

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA (FOA)  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS/SBFis

**LUÍS FERNANDO GADIOLI DOS SANTOS**

**A INFLUÊNCIA DA OCITOCINA E DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE  
OCITOCINA NO METABOLISMO ÓSSEO, ESTRESSE OXIDATIVO, PADRÕES  
DA MARCHA E ANÁLISE DO TIPO ANSIOSO DE RATAS SENESCENTES**

**ARAÇATUBA**

**2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA (FOA)  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS/SBFis

**A INFLUÊNCIA DA OCITOCINA E DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE  
OCITOCINA NO METABOLISMO ÓSSEO, ESTRESSE OXIDATIVO, PADRÕES  
DA MARCHA E ANÁLISE DO TIPO ANSIOSO DE RATAS SENESCENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas/SBFis da Unidade Associada Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

**Área de Concentração:** Fisiologia

**Orientado:** Luís Fernando Gadioli dos Santos

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Cássia Menegati Dornelles

**ARAÇATUBA**

**2020**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237i Santos, Luís Fernando Gadioli dos.  
A influência da ocitocina e do antagonista do receptor de ocitocina no metabolismo ósseo, estresse oxidativo, padrões da marcha e análise do tipo ansioso de ratas senescentes / Luís Fernando Gadioli dos Santos. - Araçatuba, 2021  
80 f. : il ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba  
Orientador: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles

1. Envelhecimento 2. Feminino 3. Osteoporose  
4. Perimenopausa 5. Ocitocina 6. Tocólise 7. Colo do fêmur I. T.

CDD 612

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

## DADOS CURRICULARES

**Nascimento:** 08.02.1985, Araçatuba – SP.

**Filiação:** Vanderlei Garcia dos Santos  
Iselda de Lourdes Gadioli

**2014/2017:** Curso de Graduação em Fisioterapia na Universidade Paulista – UNIP – Araçatuba – SP.

**2018/2020:** Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas/SBFis, curso: Mestrado, na Unidade Associada: Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – FOA – Araçatuba – SP.

## DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus que como Pai amoroso e cuidadoso, desde minha decisão de mudança de vida e troca de realidades, em que deixei de ser trabalhador rural em tempo integral, para ser profissional das ciências da saúde, e assim me entreguei e consagrei todos os meus passos a Ele, que não deixou que eu caminhasse só, ao contrário, Ele me carregou em seus braços, me protegendo e me levando em posição em que nunca imaginei que chagaria.

Dedico a minha Irmã Bruna Gadioli, que sempre me incentivou e acreditou em mim e em minha trajetória de estudos, mesmo 11 anos após minha conclusão do ensino médio, criou meios onde eu poderia continuar estudando e acreditando nisso e hoje, sou o que sou porque ela não desistiu de mim. Suas interseções me capacitaram e me fortaleceram e como um cordeiro dentre lobos, segui caminhando de cabeça erguida e sem medo, pois sabia que ela estaria me pastoreando.

A meu pai Vanderlei Garcia dos Santos, que em meio a tanta simplicidade, sempre torceu por mim, mesmo não sabendo ao certo onde seu filho estava chegando, mostrou-se orgulhoso, dizendo aos amigos: “meu filho é fisioterapeuta e professor”. Lembro-me do dia em que tive uma reunião com meus dois chefes onde trabalho para manter minha bolsa de estudos, ao fim da reunião, não entrando em acordo sobre meus horários de estágio e de trabalho, foi dada a mim a escolha, seguir o estágio e concluir o curso e abrir mão do emprego (o que não poderia, pois perderia a bolsa de estudos e não poderia custear a mensalidade da faculdade) ou trancar a faculdade e seguir trabalhando. Assim que saí da sala de reunião, meu pai, que NUNCA me ligava me ligou e perguntou: como você está? Assim, chorando como nunca havia chorado frente a ele, contei o que tinha acontecido, e ele, como a imagem e semelhança de Deus em minha vida, me disse, segue seus estudos, nada vai te faltar. Dele, que de tão humilde me trouxe tudo, na medida necessária para seguir minha trajetória. No entanto, mais uma vez Deus agiu e consegui conciliar.

A minha mãezinha Iselda de Lourdes Gadioli (*in memorian*), que deu sua vida para que meu pai, minha irmã e eu tivéssemos um futuro melhor. Como eu gostaria de retribuir tudo o que foi e sempre será para mim.

A minha esposa Damáris Raissa Gadioli dos Santos, que entrou comigo nessa como minha namorada, e mesmo em meio a tantas provações nestes tempos, tornou-se minha noiva e esposa, vivendo comigo tantas privações e dificuldades que

um casal que se conheceu na faculdade e seguiu para o mestrado juntos e neste momento finalizamos juntos mais este sonho. A todas as noites em claro em que abrimos mão de deitarmos lado a lado, a inúmeras vezes que remarcamos nossa lua de mel e ainda continuamos fazendo isso, às tantas vezes que abrimos mão de ir pescar com o tio Valquir, até que o perdemos. Enfim, juntos lutamos e juntos venceremos, em nome de Jesus.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA / UNESP), ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e a Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis) pela oportunidade e privilégio de realizar o Mestrado.

À Seção Técnica de Pós-Graduação conduzida por Valéria de Queiroz Marcondes Zagato (supervisora), Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada pelo empenho em atender e auxiliar-me.

À Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE) por toda prontidão e suporte.

A todos os funcionários da UNESP, em especial ao senhor Arnaldo que, sem medir esforços, desempenha seu trabalho com muito entusiasmo e alegria por onde passa, a Márcia pelo seu café e carinho ímpar, bondade e a todo pessoal da limpeza e manutenção pela simpatia.

Muito obrigado a todos!



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Cássia Menegati Dornelles, pela compreensão e entendimento de minhas dúvidas e dificuldades, por ceder parte de seu tempo para que meu aprendizado fosse rico e constante, pelo cuidado despendido a mim e a todos, nos momentos pontuais e necessários, por descrever com simplicidade e objetividade tamanhas ações e acontecimentos do processo fisiológico. Obrigado!

À Prof<sup>a</sup>. Me<sup>a</sup>. Fernanda Fernandes, amiga e madrinha, que como doutoranda me adotou como adotou a todos que ali passaram, e com sorriso sempre presente, voz calma e sabedoria notável, cuidava e auxiliava com maestria dividindo o peso do julgo que carregávamos.

Ao Rafael Augusto dos Santos Silva, mestrando, amigo/irmão, pelos inúmeros dias de análises, conversas, discussões e entendimentos, pelos inúmeros auxílios e orientações, pela inteligência e disponibilidade e por as vezes ser apenas ouvidos e conselheiro.

À amiga querida, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Cristina de Nicola, por disponibilizar seu tempo inúmeras vezes para me auxiliar na busca da metodologia perfeita para aquisição dos resultados buscados, também por ajudar em atividades rotineiras do laboratório, por tantas risadas e desabafos recíprocos e por mostrar que os caminhos são difíceis, mas a vitória é certa.

Ao Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto por se dispor a conversar, auxiliar e guiar sobre inúmeras atenções a serem tomadas, além de estar presente para análises e contribuir com a parte prática do trabalho, também instruir-me quanto à teoria da minha pesquisa.

Aos Professores da Banca do Exame Geral de Qualificação (EGQ) Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto e Prof. Dr. Leandro Figueiredo dos Santos pelas correções e contribuições ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino que, mesmo diante da correria dos dias, tanto me ajudou em minhas análises, disponibilizando seu tempo e espaço durante dias seguidos.

Aos amigos estiveram ou estão ao meu lado durante todas as manhãs, tardes, noites e algumas madrugadas na atividade laboratorial (FOA/UNESP) e contribuem para o meu caminhar: Melise, Manu, Ana Carolina, Ana, Otávio, Luana,

Michelle, Victor, Débora, muito obrigado por caminharem comigo em muitos momentos bons e em momentos difíceis também.

À todos vocês muito obrigado!

*"Um novo mandamento lhes dou: Amem-se uns aos outros. Como eu os amei, vocês devem amar-se uns aos outros.*

*Com isso todos saberão que vocês são meus discípulos, se vocês se amarem uns aos outros".*

*(João 13:34,35)*

# RESUMO

SANTOS, LFG. **A influência da ocitocina e do antagonista do receptor de ocitocina no metabolismo ósseo, estresse oxidativo, padrões da marcha e análise do tipo ansioso de ratas senescentes.** 2020. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da ocitocina (OT) endógena, bem como o efeito potencializador da OT exógena sobre o metabolismo ósseo, estresse oxidativo, marcha e análise do tipo ansioso de ratas na periostropausa. Ao completar 19 meses, os animais receberam injeções de solução salina (0,15M/ip), Atosiban (AT) (At; 300 µg/Kg/ip), OT (Ot; 134 µg/Kg/ip) ou At+Ot (injeções de OT 5 minutos após AT), sendo duas injeções de cada substância por dia, com intervalos de 12 horas entre elas, a cada 30 dias até a idade de 21 meses. Após trinta dias sem tratamentos, foi realizada a coleta de amostras biológicas. Aspartato aminotransferase (AST), marcador de dano hepático, foi menor em Ot e At+Ot. Substância ácida reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARs µmol/L), marcador do dano oxidativo lipídico, foi maior no grupo Ot comparado ao At ( $p = 0,0093$ ), e menor no At+Ot em relação ao Ot ( $p = 0,0040$ ). Houve maior defesa antioxidante enzimática avaliada por meio da superóxido dismutase (SOD) no grupo Ot em comparação ao Veh ( $p < 0,0312$ ). Por sua vez, no grupo At houve maior atividade enzimática da fosfatase alcalina (FAL) em relação ao Veh e Ot ( $p < 0,0001$ ; At+Ot:  $p = 0,0015$ ). A espessura do tecido ósseo compacto foi menor no grupo At em relação ao Veh ( $p = 0,0228$ ), no entanto, foi maior no grupo Ot em relação ao Veh e At ( $p = 0,0132$ ,  $p < 0,0001$ ); no grupo At+Ot foi menor quando comparado ao grupo Ot ( $p = 0,0003$ ). O número de trabéculas ósseas foi menor no grupo At comparado ao Veh ( $p = 0,0240$ ), e maior em Ot em relação ao At ( $p = 0,0084$ ). Quanto a análise imunoistoquímica realizada no osso cortical do colo do fêmur, o grupo Ot apresentou maior expressão de osteocalcina (OCN) em comparação aos grupos Veh e At ( $p = 0,05$  e  $0,0033$ ), e menor expressão no grupo At+Ot em relação ao grupo Ot ( $p = 0,05$ ). A expressão de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) foi menor no grupo Ot comparado aos grupos Veh e At ( $p = 0,05$  e  $0,0033$ ), contudo foi maior no grupo At+Ot comparado ao Ot ( $p = 0,05$ ). A densidade mineral óssea areal (DMO) foi significativamente maior nos grupos Ot e At+Ot em relação à Veh ( $p < 0,0001$ ) e grupo At ( $p = 0,0231$ ,  $p = 0,0418$ ). Por sua vez, a relação mineral-matriz ( $v1PO4/Proline$ ) foi maior e a substituição de carbonato tipo B ( $CO3/v1PO4$ ) foi menor no grupo Veh. O teste de deambulação por comprimento (cm) usado para avaliar função musculoesquelética, aumentou em última análise no grupo Ot em relação ao grupo Veh - F ( $p = 0,0078$ ), At - F ( $p = 0,0023$ ), bem como aumentou sobre Ot - I ( $p = 0,0094$ ). O teste do labirinto, usado para estudar o comportamento chamado "tipo ansioso", demonstrou que a OT inverte a redução nas entradas dos braços fechados, reduz o tempo gasto no centro causado pelo At. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a OT ajuda a modular o ciclo de remodelação óssea de ratas senescentes, melhorando os parâmetros de densitometria óssea e os parâmetros funcionais musculoesquelético.

**Palavras-chave:** envelhecimento, feminino, osteoporose, perimenopausa, ocitocina, tocólise, colo do fêmur.

# ABSTRACT

SANTOS, LFG. **The influence of oxytocin and the oxytocin receptor antagonist on bone metabolism, oxidative stress, gait and analysis of the anxious type of senescent rats.** 2020. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the endogenous oxytocin (OT) action, as well as the potentiating effect of exogenous OT on the bone metabolism, oxidative stress, gait and analysis of the anxious type of rats in periostropause. Upon completing 19 months, the animals received injections of saline solution (0.15M/ip), Atosiban (AT) (At; 300 µg/Kg/ip), OT (Ot; 134 µg/Kg/ip) or At+Ot (OT injections 5 minutes after AT), being two injections of each substance per day, with intervals of 12 hours between them, every 30 days until the age of 21 months. After thirty days without treatment, biological samples were collected. Aspartate aminotransferase (AST), a marker of liver damage, was lower after Ot and At+Ot. Acid reactive substance to thiobarbituric acid (TBARs µmol/L), marker of lipid oxidative damage, was higher in the Ot group compared to At ( $p = 0.0093$ ), and lower in At+Ot compared to Ot ( $p = 0.0040$ ). There was a higher antioxidant enzymatic defense evaluated by means of superoxide dismutase (SOD) in the Ot group compared to Veh ( $p < 0.0312$ ). In turn, in the At group there was greater alkaline phosphatase (FAL) enzymatic activity in relation to Veh and Ot ( $p < 0.0001$ ; At+Ot:  $p = 0.0015$ ). The thickness of the compact bone tissue was smaller in the At group in relation to Veh ( $p = 0.0228$ ), however, it was greater in the Ot group in relation to Veh and At ( $p = 0.0132$ ,  $p < 0.0001$ ); in the At+Ot group it was smaller when compared to Ot ( $p = 0.0003$ ). The number of bone trabecules was smaller in the At group compared to the Veh ( $p = 0.0240$ ), and greater in Ot in relation to the At ( $p = 0.0084$ ). As for the immunohistochemical analysis performed on the cortical bone of the femoral neck, the Ot group presented a higher expression of osteocalcin (OCN) compared to the Veh and At groups ( $p = 0.05$  and  $0.0033$ ), and lower expression in the At+Ot group compared to the Ot group ( $p = 0.05$ ). The tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression was lower in the Ot group compared to the Veh and At groups ( $p = 0.05$  and  $0.0033$ ), however it was higher in the At+Ot group compared to Ot ( $p = 0.05$ ). The sandal mineral density (BMD) was significantly higher in the Ot and At+Ot groups compared to Veh ( $p < 0.0001$ ) and At group ( $p = 0.0231$ ,  $p = 0.0418$ ). In turn, the parent mineral ratio ( $v1PO4/Proline$ ) was higher and the replacement of carbonate type B ( $CO3/v1PO4$ ) was lower in the Veh group. The walking test per length (cm) used to evaluate musculoskeletal function was ultimately increased in group Ot in relation to group Veh - F ( $p = 0.0078$ ), At - F ( $p = 0.0023$ ), as well as increased over Ot - I ( $p = 0.0094$ ). The labyrinth test, used to study the so-called "anxious type" behavior, demonstrated that the OT reverses the reduction in the entries of the closed arms, reducing the time spent in the center caused by At. The results obtained in this study show that the OT helps to modulate the cycle of bone remodeling of senescent rats, improving the parameters of bone densitometry and the musculoskeletal functional parameters.

Keywords: aging, female, osteoporosis, perimenopausal, oxytocin, tocolysis, femoral neck.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gráfico referente ao ciclo de remodelação óssea feminina, em diferentes idades, com destaque aos períodos de pré-menopausa e menopausa. Fonte: Adaptado de *Bone care for the postmenopausal woman*, 2013.....25
- Figura 2.** Perda de função e dependência entre os sobreviventes pós fratura de colo do fêmur descrito em estudo da Fundação Internacional da Osteoporose em parceria pioneira com a Universidade de Oxford, Amgen e UCB para combater a carga global de saúde pública da Osteoporose. Fonte: *International Osteoporosis Foundation – IOF*.....26
- Figura 3.** Conjunto de substâncias para o tratamento de osteopenia e osteoporose estudadas ao longo dos anos. Fonte: Adaptado de *Das and Crockett*, (2013).....27
- Figura 4.** Resumo dos resultados da atuação positiva da Ot no metabolismo ósseo do colo de fêmur de fêmeas Wistar em periostropausa. Fonte: adaptado de *Fernandes et al.*, (2020).....28
- Figura 5.** Imagem ilustrativa das vias de ação estrogênica ❶ genômica e ❷ não-genômica sobre a estimulação da síntese de OT e seu receptor (Oxtr). Fonte: Adaptado de *Colaianni*, (2014).....29
- Figura 6.** ❶ Estante do biotério com gaiolas devidamente identificadas ❷ Gaiola contendo 4 animais com acesso livre à água e ração. Fonte: Biotério Departamento de Ciências Básicas - UNESP.....34
- Figura 7.** Descrição metodológica do período experimental. Coleta de ciclo estral, distribuição de 40 ratas fêmeas Wistar em quatro grupos, sendo 1- Controle (Veh), 2- Atosiban (At), 3- Ocitocina (Ot) e 4- Atosiban + Ocitocina (At+Ot). Os grupos seguiram para tratamento, eutanásia e coleta de materiais para análises.....35
- Figura 8.** ❶ Coleta do esfregaço vaginal ❷ colocado em lâmina ❸ analisado fresco em microscópio ótico ❹ análise dos períodos do ciclo estral ❺ critério de inclusão e exclusão das 40 ratas submetidas aos tratamentos.....35
- Figura 9.** ❶ Eutanásia por exsanguinação sob anestesia geral com cloridrato de xilazina (10 mg/kg de m.c., IP) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg m.c., IP) ❷ Coleta do sangue em tubo heparinizado ❸ Centrifugação do sangue para obtenção do plasma (2.500 RPM por 15 min à 2°C) ❹ Coleta dos sobrenadante para análises posteriores e ❺ Retirada asséptica dos fêmures.....36
- Figura 10.** Região de interesse da análise histomorfométrica – tecido ósseo trabeculado e cortical do colo do fêmur.....39

- Figura 11.** ① Lavagem das lâminas silanizadas em PBS e PBStx durante o procedimento de imunistoquímica ② Etapa de recuperação do antígeno em tampão citrato na panela de pressão durante o procedimento de imunistoquímica ③ Lâminas coradas em hematoxilina e em *fast green*.....40
- Figura 12.** ① Densitômetro DPX-ALPHA para análise de densitometria óssea ② Software de análise para pequenos animais.....41
- Figura 13.** ① Espectrógrafo micro-Raman (Renishaw, modelo inVia) ② Software de reprodução dos dados. Parceria UNESP – *Campus* Presidente Prudente, Laboratório de Física.....42
- Figura 14.** ① As patas traseiras e dianteiras dos animais foram colocadas em contato com tinta (guache) atóxica de cores marrom (dianteiras) preta (traseiras) em seguida, ② os animais foram posicionados em caixa retangular de madeira (45 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) para ③ caminharem por três tentativas. Dados obtidos previamente (19 meses de idade) e ao fim do período experimental (21 meses de idade). ④ e ⑤ Largura e comprimento de passos por centímetro, medidos por paquímetro.....43
- Figura 15.** Animal do grupo experimental, explorando um dos braços abertos durante a realização do teste comportamental do tipo ansioso no Labirinto De Cruz Elevada.....44
- Figura 16.** GraphPad Prism 6.0 para a análise da normalidade e homocedasticidade dos dados coletados. Fonte: google - GraphPad Prism 6.0 - imagem, (2020).....45
- Figura 17.** Porcentagem das fases apresentadas durante a coleta do ciclo estral: as fases após a coleta do ciclo estro de ratos com 19 meses para inclusão nos grupos de controle, At, Ot e At+Ot. 7,19% proestro, 3,27% estro, 20,04% metaestro e 69,50% diestro, caracterizados pela irregularidade no ciclo estral (periestropausa).....47
- Figura 18.** A análise do peso corporal, uterino e ovariano: ①, peso uterino ② e peso ovariano ③ dos grupos Veh, At, Ot e At+Ot. Dados analisados pelo teste ANOVA unilateral, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna com média ± erro padrão de média e significância de 5%.....48
- Figura 19.** Determinação plasmática dos danos hepáticos: a atividade (U/L) do grupo AST ① e ALT ② de animais (Veh), tratados com At, tratados com Ot e traduzidos com At+Ot. Dados analisados pelo teste ANOVA unilateral, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna com média ± erro padrão de média e significância de 5%: \*\* $p < 0,01$  vs Veh; + $p < 0,05$  vs At.....49
- Figura 20.** Análise plasmática de marcadores de danos oxidativos: conteúdo de TBArS  $\mu\text{mol/L}$ . Dados analisados por teste *t* e teste ANOVA unidirecional, seguido

pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna com média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5%:  $^{**}p < 0,01$  vs At;  $^{**}p < 0,01$  vs Ot.....49

**Figura 21.** Determinação da defesa antioxidante não-enzimática: FRAP  $\text{Fe}^{2+}$  mmol/L nos grupos Veh, At, Ot e At+Ot. Dados analisados por teste *t* e teste ANOVA unidirecional, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna com média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5%:  $^{+}p < 0,05$  vs At.....50

**Figura 22.** Determinação da defesa antioxidante enzimática: SOD U/min/mg de proteína ❶ capacidade de GPx  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  de proteína ❷ nos grupos Veh, At, Ot e At+Ot. Dados analisados por teste *t* e teste ANOVA unidirecional, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna com média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5%:  $^{*}p < 0,05$  vs At e  $^{*}p < 0,05$  vs Ot.....50

**Figura 23.** Análise plasmática de marcadores de formação e reabsorção óssea: a atividade de FAL U/L ❶ e TRAP U/L ❷, nos grupos Veh, At, Ot, e At+Ot. Dados analisados por teste *t* e teste ANOVA unidirecional, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna com média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5%:  $^{***}p < 0,001$  vs Veh;  $^{**}p < 0,01$  e  $^{***}p < 0,0001$  vs At.....51

