



LARISSA SAMPAIO JACQUES

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE EXTRATOS DE
LINHAÇA E/OU AMOREIRA SOBRE O SISTEMA ÓSSEO DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**LAVRAS-MG
2022**

LARISSA SAMPAIO JACQUES

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE EXTRATOS DE
LINHAÇA E/OU AMOREIRA SOBRE O SISTEMA ÓSSEO DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, área de concentração
em Ciências da Saúde, para obtenção do título
de Mestre.

Prof. Dr. Bruno Del Bianco Borges
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Jacques, Larissa Sampaio.

Efeitos da Suplementação de Extratos de Linhaça e/ou
Amoreira sobre o Sistema Ósseo de Ratas Ovariectomizadas /
Larissa Sampaio Jacques. - 2021.

73 p. : il.

Orientador(a): Bruno Del Bianco Borges.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Fitoestrógenos. 2. Perda óssea. 3. Menopausa. I. Borges,
Bruno Del Bianco. II. Título.

LARISSA SAMPAIO JACQUES

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE EXTRATOS DE
LINHAÇA E/OU AMOREIRA SOBRE O SISTEMA ÓSSEO
DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

**EFFECTS OF FLAXSEED AND/OR MULBERRY EXTRACT
SUPPLEMENTATION ON BONE SYSTEM OF
OVARIETOMIZED RATS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
área de concentração em Ciências da
Saúde, para obtenção do título de
Mestre.

APROVADA em 30 de Novembro de 2020.
Dr. Bruno Del Bianco Borges, UFLA
Isabela Coelho de Castro, UFLA
Rômulo Dias Novaes, UNIFAL

Prof. Dr. Bruno Del Bianco Borges
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro do projeto, que permitiram que este fosse desenvolvido.

A minha família, por todo o apoio dado a mim todos esses anos, desde que iniciei minha trajetória ao sair de casa para iniciar faculdade, até hoje.

Ao meu namorado, Lucas. Pela sua ajuda, pela sua compreensão e infinita paciência. Obrigada por ser meu porto seguro nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos da graduação André, Isis, Kimberly, Lucas e Priscilla, por terem permanecido comigo nesse novo desafio. Obrigada por estarem presentes, mesmo que virtualmente, por todos nossos momentos juntos, por nossa amizade. Devo a vocês todos esses quase seis anos completos de risadas e lágrimas, e espero que continuemos juntos assim, independente da distância.

Aos meus colegas de mestrado, pelo companheirismo. Em especial minha colega de trabalho, Tayná. Obrigada não só pela ajuda, mas também por sua alegria, sua paciência e pelas suas sábias palavras. Aos colegas do LabCovid, pela força que me deram no final dessa etapa. Ao Dirceu, por muitas vezes me mostrar os caminhos quando eu não conseguia enxergá-los.

Aos meus professores que me deram todo o conhecimento necessário para chegar até aqui. Todos os mestres que me lecionaram desde o colégio, os que me guiaram durante a graduação na Universidade Federal de São João Del Rei e os que me ensinam o mais profundo conhecimento na Universidade Federal de Lavras. Obrigada por terem me apresentado esse mundo. Em especial ao Prof. Dr. Bruno Del Bianco Borges, por toda sua orientação ao longo do mestrado.

Muito obrigada.

*O caminho do progresso não é rápido
nem fácil.*

Marie Curie

RESUMO

Estrogênios (E₂) são hormônios esteroides, produzidos em quantidades elevadas a partir da puberdade pelos ovários, que promovem suas ações, principalmente, no desenvolvimento de órgãos reprodutivos, mas também atua na modulação da formação óssea. A diminuição na concentração plasmática de E₂, em decorrência da falência ovariana, retirada dos mesmos ou utilização de bloqueadores de seus receptores, podem ter efeitos que incluem a osteoporose. O uso de terapia de reposição hormonal pode causar danos colaterais, o que leva à busca de novas alternativas, como o uso de alimentos ricos em fitoestrógenos. A semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) e folhas, pecíolos e caules de amoreira-preta (*Morus nigra* L.) são exemplos de fontes nutracêuticas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi verificar os efeitos promovidos pela suplementação com os extratos de linhaça e/ou amoreira em ratas ovariectomizadas. Para isso, ratas Wistar (n=32) foram submetidas à ovariectomia bilateral e tratadas com extratos de linhaça (400 mg/kg), amoreira (400 mg/kg), linhaça + amoreira (200 mg/kg cada), E₂ (0,158 mg/kg) ou salina, diariamente, por 60 dias. Os fêmures e amostras de sangue foram coletados para análise. Foram realizadas quantificações de células ósseas e porcentagem trabecular em lâminas histológicas, μ -CT para observação de modificações morfométricas, e SEM-EDS para mensuração de minerais, na região da cabeça e colo dos fêmures, bem como quantificação da atividade da fosfatase alcalina óssea (ALP) plasmática. Os resultados foram analisados por Scott-Knott à 5% de significância estatística. Observou-se maior número de osteoblastos e osteoclastos nos ossos dos animais tratados com extrato de amoreira. Os animais tratados com os extratos apresentaram maior porcentagem de trabéculas, densidade mineral óssea, volume ósseo, número de trabéculas, e menor porosidade e espaço intertrabecular. A concentração de cálcio, fósforo e magnésio foi maior nos fêmures dos animais tratados com os extratos em relação aos que receberam salina. Houve maior atividade de ALP nos animais tratados com os extratos. Dessa forma, sugere-se que os extratos de linhaça e/ou amoreira foram capazes de prevenir a perda óssea promovida pela falta de ação estrogênica em ratas, atuando possivelmente na modulação do controle da reabsorção óssea, sugerindo que essa suplementação possa prevenir/reduzir os efeitos causados pela depleção hormonal.

Palavras-chave: Terapia hormonal, fitoestrógenos, Perda óssea, Menopausa.

ABSTRACT

Estrogens (E₂) are steroid hormones, produced in high amounts since puberty by the ovaries, which promote their actions, mainly in reproductive organs development, but also act in bone formation modulation. Decrease in E₂ concentration in plasma as a result of ovarian failure, surgical removal or use of receptor blockers, may have effects that can lead to osteoporosis. Hormone replacement therapy can cause collateral damage, which leads to search for new alternatives, such as use of foods rich in nutraceuticals that have relative amounts of phytoestrogens. Flaxseed (*Linum usitatissimum*) and blackberry (*Morus nigra* L.) leaves, petioles and stems are examples of nutraceutical sources. Thus, the objective of this work was to verify the effects promoted by supplementation with flaxseed and/or mulberry extracts in ovariectomized rats. For this, female Wistar rats (n=32) were submitted to bilateral ovariectomy and treated with flaxseed (400 mg/kg), mulberry (400 mg/kg), flaxseed + mulberry (200 mg/kg each) extracts, E₂ (0.158 mg/kg) or saline, daily, for 60 days. Femurs and blood samples were collected for analysis. Quantification of bone cells and trabecular percentage were performed on histological slides, μ -CT for observation of morphometric changes, and SEM-EDS for minerals quantification in femoral head and neck regions, as well as activity measurement of bone alkaline phosphatase activity (ALP) in plasma. The results were analyzed by Scott-Knott at 5% statistical significance. A greater number of osteoblasts and osteoclasts was observed in the bones of animals treated with mulberry extract. Animals treated with extracts showed lower percentage of trabeculae loss, bone mineral density, bone volume, number of trabeculae, and were able to maintain porosity and intertrabecular space. Calcium, phosphorus, and magnesium concentrations were higher in femurs of animals treated with the extracts compared to those receiving saline. There was greater ALP activity in animals treated with the extracts, similar to those treated with estrogen. Thus, it is suggested that flaxseed and/or mulberry extracts were able to prevent bone loss caused by the lack of estrogenic action in female rats, possibly acting in the modulation of the control of bone resorption, suggesting that this supplementation can prevent/reduce effects caused by hormonal depletion.

Keywords: Hormone therapy, Phytoestrogen, Bone loss, Menopause.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3	RESULTADOS.....	29
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ARTIGO - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE EXTRATOS DE LINHAÇA E/OU AMOREIRA SOBRE O SISTEMA ÓSSEO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS.....		
		42
1	INTRODUÇÃO.....	44
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3	RESULTADOS.....	51
4	DISCUSSÃO.....	57
5	CONCLUSÃO.....	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor feminino tem como principal função a produção de gametas e síntese de hormônios esteroides sexuais pelos ovários, entre eles estrogênio e progesterona (MCCARTNEY; MARSHALL, 2018). Os estrogênios atuam por meio dos seus receptores alfa (ER- α), beta (ER- β) e receptor de membrana acoplado à proteína G (GPER1, antes denominado GPR30) (FUENTES; SILVEYRA, 2019; VRTAČNIK et al., 2014), os quais promovem manutenção e desenvolvimento do sistema reprodutivo feminino e das características sexuais secundárias. Os estrogênios também possuem ação em sistemas que não estão diretamente relacionados ao sistema reprodutor, como no sistema esquelético, atuando como importantes reguladores da homeostase do metabolismo ósseo (PADILHA et al., 2010).

Os estrogênios atuam sobre os osteoclastos diminuindo a reabsorção óssea, consequentemente, em situações de falência ovariana ou na redução de ação estrogênica, ocorre desequilíbrio do metabolismo ósseo e redução da matriz óssea (KHOSLA; MONROE, 2018). A alteração da homeostase do metabolismo ósseo pode levar a osteopenia (perda gradual da massa óssea) e osteoporose, doença caracterizada pela baixa densidade mineral e deterioração da microarquitetura óssea, que eleva o risco de fraturas (LIU et al., 2015). A prevalência da osteoporose aumenta com a idade em mulheres, pois menopause os ovários param de sintetizar estrogênio (SNYMAN, 2014). Com o aumento da longevidade da população, a incidência de osteoporose e fraturas por fragilidade tem se agravado (CLYNES et al., 2020).

A primeira opção de escolha para tratamento das consequências da menopausa é a terapia de reposição hormonal (TRH) com hormônios sintéticos (LOBO et al., 2014). O estudo randomizado *Women's Health Initiative* (WHI), sobre os fatores que podem afetar a saúde pós-menopausa, analisou 16.608 mulheres na pós-menopausa, tratadas com TRH (estrogênio combinado com progestina). Após 5 anos de acompanhamento, observou-se uma diminuição de 34% nos casos de fraturas no quadril (CAULEY; CRANDALL, 2020). Entretanto, houve um aumento de casos de câncer de mama (26%), doenças coronarianas (29%) e acidente vascular cerebral (41%) (CHEUNG et al., 2004). Dessa forma, torna-se importante a busca por terapias eficazes e seguras para o tratamento e prevenção da osteoporose ocasionada pela depleção estrogênica, as quais pode-se incluir produtos naturais.

Plantas ricas em fitoestrógenos são amplamente utilizadas por mulheres na menopausa e na senescência (HAGGANS et al., 2000; MIRANDA et al., 2010). Fitoestrógenos são moléculas presentes em plantas medicinais, compostos nutracêuticos que possuem estruturas semelhante ao estrogênio, o que permite sua ação nos ERs(LTAIF et al., 2020; MA et al., 2014). A semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) é um alimento funcional rico em fitoestrógeno, principalmente lignanas (SHIM et al., 2014). As lignanas da linhaça são estruturalmente semelhantes ao estrógeno, assim como as isoflavonas da soja, descritas como reguladoras endócrinas (WARD et al., 2001). Em estudo com amoreira-preta(*Morus. Nigra* L.) através de cromatografia gasosa, concluiu-se que o extrato metanólico das suas folhas apresenta isoflavonas com características semelhantes ao 17 β -estradiol (BOLZAN, 2008; SILVA, 2012). As isoflavonas possuem afinidade para se ligar aos ERs presente nas células ósseas e regular seu metabolismo (GUIZZO et al., 2015; MORITO et al., 2001). Neste contexto, sugere-se que a semente de linhaça e as folhas de amoreira-preta possam demonstrar uma alternativa potencial à prevenção e redução dos sintomas causados pela ausência da ação estrogênica no organismo, incluindo a osteopenia e osteoporose.

O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos dos extratos de linhaça e amoreira na modulação do metabolismo ósseo em animais sem ação estrogênica endógena, quantificar a atividade de fosfatase alcalina óssea plasmática, células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) em lâminas histológicas coradas com HE, analisar a composição óssea de minerais por espectrometria de raios-X por dispersão de energia e observar alterações morfométricas através da análise de Microtomografia Computadorizada de Raios-X. A hipótese baseia-se que os extratos de linhaça e amoreira são capazes de exercer efeitos benéficos no metabolismo ósseo dos animais, semelhantemente ao E₂.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O sistema reprodutor feminino e o estrogênio

O sistema reprodutor feminino é composto por uma organização funcional complexa de diversos tecidos e vias de sinalização(GUYTON, 2011). O hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofina (GnRH) estimula as células gonadotróficas da hipófise anterior a sintetizar e secretar as gonadotrofinas: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). LH e FSH atuam nos ovários promovendo foliculogênese, seleção de oócito dominante, oocitação e síntese de hormônios esteroides sexuais, principalmente, estrogênio e progesterona(MCCARTNEY; MARSHALL, 2018).

Os estrogênios – estrona, estradiol, estriol e estreptol, são hormônios esteroides produzidos principalmente pelos ovários a partir da puberdade, quando atuam na regulação da expressão de genes envolvidos na diferenciação e desenvolvimento sexual (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). Promovem a manutenção e desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e das características sexuais secundárias, como desenvolvimento das mamas, depósitos de tecido adiposo proporcionais no corpo feminino e alterações no trato genital. Além disso, os estrogênios também desempenham importantes funções em sistemas não relacionados diretamente com a reprodução, como a regulação da homeostase esquelética, balanço hidroeletrolítico, metabolismo de lipídios e carboidratos (NILSSON et al., 2001). O estradiol (E₂ ou 17β-estradiol) é o principal estrogênio circulante, secretado, principalmente, pelas células da granulosa dos folículos ovarianos e pelos corpos lúteos, e também por tecidos extragonadais como tecido adiposo e glândulas adrenais, em menor quantidade(CARLSON, 2019a). Devido a sua relevância, é comum o uso da palavra estrogênio para se referir ao E₂ (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

O mecanismo de ação de E₂ se dá por meio da ligação aos receptores nucleares alfa (ER-α), beta (ER-β) e receptor de membrana acoplado à proteína G (GPER1)(VRTAČNIK et al., 2014). Após acoplamento ao seu ER, a sinalização pode ser dividida em genômica (direta ou indireta) e não genômica, a depender do tipo de receptor presente no tecido(FUENTES et al., 2019). A ligação dos E₂ aos receptores nucleares induz à dimerização e ligação aos elementos responsivos a estrogênio (EREs), que se encontram próximos aos promotores dos genes-alvo, promovendo a expressão gênica (NILSSON et al., 2001). Indiretamente, os E₂ podem induzir a expressão de genes sem a presença dos EREs, quando se ligam ao receptor e este interage com outras classes de fatores de transcrição e seus elementos de resposta(RAHMAN et al., 2015). E, por fim, podem agir de maneira não-genômica, quando

se ligam ao GPER1 e ativam cascatas de proteína-quinase que culminam alterações indiretas na expressão gênica devido à fosforilação dos fatores de transcrição (FUENTES et al., 2019).

Em situações de insuficiência ovariana, retirada dos ovários ou uso de medicamentos antagonistas de ERs, ocorre uma grande diminuição da ação estrogênica no organismo e consequente alteração da homeostase de vários órgãos e sistemas(MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013).

2.2 Ausência de estrogênio endógeno

As mulheres nascem com número de oócitos definido (cerca de 2 milhões) e, com o passar dos anos, estes são gradualmente esgotados pela ovulação ou atresia (degeneração) folicular(TAKAHASHI; JOHNSON, 2015). Quando não há mais folículos ovarianos, o ovário é incapaz de responder aos estímulos de FSH e LH, havendo, assim, um declínio na concentração de estrogênios (HONOUR, 2018).

Após a fase reprodutiva da mulher, esta entra em fase de transição para a menopausa, classificada como climatério, fase em que os ovários começam a entrar em falência e a concentração de E₂ circulante diminui consideravelmente, induzindo a sintomas psíquicos e somáticos: a síndrome climatérica (ALVARADO-GARCÍA et al., 2015). Após determinado período, a grande redução na quantidade de folículos ovarianos leva a insuficiência ovariana e, com isso, a concentração plasmática de E₂ reduz significativamente, fase classificada como menopausa(TAKAHASHI; JOHNSON, 2015).

A menopausa é definida como a cessação natural da menstruação por no mínimo 12 meses, a qual a maioria das mulheres inicia por volta da quinta década de vida e está associada tanto ao evento ovariano como a alterações nos hormônios hipotalâmicos e hipofisários(TAKAHASHI; JOHNSON, 2015). Com o aumento da expectativa de vida, estima-se que mulheres viverão aproximadamente 40% de suas vidas na fase pós-menopausa (SNYMAN, 2014).

Em razão das ações de E₂ no organismo, à medida que suas concentrações diminuem, ocorrem diversas alterações no organismo feminino: elevam os riscos de osteoporose, doenças cardiovasculares, declínio cognitivo, atrofia urogenital, sintomas psiquiátricos e problemas sexuais (DALAL; AGARWAL; PRADESH, 2015). Dentre essas alterações, a osteoporose afeta consideravelmente o estilo de vida das mulheres sem ação estrogênica devido ao risco

elevado de fraturas. A prevalência de osteoporose aumenta com a idade das mulheres – de 2% aos 50 anos a mais de 25% aos 80 anos (CLYNES et al., 2020).

2.3 O metabolismo ósseo

Os ossos são órgãos ricos em minerais como cálcio, fósforo, flúor, enxofre, sódio, potássio e magnésio(DE VICTORIA, 2016). Dividem-se anatomicamente em cortical e trabecular, sendo o cortical mais sólido e compacto, presente na periferia dos ossos longos (por exemplo: fêmur e tíbia), na concha das vértebras e nas superfícies dos ossos planos(CLARKE, 2008). Já o osso trabecular apresenta uma estrutura esponjosa e consiste em placas e fios interconectados, sendo encontrado envolvendo a medula óssea e nas extremidades dos ossos longos e chatos, principalmente(ALMEIDA et al., 2017).

O osso não é um órgão inerte, mas um tecido dinâmico metabolicamente, que sofre adaptações morfofuncionais constante ao longo da vida(AN et al., 2016). Esse processo é denominado remodelamento ósseo e envolve reabsorção e formação óssea por células específicas presentes nesse tecido (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). As matrizes ósseas antigas são substituídas pelas recém-formadas continuamente, sendo importantes para manutenção do volume e força do tecido. As células ósseas são provenientes de células da linhagem osteoblástica e osteoclástica, sendo a diferenciação regulada por hormônios, como hormônio da paratireóide (PTH), E₂, vitamina D₃ e calcitonina, além de citocinas como a proteína morfogenética óssea (BMP), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e ativador de receptor do fator nuclear $\kappa\beta$ (RANKL)(NAKAMURA, 2007).

Os processos de osteogênese, modelagem e remodelação que ocorrem nos ossos, são mediados por osteoblastos e osteoclastos em íntima cooperação nas unidades básicas multicelulares (BMU)(HAUGE et al., 2001).Os osteoclastos estão localizados na frente de avanço das BMUs e fazem a reabsorção óssea. Os osteoblastos seguem atrás, preenchendo as cavidades com tecido recém-formado. Além disso, algumas células permanecem na matriz óssea recém-formada, denominadas osteócitos (MANOLAGAS, 2000). A osteogênese é caracterizada pela síntese de matriz óssea pelos osteoblastos, enquanto a modelagem é feita pelos osteoclastos, mudando a forma do osso para se adequar ao ambiente e crescimento do corpo (RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016).

Os osteoblastos representam 4 a 6% da população celular no tecido ósseo. São derivadas de células-tronco mesenquimais, que podem dar origem a linhagens de mioblastos,

osteoblastos, condrócitos ou adipócitos. Caracterizam-se por serem células mononucleares em formato cúbico, aderidas à matriz óssea no endóstio, camada de tecido conjuntivo que reveste a cavidade medular (ROEDER; MATTHEWS; KALAJZIC, 2017).

A diferenciação e formação de osteoblastos é regulada, principalmente, pelo fator de transcrição RUNX2. Uma vez ativado o RUNX2, os pré-osteoblastos passam por três estágios de diferenciação, sendo cada estágio caracterizado pela expressão de certos marcadores moleculares (ROEDER; MATTHEWS; KALAJZIC, 2017; RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016). No estágio um, sintetizam fibronectina, colágeno, receptor 1 do fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e osteopontina. No estágio dois, iniciam a diferenciação, amadurecendo a matriz extracelular (MEC) com fosfatase alcalina óssea (ALP) e colágeno tipo I. No terceiro e último estágio, a MEC é mineralizada pela secreção de osteocalcina, que promove a deposição de minerais e a formação de cristais de hidroxiapatita (AN et al., 2016). Após a formação da matriz, os osteoblastos podem sofrer apoptose, diferenciar-se em osteócitos ou tornar-se células de revestimento ósseo quiescentes (ROEDER; MATTHEWS; KALAJZIC, 2017; RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016).

Osteócitos são células maduras presentes nas lacunas ósseas. Representam o tipo celular mais abundante no osso (95%) (KLEIN-NULEND; BONEWALD, 2020). Em sua diferenciação, os osteoblastos perdem mais de 70% de suas organelas e citoplasma e adquirem longos processos do tipo dendrítico, dando-lhes aparência em estrela, os quais se estendem e permitem que os osteócitos comuniquem entre si pela MEC óssea ou com osteoblastos na superfície óssea, formando a rede osteocitária lacunar-canalicular, vinculados através de junções do tipo *gap* (KLEIN-NULEND; BONEWALD, 2020). Esse tipo celular participa do metabolismo ósseo recebendo os sinais de estresse mecânico através de filamentos de actina em seus processos e transduzindo-os via segundos mensageiros ou pela secreção de esclerostina. Localizam-se cercados pelo osso mineralizado, com citoplasma reduzido em relação ao núcleo (KATSIMBRI, 2017; SHAPIRO, 2001).

