



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ADRIANA MATHIAS PEREIRA DA SILVA MARCHINI

**INFLUÊNCIA DO ALCOOLISMO CRÔNICO E DA
DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA SOBRE A EXPRESSÃO
IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS REGULADORAS DO
PROCESSO DE REABSORÇÃO ÓSSEA NO PERIODONTO
DE RATAS**

2016

ADRIANA MATHIAS PEREIRA DA SILVA MARCHINI

**INFLUÊNCIA DO ALCOOLISMO CRÔNICO E DA DEFICIÊNCIA
ESTROGÊNICA SOBRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE
PROTEÍNAS REGULADORAS DO PROCESSO DE REABSORÇÃO
ÓSSEA NO PERIODONTO DE RATAS**

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

São José dos Campos

2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Marchini, Adriana Mathias Pereira da Silva

Influência do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica sobre a expressão imunoistoquímica de proteínas reguladoras do processo de reabsorção óssea no periodonto de ratas / Adriana Mathias Pereira da Silva Marchini. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.

75 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Rosilene Fernandes da Rocha

1. Alcoolismo. 2. Ovariectomia. 3. Osteoporose. 4. Periodonto. 5. Reabsorção óssea. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. Rocha, Rosilene Fernandes da , coorient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Celia Marisa Rizzatti Barbosa

Faculdade de Odontologia
Universidade de Campinas - UNICAMP
Campus de Piracicaba

Profa. Dra. Naira Correia Cusma Pelógia

Instituto Básico de Biociências
Universidade de Taubaté - UNITAU

Profa.Tit. Yasmin Rodarte Carvalliho

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Marianne Spalding

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 10 de agosto de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos, Daniel e Gabriel, pelas horas de atenção que não lhes pude dar para que pudesse realizar este trabalho. Vocês são os grandes tesouros da minha vida!

Ao meu marido, Leonardo, que além de esposo e pai dedicado é um professor muito competente, pelo qual eu tenho grande admiração. Seu auxílio, tanto do ponto de vista pessoal quanto profissional, foi muito importante para a conclusão deste trabalho. Amo muito você!

Aos meus pais, Arthur e Marcia, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade e responsabilidade. Muito obrigada por todo amor e carinho dedicados a mim. Amo muito vocês!

A todos os demais membros da minha família que de alguma forma contribuíram para a formação do meu caráter e personalidade. Sou muito grata por ter tido uma família tão maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

Ao instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José dos Campos, representada pelo seu diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpura por possibilitar a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, que sabiamente me ajudou a concluir este estudo. Obrigada pela paciência, dedicação e tempo dispensado para comigo. Agradeço imensamente por seu precioso auxílio!

À minha coorientadora, Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, que sempre acreditou no meu potencial e me incentivou a seguir a carreira acadêmica. Você é uma pessoa muito especial em minha vida!

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela ajuda financeira, na forma de bolsa de estudo, durante os primeiros meses de realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, representado por sua coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, pela ajuda para que eu pudesse concluir o meu curso de doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal pela importante contribuição para que eu tivesse uma formação acadêmica de excelência.

Às professoras que participaram da banca do meu Exame Geral de Qualificação, Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalliho e Profa. Dra. Marianne Spalding, pelos comentários que foram muito importantes para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À querida amiga Gabriela de Fátima Santana-Melo, pelo precioso auxílio, tanto no tratamento dos animais, quanto na realização da parte laboratorial. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste estudo. Não tenho palavras para agradecer!

Às queridas amigas Miriane Carneiro Machado Salgado, Elis Andrade de Lima Zutin e Livia Stella Soares da Silva, que também contribuíram para com o tratamento dos animais e/ou procedimentos laboratoriais. Muito obrigada!

Ao técnico de histologia Walter Cruz, que auxiliou nos cortes histológicos das amostras. Sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José dos Campos, que tiveram alguma contribuição para realização deste trabalho ou que participaram de parte da minha vida acadêmica.

À equipe da Seção Técnica de pós-graduação, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Rosemary de Fátima Salgado, Ivan Oliveira Damasceno e Sandra Mara Cordeiro pelo apoio e paciência na resolução de problemas burocráticos associados a este trabalho. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse concluir meu curso de doutorado!

Aos assistentes de suporte acadêmico e à Comissão de biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José dos Campos, pelo auxílio durante os procedimentos de experimentação animal.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José dos Campos, pela paciência na revisão das referências bibliográficas e formatação deste estudo.

Ao consultor estatístico Jimmy Adans Costa Palandí, pela importante ajuda nas análises referentes à dieta e peso dos animais.

A Arthur de Campos Pereira da Silva e Leonardo Marchini pelo importante auxílio na revisão dos textos em português.

A Leonardo Marchini pelo importante auxílio na revisão dos textos em Inglês.

À Maria Amélia Seixas Marchini, Norberto Marchini e Larissa Seixas Marchini, que me ajudaram na conclusão deste trabalho, seja de maneira direta, auxiliando

na impressão dos exemplares, ou indireta, ajudando a cuidar de meus filhos. Vocês são muito especiais!

A Arthur de Campos Pereira da Silva e Rosana Maria Zalla Maffei por terem ajudado a cuidar dos meus filhos durante a fase final de conclusão deste trabalho. Muito obrigada pela preciosa ajuda!

Aos membros titulares da banca examinadora, Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, Profa. Tit. Célia Marisa Rízzatti Barbosa, Profa. Dra. Náira Correia Cusma Pelógia, Profa. Tit. Yasmín Rodarte Carvallho e Profa. Dra. Marianne Spalding, por participarem desta defesa. A presença de vocês é uma grande honra para mim!

Aos membros suplentes da banca examinadora, Prof. Dr. Carlos Eduardo Dias Colombo, Profa. Adj. Maria Aparecida Neves Jardini, Prof. Dr. Jarbas Francisco Fernandes dos Santos, Profa. Dra. Renata Falchete do Prado e Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco, que gentilmente aceitaram o convite para participar da avaliação deste estudo. Muito obrigada!

*“O coração do que tem discernimento adquire conhecimento;
os ouvidos dos sábios saem à sua procura”.*

Provérbios de Salomão 18:15

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.1.1 Tratamento dos animais: visão geral	20
3.1.2 Detalhamento dos procedimentos cirúrgicos	22
3.1.3 Detalhamento do tratamento dietético	24
3.1.4 Avaliações de alterações no peso corpóreo	25
3.1.5 Avaliações de alterações na dieta	25
3.1.6 Eutanásia	26
3.2 Análises imunoistoquímicas	26
3.2.1 Preparação das amostras	26
3.2.2 Visualização dos cortes histológicos	29
3.2.3 Análise da imunomarcação no ápice da crista óssea alveolar ...	30
3.2.3.1 Análise quantitativa da porcentagem de imunomarcação	31
3.2.3.2 Análise da imunomarcação para células ósseas	33
3.2.4 Análise da imunomarcação de fibroblastos e células inflamatórias	34
3.3 Análises estatísticas	35
3.3.1 Análises estatísticas para dieta e peso	35
3.3.2 Análises estatísticas para porcentagem de imunomarcação	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Dieta e Peso	38

4.2 Resultados da porcentagem de imunomarcação	42
4.2.1 Porcentagem de imunomarcação para a OPG	43
4.2.2 Porcentagem de imunomarcação para o RANKL	44
4.3 Resultados da imunomarcação para células ósseas	46
4.4 Resultados da imunomarcação de fibroblastos e células inflamatórias	51
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	66
7 REFERÊNCIAS	67
ANEXO	75

Marchini AMPS. Influência do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica sobre a expressão imunoistoquímica de proteínas reguladoras do processo de reabsorção óssea no periodonto de ratas. [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

Estudos prévios sugerem que tanto o consumo de álcool quanto a deficiência estrogênica poderiam afetar o osso alveolar e aumentar a suscetibilidade individual a uma mais rápida progressão da doença periodontal. No entanto, a literatura ainda não chegou a um consenso sobre esse assunto, que precisa ser mais estudado. O objetivo deste estudo foi investigar possíveis modificações na expressão imunoistoquímica de proteínas envolvidas na regulação do processo de reabsorção óssea, no periodonto de ratas submetidas ao alcoolismo crônico e/ou à deficiência estrogênica. Ratas Wistar, com três meses de idade, foram divididas em dois grupos: ovariectomizadas (ovz) ou não ovariectomizadas (sham). Trinta dias após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram subdivididos e receberam os seguintes tratamentos: dieta alcoólica (alc), dieta isocalórica (iso) ou dieta livre (dl). Os grupos álcool receberam solução alcoólica (20%), por dois meses. A análise do tratamento dietético mostrou que o grupo ovz/dl foi o que mais ganhou peso e o que mais ingeriu ração, sendo as diferenças significativas se comparadas a todos os outros grupos ($p < 0,01$). Quando considerados ambos os grupos álcool, 53,49% das calorias diárias da dieta (em média) foram provenientes do álcool. Os resultados também mostraram que o grupo sham/alc consumiu mais álcool se comparado ao ovz/alc, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). A crista óssea alveolar e tecidos adjacentes (na região entre o primeiro e segundo molar inferior) foram avaliados por imunoistoquímica, utilizando-se anticorpos para detecção de osteoprotegerina (OPG), proteína que inibe a reabsorção óssea, e ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANKL), proteína que estimula a reabsorção óssea. Os grupos ovz/alc, ovz/iso e ovz/dl apresentaram menor imunomarcagem para a OPG, se comparados ao sham/alc, sham/iso e sham/dl, respectivamente, sendo essas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$). O grupo ovz/iso apresentou maior imunomarcagem para o RANKL se comparado ao grupo sham/iso, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). O grupo sham/alc apresentou menor imunomarcagem para a OPG e maior imunomarcagem para o