**Figura 24.** Fotomicrografia com coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) demonstrando a morfologia óssea (250  $\mu\text{m}$ ) de animais dos grupos Veículo (Veh) (a), tratados com AT (At) (b), tratados com OT (Ot) (c) e tratados com AT e OT (At+Ot) (d). Análise histomorfometria do colo femoral de ratas Wistar (19 meses), espessura do tecido ósseo compacto ❶, espessura das trabéculas ósseas ❷, número de trabéculas ósseas/MM2 ❸ de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ):  $^{*}p < 0,05$  vs Veh;  $^{**}p < 0,01$ .  $^{***}p < 0,001$  vs Ot e  $^{***}p < 0,0001$  vs At.....52

**Figura 25.** Gráficos de imunistoquímica do colo do fêmur nas regiões cortical e trabecular. Osso cortical: ❶ osteocalcina (OCN) e ❸ fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Trabecular: ❷ osteocalcina (OCN) e ❹ fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). A análise estatística foi realizada usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls não pareado, descrito em coluna com média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5%:  $^{*/\bullet}p < 0,05$ ,  $^{**}p < 0,01$ .  $^{*}$ vs Veh,  $^{+}$ vs At,  $^{\bullet}$ vs Ot.....53

**Figura 26.** Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcagem para TRAP (a, c, e, g) e OCN (b, d, f, h) no colo do fêmur nos grupos Veh (a, b), At + Veh (c, d), Ot (e, f) e At + Ot (g, h). Abreviaturas e símbolos: ct, osso cortical; setas, células imunorreativas. Ampliação original: a, c, e, g: 400x; b, d, f, h: 1000x. Barras de



escala: **a, c, e, g:** 150  $\mu\text{m}$ ; **b, d, f, h:** 50  $\mu\text{m}$ . Contra-coloração: Harris Hematoxylin.....54

**Figura 27.** Análise da densidade óssea femoral total: densidade mineral óssea areal (DMOa  $\text{g}/\text{cm}^2$ ) do fêmur (osso inteiro - ①) e do colo femoral ② dos grupos Veh, At, Ot, e At+Ot. Dados analisados pelo teste ANOVA unilateral, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna com média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5%: \*/+p < 0,05, \*\*p < 0,001, +++/++++p < 0,0001. \*vs Veh, +vs At, ^vs Ot.....55

**Figura 28.** Figura 27. Análise da composição mineral e matricial do tecido ósseo, analisada pela microspectroscopia Raman, a relação Mineral/matriz ( $\sqrt{1\text{PO}_4}/\text{Prolina}$  - ①), a substituição de carbonato tipo B ( $\text{CO}_3/\sqrt{1\text{PO}_4}$  - ②) e Cristalinidade [ $\sqrt{1\text{PO}_4}$  FWHM] $^{-1}$  ③ de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): \*p < 0,05, \*\*/+p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 \*vs Veh, +vs At.....56

**Figura 29.** Espectro de fêmur representativo realizado pela microspectroscopia Raman: bandas de fosfato ( $\sqrt{1\text{PO}_4}$ ), prolina, carbonato ( $\text{CO}_3$ ) de animais dos grupos Veículo (Veh) (banda preta), tratados com AT (At) (banda vermelha), tratados com OT (Ot) (banda laranja) e tratados com AT e OT (At+Ot) (banda azul).....56

**Figura 30.** Teste de Caminhada Funcional para Avaliação e Correlação com a Força e Função do Músculo Esqueleto: Teste de caminhada por largura por cm ① e comprimento por cm ②, nos grupos Veh, At, Ot e At+Ot analisados aos 19 meses de idade do animal (teste inicial), novamente aplicou o teste aos 21 meses (teste final). Dados analisados pelo teste *t*, descritos na coluna com média  $\pm$  erro padrão da média e significância 5%:  $p < 0,01$  \*\*vs Veh-F, ++vs At-F, ^vs Ot-I.....57

**Figura 31.** Teste Comportamental de Variáveis espaço-temporais "tipo-ansioso, labirinto em cruz elevada" - Frequência - Duração: número de entradas nos braços abertos ①, número de entradas nos braços fechados ②, número de frequências no centro do labirinto ③, número de entradas totais ④, tempo de permanência nos braços abertos ⑤, tempo de permanência nos braços fechados ⑥ e tempo de permanência no centro do labirinto ⑦, nos grupos Veh, At, Ot e At+Ot analisados aos 19 meses de idade do animal no teste inicial (I), aplicando novamente o teste aos 21 meses no teste final (F). Dados analisados pelo teste *t*, descritos na coluna com média  $\pm$  erro padrão da média e 5% de significância:  $p < 0,05$  \*vs Veh-I e At-I,  $p < 0,01$  \*\*vs Veh-I e Ot-I.....58

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\mu\text{g}$ : micrograma
- $\mu\text{mol}$ : micromol
- $\mu\text{W}$ : microwatt
- ALT: alanina aminotransferase
- ANOVA: análise de variância
- AST: aspartato aminotransferase
- AT: Atosiban
- At: animais de 19 meses que receberam atosiban
- At-F: teste final de animais de 21 meses que receberam atosiban
- At-I: teste inicial de animais de 19 meses que receberam atosiban
- AT+OT: administração de atosiban e após 5 minutos receberam ocitocina
- At+Ot-F: teste final de animais de 21 meses que receberam atosiban e após 5 minutos receberam ocitocina
- At+Ot-I: teste inicial de animais de 19 meses que receberam atosiban e após 5 minutos receberam ocitocina
- At+Ot: animais de 19 meses que receberam atosiban e após 5 minutos receberam ocitocina
- BMP: proteína morfogênica óssea
- BMP-2: proteína morfogênica óssea 2
- BMP2/4: proteína morfogenética óssea 2/4
- BV/TV: razão entre o volume ósseo da amostra e o volume da amostra
- $\text{Ca}^{2+}$ : cálcio
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- $\text{cm}^2$ : centímetros quadrado
- Ct: cortical
- Ct.Ar: área óssea cortical
- Ct.Po: porcentagem de poros
- Conn.Dn: conectividade trabecular
- $\text{CO}_3/\text{v}_1\text{PO}_4$ : taxa de substituição do carbonato B
- DAB: diaminobenzidina
- DEXA: *dual-energy x-ray absorptiometry*

- DMO: densidade mineral óssea
- DMOa: densidade mineral óssea areal
- DTPA: ácido dietilenotriamina pentacético
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM: erro padrão da média
- EUA: Estados Unidos da América
- FAL: fosfatase alcalina
- Fe<sup>2+</sup> mmol/L: ferroso milimol/litro
- FRAP: capacidade antioxidante total
- GR: glutathione redutase
- GSH: glutathione
- GPx: glutathione peroxidase
- g: gramas
- g/cm<sup>2</sup>: gramas por centímetros quadrado
- h: hora
- IOF: *International Osteoporosis Foundation*
- I<sub>max</sub>: momento polar máximo
- I<sub>min</sub>: momento polar médio
- J: momento polar
- L: litro
- LCE: labirinto de cruz elevada
- MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*
- MDF: fibra de densidade média
- mg: miligrama
- min: minutos
- mL: mililitro
- mm: milímetro
- mm<sup>2</sup>: milímetros quadrado
- mmol/L: milimol/litro
- mM: milimol
- NaCl: solução fisiológica de cloreto sódio a 0,9%
- NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido

- NF-kB: fator nuclear kappa B
- nm: nanômetros
- °C: graus Celsius
- OCN: osteocalcina
- OPN: osteopontina
- OSX: osterix
- OT: ocitocina
- Ot: animais de 19 meses que receberam ocitocina
- Ot-F: teste final de animais de 21 meses que receberam ocitocina
- Ot-I: teste inicial de animais de 19 meses que receberam ocitocina
- Oxtr: receptor de OT
- PBS: tampão fosfato salina
- PBStx: tampão fosfato salina + triton
- PER: periostina
- pH: potencial de hidrogênico
- RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$
- RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$
- RPM: rotações por minuto
- RUNX2: fator de transcrição 2 relacionado à runt
- s: segundos
- Sham: cirurgia placebo
- SOD: superóxido dismutase
- TBARs: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Tb: Trabécula
- Tb.N: número de trabéculas
- TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato
- U: unidade
- U/L: unidade internacional por litro
- U/mg: unidade por miligrama
- v: volume
- $v_1\text{PO}_4$ /Proline: taxa de mineral-matriz
- Veh: animais de 19 meses que receberam veículo

- Veh-F: teste final de animais de 21 meses que receberam veículo
- Veh-I: teste inicial de animais de 19 meses que receberam veículo
- Veh: solução salina
- vs: *versus*
- KO: nocaute
- Wnt: via de sinalização intracelular Wnt

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
2.1 Objetivo Geral .....	32
2.2 Objetivos Específicos .....	32
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
3.1 Animais .....	34
3.2 Coleta de Ciclo Estral .....	35
3.3 Coleta de materiais.....	36
3.4 Determinação da Atividade da Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST).....	36
3.5 Marcadores do Estresse Oxidativo .....	37
3.6 Defesa antioxidante não-enzimática .....	37
3.7 Determinação da defesa antioxidante enzimática.....	37
3.8 Análises dos marcadores plasmáticos de formação óssea, fosfatase alcalina total (FAL), e de reabsorção óssea, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) .....	38
3.9 Análise Histomorfométrica .....	39
3.10 Análise Imunoistoquímica .....	39
3.11 Densitometria óssea.....	41
3.12 Microspectroscopia Raman .....	42
3.13 Avaliação e correlação com a força e função do músculo esquelético Teste de Caminhada Funcional .....	42
3.14 Teste Comportamental de Ansiedade "Labirinto em Cruz Elevada" - Frequência – Duração em avaliação espaço temporal.....	43
3.15 Análise estatística .....	44
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
4.1. A análise do ciclo estral .....	47
4.2 Peso corporal final, uterino e ovariano .....	47
4.3 Determinação da atividade AST e ALT .....	48
4.4 Análise do conteúdo plasmático de TBARs .....	49
4.5 Determinação da defesa antioxidante não-enzimática .....	50
4.6 Determinação da defesa antioxidante enzimática.....	50
4.7 Determinação da atividade FAL e TRAP .....	50
4.8 Histomorfometria do colo do fêmur .....	51
4.9 Análise imunoistoquímica .....	52

<b>4.10 Densitometria óssea</b> .....	<b>54</b>
<b>4.11 Espectroscopia de Raman</b> .....	<b>55</b>
<b>4.12 Teste de deambulação</b> .....	<b>56</b>
<b>4.13 Teste comportamental das variáveis espaço-tempo "Tipo-Ansioso, Labirinto Cruzado Alto" - Frequência - Duração</b> .....	<b>57</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>80</b>

# **INTRODUÇÃO**



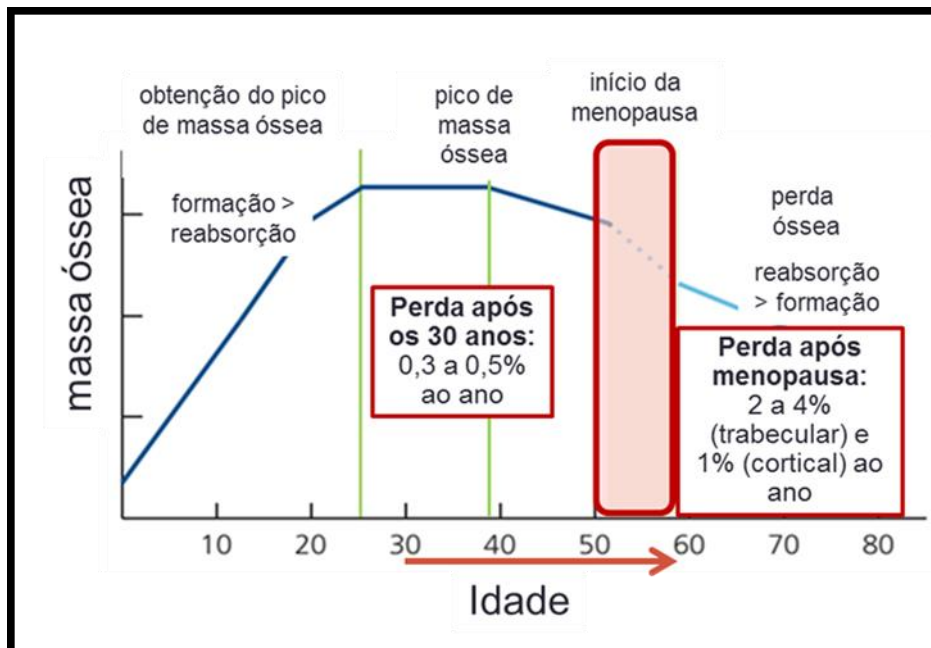
# 1 INTRODUÇÃO

O acelerado processo de envelhecimento populacional e o recente aumento na expectativa de vida tem chamado atenção para doenças integradas ao processo do envelhecimento, como a demência senil, aterosclerose, muitos tipos de cânceres e osteoporose (ROSSI, 2008). Esta última está associada à incidência de fraturas acarretando morbidade, morbidade múltipla, disfuncionalidade e mortalidade entre idosos (PARAHYBA; SIMÕES, 2006). Visando proporcionar melhor qualidade de vida a esta população, estudos acerca do metabolismo ósseo e da osteoporose estão sendo prioridade em saúde pública, em decorrência das altas taxas de fraturas, morbidade e mortalidade (AMADEI et al., 2006; SAÚDE, 2014).

O metabolismo ósseo depende do equilíbrio entre os processos anabólicos realizado por osteoblastos secretando proteínas, como a fosfatase alcalina (FAL) (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014) e catabólicos realizados por osteoclastos, sintetizando proteínas ácidas na matriz óssea, como a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (BOYCE BF, HUGHES DE, WRIGHT KR, XING L, 1999; LJUSBERG et al., 2005). A mecanotransdução, também envolvida no metabolismo ósseo, é realizada pelos osteócitos, os quais detectam estímulos mecânicos e enviam sinais às células osteoblásticas e osteoclásticas (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; KNOTHE TATE, 2003; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

A presença de receptores estrogênicos e a interação estrógeno-osteoblastos possibilita a diferenciação celular, estimula a síntese e a mineralização da matriz óssea, regulando a expressão de genes codificantes do colágeno tipo I e proteínas não colagênicas como osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), osteonectina (BLAND, 2000; TOMKINSON et al., 1998). Além desses, os efeitos na diminuição da apoptose de osteoblastos, estresse oxidativo e a atividade de NF-κB osteoblástica parecem ser mediadores chave da capacidade do estrogênio em manter a formação óssea (CALLEWAERT et al., 2010; KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012). O hormônio esteróide também apresenta efeitos sobre: osteócitos, osteoclastos e células-T, modulando a ativação do remodelamento ósseo, mediado pelo osteócito, e a reabsorção óssea, por ações diretas nos osteoclastos (CALLEWAERT et al., 2010; CAULEY, 2015).

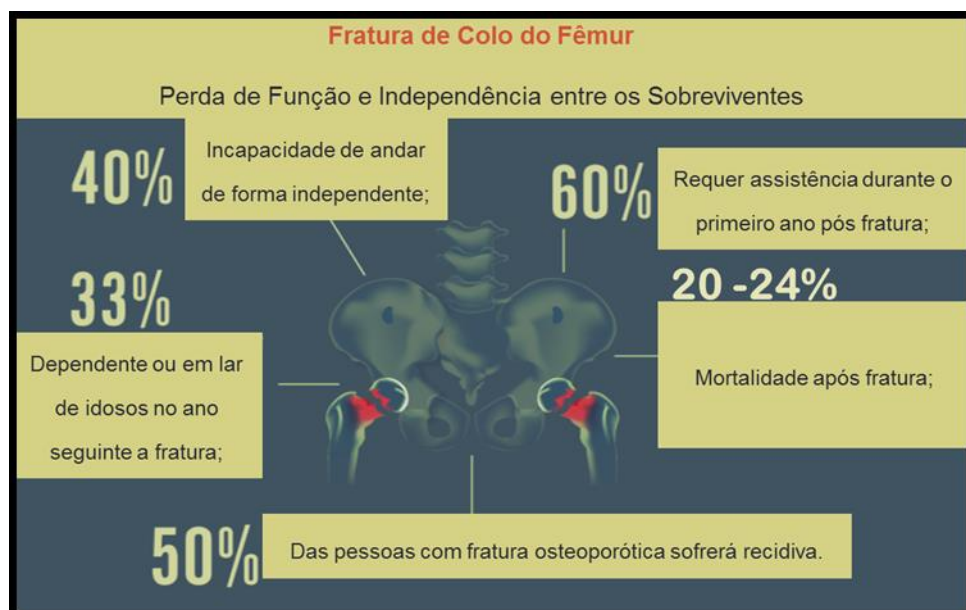
Após o pico de massa óssea ser atingido, em torno de 30 anos de idade em ambos os sexos, a reabsorção óssea começa a exceder a formação óssea, lentamente, e o risco de fratura osteoporótica duplica dentro de 7 - 8 anos após os 50 anos de idade (PARDHE et al., 2017). Essa diminuição é mais expressiva em mulheres em período de menopausa, pois sofrem perda imediata de massa e densidade óssea já no primeiro ano, estabiliza-se 10 anos após a menopausa (HUNTER; SAMBROOK, 2000) (Figura 1). Está bem evidenciado que alterações hormonais como o declínio na concentração plasmática de estrogênio ovariano (WŁODAREK et al., 2014), torna-se crucial no desenvolvimento da osteoporose (COXAM, 2008). Alteração no remodelamento ósseo leva à osteoporose e a outras doenças ósseas metabólicas, com consequente diminuição na densidade mineral óssea (DMO), aumento da incidência de fraturas, diminuição da qualidade de vida, além de risco de mortalidade (AHN et al., 2018; LEVIN; JIANG; KAGAN, 2018; PARDHE et al., 2017; PORFÍRIO; FANARO, 2016; WŁODAREK et al., 2014).



**Figura 1.** Gráfico referente ao ciclo de remodelação óssea feminina, em diferentes idades, com destaque aos períodos de pré-menopausa e menopausa. Fonte: Adaptado de *Bone care for the postmenopausal woman*, 2013.

Estima-se 13,6 milhões de pessoas com osteoporose e 57,8 milhões de pessoas com baixa massa óssea nos EUA (PATEL et al., 2018), e que, em todo o mundo, 200 milhões de pessoas sejam acometidas pela osteoporose, afetando não somente idosos, mas também mulheres de meia-idade (AMADEI et al., 2006). A

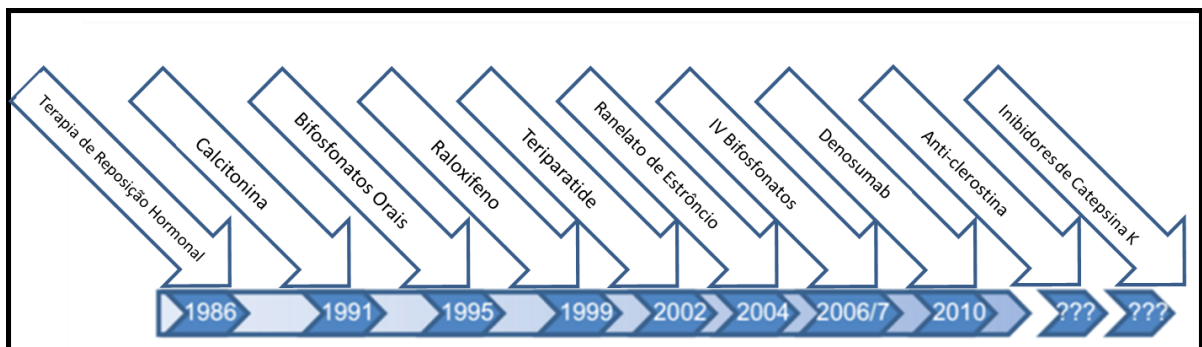
análise para ocorrência de fraturas no organismo feminino revela que na faixa etária dos 50 anos o risco para fratura osteoporótica é de 15,6% para as vértebras, 16% para o rádio distal, 17,5% para o colo do fêmur, e de aproximadamente 40% em qualquer o outro local do esqueleto (RADOMINSKI et al., 2004). A baixa DMO tem como principal consequência clínica relevante à fratura de quadril, a mais debilitante das fraturas por fragilidade, com média de 20 a 24% de mortalidade em até 12 meses de sua ocorrência (OSTEOPOROSIS; ANNOUNCES, 2020; PATEL et al., 2018), sendo a mais predominante entre todas as fraturas relacionadas à osteoporose, com as maiores taxas de morbidade na população idosa (BOONEN et al., 2008). Fraturas do colo do fêmur compõem cerca de 40% a 50% de todas as fraturas do quadril ocorrendo até três vezes mais em mulheres, evidenciando a sensibilidade dessa região específica (PELLIKAAN et al., 2018) (Figura 2).



**Figura 2.** Perda de função e dependência entre os sobreviventes pós-fratura de colo do fêmur descrito em estudo da Fundação Internacional da Osteoporose em parceria pioneira com a Universidade de Oxford, Amgen e UCB para combater a carga global de saúde pública da Osteoporose. Fonte: Adaptado de *International Osteoporosis Foundation – IOF*.

As dificuldades para a identificação e manejo da osteoporose incluem, falta de triagem e diagnóstico adequados, avaliação dos efeitos colaterais, custo dos medicamentos e educação do paciente (PATEL et al., 2018). Atentos ao grupo etário que tem gradativamente aumentado, buscamos na literatura intervenções para manutenção da DMO ou reversão da diminuição. A literatura apresenta conjunto de substâncias para o tratamento de osteopenia e osteoporose, como pode ser

visualizado na figura 3. Estudos descrevem que a terapia estrogênica normaliza a reabsorção óssea e a massa gordurosa intra-abdominal em animais e humanos (LJUSBERG et al., 2005; WEIGT et al., 2012). Porém, os efeitos colaterais dos estrogênios em órgãos não gordurosos dificultam a possibilidade de uso deste hormônio terapeuticamente (BERANGER et al., 2015), podendo levar a doenças cardiovasculares e câncer de mama, entre outras (VICKERS et al., 2007).



