

EFEITO DO TRATAMENTO COM ESTROGÊNIO E ISOFLAVONAS DE SOJA NA LÍNGUA DE RATAS OVARIETOMIZADAS¹

EFFECT OF TREATMENT WITH ESTROGEN AND SOY ISOFLAVONES ON THE TONGUE OF OVARIETOMIZED RAT

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS E ISOFLAVONAS DE SOJA EN LA LENGUA DE RATAS OVARIOECTOMIZADAS

Adriane Xavier de Moraes²
Priscila Rossi Santos Strabelli³
Vanessa Ávila Sarmento Silveira⁴
Jucely Aparecida da Rosa⁵
Lucilene Braga Sandes⁶
Tamara Nishijima Pupo Massagardi⁷
Luana Marotta Reis de Vasconcellos⁸
Yasmin Rodarte Carvalho⁹
Renata Falchete do Prado¹⁰

Resumo: Objetivou-se analisar os efeitos da terapia de reposição hormonal (TRH), do tratamento com extrato de isoflavonas de soja ou da terapia combinada sobre a espessura e o índice proliferativo do epitélio da língua de ratas ovariectomizadas. Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizadas 105 ratas fêmeas, das quais 84 foram ovariectomizadas e 21 falsamente operadas (Sham). As ratas ovariectomizadas foram divididas em quatro grupos que receberam diariamente: Grupo OVX: água filtrada; Grupo EST: 1,0mg/kg/dia de β -estradiol 17-valerato; Grupo ISO: 15 mg/kg/dia, de extrato de isoflavonas de soja; e Grupo ASS: terapia combinada. O tratamento iniciou no dia da ovariectomia até a eutanásia, que ocorreu após 3, 5 e 8 semanas. A língua foi processada para análise histológica de rotina e imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Foram

¹ Este estudo foi conduzido seguindo todas as disposições e políticas locais, adotadas pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA). O código de aprovação deste estudo é 027/2005-PA/CEP.

² Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da UNESP de São José dos Campos - SP.
E-mail: adriane.xavier@unesp.br

³ E-mail: priscila.rossi@unesp.br

⁴ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da UNESP de São José dos Campos - SP.
E-mail: vassilveira@yahoo.com.br

⁵ E-mail: jucelyaparecida@hotmail.com

⁶ E-mail: lucilnisandes@yahoo.com.br

⁷ E-mail: tamisunesp@yahoo.com.br

⁸ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da UNESP de São José dos Campos - SP.
E-mail: luanamrv@gmail.com

⁹ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da UNESP de São José dos Campos - SP.
E-mail: yasmin.rodarte@unesp.br

¹⁰ Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da UNESP de São José dos Campos - SP.
E-mail: renata.prado@unesp.br

avaliados a espessura e os aspectos morfológicos do epitélio. Os testes ANOVA e Tukey demonstraram que a ovariectomia induziu predominantemente menor espessura e maior índice proliferativo. O TRH apresentou alguns picos de espessura mais elevados. O extrato de soja demonstrou maior índice proliferativo sem significância estatística. A terapia combinada apresentou comportamento variado. O efeito dos tratamentos diferiu de acordo com os períodos de experimento e com a avaliação da espessura local. Apenas o índice proliferativo não apresentou diferenças significativas.

Palavras-chave: ovariectomia; terapia de reposição de estrogênio; isoflavonas de soja; índice proliferativo; epitélio da língua.

Abstract: To analyze the effects of ovariectomy, hormone replacement therapy (HRT), treatment with soy isoflavones extract, or combined therapy on the thickness and proliferative index of tongue epithelium. One hundred and five female rats were used, of which 84 were ovariectomized and 21 were false-operated (Sham). The ovariectomized rats were divided into four groups that received daily: Group OVX: filtered water; Group EST: 1.0mg/kg/day of β -estradiol 17-valerate; Group ISO: 15 mg/kg/day, of soy isoflavones extract; and Group ASS: combined therapy. The treatment started on the day of ovariectomy until euthanasia, which occurred after 3, 5, and 8 weeks. The tongue was processed for routine histological analysis and immunohistochemistry of cell proliferation nuclear antigen (PCNA). The thickness and morphological aspects of the epithelium were evaluated. The ANOVA and Tukey tests demonstrated that ovariectomy predominantly induced lower thickness and higher proliferative index. HRT presented some higher peaks of thickness. Soy extract demonstrated a higher proliferative index without statistical significance. Combined therapy presented varied behavior. The effect of the treatments differed according to the periods of experiment and the local thickness assessment. Only the proliferative index presented no significant differences.

Key words: ovariectomy; estrogen replacement therapy; soy isoflavones; proliferative index; tongue epithelium.

Resumen: El objetivo de este estudio fue analizar los efectos de la terapia de reemplazo hormonal (TRH), el tratamiento con extracto de isoflavonas de soja o la terapia combinada sobre el grosor y el índice de proliferación del epitelio lingual en ratas ovariectomizadas. Para el estudio, se utilizaron 105 ratas hembras, de las cuales 84 fueron ovariectomizadas y 21 fueron sometidas a cirugía simulada. Las ratas ovariectomizadas se dividieron en cuatro grupos que recibieron diariamente lo siguiente: Grupo OVX: agua filtrada; Grupo EST: 1,0 mg/kg/día de β -estradiol 17-valerato; Grupo ISO: 15 mg/kg/día de extracto de isoflavonas de soja; y Grupo ASS: terapia combinada. El tratamiento comenzó el día de la ovariectomía y continuó hasta la eutanasia, que ocurrió después de 3, 5 y 8 semanas. La lengua se procesó para análisis histológico de rutina e inmunohistoquímica del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA). Se evaluaron el grosor y los aspectos morfológicos del epitelio. Las pruebas ANOVA y Tukey demostraron que la ovariectomía indujo predominantemente un menor grosor y un mayor índice proliferativo. La terapia de reemplazo hormonal (TRH) mostró algunos picos de mayor grosor. El extracto de

soja mostró un mayor índice proliferativo, aunque sin significación estadística. La terapia combinada mostró un comportamiento variable. El efecto de los tratamientos difirió según los periodos experimentales y la evaluación del grosor local. Solo el índice proliferativo no mostró diferencias significativas.

Palabras clave: ovariectomía; terapia de reemplazo hormonal con estrógenos; isoflavonas de soja; índice de proliferación; epitelio lingual.