Células precursoras da linhagem monócito-macrófago são as responsáveis por dar origem aos osteoclastos (SIMS; MARTIN, 2020). O fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) é um fator crítico para a diferenciação, estimulando a sobrevivência das células progenitoras e induzindo a expressão de RANK (ANDERSEN et al., 2009). RANKL é sintetizado por células da linhagem de osteoblastos e participa da osteoclastogênese ao se

ligar ao RANK, expresso em células da linhagem de osteoclastos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). A osteoprotegerina (OPG) também participa da regulação da formação de osteoclastos, sendo uma citocina capaz de se ligar ao RANKL, impedir a ligação de RANK/RANKL e inibir a diferenciação de novos osteoclastos (BAUD'HUIN et al., 2013). A fusão entre as células é essencial na formação de osteoclastos: é uma célula grande e multinucleada capaz de secretar H^+ , Cl^- , catepsina K e metaloproteinases de matriz e degradar tecido ósseo, fazendo a reabsorção (ONO; NAKASHIMA, 2018).

2.4 Fosfatase Alcalina Óssea

A fosfatase alcalina óssea (ALP) é uma enzima com papel na formação óssea, presente na membrana plasmática dos osteoblastos, onde atua na mineralização de osteóides por degradação enzimática de pirofosfato, inibidor da mineralização, em pH alcalino (SHETTY et al., 2016). É utilizada na clínica como marcador bioquímico sérico para a formação de osteoblastos (VIEIRA, 1999).

ALP é um dos marcadores de formação óssea mais amplamente utilizados, ou seja, sua síntese é correlacionada positivamente com a taxa de formação óssea (MEDERLE et al., 2018). As concentrações de ALP são úteis para detectar alteração do tecido ósseo com sensibilidade e especificidade. É considerado um parâmetro útil na avaliação do estado esquelético e das alterações relacionadas à idade na renovação óssea (CHEN; LI; WANG, 2018).

2.5 Minerais ósseos

Na MEC inorgânica do tecido ósseo, destacam-se os cristais inorgânicos. Em conjunto com a matriz orgânica, ambas contribuem para o desenvolvimento e função normal do esqueleto, liberando moléculas que atuam na atividade das células ósseas, promovendo remodelação óssea (NEEL et al., 2016; SHARMA et al., 2019). Organismos com deficiência de E_2 apresentam alteração na distribuição dos minerais da matriz óssea, sendo a mineralização reduzida em pacientes com diminuição do tecido ósseo (NEEL et al., 2016; SHARMA et al., 2019).

A MEC confere ao osso características de rigidez e resistência. Sua matriz inorgânica consiste predominantemente em íons fosfato e cálcio, apesar de haver quantidades significativas de magnésio, bicarbonato, sódio, potássio, citrato, carbonato, fluorita, zinco,

bário e estrôncio (MCKEE; COLE, 2012). Os íons cálcio e fosfato se unem para formar cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), principal componente inorgânico do tecido (AN et al., 2016). A mineralização inicia-se com a formação dos cristais em vesículas, seguida pela propagação da hidroxiapatita através da membrana para a matriz extracelular, onde, juntamente com o colágeno, as proteínas não-colagenosas, capazes de se ligar ao cálcio e aos cristais, auxiliam na deposição da hidroxiapatita (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; FUJISAWA; TAMURA, 2012).

O cálcio (Ca) é um micronutriente obtido pela dieta e caracteriza-se por ser o mineral mais abundante no organismo humano, sendo importante para o esqueleto e dentes (HEANEY; RECKER; SAVILLE, 1977). Do cálcio no organismo, 99% se encontra nesses tecidos, majoritariamente, conjugado ao fósforo na forma de hidroxiapatita (AN et al., 2016). O hormônio paratireoide (PTH) e a vitamina D, em sua forma ativa, são essenciais para regulação da homeostase desse mineral (DE VICTORIA, 2016).

Além do cálcio, o fósforo inorgânico (Pi) é um nutriente essencial na saúde humana e cumpre funções essenciais no organismo, incluindo papéis estruturais nas membranas celulares, no metabolismo energético, no equilíbrio ácido/base, na sinalização intracelular e no material genético (SHAO et al., 2019). É encontrado, porém, em maior concentração nos ossos (85% do fósforo de todo o organismo) na forma de hidroxiapatita (MCKEE; COLE, 2012). A deficiência de fósforo resulta em raquitismo e crescimento atrofiado em crianças, além de osteomalacia, uma condição na qual há desmineralização de ossos maduros em adultos (VORLAND et al., 2017).

O magnésio (Mg) representa um cofator importante para as enzimas que participam da síntese da matriz óssea (GLASDAM; GLASDAM; PETERS, 2016). Uma baixa concentração de magnésio (hipomagnesemia) pode influenciar diretamente as células ósseas, que formam cristais anormais de apatita. Indiretamente, essa alteração também pode interferir na secreção da glândula paratireoide e induzir inflamação de baixo grau, o que acelera a perda óssea (MEDERLE et al., 2018).

2.6 Perda de tecido ósseo

A diminuição da densidade (massa/volume) e deterioração da microestrutura do tecido ósseo leva a uma alteração óssea designada osteopenia e caso esta diminuição e deterioração óssea aumente, ocorre a osteoporose (GENANT et al., 1999). Na osteoporose, os ossos

tornam-se menos resistentes, pois a quantidade de tecido ósseo é menor, com maiores canais de reabsorção e menor mineralização, logo, a quantidade de cálcio se torna menor (AMADEI et al., 2006).

Na osteoporose, há perda significativa de tecido ósseo e, conseqüentemente, do cálcio presente no tecido, diminuindo a dureza óssea e aumentando o risco de fraturas, podendo levar ao quadro de hipocalcemia (SNYMAN, 2014). Uma redução na densidade mineral óssea (DMO) está altamente relacionada a redução da quantidade de cálcio (LEWIECKI, 2018). Além disso, baixas concentrações séricas de Mg podem estar associados a um risco aumentado de osteoporose (MEDERLE et al., 2018). A diminuição na DMO acarreta em menor força mecânica e maior risco de fraturas (GLASER; KAPLAN, 1997).

A osteoporose é uma das alterações metabólicas ósseas mais comuns e significativas na mulher na pós-menopausa, sendo a diminuição de E_2 nesse período o fator determinante para o desenvolvimento da doença (PACIFI, 2001). Essa situação atinge uma em cada quatro mulheres na pós-menopausa e, após os 65 anos, uma em cada três, que podem perder cerca de 40%-50% da massa óssea até o final da vida (AMADEI et al., 2006). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define osteoporose como uma DMO 2,5 erros padrão abaixo do valor médio para mulheres jovens e saudáveis (score $T < -2,5 DP$) (SÖZEN; ÖZİŞIK; BAŞARAN, 2017).

2.7 Interação estrogênio e sistema ósseo

Durante a pré-puberdade, o crescimento ósseo depende principalmente do hormônio do crescimento hipofisário (GH), que estimula a produção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), conseqüentemente, a síntese e deposição de proteínas pelas células osteogênicas, havendo, assim, aumento da matriz óssea (LOCATELLI; BIANCHI, 2014). Com o rápido aumento hormônios sexuais durante a puberdade, ocorre o estímulo de formação óssea por E_2 e testosterona e o fechamento das placas de cartilagem nas extremidades dos ossos longos, para que se tenha o fim do crescimento ósseo (TETI, 2011).

E_2 possui ação crucial na homeostase do tecido ósseo, sua depleção após a menopausa é a principal causa de perda óssea, podendo levar a osteoporose (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012). Eriksen e colaboradores (1988) descreveram pela primeira vez a presença de ERs em osteoblastos (ERIKSEN et al., 1988). Apesar destes receptores estarem principalmente em osteoblastos, a função efetora desse hormônio no tecido ósseo é principalmente na reabsorção óssea. A ligação de E_2 ou seus análogos aos ERs dos

osteoblastos inibe a liberação de fatores que estimulam osteoclastos, que serão abordados com detalhes posteriormente (AMADEI et al., 2006).

Em humanos e roedores, E₂ é capaz de suprimir a reabsorção óssea nas superfícies trabeculares e endocorticais, através da ligação com ER α , ER β e GPER1. Esta ação hormonal é capaz de diminuir a diferenciação de osteoclastos e estimular apoptose, podendo agir direta ou indiretamente nas células da linhagem de osteoclastos (WARDELL; MCDONNELL; NELSON, 2013). E₂ tem efeito direto nos osteoclastos, diminuindo a reabsorção óssea, assim, a redução desse hormônio resulta em maior atividade metabólica óssea e, conseqüentemente, maior ritmo na remodelação e perda óssea (MUHAMMAD et al., 2018). Indiretamente, E₂ atua por meio da limitação osteoblastogênica, restringindo a modulação óssea. Com a redução da concentração de E₂ e diminuição da regulação no tecido ósseo, há desequilíbrio na quantidade de osteoblastos e estímulo de remodelação óssea, conseqüentemente, há uma maior expressão de fatores osteoclastogênicos a partir destes osteoblastos, desviando o metabolismo ósseo em direção à reabsorção (MARTIN-MILLAN et al., 2010). A perda óssea causada pela depleção de E₂ ocorre devido ao desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea, ou seja, a quantidade de osteoclastos se torna maior do que a de osteoblastos e há maior reabsorção (figura 1) (MIYAMOTO, 2015).

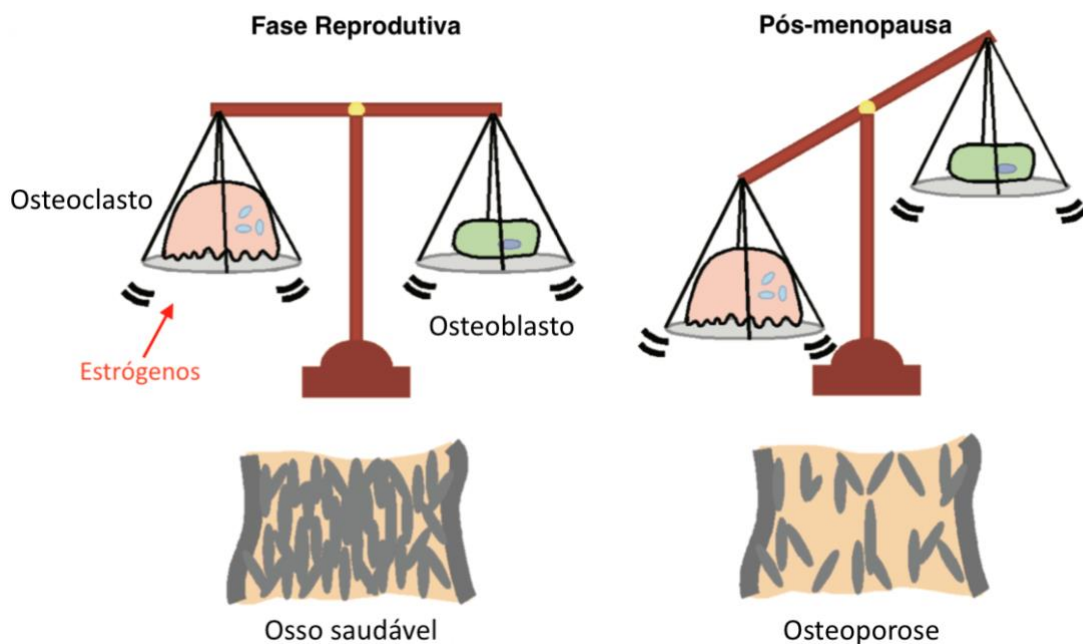


Figura 1. Representação do desequilíbrio entre a quantidade de osteoblastos e osteoclastos após a menopausa, em comparação à fase reprodutiva. Após a menopausa, a reabsorção óssea se torna maior do que a formação. Adaptado de MIYAMOTO, 2015.

E_2 é o principal estrogênio durante o crescimento ósseo em jovens tanto do sexo feminino, quanto do masculino (FUENTES; SILVEYRA, 2019). Essa afirmação foi observada em homens com deficiência de ER ou da enzima aromatase, responsável por converter testosterona em estradiol, os quais apresentavam casos de epífises abertas e déficits ósseos profundos (BILEZIKIAN et al., 1998; SMITH et al., 1994). O tratamento com reposição estrogênica foi capaz de reverter o quadro em homens com deficiência de aromatase, demonstrando a ação do hormônio no tecido ósseo (BILEZIKIAN et al., 1998). Além disso, há aumento de reabsorção óssea e ativação de novas BMUs devido à depleção de E_2 , (HEANEY; RECKER; SAVILLE, 1977; MARCUS, 2002).

RANKL é expresso nos osteoblastos, e a ligação do RANKL ao receptor RANK, expresso pelo precursor de osteoclasto, resulta na diferenciação do último, prolongando sua atividade (ANDERSEN et al., 2009). E_2 é capaz de suprimir a expressão de RANKL nos osteoblastos, diminuindo, assim, a formação dos osteoclastos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Além disso, também diminui a expressão de citocinas de reabsorção óssea, como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (MUHAMMAD et al., 2018; PACIFI, 2001). A depleção de E_2 também aumenta a expressão de interleucina-7 (IL-7) na medula óssea, citocina que eleva a expressão de RANK nos osteoclastos (USUI et al., 2004).

A interação entre RANKL presentes nos osteoblastos e RANK expresso pelos osteoclastos é essencial para a diferenciação de novos osteoclastos. Essa interação é contra-regulada por uma proteína secretada pelos osteoblastos, denominada osteoprotegerina (OPG). Tal molécula tem o papel de impedir a ligação do RANK ao seu ligante e, conseqüentemente, impedir a formação de osteoclastos (GALLIERA; ROMANELLI, 2018). E₂ não só diminui a síntese de RANKL, mas também estimula as células a produzirem OPG, como outro mecanismo de osteoproteção (FLORENCIO-SILVA et al., 2015a).

Além disso, o tecido ósseo é capaz de responder à estimulação mecânica: a massa, a forma e a microarquitetura se adaptam às tensões mecânicas, sendo os osteócitos responsáveis por essa resposta adaptativa (KATSIMBRI, 2017). Os ERs são amplamente expressos nos osteócitos e a ação estrogênica prolonga sua vida útil, influenciando na participação da regulação da remodelação óssea (MA et al., 2008). Além dos efeitos diretos nas células ósseas, a depleção de E₂ também promove diminuição da responsividade das células osteoblásticas à estimulação mecânica, potencializando o efeito na apoptose dos osteócitos (MANOLAGAS; BRIEN; ALMEIDA, 2014).

A diferenciação de osteoblastos a partir das células precursoras depende do fator de transcrição RUNX2 (RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016). Camundongos *knock-out* para o gene desse fator não possuem osteoblastos (ROEDER; MATTHEWS; KALAJZIC, 2017). Esse fator atua indiretamente na osteoclastogênese dependente de osteoblastos, via RANKL (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). E₂ via ER α demonstra efeitos inibitórios ao RUNX2 presentes no osteoblastos, o que indica outro mecanismo osteoprotetor (AMZALEG et al., 2018).

Hayashi e colaboradores demonstraram que Sema3A, uma proteína membro da família de proteínas da semaforina, é capaz de desempenhar papel osteoprotetor importante, suprimindo a reabsorção óssea osteoclástica e promovendo a formação óssea (HAYASHI et al., 2012). Sema3A apresenta associação positiva entre osteocalcina (LIU et al., 2014), e alteração no complexo receptor de Sema3A está relacionado com baixa densidade mineral óssea e um risco aumentado de fratura em mulheres na pós-menopausa, o que indica a importância da proteína no metabolismo ósseo (HWANG et al., 2006). A concentração de Sema3A é menor após a menopausa, e E₂ aumenta a expressão da proteína através da supressão de microRNAs (reguladores pós-transcricionais importantes) direcionados à região

não traduzida da proteína, exercendo, portanto, outro efeito osteoprotetor (HAYASHI et al., 2019).

O endósteo e as áreas de crescimento da epífise são áreas hipóxicas, e o fator indutível 1 da hipóxia alfa (HIF1 α) regula a função de osteoblastos e homeostase nessas regiões, sendo considerado o principal regulador transcricional da resposta celular à hipóxia (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2016). A proteína HIF1 α é superexpressa em osteoclastos de camundongos ovariectomizados (OVX), indicando que a deficiência de E₂ promove seu acúmulo, levando à ativação de osteoclastos e subsequente perda óssea (MAES; CARMELIET; SCHIPANI, 2012).

2.8 Terapia de reposição hormonal

O uso de hormônios sintéticos, denominado terapia de reposição hormonal (TRH), é a primeira opção de escolha para problema decorrentes a falta de ação estrogênica, porém há restrições, incluindo risco de desenvolvimento de câncer de mama responsivos a E₂ (BRIOT; ROUX, 2015; HSU; CHU; KAO, 2017).

A terapia hormonal na menopausa alivia ondas de calor e suores noturnos e é capaz de reduzir a perda óssea e o risco de fraturas (JOANN; PINKERTON, 2020). Apesar de parecer promissora, um estudo do tipo caso-controle em 1993 nos Estados Unidos, com 16 mil mulheres na pós-menopausa, *Women's Health Initiative* (WHI), demonstrou que mulheres que receberam hormônio estrogênico conjugado equino (ECE/ 0,625 mg) e acetato de medroxiprogesterona (AMP/ 2,5 mg), apresentaram casos de doenças cardiovasculares, tromboembolismo venoso e câncer de mama. E mesmo após três anos da interrupção da terapia, essas mulheres ainda apresentaram risco elevado de desenvolverem câncer (HEISS et al., 2008).

O tratamento da osteoporose na pós-menopausa é justificado em mulheres com alto risco de fratura e em caso de recorrência, devido às consequências em termos de morbidade e custo que algumas fraturas podem ter (STEVENSON, 2005). O tratamento hormonal se mostrou eficaz em reduzir a perda óssea, porém eleva os riscos do desenvolvimento de câncer de mama, doença com prevalência entre as mulheres na pós-menopausa (KALDER; HADJI, 2014). E₂ é capaz de estimular a proliferação celular, associado ao risco de câncer de mama: o risco, a incidência e a gravidade do câncer nas mulheres pós-menopausa está associado a fatores que incluem a terapia de reposição hormonal (MUHAMMAD et al., 2018).

Devido à isso, é importante estudar um tratamento alternativo, os quais os fitoestrógenos tem ganhado destaque, pois estão presente em alimentos funcionais e plantas medicinais e mimetizam a ação estrogênica se ligando ao seus receptores (GERBARG; BROWN, 2016).

2.9 Fitoestrógenos

Fitoestrógenos são metabólicos secundários polifenólicos, proveniente de plantas e alguns alimentos, que se assemelham estruturalmente ao E₂(figura 2) (RIETJENS; LOUISSE; BEEKMANN, 2017). São capazes de se ligar aos ERs e ter efeitos agonistas ou antagonistas, dependendo do sítio de atuação (FU et al., 2014; PETRINE; DEL BIANCO-BORGES, 2020). Existem três classes principais de fitoestrógenos encontrados na dieta: isoflavonas, como daidzeína e genisteína, encontradas em soja e seus produtos; lignanas, que dão origem ao enterodiol e enterolactona, presentes em sementes; e cumestanas, encontradas em brócolis e brotos (LAGARI; LEVIS, 2010).

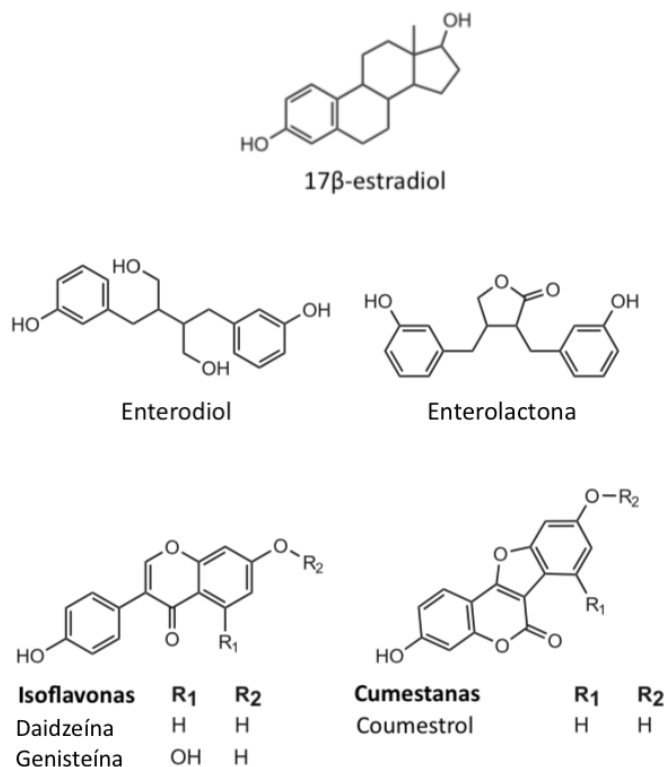


Figura 2. Estrutura do 17β-estradiol e dos principais fitoestrógenos. Adaptado de RIETJENS; LOUISSE; BEEKMANN, 2017.

O mecanismo de ação mais bem caracterizado dos fitoestrógenos é sua capacidade se ligar aos ERs. A maioria dos fitoestrógenos, incluindo as isoflavonas, ligam-se e ativam ERα e ERβ, onde atuam como moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), ou seja,

podem ter ações agonistas ou antagonistas, em tecidos específicos, de acordo com o ER e o perfil das proteínas co-ativadoras e co-repressoras presentes na célula (ANDERSON; GAMER; HILL, 1997; LAGARI; LEVIS, 2013). As isoflavonas se ligam mais eficientemente ao ER β , devido à semelhança estrutural com o 17 β -estradiol. Isso reflete na sua funcionalidade pelo organismo, evidente nos locais que expressam tal receptor, incluindo ossos, sistema cardiovascular e útero (PATISAUL; JEFFERSON, 2010). Além disso, fitoestrógenos como flavonas, isoflavonas, lignanas, cumestanas, saponinas e estilbenos também são capazes de ativar GPER1 (XU et al., 2019).

Os fitoestrógenos são capazes de atuar em várias etapas do processo reprodutivo (SIROTKIN, 2014). A genisteína pode estimular a liberação de progesterona nos ovários, produção de estradiol, maturação de oócitos e o desenvolvimento de zigotos (JEFFERSON; WILLIAMS, 2011). As isoflavonas podem alterar o desenvolvimento sexual, promovendo alterações na puberdade, no ciclo estral e na função ovariana (CEDERROTH; ZIMMERMANN; NEF, 2012). Os fitoestrógenos também podem diminuir os sintomas da menopausa, como por exemplo, a administração de 100 mg de isoflavonas por dia foi capaz de reduzir os sintomas vasomotores, sem aumentar o risco de coagulação ou afetar a mama e o endométrio, o que faz com que sejam uma potencial alternativa à TRH (DESMAWATI; SULASTRI, 2019).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é legalizado desde 2000, desde que orientado seu uso e comercialização (ANVISA, 2010). Para reposição hormonal, quatro plantas tem autorização de uso pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): *Glycine max* L. (Soja), *Trifolium pratense* L. (Trevo vermelho), *Vitex agnus-castus* L. (Agno-casto) e *Cimicífuga racemosa* L. (Cimicífuga) (ANVISA, 2018). Apesar de haver poucos estudos na literatura, também é comum o uso popular de chá de folhas de amora (*Morus nigra* L.) para amenizar os sintomas decorrentes da diminuição da ação estrogênica com no climatério e menopausa(SILVA, 2012).