RANKL quando comparado aos outros grupos sham, sendo essas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$). No grupo ovz/alc foi observada a menor imunomarcção para a OPG e a maior imunomarcção para o RANKL, sendo as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), quando comparado com a maioria dos outros grupos (exceção do ovz/iso e sham/alc, para o RANKL). Pode-se concluir que tanto a deficiência estrogênica quanto a dieta alcoólica foram relacionados à diminuição da expressão de OPG e aumento da expressão de RANKL, o que seria compatível com uma maior predisposição à reabsorção óssea. Esses resultados foram ainda mais evidentes no grupo no qual a deficiência estrogênica e o consumo de álcool foram associados.

Palavras-chave: Alcoolismo. Ovariectomia. Osteoporose. Periodonto. Reabsorção óssea.

Marchini AMPS. Influence of chronic alcoholism and estrogen deficiency on the immunohistochemical expression of regulatory proteins of the bone resorption process in the periodontium of female rats [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

Previous studies suggest that both chronic alcoholism and estrogen deficiency may affect alveolar bone and increase individual susceptibility to faster periodontal disease progression. However, the literature has not yet reached a consensus on this issue, which needs to be further studied. The aim of this study was to investigate possible changes in immunohistochemical expression of proteins involved in the regulation of bone resorption process in the periodontium of female rats subjected to chronic alcoholism and/or estrogen deficiency. Wistar female rats, at three months of age, were divided into two groups: ovariectomized (ovx) or not ovariectomized (sham). Thirty days after the surgical procedures, animals were split again and received the following treatments: alcoholic diet (alc), isocaloric diet (iso) or ad libitum diet (ad). The alcohol groups received alcoholic solution (20%), for two months. The dietary treatment analysis showed ovx/ad group gained more weight and ingested more solid food and these differences were statistically significant as compared with all other groups ($p < 0.01$). When considering both alcohol groups, 53.49% of the daily calories diet (in average) were coming from alcohol. The results also showed the sham/alc group ingested more alcohol as compared to ovx/alc group and this difference was statistically significant ($p < 0.001$). The alveolar bone crest and adjacent tissues (in the region between first and second lower molars) were evaluated by immunohistochemistry, using antibodies for detection of osteoprotegerin (OPG), a protein that inhibits bone resorption, and receptor activator of nuclear factor-kappa β ligand (RANKL), a protein that stimulates bone resorption. The groups ovx/alc, ovx/iso and ovx/ad showed lower immunostaining for OPG, compared to sham/alc sham/iso and sham/ad, respectively, and these differences were statistically significant ($p < 0.05$, $p < 0.05$, and $p < 0.01$). The group ovx/iso showed higher immunostaining for the RANKL compared to sham/iso group, and this difference was statistically significant ($p < 0.01$). Sham/alc group showed lower immunostaining for OPG and higher immunostaining for the RANKL when compared to other sham groups, and these differences were statistically significant ($p < 0.01$). In ovx/alc group the lowest immunostaining for OPG and the highest immunostaining for the

RANKL were observed, and these differences were statistically significant ($p < 0.05$) as compared to the most others groups (except ovx/iso and sham/alc for RANKL). It can be concluded that estrogen deficiency and alcohol diet were related to decreased expression of OPG and increased expression of RANKL, which would be consistent with a greater predisposition to bone resorption. These results were even more evident in the group in which estrogen deficiency and alcohol consumption were associated.

Keywords: Alcoholism. Ovariectomy. Osteoporosis. Periodontium. Bone Resorption.

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma alteração crônica inflamatória que gradualmente destrói o osso alveolar e tecidos moles de suporte dentário. O processo inflamatório decorrente da doença periodontal aumenta a expressão de citocinas chamadas de osteoclastogênicas, o que estimula o desenvolvimento e a atividade das células responsáveis pelo processo de reabsorção óssea (osteoclastos), gerando perda do osso alveolar e, conseqüentemente, do suporte dentário, num processo no qual a inflamação induz à osteólise (Lerner, 2006b; Di Benedetto et al., 2013).

Apesar de ainda não haver um consenso na literatura sobre o assunto, existem evidências que sugerem uma possível correlação entre doença periodontal e osteoporose, especialmente quando são avaliados estudos amplos e bem controlados (Genco, Borgnakke, 2013).

A osteoporose é uma desordem metabólica, caracterizada por uma diminuição da densidade óssea mineral, que torna os ossos mais frágeis e menos resistentes às fraturas, elevando índices de morbidade e mortalidade (Christenson et al., 2012; Kling et al., 2014). Fraturas diminuem a qualidade de vida de modo comparável ou mesmo mais intensamente que patologias crônicas como diabetes, artrite e doença pulmonar, fatos que realçam a importância da osteoporose como um problema de saúde pública (Watts, 2014). A osteoporose é mais prevalente em mulheres, com idade acima de 50 anos, como consequência da deficiência estrogênica, que ocorre na menopausa, de modo que a patologia está comumente associada ao processo de envelhecimento (Christenson et al., 2012). Considerando um estudo que

avaliou a prevalência da doença nos Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão, França, Alemanha, Itália, Espanha e Reino Unido, estima-se que, nesses países, a osteoporose afeta mais de 49 milhões de indivíduos (Wade et al., 2014). Essa prevalência variou de 9 a 38% para mulheres e de 1 a 8% para homens, dependendo do país analisado (Wade et al., 2014).

Apesar da importância da deficiência estrogênica na etiologia da osteoporose, deve-se considerar que essa é uma doença multifatorial, que envolve também outros fatores de risco (Lupsa, Insogna, 2015). Existem diversos fatores de risco associados à osteoporose e no presente estudo, dois deles foram avaliados: a deficiência estrogênica (Lerner, 2006a; Lupsa, Insogna, 2015) e o consumo de álcool (Maurel et al., 2012; Mikosch, 2014; Gaddini et al., 2016).

O consumo de álcool é um tema importante em saúde pública, pois está associado com diversos problemas médicos e sociais, bem como a um aumento do risco de injúrias e acidentes (Moss, 2013). Segundo a organização mundial de Saúde, em 2012, cerca de 3,3 milhões de mortes, que equivalem a 5,9% do total de mortes no mundo, foram atribuídas ao consumo de álcool (World Health Organization, 2014).

A osteoporose como consequência da diminuição da densidade óssea mineral é uma das possíveis complicações médicas associadas consumo excessivo de álcool (Maurel et al., 2012; Gaddini et al., 2016). O uso abusivo crônico do álcool tem sido sugerido como um fator de risco independente para a osteoporose (Mikosch, 2014).

A placa bacteriana é considerada o fator etiológico primário da doença periodontal. No entanto, diversos outros fatores de risco podem alterar a resposta do indivíduo à presença de placa (Di Benedetto et al., 2013; Aljehani, 2014). Muitos desses fatores de risco são modificáveis, ou seja, quando tratados, permitem um melhor controle dos problemas periodontais (Genco, Borgnakke, 2013). Tanto a osteoporose por deficiência estrogênica, quanto por consumo excessivo de álcool têm

sido considerados como possíveis fatores de risco associados a uma maior perda óssea alveolar e aumento da susceptibilidade a uma progressão mais rápida da doença periodontal (Lerner, 2006b; Amaral et al., 2009; Genco, Borgnakke, 2013).

Uma relação positiva entre agravamento de problemas periodontais com o consumo de álcool ou deficiência estrogênica têm sido sugeridos em vários estudos, incluindo revisões de literatura (Lerner, 2006b; Amaral et al., 2009; Genco, Borgnakke, 2013), avaliações clínicas (Amaral et al., 2011; Singh et al., 2014) e trabalhos realizados em animais (Irie et al., 2008; Luo et al., 2014; Bannach et al., 2015; Macari et al., 2015, 2016). No entanto, é importante ressaltar que a literatura não é unânime sobre esse assunto e há trabalhos que mostram resultados contrários, o que indica a necessidade de mais estudos sobre o tema (Orrico et al., 2005; Oballe et al., 2014; Alves et al., 2015; Tanner et al., 2015).

