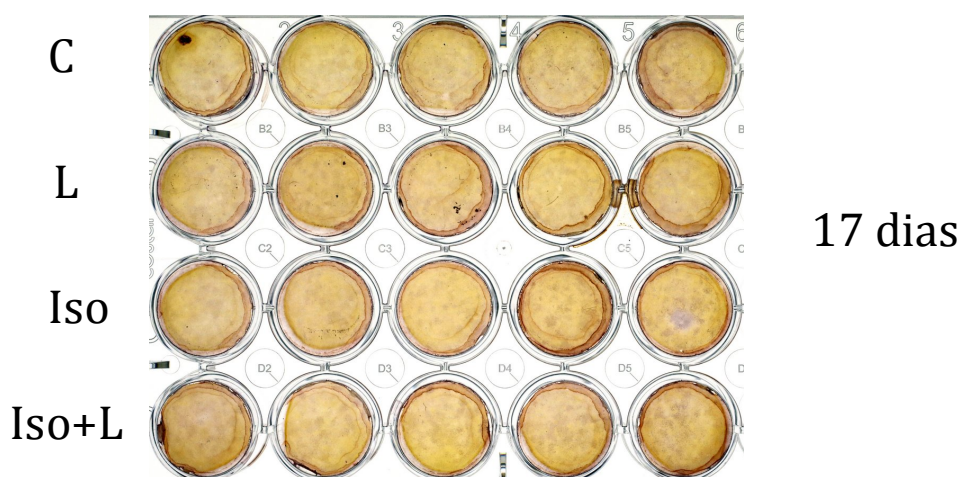


Figura 6 – Nódulos de mineralização de células osteoblásticas no período de 17 dias de cultura celular.

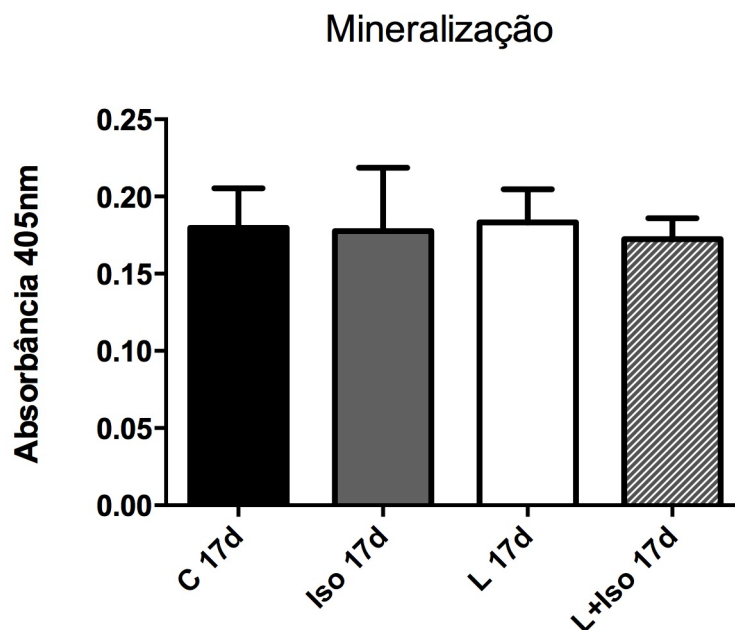


Figura 7 – Quantificação de nódulos de mineralização de células osteoblásticas no período de 17 dias de cultura celular. Ausência de significância estatística entre os grupos experimentais.

4.5. Expressão gênica quantitativa

No que se refere à expressão gênica quantitativa observa-se que na expressão de *Bsp* não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle comparado aos demais grupos nem com a comparação entre o licopeno e o licopeno associado à isoflavona. Ademais, observa-se diferença estatística entre a isoflavona com o licopeno e com a associação de ambos. Nesse quesito a isoflavona mostrou-se como a mais eficaz, sendo o grupo controle como segundo mais eficaz e o grupo do licopeno com o resultado menos significativo. No gráfico da expressão quantitativa de *Opn*, a diferença estatística ocorreu entre os grupos do controle, isoflavona e associação de licopeno e isoflavona, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa apenas entre o controle e o licopeno. A isoflavona manteve-se como a mais eficaz, sendo este resultado muito mais expressivo e visualizável e o licopeno como segundo mais eficaz, apesar deste resultado estar muito abaixo da isoflavona e muito próximo

do controle. A associação de isoflavona e licopeno demonstrou-se como a menos efetiva na expressão da *Opn*.