1 INTRODUÇÃO

Os estrogênios são hormônios que produzem inúmeras ações fisiológicas, incluindo efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas, como controle da ovulação, preparação cíclica do trato reprodutivo para fertilização, implantação do blastocisto e efeitos no metabolismo de minerais, carboidratos, proteínas e lipídios (Schweppe, 1962). O uso terapêutico de estrogênios é difundido e comumente prescrito na reposição hormonal após a menopausa e na contracepção.

Os receptores de estrogênio estão nos tecidos do trato reprodutivo em uma concentração que varia de 10.000 a 100.000 moléculas por célula. Em outros tecidos, como os ossos, os receptores de estrogênio estão presentes em níveis mais baixos, cerca de 200-1200 moléculas por célula. A especificidade é determinada pela ligação do hormônio ao receptor, e a resposta tecidual depende do número de receptores (Turner et al., 1994).

A membrana mucosa que reveste as estruturas dentro dos limites da cavidade oral é conhecida como mucosa oral. A mucosa oral é recoberta por um epitélio estratificado escamoso superficial, conhecido como epitélio oral, cuja espessura e grau de queratinização dependem da localização e das exigências funcionais. As funções da mucosa oral incluem a proteção dos tecidos subjacentes de estímulos mecânicos, químicos e biológicos, secreção de substâncias essenciais e uma função sensorial, que permite a percepção de temperatura, tato, dor e paladar (Brizuela & Winters, 2023).

A camada basal do epitélio oral apresenta uma camada de células cubóides ou colunares que estão acima da membrana basal à qual os hemidesmossomos as fixam. Estas células são conhecidas pela sua capacidade mitótica que permite a manutenção da espessura do epitélio, uma vez que as células superficiais se desprendem constantemente (Brizuela & Winters, 2023).

A menopausa é marcada pelo declínio dos níveis séricos de hormônios sexuais, porém essa diminuição afeta diretamente todos os tecidos biológicos, sendo perceptíveis na pele, que perde sua estrutura, além da interferência nos processos de cicatrização de feridas (Wilkinson & Hardman, 2017).

Forabosco et al. (1982) sugeriram que o desconforto oral (uma condição bastante comum em mulheres na menopausa) pode estar relacionado à deficiência de estrogênio. A terapia de reposição hormonal pode ser eficaz no controle dos sintomas. Ratas ovariectomizadas exibiram uma porcentagem menor de ácinos e ductos estriados das glândulas salivares do que as ratas SHAM, o que pode explicar a relação entre a menopausa e a síndrome da boca ardente (Carvalho et al., 2011), relatada em associação com os distúrbios da menopausa.

Infelizmente, os estrogênios podem causar efeitos deletérios no tecido mamário

e uterino e no sistema cardiovascular (Skouby, 2000). Assim, terapias alternativas têm sido estudadas. Os fitoestrógenos ocorrem naturalmente em alguns vegetais e são estrutural e funcionalmente semelhantes ao estradiol. Dentre as classes químicas, as ações estrogênicas mais potentes são observadas nas isoflavonas, com destaque para a genisteína, a daidzeína e a gliciteína, presentes no gérmen de soja. Dentre estes, a genisteína e a daidzeína são os mais investigados e possuem propriedades estrogênicas (Abuajah et al., 2015).

As isoflavonas parecem ser eficazes quando combinadas com estrogênio na terapia de reposição hormonal, uma vez que não demonstraram efeitos antagonistas às ações estrogênicas (Naftolin & Stanbury, 2002).

Os estrogênios podem estimular a proliferação de células epiteliais basais e a diferenciação do epitélio na glândula mamária e a proliferação de células uterinas (Mallepell et al., 2006; Zhu & Pollard, 2007). Genisteína e daidzeína (potentes constituintes das isoflavonas de soja) podem ser úteis para promover a função imunológica inata do endométrio humano devido à indução de tecidos endometriais e células epiteliais a secretar beta-defensina 1 e 2 (Srisomboon et al., 2016).

Nossa hipótese é que a espessura do epitélio pode estar envolvida nos sintomas da Síndrome da Boca Ardente após a queda do estrogênio pós-menopausa. Portanto, decidimos testar os medicamentos comumente usados para controlar outros sintomas conhecidos da menopausa e avaliamos a espessura do epitélio e a proliferação da camada celular basal.

Até onde sabemos, não há relato na literatura sobre os efeitos das isoflavonas no epitélio da superfície dorsal da língua de ratas ovariectomizadas. Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da ovariectomia e dos tratamentos com estrogênio e extrato de isoflavonas de soja, isolados ou em associação, na mucosa lingual de ratas ovariectomizadas por meio de análises histológicas, histomorfométricas e imunohistoquímicas.

2 METODOLOGIA

Os procedimentos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (027/2005-PA/CEP). Foram utilizadas 105 ratas fêmeas, pesando aproximadamente 300g (*Rattus norvegicus*, variação *Albinus*, Wistar). Os animais foram mantidos em gaiolas em temperatura ambiente, alimentados com ração e água *ad libitum*, fornecidas pelo Laboratório de Animais da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP). A solução de 13 mg/kg de 2-(2,6-xilidina)-5,6-diidro-4H-1,3-tiazina (Rompun, Bayer Brasil) e 33 mg/kg de Cetamina (Dopalen - Agribands of Brasil Ltda), por via intramuscular, foi utilizado para anestesia geral.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo ovariectomizado composto por 84 animais ovariectomizados e um grupo composto por 21 animais operados simuladamente. A ovariectomia foi realizada sob anestesia; a tricotomia foi realizada ao nível dos rins e abaixo da costela inferior e a antisepsia foi feita com álcool iodado. A incisão foi feita e após a ligadura que evita hemorragia, foi realizada a retirada dos ovários com parte do útero e tecidos moles adjacentes. Este procedimento foi realizado bilateralmente.

Nos animais do grupo Sham, foi realizada a falsa ovariectomia ou cirurgia sham, na qual foram realizados os mesmos procedimentos, com exposição dos

ovários, mas sem ligadura e remoção.

Ao final dos procedimentos, a camada muscular foi suturada com categute reabsorvível 4 (Cirumédica Brasil), em seguida a pele com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson) e nova antissepsia com álcool iodado na área operada.