Também têm sido previamente demonstrados efeitos negativos de uma associação entre deficiência estrogênica e consumo de álcool, quando ambas as condições foram avaliadas conjuntamente, em um mesmo animal. Isso foi previamente verificado em regiões como vértebras (Callaci et al., 2006), fêmur (Deco et al., 2011; Lodi et al., 2016) e tecidos periodontais (Marchini et al., 2012; Alonso et al., 2016).

Um importante mecanismo envolvido no controle dos processos que envolvem perda óssea, é a via RANK/RANKL/OPG (receptor ativador do fator nuclear $\text{Kappa } \beta$ / receptor ativador do fator nuclear $\text{Kappa } \beta$ ligante / osteoprotegerina). Quando o RANKL se liga ao RANK (que está na superfície de células progenitoras de osteoclastos) há um estímulo à formação de osteoclastos, o que leva a um aumento do processo de reabsorção óssea. A OPG tem alta afinidade pelo RANKL. Quando a ligação entre OPG e RANKL acontece, restam menos moléculas de RANKL disponíveis para a ligação com o RANK, o que diminui a formação de osteoclastos e consequentemente a reabsorção

óssea. Assim sendo, o sistema RANK/RANKL/OPG é um importante sistema regulador da osteoclastogênese (Clarke, 2008; Walsh, Choi, 2014; Nagy, Penninger, 2015).

A interação entre o receptor RANK e o RANKL é o mais importante evento que determina a formação de osteoclastos (Blair, Athanasou, 2004). Assim, o RANKL é considerado uma citocina efetora final que conduz à osteoclastogênese (Weitzmann, 2013). Deve-se ressaltar que existem outras citocinas osteoclastogênicas conhecidas, no entanto a maioria delas é capaz de atuar indiretamente sobre processo de formação de osteoclastos, estimulando um aumento dos níveis de RANKL e/ou decréscimo de OPG (Lerner, 2006b; Weitzmann, 2013).

Alguns estudos sugerem que a perda óssea decorrente da deficiência estrogênica (Eghbali-Fatourehchi et al., 2003; Lerner, 2006a; Zhao, 2012), consumo de álcool (Chen JR et al., 2008; Callaci et al., 2009) ou da doença periodontal (Lerner, 2006b; Di Benedetto et al., 2013) possam estar associados a um aumento da expressão de RANKL e a diminuição da OPG, o que seria compatível com uma exacerbação do processo de reabsorção óssea.

O presente estudo avaliou a influência do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica sobre a expressão de RANKL e OPG, no periodonto de ratas.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão imunoistoquímica de RANKL e OPG no periodonto de ratas. As análises foram feitas no ápice da crista alveolar e tecidos adjacentes.

A hipótese inicial deste estudo era de que a deficiência estrogênica e/ou o consumo de álcool estivessem relacionados a um aumento da expressão de RANKL e/ou diminuição de OPG, o que seria compatível com uma tendência a um aumento no processo de reabsorção óssea.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Tratamento dos animais: visão geral

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do CONCEA e foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, tendo sido aprovado pelo protocolo nº 05/2013-PA/CEP.

Noventa ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com aproximadamente três meses de idade, foram inicialmente divididas em dois grupos: ovariectomizadas ou sham operadas. Os animais ovariectomizados foram submetidos à deficiência estrogênica, mediante remoção cirúrgica dos ovários, e os sham operados foram submetidos à ovariectomia simulada (os ovários foram cirurgicamente expostos, mas não removidos).

Um mês após a realização das cirurgias (animais com quatro meses de idade) foi feita uma subdivisão dos grupos de acordo com o tratamento dietético: dieta alcoólica, dieta isocalórica e dieta livre. Inicialmente, os animais que receberam dieta alcoólica passaram por um período de adaptação de nove dias (três dias ingerindo solução alcoólica a 5%, três dias a 10% e três dias a 15%).

Dez dias após o início do período de adaptação (animais com quatro meses e dez dias de idade) iniciou-se o tratamento dietético propriamente dito. A partir desse momento, os animais dos grupos álcool começaram a receber solução alcoólica a 20%, como única fonte de líquidos e ração sólida à vontade. Os animais dos grupos isocalóricos receberam dieta restrita (com quantidade de calorias equivalentes às ingeridas pelos grupos álcool no dia anterior, composta por solução de sacarose 26,6%, água e ração); e os animais dos grupos com dieta livre continuaram com água e ração à vontade. Uma descrição mais detalhada das dietas será feita posteriormente. Durante o período de tratamento dietético propriamente dito, que teve duração de dois meses, a quantidade de alimentos e bebidas ingeridas pelos animais de todos os grupos foi mensurada. A eutanásia ocorreu após o término do tratamento dietético (animais com seis meses e dez dias). A figura 1 relaciona a idade dos animais aos procedimentos realizados.

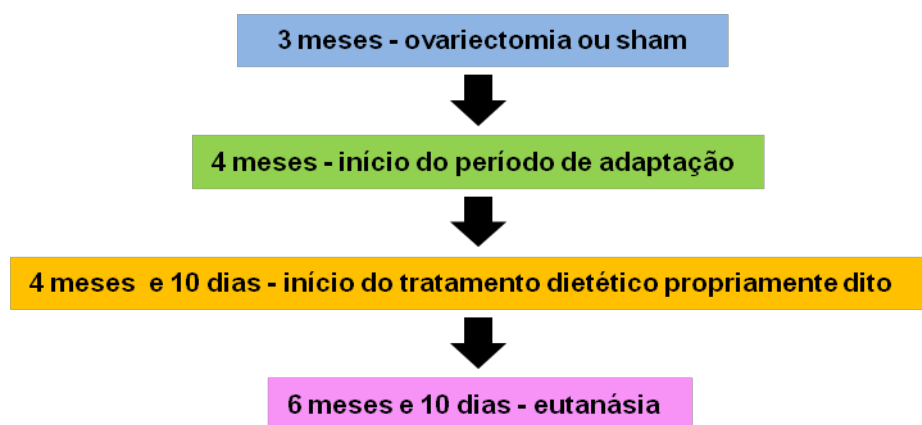


Figura 1 - Relação entre idade dos animais e procedimentos realizados.

Em resumo, os animais foram divididos em seis grupos, com quinze animais em cada: sham com dieta livre (sham/dl), ovariectomia com dieta livre (ovz/dl), sham com dieta alcoólica (sham/alc), ovariectomia com dieta alcoólica (ovz/alc), sham com dieta isocalórica

(sham/iso) e ovariectomia com dieta isocalórica (ovz/iso), conforme pode ser observado no quadro 1.

Quadro 1 - Grupos experimentais

Nome do grupo	Tipo de cirurgia	Tipo de dieta
sham/dl	sham	livre
ovz/dl	ovariectomia	livre
sham/alc	sham	alcoólica
ovz/alc	ovariectomia	alcoólica
sham/iso	sham	isocalórica
ovz/iso	ovariectomia	isocalórica

O tratamento dos animais foi baseado em trabalhos previamente realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, que utilizaram uma metodologia semelhante. A padronização do tratamento visa facilitar a comparação dos resultados do presente experimento com os obtidos em trabalhos pertencentes a mesma linha de pesquisa (Deco et al., 2011; Marchini et al., 2012, 2014; Salgado et al., 2015; Alonso et al., 2016; Lodi et al., 2016).

3.1.2 Detalhamento dos procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos, para realização da ovariectomia e cirurgia sham, foram realizados em sala cuidadosamente limpa (desinfetada utilizando álcool 70%) e com instrumentais previamente esterilizados.

Antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais receberam anestesia geral. Os fármacos utilizados para realização da anestesia e suas respectivas concentrações foram: cloridrato de Ketamina 1,16 g/10 ml*, um anestésico geral; e cloridrato de xilazina 2,3 g/100 ml**, substância sedativa e relaxante muscular. Inicialmente, foi preparada uma solução com uma mistura de 0,5 ml de cloridrato de Ketamina e 0,8 ml de cloridrato de xilazina. Em seguida, para promover a anestesia, cada animal recebeu, por via intramuscular, 0,1 ml da solução para cada 100 g de peso, de forma que um animal pesando 300 g recebeu 0,3 ml da solução.

Após anestesia, foi feita uma depilação da região abdominal lateral seguida de antissepsia com álcool iodado. Na sequência, com auxílio de uma lâmina de bisturi nº15, foi realizada uma incisão cirúrgica longitudinal, na pele do animal, com extensão aproximada de 1 cm, na região próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela. Após a incisão da pele, foi possível visualizar a camada muscular que foi cortada com auxílio de uma tesoura cirúrgica, permitindo acesso e exposição do ovário. Para a realização da ovariectomia, foi feita uma ligadura, abaixo do ovário, utilizando um fio de seda nº 4***. Logo após esse procedimento, utilizando uma tesoura cirúrgica, foi realizada a remoção do ovário juntamente com pequena porção do útero e gordura circundante. A seguir, as camadas musculares e a pele foram suturadas com fio de seda nº 4***. Ao final desses procedimentos, foi realizada nova antissepsia com álcool iodado, na região operada. A remoção dos ovários foi realizada bilateralmente e teve como objetivo a indução da deficiência estrogênica.