No que concerne ao gráfico da expressão relativa *Osx* o controle demonstrou diferença estatisticamente significativa se comparado aos demais grupos e entre os grupos da isoflavona, licopeno e isoflavona associada ao licopeno não houve diferença estatisticamente significativa entre estes. Nesse parâmetro o controle mostrou-se menos eficiente e os grupos subsequentes resultados muito similares.

Na expressão dos genes *Runx2* e *Alp* não houve diferença estatisticamente significativa entre as diferentes administrações. O grupo que recebeu a associação dos antioxidantes se mostrou muito similar ao do licopeno, sendo que visualiza-se apenas uma vantagem mínima na eficiência destes em relação ao grupo da isoflavona e do controle.

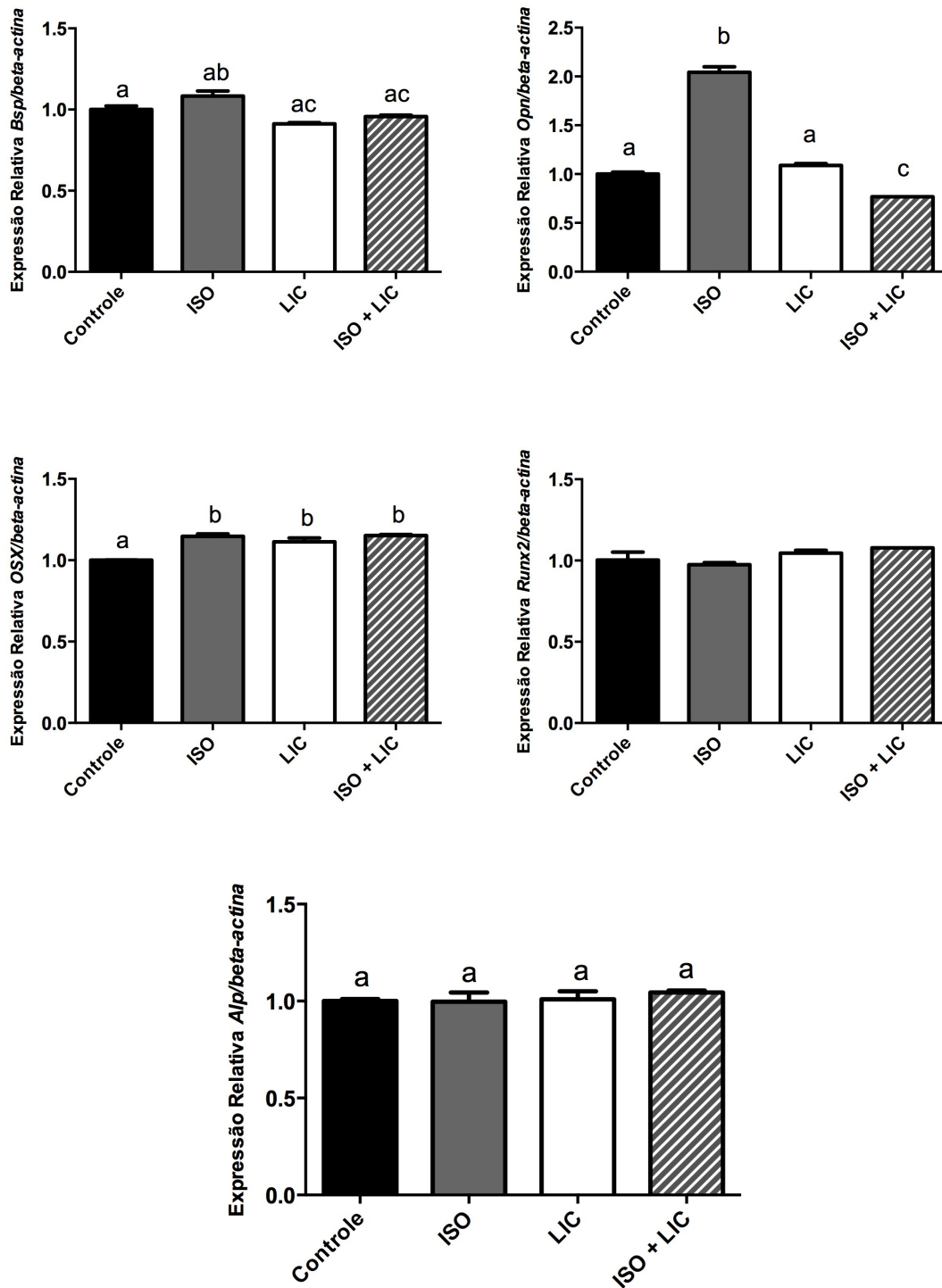


Figura 8 – Expressão quantitativa dos genes *Bsp*, *Opn*, *Osx*, *Runx2* e *Alp* em células osteoblásticas MC3T3-E1 controles e cultivadas com isoflavona, licopeno e isoflavona + licopeno. Teste estatístico ANOVA. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.6. Imunolocalização

4.6.1 Adesão celular