Em comparação com a população ocidental, a população asiática geralmente consome maiores quantidades de produtos de soja (POLUZZI et al., 2014). Sugere-se que, devido a isso, as mulheres asiáticas têm menor incidência de sintomas de menopausa e osteoporose em comparação com mulheres ocidentais. Porém, é possível que as isoflavonas derivadas da soja possam estimular o crescimento de tumores de mama já presentes, sensíveis a E₂ (NIKANDER et al., 2004).

Há estudos baseados nos fitoestrógenos presentes na soja, em que foi observado redução da reabsorção óssea nas pacientes (ARCORACI et al., 2017; MESSINA; WOOD, 2008; NIKANDER et al., 2004). Experimentos *in vivo*, com ratas OVX, usando extrato da semente do feno-grego (*Trigonella foenumgraecum*), e *in vitro*, com osteoblastos, fazendo uso do fitoestrógeno β -ecdysone presente na *Tinospora cordifolia*, também obtiveram resultados positivos quanto à redução da reabsorção óssea e aumento da formação óssea (ABIRAMASUNDARI; MOHAN GOWDA; SREEPRIYA, 2018; ANJANEYULU et al., 2018).

A soja é alimento rico em isoflavonas, genisteína e daidzeína. Daidzeína e genisteína são hidrolisadas em suas formas agliconas por bactérias intestinais. A daidzeína é metabolizada em equol, um composto com maior atividade estrogênica (SIROTKIN, 2014). *In vitro*, as isoflavonas demonstram capacidade de estimular a atividade osteoblástica e atuar na regulação da atividade osteoclástica. Em estudos com animais OVX, isoflavonas de soja demonstram prevenir a perda óssea (LAGARI; LEVIS, 2010).

O consumo diário de 200 mg/kg de equol, em ratas OVX, por 8 semanas aumentou a concentração de cálcio femoral, além de ter aumentado o peso do útero em relação aos animais que não receberam tratamento (LEGETTE et al., 2009). Em humanos, a administração de leite de soja, rico em isoflavonas, por 2 anos, foi capaz de aumentar 2,4% a densidade mineral óssea em mulheres pós-menopausa (LIU et al., 2009). As isoflavonas presentes na soja podem aumentar a DMO, provavelmente, estimulando a síntese de osteoblastos e regulando a formação de osteoclastos, efeito obtido pelo consumo a longo prazo (DESMAWATI; SULASTRI, 2019).

Alguns fitoestrógenos são destacados na literatura pela sua ação antiosteoporótica. O flavonoide rutina, as isoflavonas, o coumestrol e alguns precursores de lignana (lariciresinol, matairesinol, pinoresinol e secoisolariciresino) são capazes de inibir a formação de osteoclastos e reduzir a concentração de marcadores de reabsorção óssea, demonstrado atividade semelhante à estrogênica (IVANOVA et al., 2015).

Estudos com alimentos funcionais e fitoestrógenos administrados em ratas ovariectomizadas, demonstraram efeitos benéficos no metabolismo ósseo: os polifenóis presentes no chá verde foram capazes de aumentar a DMO em animais OVX, provavelmente interferindo na atividade de osteoblastos e osteoclastos (SHEN et al., 2008,

2009). Hesperidina, um glicosídeo flavonona encontrado em frutas cítricas, foi capaz de aumentar a DMO e a força femoral nas ratas OVX, possivelmente influenciando a sinalização via RANK/RANKL (HORCAJADA et al., 2008). Licopeno, um carotenoide, aumentou a DMO e diminuiu a concentração sérica de CTx, cálcio e fósforo, além de diminuir a quantidade de IL-6 plasmática, interleucina capaz de promover a diferenciação de precursores de osteoclastos (LIANG et al., 2012).

A linhaça e amoreira-preta são alimentos que possuem grandes quantidades de compostos fenólicos, dentre eles os fitoestrógenos, e alta atividade antioxidante sendo assim, importantes para o estudo de potenciais alternativas para a prevenção e tratamentos de osteopenia e osteoporose devido à diminuição da concentração de E₂ no organismo (PARIKH; NETTICADAN; PIERCE, 2020; PETRINE; DEL BIANCO-BORGES, 2020, 2020; SILVA, 2012).

2.9.1 Linhaça (*Linum usitatissimum*)

A linhaça é a semente do linho (*Linum usitatissimum*), planta herbácea da família Linaceae, nativa da Europa, Ásia e Região Mediterrânea. Apresenta-se em forma pequena, plana e oval, com pontas pontiagudas e varia da cor marrom ao amarelo (dourado). Sua produção é voltada principalmente para produção de linho de fibra e comercialização das sementes. As sementes são cultivadas para consumo humano e animal e seu óleo pode ser consumido ou usado na fabricação de tintas, vernizes, linóleo, entre outros (SINGH et al., 2011).

A linhaça é considerada um superalimento e fonte segura de vitaminas, minerais, proteínas e peptídeos, lipídios, carboidratos, lignanas e fibra alimentar (BEKHIT et al., 2018). Alguns desses componentes, como os lipídios, lignanas e as fibras da semente, apresentam benefícios ao organismo, com ações hipolipidêmicas, antiaterogênicas e insulinêmicas pós-prandiais, anticolesterolêmicas e anti-inflamatórias. Suas proteínas e peptídeos possuem, ainda, propriedade antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e modulatória do sistema imunológico (KWESI et al., 2018).

A semente de linhaça contém grande quantidade de ácidos graxos essenciais de fonte vegetal e, por isso, vem sendo muito utilizada como alimento funcional. Possui diversos compostos bioativos, incluindo ácido α -linolênico (ALA), lignanas, peptídeos cíclicos, glicosídeos cianogênicos (CGs), proteínas do linho e fibras solúveis e insolúveis (SHIM et al.,

2014). Seu revestimento caracteriza-se por ser rico em um tipo de lignana denominado secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG). Uma vez ingeridos, esses compostos são metabolizados pela microbiota intestinal em lignanas bioativas livres: enterolactona e enterodiol (PARIKH; NETTICADAN; PIERCE, 2020).

As lignanas da linhaça são estruturalmente semelhantes ao E₂, descritas como reguladoras endócrinas (CORRÊA et al., 2017). Algumas lignanas, incluindo enterolactona e enterodiol, são capazes de estimular a produção de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), o que resulta em diminuição de testosterona e estradiol livre, reduz a taxa de depuração metabólica dos esteroides e prolonga sua atividade biológica nas células (ADLERCREUTZ, 2007). Tanto enterolactona quanto enterodiol apresentam ativação transcricional após ativação do ER α , porém o enterodiol demonstra melhor efeito ligado ao ER β , tão potente quanto E₂ (CARREAU; FLOURIOT; BENNETAU-PELISSERO, 2008).

O consumo de linhaça inibe o crescimento do tumor mamário e reduz a concentração de marcadores bioquímicos precoces de risco para câncer de mama (VIRK-BAKER; NAGY; BARNES, 2013). A ingestão da semente de linhaça tem sido proposta como quimioprotetora, devido ao potencial de influenciar a concentração de E₂. Quando metabolizado, o estradiol dá origem ao 2-OHEstrogen1 (2-OHE1) (FISHMAN; GALLAGHER; BRADLOW, 1960). Este é considerado quimioprotetor devido à capacidade de diminuir o crescimento e proliferação de células tumorais da mama e estimular a produção de SHBG. A suplementação diária com linhaça em mulheres pré-menopausa demonstrou aumento significativo de 2-OHE1 (HAGGANS et al., 2000).

A linhaça possui SDG, ALA o ácido graxo poli-insaturado n-3 (PUFA n-3), compostos com potencial em melhorar a saúde óssea e atenuar doenças como câncer de mama, resultado observado em estudo com camundongos xenoenxertados com câncer de mama humano tratados com dieta suplementada com 10% de semente de linhaça moída (WATKINS; LI; SEIFERT, 2006). Os metabólitos da lignana, ao serem consumidos, podem desempenhar ação estrogênica no organismo, enquanto os metabólitos do ALA (ácido eicosapentaenóico e docosahexaenóico) atenuam a expressão de citocinas envolvidas na osteoclastogênese, que incluem o RANKL e TNF- α (SACCO et al., 2014). Além disso, os metabólitos ALA também são capazes de atuar nos osteoblastos aumentando a expressão de osteocalcina e, conseqüentemente, aumentando a diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos maduros (MAÍRA et al., 2018). A proteína vegetal presente na linhaça pode,

também, diminuir a desmineralização óssea através da redução de ácidos orgânicos e da acidose metabólica (PESSANHA et al., 2016). Devido a essas atividades biológicas, a semente de linhaça tem potencial ação protetora contra a perda óssea ocasionada pela depleção de E₂, como ocorre na pós-menopausa.

2.9.2 Amoreira-preta (*Morus nigra* L.)

Conhecida como amoreira-preta, a *Morus nigra* L. (*M. nigra*) pertence à família Moraceae e é nativa do sudoeste da Ásia, apesar de hoje ser cultivada em toda a Europa e Mediterrâneo. No Brasil, a espécie se adaptou muito bem ao clima tropical e subtropical (CAVALCANTE; SILVA, 2012). Suas folhas são utilizadas como fonte de nutrientes para bichos-da-seda e seus frutos, amoras-pretas, como matérias-primas para a preparação de compotas, marmeladas, vinagres, sucos, vinhos e cosméticos. Além disso, alguns de seus compostos bioativos são usados como fitoterápicos devido a seus efeitos analgésicos e, principalmente, anti-inflamatórios (LIM; CHOI, 2019).

Apesar do seu efeito terapêutico ser devido principalmente a ações anti-inflamatórias, outras atividades como: antinociceptiva, antimicrobiana, antimelanogênica, antidiabética, antiobesidade, antiperlipidêmica e anticâncer foram encontradas na amoreira-preta. Isso a permite ser um potencial recurso nutracêutico promissor para controlar e prevenir enfermidades (LIM; CHOI, 2019).

O gênero *Morus* é conhecido por conter uma variedade de compostos fenólicos incluindo flavonóides, cumarinas, cromonas, xantonas e fitoalexinas (SILVA, 2012). Na medicina popular, os frutos, as folhas e as cascas da amoreira-preta são usados pelos seus efeitos benéficos ao organismo (LIM; CHOI, 2019). Suas folhas são utilizadas tradicionalmente para fins terapêuticos como no tratamento de diabetes, hipercolesterolemia, menopausa e obesidade (ZENI et al., 2017). O chá das folhas da amoreira-preta (infusão ou decocção) é popularmente utilizado para alívio dos sintomas do climatério como, por exemplo, redução das sensações de calores (MIRANDA et al., 2010).

Em estudo do extrato de *M. nigra* por cromatografia gasosa, alguns componentes foram comparados com a isoflavona, apresentando picos semelhantes. Assim, conclui-se por meio dessa análise, que o extrato metanólico das folhas de *Morus nigra* L. apresenta características semelhantes ao 17 β -estradiol (BOLZAN, 2008; SILVA, 2012). Estudo *in vivo* com *Morus alba* L., demonstrou aumento de E₂ e progesterona (P₄) e redução de FSH e LH

séricos, recuperando a atrofia uterina nos animais ovariectomizados (BOLZAN, 2008; SILVA, 2012).

Plantas ricas em flavonóides apresentam papel positivo no tratamento antitumoral, anti-inflamatório, antioxidante, anti-hemorrágico e hormonal (GUIZZO et al., 2015). As isoflavonas presentes na amoreira-preta são fitoestrógenos capazes de desempenhar um papel positivo como tratamento hormonal, com potencial de se ligar aos ERs presente nas células dos ossos e regular seu metabolismo (MORITO et al., 2001). Em estudo de regeneração óssea com ratos fraturados, a ingestão do chá de amoreira-preta foi capaz de induzir melhor regeneração nos ossos dos animais, em comparação aos animais não tratados, demonstrando efeito osteogênico, provavelmente estimulando fatores anti-osteoclastogênicos, como osteoprotegerina, e aumentando a atividade osteoblástica (COSTA et al., 2019).

A concentração total de flavonoides na *M. nigra* são maiores que em outras espécies do mesmo gênero como *M. alba* e *M. rubra*, inclusive em suas folhas (KHALIFA et al., 2018; SANCHES-SALCEDO et al., 2015). Em estudo randomizado, duplo-cego com mulheres na pós-menopausa, observou-se que, após 60 dias de tratamento com pó da folha de *M. nigra* (250 mg), essas mulheres obtiveram melhoras em alguns sintomas da menopausa como ondas de calor, insônia e fadiga. Esse efeito provavelmente se dá devido à presença de flavonóides prenilados presentes nas plantas da família Moraceae, um potente fitoestrógeno (COSTA et al., 2020; SANCHES-SALCEDO et al., 2015; ŠTULÍKOVÁ et al., 2018).

Sendo assim, a linhaça e amoreira demonstram possuem substâncias capazes de atuar reduzindo e/ou prevenindo os efeitos causados ao organismo pela falta de ação estrogênica, podendo ser potenciais candidatas a substituição ou redução do uso de terapia de reposição hormonal, no tratamento de sintomas, incluindo a osteopenia ou osteoporose.

3. RESULTADOS

Ratas Wistar ovariectomizadas foram tratadas com extrato aquoso de linhaça e/ou amoreira-preta e variáveis ósseas foram analisados. Os resultados obtidos pela quantificação da atividade de fosfatase alcalina óssea plasmática, contagem das células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) em lâminas histológicas coradas com HE, composição óssea de minerais, e alterações morfométricas foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) à 5% de significância estatística no programa R e a normalidade das distribuições avaliada por

Shapiro-Wilk. Os gráficos dos resultados foram gerados no programa GraphPadPrism 5.0. Os animais tratados com estrógeno (controle positivo), extratos de linhaça, amoreira e linhaça + amoreira, demonstraram menor perda óssea em comparação aos tratados com salina, com parâmetros morfométricos, celulares e plasmáticos aprimorados.

Assim, os dados do presente trabalho corroboram com dados da literatura e sugerem que a suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira podem prevenir a perda óssea causada pela falta de ação estrogênica em ratas ovariectomizadas, indicando um potencial terapêutico.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados do presente trabalho corroboram com dados da literatura e sugerem que a suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira podem prevenir a perda óssea causada pela falta de ação estrogênica em ratas ovariectomizadas, indicando um potencial terapêutico. Os resultados sugerem que os extratos exerceram efeitos protetores no metabolismo ósseo de animais sem ação estrogênica, ações essas observadas nas alterações morfométricas, histológicas e na quantificação da atividade de fosfatase alcalina óssea e minerais, com resultados benéficos para saúde óssea em relação aos animais que receberam apenas salina. Assim sugere-se que a suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira possa prevenir a perda óssea causada pela falta de ação estrogênica em ratas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIRAMASUNDARI, G.; MOHAN GOWDA, C. M.; SREEPRIYA, M. Selective Estrogen Receptor Modulator and prostimulatory effects of phytoestrogen β -ecdysone in *Tinospora cordifolia* on osteoblast cells. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 9, n. 3, p. 161–168, 2018.
- ADLERCREUTZ, H. Lignans and Human Health. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 44, n. 5–6, p. 483–525, 2007.
- AKBULUT, M.; ÖZCAN, M. M. Comparison of mineral contents of mulberry (*Morus spp.*) fruits and their pekmez (boiled mulberry juice) samples. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 3, p. 231–239, jan. 2009.
- ALMEIDA, M. et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. **Physiol Rev.**, v. 97, n. 1, p. 135–187, 2017.
- ALVARADO-GARCÍA, A. et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and treatment of postmenopausal and perimenopausal. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**, v. 53, n. 2, p. 214–225, 2015.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006.
- AMZALEG, A. Y. et al. Estrogens and selective estrogen receptor modulators differentially antagonize Runx2 in ST2 mesenchymal progenitor cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 183, p. 10–17, 2018.
- AN, J. et al. Mineralization processes in hard tissue: Bone. In: **Osteoporosis**. [s.l: s.n.]. p. 235–255.
- ANDERSEN, T. L. et al. A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 239–247, jan. 2009.
- ANDERSON, J. J. B.; GAMER, S. C.; HILL, C. The effects of phytoestrogens on bone. **Nutrition Research**, v. 17, n. 10, p. 1617–1632, 1997.
- ANJANEYULU, K. et al. Beneficial Role of Hydro-alcoholic Seed Extract of *Trigonella foenum graecum* on Bone Structure and Strength in Menopause Induced Osteopenia. **Ethiopian journal of health sciences**, v. 28, n. 6, p. 787–794, 2018.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acesso em: 30 dez. 2020.
- ANVISA. Formulário de Fitoterápicos. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1ª edição, p. 157, 2018.
- ARCORACI, V. et al. Antiosteoporotic activity of genistein aglycone in postmenopausal women: Evidence from a post-hoc analysis of a multicenter randomized controlled trial. **Nutrients**, v. 9, n. 2, 2017.
- BAKKER, C. M. J. DE et al. Structural Adaptations in the Rat Tibia Bone Induced by Pregnancy and Lactation Confer Protective Effects Against Future Estrogen Deficiency Chantal. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 12, p. 2165–2176, 2018.
- BALDOCK, P. A. J. et al. Discordance Between Bone Turnover and Bone Loss: Effects of Aging and Ovariectomy in the Rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 8, p. 1442–1448, 1999.
- BAUD'HUIN, M. et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 5, p. 401–409, 2013.
- BEKHIT, A. E. A. et al. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Flaxseed: Composition , detoxification , utilization, and opportunities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 129–152, 2018.

- BHATTARAI, T. et al. Correlation of common biochemical markers for bone turnover, serum calcium, and alkaline phosphatase in post-menopausal women. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 58–61, 2014.
- BILEZIKIAN, J. P. et al. Increased Bone Mass as a Result of Estrogen Therapy in a Man with Aromatase Deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 9, p. 599–603, 1998.
- BOLZAN, V. C. **EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DA *Morus nigra* SOBRE A CITOLOGIA VAGINAL E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS EM RATAS WISTAR**. [s.l.] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2008.
- BOULBAROUD, S. et al. Preventive Effects of Flaxseed and Sesame Oil on Bone Loss in Ovariectomized Rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 13, p. 1696–1701, 15 jun. 2008.
- BRIOT, K.; ROUX, C. Post-menopausal osteoporosis: Up-to-date. **Rev Med Interne**, v. 5067, p. 6–11, 2015.
- CARLSON, B. M. The Endocrine System. In: **The Human Body**. [s.l.: s.n.]. p. 241–269.
- CARREAU, C.; FLOURIOT, G.; BENNETAU-PELISSERO, C. Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER α transcriptional activation in human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 110, p. 176–185, 2008.
- CASTRO, L. A. S. DE. Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura. **Embrapa Clima Temperado**, p. 37p, 2001.
- CAULEY, J. A.; CRANDALL, C. The Women's Health Initiative: A Landmark Resource for Skeletal Research Since 1992. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 35, n. 5, p. 845–860, maio 2020.
- CAVALCANTE, C. F. E.; SILVA, C. P. DA. EFEITOS DAS FOLHAS, CASCAS, RAÍZES E FRUTOS DA AMOREIRA (*Morus Nigra* L.) UTILIZADOS COMO FITOTERÁPICO NA MEDICINA POPULAR. **Conexão**, p. 1–4, 2012.
- CEDERROTH, C. R.; ZIMMERMANN, C.; NEF, S. Molecular and Cellular Endocrinology Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, n. 2, p. 192–200, 2012.
- CHAPPARD, D. et al. Trabecular bone microarchitecture: A review. **Morphologie**, v. 92, p. 162–170, 2008.
- CHEN, F. et al. Flaxseed oil ameliorated high-fat-diet-induced bone loss in rats by promoting osteoblastic function in rat primary osteoblasts. **Nutrition & Metabolism**, v. 16, n. 71, p. 1–13, 2019.
- CHEN, H.; LI, J.; WANG, Q. Associations between bone-alkaline phosphatase and bone mineral density in adults with and without diabetes. **Medicine**, v. 97, n. 17, p. 1–7, 2018.
- CHEUNG, A. M. et al. Perimenopausal and Postmenopausal Health. **BMC Women's Health**, v. 14, p. 1–14, 2004.
- CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. Supplement 3, p. S131–S139, nov. 2008.
- CLYNES, M. A. et al. The epidemiology of osteoporosis. **British Medical Bulletin**, p. ldaa005, 13 abr. 2020.
- COHEN, S. L.; WARD, W. E. Flaxseed Oil and Bone Development in Growing Male and Female Mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 68, n. 21, p. 1861–1870, nov. 2005.
- CORRÊA, L. B. N. S. et al. Influence of prolonged flaxseed (*Linum usitatissimum*) consumption over epididymis and testicle histoarchitecture of Wistar rats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 650–656, 2017.