Nos animais dos grupos sham, os ovários foram expostos, mas não foi feita a ligadura e nem a remoção dos mesmos. A cirurgia sham teve como objetivo simular o estresse cirúrgico sofrido pelos grupos ovariectomizados.

* Dopalen® - Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil.

** Anasedan® - Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil.

*** Ethicon® - Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil.

Após as cirurgias, os animais receberam o anti-inflamatório diclofenaco sódico*, e um poli antibiótico com penicilinas e estreptomicinas**. As doses utilizadas foram: 0,3 ml/animal, para o anti-inflamatório e 0,1 ml/animal para o poli antibiótico, sendo ambos administrados via intramuscular.

3.1.3 Detalhamento do tratamento dietético

Após o período de adaptação, os animais do grupo álcool receberam soluções alcoólicas a 20%, como única fonte de dieta líquida. A preparação dessas soluções foi realizada utilizando-se água e álcool etílico a 99,5%***. Os grupos que receberam a dieta com álcool iniciaram o tratamento um dia antes dos isocalóricos. Foi oferecido, diariamente, 50 ml de solução alcoólica por animal. Tal quantidade é suficiente para que haja uma sobra diária de solução alcoólica, permitindo que os animais façam o consumo à vontade. No dia seguinte, a solução restante foi mensurada, sendo calculada a média ingerida por animal. Os grupos isocalóricos receberam uma solução de sacarose P.A.**** cuja concentração tem, em ml, a mesmas calorias da solução de álcool a 20%. A solução isocalórica foi preparada dissolvendo-se 266 g de sacarose em 1000 ml de água (solução de sacarose a 26,6%). Os cálculos da concentração adequada da solução isocalórica foram feitos levando-se em consideração a concentração alcoólica utilizada no presente estudo (20%), a densidade do álcool absoluto (0,787 g/ml) e os valores calóricos da sacarose (4,1 kcal/g) e do álcool (7,1 kcal/g). Além de receberem solução de sacarose, os grupos isocalóricos também tiveram acesso à água à vontade. Os grupos com dieta livre receberam água à vontade.

A dieta sólida utilizada neste estudo foi uma ração comercial*****. Para os animais que receberam solução alcoólica foram

* Voltaren® 75 mg/3 ml - Novartis, São Paulo, SP, Brasil.

** Pentabiótico Pequeno Porte® - Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil.

*** Ecibra, São Paulo, SP, Brasil.

**** Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

***** Labina® - Purina do Brasil, Paulínia, SP, Brasil.

fornechas 50 g de ração, diariamente, por animal. Tal quantidade foi suficiente para que houvesse uma sobra diária de ração, permitindo que os animais fizessem o consumo à vontade. No dia seguinte, as porções restantes foram pesadas e foi obtida a quantidade média de ração ingerida por animal. Aos grupos isocalóricos foi oferecida a mesma quantidade média de ração consumida pelos grupos álcool no dia anterior (média da ração consumida pelos grupos sham/alc e ovz/alc). Os grupos com dieta livre receberam ração à vontade.

3.1.4 Avaliações de alterações no peso corpóreo

No início do experimento (momento da ovariectomia ou cirurgia sham) e imediatamente antes da eutanásia todos os animais foram pesados em balança semianalítica. Esse procedimento teve como finalidade verificar se os tratamentos realizados interferiram no peso dos animais. As alterações de peso foram verificadas em porcentagem utilizando a fórmula:

$$\text{Alterações de peso (\%)} = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial} \times 100$$

3.1.5 Avaliações de alterações na dieta

Foram registrados os valores médios diários de ração e dieta líquida consumida por animal, considerando solução líquida (ml) e ração ingerida (g). Para os grupos álcool foram avaliados o consumo de solução alcoólica a 20% e ração. Para os grupos isocalóricos foram avaliados o consumo de solução de sacarose a 26,6% e ração. Para os

grupos com dieta livre foram avaliados o consumo de água e ração. A partir desses dados, para os grupos álcool, foi calculada a porcentagem total de calorias da dieta provenientes do álcool, conforme previamente preconizado (Marchini et al., 2012, 2014). Para esses cálculos, foi considerado que 1 ml de álcool equivale a 0,787 g; que 1 g da ração contém aproximadamente 2,386 kcal; e que 1 g de álcool etílico absoluto contém aproximadamente 7,1 kcal.

3.1.6 Eutanásia

Transcorridos dois meses do início da administração das dietas (61 dias), todos os animais foram anestesiados (com os mesmos fármacos utilizados nos procedimentos cirúrgicos, nas mesmas dosagens). A eutanásia foi feita por perfusão cardíaca com formalina a 4%, visando obter melhor fixação dos cortes histológicos.

3.2 Análises imunoistoquímicas

3.2.1 Preparação das amostras

Após a eutanásia, uma hemimandíbula de cada animal (lado esquerdo) foi colocada em solução de formol a 10% por 48 h.

A seguir, as amostras foram descalcificadas, mediante a realização de trocas frequentes de solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético)*, para posterior inclusão em parafina.

*Titriplex® - Merck, Darmstadt, HE, Alemanha.

Cortes histológicos de 3 µm de espessura foram realizados na região da crista óssea alveolar, entre os primeiros e segundos molares inferiores, no sentido longitudinal.

Os cortes foram realizados de tal forma que fosse possível visualizar a raiz mesial do segundo molar inferior, a raiz distal do primeiro molar inferior e a crista óssea alveolar no centro, conforme pode ser visto na figura 2. Os cortes foram estendidos em lâminas silanizadas, as quais foram utilizadas para as análises imunoistoquímicas.

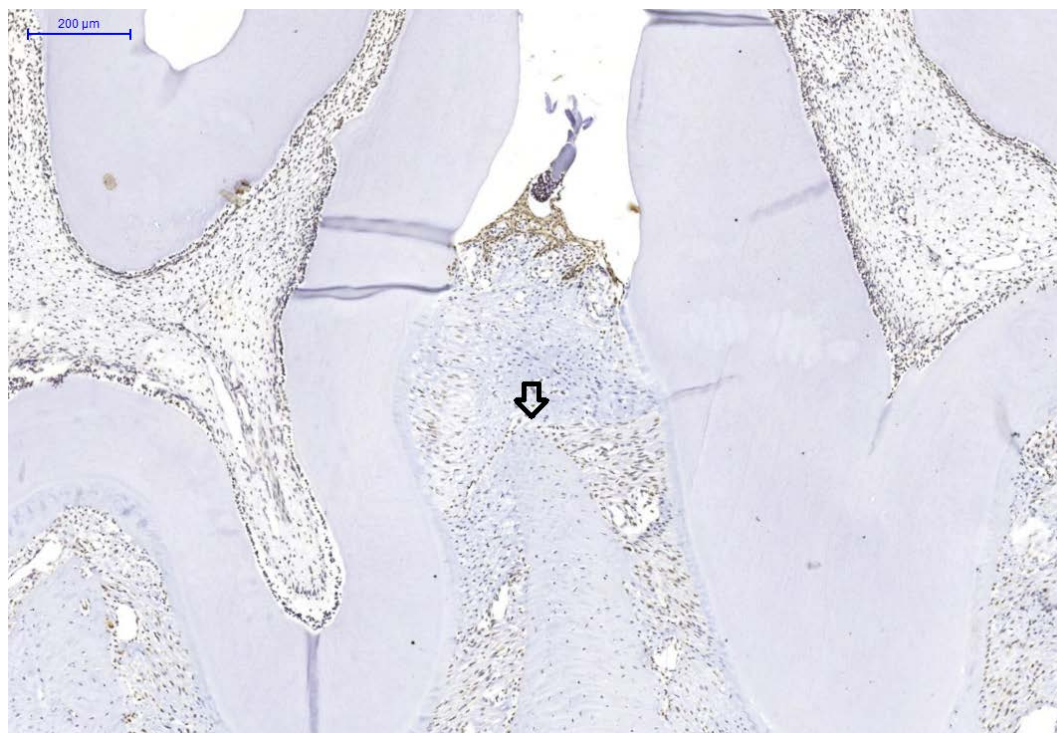


Figura 2 - Crista óssea alveolar (seta) visualizada entre as raízes dos molares. Grupo sham/alc - RANKL).

Os marcadores imunoistoquímicos utilizados foram anti-RANKL* (com especificidade para detecção do RANKL ligado à membrana) e anti-OPG**. Para a realização das reações imunoistoquímicas foram realizados os seguintes procedimentos:

Inicialmente, foi feita a desparafinização. Para esse procedimento as lâminas foram colocadas em uma estufa (60°C por 30

* Ms mAB to Rankl - ab45039® - Abcam, Cambridge, CA, Reino Unido.