Na análise de adesão celular nos tempos de 24 horas e 3 dias os poços em que administraram-se o licopeno foram os que detiveram o maior número de células por campo. No parâmetro observado em 24 horas a diferença estatística se deteve apenas entre o controle e o licopeno, pois os demais não apresentaram diferença estatística entre si e com os anteriormente mencionados. Neste caso o grupo controle apresentou o menor número de células aderidas por campo.

No tempo de 3 dias o grupo controle foi o único que apresentou diferença estatisticamente significativa com os demais, sendo que os grupos da isoflavona, do licopeno e da associação deste não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si. O grupo controle, assim como no tempo de 24 horas, apresentou o menor número de células aderidas por campo. E a associação da isoflavona com o licopeno mostrou o segundo melhor resultado.

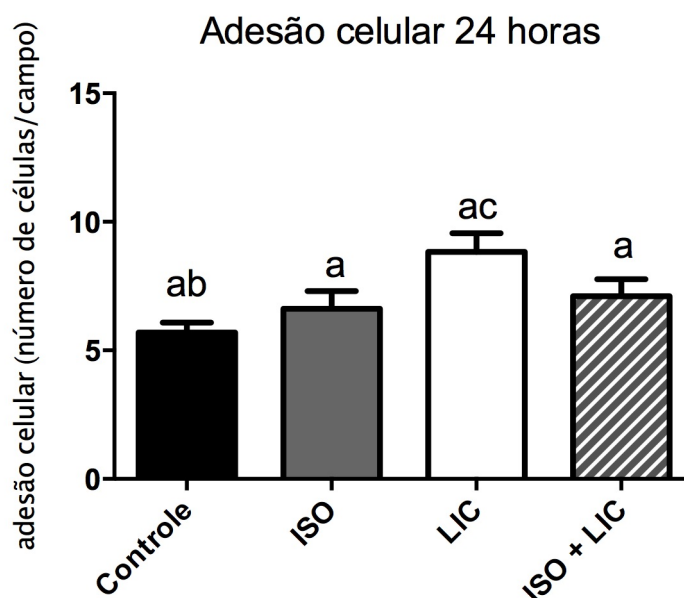


Figura 9 – Adesão de células osteoblásticas MC3T3-E1 controles e cultivadas com isoflavona, licopeno e isoflavona + licopeno em lamínulas de vidro após 24 horas de cultura e marcação nuclear com DAPI. Teste estatístico ANOVA. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