- COSTA, J. C. et al. Effects of *Morus nigra* L. in Bone Healing. **Journal of Morphological Sciences**, v. 36, n. 4, p. 286–290, 2019.
- COSTA, J. P. L. et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of *Morus nigra* L. (black mulberry) leaf powder on symptoms and quality of life among climacteric women. **Int J Gynaecol Obstet.**, v. 148, n. 2, p. 243–252, 2020.
- CURYLOFO-ZOTTI, F. A. et al. Differential effects of natural Curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 91, p. 42–50, 2018.
- DALAL, P. K.; AGARWAL, M.; PRADESH, U. Postmenopausal syndrome. **Indian J Psychiatry.**, v. 57, n. 2, p. 222–232, 2015.
- DE VICTORIA, E. M. Calcium, essential for health. **Nutr Hosp**, v. 33, n. 4, p. 26–31, 2016.
- DELMAS, P. D. et al. The Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 11, n. 0, p. S2–S17, 1 dez. 2000.
- DENG, L. et al. Effect of the mixture of mulberry leaf powder and KGM flour on promoting calcium absorption and bone mineral density in vivo. **J Science Food Agric**, v. 100, n. 3587–3597, 2020.
- DESMAWATI, D.; SULASTRI, D. Phytoestrogens and Their Health Effect. **Open Access Maced J Med Sci**, v. 7, n. 3, p. 495–499, 2019.
- DING, M.; HVID, I. Quantification of Age-Related Changes in the Structure Model Type and Trabecular Thickness of Human Tibial Cancellous Bone. **Bone**, v. 26, n. 3, p. 291–295, 2000.
- DO, S. H. et al. Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. **Menopause**, v. 15, n. 4, p. 676–683, jul. 2008.
- DONG, P. et al. 3D osteocyte lacunar morphometric properties and distributions in human femoral cortical bone using synchrotron radiation micro-CT images. **Bone**, v. 60, p. 172–185, 2014.
- DOVENTAS, A. et al. Interrelationships between obesity and bone markers in postmenopausal women with either obesity or osteoporosis. **European Geriatric Medicine**, v. 6, n. 1, p. 15–20, 2015.
- EMERTON, K. B. et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. **Bone**, v. 46, n. 3, p. 577–583, mar. 2010.
- ERIKSEN, E. F. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 84–86, 1988.
- FERNANDES, G.; LAWRENCE, R.; SUN, D. Protective role of n-3 lipids and soy protein in osteoporosis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 6, p. 361–372, jun. 2003.
- FERNÁNDEZ-TORRES, J. et al. Review article Role of HIF-1 α signaling pathway in osteoarthritis : **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 57, n. 2, p. 162–173, 2016.
- FISHMAN, J.; GALLAGHER, T. F.; BRADLOW, H. L. Oxidative metabolism of estradiol. v. 235, p. 3104–7, nov. 1960.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue : Structure , Function , and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.
- FRANKENFELD, C. L. et al. Postmenopausal bone mineral density in relation to soy isoflavone-metabolizing phenotypes. **Maturitas**, v. 53, n. 3, p. 315–324, fev. 2006.
- FU, M. et al. Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts in vitro. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 2, p. 129–134, 2012.
- FU, S. et al. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. **Nutrition Research**, v. 34, n. 6, p. 467–477, 2014.
- FUENTES, N. et al. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Adv Protein Chem Struct Biol.**, v. 116, p. 135–145, 2019.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. In: **Intracellular Signalling Proteins**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 116p. 135–170.

FUJISAWA, R.; TAMURA, M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, p. 1891–1903, 2012.

GALLIERA, E.; ROMANELLI, M. M. C. Molecular Basis of Bone Diseases. In: **Molecular Pathology**. [s.l.: s.n.]. p. 627–649.

GALVÃO, E. L. et al. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça Evaluation of the antioxidant potential and sub-critical extraction of linseed oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 551–557, 2008.

GENANT, H. K. et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 10, n. 4, p. 259–264, 1999.

GERBARG, P. L.; BROWN, R. P. Pause menopause with *Rhodiola rosea*, a natural selective estrogen receptor modulator. **Phytomedicine**, v. 23, n. 7, p. 763–769, 2016.

GLASDAM, S.; GLASDAM, S.; PETERS, G. H. The Importance of Magnesium in the Human Body : A Systematic Literature Review. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 73, p. 169–193, 2016.

GLASER, D. L.; KAPLAN, F. S. Osteoporosis: Definition and Clinical Presentation. **Spine**, v. 22, n. 24, p. 12–16, 1997.

GUIZZO, P. L. et al. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 36, n. 2, p. 259–265, 2015.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a Edição ed. [s.l.: s.n.].

HAGGANS, C. J. et al. The Effect of Flaxseed and Wheat Bran Consumption on Urinary Estrogen Metabolites in Premenopausal Women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, n. July, p. 719–725, 2000.

HAGGANS, C. J. et al. The Effect of Flaxseed and Wheat Bran Consumption on Urinary

HAUGE, E. M. et al. Cancellous Bone Remodeling Occurs in Specialized Compartments Lined by Cells Expressing Osteoblastic Markers. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 9, p. 1575–1582, 1 set. 2001.

HAYASHI, M. et al. Osteoprotection by semaphorin 3A. **Nature**, v. 485, n. 7396, p. 69–74, maio 2012.

HAYASHI, M. et al. Autoregulation of Osteocyte Sema3A Orchestrates Estrogen Action and Counteracts Bone Aging. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 627- 637.e5, mar. 2019.

HEANEY, R. P.; RECKER, R. R.; SAVILLE, P. D. Calcium balance and calcium requirements in middle-aged women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1603–1611, 1977.

HEISS, G. et al. Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. **JAMA**, v. 299, p. 1036–45, 2008.

HONOUR, J. W. Biochemistry of the menopause. **Annals of Clinical Biochemistry Manuscript**, v. 55, n. 1, p. 18–33, 2018.

HORCAJADA, M. et al. Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strength in young and adult intact rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 648–654, 2008.

HSU, L. H.; CHU, N. M.; KAO, S. H. Estrogen, estrogen receptor and lung cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1–17, 2017.

HWANG, J.-Y. et al. Association of PLXNA2 polymorphisms with vertebral fracture risk and bone mineral density in postmenopausal Korean population. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 11, p. 1592–1601, 29 set. 2006.

IRIE, M. S. et al. Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. **Braz Dent J**, v. 29, n. 3, p. 227–238, 2018.

IVANOVA, S. et al. OSTEOPOROSIS: THERAPEUTIC OPTIONS. **Osteoporosis: Therapeutic Options**, v. 57, n. 3 & 4, p. 181–190, 2015.

JAO, H.-Y. et al. Mulberry water extract regulates the osteoblast/osteoclast balance in an ovariectomic rat model. **Food & Function**, v. 7, n. 12, p. 4753–4763, 2016.

JEFFERSON, W. N.; WILLIAMS, C. J. Circulating levels of genistein in the neonate , apart from dose and route , predict future adverse female reproductive outcomes. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 272–279, 2011.

JIA, T.-L. et al. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 709–715, mar. 2003.

JIANG, Z. et al. Echinacoside Increases Sperm Quantity in Rats by Targeting the Hypothalamic Androgen Receptor. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3839, dez. 2018.

JIAO, L. et al. Estrogen and calcium handling proteins: new discoveries and mechanisms in cardiovascular diseases. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 318, n. 4, p. H820–H829, 1 abr. 2020.

JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 264–271, jun. 2013.

JOANN, V.; PINKERTON, M. D. Hormone Therapy for Postmenopausal Women. **N Engl J Med**, v. 382, p. 446–455, 2020.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. [s.l.] São Paulo: Editora Santos, 1983.

KALDER, M.; HADJI, P. Breast Care Breast Cancer and Osteoporosis – Management of Cancer Treatment-Induced Bone Loss in Postmenopausal Women with Breast Cancer. **Breast Care**, v. 9, p. 312–317, 2014.

KATSIMBRI, P. The biology of normal bone remodelling. **Eur J Cancer Care**, v. 26, n. 6, p. 1–5, 2017.

KHALIFA, I. et al. Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds : Compositions , metabolism , health benefits, and stability — A structural review. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 28–43, 2018.

KHOSLA, S.; MONROE, D. G. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. a031211, jan. 2018.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576–581, nov. 2012.

KLEIN-NULEND, J.; BONEWALD, L. F. The osteocyte. In: **Principles of Bone Biology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 133–162.

KONDOH, S. et al. Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. **Bone**, v. 60, p. 68–77, mar. 2014.

KONONKO, L. N. et al. Mineral composition of the protein concentrates made from nontraditional raw plant materials. v. 2, p. 69–72, abr. 1986.

KWESI, C. et al. Bioprocessing of Functional Ingredients from Flaxseed. **Molecules**, v. 23, p. 1–18, 2018.

LAGARI, V. S.; LEVIS, S. Phytoestrogens and bone health. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 17, n. 6, p. 546–553, 2010.

LAGARI, V. S.; LEVIS, S. Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, p. 1–8, 2013.

LANE, N. E. et al. Early Estrogen Replacement Therapy Reverses the Rapid Loss of Trabecular Bone Volume and Prevents Further Deterioration of Connectivity in the Rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 206–214, 1999.

LEGETTE, L. L. et al. Supplemental Dietary Racemic Equol Has Modest Benefits to Bone but Has Mild Uterotropic Activity in Ovariectomized Rats 1 – 3. **J. Nutr.**, v. 139, p. 1908–

1913, 2009.

LEMAIRE, V. et al. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. **Journal of Theoretical Biology**, v. 229, n. 3, p. 293–309, ago. 2004.

LEWIECKI, E. M. Osteoporosis: Clinical Evaluation. **Endotext**, 2018.

LI, F. et al. Antiosteoporotic activity of echinacoside in ovariectomized rats. **Phytomedicine**, v. 20, n. 6, p. 549–557, abr. 2013.

LIANG, H. et al. Lycopene Effects on Serum Mineral Elements and Bone Strength in Rats. **Molecules**, v. 17, p. 7093–7102, 2012.

LIM, S. H.; CHOI, C. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. **Nutrients**, v. 11, n. 437, p. 1–18, 2019.

LIU, C. C. et al. Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Bone Loss. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 4, p. 670–680, 2015a.

LIU, D. et al. Serum Sema3A Is in a Weak Positive Association With Bone Formation Marker Osteocalcin But Not Related to Bone Mineral Densities in Postmenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 12, p. E2504–E2509, dez. 2014.

LIU, H. et al. Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. **BioMed Research International**, 2017.

LIU, J. et al. Effect of long-term intervention of soy iso flavones on bone mineral density in women : A meta-analysis of randomized controlled trials. **Bone**, v. 44, n. 5, p. 948–953, 2009.

LIU, Z. et al. Distributional Variations in Trabecular Architecture of the Mandibular Bone : An In Vivo Micro-CT Analysis in Rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015.

LOBO, R. A. et al. Prevention of diseases after menopause. **Climacteric**, p. 540–556, out. 2014.

LOCATELLI, V.; BIANCHI, V. E. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–25, 2014.

LONGO, A. B.; WARD, W. E. Providing Flaxseed Oil but Not Menhaden Oil Protects against OVX Induced Bone Loss in the Mandible of Sprague-Dawley Rats. **Nutrients**, v. 8, n. 597, p. 1–11, 2016.

LTAIF, M. et al. Protective effects of *Avena sativa* against oxidative stress-induced kidney damage resulting from an estrogen deficiency in ovariectomized Swiss mice model. **Journal of Food Biochem.**, p. 1–13, 2020.

MA, H. et al. Icaritin and icaritin stimulate the proliferation of SKBr3 cells through the GPER1-mediated modulation of the EGFR-MAPK signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, p. 1627–1634, 2014.

MA, Y.-L. et al. Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. **Journal of Biomechanics**, v. 41, n. 6, p. 1324–1332, 2008.

MA'ARIF, B.; AGIL, M.; LASWATI, H. Alkaline Phosphatase Activity of *Marsilea crenata* Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 2018.

MAES, C.; CARMELIET, G.; SCHIPANI, E. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 6, p. 358–366, 2012.

MAÍRA, D. C. DE A. et al. Flaxseed (*linum usitatissimum*) flour contributes to bone health in adult male rats. **Nutrition**, v. 49, p. 48–50, maio 2018.

MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells : Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. January, p. 115–137, 2000.

MANOLAGAS, S. C.; BRIEN, C. A. O.; ALMEIDA, M. The role of estrogen and androgen

receptors in bone health and disease. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 9, n. 12, p. 699–712, 2014.

MARCUS, R. Post-menopausal osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 3, p. 309–327, 2002.

MARTIN-MILLAN, M. et al. The Estrogen Receptor- α in Osteoclasts Mediates the Protective Effects of Estrogens on Cancellous But Not Cortical Bone Generation of ER α LysM^{-/-} mice. **Mol Endocrinol**, v. 24, n. 2, p. 323–334, 2010.

MATTILA, P. et al. Nutritional Value of Commercial Protein-Rich Plant Products. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 108–115, jun. 2018.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. v. 34, n. 3, p. 309–338, 2013.

MCCARTNEY, C. R.; MARSHALL, J. C. **Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology**. 8^a Edição ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

MCKEE, M. D.; COLE, W. G. Bone Matrix and Mineralization. In: **Pediatric Bone**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. p. 9–37.

MEDERLE, O. A. et al. Correlations between bone turnover markers, serum magnesium and bone mass density in postmenopausal osteoporosis. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 1383–1389, 2018.

MESSINA, M. J.; WOOD, C. E. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: Analysis and commentary. **Nutrition Journal**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2008.

MIRANDA, M. A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres. **HU Revista**, v. 36, n. 1, p. 61–68, 2010.

MIYAMOTO, T. Mechanism Underlying Post-menopausal Osteoporosis: HIF1 α is Required for Osteoclast Activation by Estrogen Deficiency. **Keio J Med**, v. 64, n. 3, p. 44–47, 2015.

MORABITO, N. et al. Effects of Genistein and Hormone-Replacement Therapy on Bone Loss in Early Postmenopausal Women: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 10, p. 1904–1912, 1 out. 2002.

MORI-OKAMOTO, J. et al. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 93–101, maio 2004.

MORITO, K. et al. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β . **Biol. Pharm. Bull**, v. 24, n. 4, p. 351–356, 2001.

MUHAMMAD, A. et al. Postmenopausal osteoporosis and breast cancer: The biochemical links and beneficial effects of functional foods. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, p. 571–582, 2018.

NAKAMURA, H. Review Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells. **Journal of Hard Tissue Biology**, v. 16, n. 1, p. 15–22, 2007.

NEEL, ENSANYA A. A. et al. Demineralization – remineralization dynamics in teeth and bone. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4743–4763, 2016.

NIAN, H. et al. Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. **Phytomedicine**, v. 16, p. 320–326, 2009.

NIEVES, J. W. et al. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: review and analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 18–24, 1 jan. 1998.

NIKANDER, E. et al. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 3, p. 1207–1212, 2004.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of Estrogen Action. **Physiol Rev.**, v. 81, n. 4, p. 1535–1565, 2001.

OCCHIUTO, F. et al. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 2, p. 130–134,

fev. 2007.

OKAMOTO, M. et al. Conditional Deletion of *Bmpr1a* in Differentiated Osteoclasts Increases Osteoblastic Bone Formation, Increasing Volume of Remodeling Bone in Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 10, p. 2511–2522, 2011.

ONO, T.; NAKASHIMA, T. Recent advances in osteoclast biology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 325–341, 2018.

PACIFI, R. Mechanisms of Estrogen Action in Bone. In: EDITION, 3RD (Ed.). . **Principles of Bone Biology**. [s.l: s.n.]. p. 921–933.

PADILHA, M. M. et al. Artigo Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta ., **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. June, p. 621–626, 2010.

PARIKH, M.; NETTICADAN, T.; PIERCE, G. N. Flaxseed: its bioactive components and their cardiovascular benefits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** **314**:, v. 314, n. 25, p. 146–159, 2020.

PATISAUL, H. B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. **Front Neuroendocrinol.**, v. 31, n. 4, p. 400–419, 2010.

PENG, S. et al. Effect of Epimedium-derived Phytoestrogen on Bone Turnover and Bone Microarchitecture in OVX-induced Osteoporotic Rats. **J Huazhong Univ Sci Technol (Medical Sciences)**, v. 28, n. 2, p. 167–170, 2008.

PESSANHA, C. R. et al. Flaxseed flour, compared to flaxseed oil, contributes to femoral structure in male rats subjected to early weaning. **Food & Function**, v. 7, n. 3, p. 1296–1300, 2016.

PETRINE, J. C. P.; DEL BIANCO-BORGES, B. The influence of phytoestrogens on different physiological and pathological processes: An overview. **Phytotherapy Research**, p. 1–18, 2020.

POLUZZI, E. et al. Phytoestrogens in Postmenopause: The State of the Art from a Chemical, Pharmacological and Regulatory Perspective. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 417–436, 2014.

POWER, K. A. et al. Flaxseed and Soy Protein Isolate, Alone and in Combination, Differ in their Effect on Bone Mass, Biomechanical Strength, and Uterus in Ovariectomized Nude Mice with MCF-7 Human Breast Tumor Xenografts. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, n. 22, p. 1888–1896, 9 out. 2007.

QI, S. Synergistic Effects of Genistein and Zinc on Bone Metabolism and the Femoral Metaphyseal Histomorphology in the Ovariectomized Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 183, n. 2, p. 288–295, 2017.

RAHMAN, M. S. et al. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: Regulation of osteoblastogenesis and bone formation. **Bone Research**, v. 3, n. April 2016, 2015.

RENTSCH, C. et al. Comprehensive histological evaluation of bone implants. **Biomatter**, v. 4, p. 1–11, 2014.

RIETJENS, I. M. C. M.; LOUISSE, J.; BEEKMANN, K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1263–1280, 2017.

ROEDER, E.; MATTHEWS, B. G.; KALAJZIC, I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. **Bone**, v. 92, p. 189–195, 2017.

RUTKOVSKIY, A.; STENSLØKKEN, K.-O.; VAAGE, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 22, p. 95–106, 2016.

SACCO, S. M. et al. Flaxseed combined with low-dose estrogen therapy preserves bone tissue in ovariectomized rats. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v. 16, n. 3, p. 545–554, 2009.

SACCO, S. M. et al. Flaxseed enhances the beneficial effect of low-dose estrogen therapy at reducing bone turnover and preserving bone microarchitecture in ovariectomized rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 7, p. 801–810, 2014.

SANCHES-SALCEDO, E. et al. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves : Their potential for new products rich in phytochemicals. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1039–1046, 2015.

SANTOS, C. S. DOS; NETO, A. A. Caracterização química de amostras minerais por espectrometria de absorção atômica. p. 1–4, 2015.

SAWANT, S. H.; BODHANKAR, S. L. Flax lignan concentrate reverses alterations in blood pressure , left ventricular functions , lipid profile and antioxidant status in DOCA-salt induced renal hypertension in rats. **Renal Failure**, v. 6049, n. January, 2016.

SCOTT, A. A. J.; KNOTT, M. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507–512, 1974.

SHAO, Y. et al. Bone phosphorus retention and bone development of broilers at different ages. **Poultry Science**, v. 0, p. 1–8, 2019.

SHAPIRO, F. Developmental Bone Biology. In: **Pediatric Orthopedic Deformities, Volume 1**. [s.l.] Academic Press. San Diego, 2001. p. 3–128.

SHARMA, D. et al. The Effects of Estrogen Deficiency on Cortical Bone Microporosity and Mineralization. **Bone**, v. 110, p. 1–10, 2019.

SHEN, C. L. et al. Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. **Osteoporos Int**, v. 19, n. 7, p. 979–990, 2008.

SHEN, C. L. et al. Green tea polyphenols mitigate deterioration of bone microarchitecture in middle-aged female rats ☆. **Bone**, v. 44, n. 4, p. 684–690, 2009.

SHETTY, S. et al. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 846, 2016.

SHIM, Y. Y. et al. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 5–20, 2014.

SILVA, S. D. N. **ATIVIDADE FITOESTROGÊNICA DE *Morus nigra* L ., MORACEAE EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**. [s.l.] Universidade Federal do Maranhão, 2012.

SIMS, N. A.; MARTIN, T. J. The osteoblast lineage: its actions and communication mechanisms. In: **Principles of Bone Biology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 23p. 89–110.

SINGH, K. K. et al. Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 2010–222, 2011.

SIROTKIN, A. V. Phytoestrogens and their effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, n. 1, p. 230–236, 2014.

SMITH, E. P. et al. Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 16, p. 1056–1061, 1994.

SNYMAN, L. Menopause-related osteoporosis. **South African Family Practice**, v. 56, n. 3, p. 174–177, 2014.

SOUNDHARRAJAN, I. et al. Modulation of osteogenic and myogenic differentiation by a phytoestrogen formononetin via p38MAPK-dependent JAK-STAT and Smad-1/5/8 signaling pathways in mouse myogenic progenitor cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9307, dez. 2019.

SOUZA, G. R. et al. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 248–254, 17 ago. 2017.

SOUZA, V. R. et al. Description of Ovariectomy Protocol in Mice. In: PRESS, H. (Ed.). . **Pre-Clinical Models. Techniques and Protocols**. Nova York, NY: [s.n.]. v. 1916p. 303–309.

SÖZEN, T.; ÖZİŞİK, L.; BAŞARAN, N. Ç. An overview and management of osteoporosis. **European Journal of Rheumatology**, v. 4, p. 46–56, 2017.

STEVENSON, J. C. Justification for the use of HRT in the long-term prevention of

osteoporosis. **Matirutas**, v. 51, p. 113–126, 2005.

ŠTULÍKOVÁ, K. et al. Therapeutic Perspectives of 8-Prenylaringenin, a Potent Phytoestrogen from Hops. **Molecules**, v. 23, n. 660, p. 1–13, 2018.

SZADOWSKA-SZLACHETKA, Z. C. et al. Intensity of menopausal symptoms and quality of life in climacteric women. **Menopause Review**, v. 18, n. 4, p. 217–221, 2019.

TAKAHASHI, T. A.; JOHNSON, K. M. Menopause. **Med Clin N Am**, v. 99, p. 521–534, 2015.

TETI, A. Bone Development: Overview of Bone Cells and Signaling. **Current Osteoporosis Reports**, v. 9, n. 4, p. 264–273, dez. 2011.

TOMKINSON, A. et al. The Role of Estrogen in the Control of Rat Osteocyte Apoptosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 8, p. 1243–1250, 1 ago. 1998.

USUI, M. et al. Tob deficiency superenhances osteoblastic activity after ovariectomy to block estrogen deficiency-induced osteoporosis. **PNAS**, v. 101, n. 17, p. 6653–6658, 2004.

VERBORGT, O.; GIBSON, G. J.; SCHAFFLER, M. B. Loss of Osteocyte Integrity in Association with Microdamage and Bone Remodeling After Fatigue In Vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 1, p. 60–67, 1 jan. 2000.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415–422, 1999.

VIRK-BAKER, M. K.; NAGY, T. R.; BARNES, S. Role of phytoestrogens in cancer therapy. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1132–1142, 2013.

VORLAND, C. J. et al. Effects of Excessive Dietary Phosphorus Intake on Bone Health. **Curr Osteoporosis Rep**, v. 15, n. 5, p. 473–482, 2017.

VRTAČNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 3, p. 329–342, 2014.

WANG, C. et al. Nutritive Value of Mulberry Leaf Meal and its Effect on the Performance of 35-70-Day-Old Geese. **The Journal of Poultry Science**, v. 54, n. 1, p. 41–46, 2017.

WARD, W. E. et al. Exposure to purified lignan from flaxseed (*Linum usitatissimum*) alters bone development in female rats. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. 4, p. 499–505, out. 2001.