** Rb pAb to osteoprotegerin - ab73400® - Abcam, Cambridge, CA, Reino Unido.

min) e a seguir receberam dois banhos de xilol* por 15 min, a temperatura ambiente.

Na sequência, as lâminas foram reidratadas utilizando etanol* em concentrações decrescentes (absoluto, 95%, 90%, 80% e 70%). Esse procedimento foi realizado por 5 min para cada concentração e foi seguido de uma rápida lavagem em água destilada.

A seguir foram realizados os procedimentos para a recuperação antigênica. Para a OPG e RANKL, as lâminas foram imersas em uma cuba de vidro contendo pepsina, pH 1,8** e colocadas em estufa (inicialmente à 60°C, por 10 min, e posteriormente, à 37°C, por 50 min). Esse procedimento foi seguido por um resfriamento durante 30 min (temperatura ambiente), posterior lavagem (água corrente) por 5 min e duas passagens em água destilada.

Na sequência, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio 20 volumes* e álcool metílico*, na proporção de 1:1, por 10 min, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena tecidual. Esse procedimento foi seguido de lavagem em água corrente e água destilada bem como imersão por duas vezes em solução tampão Tris (tris-hidroxi-metil-aminometano)**, pH 7,4, durante 5 min cada.

Para eliminação dos anticorpos inespecíficos, foi feita uma incubação com soro albumina bovina 1%*** por 30 min, em câmara úmida. Esse procedimento foi seguido de lavagem com tampão Tris por 5 min.

Os próximos procedimentos realizados foram diluição e incubação dos anticorpos primários. Para o RANKL a diluição foi de 1:50 e para a OPG de 1:100, para ambos a incubação foi à 4°C, por 18 h. As diluições foram feitas utilizando diluente universal***.

A seguir, após a lavagem das lâminas (com tampão Tris, por 10 min), foi feita a incubação com o anticorpo secundário, utilizando um sistema comercial**** (30 min, à temperatura ambiente).

* Merck, Darmstadt, HE, Alemanha.

** Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos da América.

*** Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos da América.

**** EnVision® - DAKO, Carpinteria, CA, Estados Unidos da América.

Na sequência, as lâminas foram novamente lavadas (com tampão Tris, por 10 min). Após a lavagem, foi feita uma incubação com solução de diaminobenzidina*, por 5 min.

Posteriormente, após imersão das lâminas em tampão Tris, por 10 min, realizou-se a contra coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer** seguida de lavagem por 5 min em água corrente e duas passagens em água destilada.

A seguir as lâminas foram desidratadas com etanol em uma série crescente (70%, 80%, 90% e absoluto, por 5 min em cada concentração) e diafanizadas em xilol por 10 min. Por fim foi realizada a montagem das lâminas com resina sintética***.

Os controles negativos foram feitos com a substituição dos anticorpos primários (RANKL e OPG) por diluente universal****.

Para validação das reações foram utilizados os seguintes controles positivos: para o RANKL, linfonodo de rato Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) que marca centro germinativo e linfócitos; para a OPG, fígado de rato Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), que marca hepatócitos.

As lâminas foram processadas utilizando-se uma caixa incubadora com capacidade para 18 lâminas, sendo uma para o controle positivo, uma para o controle negativo e o restante foi dividido entre os seis grupos experimentais na proporção 3:3:3:3:2:2.

3.2.2 Visualização dos cortes histológicos

Após a realização dos procedimentos imunoistoquímicos, as lâminas foram escaneadas em um equipamento próprio para digitalização de lâminas histológicas*****. Os cortes histológicos foram

*Líquido DAB® - DAKO, Carpinteria, CA, Estados Unidos da América.

** Merck, Darmstadt, HE, Alemanha.

*** Entellan® - Merck, Darmstadt, HE, Alemanha.

**** Dako, Carpinteria, CA, Estados Unidos da América.

***** Panoramic Desk® - 3DHitech, Budapeste, Hungria.

visualizados utilizando o programa Pannoramic Viewer*, o qual permitiu fazer fotografias e realizar mensurações.

3.2.3 Análise da imunomarcção no ápice da crista óssea alveolar

Para essa análise foram feitas fotografias do ápice da crista óssea alveolar (localizada entre o primeiro e o segundo molar inferior) com uma ampliação de 40 vezes, a partir da imagem escaneada, utilizando o programa Pannoramic Viewer*. As fotografias foram feitas de forma padronizada utilizando-se, para todas, os mesmos valores de brilho, contraste, escala e balanço de cores. Todas as fotografias foram realizadas tendo como ponto de referência o ápice da crista óssea, que ficou localizado na porção central da fotografia, considerando um espaço de aproximadamente 50 micrômetros (μm) entre o ápice da crista e a margem superior da fotografia (Figura 3).

* Pannoramic Viewer 1.15.4 - 3DHistech, Budapeste, Hungria.

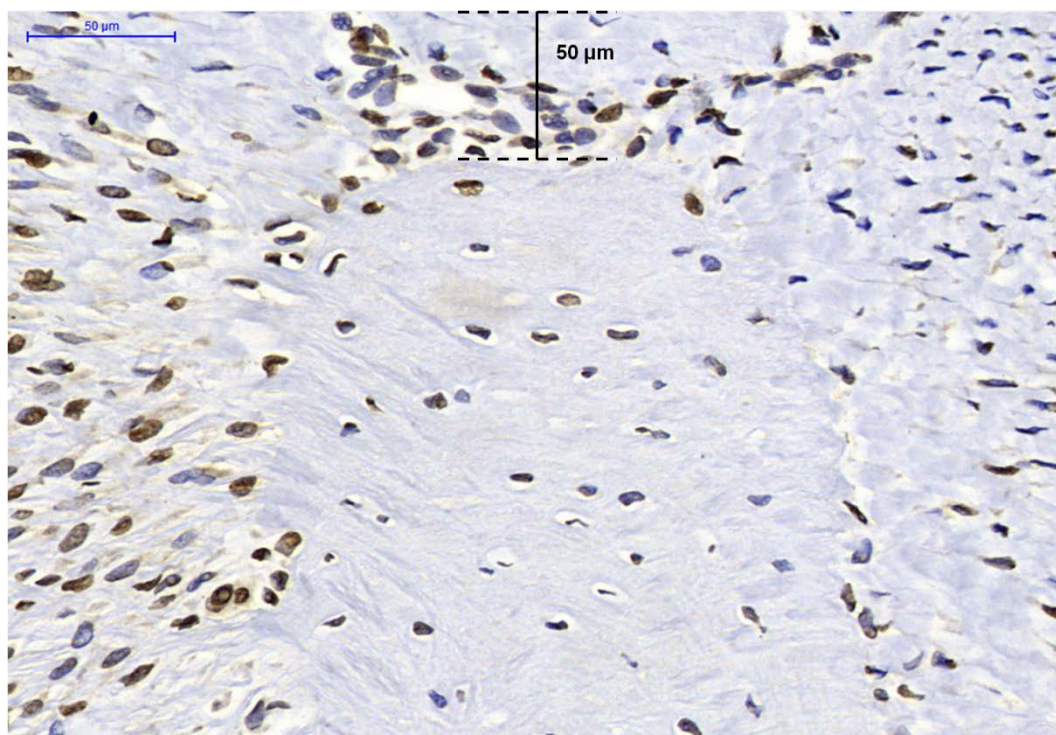


Figura 3 - Ápice da crista óssea alveolar. As anotações e a barra de escala são ilustrativas e foram removidas no momento das análises (sham/alc - RANKL).

3.2.3.1 Análise quantitativa da porcentagem de imunomarcção

Com o objetivo de realizar uma análise quantitativa dos resultados obtidos na imunoistoquímica, as fotografias (Figura 3) foram abertas no programa computacional NIH ImageJ*. Foram feitas duas análises de cada fotografia. Na primeira análise, foi verificada a área total ocupada por células, selecionando o maior número possível de células (imunomarcadas e não imunomarcadas). Na segunda análise, excluiu-se a área da primeira análise que não havia sido marcada pela imunoistoquímica, selecionando-se apenas a área imunomarcada (que na imagem original estava em marrom). Exemplos das imagens (original,

* Domínio público - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

primeira análise e segunda análise) podem ser visualizadas nas figuras 4, 5 e 6.

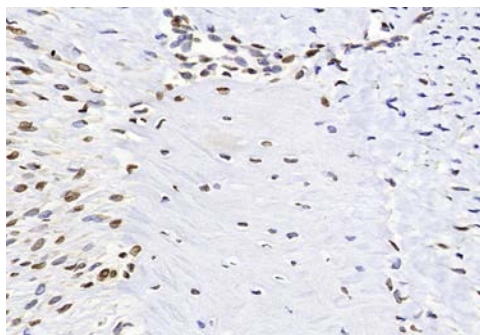


Figura 4 - Imagem original (sham/alc - RANKL). Fotografia feita sem a presença da barra de escala ou anotações, pronta para ser analisada pelo programa NIH ImageJ.