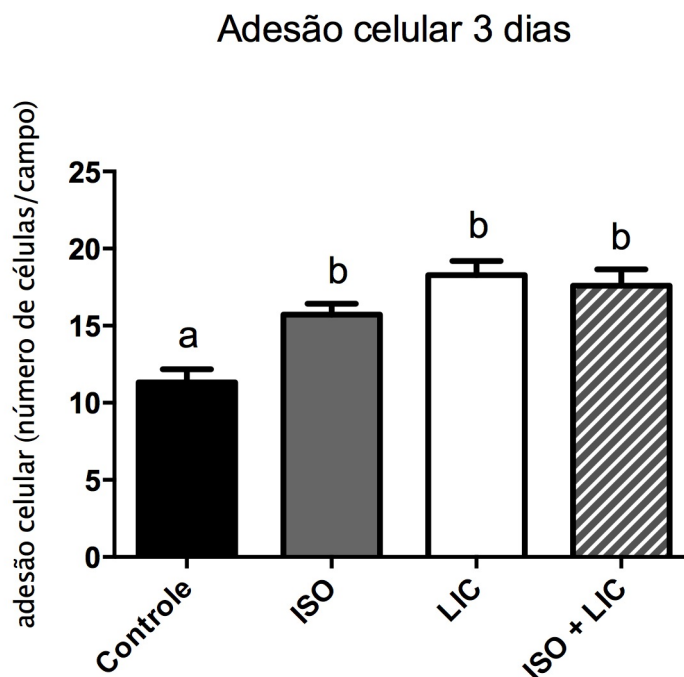


Figura 10 – Adesão de células osteoblásticas MC3T3-E1 controles e cultivadas com isoflavona, licopeno e isoflavona + licopeno em lamínulas de vidro após 3 dias de cultura e marcação nuclear com DAPI. Teste estatístico ANOVA. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.6.2. Marcação com anticorpo para BSP

A marcação das células para BSP foi realizada após 24 horas e 3 dias de cultura, e as imagens podem ser observadas nas Figuras 12 e 13. A análise qualitativa mostra que as células em todos os grupos experimentais se aderiram à lamínula de vidro e se espraíram com morfologia típica de osteoblastos, como pode ser visto pela marcação da actina em verde. A sialoproteína óssea se mostrou expressa após 24 horas e 3 dias de cultura em todos os grupos experimentais de maneira similar.