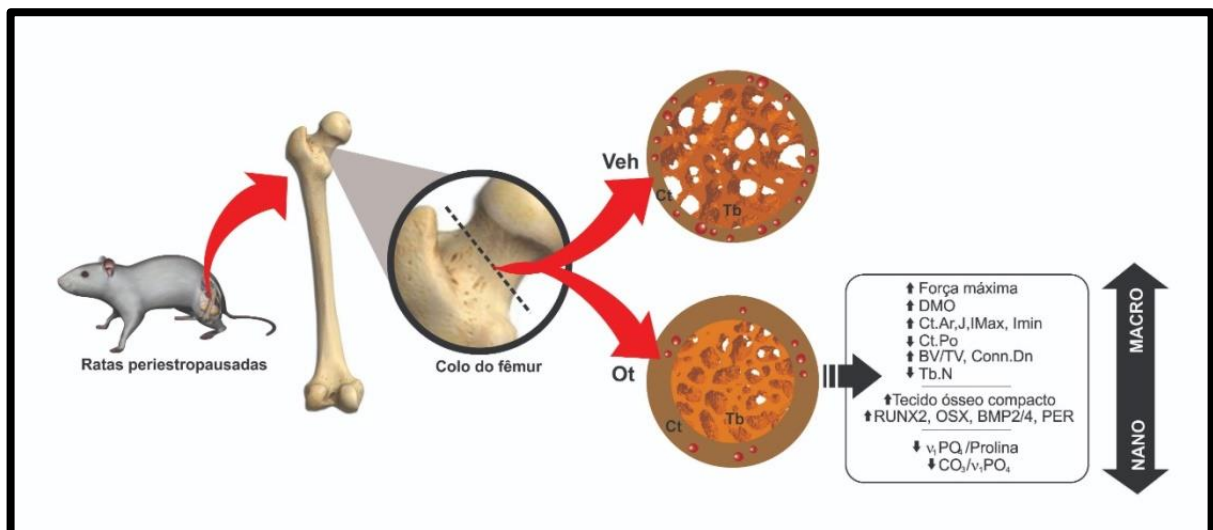
**Figura 3.** Conjunto de substâncias para o tratamento de osteopenia e osteoporose estudadas ao longo dos anos. Fonte: Adaptado de Das and Crockett, (2013).

Diante dos riscos relatados, buscamos alternativas para controle da remodelação óssea no período de intensa variabilidade hormonal no organismo feminino: perimenopausa nas mulheres e periostropausa nas ratas.

Estudos tem demonstrado participação da ocitocina (OT), um nonapeptídeo, na remodelação óssea (BREUIL et al., 2014; COLLI et al., 2012a; ELABD et al., 2007; FERNANDES et al., 2020; SANTOS et al., 2018; TAMMA et al., 2009b). Produzida em neurônios de núcleos hipotalâmicos, como o núcleo supraóptico e núcleo paraventricular, a OT é distribuída para outras partes do cérebro e para a neurohipófise, de onde é liberada na circulação sanguínea, indispensável na contração do útero durante o parto e ejeção do leite durante a lactação, período em que a concentração plasmática de OT é elevada ao máximo (PETERSSON et al., 2002). No entanto, receptores de ocitocina (Oxtr), e a síntese deste hormônio ocorrem em muitos tecidos diferentes, como: útero, ovário, timo, glândula suprarrenal e pâncreas (JENKINS; NUSSEY, 1991), demonstrados também em células humanas semelhantes a osteoblastos, estimulando-as e atuando na diferenciação dos adipócitos (ELABD et al., 2008).

Estudo *in vitro*, realizado em nosso grupo, mostrou ação importante da OT no processo de mineralização biológica realizada pelos osteoblastos, provenientes de

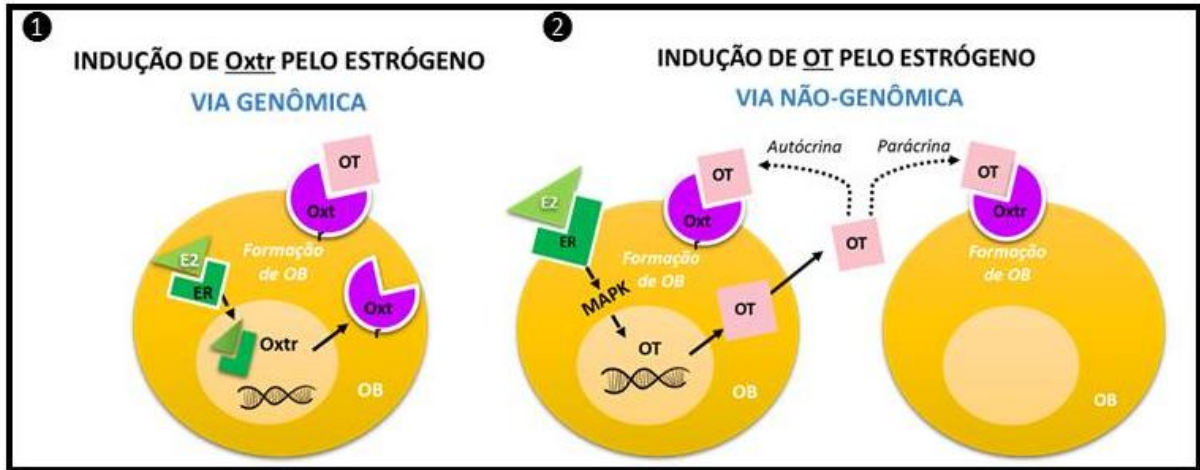
ratas acíclicas (24 meses) e cíclicas (12 meses), antecipando este processo (SANTOS et al., 2018). *In vivo* a OT demonstra ação regulando a formação e a função de osteoblastos e osteoclastos, controlando a remodelação e atuando como agente anabólico ósseo (COLLI et al., 2012a; COPLAND et al., 1999; FERNANDES et al., 2020; SANTOS et al., 2018; SUN et al., 2016; TAMMA et al., 2009a). Estudo realizado também em nosso laboratório revelou atuação positiva da OT no metabolismo ósseo de fêmeas Wistar, pela diminuição na porcentagem de poros na região cortical do colo do fêmur bem como em melhores parâmetros biomecânicos (força máxima e rigidez óssea), durante o período de periostropausa (18 meses), sugerindo diminuição do risco de fraturas (FERNANDES et al., 2020) (Figura 4).



**Figura 4.** Resumo dos resultados da atuação positiva da Ot no metabolismo ósseo do colo de fêmur de fêmeas Wistar em periostropausa. Fonte: Adaptado de Fernandes et al., (2020).

Estudos de Breuil e colaboradores (2008; 2014) mostram que em mulheres na pós-menopausa e com osteoporose, a concentração de OT plasmática é menor quando comparada às aquelas saudáveis. O mesmo ocorre com ratas ovariectomizadas que apresentam osteopenia: diminuição significativa na concentração plasmática de OT quando comparadas as ratas sham (BERANGER et al., 2014; TAMMA et al., 2009a). A relação entre os hormônios (estradiol e OT) parece importante na fisiopatologia da osteoporose. Estudo relata que o estrógeno medeia a síntese de OT e Oxtr, e que a OT é também mediadora da ação do estrógeno no tecido ósseo (COLAIANNI et al., 2014a). Estes autores demonstraram que as células osteoblásticas são capazes de sintetizar e secretar OT após

tratamento com estradiol, evidenciando atividade reguladora do estrógeno através da OT (COLAIANNI et al., 2014b) (Figura 5).



**Figura 5.** Imagem ilustrativa das vias de ação estrogênica ① genômica e ② não-genômica sobre a estimulação da síntese de OT e seu receptor (Oxtr). Fonte: Adaptado de Colaianni et al., (2014b).

No que se diz respeito à ação da OT, vale destacar que em sua ação clássica, em parturientes, o aumento na concentração circulante de OT causa contrações coordenadas e fortes que levam à expulsão do feto. Em qualquer caso, a ativação do OTR é etapa obrigatória para a estimulação de células ativadas pela OT como as células do útero. Portanto, a abordagem mais indicada para a prevenção do trabalho de parto prematuro é a regulação negativa ou o bloqueio do OTR (GIMPL; FAHRENHOLZ; GENE, 2001). O nonapeptídeo Atosiban (AT) é análogo desamino-OT e antagonista competitivo do receptor da vasopressina / ocitocina (VOTra) (KAM; LAMONT, 2008; LAMONT; KAM, 2008), que inibe a liberação de IP<sub>3</sub> mediada por OT da membrana celular miometrial (KAM; LAMONT, 2008). Como resultado, há redução da liberação de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular armazenado do retículo sarcoplasmático das células miometriais e redução do influxo de Ca<sup>2+</sup> ao espaço extracelular através de canais controlados por voltagem. Além disso, o AT suprime a liberação de PGE e PGF mediada por OT da decídua (DAWOOD et al., 1981; JENKINS; NUSSEY, 1991).

Confirmando a especificidade de AT também em células ósseas, Tamma e colaboradores (2009b), incubaram osteoclastos maduros com partículas ósseas marcadas com prolina e verificaram os níveis sobrenadantes de marcador de reabsorção. Constataram redução de 30% em reabsorção óssea com o OT. A inibição foi totalmente revertida pelo AT, antagonista específico da Oxtr, confirmando

a especificidade de AT e a ação antirreabsortiva de OT. Análise realizada posteriormente Colaianni e colaboradores (2012) revelou que a estimulação autócrina putativa da OT foi abolida pelo AT estabelecendo que a expressão de OT induzida por OT requer ativação de Oxtr. Isto é, o  $17\beta$ -estradiol induz a expressão de OT e Oxtr em osteoblastos, pois a expressão de mRNA de OT em resposta ao  $17\beta$ -estradiol foi revogada nos osteoblastos MC3T3-E1 silenciados para Oxtr (fêmea), sugerindo que os Oxtr são necessários para a produção de OT induzida por estrogênio. De acordo com isso, os camundongos Oxtr(-) falharam em mostrar aumento sérico de OT em resposta ao  $17\beta$ -estradiol. A necessidade dos Oxtr para a expressão do OT induzida por estrogênio foi evidenciado com a utilização de AT.

Diante do exposto, a **hipótese básica** deste estudo é que o antagonista de OT (endógena) potencializa a ocorrência de osteopenia na região do colo do fêmur em ratas na periostropausa e o tratamento com OT reverte este quadro.

## **OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atuação da OT endógena, bem como efeito exercido pela OT exógena sobre o metabolismo ósseo de ratas na periostropausa.

### 2.2. Objetivos Específicos

Com base nas evidências obtidas na revisão de literatura sistemática e resultados preliminares, os objetivos específicos foram formulados para melhor compreender a ação da OT no metabolismo ósseo durante o processo de envelhecimento, no período da periostropausa:

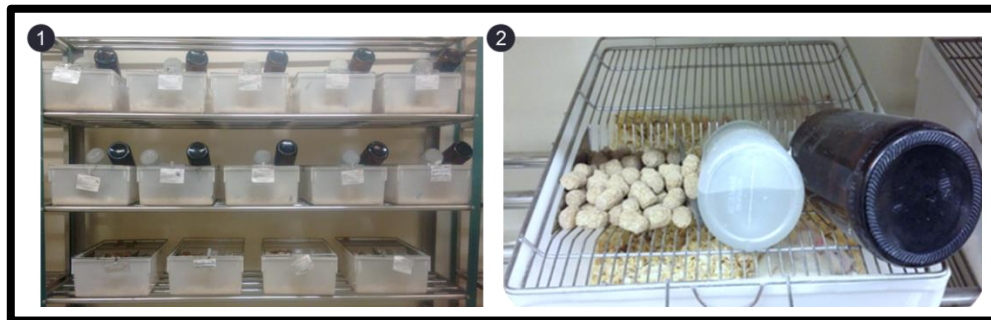
- Testar atuação do antagonista de OT, *in vivo*, e a possível ocorrência de osteopenia e osteoporose em ratas periostropausadas;
- Verificar se ocitocina endógena, em ratas no período da periostropausa, favorece a estrutura óssea;
- Analisar se OT exógena reverte à ação de seu antagonista e estabelece a qualidade óssea em ratas no período da periostropausa;
- Analisar OT e AT no estresse oxidativo e defesa antioxidante, padrões da marcha e análise da ansiedade em ratas no período da periostropausa.

**METODOLOGIA**

### 3 METODOLOGIA

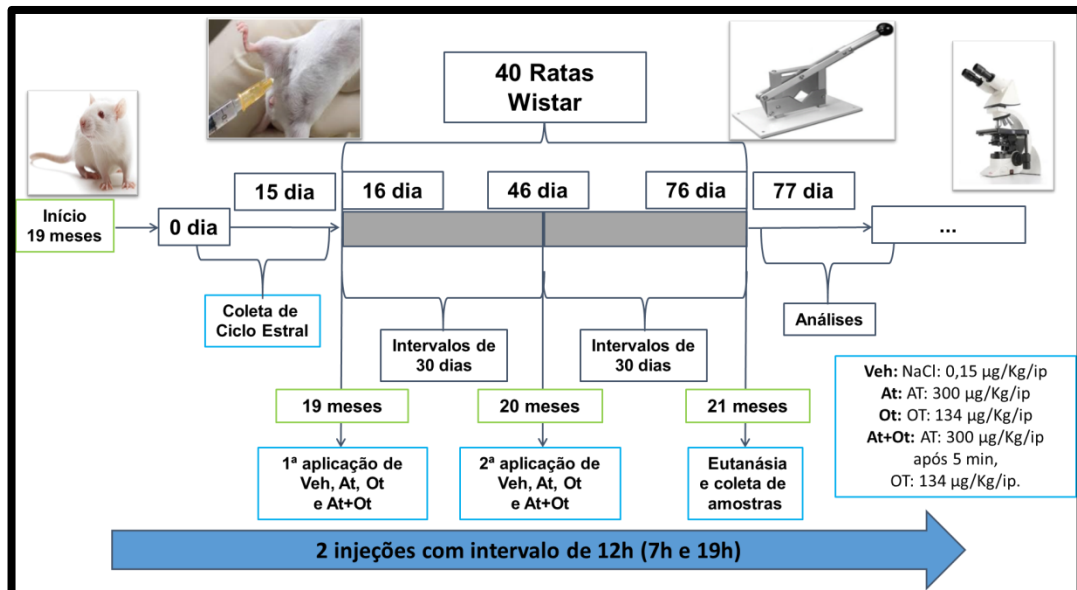
#### 3.1. Animais

Estudo realizado com 40 ratas saudáveis e múltiparas da linhagem Wistar, inicialmente com 19 meses, mantidas em gaiolas coletivas (n=4/caixa) em ambiente controlado com temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo de luz (7:00h/19:00h), umidade ( $55\% \pm 10\%$ ) e acesso à água e ração *ad libitum* (Figura 6).



**Figura 6.** ① Estante do biotério com gaiolas devidamente identificadas ② Gaiola contendo 4 animais com acesso livre à água e ração. Fonte: Biotério Departamento de Ciências Básicas - UNESP.

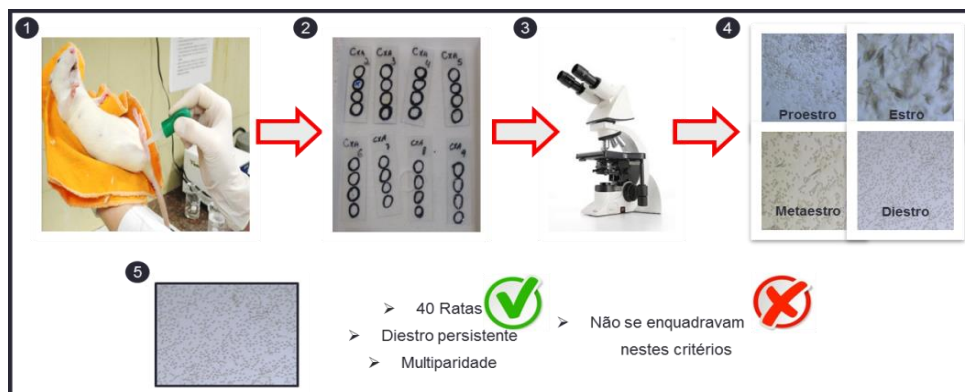
O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (processo 00688-2018) da Faculdade de Odontologia da UNESP, *campus* de Araçatuba. As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente e constituíram os grupos experimentais, com 10 cada: 1- Controle (Veh), 2- Atosiban (At), 3- Ocitocina (Ot) e 4- Atosiban + Ocitocina (At+Ot). As injeções foram realizadas às 7h e às 19h, no 15<sup>o</sup> dia dos meses 19 e 20 das ratas. O grupo 1 recebeu duas injeções de solução salina (Veh 0,15M/ip); os animais dos grupos 2 e 3 receberam injeções de AT (300  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{ip}$ ) ou OT (134  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{ip}$ ); os animais do grupo 4 receberam injeções de AT e, 5 minutos depois, injeções de OT (COLLI et al., 2012; PARK et al., 2014; TAMMA et al., 2009b). Todos os animais receberam duas injeções por dia, com intervalos de 12 h entre as injeções, no 19<sup>o</sup> mês e 20<sup>o</sup> mês. Após 30 dias sem tratamento foram eutanasiados (21<sup>o</sup> mês) (Figura 7).



**Figura 7.** Descrição metodológica do período experimental. Coleta de ciclo estral, distribuição de 40 ratas fêmeas Wistar em quatro grupos, sendo 1- Controle (Veh), 2- Atosiban (At), 3- Ocitocina (Ot) e 4- Atosiban + Ocitocina (At+Ot). Os grupos seguiram para tratamento, eutanásia e coleta de materiais para análises.

### 3.2. Coleta de Ciclo Estral

O esfregaço vaginal foi coletado e colocado em lâmina de vidro às 9 horas da manhã, e analisado fresco sob o microscópio ótico para checar o período do ciclo estral, por 15 dias, para acompanhamento dos grupos experimentais, de acordo com a técnica de Long & Evans (1922). Como critério de inclusão somente participaram deste estudo ratas com 19 meses, com ciclo estral irregular em diestro persistente e múltiparas (NICOLA et al., 2016) (Figura 8). Após a confirmação da irregularidade (19 meses) do ciclo estral, 40 ratas foram submetidas aos tratamentos.



**Figura 8.** 1 Coleta do esfregaço vaginal 2 colocado em lâmina 3 analisado fresco em microscópio ótico 4 análise dos períodos do ciclo estral 5 critério de inclusão e exclusão das 40 ratas submetidas aos tratamentos.

### 3.3. Coleta de materiais

Trinta dias após a última administração de Veh, At, Ot ou At+Ot, os animais foram anestesiados com mistura de cloridrato de xilazina (10 mg/kg de m.c., IP) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg m.c., IP) e posteriormente decapitados para a coleta sanguínea. O sangue foi centrifugado (2.500 RPM; 15min; 20C) e o plasma foi armazenado para medições de marcadores da atividade celular do metabolismo ósseo. Os fêmures foram retirados assepticamente e imediatamente processados para análise histomorfométrica e imunohistoquímica (Figura 9).



**Figura 9.** ① Eutanásia por exsanguinação sob anestesia geral com cloridrato de xilazina (10 mg/kg de m.c., IP) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg m.c., IP) ② Coleta do sangue em tubo heparinizado ③ Centrifugação do sangue para obtenção do plasma (2.500 RPM por 15 min à 2°C) ④ Coleta dos sobrenadante para análises posteriores e ⑤ Retirada asséptica dos fêmures.

### 3.4. Determinação da Atividade da Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)

As enzimas Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) foram avaliadas usando kits Bioclin. A atividade AST foi medida pelo método baseado na transferência de aminogrupos de L-aspartato para 2- $\alpha$ -ketoglutarato com formação de oxaloacetato e L-glutamato e depois oxaloacetato foi reduzido para malato por desidrogenase de malato com oxidação simultânea de NADH para NAD<sup>+</sup>. A atividade ALT, semelhante à AST, foi analisada pelo método baseado na transferência de aminogrupos de L-alanina para 2- $\alpha$ -ketoglutarato com formação de piruvato, que depois foi reduzido para L-lactato por LDH com oxidação simultânea de NADH para NAD<sup>+</sup> (HENRY et al., 1960; KARMEN, 1955). Em ambos os casos, a redução da absorção a 340 nm, resultante da oxidação do NADH, foi proporcional à atividade ALT e AST na amostra. Os valores da atividade de ALT e AST foram

expressos como atividade específica (U/mg de proteína total) (HUIJGEN, SANDERS, KOSTER, VREEKEN, 1997).

### **3.5. Marcadores do Estresse Oxidativo**

Determinação do dano oxidativo lipídico por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs): a peroxidação foi realizada através da medição de TBARs. O sobrenadante foi suavemente agitado com mistura de reação contendo 15% (p/v) de ácido tricloroacético, 0,67% (p/v) de ácido tiobarbitúrico e 0,25 mol/L HCl. As amostras foram incubadas em banho-maria a 95°C por 45 minutos e depois resfriadas em gelo (BIRD; DRAPER, 1984). Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 1000 x g durante 10 minutos. Após a centrifugação, o TBARs no sobrenadante foi determinado a 532 nm em leitor de microplaca (Biotek Powerwave 340, EUA) (BOSE; SUTHERLAND; PINSKY, 1989). A quantidade de aldeídos formada foi calculada utilizando seu coeficiente de extinção ( $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **3.6. Defesa antioxidante não-enzimática**

A capacidade antioxidante total (FRAP) foi determinada espectrofotometricamente pelo método de redução do ferro, conforme descrito anteriormente por Benzie & Strain (1996). Os resultados foram calculados utilizando curva padrão com diferentes concentrações de soluções de  $\text{FeSO}_4$ .