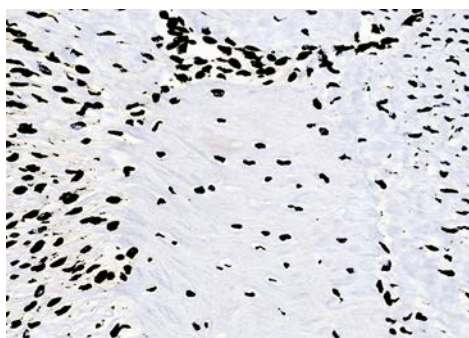


Figura 5 - Primeira análise (sham/alc - RANKL). O objetivo da primeira análise foi selecionar o maior número possível de células (imunomarcadas e não imunomarcadas). A seleção foi feita em cor preta, pelo programa computacional NIH ImageJ.

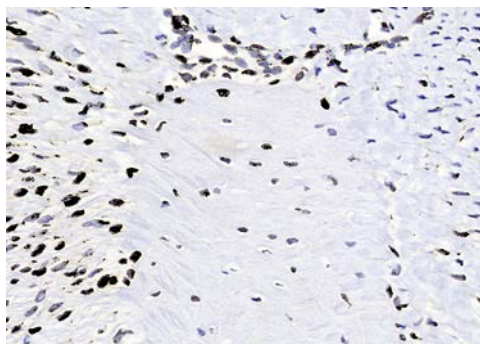


Figura 6 - Segunda análise (sham/alc - RANKL). O objetivo da segunda análise foi selecionar a área marcada pela imunoistoquímica (que na imagem original estava em marrom). A seleção foi feita em cor preta, pelo programa computacional NIH ImageJ.

A partir desses dados foi calculada a porcentagem ocupada pela área imunomarcada, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Área imunomarcada (\%)} = (\text{segunda análise/primeira análise}) \times 100$$

Um passo a passo para a realização dessa técnica (considerando as adaptações acima descritas), foi previamente preconizado (OpenWetWare, 2012).

3.2.3.2 Análise da imunomarcção para células ósseas

Com o objetivo de complementar a análise da imunomarcção, no ápice da crista óssea alveolar, foi feita uma avaliação do número de células ósseas imunomarcadas. Essa análise foi feita na região padronizada pela mesma fotografia que havia sido previamente utilizada para a avaliação porcentagem de imunomarcção (Figura 3). Nessa análise, apenas as células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) foram contadas (as demais células foram desconsideradas). As células ósseas foram avaliadas de acordo com a sua morfologia e localização, conforme preconizado previamente (Marchini et al., 2014). Foram considerados osteoblastos as células uninucleares em íntimo contato com a superfície da crista óssea. Foram considerados osteoclastos as células multinucleares em íntimo contato com a superfície da crista óssea. Foram considerados osteócitos as células aprisionadas dentro da matriz óssea. Para essa avaliação não foi considerada a intensidade da imunomarcção, sendo as células consideradas imunomarcadas ou não imunomarcadas. Os resultados foram avaliados de forma descritiva, considerando-se as médias e desvios padrões do

número de células imunomarcadas por fotografia, dentro de cada grupo experimental.

3.2.4 Análise da imunomarcação de fibroblastos e células inflamatórias

Essa análise teve como objetivo observar a imunomarcação de fibroblastos e células inflamatórias utilizando uma metodologia semiquantitativa.

A avaliação dos fibroblastos foi feita em uma área extensa, que compreendeu o tecido conjuntivo gengival e a área ocupada pelo ligamento periodontal em toda sua extensão, na região compreendida entre o primeiro e segundo molar inferior. A escolha dessas células levou em consideração o fato dos fibroblastos (tanto os gengivais quanto os do ligamento periodontal) serem importantes fontes de OPG (Sakata et al., 1999; De Vries et al., 2006; Sokos et al., 2015).

As células inflamatórias foram avaliadas na região do tecido conjuntivo gengival, localizado entre o primeiro e segundo molar inferior. A escolha levou em consideração a frequente presença de infiltrado inflamatório nessa região (Alonso et al., 2016) bem como o fato de células inflamatórias serem considerados fontes primárias de RANKL em caso de problemas periodontais (Kawai et al., 2006; Chen B et al., 2014).

Essas avaliações foram realizadas de forma semiquantitativa utilizando uma escala numérica de 0 a 3, sendo 0 (nenhuma imunomarcação evidente foi observada durante a análise ou a imunomarcação foi raríssima), 1 (poucas células imunomarcadas); 2 (moderada quantidade de células imunomarcadas); 3 (grande quantidade de células imunomarcadas). Essas análises foram realizadas duas vezes,

sendo consideradas as médias por animal. Após as análises, foram calculados os valores médios para cada grupo experimental.

3.3 Análises estatísticas

3.3.1 Análises estatísticas para dieta e peso

Os dados relativos às dietas foram tabelados e enviados para a análise estatística, considerando-se a média do consumo diário durante 61 dias (n=61). Para as alterações de peso foram considerados os valores obtidos por animal. Alguns animais morreram antes do final do experimento (um no grupo ovz/alc, um no grupo ovz/iso e três no grupo ovz/dl), o que alterou o número de final de animais analisados por grupo. O número de animais avaliados quanto às alterações de peso, pode ser visualizado na legenda da figura 7, no capítulo referente aos resultados.

A estatística relativa ao peso e dieta foi realizada utilizando-se a análise de variância, ANOVA GLM (*General Linear Models*) e o teste de comparação múltipla de Tukey. Para essas análises os seguintes programas foram utilizados: SPSS Statistics for Windows* e Minitab**. Os gráficos foram feitos no programa Microsoft Excel 2007***. Essas análises foram realizadas com auxílio do consultor estatístico Jimmy Adans Costa Palandi (CONRE 8250-A).

* Versão 17, IBM, Chicago, IL, Estados Unidos da América.

** Versão 16, Minitab Inc., State College, PA, Estados Unidos da América.

*** Microsoft Corporation, Redmond, WA, Estados Unidos da América.

3.3.2 Análises estatísticas para porcentagem de imunomarcção

Para este estudo, a adequada padronização dos cortes histológicos (conforme descrito no capítulo material e métodos - Figura 2), bem como a presença de dobras ou rasgos nesses cortes (dependendo do tamanho e localização) foram motivos que limitaram o número de animais avaliados nas análises imunoistoquímicas.

Como regra geral, foram escolhidos os sete melhores cortes histológicos de cada grupo de animais (em alguns grupos foi possível escolher apenas seis). O número final de animais analisados por grupo experimental pode ser visualizado na legenda da figura 8, no capítulo referente aos resultados.

Se por um lado, esse procedimento diminuiu o número final de animais analisados, por outro lado, a análise de amostras padronizadas torna os resultados mais confiáveis. Deve-se considerar que foram encontradas dificuldades técnicas devido ao tamanho reduzido da área a ser analisada e a problemas na obtenção de uma adequada angulação no momento da inclusão em parafina bem como no momento dos cortes.

Também deve ser salientado que um número de amostras equivalente a sete ou menos por grupo experimental já foi utilizado por diversos outros autores (Irie et al., 2008; Luo et al., 2014; Macari et al., 2015).

Adicionalmente, os resultados das análises da porcentagem de imunomarcção foram considerados adequados do ponto de vista estatístico. Os dados foram submetidos a testes de normalidade (teste de Kolmogorov - Smirnov) e foram considerados paramétricos. A estatística foi feita utilizando-se a análise de variância, One Way ANOVA, e o teste de comparação múltipla de Tukey. Os testes

foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 5.01*. Os gráficos foram feitos no programa Microsoft Excel 2007**.

* GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos da América.

** Microsoft Corporation, Redmond, WA, Estados Unidos da América.

4 RESULTADOS

4.1 Dieta e Peso

A figura 7 ilustra os valores das médias e desvios padrões em relação à dieta líquida (solução alcoólica a 20% para os grupos álcool; solução de sacarose a 26,6% para os grupos isocalóricos e água para os grupos com dieta livre); dieta sólida (ração para todos os grupos); e alterações de peso (variações no peso dos animais entre os momentos dos procedimentos cirúrgicos e eutanásia). As tabelas 1, 2 e 3 ilustram as diferenças estatísticas entre os grupos para a dieta líquida, dieta sólida e alterações de peso, respectivamente.