Os animais foram monitorados no período pós-operatório imediato, seguindo as normas institucionais vigentes à época do estudo, não sendo observados sinais clínicos relacionados à dor ou sofrimento, indicativos de necessidade de analgesia adicional.

De acordo com o tratamento recebido (gavagem oral diária), os animais ovariectomizados foram divididos aleatoriamente em grupos: Grupo OVX: composto por 21 ratas que receberam água filtrada; Grupo EST: composto por 21 ratas que receberam 1,0mg/kg/dia de β -estradiol 17-valerato; Grupo ISO: composto por 21 ratos que receberam 15mg/kg/dia de extrato de isoflavonas; Grupo ASS: composto por 21 ratas que receberam 15mg/kg/dia de extrato de isoflavonas e 1,0mg/kg/dia de β -estradiol 17-valerato.

Os medicamentos utilizados foram Primogyna (Schering do Brasil, Química e Farmacêutica Ltda São Paulo Brasil) e extrato de isoflavonas (gentilmente cedido pelo laboratório Herbarium). Detalhes do extrato foram publicados anteriormente (Carvalho et al., 2011). Ambos foram diluídos em água. Os animais do grupo Sham receberam água filtrada.

Os animais de cada grupo foram sacrificados aleatoriamente 3, 5 ou 8 semanas após a cirurgia (n=7). Os animais foram anestesiados e eutanasiados por guilhotina, sendo a língua de cada animal retirada e imediatamente fixada em formol a 10% para posterior análise histológica e histomorfométrica. Durante a eutanásia, os efeitos da deficiência de estrogênio no útero foram observados macroscopicamente.

Para análise histológica, a língua foi seccionada em duas partes no sentido sagital. Após a fixação, o material foi submetido ao processamento rotineiro para corte e coloração com hematoxilina-eosina, para ser examinado em microscopia óptica.

A análise histomorfométrica foi realizada na região das papilas cônicas simples, na superfície dorsal. Medidas lineares foram feitas estendendo-se da camada basal até a camada superior da córnea e separadamente apenas na camada córnea (queratina). Para análise histomorfométrica foram realizados dois cortes semi-seriados de cada língua. Em ampliação original de 200X, as imagens foram capturadas por câmera digital Cyber-Shot, DSC-585 acoplada ao microscópio óptico Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A espessura do epitélio foi medida utilizando o software NIH IMAGE J. Duas regiões em cada nível foram medidas por dois examinadores calibrados (teste Kappa 85%) e foi obtida uma média por animal.

2.1 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina foram utilizadas para análise imunohistoquímica pelo método complexo avidina-biotina-peroxidase (kit LSAB, peroxidase de rábano DAKO). Resumidamente, seções de 3 μ m da língua foram desparafinadas e reidratadas antes da recuperação antigênica, que foi realizada em tampão citrato no microondas por 15 minutos. Estas preparações foram incubadas em H₂O₂ durante 5 min para bloquear a peroxidase endógena. Em seguida, foram incubados durante a noite a 4°C com expressão de antígeno nuclear

de células antiproliferativas de anticorpo monoclonal primário de camundongo (PCNA - PC10 Dako Denmark A/S). As amostras foram incubadas com um anticorpo secundário biotilado e expostas a um complexo terciário estreptavidina-peroxidase (Kit Universal Dako LSAB, Peroxidase). A detecção cromogênica foi realizada com 3,3-diaminobenzidina (DAB). A contrastação foi realizada com hematoxilina de Mayer. Os controles negativos para imunocoloração foram obtidos substituindo os anticorpos primários por PBS. De um total de 300 células epiteliais da camada basal, foi obtido um percentual de células positivas para PCNA para cada animal.

2.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

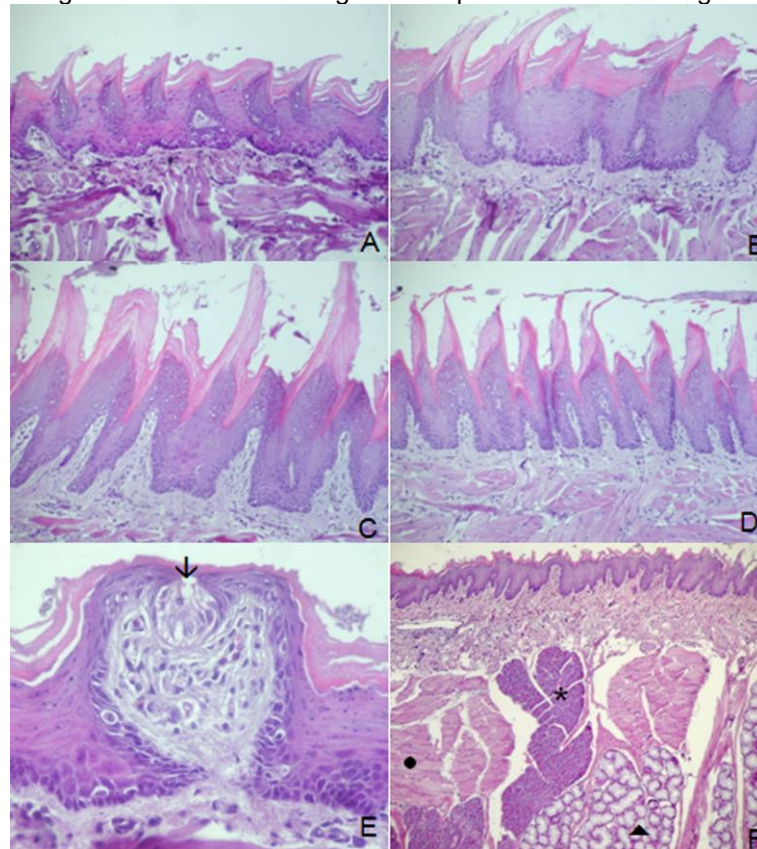
Foi aplicado o teste de normalidade Kolmogorov Smirnov. As estatísticas inferenciais compararam os grupos Sham, OVX, EST, ISO e ASS em cada período de eutanásia (3, 5 e 8 semanas após a cirurgia) usando análise de variância (ANOVA, one way) e testes de Tukey (5%).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A concordância Kappa entre avaliadores foi de 85%.