### **3.7. Determinação da defesa antioxidante enzimática**

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada espectrofotometricamente (420 nm) mensurando a taxa de inibição da autooxidação do pirogalol em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50% 3. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi determinada pelo método que utiliza o peróxido de di-terc-butila como substrato da reação, ocorrendo oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathione redutase

(GR), consumindo nessa reação uma molécula de NADPH. A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente monitorando o consumo de NADPH a 340 nm em meio contendo 50 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 1 mmol/L de EDTA, 0,1 mmol/L de NADPH, 0,4 mmol/L de azida de sódio, 0,1 U/mL de GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de peróxido de terc-butila e amostras. A azida de sódio foi usada para bloquear a atividade da catalase. Uma U da atividade da GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto, usando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

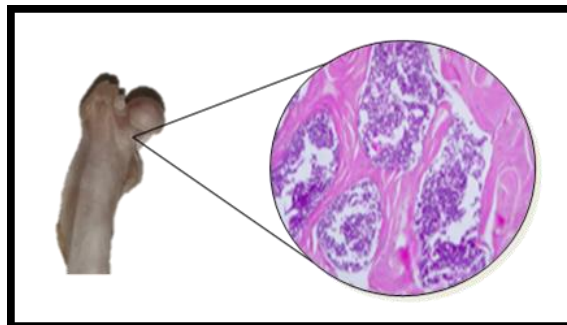
### **3.8. Análises dos marcadores de formação óssea, Fosfatase Alcalina Total (FAL), e de reabsorção óssea, Fosfatase Ácida Resistente Ao Tartarato (TRAP)**

A análise bioquímica da fosfatase alcalina (FAL) em amostras de plasma foi determinada pelo método colorimétrico adaptado (GRANJEIRO; TAGA; AOYAMA, 1997; ZHANG et al., 2012). A atividade enzimática foi determinada a 37 °C em tampão glicina (pH 9,4), contendo 2,0 mM de substrato p-NPP e 2,5 mM de cloreto de magnésio Sigma, St. Louis, EUA. A formação de p - NP foi determinada colorimetricamente pela leitura da absorvância a 405 nm usando um coeficiente de extinção molar de  $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A atividade residual correspondente ao FAL foi expressa em Unidades Internacionais por litro (U/L), onde uma unidade corresponde à quantidade necessária de enzima que catalisa a transformação de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto por litro de plasma. A análise bioquímica da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) em amostras de plasma foi determinada pelo método colorimétrico adaptado de (BENZIE; STRAIN, 1996; ZHANG et al., 2012). A atividade enzimática do TRAP foi determinada a 37° C em tampão de acetato de sódio (pH 5,8), contendo 5 mM de substrato de p-nitrofenilfosfato na presença de 50 mM de tartarato de sódio e 1 mM de p-hidroximercribenzoato, inibidor de fosfatase ácida de baixo peso molecular (LAIDLER; TAGA; VAN ETTEN, 1982; LAU et al., 1987), (p-HMB, Sigma, St. Louis, EUA). A formação de p-nitrofenil (p-NP) foi colorimetricamente determinada pela leitura da absorvância a 405 nm usando coeficiente de extinção molar de  $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A atividade residual correspondente ao TRAP foi expressa em (U/L), onde uma unidade corresponde à quantidade necessária de enzima que catalisa a transformação de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto por litro de plasma.

### 3.9. Análise Histomorfométrica

Para análise histológica, os fêmures foram fixados em formalina neutra (10%) por 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados em água corrente (24 horas) e descalcificados em solução de EDTA (10%). Após a descalcificação, lavados em água corrente (24 horas), desidratados e diafanizados, e incluídos em parafina pelo método de rotina. Posteriormente foram confeccionados cortes semi-seriados de 03 micrômetros de espessura corados com hematoxilina e eosina para análise histológica da região epifisária proximal.

Imagens da região do colo do fêmur foram obtidas com auxílio de microscópio óptico (Axio Scope®, Carl Zeiss Microscopy) e programa de imagem ZEN 2® (*Blue edition*; versão 6.1.7601; Carl Zeiss Microscopy). O programa IMAGE J foi utilizado para efetuar as mensurações nas fotomicrografias. No tecido ósseo compacto foi mensurada a espessura média da cortical óssea, em  $\mu\text{m}$ . No tecido ósseo esponjoso foram mensuradas a espessura média das trabéculas ósseas, em  $\mu\text{m}$ , e a quantidade média de trabéculas ósseas por  $\text{mm}^2$ .



**Figura 10.** Região de interesse da análise histomorfométrica – tecido ósseo trabecular e cortical do colo do fêmur.

### 3.10. Análise Imunoistoquímica

O processamento imunoistoquímico foi realizado através do método de imunoperoxidase indireta, conforme descrito por Ervolino e colaboradores (2019). As lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram divididas em oito lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OCN de coelho (1:200; ab-93876, Abcam®) e anti-TRAP (1:400; SC-376875, Santa Cruz Biotecnologia®).



As seções histológicas foram examinadas cegamente sob iluminação brilhante *field* em microscópio de luz (Optiphot-2, Nikon, Japão) por examinadores histologista certificado (E.E.) com grande experiência neste tipo de avaliação. A atribuição da pontuação foi executada cegamente duas vezes e em dias diferentes para aumentar a confiabilidade dos dados obtidos. Duas áreas foram analisadas na porção cortical e na porção medular do tecido ósseo do colo do fêmur. Cada uma destas áreas foi  $300 \times 400 \mu\text{m}$  e foi realizada com ampliação de x400. O padrão de marcação imunológica foi avaliado através de escores, adaptados a partir dos critérios estabelecidos por Stringhetta-Garcia e colaboradores (2016). Para TRAP: SCORE 0 indica ausência de imunomarcção; SCORE 1 indica padrão de imunomarcção baixo, menos de três células de imunoreatividade por área; SCORE 2 indica padrão de imunomarcção moderado, entre três e sete células de imunoreatividade por área; SCORE 3 indica padrão de imunomarcção alto, mais de sete células de imunoreatividade por área. Somente células multinucleadas TRAP-positivas perto de superfície óssea foram consideradas. Para OCN: SCORE 0 significa ausência total de imunomarcção; SCORE 1 significa baixa rotulagem, considerando que aproximadamente 1/3 das células eram imunoreativas e que havia uma rotulagem leve na matriz extracelular; SCORE 2 significa rotulagem moderada, considerando que aproximadamente 1/2 das células eram imunoreativas e que havia uma rotulagem moderada na matriz extracelular; SCORE 3 significa rotulagem alta, considerando que aproximadamente 2/3 das células eram imunoreativas e que havia uma rotulagem forte na matriz extracelular (Figura 11).



**Figura 11.** ① Lavagem das lâminas silanizadas em PBS e PBStx durante o procedimento de imunoistoquímica ② Etapa de recuperação do antígeno em tampão citrato na panela de pressão durante o procedimento de imunoistoquímica ③ Lâminas coradas em hematoxilina e em *fast green*.

### 3.11. Densitometria Óssea

A densidade mineral óssea areal (DMOa; g/cm<sup>2</sup>) foi determinada no fêmur direito (colo do fêmur e fêmur total) dos animais, utilizando densitômetro DPX-ALPHA, com software especial para pequenos animais (Figura 12). A avaliação densitométrica foi realizada no início do período experimental, ou seja, no momento da separação dos grupos e após o sacrifício dos animais e dissecação dos fêmures.

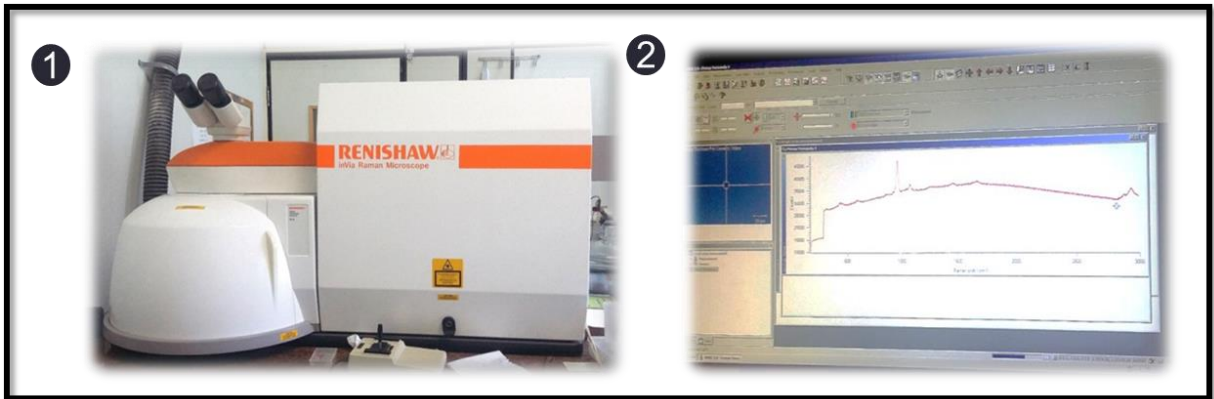


**Figura 12.** ① Densitômetro DPX-ALPHA para análise de densitometria óssea ② Software de análise para pequenos animais.

### 3.12. Microspectroscopia Raman

A composição mineral-matriz do tecido ósseo foi analisada pela microspectroscopia de Raman utilizando o espectrógrafo micro-Raman (Renishaw, modelo inVia). O comprimento de onda do laser utilizado foi de 633 nm a 50% da potência do laser (microwatts- $\mu$ W). Os ajustes foram realizados a 1800 linhas por mm com tempo de exposição de 30 segundos, e o número de acúmulo foi de três. Durante o processo de análise, foi utilizado microscópio óptico Leica (série DMLM) acoplado ao espectrógrafo e a objetiva de 50x (Figura 13). Três espectros (varreduras) de cada amostra foram coletados para determinar a composição e as intensidades relativas do mineral e da matriz no colo do fêmur direito (PERES-UENO et al., 2017). Os espectros Raman de cada amostra foram truncados (200 a 2000 cm<sup>-1</sup>), corrigidos na linha de base e na média. As faixas utilizadas neste estudo foram fosfato (1PO<sub>4</sub>: 959-960 cm<sup>-1</sup>), colágeno específico (prolina: 855 cm<sup>-1</sup>) e carbonato (CO<sub>3</sub>: 1070-1077 cm<sup>-1</sup>) (BI et al., 2011; KHALID et al., 2018). Com base

nas relações de intensidades de pico, foram calculadas a relação mineral/colágeno ( $1\text{PO}_4/\text{Proline}$ ) e a substituição de carbonato tipo B ( $\text{CO}_3/1\text{PO}_4$ ) (KHALID et al., 2018). A cristalinidade foi determinada como o inverso da largura total na metade do máximo, na qual o máximo foi a intensidade de pico normalizada (um) em relação à linha de base (zero) do pico  $1\text{PO}_4$  (AKKUS; ADAR; SCHAFFLER, 2004).

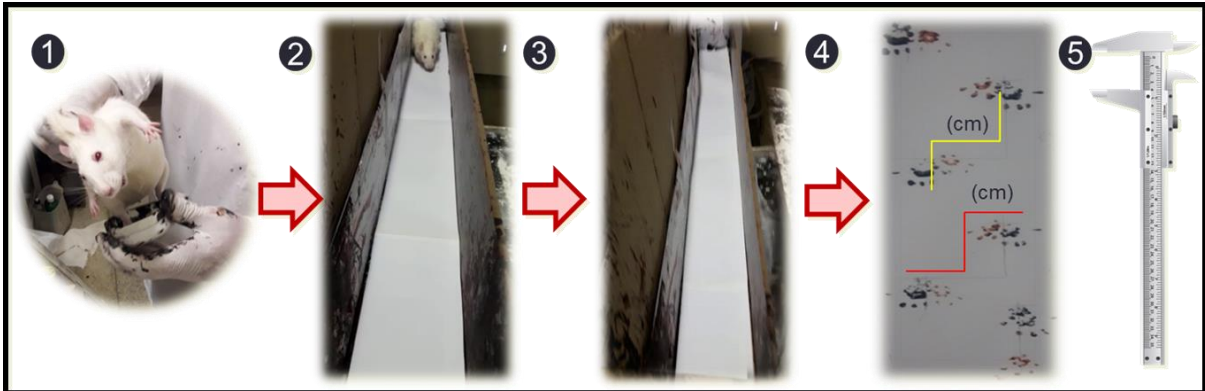


**Figura 13.** ① Espectrógrafo micro-Raman (Renishaw, modelo inVia) ② Software de reprodução dos dados. Parceria UNESP – *Campus* Presidente Prudente, Laboratório de Física.

### 3.13. Avaliação e correlação com a força e função do músculo esquelético

#### Teste de Caminhada Funcional

O teste de caminhada permitiu a avaliação funcional da marcha de roedores e foi indicativo do estado da função do músculo esquelético (KENNEL et al., 1996). Neste teste, as patas traseiras dos animais foram colocadas em contato com tinta preta não tóxica (guache) e as patas dianteiras com tinta marrom com as mesmas especificações. Os animais foram então suavemente posicionados em caixa retangular de madeira (45 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrados com papel branco) (Figura 14). Antes de terem suas patas pintadas, os animais caminharam pela caixa três vezes. Em seguida, foi medido o comprimento da caminhada. Os dados foram obtidos previamente antes do início dos tratamentos (19 meses de idade) e ao final do período experimental (21 meses de idade).



**Figura 14.** ① As patas traseiras e dianteiras dos animais foram colocadas em contato com tinta (guache) atóxica de cores marrom (dianteiras) preta (traseiras) em seguida, ② os animais foram posicionados em caixa retangular de madeira (45 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) para ③ caminharem por três tentativas. Dados obtidos previamente (19 meses de idade) e ao fim do período experimental (21 meses de idade). ④ e ⑤ Largura e comprimento de passos por centímetro, medidos por paquímetro.

### 3.14. Teste Comportamental de Ansiedade "Labirinto em Cruz Elevada" - Frequência – Duração em avaliação espaço temporal

Teste foi realizado no labirinto de cruz elevada (LCE), fabricado em material de fibra de densidade média (MDF) revestido com fórmica branca e com quatro braços com as mesmas dimensões de (50 cm x 10 cm) dispostos em forma de cruz. Os braços partiram do quadrado central (10 cm x 10 cm) levantados 50 cm acima do solo. Dois braços opostos foram abertos (sem nenhuma proteção), enquanto os outros dois foram fechados por paredes de MDF de 40 cm de altura. O teste foi realizado na fase clara do animal. Cada animal foi gentilmente colocado na praça central e pôde explorar livremente o labirinto por 5 min (FERREIRA, 2005). Uma primeira sessão de habituação e segunda sessão para o teste eficaz foram realizadas, com intervalo de uma hora entre elas (Figura 15). A sessão foi gravada com câmera de vídeo e estes vídeos seguiram para análise comportamental detalhada.

#### Variáveis de espaço-tempo estudadas - duração e frequência:

- **Número de entradas em braços abertos e braços fechados:** Frequência das entradas, confirmada a partir da colocação das quatro patas dos animais em cada braço.
- **Número total de entradas:** Soma do número de entradas nos braços abertos e fechados.

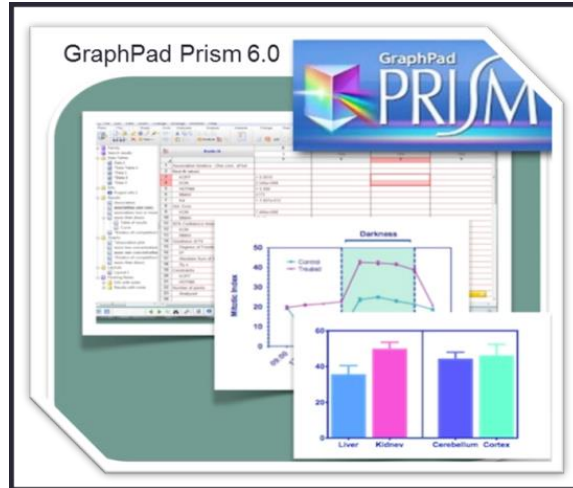
- **Número de entradas em braços abertos (%):** Cálculo da porcentagem do número de entradas em braços abertos ( $\text{Número de entradas em braços abertos} \times 100 / \text{Número total de entradas}$ ).
- **Duração da permanência em braços abertos:** Duração da estadia em braços abertos, começando a contar a partir da colocação das quatro patas dos animais em cada um dos braços.
- **Tempo de permanência em braços fechados:** Tempo de permanência nos braços fechados, iniciando a contagem a partir da colocação das quatro patas dos animais em cada um dos braços.



**Figura 15.** Animal do grupo experimental, explorando um dos braços abertos durante a realização do teste comportamental do tipo ansioso no Labirinto De Cruz Elevada.

### 3.15. Análise estatística

A normalidade e homocedasticidade dos dados foram coletados e verificados e os resultados foram analisados usando o GraphPad Prism 6.0 (Figura 16), expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e considerados estatisticamente significativos quando 5% ( $p < 0,05$ ) do nível de rejeição da hipótese de nulidade. Os dados foram submetidos ao teste  $t$ , análise de variância (ANOVA) One-way seguido pelo pós-teste de Tukey. Os dados imunistoquímicos foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls não pareado.



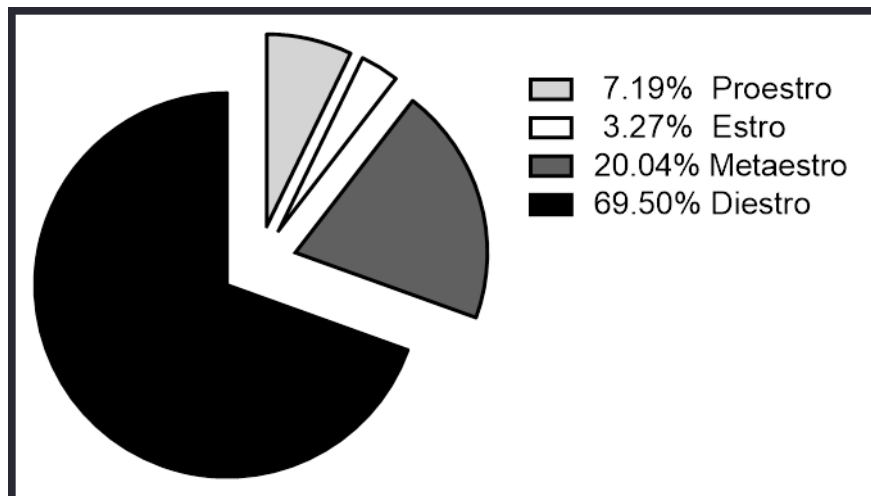
**Figura 16.** GraphPad Prism 6.0 para a análise da normalidade e homocedasticidade dos dados coletados. Fonte: google - GraphPad Prism 6.0 - imagem, (2020).

## **RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1. A análise do ciclo estral

Para caracterizar o modelo experimental apropriado ao estudo da senescência, analisamos as alterações que ocorrem no ciclo estral de ratas multíparas com 19 meses de idade. As análises mostraram que a alteração inicial foi o aumento da variabilidade na duração das fases do ciclo estral com diestro persistente (69,50%) com duração de 10-12 dias a mais com recorrência dentro de 3 ou 4 ciclos, seguido por 20,04% metaestro, 7,19% proestro e 3,27% estro. Esta variabilidade na duração das fases e a persistência em diestro, caracterizaram o período de periestro-pausa nestes animais. Após as injeções de Veh, AT, OT ou AT+OT, a irregularidade do ciclo estral não foi significativamente alterada e, portanto, o período experimental foi continuado (Figura 17).

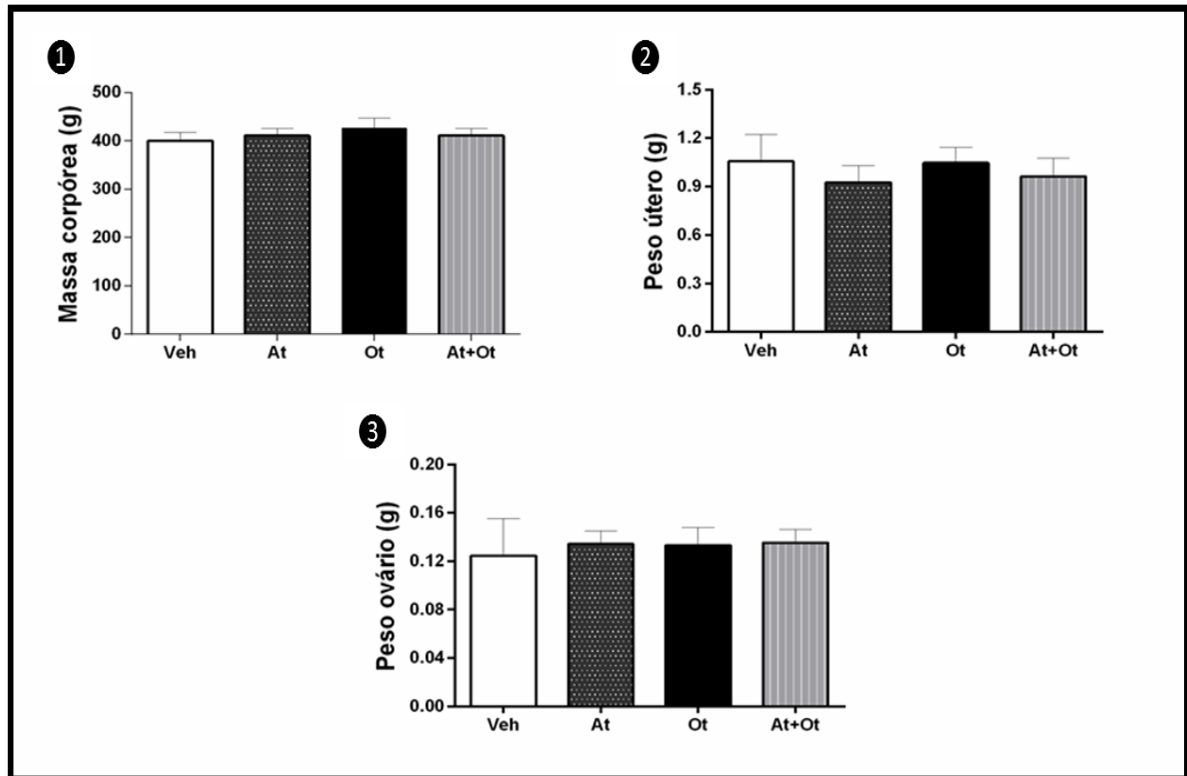


**Figura 17.** Porcentagem das fases do ciclo estral das ratas com 18 meses: 7,19% proestro, 3,27% estro, 20,04% metaestro e 69,50% diestro, evidenciando a irregularidade no ciclo estral (periestro-pausa).