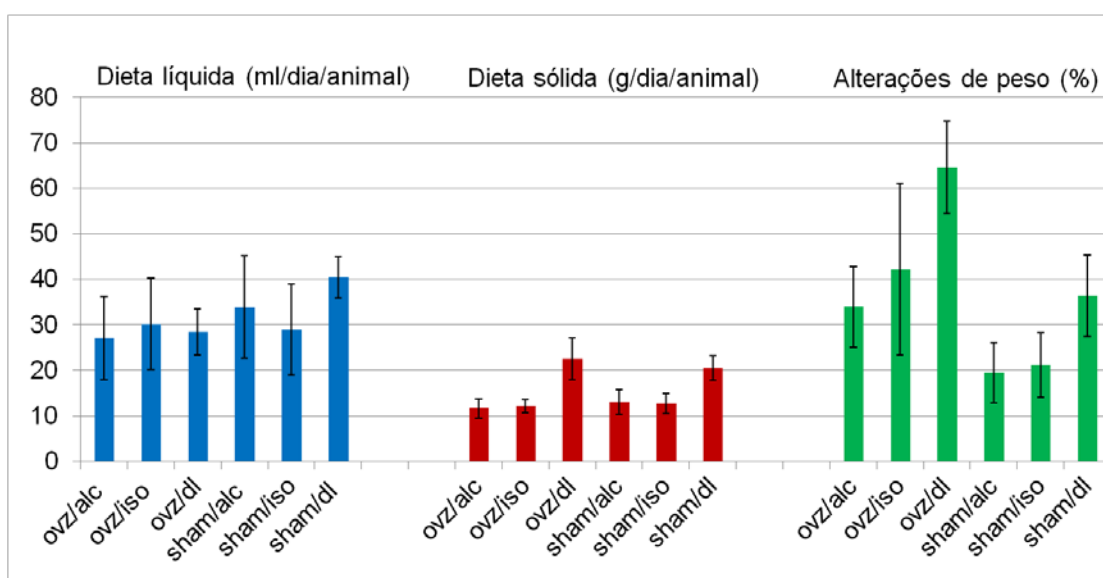


Figura 7 - Valores das médias (barras) e desvios padrões (linhas acima das barras) para dieta líquida (azul), dieta sólida (vermelho) e alterações de peso (verde). Número de análises por grupo (n): dieta líquida: n=61 dias de tratamento; dieta sólida: n=61 dias de tratamento; alterações de peso: ovz/alc: n=14; ovz/iso: n=14; ovz/dl: n= 12; sham/alc: n=15; sham/iso: n=15; sham/dl: n= 15.

Tabela 1 - Dieta líquida (solução alcoólica a 20% para os grupos álcool; solução de sacarose a 26,6% para os grupos isocalóricos e água para os grupos com dieta livre): comparações estatísticas entre os grupos (valores de p)

	ovz/alc	ovz/iso	ovz/dl	sham/alc	sham/iso
ovz/iso	NS				
ovz/dl	NS	NS			
sham/alc	<0,001***	NS	<0,01**		
sham/iso	NS	NS	NS	<0,05*	
sham/dl	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,01**	<0,001***

NS - $p > 0.05$ - valores não significativos.

* $p < 0.05$ - valores significativos.

** $p < 0.01$ - valores muito significativos.

*** $p < 0.001$ - valores extremamente significativos.

Tabela 2 - Dieta sólida (ração): comparações estatísticas entre os grupos (valores de p)

	ovz/alc	ovz/iso	ovz/dl	sham/alc	sham/iso
ovz/iso	NS				
ovz/dl	<0,001***	<0,001***			
sham/alc	NS	NS	<0,001***		
sham/iso	NS	NS	<0,001***	NS	
sham/dl	<0,001***	<0,001***	<0,01**	<0,001***	<0,001***

NS - $p > 0.05$ - valores não significativos.

* $p < 0.05$ - valores significativos.

** $p < 0.01$ - valores muito significativos.

*** $p < 0.001$ - valores extremamente significativos.

Tabela 3 - Alterações de peso durante o experimento: comparações estatísticas entre os grupos (valores de p)

	ovz/alc	ovz/iso	ovz/dl	sham/alc	sham/iso
ovz/iso	NS				
ovz/dl	<0,001***	<0,001***			
sham/alc	<0,01**	<0,001***	<0,001***		
sham/iso	<0,05*	<0,001***	<0,001***	NS	
sham/dl	NS	NS	<0,001***	<0,01**	<0,01**

NS - $p > 0.05$ - valores não significativos.

* $p < 0.05$ - valores significativos.

** $p < 0.01$ - valores muito significativos.

*** $p < 0.001$ - valores extremamente significativos.

Pode-se observar que o grupo que ingeriu maior quantidade de líquidos foi o sham/dl. Esse grupo foi estatisticamente diferente de todos os outros grupos. Por outro lado, o grupo que ingeriu menor quantidade de líquidos foi ovz/alc, que foi estatisticamente diferente apenas do sham/dl e do sham/alc. Deve-se ressaltar o fato do grupo sham/alc ter ingerido significativamente maior quantidade de solução alcoólica, se comparado ao grupo ovz/alc (Figura 7 e Tabela 1).

O grupo que ingeriu a maior quantidade ração foi o ovx/dl, diferindo significativamente de todos os outros grupos. Por outro lado, o grupo que ingeriu menor quantidade de ração foi o ovx/alc, diferindo significativamente apenas dos grupos com dieta livre (ovz/dl e sham/dl). Os grupos com dieta livre (ovz/dl e sham/dl) ingeriram as maiores quantidades de ração, diferindo significativamente de todos os grupos com dieta controlada (sham/alc, sham/iso, ovz/iso e ovz/alc). Também foi observado que não houve diferenças significativas entre os grupos com dieta controlada (sham/alc, sham/iso, ovz/iso e ovz/alc) para o consumo de ração (Figura 7 e Tabela 2).

Em todos os grupos experimentais houve aumento de peso durante o experimento. O grupo com maior ganho de peso foi ovz/dl, diferindo significativamente de todos os outros grupos. Por outro lado, o grupo com menor ganho de peso foi sham/alc, que foi diferente da maioria dos outros grupos, com exceção do sham/iso (Figura 7 e Tabela 3).

A tabela 4 mostra uma análise detalhada do consumo de álcool para os grupos ovz/alc e sham/alc. Mediante essa análise, pode-se observar que os grupos ovz/alc e sham/alc ingeriram 27,06 ml e 33,93 ml de solução de alcoólica a 20% por dia por animal, respectivamente (média de 30,5 ml). Também foi calculado o percentual das calorias alimentares provenientes de álcool. Os resultados mostraram que para os grupos ovx/alc e sham/alc, 52,09% e 54,89% das calorias da dieta vieram do álcool, respectivamente (média de 53,49%). Todos os cálculos foram realizados conforme previamente preconizado (Marchini et al., 2012, 2014).

Tabela 4 - Análise do consumo diário de álcool para os grupos ovx/alc, sham/alc e médias entre os grupos

	ovx/alc	sham/alc	média
Solução alcoólica a 20% (ml/dia/animal)	27,06	33,93	30,50
Álcool absoluto (ml/dia/animal)	5,41	6,79	6,10
Álcool absoluto (g/dia/animal)*	4,26	5,34	4,80
Álcool absoluto (g/ Kg de peso/dia)**	14,20	17,80	16,00
Ingestão de ração (g/dia/animal)	11,66	13,06	12,36
Ingestão de ração (kcal/dia/animal)***	27,82	31,16	29,49
Álcool (kcal/dia/animal)****	30,25	37,91	34,08
Total de kcal/dia/animal (ração + álcool)	58,07	69,07	63,57
Calorias diárias provenientes do álcool (%)	52,09	54,89	53,49

* considerando que 1 ml de álcool é equivalente a aproximadamente 0,787 g.

** considerando um animal com peso médio de 300 g.

*** considerando que 1 g da ração equivale a aproximadamente 2,386 kcal.

**** considerando que 1 g de álcool equivale a aproximadamente 7,1 kcal.

4.2 Resultados da porcentagem de imunomarcção

A figura 8 ilustra os valores das médias e desvios padrões em relação aos resultados da porcentagem de imunomarcção, no ápice da crista óssea alveolar, para OPG e RANKL, comparando os diferentes grupos experimentais.