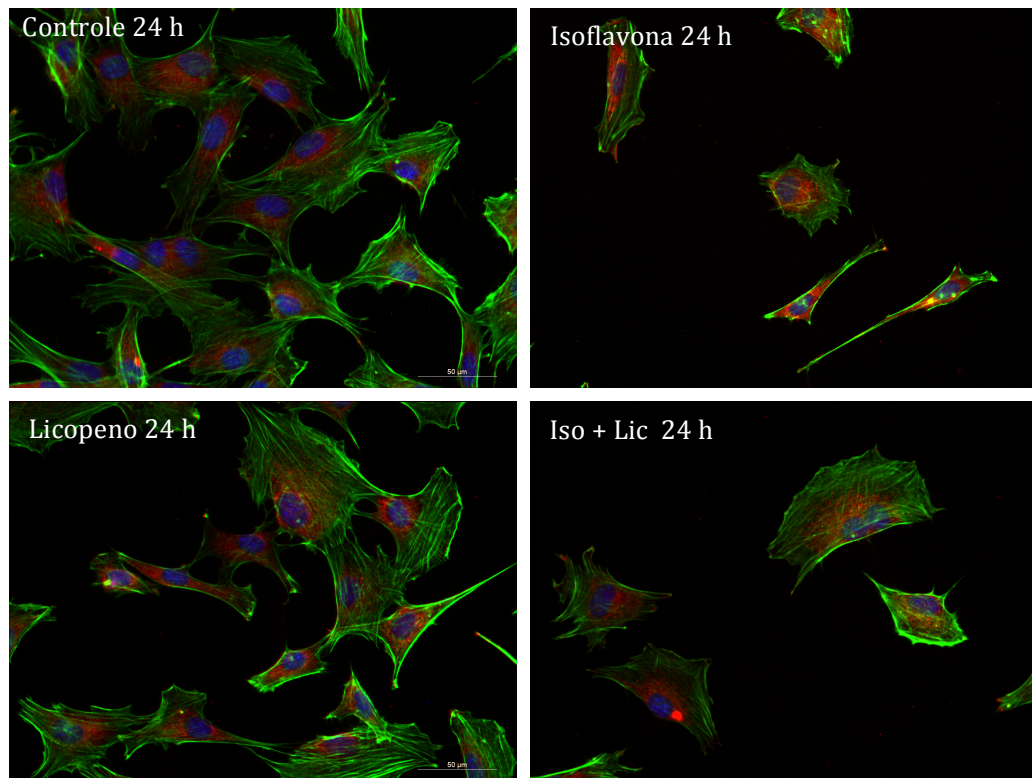


Figura 12 – Imunolocalização de sialoproteína óssea (BSP) em 24 horas de cultura em células osteoblásticas. Adesão de células osteoblásticas controles e cultivadas com isoflavona, licopeno e iso + lic em lamínulas de vidro. Marcação verde indica o citoplasma, marcação azul indica o núcleo e marcação vermelha indica a proteína BSP. Barra=50 µm.

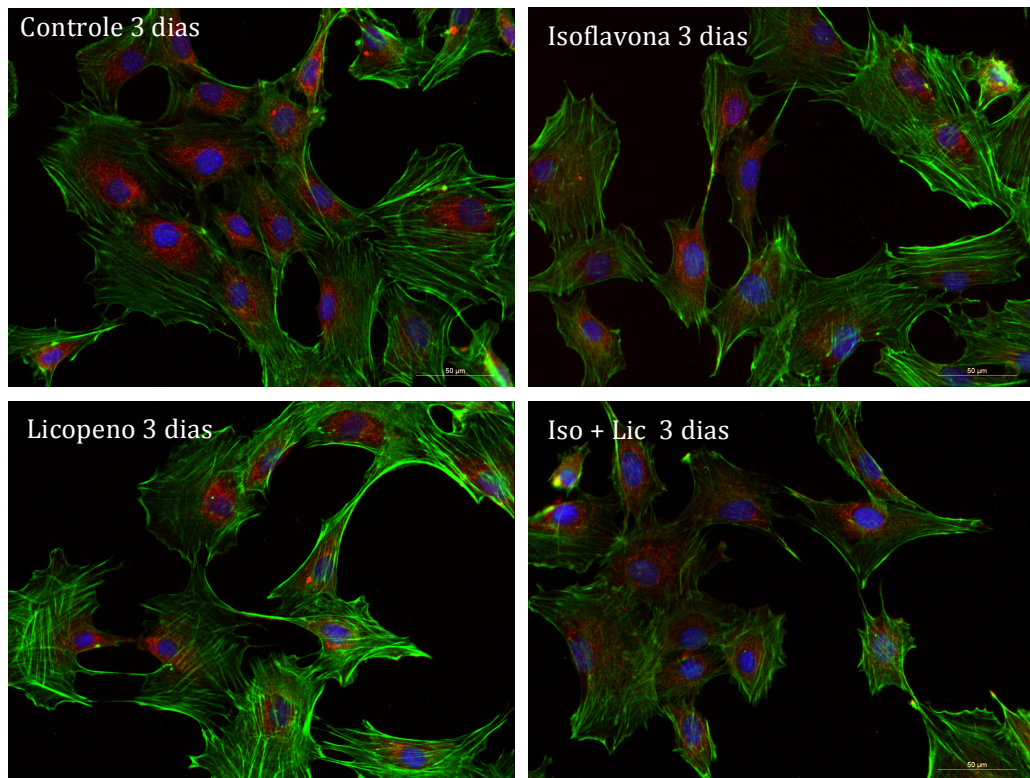


Figura 13 – Imunolocalização de sialoproteína óssea (BSP) em 3 dias de cultura em células osteoblásticas. Adesão de células osteoblásticas controles e cultivadas com isoflavona, licopeno e iso + lic em lamínulas de vidro. Marcação verde indica o citoplasma, marcação azul indica o núcleo e marcação vermelha indica a proteína BSP. Barra=50 um.