### 4.2. Peso corporal final, uterino e ovariano

As análises do peso corporal (Figura 18-1), uterino (Figura 18-2) e ovariano (Figura 18-3) mostraram que após o tratamento com Veh, AT, OT e AT+OT, não houveram alterações nos pesos entre os diferentes grupos experimentais.

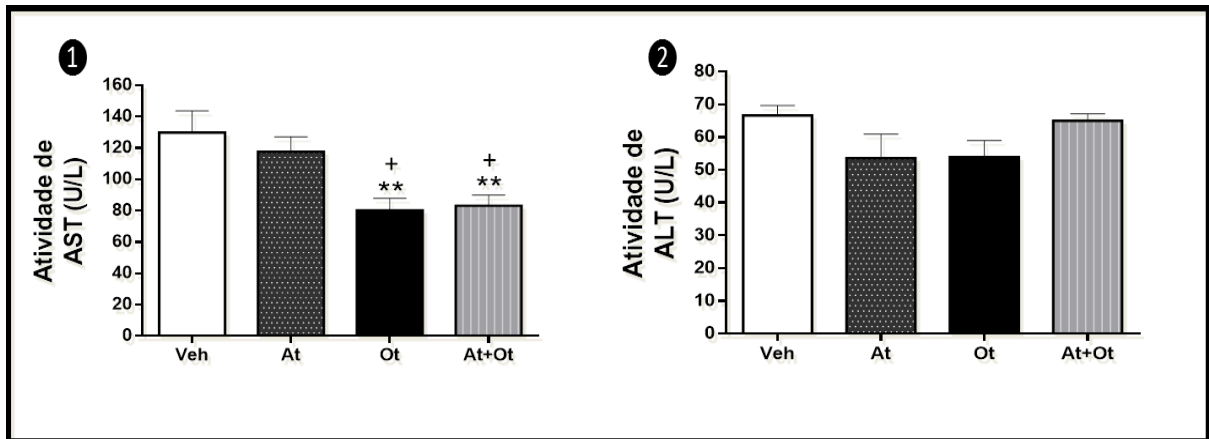




**Figura 18.** Análise do peso corporal ①, uterino ② e ovariano ③ por gramas (g), de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média.

### 4.3. Determinação da atividade AST e ALT

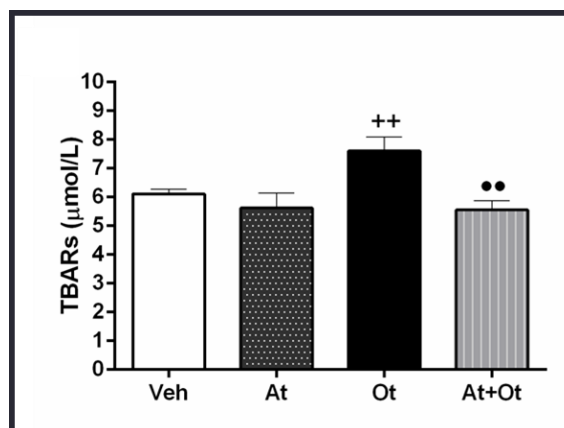
A determinação bioquímica plasmática de marcadores de danos hepáticos evidenciou que atividade de AST, nos animais dos grupos tratados com Ot, foi menor em relação aos dos grupos At ( $p = 0,0282$ ) e Veh ( $p = 0,0066$ ). Também foi verificado menor atividade de AST nos animais do grupo At + Ot em relação aos grupos At ( $p = 0,0353$ ) e Veh ( $p = 0,0080$ ) (Figura 19- 1). Em ALT, não foram observadas alterações significantes (Figura 19- 2).



**Figura 19.** Análise plasmática dos marcadores de dano hepático: atividade (U/L) da Aspartato Aminotransferase (AST) e ① e Alanina Aminotransferase (ALT) ALT ② de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): \*\* $p < 0,01$  vs Veh; + $p < 0,05$  vs At.

#### 4.4. Análise do conteúdo plasmático de TBARs

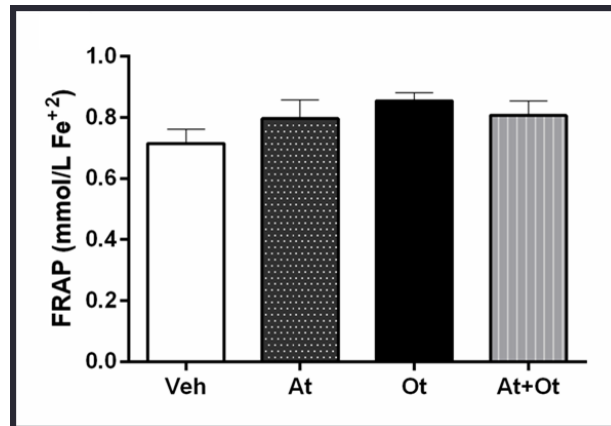
Análise plasmática dos danos oxidativos lipídicos: TBARs ( $\mu\text{mol/L}$ ), foi possível observar aumento significativo no grupo Ot quando comparado ao grupo At ( $p = 0,0093$ ), e diminuição no grupo At + Ot em relação ao grupo Ot ( $p = 0,0040$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Análise plasmática dos marcadores de dano oxidativo lipídico: atividade ( $\mu\text{mol/L}$ ) das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): ++ $p < 0,01$  vs At; \*\* $p < 0,01$  vs Ot.

#### 4.5. Determinação da defesa antioxidante não-enzimática

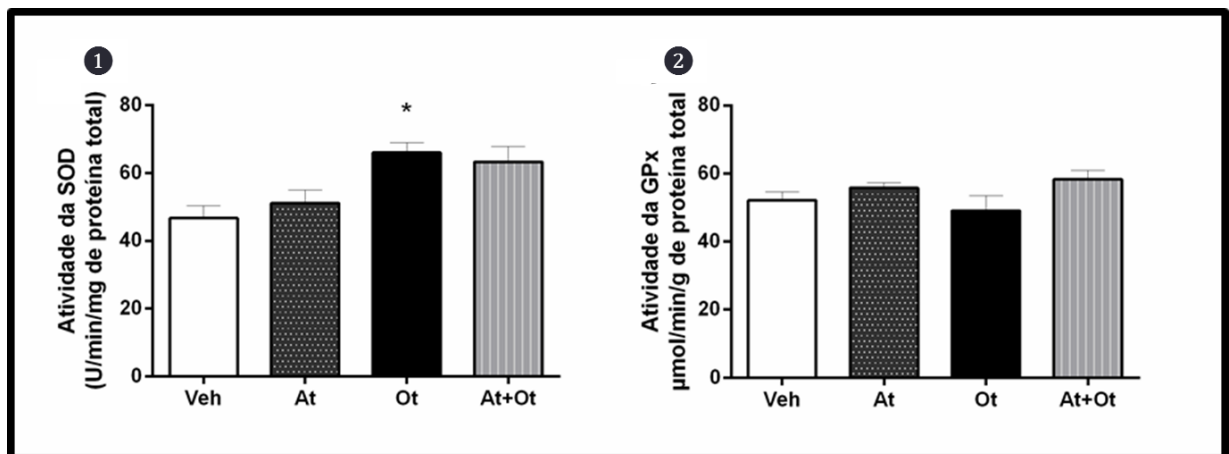
Na análise plasmática de determinação da FRAP, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados (Figura 21).



**Figura 21.** Análise plasmática dos marcadores de defesa antioxidante não-enzimática: capacidade antioxidante total (FRAP) Fe<sup>2+</sup> mmol/L, de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, descrito na coluna como média ± erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Determinação da defesa antioxidante enzimática

Foram observadas diferenças entre os grupos nas atividades da SOD no grupo OT quando comparado ao grupo Veh ( $p < 0,0312$ ) (Figura 22- 1). Já na análise enzimática de GPx, não observamos diferença significativa entre os grupos (Figura 22- 2).

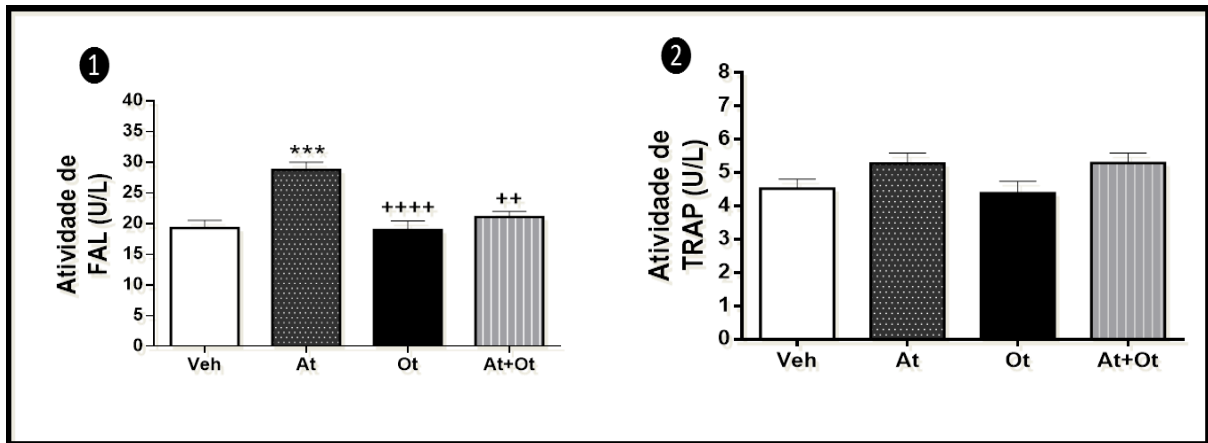


**Figura 22.** Análise plasmática dos marcadores de defesa antioxidante enzimática: superóxido dismutase (SOD) U/min/mg de proteína ① capacidade de glutathione peroxidase (GPx) µmol/min/g de proteína ② de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média ± erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): \* $p < 0,05$  vs Veh.

#### 4.7. Determinação da atividade FAL e TRAP

Na análise plasmática dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea a FAL (U/L), foi observado aumento no grupo At quando comparado ao grupo Veh ( $p =$

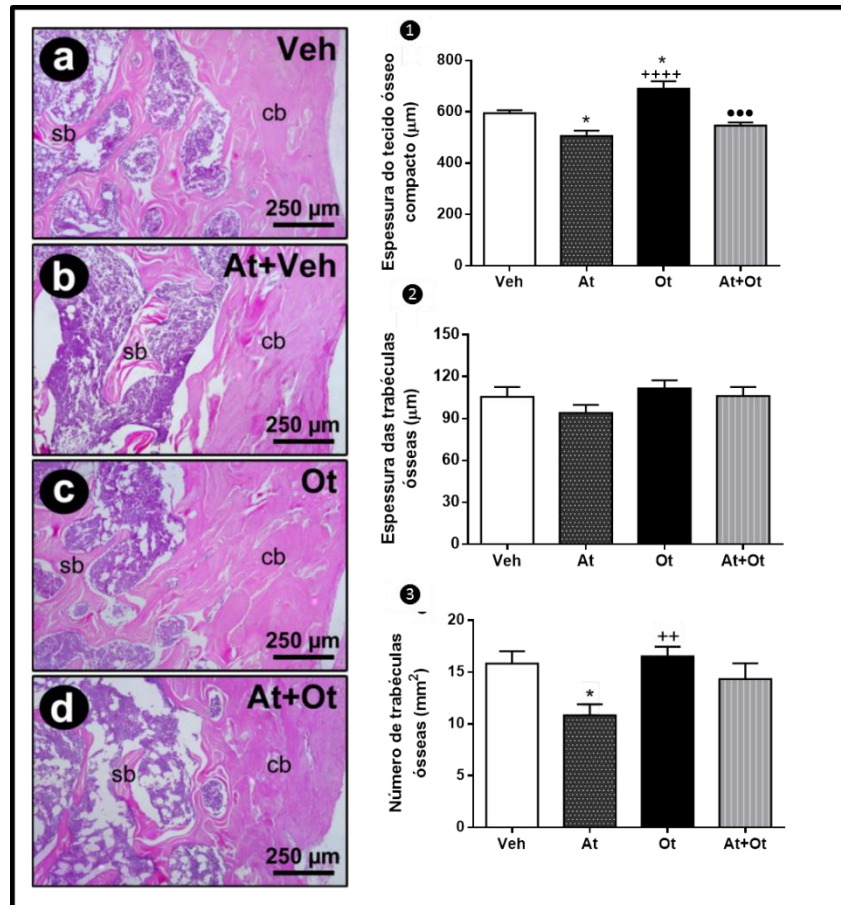
0,0001), e a diminuição nos grupos Ot e At+Ot em relação ao grupo At ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0015$ ) (Figura 23- 1). Na análise de TRAP (U/L) não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos (Figura 23- 2).



**Figura 23.** Análise plasmática dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea: atividade (U/L) de fosfatase alcalina (FAL) ① e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) ②, de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): \*\*\* $p < 0,001$  vs Veh; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs At.

#### 4.8. Histomorfometria do colo do fêmur

A histomorfometria do colo do fêmur das ratas Wistar, demonstrou diminuição significativa na espessura do tecido ósseo compacto dos animais do grupo At, em relação ao grupo Veh ( $p = 0,0228$ ). Nesta mesma análise houve aumento significativo nos animais do grupo tratado com OT em relação ao grupo Veh e At ( $p = 0,0132$ ,  $p < 0,0001$ ). Nos animais do grupo At+Ot há diminuição significativa quando comparado ao grupo Ot ( $p = 0,0003$ ) (figura 24- 1). A análise de espessura das trabéculas ósseas não evidenciou diferenças significantes entre os grupos tratados (figura 24-2). Já o número de trabéculas ósseas evidenciou diminuição nos animais do grupo At comparado ao grupo Veh ( $p = 0,0240$ ), e aumento do grupo Ot em relação ao grupo At ( $p = 0,0084$ ) (figura 24-3).

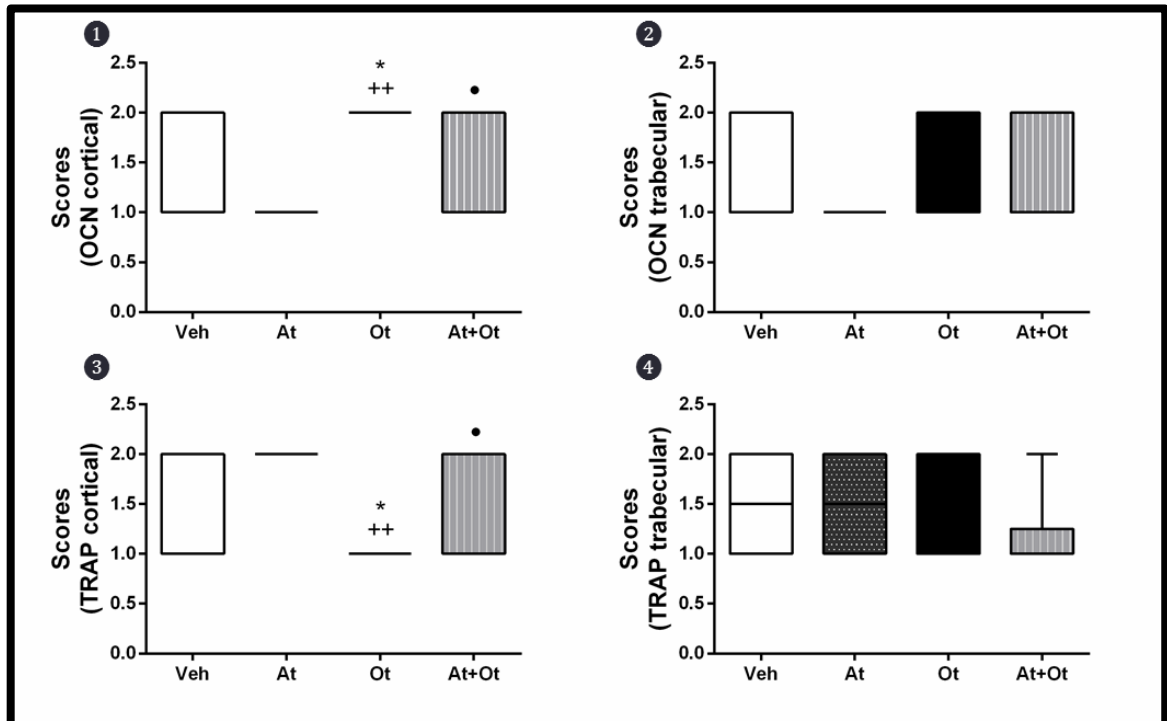


**Figura 24.** Fotomicrografia com coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) demonstrando a morfologia óssea (250 µm) de animais dos grupos Veículo (Veh) (a), tratados com AT (At) (b), tratados com OT (Ot) (c) e tratados com AT e OT (At+Ot) (d). Análise histomorfométrica do colo do fêmur de ratas Wistar (19 meses), espessura do tecido ósseo compacto ①, espessura das trabéculas ósseas ②, número de trabéculas ósseas ③ de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média ± erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): \* $p < 0,05$  vs Veh; \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$  vs Ot e \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs At. sb:osso esponjoso; cb:osso cortical.

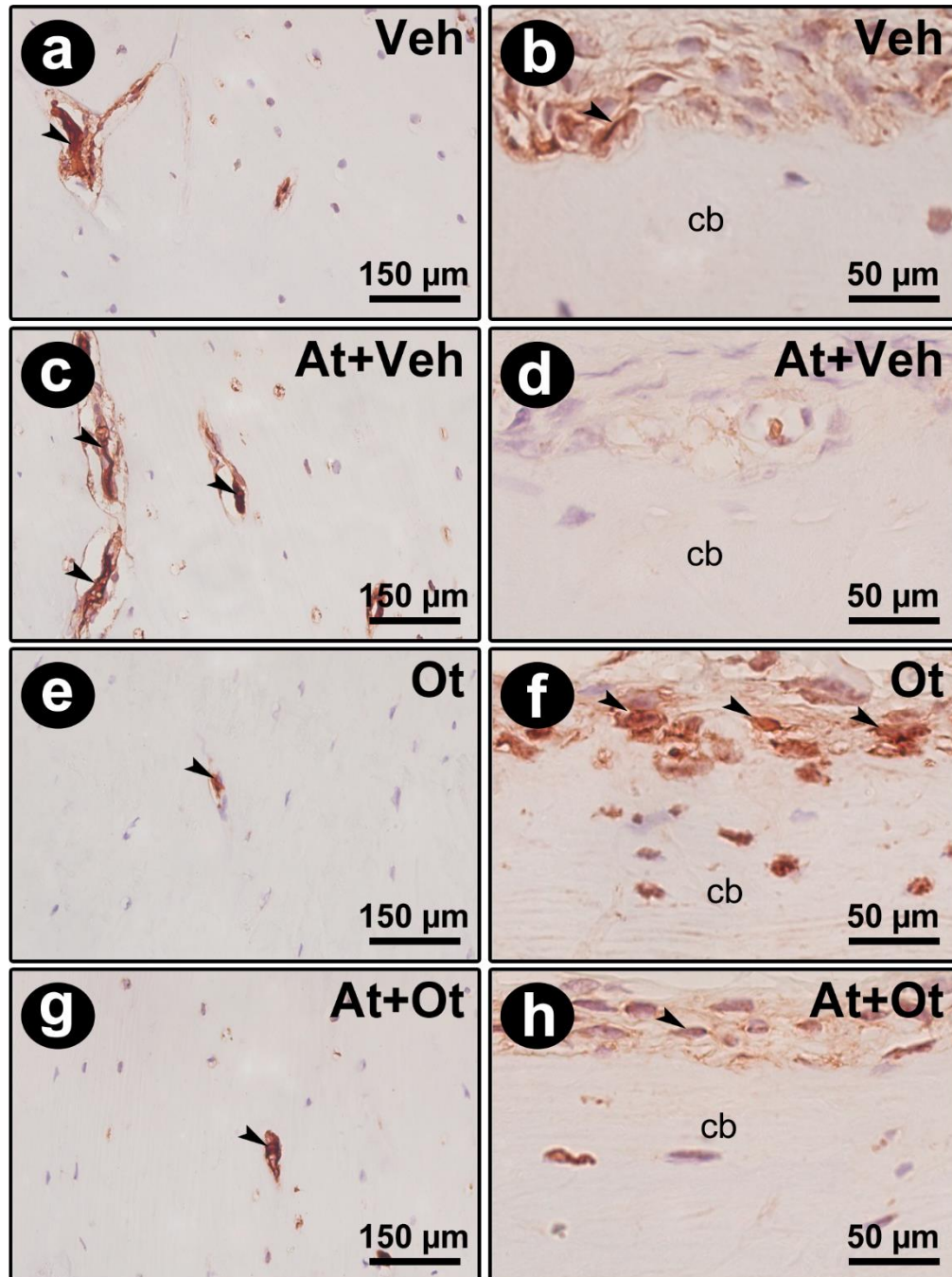
#### 4.9. Análise imunoistoquímica

Os anticorpos utilizados no método imunoistoquímico apresentaram alta especificidade para as proteínas estudadas, o que foi confirmado pela ausência completa de imunomarcagem no controle negativo. O osso cortical do colo do fêmur dos animais que receberam OT apresentou maior expressão cortical de osteocalcina (OCN) no grupo Ot em relação aos grupos Veh e At ( $p = 0,05$  e  $0,0033$ ), e menor expressão no grupo At+Ot em relação aos animais do grupo Ot ( $p = 0,05$ ) (Figura 25- 1; Figura 26- b, d, f, h). Quanto à expressão TRAP, houve menor expressão no grupo Ot em relação aos grupos Veh e At ( $p = 0,05$  e  $0,0033$ ) e maior expressão de TRAP no grupo At+Ot em relação aos animais do grupo Ot ( $p = 0,05$ ) (Figura 25- 3;

Figura 26- a, c, e, g). As mesmas proteínas no osso trabecular não mostraram quaisquer alterações significantes (Figura 25- 2 e 4).