A análise histológica baseou-se na avaliação qualitativa da morfologia das células e estruturas. Todos os grupos (Sham, OVX, ISO, ASS e EST) apresentaram características microscópicas qualitativamente idênticas nos três períodos. Eles foram, portanto, descritos juntos.

Figura 1 – Análise histológica da superfície dorsal da língua



Fonte: Elaborado pelos autores.

A superfície dorsal da língua é coberta por epitélio escamoso estratificado ortoqueratinizado, formando interdigitações com o tecido conjuntivo subjacente. As papilas filiformes são observadas como três subtipos diferentes: cônicas simples, cônicas verdadeiras e gigantes, localizadas nos dois terços anteriores (Figuras 1A e B); as papilas fungiformes estão presentes em menor número, também nos dois terços anteriores, dispersas entre as papilas cônicas simples.

As papilas cônicas simples são curtas, apresentam base larga e estão distantes umas das outras com superfícies interpapilares suficientes. As papilas gigantes são maiores e mais visíveis (Figura 1C) que as cônicas simples. As verdadeiras papilas cônicas são mais longas, mais finas e próximas umas das outras (Figura 1D). As papilas fungiformes são curtas e largas, com base arredondada e corpúsculo gustativo no epitélio da superfície superior (Figura 1E).

As papilas filiformes apresentam duas superfícies: a anterior, que é convexa nas cônicas simples e verdadeiras, mas côncava nas gigantes; e posteriormente, que é côncava nas cônicas simples e verdadeiras e convexa nas gigantes. A colonização de bactérias no dorso da língua ocorre na superfície convexa do filiforme, geralmente não ocorrendo nas superfícies côncavas, regiões interpapilares e papilas fungiformes.

As bactérias são predominantemente cocos e estão mais presentes nas papilas verdadeiras. A superfície ventral da língua é revestida por epitélio escamoso queratinizado e o tecido conjuntivo é rico em vasos sanguíneos e linfáticos. O epitélio forma algumas interdigitações com o tecido conjuntivo e a

camada de queratina é plana e não há evidências de acúmulo de bactérias nesta superfície. Profundamente, a língua é formada por músculo estriado cujas fibras estão agrupadas em feixes dispostos em três planos. Entre as fibras musculares posteriores estão as glândulas salivares serosas e mucosas (Figura 1F).

3.1 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A normalidade foi comprovada com base no teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov. O teste de igualdade de variâncias foi realizado através do teste de Brown-Forsythe. Não houve diferenças significativas nas variâncias.

Tabela 1- Resultados dos testes ANOVA two way. Efeitos de grupo e período no epitélio da língua demonstrados em cada análise quantitativa

ANÁLISE	RESULTADOS DA ANOVA	DF	SS	EM	F	p
ESPESSURA TOTAL DO EPITÉLIO (μm)	GRUPO	4	51131	12783	3,22	0,0156*
	PERÍODO	2	21317	10659	2,69	0,0731
	PERÍODO DE GRUPO \leftrightarrow	8	84834	10604	2,67	0,0105*
	Erro	101	400892	3969		
ESPESSURA DE QUERATINA (μm)	GRUPO	4	4153	1038	2,56	0,0432*
	PERÍODO	2	1107	553	1,36	0,2605
	PERÍODO DE GRUPO \leftrightarrow	8	11584	1448	3,57	0,0011*
	Erro	100	40585	406		

EPITÉLIO DORSO ESPESSURA (μm)	GRUPO	4	17340	4335	3,27	0,0145*
	PERÍODO	2	7345	3673	2,77	0,0673
	PERÍODO DE GRUPO \leftrightarrow	8	49355	6169	4,66	0,0001*
	Erro	99	131086	1324		
CÉLULAS POSITIVAS PCNA (%)	GRUPO	4	3345	836	1,86	0,1297
	PERÍODO	2	1401	701	1,56	0,2193
	PERÍODO DE GRUPO \leftrightarrow	8	4478	560	1,24	0,2903
	Erro	60	27011	450		

Fonte: Elaborado pelos autores.

Legenda: \leftrightarrow interação * diferenças estatisticamente significativas

A Tabela 1 resumiu os resultados dos testes ANOVA de dois critérios. Valores significativos de p foram apresentados nos fatores: grupo e interações de grupo e período. Qualquer comparação do período apresentou diferenças significativas.

3.2 ESPESSURA TOTAL DO EPITÉLIO

A Figura 2 ilustra médias, desvios padrão, bem como formação de grupos homogêneos a partir de múltiplas comparações dos resultados do teste de Tukey. O grupo ISO às 3 semanas apresentou maior espessura total do epitélio (média e DP), diferindo significativamente do grupo SHAM às 5 semanas e do grupo OVX às 8 semanas ($p < 0,05$).

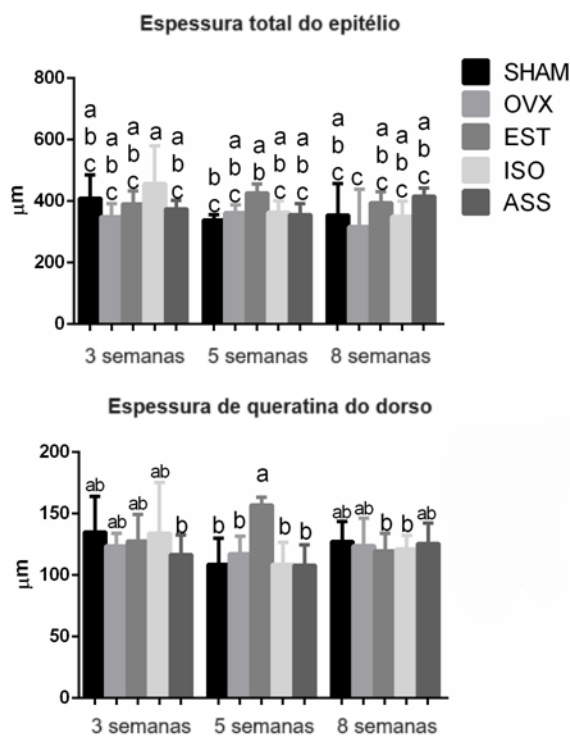
Tabela 2 – Estatística descritiva dos dados da espessura epitelial total dos grupos segundo as variáveis grupo e tempo de sacrifício (semanas)

Grupo	Tempo	SHAM	OVX	ASS	EST	ISO
Média (μm)	3	409,8	349,3	374,48	390,9	457,2
	5	338,0	362,41	355,5	427,0	363,6
	8	392,96	350,8	415,98	394,5	350,1
DP (μm)	3	75,6	43,2	27,75	42,0	122,4
	5	17,99	26,01	36,2	28,5	37,9
	8	20,42	80,7	26,96	36,1	49,3

Fonte: Elaborado pelos autores

O grupo OVX às 8 semanas apresentou a menor espessura, com diferença significativa em relação ao grupo EST, às 5 semanas. Os valores dos demais grupos foram semelhantes. Os valores descritivos completos encontram-se apresentados na Tabela 2.