WARDELL, S. E.; MCDONNELL, D. P.; NELSON, E. R. Regulation of Bone Cell Function by Estrogens. In: **Osteoporosis**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 329–344.

WATKINS, B. et al. Protective actions of soy isoflavones and n-3 PUFAs on bone mass in ovariectomized rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 8, p. 479–488, ago. 2005.

WATKINS, B. A.; LI, Y.; SEIFERT, M. F. Dietary ratio of n-6 / n-3 PUFAs and docosahexaenoic acid : actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats. **Journal of Nutritional Biochemistry 1**, v. 17, p. 282–289, 2006.

WONG, W. W. et al. Soy isoflavone supplementation and bone mineral density in menopausal women: a 2-y multicenter clinical trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 5, p. 1433–1439, 1 nov. 2009.

WU, G.-J. et al. Genistein Improves Bone Healing via Triggering Estrogen Receptor Alpha-Mediated Expressions of Osteogenesis-Associated Genes and Consequent Maturation of Osteoblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 39, p. 10639–10650, 30 set. 2020.

XING, L. et al. Principal Component Analysis of Mineral Elements and Fatty Acids Composition in Flaxseed from Ten Different Regions. **Principal Component Analysis of Mineral Elements and Fatty Acids Composition in Flaxseed from Ten Different Regions**, v. 34, n. 9, p. 2538–43, set. 2014.

XU, S. et al. G Protein-Coupled Estrogen Receptor : A Potential Therapeutic Target in

Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. October, p. 1–12, 2019.

ZENI, A. L. B. et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2805–2815, 7 dez. 2017.

ZHAO, W. et al. Action mechanism of Zuo Gui Yin Decoction ' s promotion on estradiol production in rats during the peri-menopausal period. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 1, p. 122–129, 2011.

ARTIGO

**Efeitos da suplementação de extratos de Linhaça e/ou Amoreira
sobre o sistema ósseo de ratas ovariectomizadas**

Larissa Sampaio Jacques^{1*}; Bruno Del Bianco Borges¹

²Departamento de Medicina, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras - UFLA; Campus Universitário, CP: 3037, Lavras 37200-000, Brazil

***Corresponding author:**

Larissa Sampaio Jacques
Departamento de Medicina
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Lavras
Caixa Postal 3037 Lavras - MG - Brasil
CEP 37200-900
Tel: +55 35 3829 1742
Email: larissa.jacques@estudante.ufla.br

RESUMO

O metabolismo ósseo é modulado, entre outros hormônios, por estrogênios (principalmente E₂). A diminuição na concentração plasmática de E₂, em decorrência da falência ovariana, retirada dos mesmos ou utilização de bloqueadores de seus receptores, podem ter efeitos que incluem a osteoporose. Há controvérsias quanto à terapia de reposição hormonal devido aos efeitos colaterais, o que leva à busca de novas alternativas, como o uso de alimentos ricos em nutracêuticos que possuem quantidade relativas de fitoestrógenos. O objetivo do trabalho foi verificar os efeitos promovidos pela suplementação com os extratos de semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) e folhas, pecíolos e caules de amoreira-preta (*Morus nigra* L.) em ratas ovariectomizadas. Os animais foram tratados com 400 mg/kg de cada extrato, 200 mg/kg de ambos combinados, E₂ (0,158 mg/kg) ou salina, diariamente, por 60 dias. Foram analisados parâmetros morfológicos, celulares, minerais e plasmáticos. Os resultados foram analisados por Scott-Knott à 5% de significância estatística. Observou-se maior número de osteoblastos e osteoclastos nos fêmures dos animais tratados com extrato de amoreira. O tratamento com os extratos impediu a redução da porcentagem de trabéculas, densidade mineral óssea, volume ósseo, número de trabéculas, e menor porosidade e espaço intertrabecular, semelhantes aos animais tratados com E₂, assim como houve maior atividade de fosfatase alcalina óssea. A concentração de cálcio, fósforo e magnésio foi maior nos fêmures dos animais tratados com os extratos em relação aos que receberam salina. Dessa forma, sugere-se que os extratos de linhaça e/ou amoreira foram capazes de prevenir a perda óssea promovida pela falta de ação estrogênica em ratas, atuando possivelmente na modulação do controle da reabsorção óssea, sugerindo que essa suplementação possa prevenir/reduzir os sinais e sintomas causados pela falta de ação estrogênica.

Palavras-chave: Terapia hormonal, fitoestrógenos, Perda óssea, Menopausa.

Introdução

O sistema reprodutor feminino é composto por uma organização funcional complexa de diversos tecidos e vias de sinalização (MCCARTNEY; MARSHALL, 2018). Os ovários, a partir da puberdade, produzem hormônios esteroides que regulam a expressão de genes envolvidos na diferenciação e desenvolvimento sexual, sendo os principais: estrogênio e a progesterona (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013). Os estrogênios, sendo estradiol (E₂ ou 17β-estradiol) o principal estrogênio circulante, atuam em diferentes tecidos-alvo (CARLSON, 2019; FUENTES et al., 2019). Além das ações no desenvolvimento do sistema reprodutivo feminino e das características sexuais secundárias, o estrogênio também desempenha importantes funções em sistemas não relacionados diretamente com a reprodução, como a regulação da homeostase esquelética, metabolismo de lipídios e carboidratos e balanço hidroeletrolítico (NILSSON et al., 2001).

A partir da quinta década de vida ocorre a falência ovariana, o que reduz a síntese e secreção dos hormônios sexuais (SZADOWSKA-SZLACHETKA et al., 2019). Além disso, o uso de medicamentos com ação antagonista nos receptores para estrogênio (ER-α, ER-β e GPER1) ou a retirada dos ovários, também promovem diminuição de ação estrogênica no organismo (CHEUNG et al., 2004). No caso de falência ovariana ou retirada dos ovários, esses hormônios passam a serem sintetizados apenas em locais extragonadais, como tecido mamário, cerebral, muscular, ósseo e adiposo, porém em quantidade insuficientes para as ações no organismo (MAUVAIS-JARVIS; CLEGG; HEVENER, 2013).

Ao longo de toda a vida, a atividade metabólica do osso é dinâmica, processo este denominado remodelamento ósseo (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Esse processo depende da ação coordenada de osteogênese, modelagem e remodelação, que ocorrem mediados pelos osteoblastos e osteoclastos, células ósseas que estão em íntima cooperação nas unidades básicas multicelulares (BMU) (FUJISAWA; TAMURA, 2012). A osteogênese é caracterizada pela síntese de matriz óssea pelos osteoblastos, enquanto a modelagem é feita pelos osteoclastos, mudando a forma do osso para se adequar ao ambiente e crescimento corporal (RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016). A fosfatase alcalina óssea (ALP) é uma enzima com papel na mineralização óssea, presente na membrana plasmática dos osteoblastos, onde atua na formação e mineralização de osteóides (matriz óssea não calcificada) por degradação enzimática de pirofosfato, inibidor da mineralização, em pH alcalino (SHETTY et al., 2016). As células ósseas sofrem constante diferenciação e são reguladas por ações hormonais que incluem a ação estrogênica (NAKAMURA, 2007).

O estrogênio demonstra ação crucial na homeostase do tecido ósseo, uma vez que a diminuição de sua concentração, após a menopausa, é a principal causa de perda óssea, podendo conseqüentemente causar osteoporose (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012).

Em humanos e roedores, o E₂ é capaz de suprimir a reabsorção óssea nas superfícies trabeculares e endocorticais, reduzindo a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos ativos e estimulando sua apoptose, podendo agir indiretamente nas células da linhagem de osteoclastos, por meio da limitação da osteoblastogênese (WARDELL; MCDONNELL; NELSON, 2013). Com a redução da concentração estrogênica e conseqüente diminuição da regulação no tecido ósseo, há aumento de osteoblastos e estímulo de remodelação óssea. Conseqüentemente, há maior expressão de fatores osteoclastogênicos a partir desses osteoblastos, desviando o metabolismo ósseo em direção à reabsorção (MARTIN-MILLAN et al., 2010). Assim, a osteopenia causada pela diminuição da concentração de E₂ ocorre devido ao desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea, uma vez que a atividade de osteoclastos se torna maior do que a de osteoblastos, promovendo maior reabsorção (MIYAMOTO, 2015).

O uso de hormônios sintéticos, denominado terapia de reposição hormonal, é a primeira opção de escolha para o tratamento de sintomas relacionados à falência ovariana, porém há restrições e controvérsias quanto ao seu uso, incluindo risco de desenvolvimento de câncer de mama responsivos ao estrogênio (BRIOT; ROUX, 2015; HEISS et al., 2008; HSU; CHU; KAO, 2017). Devido à isso, faz-se necessário a busca por tratamentos alternativos, dentre os quais, o uso de alimentos funcionais e plantas medicinais que contenham quantidades relativas de fitoestrógenos, moléculas com potencial de se ligar ao ERs e mimetizar suas ações (GERBARG; BROWN, 2016a). Dentre as principais classes de fitoestrógenos encontrados na dieta podemos destacar as isoflavonas, cumestanas e lignanas (FRANKENFELD et al., 2006; LAGARI; LEVIS, 2010; WONG et al., 2009).

A linhaça e amoreira-preta são alimentos que possuem quantidades relativas de compostos fenólicos em sua composição, dentre eles fitoestrógenos, sendo assim, potenciais alternativas para a prevenção e redução de osteopenia devido à diminuição de estrogênios no organismo (PARIKH; NETTICADAN; PIERCE, 2020; SILVA, 2012). A linhaça (*Linum usitatissimum*), é rica em lignanas, substâncias estruturalmente similares ao estrogênio, assim como as isoflavonas presentes na soja, descritas como reguladoras endócrinas (CORRÊA et al., 2017). O chá das folhas da amoreira-preta (*Morus nigra* L.), é popularmente utilizado para alívio dos sintomas relacionados à baixa ação estrogênica durante a menopausa (MIRANDA et al., 2010). Além disso, as isoflavonas presentes na amoreira-preta possuem potencial de se

ligar aos ERs presentes nas células dos ossos e regular seu metabolismo (MORITO et al., 2001).

Sendo assim, a linhaça e a amoreira demonstram possuírem substâncias capazes de atuar prevenindo os efeitos causados ao organismo pela falta de ação estrogênica. Com isso, a hipótese do presente trabalho é que os extratos de linhaça e amoreira promovem efeitos no metabolismo ósseo de animais sem ação estrogênica. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a microestrutura e morfometria do tecido ósseo, a quantificação mineral óssea e analisar a atividade plasmática de fosfatase alcalina em ratas ovariectomizadas suplementadas com extratos de linhaça e/ou amoreira.

Material e Métodos

Extração da linhaça e amoreira

Os extratos de linhaça e de amoreira foram obtidos por processamentos da linhaça e folhas, pecíolos e caules da amoreira no Departamento de Nutrição, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os grãos da linhaça foram triturados em liquidificador até a formação de pó homogêneo. As folhas, caules e pecíolos da amoreira também foram processados em liquidificador até se obter pequenas frações. A extração das sementes de linhaça iniciou-se com a mistura do pó com éter etílico (1:20), que permaneceu em agitação por 1 hora e posteriormente foi filtrada. O precipitado foi misturado com álcool etílico (1:20), e, novamente, a mistura permaneceu por 1 hora em agitação e foi filtrada. O precipitado resultante dessa etapa foi misturado com água destilada (1:20). A mistura foi agitada por 1 hora e, então, foi centrifugada e filtrada a vácuo. O filtrado desta etapa caracterizou-se como o extrato aquoso da semente de linhaça (GALVÃO et al., 2008).

A extração das folhas, pecíolos e caules de amoreira foi feita utilizando a metodologia de Fu e colaboradores (FU et al., 2012). As folhas secas, caules e pecíolos foram primeiramente extraídos com etanol 95%, por 3 horas, em temperatura de 60-70°C. Concentrou-se a amostra em rotaevaporador à vácuo, da marca SOLAB (SL-126), para obtenção do extrato bruto e posteriormente, foi diluído em água destilada. Após obtenção dos extratos, eles foram envasados em frasco âmbar, protegidos com papel alumínio e armazenados sob temperatura de refrigeração à 4°C.

Animais e protocolo experimental

Foram utilizadas ratas fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas, pesando 180-220g, mantidas em fotoperíodo de 12/12 horas (luz das 06-18 horas), à temperatura de aproximadamente 22°C, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (41x34x17,8 cm), em grupos de 4 animais por caixa, ambientados por uma semana no Biotério Central Multiusuário da Universidade Federal de Lavras. Este projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras (CEUA-UFLA) sob o protocolo nº 071/19.

Os animais foram submetidos à ovariectomia bilateral, que consiste na retirada cirúrgica de ambos ovários por meio de duas incisões dorsolaterais (SOUZA et al., 2018). Os animais foram anestesiados com Ketamina (90mg/kg, Ketamina Agener® União Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, Brasil) e Xilazina (10mg/kg, Dopaser® Laboratório Calier S.A. Barcelona, Espanha), fez-se a tricotomia da área central da coluna até o flanco, localizando o bordo caudal das costelas e a lateral da coluna vertebral. Foi feita a limpeza da área tricotomizada com solução de clorexidinalcoolíca a 0,5%, e a incisão da pele na área central tricotomizada com auxílio de um bisturi. Posteriormente, foi feita uma pequena incisão na fáscia e na musculatura, prolongando-a em sentido cranial e caudal (aproximadamente 1 cm de incisão total). Identificou e exteriorizou-se o ovário e o oviduto, e fez-se a ligadura ao redor do oviduto e a remoção do ovário. O útero e tecido adiposo foram reposicionados na cavidade abdominal. Por fim, foi feita uma sutura da musculatura e da pele. Os animais foram tratados com pentabiótico veterinário (113mg/kg Wyeth, Brasil) e analgésicos flunixinina (me glumina) (2,5mg/kg, Banamine, Chemitec Agro-Vetrinária Ltda) intramuscular.

Após sete dias de recuperação da cirurgia, os animais (n=32) iniciaram a suplementação com os extratos, via gavagem, diariamente, com duração de 60 dias. Os mesmos foram divididos em cinco grupos, sendo eles: salina (n=6), estrogênio (n=5)(estriol, 0,158 mg/kg – Ovestrion, Eurofama Laboratório S.A., Brasil)(ZHAO et al., 2011), extrato de linhaça (n=7)(400 mg/kg) (SAWANT; BODHANKAR, 2016), extrato de amoreira (n=7)(400 mg/kg) (DO et al., 2008) e complexo (n=7)(extrato linhaça + amoreira - 200 mg/kg de cada extrato).

Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com Ketamina (90mg/kg – Ketamina, Sespo Indústria e Comércio Ltda) e Xilazina (10mg/kg, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda), e amostras de sangue dos diferentes grupos foram coletadas, por punção cardíaca, e transferida ao tubo de ensaio contendo EDTA para posterior centrifugação (1370 g por 20 minutos), o plasma foi coletado e armazenado em ultra freezer (-80°C). O fêmur

esquerdo foi retirado, removido todo tecido mole e foi colocado em formalina à 10%. Após 48h os fêmures foram colocados em álcool etílico 70%, para posterior preparo histológico. Já os fêmures direitos tiveram todo tecido mole removido e foram armazenados em recipiente plástico para posteriormente serem submetido à análise por Microtomografia Computadorizada de Raios-X e espectrometria de raios-X por dispersão de energia.

Descalcificação do fêmur com EDTA

Os fêmures esquerdos foram mantidos em solução descalcificadora, contendo 50g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em 1000 ml de água destilada e 4,5 g de hidróxido de sódio para obter pH entre 6,5 a 7,0. Foram realizadas trocas da solução descalcificadora a cada três dias, até diminuição total da resistência óssea.

Após a descalcificação, cortes transversais cornais e longitudinais foram realizados, para a obtenção apenas do trocânter maior, cabeça e o colo do fêmur, que foram colocados em água destilada por 2 horas e depois transferidos para álcool 70%.

Preparo histológico

Após as amostras serem clivadas e colocadas em cassetes, estas foram submetidas ao histotécnico para desidratação em série gradativa de álcool etílico (70, 80, 90, 95 e 100%, durante 20 minutos cada), diafanização em xilol (dois banhos de 15 minutos cada) e embebido em parafina à 60°C (dois banhos de 40 minutos cada).

Os blocos de parafina contendo as amostras foram seccionados em micrótomo na espessura de 4µm e as secções colocadas em lâminas de vidro, desparafinados, hidratados e corados com Hematoxilina de Harris (2 minutos). Posteriormente, foram lavados em água corrente (2 minutos) e corados com eosina (4 minutos). Ao final, os cortes foram novamente desidratados, diafanizados, e as lâminas montadas com bálsamo do Canadá sintético e uma lamínula sobrepondo (JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, 1983).

Foram analisados quatro cortes histológicos para cada fêmur e por meio do fotomicroscópio (Olympus CX22 RFS2) com câmera digital SC30, foram capturados dois campos de cada secção, com aumento de 10X, sendo os campos, da cabeça do fêmur abaixo da linha epifisária e do colo do fêmur, abrangendo toda extensão. Foram realizadas medidas através do programa *ImageJ*, versão 4.5.0.29 (National Institutes of Health, EUA). A proporção de área trabecular relativa (%) foi obtida de cada animal a partir de pontos dentro

da trabécula, contendo sobreposição de 432 pontos (intersecções) para imagens obtidas em um total de 2 campos por área, totalizando 864 pontos no total/campo/animal.

Quantificação celular

Além da análise de área total trabecular, foram quantificados osteócitos, osteoblastos e osteoclastos nas mesmas lâminas.

A coloração por hematoxilina-eosina (HE) é a principal técnica de coloração de tecidos na área de histologia (LIU et al., 2017). Essa técnica permite diferenciar regiões de acordo com seu pH: basófilas, pela hematoxilina e acidófilas, pela eosina. Em lâminas de ossos, a coloração HE permite uma visão geral da seção histológica, com todos os tecidos presentes separados morfológicamente (CURYLOFO-ZOTTI et al., 2018). O osso apresenta-se como uma estrutura compacta vermelho escuro. O tecido conjuntivo, rico em células e fibras de colágeno, encontra-se em uma cor levemente rosada. A cartilagem é marcada em uma mistura cinza-rosa, mas todos os tecidos precisam ser separados morfológicamente. É possível localizar e diferenciar diferentes tipos celulares através da identificação de sua estrutura morfológica e localização: osteócitos, osteoclastos e osteoblastos e são encontrados no tecido duro (RENTSCH et al., 2014).

Foram feitas as identificações e quantificações dos tipos celulares através da localização e estrutura morfológica. Osteoclastos e osteoblastos foram quantificados junto ao endósteo e periósteo. A análise foi executada por dois pesquisadores treinados, por meio do programa *ImageJ4.5.0.29* (National Institutes of Health, EUA), em que se padronizou as contagens por toda a lâmina.

Atividade de fosfatase alcalina óssea

A detecção e quantificação da atividade de fosfatase alcalina óssea foi realizada utilizando o plasma dos animais por meio de método colorimétrico, seguindo as instruções do kit comercial e leitura em espectrofotômetro a 520 nm (Alkaline Phosphatase (ALP) Activity Assay Kit - E-BC-K091-MT96, Elabscience Biotechnology Inc.®, EUA).

Microtomografia Computadorizada de Raios-X (μ -CT)

A técnica da Microtomografia Computadorizada de Raios-X (μ CT) segue os princípios básicos da tomografia computadorizada médica, ou seja, faz uso de dados de atenuação de raios-X adquiridos em vários ângulos rotacionados para construir uma

representação 3D da amostra de acordo com a distribuição espacial e densidade do material. Possui vantagens em relação às análises histológicas por permitir uma análise representativa de toda a extensão de interesse da amostra, resultando na visualização da proporcionalidade entre a imagem e sua densidade em tons de cinza, além de ser um método não destrutivo (IRIE et al., 2018).

O diagnóstico da osteoporose pode ser feito através do μ CT em modelos animais. Diferentemente dos métodos tradicionais com resultados em 2D, esse método considera a relação interna dos recursos da amostra e fornece um resultado otimizado global. As variáveis escolhidas para análise relacionam com a estrutura da amostra óssea. O resultado obtido é muito satisfatório, conveniente e não invasivo ao material (XU et al., 2013). A análise da microarquitetura óssea trabecular é, clinicamente, considerada um método aceitável de prever a perda óssea e deterioração estrutural da osteoporose (CHAPPARD et al., 2008; DONG et al., 2014).

Foram utilizados fêmures direito, os quais tiveram selecionadas a região da cabeça e colo do fêmur, que possuem, principalmente, osso trabecular. As variáveis escolhidas permitem a observação da densidade mineral óssea (BMD, g/cm^{-3}), quantificação trabecular (Tb.N $1/\mu\text{m}$), análise do volume ósseo (BV/TV, %), porosidade total da amostra (Po(tot), %), espaço intertrabecular (Tb.Sp, μm) e o espessamento das trabéculas (Tb.Th, μm). O ensaio foi realizado por meio de colaboração com o Departamento de Engenharia Metalúrgica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Espectrometria de Raios-X por Dispersão em Energia (SEM-EDS)

Os minerais Cálcio, Fósforo, Flúor, Enxofre, Sódio, Potássio e Magnésio, presentes nos fêmures direito, foram quantificados através da técnica de SEM-EDS, em que cada espécie atômica possui uma intensidade da absorção da radiação característica, permitindo identificar e quantificar o elemento (SANTOS; NETO, 2015).

As amostras foram depositadas no suporte do microscópio considerando a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e o coletor de elétrons secundários. As regiões de análise foram cabeça e colo do fêmur. Para fixação, foi usado adesivo com cola condutora de carbono coloidal. Os ossos foram revestidos por uma camada condutora de carbono. A cobertura de amostras biológicas, geralmente ouro ou carbono, visa torná-los bons condutores térmicos e elétricos (CASTRO, 2001). Essa análise foi executada no Laboratório de

Análise Estatística

Os testes de Shapiro-Wilk foram utilizados para avaliar a normalidade das distribuições. Os dados de cada parâmetro analisado foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott(SCOTT; KNOTT, 1974) à 5% de significância estatística no programa R. Os gráficos dos resultados foram gerados no programa GraphPad Prism 5.0.

Resultados

Análise histomorfométrica

Foi analisada a porcentagem de trabécula por meio de proporção de área total trabecular presente na cabeça e colo do fêmur. Os animais tratados com estrogênio, extratos de linhaça, amoreira ou linhaça + amoreira, apresentaram uma porcentagem maior de trabéculas intactas em comparação ao grupo tratado com salina, demonstrando uma menor perda óssea nos animais tratados com estrogênio ou extratos(figura 1). As figuras 2 e 3 demonstram imagens representativas da análise histológica da cabeça e colo do fêmur, respectivamente, em que as setas indicam as trabéculas ósseas.