**Figura 25.** Gráficos de imunohistoquímica do colo do fêmur nas regiões cortical e trabecular. Osso cortical: ① osteocalcina (OCN) e ③ fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Trabecular: ② osteocalcina (OCN) e ④ fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). A análise estatística foi realizada usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls não pareado, descrito em coluna com média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5%: \*/•  $p < 0,05$ , ++ $p < 0,01$ . \*vs Veh, +vs At, •vs Ot.

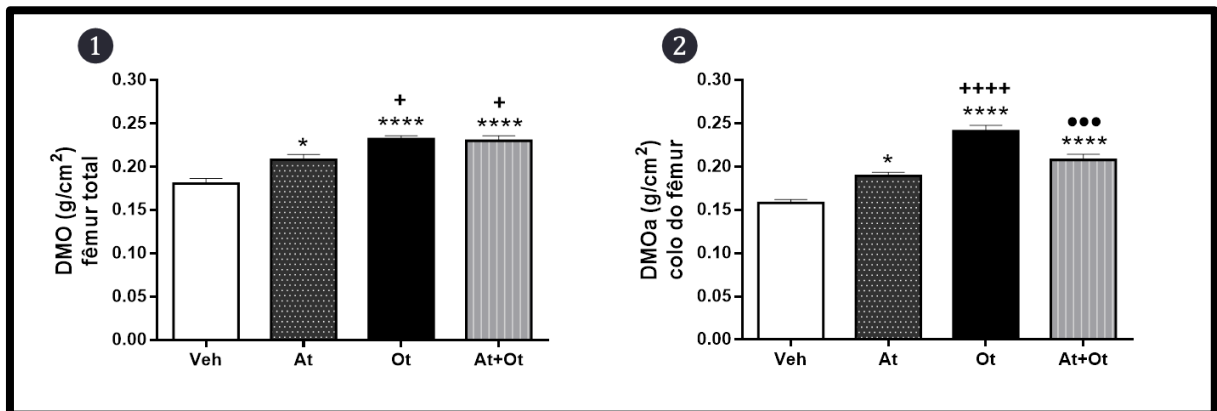


**Figura 26.** Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TRAP (a, c, e, g) e OCN (b, d, f, h) no colo do fêmur nos grupos Veh (a, b), At + Veh (c, d), Ot (e, f) e At + Ot (g, h). Abreviaturas e símbolos: cb, osso cortical; setas, células imunorreativas. Ampliação original: a, c, e, g: 400x; b, d, f, h: 1000x. Barras de escala: a, c, e, g: 150 µm; b, d, f, h: 50 µm. Contra-coloração: Harris Hematoxylin.

#### 4.10. Densitometria óssea

Na análise da densitometria óssea do fêmur total, foi possível observar que o DMO (DMO g/cm<sup>2</sup>) nos grupos At, Ot e At+Ot foi maior em relação ao Veh ( $p = 0,0116$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ), enquanto que os grupos Ot e At+Ot apresentaram DMO maior em relação ao grupo At ( $p = 0,0231$ ,  $p = 0,0418$ ) (Figura 27- 1). A

densitometria óssea areal do colo do fêmur foi mais alto dos grupos At, Ot e At + Ot em comparação com o grupo Veh ( $p = 0,0103$ ,  $p < 0,0001$  e  $p < 0,0001$ ) enquanto que o grupo Ot foi mais alto em comparação com o grupo At ( $p < 0,0001$ ). O DMOa foi menor no grupo At+Ot em comparação com o grupo Ot ( $p = 0,0010$ ) (Figura 27-2).

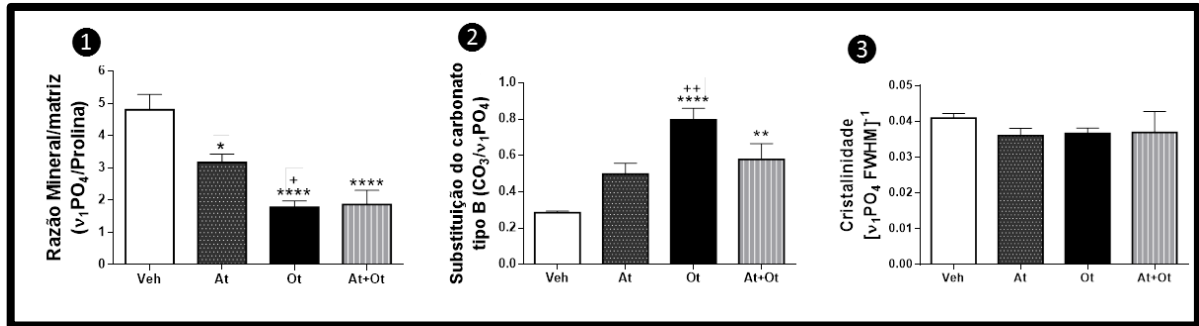


**Figura 27.** Análise da densidade óssea do fêmur: densidade mineral óssea (DMO g/cm<sup>2</sup>) do fêmur (osso inteiro - ❶) e DMOa (g/cm<sup>2</sup>) do colo do fêmur ❷ de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): \*/+ $p < 0,05$ , ••• $p < 0,001$ , ++++/\*\*\*\* $p < 0,0001$ . \*vs Veh, +vs At, •vs Ot.

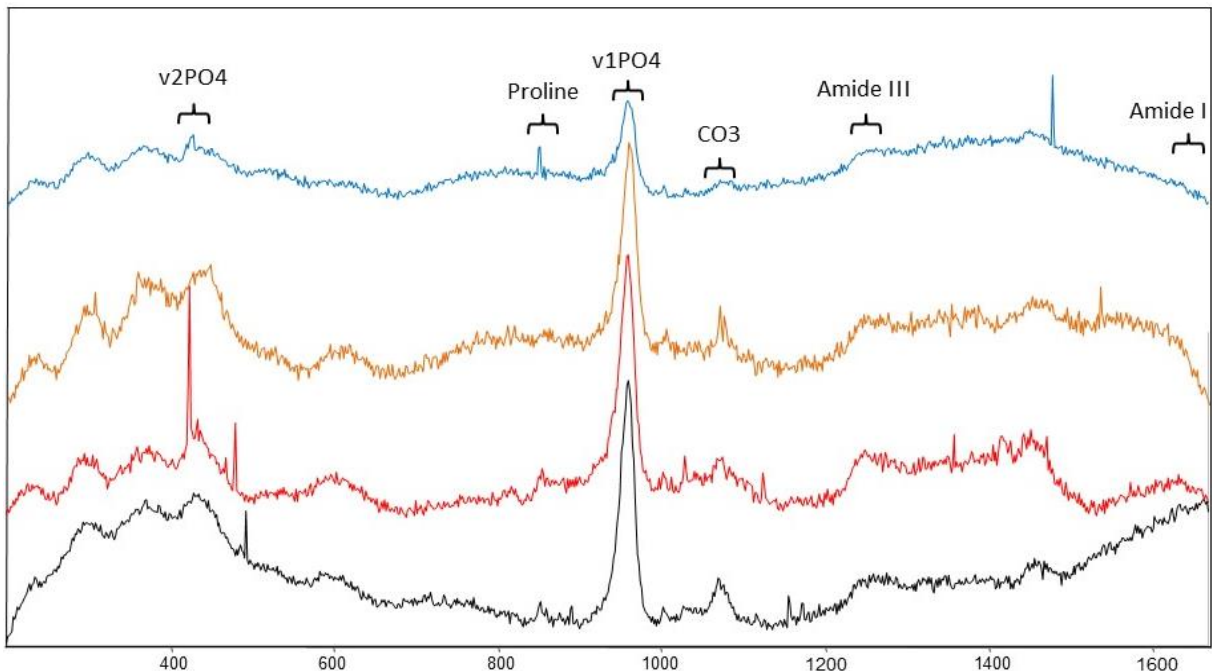
#### 4.11. Espectroscopia de Raman

Para a composição mineral-matriz do tecido ósseo da região do colo do fêmur analisada pela microspectroscopia de Raman, obtivemos os resultados em Razão Mineral-matriz ( $\sqrt{1}\text{PO}_4/\text{Prolina}$  - Figura 28-1). Os grupos At, Ot e At+Ot apresentaram menor razão mineral-matriz em relação ao grupo Veh ( $p = 0,0195$ ,  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$ ). Nesta mesma análise, o grupo que recebeu Ot apresentou diminuição significativa quando comparado ao grupo At ( $p = 0,0342$ ). A substituição de carbonato tipo B ( $\text{CO}_3/\sqrt{1}\text{PO}_4$  - Figura 28- 2) nos grupos Ot e At+Ot foi maior em relação ao grupo Veh ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0070$ ) e o grupo Ot apresentou aumento em relação ao At ( $p = 0,0073$ ). A análise da Cristalinidade [ $\sqrt{1}\text{PO}_4$  FWHM]<sup>-1</sup>, não apresentou resultados com diferença significantes entre os diferentes tratamentos (Figura 28- 3). A representação das bandas utilizadas está ilustrada na figura 29.





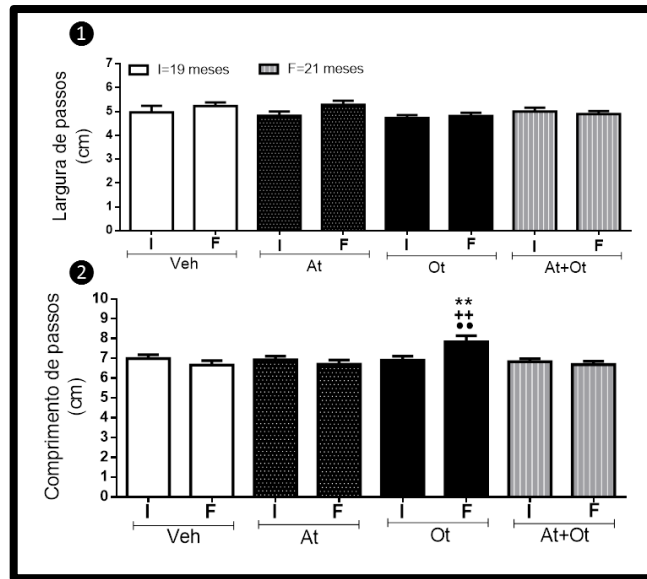
**Figura 28.** Análise da composição mineral e matricial do tecido ósseo, analisada pela microspectroscopia Raman: a relação Mineral/matriz ( $v_1PO_4$ /Prolina - ①), a substituição de carbonato tipo B ( $CO_3/v_1PO_4$  - ②) e Cristalinidade [ $v_1PO_4$  FWHM]<sup>-1</sup> ③ de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): \* $p < 0,05$ , \*\*/++ $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  \*vs Veh, +vs At.



**Figura 29.** Espectro de fêmur representativo realizado pela microspectroscopia Raman: bandas de fosfato ( $v_1PO_4$ ), prolina, carbonato ( $CO_3$ ) de animais dos grupos Veículo (Veh) (banda preta), tratados com AT (At) (banda vermelha), tratados com OT (Ot) (banda laranja) e tratados com AT e OT (At+Ot) (banda azul).

#### 4.12. Teste de deambulação

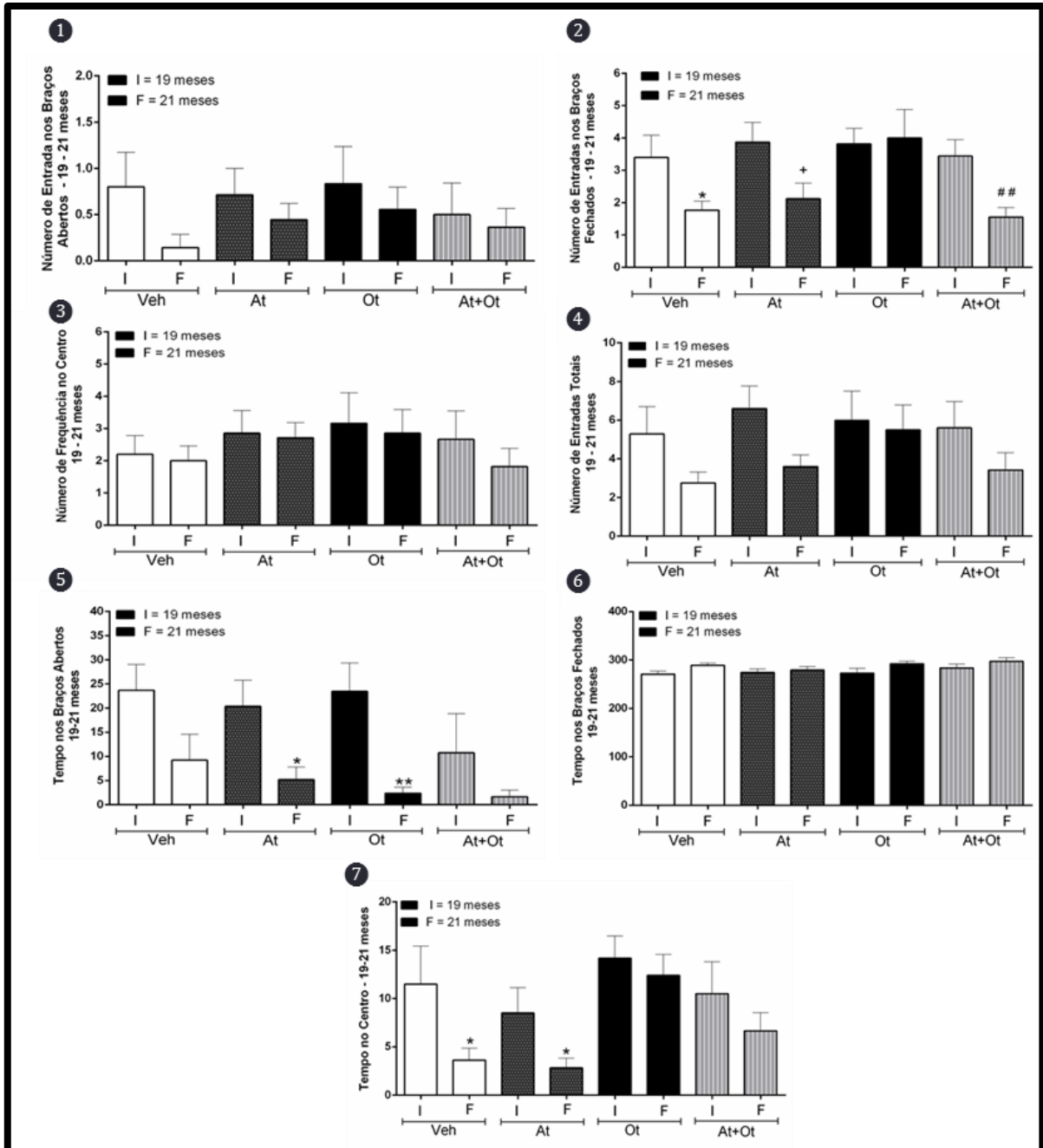
No teste de avaliação e correlação com a força e a função do músculo esquelético, não foi possível observar alterações significantes em relação à interação dos grupos (Figura 30-1). No teste do comprimento dos passos por centímetro de caminhada, podemos observar aumento no comprimento dos passos por centímetro do grupo Ot - F em comparação com Veh - F ( $p = 0,0078$ ), At - F ( $p = 0,0023$ ), e mostrou aumento sobre Ot - I ( $p = 0,0094$ ) (Figura 30- 2).



**Figura 30.** Análise de caminhada funcional: caminhada por largura (cm) ① e comprimento (cm) ② de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot), analisados aos 19 meses de idade do animal - teste inicial (I), novamente aplicado o teste aos 21 meses - teste final (F). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ):  $p < 0,01$  \*\*vs Veh-F, \*\*vs At-F, ••vs Ot-I.

#### 4.13. Teste Comportamental das variáveis espaço-tempo "Tipo-Ansioso, Labirinto Cruzado Alto" - Frequência - Duração

As análises do número de entradas nos braços abertos, número de frequências no centro do labirinto e número de entradas totais, não demonstraram diferenças significantes (Figura 31-1, 3 e 4). Entretanto, o número de entradas nos braços fechados apresentou redução significativa do grupo Veh-F em relação ao Veh-I ( $p = 0,0256$ ), redução significativa do grupo At-F em relação ao At-I ( $p = 0,0407$ ), e redução do grupo At+Ot-F em relação ao grupo At+Ot-I ( $p=0,0051$ ) (Figura 31-2). Nas variáveis de duração, foi possível observar diminuição no tempo de permanência de braços abertos no grupo At-F em relação ao grupo At-I ( $p = 0,0137$ ), e diminuição significativa no grupo Ot em relação ao grupo Ot-I ( $p = 0,0034$ ) (Figura 31-5), enquanto no tempo de permanência nos braços fechados não foi verificado resultado significativo (Figura 31-6). No período de permanência no centro, foi possível observar diminuição no grupo Veh-F em relação ao grupo Veh-I ( $p = 0,0311$ ) e também diminuição no grupo At-F em relação ao grupo At-I ( $p = 0,0439$ ) (Figura 31-7).



**Figura 31.** Análise comportamental de variáveis espaço-temporais “tipo-ansioso, labirinto em cruz elevada”, analisado em frequência e duração: número de entradas nos braços abertos **1**, número de entradas nos braços fechados **2**, número de frequência no centro do labirinto **3**, número de entradas totais **4**, tempo de permanência nos braços abertos **5**, tempo de permanência nos braços fechados **6** e tempo de permanência no centro do labirinto **7**, de animais dos grupos Veículo (Veh), tratados com AT (At), tratados com OT (Ot) e tratados com AT e OT (At+Ot). Dados analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, descrito na coluna como média  $\pm$  erro padrão de média e significância de 5% ( $p < 0,05$ ): \*vs Veh-I e At-I,  $p < 0,01$  \*\*vs Veh-I e Ot-I.

**DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo comprovamos a hipótese de que o uso do antagonista de OT, AT, potencializa a ocorrência de osteopenia e pode ser revertido pela administração de OT em ratas senescentes. Os resultados mostraram que a OT modulou o ciclo de remodelação óssea, melhorando os marcadores bioquímicos de remodelação óssea, defesa antioxidante, expressão de proteínas, densidade e propriedades físico-químicas. Nossos resultados mostram importante ação da OT endógena no processo de remodelação óssea em ratas durante o período de senescência. Além disso, a administração de OT melhora a estrutura óssea neste período da vida, quando alterações biológicas estão ocorrendo e determinando a periostropausa.

Este estudo foi realizado em ratas com irregularidade no ciclo estral (19 - 21 meses), que caracteriza o início da senescência reprodutiva. Estudos realizados em nosso laboratório mostraram alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e na regularidade do ciclo estral de ratas Wistar aos 17 e 18 meses, descrevendo assim, o período de periostropausa (FERREIRA et al., 2015; NICOLA et al., 2016), que corresponde ao período de perimenopausa nas mulheres (ANDREOLLO et al., 2012). A menor concentração plasmática de estrogênio, além de contribuir para a senescência reprodutiva feminina, está diretamente relacionada à diminuição da massa óssea, deterioração da microarquitetura óssea, associada ao aumento da reabsorção óssea e mudanças no ciclo fisiológico da remodelação óssea, favorecendo a instalação da osteoporose (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2017).

A fim de verificar a interação dos tratamentos utilizados neste estudo, com especial atenção imposta ao AT, droga potente utilizada principalmente como agente tocolítico (GOLICHOWSKI et al., 1985), analisamos marcadores de lesão hepática. A literatura mostra aumento na atividade de AST e ALT durante ou após o uso de AT em organismos maternos (KLUMPER et al., 2019), porém, em nosso estudo não observamos modificação na atividade destas enzimas no grupo At, mas redução significativa na atividade da AST nos grupos Ot e At+Ot em comparação com o grupo Veh. Estes dados corroboram com estudo em que a administração de OT em ratas ovariectomizadas de quatro semanas reduziu os níveis séricos de AST (IWASA et al., 2019). Em nossa análise enzimática da ALT, não obtivemos resultado significativo, que difere de Iwasa e colaboradores (2019), o qual mostra redução na

atividade da ALT. Diferença entre os achados é possivelmente explicada em detrimento das diferentes metodologias dos estudos, entretanto, reforçamos a adequada metodologia utilizada neste estudo, uma vez que não houveram danos hepático nos animais.

Achado importante deste estudo refere-se a maior concentração plasmática de TBARs. Embora o aumento do estresse oxidativo possa estar associado à osteoporose (TU et al., 2020; ZHANG et al., 2011), o aumento controlado de radicais livres pode estimular a proliferação e diferenciação osteoblástica (MANDAL et al., 2011; YOUNGJI CHOE et al., 2012), o que pode ser relacionado ao aumento da área óssea do colo do fêmur nos animais que receberam OT. De fato, a maior atividade de TBARs no grupo Ot sugere aumento do estresse oxidativo, porém, este efeito pode ser resposta inerente ao tratamento com OT como observado nos modelos animais em lactação *in vivo* e *ex vivo*, onde a ação da OT na regulação da excreção de proteínas pelas células secretoras mamárias tem sido associada ao aumento da peroxidação lipídica no plasma (IQBAL et al., 2013) e glândula mamária (GALANTSEV et al., 1993). Além disso, estudos mostram a relação da ação da OT por meio do seu receptor expresso em tecido adiposo com aumento na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico e à lipólise, o que pode também explicar o aumento da atividade de TBARs (DEBLON et al., 2011; GAJDOSECHOVA et al., 2014; YI et al., 2015). Por outro lado, a OT aumentou a atividade de SOD no plasma, enquanto que não alterou a FRAP e GPx. Este efeito é importante, já que os níveis de GPx séricos, SOD e FRAP foram encontrados significativamente menores em mulheres osteoporóticas pós-menopausadas (SHARMA et al., 2015). No entanto, no grupo At não observamos resultados significantes, o que pode estar associado ao fato de que os efeitos antioxidantes da OT seriam mediados por Oxtr (ÇETINEL et al., 2010).