5. Discussão

Os mistérios da biologia óssea estão sendo desvendados em um ritmo sem precedentes e nossa compreensão sobre doenças resultantes da remodelação óssea e terapias direcionadas a elas estão evoluindo rapidamente. Assim, uma dieta antioxidante adequada rica em frutas, legumes, nozes e sementes está associada a valores mais elevados de densidade mineral óssea, demonstrando uma relação entre osteoporose e marcadores do estresse oxidativo (Rivas et al., 2013; Xu et al., 2017).

O acesso à substâncias antioxidantes nos dias atuais se dá com facilidade e ampla disponibilidade, sendo que pode ser obtido tanto no comércio comum de produtos como em farmácias de manipulação atendendo às necessidades individuais de um paciente. Pode ser portanto, um tratamento seguro e facilitado às mulheres que necessitem de uma proposta profilática ou terapêutica para prevenção ou tratamento da osteoporose que se estabelece principalmente após a menopausa, já que sabe-se, segundo inúmeros estudos, que após a menopausa há uma progressiva perda de tecido ósseo decorrentes da redução de estrogênio no organismo feminino.

Entre os antioxidantes que podem ser consumidos, os carotenoides representam um grupo heterogêneo muito importante, que está presente principalmente em frutas e vegetais. Os principais carotenoides ingeridos são o alfa e o β -caroteno, a β -criptoxantina, a luteína, a zeaxantina e o licopeno, sendo este último o mais potente do grupo com duas vezes mais capacidade antioxidante que o β -caroteno e 10 vezes mais que a do α -tocoferol (Di Mascio et al., 1989; Krinsky, 1998; Omoni & Aluko 2005; Costa-Rodrigues et al. 2018). A isoflavona está naturalmente presente em alguns legumes já presentes em nossa dieta e pode modular seletivamente receptores de estrógeno (Spagnuolo et al., 2017). Uma revisão por meta-análise realizada por Lambert et al. (2017) fornece evidências de que a suplementação com isoflavona pode

diminuir a reabsorção óssea promovida por deficiência de hormônios estrógenos em mulheres pré e pós-menopausa. De acordo com estudos recentes, as isoflavonas podem ainda oferecer outras aplicações medicinais aos seres humanos, isso é idealizado por exemplo no estudo que comprovou que as isoflavonas melhoram o colágeno I e os glicosaminoglicanos e previnem a perda óssea em ratos diabéticos tipo 1 (Carbonel et al., 2019).

No nosso trabalho optou-se portanto, pelo estudo do polifenol isoflavona, presente na soja e do licopeno, carotenoide predominante nos tomates, para a administração em células da linhagem osteoblástica MC3T3-E1. Com esse estudo alcançou-se conclusões que podem contribuir para o estudo do efeito desses produtos em células ósseas de seres humanos, prevenindo ou atuando como tratamento de fato na osteoporose. A maioria dos artigos publicados na literatura mostram uma associação benéfica entre o licopeno e a isoflavona para prevenção de câncer de próstata ou em mulheres pós-menopausa com risco de apresentarem câncer de mama (Llanos et al., 2014; Grainger et al., 2019). Não encontramos até o momento estudos mostrando o efeito desta associação no tecido ósseo ou em células osteoblásticas.

Segundo os resultados obtidos na presente investigação, a administração *in vitro* de licopeno e isoflavona aumentou a atividade funcional das células osteoblásticas, mesmo que em alguns testes isso tenha se expresso muito próximo ao controle, e ainda assim não promoveram toxicidade às células em nenhum dos testes realizados. Porém, se faz importante relatar que a nossa hipótese não foi confirmada pois observa-se que a administração dos dois associados não é tóxica, mas também não é tão efetiva quanto das substâncias de uma maneira isolada. Esta sugestão é decorrente principalmente dos testes de proliferação, detecção *in situ* de ALP e adesão celular.

O presente estudo foi realizado com células MC3T3-E1 que não sofreram intervenções na sua atividade funcional. A partir destes resultados, nosso grupo de pesquisa tem o intuito de dar um próximo passo e promover a indução do estresse oxidativo nas células, verificando a resposta das mesmas frente à presença destas duas substâncias isoladas ou em associação, para posteriormente aplicarmos parâmetros in vivo. Sendo assim, é imprescindível que novos estudos com essa proposta e nessa área sejam formulados, já que estabelecem uma relação direta com as necessidades atuais dos pacientes e promovem a facilidade no tratamento.