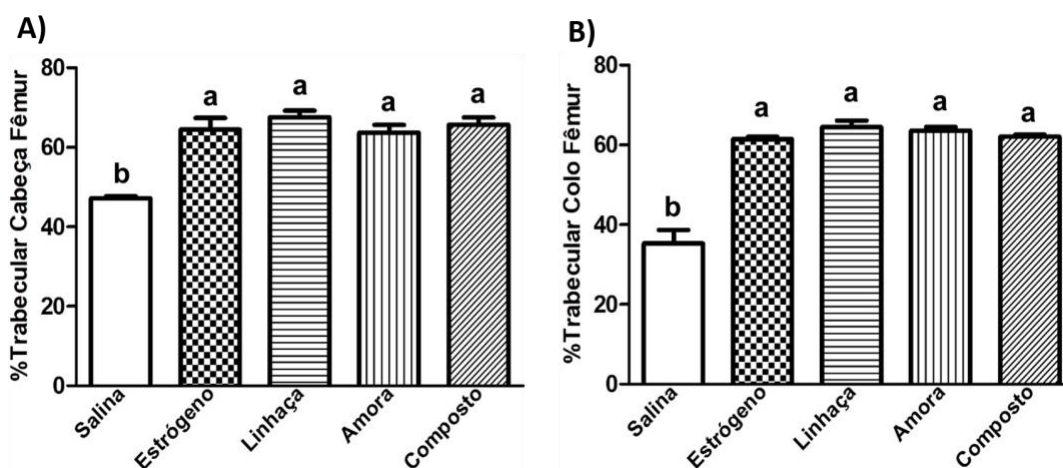


Figura 1 - Porcentagem de osso trabecular, na cabeça (A) e no colo do fêmur (B) dos animais tratados com salina, estrogênio, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira). As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Os valores representam médias \pm erro padrão.

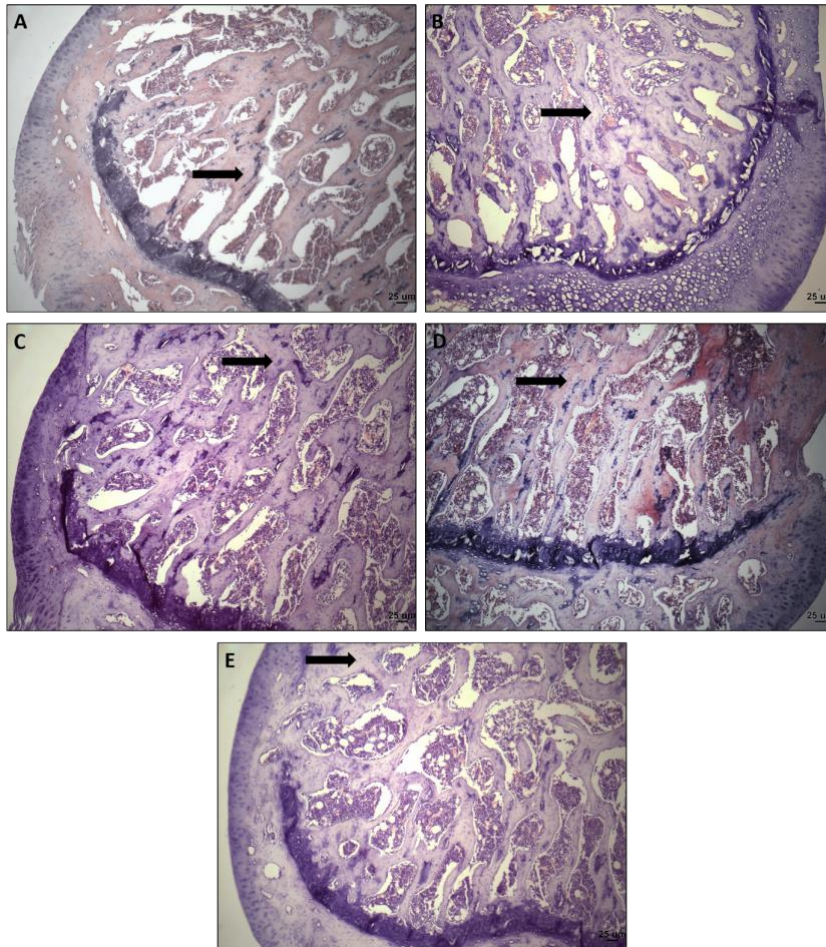


Figura 2 - Fotomicroscopia (Hematoxilina e Eosina, aumento de 100x) trabecular da cabeça do fêmur dos animais tratados com salina (A), estrogênio (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E). A seta indica trabécula óssea.

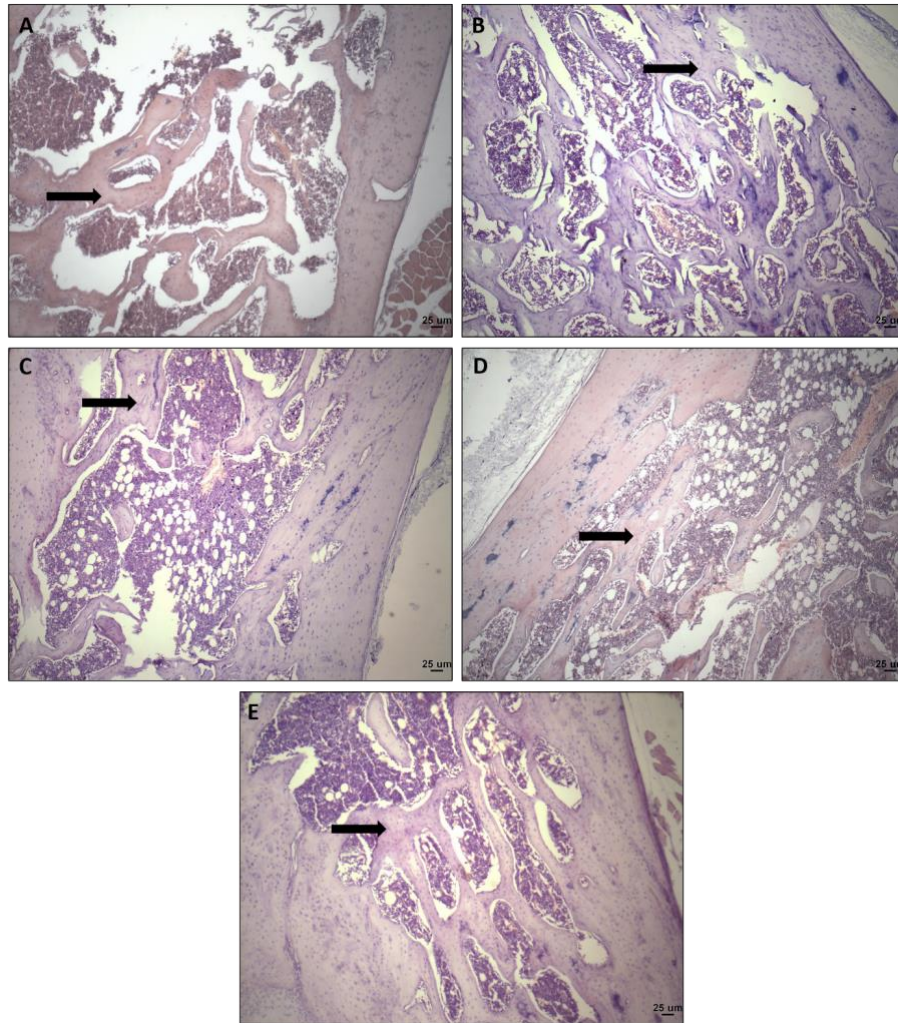


Figura 3 -Fotomicroscopia (Hematoxilina e Eosina; aumento de 100x) trabecular do colo do fêmur dos animais tratados com salina (A), estrogênio (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E).A seta indica trabécula óssea.

Quantificação celular

Foi realizada a quantificação celular de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos através da localização e estrutura morfológica dos tipos celulares (figura 4). Observou-se maior número de osteoblastos e osteoclastos na cabeça e colo dos fêmures dos animais tratados com extrato de amora em relação aos animais tratados com salina (p -valor $<0,05$), o que indica que o extrato estimulou o remodelamento ósseo (figura 5).

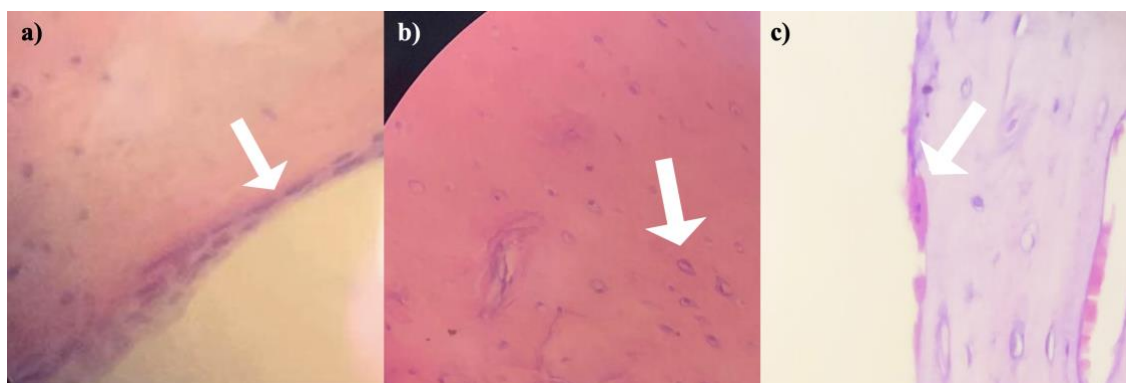


Figura 4. Morfologia das células ósseas coradas com Hematoxilina e Eosina, observadas em microscópio óptico no aumento 100x. **a)** Osteoblastos **b)** Osteócitos **c)** Osteoclastos, indicados pela seta.

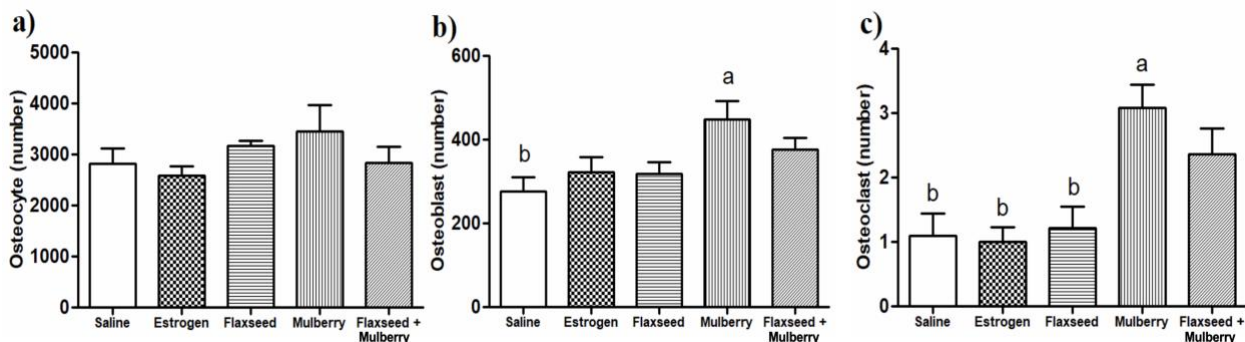


Figura 5. **a)** Quantificação de osteócitos. **b)** Quantificação de osteoblastos. **c)** Quantificação de osteoclastos. As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Os valores representam médias \pm erro padrão.

Microtomografia Computadorizada de Raios-X (μ -CT)

Foram analisadas modificações morfométricas através de Microtomografia Computadorizada de Raios-X (μ -CT). A figura 6 representa a imagem tridimensional das regiões dos ossos analisadas nos diferentes grupos. Os animais tratados com estrogênio, extratos de linhaça, amoreira ou linhaça + amoreira, apresentaram maior densidade mineral

óssea (BMD), volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N), e menor porosidade (Po(tot)) e espaço intertrabecular (Tb.Sp) em relação aos animais tratados com salina ($p < 0,05$) (figura 7). Essas diferenças indicam que os extratos diminuíram a perda óssea causada pela ausência de estrogênio endógeno.

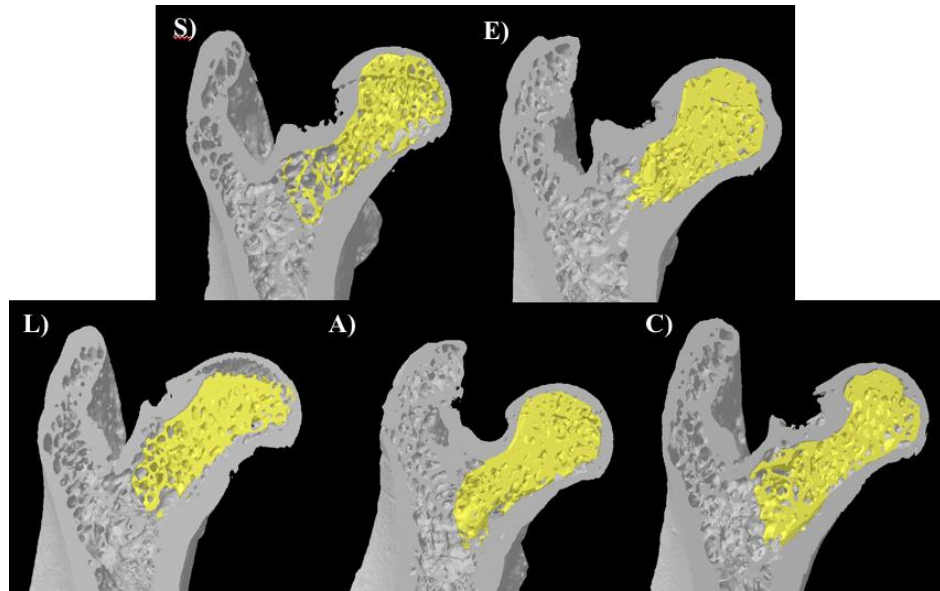


Figura 6. Imagem dos ossos femorais esquerdos visualizadas pelo μ CT, com a região de interesse indicada em amarelo. S) salina. E) estrogênio. L) extrato de linhaça. A) extrato de amoreira. C) extratos de amoreira + linhaça.

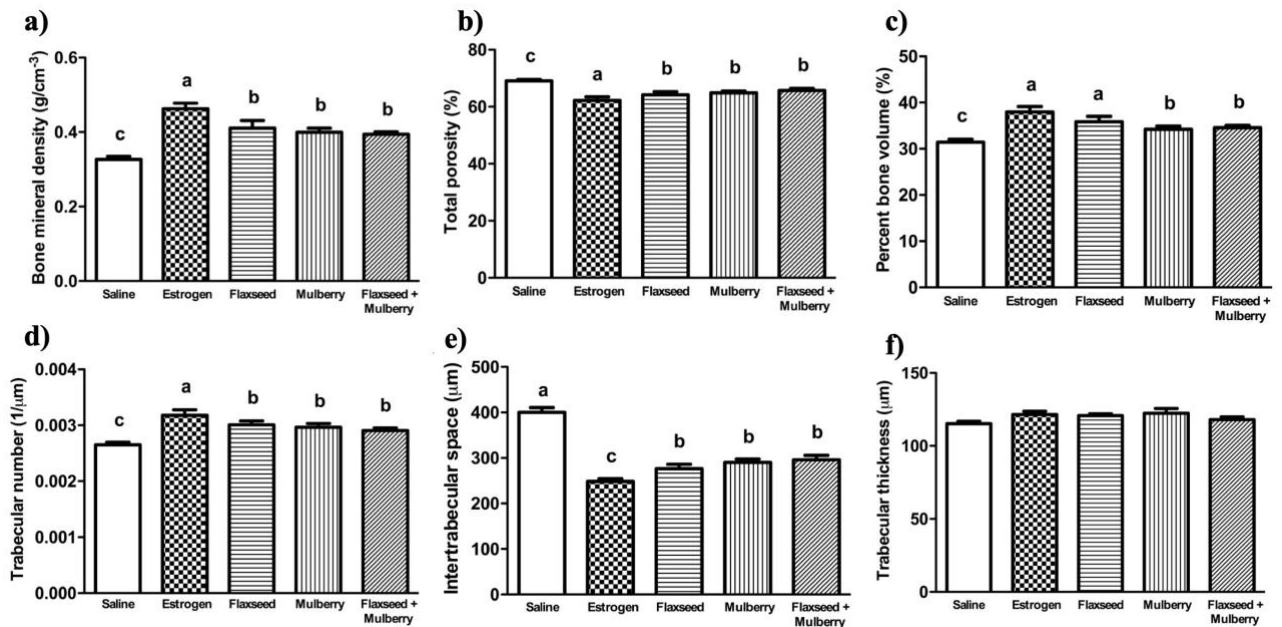


Figura 7. Resultados das análises do μ CT entre os diferentes grupos. As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Os valores representam médias \pm erro padrão. **a)** Densidade mineral óssea **b)** Porosidade total **c)** Volume ósseo **d)** Número de trabéculas **e)** Espaço intertrabecular **f)** Espessura trabecular.

Espectrometria de Raios-X por Dispersão em Energia

A análise de SEM-EDS demonstrou que a quantidade de Cálcio, Fósforo e Magnésio foi menor nos ossos dos animais tratados com salina (p -valor $<0,05$). Os mesmos minerais encontraram-se em quantidades elevadas nos fêmures dos animais tratados com linhaça e amoreira-preta, resultado que corrobora com a maior DMO observada pela análise de micro-CT. Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de Flúor, Enxofre, Sódio e Potássio nos ossos dos animais.

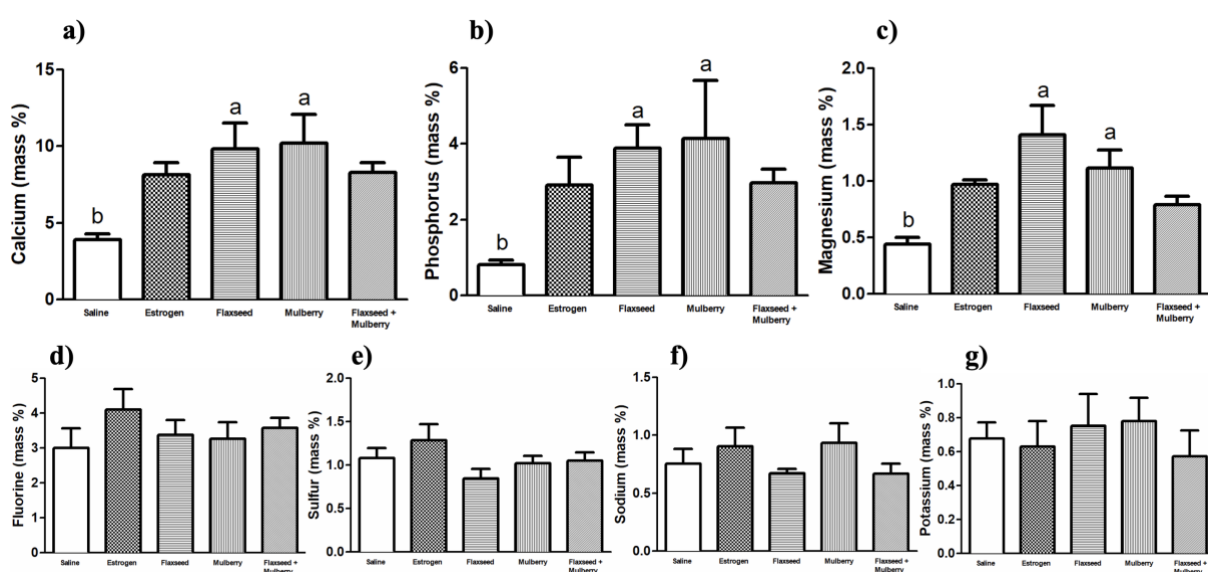


Figura 8. Quantificação de minerais por SEM-EDS. **a)** Cálcio. **b)** Fósforo. **c)** Magnésio. **d)** Flúor. **e)** Enxofre. **f)** Sódio. **g)** Potássio. As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Os valores representam médias \pm erro padrão.

Quantificação de fosfatase alcalina óssea

A atividade de fosfatase alcalina plasmática foi maior nos animais tratados com extrato de linhaça e amoreira, comparados com o controle negativo (p -valor $<0,05$).



Figura 9. Atividade de fosfatase alcalina óssea. Calculados de acordo com protocolo do kit. As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Os valores representam médias \pm erro padrão.

Discussão:

Os dados do presente trabalho demonstram que animais com baixa concentração estrogênica endógena possuem menor matriz óssea em relação aos animais tratados com estrogênio exógeno. Além disso, a suplementação desses animais com extratos de linhaça e/ou amoreira foram capazes de prevenir a perda óssea promovida pela falta de ação do estrogênio, quando comparado com os animais tratados com salina, atuando possivelmente na modulação do controle da formação óssea.

A ovariectomia, com conseqüente diminuição na concentração de estrogênio, na maioria dos casos, promove aumento na remodelação óssea (reabsorção excedendo à formação) associada à perda de massa óssea em vários locais, principalmente em ossos trabeculares, levando a diminuição na densidade óssea, mineralização e força (BALDOCK et al., 1999). Assim, nas mulheres, a perda óssea como conseqüência da menopausa, está associada a altas concentrações de marcadores bioquímicos de renovação óssea (OCCHIUTO et al., 2007). Os dados do presente estudo confirmam a ação protetora do estrogênio sobre a modelação óssea, prevenindo a reabsorção óssea, quando se compara com os resultados obtidos com os animais tratados com salina.

Alguns nutracêuticos contendo quantidades relativas de fitoestrógenos demonstram ser uma alternativa à reposição hormonal, a qual possui controvérsias quanto ao uso (BRIOT; ROUX, 2015; GERBARG; BROWN, 2016; HEISS et al., 2008; HSU; CHU; KAO, 2017). Dentre os diversos produtos com estas características, a linhaça e a amoreira podem ser potenciais alternativas para a prevenção de osteopenia devido à diminuição de E_2 no organismo.