Figura 2 – Gráficos contendo médias, desvios padrão, através de múltiplas comparações.



Fonte: Elaborado pelos autores.

3.3 ESPESSURA DE QUERATINA DO DORSO

A maior espessura foi observada no grupo EST às 5 semanas. Esse valor foi estatisticamente superior ao grupo ASS às 3 semanas e aos demais grupos às 5 semanas, bem como aos grupos EST e ISO às 8 semanas. Os valores descritivos completos encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Estatística descritiva dos dados da espessura de queratina do dorso dos grupos segundo as variáveis grupo e tempo de sacrifício (semanas)

Grupo	Tempo	SHAM	OVX	ASS	EST	ISO
Média (µm)	3	134,9	123,74	116,81	127,78	134,2
	5	108,58	117,34	108,0	156,94	108,74
	8	127,46	123,95	125,66	119,59	121,27
DP (µm)	3	29,1	10,36	15,8	21,67	41,1
	5	21,52	14,18	16,58	6,35	17,82

	8	16,18	22,32	16,74	14,34	11,19
--	---	-------	-------	-------	-------	-------

Fonte: Elaborado pelos autores.

3.4 ESPESSURA DO EPITÉLIO DO DORSO

Valores significativos de p foram demonstrados nos fatores: grupo e interações de grupo e período durante a análise da espessura do epitélio do dorso. O padrão de distribuição das diferenças do teste de Tukey de múltiplas comparações não permitiu a formação homogênea de grupos e a distribuição das letras entre os grupos. Observou-se maior valor médio de espessura do epitélio do dorso no grupo ISO às 3 semanas. Um valor médio mais baixo de espessura do epitélio do dorso foi observado em OVX em 3 semanas. Valores descritivos completos encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Estatística descritiva dos dados da espessura de epitélio do dorso da língua dos grupos segundo as variáveis grupo e tempo de sacrifício (semanas)

Grupo	Tempo	SHAM	OVX	ASS	EST	ISO
Média (µm)	3	274,90	225,60	257,67	263,08	323,0
	5	229,42	245,08	247,49	270,05	254,90
	8	265,14	238,40	290,34	274,86	228,80
DP (µm)	3	50,3	42,3	14,6	28,15	83,0
	5	14,85	24,22	24,04	23,29	22,27
	8	18,95	37,3	20,6	23,35	43,4

Fonte: Elaborado pelos autores.

Os dados do índice proliferativo das células da camada basal não apresentaram diferenças entre todos os grupos conforme ilustrado na Figura 3. Os grupos ovariectomizados e tratados parecem apresentar valores mais elevados após

3 e 8 semanas de administração sistêmica da droga, destacando os picos proliferativos do grupo isoflavona de soja. Após 8 semanas, o epitélio da língua do grupo que recebeu terapia combinada (estrogênio e extrato de isoflavonas de soja) apresentou o menor valor. Os valores descritivos completos encontram-se apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Estatística descritiva dos dados da porcentagem de células PCNA (%) positivas na língua dos grupos segundo as variáveis grupo e tempo de sacrifício (semanas)

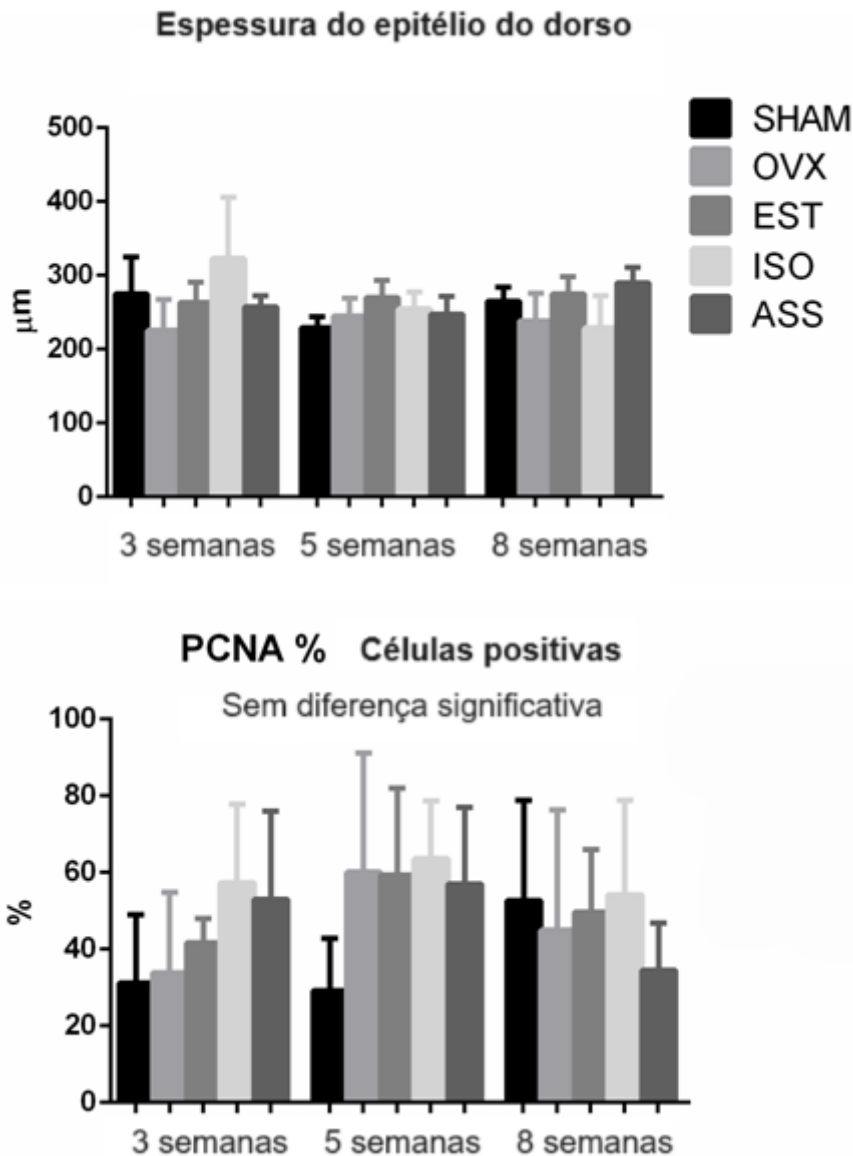
Grupo	Tempo	SHAM	OVX	ASS	EST	ISO
Média (%)	3	31,13	57,4	29,2	63,6	52,6
	5	33,86	52,93	60,13	57,06	44,93
	8	41,66	29,2	59,26	52,6	49,66
DP (%)	3	17,84	20,48	13,61	19,98	26,2
	5	20,97	23,1	30,98	26,2	31,48
	8	6,298	10,33	22,81	31,48	24,71