6. Conclusão

Conclui-se com o presente trabalho que a administração in vitro do polifenol isoflavona e do carotenoide licopeno melhora significativamente a atividade funcional das células osteoblásticas, embora esta tenha sido verificada com maior amplitude nos grupos em que as substâncias foram administradas isoladamente. Se faz relevante enfatizar que a busca pela obtenção de mais descobertas no âmbito dos antioxidantes é crucial para a ciência e para a evolução, melhoria da qualidade e expectativa de vida dos seres humanos. A facilidade na obtenção e o emprego cotidiano dessas substâncias os tornam prováveis substitutos plausíveis para terapias convencionais que apresentam consideráveis efeitos adversos, tornando-se, portanto, um avanço irrefutável na medicina.

7. Referências

BARKHEM T, CARLSSON B, NILSSON Y, ENMARK E, GUSTAFSSON J, NILSSON S. Differential response of estrogen receptor and estrogen receptor to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol*, 1998, 54, 105–112.

BOHN T, BLACKWOOD M, FRANCIS D, TIAN Q, SCHWARTZ SJ, CLINTON SK. Bioavailability of phytochemical constituents from a novel soy fortified lycopene rich tomato juice developed for targeted cancer prevention trials. *Nutr Cancer*. 2013;65(6):919-29.

CARBONEL AAF, VIEIRA MC, SIMÕES RS, LIMA PDA, FUCHS LFP, GIRÃO ERC, CICIVIZZO GP, SASSO GRS, DE MORAES LOC, SOARES JUNIOR JM, BARACAT EC, SIMÕES MJ, GIRÃO MJBC: Isoflavones improve collagen I and glycosaminoglycans and prevent bone loss in type 1 diabetic rats *Climacteric*. 2019 Jul 1:1-9.

CHEN XW, GARNER SC, ANDERSON JJ. Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 295, 417–422.

COSTA-RODRIGUES J, FERNANDES MH, PINHO O, ROCHA-MONTEIRO PR. Modulation of human osteoclastogenesis and osteoblastogenesis by lycopene. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2018, v. 57, p. 26-34.

CRANDALL C. Low dose estrogen therapy for menopausal women: a review of efficacy and safety. *J Womens Health (Larchmt)*, 12 (8):723–47.

DE OLIVEIRA PT, NANJI A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004, v. 25, n. 3, p. 403-13.

DI MASCIO P, KAISER S, SIES H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989, v. 274, p. 532-538.

Ge Y, Chen D, Xie L, Zhang R. Enhancing effect of daidzein on the differentiation and mineralization in mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *Yakugaku Zasshi*. 2006 Aug;126(8):651-6.

GRAINGER EM, MORAN NE, FRANCIS DM, SCHWARTZ SJ, WAN L, THOMAS-AHNER J, KOPEC RE, RIEDL KM, YOUNG GS, ABAZA R, BAHNSON RR, CLINTON SK. A Novel Tomato-Soy Juice Induces a Dose-Response Increase in Urinary and Plasma Phytochemical Biomarkers in Men with Prostate Cancer. *J Nutr*. 2019 Jan 1;149(1):26-35.

GRAINGER EM, SCHWARTZ SJ, WANG S, UNLU NZ, BOILEAU TW, FERKETICH AK, MONK JP, GONG MC, BAHNSON RR, DEGROFF VL, CLINTON SK. A combination of tomato and soy products for men with recurring prostate cancer and rising prostate specific antigen. *Nutr Cancer*. 2008;60(2):145-54.

GREGORY CA, GUNN WG, PEISTER A, PROCKOP DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004, Jun 1;329(1):77-84.

HU B, YU B, TANG D, LI S, WU Y. Daidzein promotes osteoblast proliferation and differentiation in OCT1 cells through stimulating the activation of BMP-2/Smads pathway. *Genet Mol Res*. 2016 Jun 24;15(2). doi: 10.4238/gmr.15028792.