Componentes na linhaça, podem, pelo menos em partes, serem responsáveis por efeitos benéficos, como a estabilidade da formação óssea (POWER et al., 2007). Diversos estudos constataram que os ácidos graxos poli-insaturados Omega-3 (Ω -3) promovem efeitos nos ossos, inibindo a síntese da prostaglandina E2, que são ecosanóides de reabsorção óssea (FERNANDES; LAWRENCE; SUN, 2003; WATKINS et al., 2005) e diminuindo as citocinas pró-inflamatórias (COHEN; WARD, 2005), fatores estes que causam aumento da reabsorção óssea. Alguns efeitos benéficos nos parâmetros de força biomecânica do fêmur foram observados, após animais ovariectomizados (OVX) serem alimentados com linhaça, produzindo maior rigidez ao fêmur colocado sob carga, em comparação aos animais sem suplementação (POWER et al., 2007). Isso pode indicar uma alteração induzida pela linhaça no osso, havendo uma redução no risco de fraturas ósseas, situação comum em mulheres pós menopausa (SNYMAN, 2014).

Ratas OVX apresentam trabéculas escassas, com tendência à ruptura, entretanto, a suplementação desses animais com óleo de linhaça e de gergelim demonstraram trabéculas alongadas, presença de conectividade e com menos rupturas (BOULBAROUD et al., 2008). No presente trabalho, observou-se que a suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira foi capaz de evitar a diminuição da densidade mineral óssea (DMO) e do volume ósseo, além de impedir o aumento da porosidade total, indicando um mecanismo de inibição da reabsorção óssea e melhores taxas de formação óssea (MANOLAGAS; BRIEN; ALMEIDA, 2014; OKAMOTO et al., 2011).

Após administração do extrato do fruto de *Rubuscoreanus* (RCM), popularmente conhecido como amora coreana, foi observada prevenção da perda óssea induzida pela ovariectomia, sendo que, o grupo que recebeu 400 mg/kg de RCM, durante 10 semanas, tiveram a dimensão óssea trabecular do fêmur mantida em mais de 35% em comparação aos animais OVX que não receberam a suplementação. Assim, sugere-se que o efeito protetor ósseo de RCM seja mediado, pelo menos em parte, pela estimulação da diferenciação e maturação dos osteoblastos, bem como indução da apoptose de osteoclastos (DO et al., 2008). Semelhantemente, é possível que o mecanismo protetor ósseo do extrato de amoreira seja através da modulação das células ósseas.

Estudos feitos com ratas OVX tratadas com compostos ricos em fitoestrógenos demonstram homeostase na quantidade de marcadores de modelação óssea e de marcadores osteogênicos e osteoclastogênicos (DENG et al., 2020; JAO et al., 2016; LONGO; WARD, 2016; POWER et al., 2007; SACCO et al., 2009, 2014). A literatura indica que essas

alterações são devido ao mecanismo de ação protetora óssea (CHEN et al., 2019; JAO et al., 2016; NIAN et al., 2009; PENG et al., 2008; QI, 2017).

Além disso, observou-se que o tratamento com os extratos de linhaça e/ou amoreira evitaram a redução da quantidade de trabéculas ósseas e o aumento do espaço intertrabecular, o que corrobora com a conservação do volume ósseo. Os extratos foram capazes de manter o equilíbrio no metabolismo ósseo, diminuindo a reabsorção, baseado nas alterações morfológicas.

Os resultados do presente trabalho não demonstraram alteração na espessura trabecular dos animais tratados, provavelmente devido a este parâmetro ser pouco alterado com o envelhecimento, após menopausa e na osteoporose (DING; HVID, 2000). Além disso, em estudos de curto espaço de tempo, é possível que não se observe modificação na espessura trabecular (BAKKER et al., 2018; BALDOCK et al., 1999; LANE et al., 1999; LIU et al., 2015a).

A ação estrogênica nos osteócitos via ER- α é importante para a massa óssea trabecular (KONDOH et al., 2014). A deficiência específica de estrogênio nesse tipo celular resulta na anulação dos seus efeitos osteoprotetores, sendo a morte de osteócitos frequentemente observada nessa situação (HAYASHI et al., 2019). Através da coloração de Hematoxilina e Eosina, não se pode fazer uma medida precisa da viabilidade celular dos osteócitos, sendo necessário uso de marcadores específicos de morte celular (JILKA; NOBLE; WEINSTEIN, 2013).

Em casos de microdanos ao tecido ósseo, a apoptose de osteócitos no local do dano desempenha um direcionamento na remodelação óssea, induzindo resposta osteoclástica (VERBORGT; GIBSON; SCHAFFLER, 2000). Um mecanismo semelhante ocorre após a diminuição de E₂ no organismo (TOMKINSON et al., 1998). Em estudo utilizando ratas OVX e marcação por imuno-histoquímica para caspase-3 clivada (caspase efetora, marcadora de morte celular programada), observou-se elevação da apoptose de osteócitos no córtex diafisário femoral dos animais até 14 dias após a cirurgia. Entretanto, 21 dias após a OVX, a apoptose não foi significativamente diferente entre os grupos (EMERTON et al., 2010), demonstrando estabilização da morte celular dos osteócitos nos animais nesse período. Uma vez que, no presente trabalho, a contagem celular foi feita 67 dias após a OVX, é possível que não se observou diferença na quantidade de osteócitos entre os grupos devido ao período analisado.

Os osteoblastos são derivados de células-tronco mesenquimais (MSC), sua diferenciação e proliferação depende da expressão de genes específicos – incluindo Runx2, e a síntese de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). O extrato de amoreira foi capaz de aumentar o número de osteoblastos, o que corrobora com os resultados do μ CT, indicando que o extrato possui ação osteoprotetora, sendo capaz de prevenir a perda óssea.

Apesar de não haver relatos na literatura dos efeitos da amoreira-preta sobre os osteoblastos, ela possui fitoestrógenos, os quais demonstram atividade protetora ao metabolismo ósseo na literatura. Daidzeína é capaz de aumentar o crescimento de osteoblastos por meio da regulação positiva da expressão de BMP em células de osteoblastos primários (JIA et al., 2003). Equinacosídeo é um componente bioativo derivado de das espécies *Echinacea* e *Cistanche*, popularmente usado para curar disfunções reprodutivas e aumentar a atividade sexual na medicina tradicional chinesa (JIANG et al., 2018). Esse composto, purificado de extrato etanólico de *Cistanche tubulosa* (Schenk) R. Wight em animais OVX (90 mg/kg e 270 mg/kg), demonstrou ação protetora com a melhora de parâmetros que incluíram o aumento do número de osteoblastos, provavelmente atuando pela ativação de ERs (LI et al., 2013). O extrato de romã contendo sementes possui isoflavonas, como genisteína e daidzeína, e coumesterol, e sua administração em animais OVX (0,01 ml/g) demonstrou ser capaz de restaurar a quantidade de osteoblastos aos níveis normais, indicando a inibição da renovação óssea estimulada pela falta de ação estrogênica (MORI-OKAMOTO et al., 2004).

O tratamento de animais OVX com extrato aquoso de *Morus Alba* L. (concentração de 0,5% e 1%) aumentou a expressão de Runx2, demonstrando uma possível ação na elevação da diferenciação de osteoblastos (JAO et al., 2016). É possível que o maior número de osteoblastos nos ossos dos animais tratados com o extrato de amoreira-preta seja devido à alteração na expressão de fatores responsáveis pela diferenciação dessas células.

A diminuição da concentração de E₂ no organismo acarreta em um desequilíbrio entre a quantidade de osteoclastos e osteoblastos no tecido ósseo, elevando a reabsorção óssea (MIYAMOTO, 2015). Dentre a complexa regulação do metabolismo ósseo, os osteoblastos imaturos e maduros controlam a diferenciação de osteoclastos e seu grau de atividade (LEMAIRE et al., 2004). O uso de substâncias que estimulam o metabolismo ósseo e elevam a quantidade de osteoblastos pode, indiretamente, aumentar o número de células osteoclásticas, através da maior expressão de RANKL (MUHAMMAD et al., 2018). O aumento do número de osteoclastos nos ossos dos animais tratados com extrato de amoreira-

preta, acompanhado dos outros resultados obtidos no presente trabalho, indicam que os osteoclastos presentes no tecido podem não ser maduros e não estarem efetivamente elevando a reabsorção óssea em relação à formação, visto que não houve perda óssea nesses animais. Para confirmação dessa hipótese, faz-se necessário mais estudos para a análise de quantidades de citocinas de reabsorção, como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (PACIFI, 2001).

Na matriz extracelular inorgânica do tecido ósseo, destacam-se os cristais inorgânicos (LEMAIRE et al., 2004). Em conjunto com a matriz orgânica, ambas contribuem para o desenvolvimento e função normal do esqueleto, liberando moléculas que atuam na atividade das células ósseas, promovendo remodelação óssea (NEEL et al., 2016; SHARMA et al., 2019). Cálcio, Fósforo, Magnésio, Flúor, Enxofre, Potássio e Sódio são minerais essenciais para saúde óssea, presentes na matriz extracelular inorgânica (MCKEE; COLE, 2012). Os ossos são mineralizados por cristais de hidroxiapatita, formados por íons cálcio e fosfato ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), conferindo rigidez e resistência ao tecido (AN et al., 2016). O magnésio é um cofator importante para as enzimas que participam da síntese da matriz (GLASDAM; GLASDAM; PETERS, 2016). A deficiência de E_2 leva a alteração na distribuição desses minerais e redução da mineralização (NEEL et al., 2016; SHARMA et al., 2019). A carência de Ca^{+2} , P e Mg^{+2} no organismo pode resultar em raquitismo em crianças, osteomalacia (desmineralização de ossos maduros), osteopenia e osteoporose (DENG et al., 2020; GLASDAM; GLASDAM; PETERS, 2016; VORLAND et al., 2017).

Em mulheres pós-menopausa, a concentração de cálcio sérico demonstra-se reduzida (BHATTARAI et al., 2014). E_2 desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase do cálcio no organismo, e a alta ingestão de cálcio potencializa esse efeito na massa óssea (JIAO et al., 2020; NIEVES et al., 1998). No presente trabalho, os animais OVX suplementados com extratos de linhaça ou amoreira demonstraram porcentagem significativamente maior de Ca^{+2} , P e Mg^{+2} que os animais que receberam salina. É possível que o cálcio presentes nos extratos tenha intensificado o efeito dos fitoestrógenos no metabolismo ósseo, uma vez que as folhas de amoreira, *Morus* spp., apresenta elevado conteúdo de minerais que incluem cálcio, fósforo e magnésio (AKBULUT; ÖZCAN, 2009; WANG et al., 2017). Em estudo feito com pó de amoreira, *Morus Alba* L., demonstrou-se que o conteúdo de cálcio é maior do que o presente no leite, produtos de soja e no queijo (DENG et al., 2020). Similarmente, a linhaça possui mais cálcio do que outros vegetais ricos

em proteínas, além de ser rica em magnésio e fósforo (KONONKO et al., 1986; MATTILA et al., 2018; XING et al., 2014).

Outro fator importante na manutenção da matriz óssea é a fosfatase alcalina (ALP), enzima importante na mineralização óssea, considerada biomarcador de formação óssea amplamente utilizado, pois está presente no estágio inicial de diferenciação do osteoblasto maduro (DELMAS et al., 2000). Elevada atividade de ALP pode indicar um maior número de osteoblastos em processo de diferenciação (MA'ARIF; AGIL; LASWATI, 2018). Após a depleção de E₂ em mulheres pós-menopausa, a ALP apresenta-se deficiente, acompanhada do processo de perda óssea (DOVENTAS et al., 2015). O tratamento com o fitoestrógeno genisteína (54 mg) foi capaz de aumentar a concentração plasmática de ALP em mulheres pós-menopausa, semelhantemente às tratadas com estrogênio (MORABITO et al., 2002). Em estudos com animais, demonstrou-se que isoflavona elevou a expressão de ALP, assim como osteocalcina e Runx2, por meio da ligação com ER α e subsequente maturação de osteoblastos (SOUNDHARRAJAN et al., 2019; WU et al., 2020). A fosfatase alcalina plasmática dos animais suplementados com os extratos de linhaça ou amoreira, no presente estudo, demonstraram maiores concentrações em relação aos animais que receberam salina. Isso indica que os extratos utilizados apresentaram ação na formação óssea, suprimindo a ação osteoclastogênica promovida pela falta de ação estrogênica, provavelmente devido as quantidades relativas de compostos fenólicos encontrados nos mesmos, dentre eles fitoestrógenos, e da alta atividade anti-oxidativa presente nos extratos (dados do laboratório ainda não publicados).

Conclusão

Os resultados do presente trabalho sugerem que os extratos de linhaça ou amoreira foram capazes de exercer efeitos protetores no metabolismo ósseo de animais sem ação estrogênica, ações essas observadas nas alterações morfométricas, histológicas e na quantificação da atividade de fosfatase alcalina óssea e minerais, com resultados benéficos para saúde óssea em relação aos animais que receberam apenas salina. Assim sugere-se que a suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira possa prevenir a perda óssea causada pela falta de ação estrogênica em ratas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Universidade Federal de Lavras (UFLA), Brasil.

Conflito de interesse

Os autores declaram nenhum conflito de interesse.

Referências Bibliográficas

- ABIRAMASUNDARI, G.; MOHAN GOWDA, C. M.; SREEPRIYA, M. Selective Estrogen Receptor Modulator and prostimulatory effects of phytoestrogen β -ecdysone in *Tinospora cordifolia* on osteoblast cells. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 9, n. 3, p. 161–168, 2018.
- ADLERCREUTZ, H. Lignans and Human Health. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 44, n. 5–6, p. 483–525, 2007.
- AKBULUT, M.; ÖZCAN, M. M. Comparison of mineral contents of mulberry (*Morus* spp.) fruits and their pekmez (boiled mulberry juice) samples. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 3, p. 231–239, jan. 2009.
- ALMEIDA, M. et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. **Physiol Rev.**, v. 97, n. 1, p. 135–187, 2017.
- ALVARADO-GARCÍA, A. et al. Clinical practice guideline. Diagnosis and treatment of postmenopausal and perimenopausal. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc**, v. 53, n. 2, p. 214–225, 2015.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006.
- AMZALEG, A. Y. et al. Estrogens and selective estrogen receptor modulators differentially antagonize Runx2 in ST2 mesenchymal progenitor cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 183, p. 10–17, 2018.
- AN, J. et al. Mineralization processes in hard tissue: Bone. In: **Osteoporosis**. [s.l: s.n.]. p. 235–255.
- ANDERSEN, T. L. et al. A Physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 239–247, jan. 2009.
- ANDERSON, J. J. B.; GAMER, S. C.; HILL, C. The effects of phytoestrogens on bone. **Nutrition Research**, v. 17, n. 10, p. 1617–1632, 1997.
- ANJANEYULU, K. et al. Beneficial Role of Hydro-alcoholic Seed Extract of *Trigonella foenum graecum* on Bone Structure and Strength in Menopause Induced Osteopenia. **Ethiopian journal of health sciences**, v. 28, n. 6, p. 787–794, 2018.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acesso em: 30 dez. 2020.
- ANVISA. Formulário de Fitoterápicos. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1ª edição, p. 157, 2018.
- ARCORACI, V. et al. Antiosteoporotic activity of genistein aglycone in postmenopausal women: Evidence from a post-hoc analysis of a multicenter randomized controlled trial. **Nutrients**, v. 9, n. 2, 2017.
- BAKKER, C. M. J. DE et al. Structural Adaptations in the Rat Tibia Bone Induced by Pregnancy and Lactation Confer Protective Effects Against Future Estrogen Deficiency Chantal. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 12, p. 2165–2176, 2018.
- BALDOCK, P. A. J. et al. Discordance Between Bone Turnover and Bone Loss: Effects of Aging and Ovariectomy in the Rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 8, p. 1442–1448, 1999.
- BAUD'HUIN, M. et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, n. 5, p. 401–409, 2013.
- BEKHIT, A. E. A. et al. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Flaxseed: Composition, detoxification, utilization, and opportunities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 129–152, 2018.
- BHATTARAI, T. et al. Correlation of common biochemical markers for bone turnover, serum

- calcium, and alkaline phosphatase in post-menopausal women. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 58–61, 2014.
- BILEZIKIAN, J. P. et al. Increased Bone Mass as a Result of Estrogen Therapy in a Man with Aromatase Deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 9, p. 599–603, 1998.
- BOLZAN, V. C. **EFEITO DO EXTRATO DAS FOLHAS DA *Morus nigra* SOBRE A CITOLOGIA VAGINAL E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS EM RATAS WISTAR**. [s.l.] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2008.
- BOULBAROUD, S. et al. Preventive Effects of Flaxseed and Sesame Oil on Bone Loss in Ovariectomized Rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 13, p. 1696–1701, 15 jun. 2008.
- BRIOT, K.; ROUX, C. Post-menopausal osteoporosis: Up-to-date. **Rev Med Interne**, v. 5067, p. 6–11, 2015.
- CARLSON, B. M. The Endocrine System. In: **The Human Body**. [s.l.: s.n.]. p. 241–269.
- CARREAU, C.; FLOURIOT, G.; BENNETAU-PELISSERO, C. Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER α transcriptional activation in human breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 110, p. 176–185, 2008.
- CASTRO, L. A. S. DE. Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura. **Embrapa Clima Temperado**, p. 37p, 2001.
- CAULEY, J. A.; CRANDALL, C. The Women's Health Initiative: A Landmark Resource for Skeletal Research Since 1992. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 35, n. 5, p. 845–860, maio 2020.
- CAVALCANTE, C. F. E.; SILVA, C. P. DA. EFEITOS DAS FOLHAS, CASCAS, RAÍZES E FRUTOS DA AMOREIRA (*Morus Nigra* L.) UTILIZADOS COMO FITOTERÁPICO NA MEDICINA POPULAR. **Conexão**, p. 1–4, 2012.
- CEDERROTH, C. R.; ZIMMERMANN, C.; NEF, S. Molecular and Cellular Endocrinology Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, n. 2, p. 192–200, 2012.
- CHAPPARD, D. et al. Trabecular bone microarchitecture: A review. **Morphologie**, v. 92, p. 162–170, 2008.
- CHEN, F. et al. Flaxseed oil ameliorated high-fat-diet-induced bone loss in rats by promoting osteoblastic function in rat primary osteoblasts. **Nutrition & Metabolism**, v. 16, n. 71, p. 1–13, 2019.
- CHEN, H.; LI, J.; WANG, Q. Associations between bone-alkaline phosphatase and bone mineral density in adults with and without diabetes. **Medicine**, v. 97, n. 17, p. 1–7, 2018.
- CHEUNG, A. M. et al. Perimenopausal and Postmenopausal Health. **BMC Women's Health**, v. 14, p. 1–14, 2004.
- CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. Supplement 3, p. S131–S139, nov. 2008.
- CLYNES, M. A. et al. The epidemiology of osteoporosis. **British Medical Bulletin**, p. ldaa005, 13 abr. 2020.
- COHEN, S. L.; WARD, W. E. Flaxseed Oil and Bone Development in Growing Male and Female Mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 68, n. 21, p. 1861–1870, nov. 2005.
- CORRÊA, L. B. N. S. et al. Influence of prolonged flaxseed (*Linum usitatissimum*) consumption over epididymis and testicle histoarchitecture of Wistar rats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 650–656, 2017.
- COSTA, J. C. et al. Effects of *Morus nigra* L. in Bone Healing. **Journal of Morphological**

- Sciences**, v. 36, n. 4, p. 286–290, 2019.
- COSTA, J. P. L. et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of *Morus nigra* L. (black mulberry) leaf powder on symptoms and quality of life among climacteric women. **Int J Gynaecol Obstet.**, v. 148, n. 2, p. 243–252, 2020.
- CURYLOFO-ZOTTI, F. A. et al. Differential effects of natural Curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 91, p. 42–50, 2018.
- DALAL, P. K.; AGARWAL, M.; PRADESH, U. Postmenopausal syndrome. **Indian J Psychiatry.**, v. 57, n. 2, p. 222–232, 2015.
- DE VICTORIA, E. M. Calcium, essential for health. **Nutr Hosp**, v. 33, n. 4, p. 26–31, 2016.
- DELMAS, P. D. et al. The Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 11, n. 0, p. S2–S17, 1 dez. 2000.
- DENG, L. et al. Effect of the mixture of mulberry leaf powder and KGM flour on promoting calcium absorption and bone mineral density in vivo. **J Science Food Agric**, v. 100, n. 3587–3597, 2020.
- DESMAWATI, D.; SULASTRI, D. Phytoestrogens and Their Health Effect. **Open Access Maced J Med Sci**, v. 7, n. 3, p. 495–499, 2019.
- DING, M.; HVID, I. Quantification of Age-Related Changes in the Structure Model Type and Trabecular Thickness of Human Tibial Cancellous Bone. **Bone**, v. 26, n. 3, p. 291–295, 2000.
- DO, S. H. et al. Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. **Menopause**, v. 15, n. 4, p. 676–683, jul. 2008.
- DONG, P. et al. 3D osteocyte lacunar morphometric properties and distributions in human femoral cortical bone using synchrotron radiation micro-CT images. **Bone**, v. 60, p. 172–185, 2014.
- DOVENTAS, A. et al. Interrelationships between obesity and bone markers in postmenopausal women with either obesity or osteoporosis. **European Geriatric Medicine**, v. 6, n. 1, p. 15–20, 2015.
- EMERTON, K. B. et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. **Bone**, v. 46, n. 3, p. 577–583, mar. 2010.
- ERIKSEN, E. F. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, v. 241, n. 4861, p. 84–86, 1988.
- FERNANDES, G.; LAWRENCE, R.; SUN, D. Protective role of n-3 lipids and soy protein in osteoporosis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 6, p. 361–372, jun. 2003.
- FERNÁNDEZ-TORRES, J. et al. Review article Role of HIF-1 α signaling pathway in osteoarthritis : **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 57, n. 2, p. 162–173, 2016.
- FISHMAN, J.; GALLAGHER, T. F.; BRADLOW, H. L. Oxidative metabolism of estradiol. v. 235, p. 3104–7, nov. 1960.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue : Structure , Function , and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.
- FRANKENFELD, C. L. et al. Postmenopausal bone mineral density in relation to soy isoflavone-metabolizing phenotypes. **Maturitas**, v. 53, n. 3, p. 315–324, fev. 2006.
- FU, M. et al. Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts in vitro. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 2, p. 129–134, 2012.
- FU, S. et al. Systematic review and meta-analysis of the bone protective effect of phytoestrogens on osteoporosis in ovariectomized rats. **Nutrition Research**, v. 34, n. 6, p. 467–477, 2014.
- FUENTES, N. et al. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Adv Protein Chem Struct Biol.**, v. 116, p. 135–145, 2019.
- FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. In: **Intracellular**

- Signalling Proteins**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 116p. 135–170.
- FUJISAWA, R.; TAMURA, M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, p. 1891–1903, 2012.
- GALLIERA, E.; ROMANELLI, M. M. C. Molecular Basis of Bone Diseases. In: **Molecular Pathology**. [s.l.: s.n.]. p. 627–649.
- GALVÃO, E. L. et al. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça Evaluation of the antioxidant potential and sub-critical extraction of linseed oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 551–557, 2008.
- GENANT, H. K. et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 10, n. 4, p. 259–264, 1999.
- GERBARG, P. L.; BROWN, R. P. Pause menopause with *Rhodiola rosea*, a natural selective estrogen receptor modulator. **Phytomedicine**, v. 23, n. 7, p. 763–769, 2016a.
- GLASDAM, S.; GLASDAM, S.; PETERS, G. H. The Importance of Magnesium in the Human Body : A Systematic Literature Review. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 73, p. 169–193, 2016.
- GLASER, D. L.; KAPLAN, F. S. Osteoporosis: Definition and Clinical Presentation. **Spine**, v. 22, n. 24, p. 12–16, 1997.
- GUIZZO, P. L. et al. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 36, n. 2, p. 259–265, 2015.
- GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª Edição ed. [s.l.: s.n.].
- HAGGANS, C. J. et al. The Effect of Flaxseed and Wheat Bran Consumption on Urinary Estrogen Metabolites in Premenopausal Women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, n. July, p. 719–725, 2000.
- HAGGANS, C. J. et al. The Effect of Flaxseed and Wheat Bran Consumption on Urinary
- HAUGE, E. M. et al. Cancellous Bone Remodeling Occurs in Specialized Compartments Lined by Cells Expressing Osteoblastic Markers. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 9, p. 1575–1582, 1 set. 2001.
- HAYASHI, M. et al. Osteoprotection by semaphorin 3A. **Nature**, v. 485, n. 7396, p. 69–74, maio 2012.
- HAYASHI, M. et al. Autoregulation of Osteocyte Sema3A Orchestrates Estrogen Action and Counteracts Bone Aging. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 627- 637.e5, mar. 2019.
- HEANEY, R. P.; RECKER, R. R.; SAVILLE, P. D. Calcium balance and calcium requirements in middle-aged women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1603–1611, 1977.
- HEISS, G. et al. Health risks and benefits 3 years after stopping randomized treatment with estrogen and progestin. **JAMA**, v. 299, p. 1036–45, 2008.
- HONOUR, J. W. Biochemistry of the menopause. **Annals of Clinical Biochemistry Manuscript**, v. 55, n. 1, p. 18–33, 2018.
- HORCAJADA, M. et al. Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strength in young and adult intact rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 648–654, 2008.
- HSU, L. H.; CHU, N. M.; KAO, S. H. Estrogen, estrogen receptor and lung cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1–17, 2017a.
- HWANG, J.-Y. et al. Association of PLXNA2 polymorphisms with vertebral fracture risk and bone mineral density in postmenopausal Korean population. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 11, p. 1592–1601, 29 set. 2006.
- IRIE, M. S. et al. Use of Micro-Computed Tomography for Bone Evaluation in Dentistry. **Braz Dent J**, v. 29, n. 3, p. 227–238, 2018.
- IVANOVA, S. et al. OSTEOPOROSIS: THERAPEUTIC OPTIONS. **Osteoporosis:**

Therapeutic Options, v. 57, n. 3 & 4, p. 181–190, 2015.