A atividade da FAL, marcador da atividade osteoblástica analisada no plasma sanguíneo, mostrou aumento significativo no grupo At quando comparado ao grupo Veh, e diminuição nos grupos Ot e At+Ot quando comparado ao grupo At. Na análise da TRAP, marcador da ação osteoclástica, não foram detectados resultados significantes. Já se sabe que o OT age como agente ósseo anabólico (COLLI et al., 2012; COPLAND et al., 1999; FERNANDES et al., 2020; SANTOS et al., 2018; SUN et al., 2016; TAMMA et al., 2009a) e o aumento plasmático da atividade da FAL produzida é excelente indicador de estágios iniciais da formação óssea (EPSTEIN,

1988; BECK, 2003). Estudo realizado em nosso laboratório mostrou aumento significativo da FAL e da OCN plasmática, sugerindo que a OT estimula a atividade osteoblástica e a formação óssea em ratas de 24 meses (COLLI et al., 2012). No entanto, nossos resultados diferem, apresentando o aumento da FAL nos grupos tratados com antagonista do Oxtr, enquanto que os grupos Ot e At+Ot houve diminuição em comparação ao At.

Ratas senescentes apresentam características interessantes para a análise da perda óssea após irregularidade do ciclo estral (GORE, 2001). A histomorfometria do colo do fêmur mostra que a espessura do tecido ósseo compacto foi menor no grupo At, e maior no Ot, contribuindo para maior resistência óssea, pois análise da microestrutura óssea mostrou influência mais pronunciada do tecido ósseo cortical na rigidez do que o trabecular, sendo forte preditor de resistência óssea e fraturas (AUGAT; SCHORLEMMER, 2006; HEMMATIAN et al., 2018). Os animais do grupo At+Ot apresentaram diminuição da espessura do tecido ósseo compacto, o que descreve que na microarquitetura do tecido ósseo dos animais tratados com AT ocorreu bloqueio da ação da OT endógena. Além disso, o número de trabéculas ósseas foi menor no grupo At e maior no grupo Ot, evidenciando efeito benéfico da OT. Estudos relatam que o Oxtr é funcional e que o hormônio pode modular tanto a osteoclastogênese quanto a osteoblastogênese, o que explica as modificações em relação ao tecido cortical e trabecular (COPLAND et al., 1999; COLAIANNI et al., 2014a).

Ao observar a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo, OCN e TRAP, destaca-se o remodelamento ósseo dos animais tratados com OT, uma vez que a OCN, sintetizada pelos osteoblastos, incorpora-se à matriz óssea por ligação à hidroxiapatita de forma dependente do  $Ca^{2+}$ , participando da mineralização (PRAKASH; BEHARI, 2009). A TRAP é marcador de origem osteoclástica, liberada durante a reabsorção óssea e após a remoção dos osteoclastos de seu local de trabalho (AZRIA, 1989). A diminuição significativa na imunomarcação de TRAP após o tratamento com OT, sugere que em ratas senescentes, a OT atua controlando a reabsorção óssea. Tamma e colaboradores (2009a) descreveram que apesar de a OT favorecer a osteoclastogênese, pode também inibir a função de reabsorção dos osteoclastos maduros via mecanismo de sinalização de  $Ca^{2+}$  ativado por Oxtr. Uma vez que o tratamento com OT induz o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular, isto pode estar associado à diminuição de TRAP no grupo Ot, enquanto que animais do grupo At+Ot

apresentam aumento de TRAP quando comparado ao grupo Ot, possivelmente devido à ação do AT, não permitindo a ativação do mecanismo de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , em decorrência do bloqueio do Oxtr. Nossos resultados corroboram com Colli e colaboradores (2012) que descrevem maior marcação de OCN e menor de TRAP no reparo ósseo alveolar de ratas Wistar com 24 meses tratadas com OT. Corroborando com estes resultados, Tamma e colaboradores (2009a), descrevem que a OT apresentou 30% de redução na reabsorção óssea, sendo totalmente revertida pelo AT, confirmando a especificidade do AT. Portanto, em nossos resultados, a maior expressão de OCN e a menor expressão de TRAP observada na área óssea cortical de ratas tratadas com OT, sugerem que a mineralização ocorreu com maior veracidade, elencando a possibilidade de osso mais maduro pela expressão de OCN.

Diante disto, é válido destacar a importância da análise mais aprofundada do tecido ósseo por espectroscopia de Raman. A diminuição significativa da razão  $\nu_1\text{PO}_4/\text{Prolina}$  e a maior substituição do carbonato tipo B ( $\text{CO}_3/\nu_1\text{PO}_4$ ) nos grupos At, Ot e At+Ot podem estar associadas a maior maturação óssea. Porém, a cristalinidade  $[\nu_1\text{PO}_4/\text{FWHM}]^{-1}$  permaneceu inalterada, mostrando equilíbrio de rigidez. Portanto, estes resultados descrevem balanço positivo entre matriz orgânica e inorgânica sem influência na quantidade e deformações dos cristais, divergindo de parâmetros que ocorrem com o envelhecimento, como descrito por Boskey (2013), em que estas variáveis são aumentadas com a idade. Além do mais, neste mesmo estudo, foi descrito que a razão mineral/matriz e a cristalinidade estão aumentadas na osteoporose em humanos.

Estudo transversal realizado por Breuil e colaboradores (2014), analisaram a concentração de OT, leptina e estradiol foram de 1097 mulheres na pós-menopausa e compararam com a DMO, incidência de fraturas e marcadores de renovação óssea (FAL). No subgrupo de mulheres com nível sérico indetectável de estradiol verificaram que o nível sérico de OT correlacionou positivamente com DMO na coluna vertebral, colo do fêmur, quadril e negativamente com marcadores remodeladores ósseos (FAL). No subgrupo de mulheres com estradiol elevado, a OT se correlacionou fracamente com a DMO do quadril e não com os marcadores ósseos. Isto descreve o perfil dos resultados de nosso estudo, uma vez que nossos animais, de acordo com a coleta do ciclo estral, apresentaram período de diestro persistente que apresenta a menor concentração de estrogênio circulante (NICOLA



et al., 2016; SRINGHETTA-GARCIA et al., 2017) junto com o aumento da FAL no grupo At.

A análise DEXA do quadril e da coluna lombar é a ferramenta de diagnóstico mais utilizada para avaliar a osteoporose (MOYER; LE FEVRE; SIU, 2011). Nossas análises de densitometria óssea mostraram aumento da DMO no colo do fêmur e no fêmur total nos grupos At, Ot e At+Ot em relação ao grupo Veh. Um estudo realizado por Colaianni e colaboradores (2014b) mostrou aumento na DMO em animais tratados com OT, com possível sinalização na massa óssea mediada por estrogênio em camundongos, pois encontraram DMO inferior na coluna lombar e no fêmur após ovariectomia em camundongos e KO para OT (COLAIANNI et al., 2014a). A associação destes resultados mostra possível diferença cronológica no ciclo de remodelação óssea nos diferentes grupos experimentais. A maior atividade do FAL no grupo At sugere atraso no estágio de mineralização do tecido ósseo neste grupo de animais. Entretanto, o grupo de animais que recebeu OT, FAL não alterou atividade em relação ao grupo veículo e a DMO foi significativamente maior. Este resultado sugere maior mineralização do tecido, destacando a maior expressão de OCN nestes animais, que pode ter sido influenciada pela ação da OT. No grupo de animais que recebeu o OT após seu antagonista, a DMO foi ligeiramente menor, corroborando com as informações apresentadas acima.

Além disso, durante o processo de envelhecimento, a perda de força muscular está associada à redução progressiva da massa muscular esquelética, relacionada à sarcopenia, fatores como aumento do tecido não-contratável, redução da capacidade de recrutamento neural e mudanças nas propriedades de contração muscular (SOUZA et al., 2017). Estudos de parâmetros bioquímicos plasmáticos e histológicos são fundamentais para descrever as ações da terapia utilizada em nosso estudo, porém para nós, também é importante conhecer o grau de recuperação funcional que esta terapia implica, pois estímulos mecânicos são fundamentais para garantir o desempenho do esqueleto humano, já que a carga mecânica resulta em ajustes no tamanho e forma do osso, aumentando sua força (KLEIN-NULEND; BACABAC, 2012). As avaliações funcionais são mais utilizadas em humanos quando comparadas à sua aplicação em animais, pois não são invasivas. Entretanto, buscando a influência da aplicação de Veh, AT, OT e AT+OT, avaliamos o estado funcional da marcha, utilizando análise de largura e comprimento, verificamos o padrão da caminhada dos animais.

Os animais do grupo Ot, mostraram resultados positivos na função muscular, em relação ao teste de marcha onde apresentaram em seu teste final, melhora após a intervenção em relação ao mesmo grupo em seu teste inicial e os outros grupos em seus testes finais. Nossos resultados de avaliação funcional no teste de marcha corroboram com estudos que descrevem que os dois hormônios neurohipofisários parecem regular positivamente a homeostase muscular em diferentes modelos: OT atuando em modelos de envelhecimento e ratos KO (ELABD et al., 2014), o que apoia a melhora da função muscular obtida no grupo Ot. Os resultados verificados em animais que receberam AT ou AT+OT mostram a ação do AT, pois não permite o resgate feito pelo OT para manutenção da homeostase muscular. Os ratos *Null* OT e *Oxtr* desenvolveram obesidade e diminuição da massa muscular independente da ingestão de alimentos (SCHORR et al., 2017). A aparente sobreposição entre os efeitos observados por OT e vasopressina na regulação da diferenciação muscular e do trofismo pode depender do fato de que V1a-R e OT-R cruzam-se com seus hormônios, embora com afinidades diferentes. Estas considerações sugerem o potencial uso terapêutico de OT e vasopressina, juntamente com análogos mais seletivos e poderosos, em condições atroficas e de redução da massa muscular, como sarcopenia e caquexia, e como ferramenta em terapias adjuvantes contra distrofias musculares e doenças neuromusculares (ADAMO et al., 2019).

No teste do labirinto em cruz elevada, nosso estudo mostrou em frequência variável, que nenhum dos tratamentos utilizados por nós mudou o número de entradas nos braços abertos e no centro do labirinto, e que os grupos tratados com Veh, AT e AT+OT reduziram o número de entradas nos braços fechados. Estes resultados indicam redução na exploração protetora e estado de "apatia", o que está relacionado ao aumento no comportamento do tipo ansioso. Estes resultados apoiam o estudo que diz que o aumento do estresse e da ansiedade são queixas comuns em mulheres perimenopausadas (FREEMAN et al., 2008). O grupo que recebeu OT não apresentou alterações significantes, sugerindo que a OT reverte o efeito e pode ser considerado fator de melhora do comportamento ansioso ou efeito ansiolítico.

Com relação aos resultados do tempo em cada espaço, o OT e o AT reduzem o tempo em braços abertos. Estudo de Marcondes e colaboradores (2001) mostra a influência do ciclo estral com o aumento da exploração de braços abertos no proestro, que é quando o estradiol se apresenta mais alto que o período do diestro,

(SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). Quanto ao tempo nos braços fechados, não houve resultados significantes. Por outro lado, o tempo passado no centro do labirinto mostrou diminuição nos grupos Veh e At, relacionando com aumento do comportamento ansioso, enquanto o grupo Ot não apresentou resultados significante, revertendo este comportamento. Nossos resultados descrevem que o modelo não leva ao aumento no comportamento do tipo ansioso. Os resultados relacionados aos braços fechados (exploração de proteção) e o tempo no centro do labirinto sugerem efeito ansiolítico do OT. Por outro lado, os dados de tempo nos braços abertos são controversos, pois o OT reduz o tempo, o que indica aumento no comportamento do tipo ansioso, o que corrobora com Szawka e colaboradores (2013), que relataram que o estradiol, a progesterona e seus metabólitos modulam os sistemas neurotransmissores, e estes estão envolvidos no controle central dos estados emocionais. E, como já descrito, nossos animais estavam em diestro persistente, portanto, baixo estradiol.

Os resultados da atividade locomotora no labirinto e no teste de deambulação podem sugerir que os animais tratados com OT apresentaram melhor desempenho em comparação com todos os outros grupos, com diminuição do estado de ansiedade causado pela apatia apresentada pela diminuição locomotora. Com isso, o efeito ansiolítico da OT pode ser mais ativo opondo-se ao estado ansiogênico. Assim, embora a perimenopausa esteja associado ao aumento do risco de sintomas de ansiedade e mudanças de humor nas mulheres (FREEMAN et al., 2005), nossos resultados mostram que em ratas durante a periostropausa, a OT pode ajudar a melhorar este quadro.

**CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a OT é importante para o ciclo de remodelação óssea de ratas senescentes, melhorando os parâmetros de densitometria óssea, melhorando os marcadores bioquímicos de remodelação óssea, defesa antioxidante, expressão de proteínas, densidade e propriedades físico-químicas, além do estado de ansiedade e parâmetros funcionais musculoesqueléticos. Portanto, os resultados deste estudo mostram que a OT óssea atua no ciclo de remodelação óssea, controlando a reabsorção óssea em ratas durante o período da periostropausa. Estes resultados mostram modulação da OT endógena no colo do fêmur, ação na prevenção da osteoporose primária durante a senescência e sugerem efeito ansiolítico da OT no período de periostropausa.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

ADAMO, Sergio; PIGNA, Eva; LUGARÀ, Rosamaria; MORESI, Viviana; COLETTI, Dario; BOUCHÉ, Marina. Skeletal muscle: A significant novel neurohypophyseal hormone-secreting organ. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 9, n. January, p. 2017–2020, 2019. DOI: 10.3389/fphys.2018.01885.

AHN, T. K.; KIM, J. O.; KIM, H. W.; PARK, H. S.; SHIM, J. H.; ROPPER, A. E.; HAN, I. B.; KIM, N. K. 3'-UTR polymorphisms of MTHFR and TS associated with osteoporotic vertebral compression fracture susceptibility in postmenopausal women. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3390/ijms19030824.

AKKUS, Ozan; ADAR, Fran; SCHAFFLER, Mitchell B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. **Bone**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 443–453, 2004. DOI: 10.1016/j.bone.2003.11.003.

AMADEI, Susana Ungaro; SILVEIRA, Vanessa Ávila Sarmiento; PEREIRA, Andresa Costa; CARVALHO, Yasmin Rodarte; ROCHA, Rosilene Fernandes Da. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006. DOI: 10.1590/S1676-24442006000100003. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442006000100003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442006000100003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt).

ANDREOLLO, Nelson Adami; SANTOS, Elisvânia Freitas Dos; ARAÚJO, Marina Rachel; LOPES, Luiz Roberto. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 49–51, 2012. DOI: 10.1590/S0102-67202012000100011.

AUGAT, Peter; SCHORLEMMER, Sandra. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. **Age and Ageing**, [S. l.], v. 35, n. SUPPL.2, p. 27–31, 2006. DOI: 10.1093/ageing/afl081.

BECK, George R. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 234–243, 2003. DOI: 10.1002/jcb.10622.

BENZIE, Iris F. F.; J. J. STRAIN. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Methods**, [S. l.], v. 8, n. 31, p. 70–76, 1996. DOI: 10.1039/C6AY01739H. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AY01739H>.

BERANGER, Guillaume E. et al. Oxytocin Reverses Ovariectomy-Induced Osteopenia and Body Fat Gain. **Endocrinology**, [S. l.], v. 155, n. 4, p. 1340–1352, 2014. DOI: 10.1210/en.2013-1688. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2013-1688>.

BERANGER, Guillaume E.; DJEDAINI, Mansour; BATTAGLIA, SÃ©verine; ROUX, Christian H.; SCHEIDELER, Marcel; HEYMANN, Dominique; AMRI, Ez-Zoubir; PISANI, Didier F. Oxytocin Reverses Osteoporosis in a Sex-Dependent Manner. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 6, n. MAY, p. 4–11, 2015. DOI: 10.3389/fendo.2015.00081. Disponível em: [http://www.frontiersin.org/Endocrinology\\_of\\_Aging/10.3389/fendo.2015.00081/abstract](http://www.frontiersin.org/Endocrinology_of_Aging/10.3389/fendo.2015.00081/abstract).

BI, Xiaohong; PATIL, Chetan A.; LYNCH, Conor C.; PHARR, George M.; MAHADEVAN-JANSEN, Anita; NYMAN, Jeffrey S. Raman and mechanical properties correlate at whole bone- and tissue-levels in a genetic mouse model. **Journal of Biomechanics**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 297–303, 2011. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2010.10.009. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.10.009>.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. [35] Comparative Studies on Different Methods of Malonaldehyde Determination. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 105, n. C, p. 299–305, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05038-2.

BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clinical science (London, England : 1979)**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 217–40, 2000. DOI: 10.1042/cs0980217. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657279>.

BOONEN, Steven; DEJAEGER, Eddy; VANDERSCHUEREN, Dirk; VENKEN, Katrien; BOGAERTS, An; VERSCHUEREN, Sabine; MILISEN, Koen. Osteoporosis and osteoporotic fracture occurrence and prevention in the elderly: a geriatric perspective. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 765–785, 2008. DOI: 10.1016/j.beem.2008.07.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2008.07.002>.

BOSE, Ranjan; SUTHERLAND, Garnette R.; PINSKY, Carl. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. **Neurochemical Research**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 217–220, 1989. DOI: 10.1007/BF00971313.

BOSKEY, Adele L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. **BoneKEy Reports**, [S. l.], v. 2, 2013. DOI: 10.1038/bonekey.2013.181.

BOYCE BF, HUGHES DE, WRIGHT KR, XING L, Dai A. **Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases.**, 1999. Disponível em: 10068197.

BREUIL, Véronique et al. Oxytocin, a new determinant of bone mineral density in post-menopausal women: Analysis of the OPUS cohort. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 99, n. 4, p. 634–641, 2014. DOI: 10.1210/jc.2013-4126.

CALLEWAERT, Filip; VENKEN, Katrien; BOONEN, Steven; VANDERSCHUEREN, Dirk. **Estrogen and the Skeleton - RodentsOsteoporosis in Men**, 2010. DOI: 10.1016/B978-0-12-374602-3.00023-7.

CAPULLI, Mattia; PAONE, Riccardo; RUCCI, Nadia. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 561, n. May, p. 3–12, 2014. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>.

CAULEY, Jane A. Estrogen and bone health in men and women. **Steroids**, [S. l.], v. 99, n. Part A, p. 11–15, 2015. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.12.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.010>.

ÇETINEL, Şule; HANCIOĞLU, Sertan; ŞENER, Emre; ÜNER, Can; KILIÇ, Merve; ŞENER, Göksel; YEĞEN, Berrak Ç. Oxytocin treatment alleviates stress-aggravated colitis by a receptor-dependent mechanism. **Regulatory Peptides**, [S. l.], v. 160, n. 1–3, p. 146–152, 2010. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.11.011.

CHANDI C. MANDAL. Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. [S. l.], v. 344, n. 6188, p. 1173–1178, 2011. DOI: 10.1042/BJ20100357.

COLAIANNI, G.; TAMMA, R.; DI BENEDETTO, A.; YUEN, T.; SUN, L.; ZAIDI, M.; ZALLONE, A. The Oxytocin-Bone Axis. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 53–57, 2014. a. DOI: 10.1111/jne.12120. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jne.12120>.

COLAIANNI, Graziana et al. Bone marrow oxytocin mediates the anabolic action of estrogen on the skeleton. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 34, p. 29159–29167,



2012. DOI: 10.1074/jbc.M112.365049.

COLAIANNI, Graziana; SUN, L.; ZAIDI, Mone; ZALLONE, Alberta. Oxytocin and bone. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 307, n. 8, p. R970–R977, 2014. b. DOI: 10.1152/ajpregu.00040.2014.

COLLI, Vilma Clemi; OKAMOTO, Roberta; SPRITZER, Poli Mara; DORNELLES, Rita Cássia Menegati. Oxytocin promotes bone formation during the alveolar healing process in old acyclic female rats. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 57, n. 9, p. 1290–1297, 2012. a. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.03.011.

COLLI, Vilma Clemi; OKAMOTO, Roberta; SPRITZER, Poli Mara; DORNELLES, Rita Cássia Menegati. Oxytocin promotes bone formation during the alveolar healing process in old acyclic female rats. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 57, n. 9, p. 1290–1297, 2012. b. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.03.011.

COPLAND, John A.; IVES, Kirk L.; SIMMONS, David J.; SOLOFF, Melvyn S. Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts. **Endocrinology**, [S. l.], v. 140, n. 9, p. 4371–4, 1999. DOI: 10.1210/endo.140.9.7130. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo.140.9.7130>.

COXAM, Véronique. Phyto-oestrogens and bone health. **Proceedings of the Nutrition Society**, [S. l.], v. 67, n. 02, p. 184–195, 2008. DOI: 10.1017/S0029665108007027. Disponível em: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0029665108007027](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665108007027).

DAWOOD, M. YUSOFF; KHAN-DAWOOD, FIRYAL S.; WAHI, RANJIT S.; FUCHS, FRITZ. Oxytocin Release and Plasma Anterior Pituitary and Gonadal Hormones in Women during Lactation\*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 678–683, 1981. DOI: 10.1210/jcem-52-4-678. Disponível em: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem-52-4-678>.

DEBLON, Nicolas et al. Mechanisms of the anti-obesity effects of oxytocin in diet-induced obese rats. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 9, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025565.

ELABD, Christian et al. Oxytocin Controls Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Reverses Osteoporosis. **Stem Cells**, [S. l.], v. 26, n. 9, p. 2399–2407, 2008. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0127. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2008-0127>.

ELABD, Christian; COUSIN, Wendy; UPADHYAYULA, Pavan; CHEN, Robert Y.; CHOOLJIAN, Marc S.; LI, Ju; KUNG, Sunny; JIANG, Kevin P.; CONBOY, Irina M. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. **Nature Communications**, [S. l.], v. 5, n. 1762, p. 1–11, 2014. DOI: 10.1038/ncomms5082.

ELABD, S. K.; SABRY, I.; HASSAN, W. B.; NOUR, H.; ZAKY, K. Possible neuroendocrine role for oxytocin in bone remodeling. **Endocrine Regulations**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 131–141, 2007.

EPSTEIN, Sol. Serum and urinary markers of bone remodeling: Assessment of bone turnover. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 437–449, 1988. DOI: 10.1210/edrv-9-4-437.

FERNANDES, Fernanda et al. Oxytocin and bone quality in the femoral neck of rats in periestropause. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-64683-0.