Fonte: Elaborado pelos autores.

Esta pesquisa demonstrou, às 3 semanas, a redução da espessura do epitélio da língua nos animais devido à deficiência de estrogênio após ovariectomia. Também demonstrou a recuperação do epitélio de ratas ovariectomizadas recebendo TRH e isoflavonas.

Tais efeitos podem estar relacionados à atuação do estrogênio na renovação e diferenciação tecidual, especialmente do epitélio escamoso estratificado, que é mediada por receptores de estrogênio presentes em tecidos não reprodutivos. As isoflavonas de soja atuam como moduladores seletivos dos receptores estrogênicos, com atividade agonista parcial dependente do tecido, o que poderia também explicar os efeitos mais evidentes nas primeiras semanas de tratamento.

Figura 3 – Diferença entre grupos



Fonte: Elaborado pelos autores.

Este efeito não se restringe apenas à língua, já foi descrito na mucosa bucal quando Rahnema et al. (2004) observaram que a falta de estrogênio causa diminuição da espessura do epitélio e da secreção salivar. Ratas ovariectomizadas apresentaram atrofia epitelial quando comparadas ao grupo sham. Entretanto, pouco se sabe sobre a interação do estrogênio em tecidos que não são considerados órgãos-alvo clássicos dos hormônios femininos (Canpolat et al., 2010).

Este estudo confirma os resultados de Seko et al. (2005) que observaram espessura significativamente menor do epitélio lingual no grupo OVX quando comparado ao grupo sham, após 6 meses de ovariectomia. Os mecanismos biológicos responsáveis pela resposta epitelial à deficiência de estrogênio podem ser melhor compreendidos nos modelos que evidenciam a dependência estrogênica da proliferação e da diferenciação celulares (Kanda & Watanabe, 2004). Assim, sugerimos que a deficiência de estrogênio promove diminuição da espessura do epitélio. Essa diminuição, segundo a literatura, possivelmente se deve à redução da

renovação do epitélio lingual (Seko et al., 2005).

Alguns aspectos clínicos da SBA, como maior prevalência em mulheres na fase pós-menopausa, corroboram a hipótese de que o fator hormonal é o principal responsável por esta condição (Brizuela & Winters, 2023). A secreção salivar e a composição da saliva aparecem como outros importantes fatores etiológicos da síndrome. Os hormônios femininos causam alterações nas funções salivares.

Os sintomas mais importantes relacionados à síndrome são dor e boca seca (Forabosco et al., 1982). A deficiência de estrogênio secundária à ovariectomia causa redução no número de ácinos e ductos salivares, o que pode levar à xerostomia (Carvalho et al., 2011). A síndrome da boca ardente (SAB) é uma doença crônica para a qual uma etiopatologia definitiva não é conhecida. Foi descrita como uma doença neuropática (Bender, 2018). Sugerimos que a atrofia do epitélio e o atraso na função salivar podem estar associados à dor e à boca seca.

As médias da espessura total do epitélio do grupo EST (todos os períodos) foram qualitativamente superiores às dos grupos OVX. Rahnama et al. descobriram que a terapia de reposição com estrogênio em ratas ovariectomizadas resultou em espessamento da mucosa do epitélio da bochecha. Os autores atribuíram esse efeito à ação do estrogênio sobre o potencial proliferativo da camada basal do epitélio, prevenindo a atrofia epitelial induzida pela ovariectomia (Canpolat et al., 2010; Hall & Levison, 1990). Nas presentes condições experimentais, não foi observado efeito da deficiência de estrogênio na morfologia da língua, bem como no índice proliferativo na camada basal do epitélio, embora o grupo OVX não tenha apresentado médias significativamente maiores de células PCNA positivas (Hall & Levison, 1990). É fundamental considerar que o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) possui uma meia-vida biológica longa que persiste além do ciclo celular, o que possibilita sua detecção em células que já saíram da mitose ou que estão envolvidas em processos de reparo de DNA, influenciando a interpretação do índice proliferativo (Tipoe et al., 1996).

A influência de agentes sistêmicos na cinética celular da mucosa lingual pode ser comparada à ação de fatores de crescimento exógenos, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), que são capazes de modular a dinâmica do ciclo celular, interferindo na progressão da fase S e mitose, resultando em variações temporais na espessura e na organização do epitélio (Yamada et al., 1997).

A concentração da marcação de proliferação nas camadas basal e parabasal corrobora com investigações em mucosas orais humanas e murinas que indicam que a atividade proliferativa predominante ocorre nesses compartimentos germinativos, sendo essencial para sustentar a rápida taxa de renovação e a integridade do epitélio estratificado (Liu et al., 1998).

Apesar disso, o PCNA é considerado um anticorpo bem estabelecido para abordar o índice de proliferação (Strzalka & Ziemienowicz, 2011). A terapia estrogênica, aplicada neste estudo, manteve o índice proliferativo como os demais grupos ovariectomizados. Foi um alívio não ter sido observada indução de maior proliferação, uma vez que foi descrito como tendo este efeito adverso. Outros efeitos adversos descritos foram a maior ocorrência de hiperplasia e carcinoma endometrial (Vincent & Fitzpatrick, 2000), câncer de mama e complicações vasculares (Wuttke et al., 2003). Devido a esses efeitos, pesquisadores de todo o mundo têm buscado tratamentos alternativos.