JAO, H.-Y. et al. Mulberry water extract regulates the osteoblast/osteoclast balance in an ovariectomic rat model. **Food & Function**, v. 7, n. 12, p. 4753–4763, 2016.

JEFFERSON, W. N.; WILLIAMS, C. J. Circulating levels of genistein in the neonate , apart from dose and route , predict future adverse female reproductive outcomes. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 272–279, 2011.

JIA, T.-L. et al. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 709–715, mar. 2003.

JIANG, Z. et al. Echinacoside Increases Sperm Quantity in Rats by Targeting the Hypothalamic Androgen Receptor. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3839, dez. 2018.

JIAO, L. et al. Estrogen and calcium handling proteins: new discoveries and mechanisms in cardiovascular diseases. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 318, n. 4, p. H820–H829, 1 abr. 2020.

JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 264–271, jun. 2013.

JOANN, V.; PINKERTON, M. D. Hormone Therapy for Postmenopausal Women. **N Engl J Med**, v. 382, p. 446–455, 2020.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. [s.l.] São Paulo: Editora Santos, 1983.

KALDER, M.; HADJI, P. Breast Care Breast Cancer and Osteoporosis – Management of Cancer Treatment-Induced Bone Loss in Postmenopausal Women with Breast Cancer. **Breast Care**, v. 9, p. 312–317, 2014.

KATSIMBRI, P. The biology of normal bone remodelling. **Eur J Cancer Care**, v. 26, n. 6, p. 1–5, 2017.

KHALIFA, I. et al. Polyphenols of mulberry fruits as multifaceted compounds : Compositions , metabolism , health benefits, and stability — A structural review. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 28–43, 2018.

KHOSLA, S.; MONROE, D. G. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 1, p. a031211, jan. 2018.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576–581, nov. 2012.

KLEIN-NULEND, J.; BONEWALD, L. F. The osteocyte. In: **Principles of Bone Biology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 133–162.

KONDOH, S. et al. Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. **Bone**, v. 60, p. 68–77, mar. 2014.

KONONKO, L. N. et al. Mineral composition of the protein concentrates made from nontraditional raw plant materials. v. 2, p. 69–72, abr. 1986.

KWESI, C. et al. Bioprocessing of Functional Ingredients from Flaxseed. **Molecules**, v. 23, p. 1–18, 2018.

LAGARI, V. S.; LEVIS, S. Phytoestrogens and bone health. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 17, n. 6, p. 546–553, 2010.

LAGARI, V. S.; LEVIS, S. Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, p. 1–8, 2013.

LANE, N. E. et al. Early Estrogen Replacement Therapy Reverses the Rapid Loss of Trabecular Bone Volume and Prevents Further Deterioration of Connectivity in the Rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 2, p. 206–214, 1999.

LEGETTE, L. L. et al. Supplemental Dietary Racemic Equol Has Modest Benefits to Bone but Has Mild Uterotropic Activity in Ovariectomized Rats 1 – 3. **J. Nutr.**, v. 139, p. 1908–1913, 2009.

LEMAIRE, V. et al. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. **Journal of Theoretical Biology**, v. 229, n. 3, p. 293–309, ago. 2004.

LEWIECKI, E. M. Osteoporosis: Clinical Evaluation. **Endotext**, 2018.

LI, F. et al. Antiosteoporotic activity of echinacoside in ovariectomized rats. **Phytomedicine**, v. 20, n. 6, p. 549–557, abr. 2013.

LIANG, H. et al. Lycopene Effects on Serum Mineral Elements and Bone Strength in Rats. **Molecules**, v. 17, p. 7093–7102, 2012.

LIM, S. H.; CHOI, C. Pharmacological Properties of Morus nigra L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. **Nutrients**, v. 11, n. 437, p. 1–18, 2019.

LIU, C. C. et al. Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Bone Loss. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 4, p. 670–680, 2015a.

LIU, D. et al. Serum Sema3A Is in a Weak Positive Association With Bone Formation Marker Osteocalcin But Not Related to Bone Mineral Densities in Postmenopausal Women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 12, p. E2504–E2509, dez. 2014.

LIU, H. et al. Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. **BioMed Research International**, 2017.

LIU, J. et al. Effect of long-term intervention of soy iso flavones on bone mineral density in women : A meta-analysis of randomized controlled trials. **Bone**, v. 44, n. 5, p. 948–953, 2009.

LIU, Z. et al. Distributional Variations in Trabecular Architecture of the Mandibular Bone : An In Vivo Micro-CT Analysis in Rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015.

LOBO, R. A. et al. Prevention of diseases after menopause. **Climacteric**, p. 540–556, out. 2014.

LOCATELLI, V.; BIANCHI, V. E. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–25, 2014.

LONGO, A. B.; WARD, W. E. Providing Flaxseed Oil but Not Menhaden Oil Protects against OVX Induced Bone Loss in the Mandible of Sprague-Dawley Rats. **Nutrients**, v. 8, n. 597, p. 1–11, 2016.

LTAIF, M. et al. Protective effects of Avena sativa against oxidative stress-induced kidney damage resulting from an estrogen deficiency in ovariectomized Swiss mice model. **Journal of Food Biochem.**, p. 1–13, 2020.

MA, H. et al. Icarin and icaritin stimulate the proliferation of SKBr3 cells through the GPER1-mediated modulation of the EGFR-MAPK signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, p. 1627–1634, 2014.

MA, Y.-L. et al. Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. **Journal of Biomechanics**, v. 41, n. 6, p. 1324–1332, 2008.

MA'ARIF, B.; AGIL, M.; LASWATI, H. Alkaline Phosphatase Activity of Marsilea crenata Presl. Extract and Fractions as Marker of MC3T3-E1 Osteoblast Cell Differentiation. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 2018.

MAES, C.; CARMELIET, G.; SCHIPANI, E. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 6, p. 358–366, 2012.

MAÍRA, D. C. DE A. et al. Flaxseed (linum usitatissimum) flour contributes to bone health in adult male rats. **Nutrition**, v. 49, p. 48–50, maio 2018.

MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells : Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. January, p. 115–137, 2000.

MANOLAGAS, S. C.; BRIEN, C. A. O.; ALMEIDA, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 9, n. 12, p. 699–712, 2014.

MARCUS, R. Post-menopausal osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 3, p. 309–327, 2002.

MARTIN-MILLAN, M. et al. The Estrogen Receptor- α in Osteoclasts Mediates the Protective Effects of Estrogens on Cancellous But Not Cortical Bone Generation of ER α LysM^{-/-} mice. **Mol Endocrinol**, v. 24, n. 2, p. 323–334, 2010.

MATTILA, P. et al. Nutritional Value of Commercial Protein-Rich Plant Products. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 108–115, jun. 2018.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. v. 34, n. 3, p. 309–338, 2013.

MCCARTNEY, C. R.; MARSHALL, J. C. **Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology**. 8ª Edição ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

MCKEE, M. D.; COLE, W. G. Bone Matrix and Mineralization. In: **Pediatric Bone**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. p. 9–37.

MEDERLE, O. A. et al. Correlations between bone turnover markers, serum magnesium and bone mass density in postmenopausal osteoporosis. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 1383–1389, 2018.

MESSINA, M. J.; WOOD, C. E. Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: Analysis and commentary. **Nutrition Journal**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2008.

MIRANDA, M. A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres. **HU Revista**, v. 36, n. 1, p. 61–68, 2010.

MIYAMOTO, T. Mechanism Underlying Post-menopausal Osteoporosis : HIF1 α is Required for Osteoclast Activation by Estrogen Deficiency. **Keio J Med**, v. 64, n. 3, p. 44–47, 2015.

MORABITO, N. et al. Effects of Genistein and Hormone-Replacement Therapy on Bone Loss in Early Postmenopausal Women: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 10, p. 1904–1912, 1 out. 2002.

MORI-OKAMOTO, J. et al. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 93–101, maio 2004.

MORITO, K. et al. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β . **Biol. Pharm. Bull**, v. 24, n. 4, p. 351–356, 2001.

MUHAMMAD, A. et al. Postmenopausal osteoporosis and breast cancer: The biochemical links and beneficial effects of functional foods. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, p. 571–582, 2018.

NAKAMURA, H. Review Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells. **Journal of Hard Tissue Biology**, v. 16, n. 1, p. 15–22, 2007.

NEEL, ENSANYA A. A. et al. Demineralization – remineralization dynamics in teeth and bone. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4743–4763, 2016.

NIAN, H. et al. Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. **Phytomedicine**, v. 16, p. 320–326, 2009.

NIEVES, J. W. et al. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: review and analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 18–24, 1 jan. 1998.

NIKANDER, E. et al. Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 3, p. 1207–1212, 2004.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of Estrogen Action. **Physiol Rev.**, v. 81, n. 4, p. 1535–1565, 2001.

OCCHIUTO, F. et al. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 2, p. 130–134, fev. 2007.

OKAMOTO, M. et al. Conditional Deletion of *Bmpr1a* in Differentiated Osteoclasts Increases Osteoblastic Bone Formation, Increasing Volume of Remodeling Bone in Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 10, p. 2511–2522, 2011.

ONO, T.; NAKASHIMA, T. Recent advances in osteoclast biology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 325–341, 2018.

PACIFI, R. Mechanisms of Estrogen Action in Bone. In: EDITION, 3RD (Ed.). . **Principles of Bone Biology**. [s.l: s.n.]. p. 921–933.

PADILHA, M. M. et al. Artigo Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta ,. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. June, p. 621–626, 2010.

PARIKH, M.; NETTICADAN, T.; PIERCE, G. N. Flaxseed: its bioactive components and their cardiovascular benefits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** **314**:, v. 314, n. 25, p. 146–159, 2020.

PATISAUL, H. B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. **Front Neuroendocrinol.**, v. 31, n. 4, p. 400–419, 2010.

PENG, S. et al. Effect of Epimedium-derived Phytoestrogen on Bone Turnover and Bone Microarchitecture in OVX-induced Osteoporotic Rats. **J Huazhong Univ Sci Technol (Medical Sciences)**, v. 28, n. 2, p. 167–170, 2008.

PESSANHA, C. R. et al. Flaxseed flour, compared to flaxseed oil, contributes to femoral structure in male rats subjected to early weaning. **Food & Function**, v. 7, n. 3, p. 1296–1300, 2016.

PETRINE, J. C. P.; DEL BIANCO-BORGES, B. The influence of phytoestrogens on different physiological and pathological processes: An overview. **Phytotherapy Research**, p. 1–18, 2020.

POLUZZI, E. et al. Phytoestrogens in Postmenopause: The State of the Art from a Chemical, Pharmacological and Regulatory Perspective. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 417–436, 2014.

POWER, K. A. et al. Flaxseed and Soy Protein Isolate, Alone and in Combination, Differ in their Effect on Bone Mass, Biomechanical Strength, and Uterus in Ovariectomized Nude Mice with MCF-7 Human Breast Tumor Xenografts. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, n. 22, p. 1888–1896, 9 out. 2007.

QI, S. Synergistic Effects of Genistein and Zinc on Bone Metabolism and the Femoral Metaphyseal Histomorphology in the Ovariectomized Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 183, n. 2, p. 288–295, 2017.

RAHMAN, M. S. et al. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: Regulation of osteoblastogenesis and bone formation. **Bone Research**, v. 3, n. April 2016, 2015.

RENTSCH, C. et al. Comprehensive histological evaluation of bone implants. **Biomatter**, v. 4, p. 1–11, 2014.

RIETJENS, I. M. C. M.; LOUISSE, J.; BEEKMANN, K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1263–1280, 2017.

ROEDER, E.; MATTHEWS, B. G.; KALAJZIC, I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. **Bone**, v. 92, p. 189–195, 2017.

RUTKOVSKIY, A.; STENSLØKKEN, K.-O.; VAAGE, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 22, p. 95–106, 2016.

SACCO, S. M. et al. Flaxseed combined with low-dose estrogen therapy preserves bone tissue in ovariectomized rats. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v. 16, n. 3, p. 545–554, 2009.

SACCO, S. M. et al. Flaxseed enhances the beneficial effect of low-dose estrogen therapy at reducing bone turnover and preserving bone microarchitecture in ovariectomized rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 7, p. 801–810, 2014.

SANCHES-SALCEDO, E. et al. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white

(*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves : Their potential for new products rich in phytochemicals. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1039–1046, 2015.

SANTOS, C. S. DOS; NETO, A. A. Caracterização química de amostras minerais por espectrometria de absorção atômica. p. 1–4, 2015.

SAWANT, S. H.; BODHANKAR, S. L. Flax lignan concentrate reverses alterations in blood pressure , left ventricular functions , lipid profile and antioxidant status in DOCA-salt induced renal hypertension in rats. **Renal Failure**, v. 6049, n. January, 2016.

SCOTT, A. A. J.; KNOTT, M. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507–512, 1974.

SHAO, Y. et al. Bone phosphorus retention and bone development of broilers at different ages. **Poultry Science**, v. 0, p. 1–8, 2019.

SHAPIRO, F. Developmental Bone Biology. In: **Pediatric Orthopedic Deformities, Volume 1**. [s.l.] Academic Press. San Diego, 2001. p. 3–128.

SHARMA, D. et al. The Effects of Estrogen Deficiency on Cortical Bone Microporosity and Mineralization. **Bone**, v. 110, p. 1–10, 2019.

SHEN, C. L. et al. Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. **Osteoporos Int**, v. 19, n. 7, p. 979–990, 2008.

SHEN, C. L. et al. Green tea polyphenols mitigate deterioration of bone microarchitecture in middle-aged female rats ☆. **Bone**, v. 44, n. 4, p. 684–690, 2009.

SHETTY, S. et al. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 846, 2016.

SHIM, Y. Y. et al. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 5–20, 2014.

SILVA, S. D. N. **ATIVIDADE FITOESTROGÊNICA DE *Morus nigra* L ., MORACEAE EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**. [s.l.] Universidade Federal do Maranhão, 2012.

SIMS, N. A.; MARTIN, T. J. The osteoblast lineage: its actions and communication mechanisms. In: **Principles of Bone Biology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 23p. 89–110.

SINGH, K. K. et al. Flaxseed: A Potential Source of Food, Feed and Fiber. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 2010–222, 2011.

SIROTKIN, A. V. Phytoestrogens and their effects. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, n. 1, p. 230–236, 2014.

SMITH, E. P. et al. Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 16, p. 1056–1061, 1994.

SNYMAN, L. Menopause-related osteoporosis. **South African Family Practice**, v. 56, n. 3, p. 174–177, 2014.

SOUNDHARRAJAN, I. et al. Modulation of osteogenic and myogenic differentiation by a phytoestrogen formononetin via p38MAPK-dependent JAK-STAT and Smad-1/5/8 signaling pathways in mouse myogenic progenitor cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9307, dez. 2019.

SOUZA, G. R. et al. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 248–254, 17 ago. 2017.

SOUZA, V. R. et al. Description of Ovariectomy Protocol in Mice. In: PRESS, H. (Ed.). **Pre-Clinical Models. Techniques and Protocols**. Nova Yorque, NY: [s.n.]. v. 1916p. 303–309.

SÖZEN, T.; ÖZİŞİK, L.; BAŞARAN, N. Ç. An overview and management of osteoporosis. **European Journal of Rheumatology**, v. 4, p. 46–56, 2017.

STEVENSON, J. C. Justification for the use of HRT in the long-term prevention of osteoporosis. **Matirutas**, v. 51, p. 113–126, 2005.

ŠTULÍKOVÁ, K. et al. Therapeutic Perspectives of 8-Prenylnaringenin, a Potent Phytoestrogen from Hops. **Molecules**, v. 23, n. 660, p. 1–13, 2018.

SZADOWSKA-SZLACHETKA, Z. C. et al. Intensity of menopausal symptoms and quality of life in climacteric women. **Menopause Review**, v. 18, n. 4, p. 217–221, 2019.

TAKAHASHI, T. A.; JOHNSON, K. M. Menopause. **Med Clin N Am**, v. 99, p. 521–534, 2015.

TETI, A. Bone Development: Overview of Bone Cells and Signaling. **Current Osteoporosis Reports**, v. 9, n. 4, p. 264–273, dez. 2011.

TOMKINSON, A. et al. The Role of Estrogen in the Control of Rat Osteocyte Apoptosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 8, p. 1243–1250, 1 ago. 1998.

USUI, M. et al. Tob deficiency superenhances osteoblastic activity after ovariectomy to block estrogen deficiency-induced osteoporosis. **PNAS**, v. 101, n. 17, p. 6653–6658, 2004.

VERBORGT, O.; GIBSON, G. J.; SCHAFFLER, M. B. Loss of Osteocyte Integrity in Association with Microdamage and Bone Remodeling After Fatigue In Vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 1, p. 60–67, 1 jan. 2000.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415–422, 1999.

VIRK-BAKER, M. K.; NAGY, T. R.; BARNES, S. Role of phytoestrogens in cancer therapy. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1132–1142, 2013.

VORLAND, C. J. et al. Effects of Excessive Dietary Phosphorus Intake on Bone Health. **Curr Osteoporosis Rep**, v. 15, n. 5, p. 473–482, 2017.

VRTAČNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 3, p. 329–342, 2014.

WANG, C. et al. Nutritive Value of Mulberry Leaf Meal and its Effect on the Performance of 35-70-Day-Old Geese. **The Journal of Poultry Science**, v. 54, n. 1, p. 41–46, 2017.

WARD, W. E. et al. Exposure to purified lignan from flaxseed (*Linum usitatissimum*) alters bone development in female rats. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. 4, p. 499–505, out. 2001.

WARDELL, S. E.; MCDONNELL, D. P.; NELSON, E. R. Regulation of Bone Cell Function by Estrogens. In: **Osteoporosis**. Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 329–344.

WATKINS, B. et al. Protective actions of soy isoflavones and n-3 PUFAs on bone mass in ovariectomized rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 8, p. 479–488, ago. 2005.

WATKINS, B. A.; LI, Y.; SEIFERT, M. F. Dietary ratio of n-6 / n-3 PUFAs and docosahexaenoic acid : actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats. **Journal of Nutritional Biochemistry** 1, v. 17, p. 282–289, 2006.

WONG, W. W. et al. Soy isoflavone supplementation and bone mineral density in menopausal women: a 2-y multicenter clinical trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n. 5, p. 1433–1439, 1 nov. 2009.

WU, G.-J. et al. Genistein Improves Bone Healing via Triggering Estrogen Receptor Alpha-Mediated Expressions of Osteogenesis-Associated Genes and Consequent Maturation of Osteoblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 39, p. 10639–10650, 30 set. 2020.

XING, L. et al. Principal Component Analysis of Mineral Elements and Fatty Acids Composition in Flaxseed from Ten Different Regions. **Principal Component Analysis of Mineral Elements and Fatty Acids Composition in Flaxseed from Ten Different Regions**, v. 34, n. 9, p. 2538–43, set. 2014.

XU, S. et al. G Protein-Coupled Estrogen Receptor : A Potential Therapeutic Target in Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. October, p. 1–12, 2019.

ZENI, A. L. B. et al. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2805–2815, 7 dez. 2017.

ZHAO, W. et al. Action mechanism of Zuo Gui Yin Decoction ' s promotion on estradiol production in rats during the peri-menopausal period. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 1, p. 122–129, 2011.