FERREIRA, A. Motivational aspects of maternal anxiolysis in lactating rats. [S. l.], p. 241–248, 2005. DOI: 10.1007/s00213-005-2157-y.

FERREIRA, Larissa Brazolotto; DE NICOLA, Angela Cristina; ANSELMO-FRANCI, Janete Aparecida; DORNELLES, Rita Cássia Menegati. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. **Experimental Gerontology**, [S. l.], v. 72, p. 157–161, 2015. DOI: 10.1016/j.exger.2015.10.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2015.10.003>.

FLORENCIO-SILVA, Rinaldo; SASSO, Gisela Rodrigues Da Silva; SASSO-CERRI, Estela; SIMÕES, Manuel Jesus; CERRI, Paulo Sérgio. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/421746.

FRANZ-ODENDAAL, Tamara A.; HALL, Brian K.; WITTEN, P. Eckhard. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. **Developmental Dynamics**, [S. l.], v. 235, n. 1, p. 176–190, 2006. DOI: 10.1002/dvdy.20603.

FREEMAN, Ellen W.; SAMMEL, Mary D.; LIN, Hui; GRACIA, Clarisa R.; KAPOOR, Shiv. Symptoms in the Menopausal Transition. **Obstetrics & Gynecology**, [S. l.], v. 111, n. 1, p. 127–136, 2008. DOI: 10.1097/01.aog.0000295867.06184.b1.

FREEMAN, Ellen W.; SAMMEL, Mary D.; LIN, Hui; GRACIA, Clarisa R.; KAPOOR, Shiv; FERDOUSI, Tahmina. The role of anxiety and hormonal changes in menopausal hot flashes. **Menopause**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 258–266, 2005. DOI: 10.1097/01.GME.0000142440.49698.B7.

GAJDOSECHOVA, Lucia; KRŠKOVA, Katarina; SEGARRA, Ana Belen; SPOLCOVA, Andrea; SUSKI, Maciej; OLSZANECKI, Rafal; ZORAD, Stefan. Hypo-oxytocinaemia in obese Zucker rats relates to oxytocin degradation in liver and adipose tissue. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 220, n. 3, p. 333–343, 2014. DOI: 10.1530/JOE-13-0417.

GALANTSEV, V. P.; KOVALENKO, S. G.; MOLTCHANOV, A. A.; PRUTSKOV, V. I. Lipid peroxidation, low-level chemiluminescence and regulation of secretion in the mammary gland. **Experientia**, [S. l.], v. 49, n. 10, p. 870–875, 1993. DOI: 10.1007/BF01952600.

GIMPL, Gerald; FAHRENHOLZ, Falk; GENE, C. The Oxytocin Receptor System : Structure , Function , and Regulation. [S. l.], v. 81, n. 2, p. 629–683, 2001.

GOLICHOWSKI, Alan M.; HATHAWAY, David R.; FINEBERG, Naomi; PELEG, Dan. Tocolytic and hemodynamic effects of nifedipine in the ewe. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 151, n. 8, p. 1134–1140, 1985. DOI: 10.1016/0002-9378(85)90397-7.

GORE, Andrea C. Gonadotropin-releasing hormone neurons , NMDA receptors , and their regulation by steroid hormones across the reproductive life cycle. [S. l.], v. 37, p. 235–248, 2001.

GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 69, n. 4, p. 451–60, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9629311>. Acesso em: 4 abr. 2020.

HEMMATIAN, Haniyeh; LAURENT, Michaël R.; BAKKER, Astrid D.; VANDERSCHUEREN, Dirk; KLEIN-NULEND, Jenneke; VAN LENTHE, G. Harry. Age-related changes in female mouse cortical bone microporosity. **Bone**, [S. l.], v. 113, n. May, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1016/j.bone.2018.05.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.05.003>.

HENRY, Richard J.; CHIAMORI, Neil; GOLUB, Orville J.; BERKMAN, S. Revised Spectrophotometric Methods for the Determination of Glutamic-Oxalacetic Transaminase, Glutamic-Pyruvic Transaminase, and Lactic Acid Dehydrogenase. **American Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 34, n. 4\_ts, p. 381–398, 1960. DOI: 10.1093/ajcp/34.4\_ts.381.

Disponível em: [https://academic.oup.com/ajcp/article/34/4\\_ts/381/4822747](https://academic.oup.com/ajcp/article/34/4_ts/381/4822747).

HUIJGEN HJ1, SANDERS GT, KOSTER RW, VREEKEN J, Bossuyt PM. **Lichtinghagen R Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995.pdf**, 1997. DOI: 9298346. Disponível em: 9298346.

HUNTER, David J.; SAMBROOK, Philip N. Bone loss. Epidemiology of bone loss. **Arthritis research**, [S. l.], v. 2, n. 6, p. 441–5, 2000. DOI: 10.1186/ar125. Disponível em: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar125>.

IQBAL, Zafar; RAHMAN, Zia Ur; MUHAMMAD, Faqir; KHALIQ, Tanweer; ANWAR, Haseeb; AWAIS, Mian Muhammad; SADAF, Saima. Oxytocin induced oxidative stress in lactating *Bubalis bubalis* ( Nili Ravi ). **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/1746-6148-9-169. Disponível em: BMC Veterinary Research.

IWASA, Takeshi; MATSUZAKI, Toshiya; MAYILA, Yiliyasi; YANAGIHARA, Rie; YAMAMOTO, Yuri; KAWAKITA, Takako; KUWAHARA, Akira; IRAHARA, Minoru. Oxytocin treatment reduced food intake and body fat and ameliorated obesity in ovariectomized female rats. **Neuropeptides**, [S. l.], v. 75, n. December 2018, p. 49–57, 2019. DOI: 10.1016/j.npep.2019.03.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.03.002>.

JENKINS, J. S.; NUSSEY, S. S. The role of oxytocin: present concepts. **Clinical Endocrinology**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 515–525, 1991. DOI: 10.1111/j.1365-2265.1991.tb00333.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2265.1991.tb00333.x>.

KAM, K. Y. Ronal.; LAMONT, Ronald F. Developments in the pharmacotherapeutic management of spontaneous preterm labor. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 1153–1168, 2008. DOI: 10.1517/14656566.9.7.1153.

KARMEN, A. A note on the spectrometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. **The Journal of clinical investigation**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 131–133, 1955.

KENNEL, Philippe F. et al. Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. **Neurobiology of Disease**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 137–147, 1996. DOI: 10.1006/nbdi.1996.0014.

KHALID, Mohamed; BORA, Tanujjal; GHAITHI, Ahmed Al; THUKRAL, Sharanjit; DUTTA, Joydeep. Raman spectroscopy detects changes in bone mineral quality and collagen cross-linkage in staphylococcus infected human bone. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27752-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-27752-z>.

KHOSLA, Sundeep; OURSLER, Merry Jo; MONROE, David G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 576–581, 2012. DOI: 10.1016/j.tem.2012.03.008. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276012000525>.

KLEIN-NULEND, JENNEKE; BACABAC, ROMMEL GAUD. Bone Adaptation and Regeneration – New Developments. **International Journal of Modern Physics: Conference Series**, [S. l.], v. 17, p. 34–43, 2012. DOI: 10.1142/s201019451200791x.

KLUMPER, Job et al. Study protocol for a randomised trial for atosiban versus placebo in threatened preterm birth: The APOSTEL 8 study. **BMJ Open**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-029101.

KNOTHE TATE, Melissa L. “Whither flows the fluid in bone?” An osteocyte’s perspective. **Journal of Biomechanics**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1409–1424, 2003. DOI: 10.1016/S0021-9290(03)00123-4.

LAILER, Piotr M.; TAGA, Eulazio M.; VAN ETTEN, Robert L. Human liver acid phosphatases: Cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 216, n. 2, p. 512–521, 1982. DOI: 10.1016/0003-9861(82)90240-5.

LAMONT, Ronald F.; KAM, K. Y. Ronal. Atosiban as a tocolytic for the treatment of spontaneous preterm labor. **Expert Review of Obstetrics and Gynecology**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 163–174, 2008. DOI: 10.1586/17474108.3.2.163.

LAU, K. H. W.; ONISHI, T.; WERGEDAL, J. E.; SINGER, F. R.; BAYLINK, D. J. Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: Potential use to assess bone resorption. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 458–462, 1987. DOI: 10.1093/clinchem/33.4.458.

LEVIN, V. A.; JIANG, X.; KAGAN, R. Estrogen therapy for osteoporosis in the modern era. **Osteoporosis International**, [S. l.], v. 29, n. 5, p. 1049–1055, 2018. DOI: 10.1007/s00198-018-4414-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00198-018-4414-z>.

LJUSBERG, Jenny; WANG, Yunling; LÅNG, Pernilla; NORGÅRD, Maria; DODDS, Robert; HULTENBY, Kjell; EK-RYLANDER, Barbro; ANDERSSON, Göran. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 280, n. 31, p. 28370–28381, 2005. DOI: 10.1074/jbc.M502469200.

LONG, J. A. & EVANS, H. M. **The estrous cycle in the rat and its associated phenomena**. 1. ed. [s.l.] : 6, 1922. Disponível em: <https://www.worldcat.org/title/oestrous-cycle-in-the-rat-and-its-associated-phenomena/oclc/14774851>.

M., Azria. **The value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism**, 1989.

MARCONDES, Fernanda Klein; MIGUEL, Katia Jacqueline; MELO, Liana Lins; SPADARI-BRATFISCH, Regina Célia. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 74, n. 4–5, p. 435–440, 2001. DOI: 10.1016/S0031-9384(01)00593-5.

MOYER, Virginia A.; LE FEVRE, Michael L.; SIU, Albert L. Re: Screening for osteoporosis: U.S. preventive services task force recommendation statement. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 155, n. 4, p. 276–277, 2011. DOI: 10.7326/0003-4819-155-4-201108160-00022.

NICOLA, Angela Cristina; LEITE, Cristiane Mota; NISHIKAVA, Mariane Mayumi Batista; DE CASTRO, João Cesar Bedran; ANSELMO-FRANCI, Janete Aparecida; DORNELLES, Rita Cássia Menegati. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. **Experimental Gerontology**, [S. l.], v. 81, p. 19–27, 2016. DOI: 10.1016/j.exger.2016.04.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2016.04.015>.

OSTEOPOROSIS, International; ANNOUNCES, Foundation. New Capture the Fracture ® partnership aims for 25 % reduction in the incidence of hip and vertebral fractures due to osteoporosis by 2025. [S. l.], n. 5, p. 6–8, 2020.

PARAHYBA, Maria Isabel; SIMÕES, Celso Cardoso da Silva. **A prevalência de incapacidade funcional em idosos no Brasil** *Ciência & Saúde Coletiva*, 2006. DOI: 10.1590/S1413-81232006000400018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csc/v11n4/32333.pdf>.

PARDHE, Bashu Dev; PATHAK, Sabala; BHETWAL, Anjeela; GHIMIRE, Sumitra; SHAKYA, Shreena; KHANAL, Puspa Raj; MARAHATTA, Sujana Babu. Effect of age and estrogen on biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women: a population-based study

from Nepal. **International Journal of Women's Health**, [S. l.], v. Volume 9, p. 781–788, 2017. DOI: 10.2147/IJWH.S145191. Disponível em: <https://www.dovepress.com/effect-of-age-and-estrogen-on-biochemical-markers-of-bone-turnover-in-peer-reviewed-article-IJWH>.

PARK, Jin-Woo; KIM, Jae-Min; LEE, Heon-Jin; JEONG, Seong-Hwa; SUH, Jo-Young; HANAWA, Takao. Bone healing with oxytocin-loaded microporous  $\beta$ -TCP bone substitute in ectopic bone formation model and critical-sized osseous defect of rat. **Journal of Clinical Periodontology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 181–190, 2014. DOI: 10.1111/jcpe.12198. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcpe.12198>.

PATEL, Dharmik; WORLEY, John R.; VOLGAS, David A.; CRIST, Brett D. The Effectiveness of Osteoporosis Screening and Treatment in the Midwest. **Geriatric Orthopaedic Surgery & Rehabilitation**, [S. l.], v. 9, p. 215145931876584, 2018. DOI: 10.1177/2151459318765844. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2151459318765844>.

PELLIKAAN, Pim; GIARMATZIS, Georgios; VANDER SLOTEN, Jos; VERSCHUEREN, Sabine; JONKERS, Ilse. Ranking of osteogenic potential of physical exercises in postmenopausal women based on femoral neck strains. **PloS one**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. e0195463, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0195463. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0195463>.

PERES-UENO, Melise Jacon; STRINGHETTA-GARCIA, Camila Tami; CASTOLDI, Robson Chacon; OZAKI, Guilherme Akio Tamura; CHAVES-NETO, Antônio Hernandez; DORNELLES, Rita Cássia Menegati; LOUZADA, Mário Jefferson Quirino. Model of hindlimb unloading in adult female rats: Characterizing bone physicochemical, microstructural, and biomechanical properties. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 1–15, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0189121.

PETERSSON, Maria; LAGUMDZIJA, Alena; STARK, André; BUCHT, Elisabet. Oxytocin stimulates proliferation of human osteoblast-like cells. **Peptides**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 1121–6, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126740>.

PORFÍRIO, Elisângela; FANARO, Gustavo Bernardes. Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 153–164, 2016. DOI: 10.1590/1809-9823.2016.14145. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1809-98232016000100153&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-98232016000100153&lng=en&tlng=en).

PRAKASH, D.; BEHARI, J. Synergistic role of hydroxyapatite nanoparticles and pulsed electromagnetic field therapy to prevent bone loss in rats following exposure to simulated microgravity. **International journal of nanomedicine**, [S. l.], v. 4, p. 133–144, 2009.

RADOMINSKI, S. C.; PINTO-NETO, A. M.; MARINHO, R. M.; COSTA-PAIVA, L. H. S.; PEREIRA, A. S.; URBANETZ, A. A.; FERRARI, A. E. M.; BARACAT, E. C. Osteoporose em Mulheres na Pós-Menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S. l.], v. 44, n. 6, p. 426–434, 2004. DOI: 10.1590/S0482-50042004000600006.

RAGGATT, Liza J.; PARTRIDGE, Nicola C. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010. DOI: 10.1074/jbc.R109.041087. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R109.041087>.

ROSSI, Edison. Envelhecimento do Sistema Osteoarticular. **Einstein**, [S. l.], v. 6, n. Supl 1, p. 1190–1198, 2008.

SANTOS, Leandro Figueiredo; SINGULANI, Monique Patricio; STRINGHETTA-GARCIA, Camila Tami; OLIVEIRA, Sandra Helena Penha; CHAVES-NETO, Antonio Hernandez; DORNELLES, Rita Cássia Menegati. Oxytocin effects on osteoblastic differentiation of Bone

Marrow Mesenchymal Stem Cells from adult and aging female Wistar rats. **Experimental Gerontology**, [S. l.], v. 113, n. September, p. 58–63, 2018. DOI: 10.1016/j.exger.2018.09.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.09.023>.

SAÚDE, Ministério Da. Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde - Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 2359–2381, 2014. DOI: 10.1007/s00198-014-2794-2. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/pcdt-osteoporose-2014.pdf%0Ahttp://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/pcdt-osteoporose-2014.pdf%5Cnhttp://link.springer.com/10.1007/s00198-014-2794-2%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?scrip>.

SCHORR, Melanie; MARENGI, Dean A.; PULUMO, Reitumetse L.; YU, Elaine; EDDY, Kamryn T.; KLIBANSKI, Anne; MILLER, Karen K.; LAWSON, Elizabeth A. Oxytocin and its relationship to body composition, bone mineral density, and hip geometry across the weight spectrum. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 102, n. 8, p. 2814–2824, 2017. DOI: 10.1210/jc.2016-3963.

SHARMA, Tripti; ISLAM, Najmul; AHMAD, Jamal; AKHTAR, Nishat; BEG, Mujahid. Original Article Correlation between bone mineral density and oxidative stress in postmenopausal women. [S. l.], 2015. DOI: 10.4103/2230-8210.159053.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 219–226, 1975. DOI: 10.1210/endo-96-1-219.

SOUZA, Carine Fernandes De; VIEIRA, Mariana Carmem Apolinário; NASCIMENTO, Rafaela Andrade Do; MOREIRA, Mayle Andrade; CÂMARA, Saionara Maria Aires Da; MACIEL, Álvaro Campos Cavalcanti. Relationship between strength and muscle mass in middle-aged and elderly women: a cross-sectional study. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 660–669, 2017. DOI: 10.1590/1981-22562017020.170021.

STRINGHETTA-GARCIA, Camila Tami; MORAIS, Samuel Rodrigues Lourenço; FERNANDES, Fernanda; PEREZ-UENO, Melise Jacon; ALMEIDA, Ricardo De Paula; LOUZADA, Mário Jefferson Quirino; CHAVES-NETO, Antonio Hernandez; ERVOLINO, Edilson; DORNELLES, Rita Cássia Menegati. Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-13098-5.

STRINGHETTA-GARCIA, Camila Tami; SINGULANI, Monique Patrício; SANTOS, Leandro Figueiredo; LOUZADA, Mário Jefferson Quirino; NAKAMUNE, Ana Cláudia Stevanato; CHAVES-NETO, Antonio Hernandez; ROSSI, Ana Cláudia; ERVOLINO, Edilson; DORNELLES, Rita Cássia Menegati. The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. **Bone**, [S. l.], v. 85, p. 45–54, 2016. DOI: 10.1016/j.bone.2015.11.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.023>.

SUN, Li et al. Functions of vasopressin and oxytocin in bone mass regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 113, n. 1, p. 164–169, 2016. DOI: 10.1073/pnas.1523762113. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1523762113>.

SZAWKA, Raphael E. et al. Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. **Endocrinology**, [S. l.], v. 154, n. 1, p. 363–374, 2013. DOI: 10.1210/en.2012-1302.

TAMMA, R. et al. Oxytocin is an anabolic bone hormone. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 17, p. 7149–7154, 2009. a. DOI: 10.1073/pnas.0901890106. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0901890106>.

TAMMA, Roberto et al. Oxytocin is an anabolic bone hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 106, n. 17, p. 7149–7154, 2009. b. DOI: 10.1073/pnas.0901890106.

TOMKINSON, A.; GEVERS, E. F.; WIT, J. M.; REEVE, J.; NOBLE, B. S. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 1243–1250, 1998. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.8.1243.

TU, Chen; WU, Di Zheng; HUANG, Yu Sheng; ZHUANG, Jing Shen; ZENG, Ji Huan; XU, Ping; MENG, Ting Ting; ZHONG, Zhao Ming. Oxidative stress contributes to hyperalgesia in osteoporotic mice. **Journal of Pain Research**, [S. l.], v. 13, p. 131–142, 2020. DOI: 10.2147/JPR.S234334.

VICKERS, Madge R. et al. Main morbidities recorded in the women's international study of long duration oestrogen after menopause (WISDOM): a randomised controlled trial of hormone replacement therapy in postmenopausal women. **BMJ**, [S. l.], v. 335, n. 7613, p. 239, 2007. DOI: 10.1136/bmj.39266.425069.AD. Disponível em: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.39266.425069.AD>.

WEIGT, Carmen; HERTRAMPF, Torsten; ZOTH, Nora; FRITZEMEIER, Karl Heinrich; DIEL, Patrick. Impact of estradiol, ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 351, n. 2, p. 227–238, 2012. DOI: 10.1016/j.mce.2011.12.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.12.013>.

WŁODAREK, Dariusz; GŁĄBSKA, Dominika; KOŁOTA, Aleksandra; ADAMCZYK, Piotr; CZEKAJŁO, Aleksandra; GRZESZCZAK, Władysław; DROZDZOWSKA, Bogna; PLUSKIEWICZ, Wojciech. Calcium intake and osteoporosis: the influence of calcium intake from dairy products on hip bone mineral density and fracture incidence – a population-based study in women over 55 years of age. **Public Health Nutrition**, [S. l.], v. 17, n. 02, p. 383–389, 2014. DOI: 10.1017/S1368980012005307. Disponível em: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S1368980012005307](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1368980012005307).

YI, K. J. et al. The regulation of oxytocin receptor gene expression during adipogenesis. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 335–342, 2015. DOI: 10.1111/jne.12268.

YOUNGJI CHO. Continuously Generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulates the Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Periodontal Ligament Fibroblasts. **Bone**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 1–7, 2012. DOI: 10.1002/jcb.24017.

ZHANG, Yu Bin; ZHONG, Zhao Ming; HOU, Gang; JIANG, Hui; CHEN, Jian Ting. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. **Journal of Surgical Research**, [S. l.], v. 169, n. 1, p. e37–e42, 2011. DOI: 10.1016/j.jss.2011.02.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2011.02.033>.


ZHANG, Jian et al. Differential effects of short term feeding of a soy protein isolate diet and estrogen treatment on bone in the pre-pubertal rat. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 4, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035736.





## ANEXO

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – UNESP

	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA</b> <b>"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"</b>	
<b>CAMPUS ARAÇATUBA</b> <b>FACULDADE DE ODONTOLOGIA</b> <b>FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA</b>		
<b>CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais</b> <b>CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals</b>		
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "<b>A influência da ocitocina no metabolismo ósseo de ratas senescentes</b>", Processo FOA nº 00688-2018, sob responsabilidade de Rita Cássia Menegati Dornelles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 18 de Setembro de 2018.</p>		
<b>VALIDADE DESTE CERTIFICADO:</b> 10 de Dezembro de 2020.		
<b>DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:</b> até 10 de Janeiro de 2021.		
<b>CERTIFICATE</b>		
<p>We certify that the study entitled "<b>The influence of oxytocin on the bone metabolism of senescent rats</b>", Protocol FOA nº 00688-2018, under the supervision of Rita Cássia Menegati Dornelles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 18, 2018.</p>		
<b>VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:</b> December 10, 2020.		
<b>DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:</b> January 10, 2021.		
 <b>Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani</b> Coordenador da CEUA CEUA Coordinator		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Araçatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP Fone (16) 3636-3234 Email: CEUA_oua@fvt.unesp.br		