A homeostase da mucosa lingual depende de uma dinâmica contínua de renovação celular, com tempos de turnover relativamente curtos em modelos

experimentais com roedores, nos quais estímulos externos podem acelerar a progressão do ciclo celular ou induzir a diferenciação celular como mecanismo adaptativo para a manutenção da integridade da barreira epitelial frente a estímulos mecânicos e biológicos (Dörr & Kummermhr, 1991).

De acordo com nossos resultados, inicialmente, as isoflavonas reverteram os efeitos da ovariectomia no epitélio bucal. Valores mais elevados de espessura e índice proliferativo foram observados após 3 semanas de tratamento. No entanto, o seu efeito terapêutico diminuiu com o tempo. Isoflavonas de soja melhoraram a qualidade óssea em fêmures de ratos, aumentando os parâmetros histomorfométricos, o conteúdo de glicosaminoglicanos e as fibras maduras de colágeno tipo I. Esses efeitos positivos foram dependentes da dose (Santos et al., 2014).

A dinâmica observada no epitélio lingual frente aos tratamentos pode ser comparada aos efeitos do fator de crescimento de queratinócitos (KGF), onde uma estimulação proliferativa inicial é seguida por uma redução na atividade celular, sugerindo que o tecido possui processos homeostáticos endógenos capazes de corrigir a sobreprodução de células para restaurar a normalidade (Potten et al., 2002).

Aqui a escolha do extrato de isoflavonas baseou-se no fato de que a capacidade das isoflavonas conjugadas flutua significativamente entre camundongos e ratos, bem como entre roedores e humanos, que possuem capacidade avançada de conjugar isoflavonas (Setchell et al., 2011). Após uma dose de 50 mg/kg/dia de extrato de isoflavonas de soja, em ratas castradas Sprague-Dawley, os níveis séricos foram de 0,03 µm de genisteína livre de um total de 0,91 µm e 0,06 µm de daidzeína livre de um total de 1,5 µm (Gallo et al., 2005). Esta dose foi semelhante à administrada no presente estudo.

Além dos efeitos ósseos, a administração precoce de fitoestrógenos a ratas ovariectomizadas reverteram os efeitos uterinos/uretrais da castração (Santos et al., 2010) e não mostraram efeitos proliferativos e angiogênicos na glândula mamária de ratas ovariectomizadas.

As isoflavonas parecem ser eficazes quando combinadas com estrogênio na terapia de reposição hormonal, pois demonstraram não antagonizar as ações estrogênicas (Naftolin & Stanbury, 2002). Na boca, a terapia com estrogênio, a terapia com isoflavonas de soja e a combinação de ambas foram eficazes na redução dos efeitos da ovariectomia nas glândulas salivares (Carvalho et al., 2011).

A terapia combinada causaria maior ocupação dos receptores, proporcionando o efeito desejado. Um possível sinergismo entre isoflavonas e estrogênio foi encontrado na fase posterior deste trabalho; o grupo ASS apresentou maior espessura de epitélio quando comparado aos demais grupos às 8 semanas, sem diferença significativa. No entanto, o efeito dos tratamentos variou ao longo de outros períodos.

Embora os mecanismos de ação moleculares não tenham sido alvo do presente estudo, os achados morfológicos evidenciam a ação do estrogênio e das isoflavonas de soja nos tecidos e epitélios estratificados dependentes de estrogênio, reforçando a plausibilidade dos resultados apresentados.

O principal mecanismo molecular identificado para o controle da progressão do ciclo celular é a regulação das ciclinas. As ciclinas do tipo D, especialmente a D1, são descritas como os controladores limitantes da progressão da fase G1 em células de mamíferos, sendo expressas especificamente durante as fases G1-S (Liu et al.,

1998). O 17 β -estradiol estimula o crescimento de queratinócitos através da indução da expressão da ciclina D2, o que facilita a entrada da célula no ciclo mitótico (Kanda & Watanabe, 2004). As isoflavonas, como a genisteína e a daidzeína, atuam como mímicos estruturais e funcionais do estradiol, interagindo com os mesmos receptores para promover a saúde tecidual e reverter a atrofia epitelial sem os efeitos colaterais proliferativos deletérios observados em outros órgãos (Kuiper et al., 1998).

A farmacodinâmica e a farmacocinética das isoflavonas de soja isoladas ou combinadas com estrogênios não são completamente compreendidas, sendo necessários novos estudos para determinar sua aplicação no tratamento de alterações do climatério. Uma limitação do nosso estudo é a dosagem de estradiol e isoflavonas de soja e a ausência de suas concentrações séricas. A literatura não apresenta requisitos uniformes para TRH em ratos e a comparação com outros resultados é difícil.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito dos tratamentos diferiu de acordo com os períodos de experimento e com a avaliação da espessura local. Apenas o índice proliferativo não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Valores mais elevados de espessura e índice proliferativo foram observados após 3 semanas de tratamento com isoflavonas.

A terapia combinada proporcionou um efeito desejado talvez por um possível sinergismo entre isoflavonas e estrogênio. Foi observado que as isoflavonas reverteram os efeitos da ovariectomia no epitélio bucal, no entanto, o seu efeito terapêutico diminuiu com o tempo.

REFERÊNCIAS

- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2522–2529. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1396-5>
- Bender, S. D. (2018). Burning mouth syndrome. *Dental Clinics of North America*, 62(4), 585–596. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.05.006>
- Brizuela, M., & Winters, R. (2023). Histology, oral mucosa. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572115/>
- Canpolat, S., Tug, N., Seyran, A. D., Kumru, S., & Yilmaz, B. (2010). Effects of raloxifene and estradiol on bone turnover parameters in intact and ovariectomized rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 66(1), 23–28. <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0008-8>
- Carvalho, V. D. C., Silveira, V. Á. S., Do Prado, R. F., & Carvalho, Y. R. (2011). Effect of estrogen therapy, soy isoflavones, and the combination therapy on the submandibular gland of ovariectomized rats. *Pathology - Research and Practice*, 207(5), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.01.002>