JIA TL, WANG HZ, XIE LP, WANG XY, ZHANG RQ. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol*. 2003 Mar 1;65(5):709-15.

KIMIRA Y, KATSUMATA S, SUZUKI K, ISHIMI Y, UENO T, UCHIYAMA S, ADLERCREUTZ H, UEHARA M. Comparative activities of the S-enantiomer and racemic forms of equol on bone fragility in ovariectomized mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012; 76(5):1018-21.

KRINSKY NI. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1998, v. 854, p. 443-447.

LAMBERT MNT, HU LM, JEPPESEN PB. A systematic review and meta-analysis of the effects of isoflavone formulations against estrogen-deficient bone resorption in peri- and postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 2017 Sep;106(3):801-811.

LLANOS AA, PENG J, PENNELL ML, KROK JL, VITOLINS MZ, DEGRAFFINREID CR, PASKETT ED. Effects of tomato and soy on serum adipokine concentrations in postmenopausal women at increased breast cancer risk: a cross-over dietary intervention trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Feb;99(2):625-32.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 nov; 193(1): 265-75.

NISHIDE Y, TOUSEN Y, TADAISHI M, INADA M, MIYAURA C, KRUGER MC, ISHIMI Y. Combined Effects of Soy Isoflavones and β -Carotene on Osteoblast Differentiation. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Nov; 12(11): 13750–13761.

OLIVEIRA GR, VARGAS-SANCHEZ PK, FERNANDES RR, RICOLDI MST, SEMEGHINI MS, PITOL DL, DE SOUSA LG, SIESSERE S, BOMBONATO-PRADO KF. Lycopene influences osteoblast functional activity and prevents femur bone loss in female rats submitted to an experimental model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2019 Jul;37(4):658-667

OMONI, A. O; ALUKO, R.E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. *Nutr Rev* 2005, v. 63, n. 8, p. 272-283.

PACIFICI R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis– the second decade. *Endocrinology*, 1998, 139, 2659–2661.

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

PALOZZA P, PARRONE N, CATALANO A, SIMONE R. Review Tomato Lycopene and Inflammatory Cascade: Basic Interactions and Clinical Implications. *Curr Med Chem*. 2010; 17(23):2547-63.

RIVAS A, ROMERO A, MARISCAL-ARCAS M, MONTEAGUDO C, FERICHE B, LORENZO ML, et al. Mediterranean diet and bone mineral density in two age groups of women. *Int J Food Sci Nutr* 2013, v. 64, p. 155-61.

ROODMAN GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17:308–332.

SETCHELL KD, CLERICI C, LEPHART ED, ET AL. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;81:1072–1079.

SPAGNUOLO P, RASINI E, LUINI A, LEGNARO M, LUZZANI M, CASARETO E, CARRERI M, PARACCHINI S, MARINO F, COSENTINO M. Isoflavone content and estrogenic activity of different batches of red clover (*Trifolium pratense* L.) extracts: an in vitro study in MCF-7 cells. *Fitoterapia*. 2014 Apr;94:62-9. doi: 10.1016/j.fitote.2014.01.027. Epub 2014 Feb 5.

TADAISHI M, NISHIDE Y, TOUSEN Y, KRUGER MC, ISHIMI Y. Cooperative effects of soy isoflavones and carotenoids on osteoclast formation. *J Clin Biochem Nutr.* 2014 Mar;54(2):109-15. doi: 10.3164/jcbtn.13-94. Epub 2014 Jan 25.

VAISHAMPAYAN U, HUSSAIN M, BANERJEE M, SEREN S, SARKAR FH, FONTANA J, FORMAN JD, CHER ML, POWELL I, PONTES JE, KUCUK O. Lycopene and soy isoflavones in the treatment of prostate cancer. *Nutr Cancer.* 2007;59(1):1-7.

XU J, SONG C, SONG X, ZHANG X, LI X. Carotenoids and risk of fracture: a meta-analysis of observational studies. *Oncotarget* 2017, v. 8, n. 2, p. 2391-2399.