- Dörr, W., & Kummermehr, J. (1991). Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal conditions and following single dose irradiation. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 60(1), 287–294. <https://doi.org/10.1007/BF02899559>
- Forabosco, A., Criscuolo, M., Coukos, G., Uccelli, E., Weinstein, R., Spinato, S., Botticelli, A., & Volpe, A. (1992). Efficacy of hormone replacement therapy in postmenopausal women with oral discomfort. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 73(5), 570–574. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(92\)90100-5](https://doi.org/10.1016/0030-4220(92)90100-5)
- Gallo, D., Zannoni, G. F., Apollonio, P., Martinelli, E., Ferlini, C., Passetti, G., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., & Scambia, G. (2005). Characterization of the pharmacologic profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: Effects on bone, uterus, and lipid profile. *Menopause*, 12(5), 589–600. <https://doi.org/10.1097/01.GME.0000156348.61767.D5>
- Hall, P. A., & Levison, D. A. (1990). Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *Journal of Clinical Pathology*, 43(3), 184–192. <https://doi.org/10.1136/jcp.43.3.184>.
- Kanda, N., & Watanabe, S. (2004). *17β-Estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression*. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 33. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.12645.x>
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., & Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263. <https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>
- Liu, S. C., Sauter, E. R., Clapper, M. L., Feldman, R. S., Levin, L., Chen, S. Y., Yen, T. J., Ross, E., Engstrom, P. F., & Klein-Szanto, A. J. (1998). Markers of cell proliferation in normal epithelia and dysplastic leukoplakias of the oral cavity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 7(7), 597–603.
- Mallepell, S., Krust, A., Chambon, P., & Briskin, C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor α is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2196–2201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510974103>
- Naftolin, F., & Stanbury, M. G. (2002). Phytoestrogens: Are they really estrogen mimics? *Fertility and Sterility*, 77(1), 15–17. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02006-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02006-4)
- Potten, C. S., Booth, D., Cragg, N. J., O'Shea, J. A., Tudor, G. L., & Booth, C. (2002). Cell kinetic studies in the murine ventral tongue epithelium: The effects of repeated exposure to keratinocyte growth factor. *Cell Proliferation*, 35(s1), 22–31. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.35.s1.3.x>

- Rahnama, M., Świątkowski, W., Łańcut, M., & Wójcik, A. (2004). Influence of raloxifene and 17 β -oestradiol on rats oral mucosal structure. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48(3), 329–332.
- Santos, E. T., Sampaio, M. D. D., Cecon, P. R., De Jesus Simões, M., Sartori, M. G. F., & Girão, M. J. B. C. (2010). Effects of soy isoflavones on the uterus and urethra of ovariectomized rats. *International Urogynecology Journal*, 21(1), 111–116. <https://doi.org/10.1007/s00192-009-0995-6>
- Santos, M. A., Florencio-Silva, R., Medeiros, V. P., Nader, H. B., Nonaka, K. O., Sasso, G. R. S., Simões, M. J., & Reginato, R. D. (2014). Effects of different doses of soy isoflavones on bone tissue of ovariectomized rats. *Climacteric*, 17(4), 393–401. <https://doi.org/10.3109/13697137.2013.830606>
- Schweppe, J. S. (1962). Female sex hormones: Basic physiological concepts regarding estrogens. *Quarterly Bulletin of the Northwestern University Medical School*, 36, 109–114.
- Seko, K., Kagami, H., Senga, K., Ozeki, K., Mizutani, H., & Ueda, M. (2005). Effects of ovariectomy and estrogen replacement on rat oral mucosa. *Maturitas*, 50(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.03.015>
- Setchell, K. D., Brown, N. M., Zhao, X., Lindley, S. L., Heubi, J. E., King, E. C., & Messina, M. J. (2011). Soy isoflavone phase II metabolism differs between rodents and humans: Implications for the effect on breast cancer risk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(5), 1284–1294. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.019638>
- Skouby, S. O. (2000). The rationale for a wider range of progestogens. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 3 Suppl 2, 14–20.
- Srisomboon, Y., Poonyachoti, S., & Deachapunya, C. (2016). Enhanced Secretion of Beta-Defensins in Endometrial Tissues and Epithelial Cells by Soy Isoflavones. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*, 99 Suppl 8, S142–S149.
- Strzalka, W., & Ziemienowicz, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*, 107(7), 1127–1140. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>
- Tipoe, G. L., Jin, Y., & White, F. H. (1996). The relationship between vascularity and cell proliferation in human normal and pathological lesions of the oral cheek epithelium. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*, 32(1), 24–31. [https://doi.org/10.1016/0964-1955\(95\)00049-6](https://doi.org/10.1016/0964-1955(95)00049-6)

Turner, R. T., Riggs, B. L., & Spelsberg, T. C. (1994). Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Reviews*, 15(3), 275–300.

Vincent, A., & Fitzpatrick, L. A. (2000). Soy Isoflavones: Are They Useful in Menopause? *Mayo Clinic Proceedings*, 75(11), 1174–1184.
<https://doi.org/10.4065/75.11.1174>

Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2017). The role of estrogen in cutaneous ageing and repair. *Maturitas*, 103, 60–64.
<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.06.026>

Wuttke, W., Jarry, H., Becker, T., Schultens, A., Christoffel, V., Gorkow, C., & Seidlová-Wuttke, D. (2003). Phytoestrogens: Endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas*, 44, S9–S20.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5122\(02\)00344-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5122(02)00344-4)

Yamada, M., Ikeuchi, T., & Hatanaka, H. (1997). The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Progress in Neurobiology*, 51(1), 19–37.
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(96\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00046-9)

Zhu, L., & Pollard, J. W. (2007). Estradiol-17 β regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(40), 15847–15851.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0705749104>

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo processo de bolsa n. 05/55998-0 e processo n. 05/55999-6. Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob número de bolsa 476143/2006-3.

Financiamento

Este estudo foi apoiado parcial ou totalmente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, para o processo de bolsa n. 05/55998-0 e processo n. 05/55999-6. Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob número de bolsa 476143/2006-3.

Conflito de interesses

Os autores não têm interesse proprietário, financeiro ou outro interesse pessoal de qualquer natureza ou tipo em qualquer produto, serviço e/ou empresa apresentado neste artigo.

Declaração Regulatória

Este estudo foi conduzido seguindo todas as disposições e políticas locais, adotadas pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA). O código de aprovação deste estudo é 027/2005-PA/CEP.