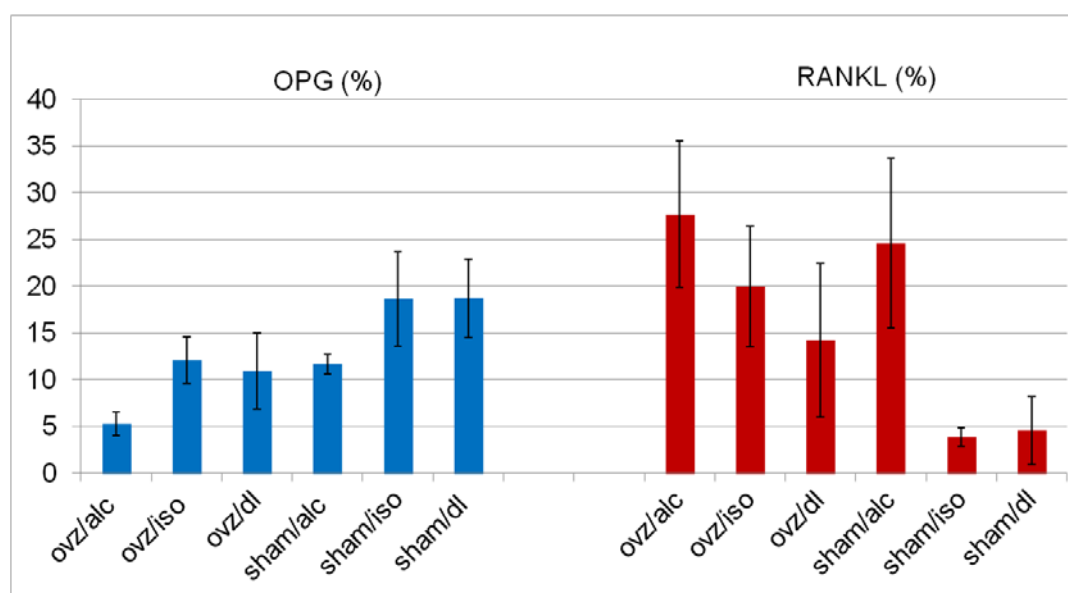


Figura 8 - Valores das médias (barras) e desvios padrões (linhas acima das barras) para a porcentagem de imunomarcação. OPG (azul) e RANKL (vermelho). OPG: número de animais analisados por grupo (n): ovz/alc: n=6; ovz/iso: n=7; ovz/dl: n=6; sham/alc: n=7; sham/iso: n=7; sham/dl: n=7. RANKL: número de animais analisados por grupo (n): ovz/alc: n=7; ovz/iso: n=6; ovz/dl: n=7; sham/alc: n=7; sham/iso: n=7; sham/dl: n=6.

4.2.1 Porcentagem de imunomarcação para a OPG

Para a OPG, o grupo para o qual foi observada a maior porcentagem de imunomarcação foi o sham/dl cujos valores médios foram bastante próximos do sham/iso. Os grupos sham/dl e sham/iso não foram estatisticamente diferentes entre si, mas foram diferentes de todos os outros grupos (Figura 8 e Tabela 5).

O grupo no qual foi observada a menor porcentagem de imunomarcação para a OPG foi o ovz/alc, que foi diferente estatisticamente de todos os outros grupos experimentais (Figura 8 e Tabela 5).

Todos os grupos ovariectomizados apresentaram menor porcentagem de imunomarcação para a OPG, se comparados aos seus respectivos controles, e essas diferenças foram estatisticamente significativas. O ovz/alc foi diferente do sham/alc ($p < 0,05$); o ovz/iso foi

diferente do sham/iso ($p < 0,05$) e o ovz/dl foi diferente do sham/dl ($p < 0,01$) (Figura 8 e Tabela 5).

O grupo sem deficiência estrogênica que recebeu álcool (sham/alc) apresentou menor imunomarcção para a OPG quando comparado aos demais grupos sham e essas diferenças foram estatisticamente significativas. O grupo sham/alc foi diferente tanto do sham/iso ($p < 0,01$) quanto do sham/dl ($p < 0,01$) (Figura 8 e Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da análise da porcentagem de imunomarcção para a OPG: comparações estatísticas entre os grupos (valores de p)

	ovz/alc	ovz/iso	ovz/dl	sham/alc	sham/iso
ovz/iso	<0,05*				
ovz/dl	<0,05*	NS			
sham/alc	<0,05*	NS	NS		
sham/iso	<0,001***	<0,05*	<0,01**	<0,01**	
sham/dl	<0,001***	<0,05*	<0,01**	<0,01**	NS

NS - $p > 0.05$ - valores não significativos.

* $p < 0.05$ - valores significativos.

** $p < 0.01$ - valores muito significativos.

*** $p < 0.001$ - valores extremamente significativos.

4.2.2 Porcentagem de imunomarcção para o RANKL

Para o RANKL, o grupo para o qual foi observada a maior porcentagem de imunomarcção foi o ovz/alc, o qual foi estatisticamente diferente da maioria dos outros grupos experimentais, com exceção do ovz/iso e do sham/alc (Figura 8 e Tabela 6).

O grupo no qual foi observada a menor porcentagem de imunomarcção para o RANKL foi o sham/iso, que foi diferente

estatisticamente da maioria dos outros grupos experimentais, com exceção do sham/dl e do ovz/dl.

Quando considerados apenas os valores médios, todos os grupos ovariectomizados apresentaram maior porcentagem de imunomarcção para o RANKL, se comparados os seus respectivos controles, no entanto isto não foi estatisticamente significativo para todos os grupos. Assim sendo, o grupo ovz/iso foi estatisticamente diferente do sham/iso ($p < 0,01$), porém, o grupo ovz/alc não foi estatisticamente diferente do sham/alc e o grupo ovz/dl não foi estatisticamente diferente do sham/dl (Figura 8 e Tabela 6).

O grupo sem deficiência estrogênica que recebeu álcool (sham/alc) apresentou maior imunomarcção para o RANKL quando comparado aos demais grupos sham e essas diferenças foram significativas. O grupo sham/alc foi diferente tanto do sham/iso ($< 0,001$) quanto do sham/dl ($< 0,001$). (Figura 8 e Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da análise da porcentagem de imunomarcção para o RANKL: comparações estatísticas entre os grupos (valores de p)

	ovz/alc	ovz/iso	ovz/dl	sham/alc	sham/iso
ovz/iso	NS				
ovz/dl	$< 0,01^{**}$	NS			
sham/alc	NS	NS	NS		
sham/iso	$< 0,001^{***}$	$< 0,01^{**}$	NS	$< 0,001^{***}$	
sham/dl	$< 0,001^{***}$	$< 0,01^{**}$	NS	$< 0,001^{***}$	NS

NS - $p > 0.05$ - valores não significativos.

* $p < 0.05$ - valores significativos.

** $p < 0.01$ - valores muito significativos.

*** $p < 0.001$ - valores extremamente significativos.

4.3 Resultados da imunomarcção para células ósseas

Os resultados referentes às médias ($\pm$ desvio padrão) do número de células ósseas imunomarcadas, por grupo experimental, na região do ápice da crista óssea alveolar, estão representados na tabela 7.

Tabela 7 - Médias ($\pm$ desvio padrão) do número de células ósseas imunomarcadas, por grupo experimental, na região do ápice da crista óssea alveolar

	osteoblastos	osteócitos	osteoclastos	Total
OPG - ovz/alc	1,17 $\pm$ 1,17	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,17 $\pm$ 1,17
OPG - ovz/iso	4,43 $\pm$ 2,30	0,14 $\pm$ 0,38	0,00 $\pm$ 0,00	4,57 $\pm$ 2,37
OPG - ovz/dl	2,50 $\pm$ 1,76	0,33 $\pm$ 0,52	0,17 $\pm$ 0,41	3,00 $\pm$ 1,90
OPG - sham/alc	2,57 $\pm$ 1,99	1,29 $\pm$ 1,25	0,14 $\pm$ 0,38	4,00 $\pm$ 3,21
OPG - sham/iso	6,43 $\pm$ 1,99	0,57 $\pm$ 1,13	0,14 $\pm$ 0,38	7,14 $\pm$ 2,61
OPG - sham/dl	6,14 $\pm$ 1,95	0,43 $\pm$ 0,53	0,14 $\pm$ 0,38	6,71 $\pm$ 2,14
RANKL - ovz/alc	14,71 $\pm$ 2,98	1,29 $\pm$ 0,49	0,57 $\pm$ 0,79	16,57 $\pm$ 2,82
RANKL - ovz/iso	9,00 $\pm$ 2,10	2,50 $\pm$ 2,88	0,50 $\pm$ 0,84	12,00 $\pm$ 4,65
RANKL - ovz/dl	9,00 $\pm$ 4,12	2,29 $\pm$ 4,03	0,14 $\pm$ 0,38	11,43 $\pm$ 5,13
RANKL - sham/alc	10,86 $\pm$ 4,30	2,71 $\pm$ 2,14	0,14 $\pm$ 0,38	13,71 $\pm$ 5,41
RANKL - sham/iso	2,71 $\pm$ 1,11	0,43 $\pm$ 0,53	0,14 $\pm$ 0,38	3,29 $\pm$ 0,95
RANKL - sham/dl	3,50 $\pm$ 1,97	0,67 $\pm$ 0,82	0,17 $\pm$ 0,41	4,33 $\pm$ 2,58

Para a OPG, diversas células consideradas como osteoblastos (células uninucleares em íntimo contato com a superfície da crista óssea alveolar) estavam imunomarcadas e essa imunomarcção foi mais frequente nos grupos sem deficiência estrogênica que não receberam dieta alcoólica (sham/iso, seguido pelo sham/dl) (Figura 9 e

Tabela 7). Diversos osteócitos (células aprisionadas na matriz óssea) foram observados na região do ápice da crista óssea alveolar, porém a grande maioria não apresentou imunomarcção para a OPG (Figura 9 e Tabela 7). Raras células consideradas como osteoclastos (células multinucleares em íntimo contato com a superfície da crista óssea alveolar) foram observadas, sendo que algumas delas apresentaram imunomarcção para a OPG (Figura 10 e Tabela 7).

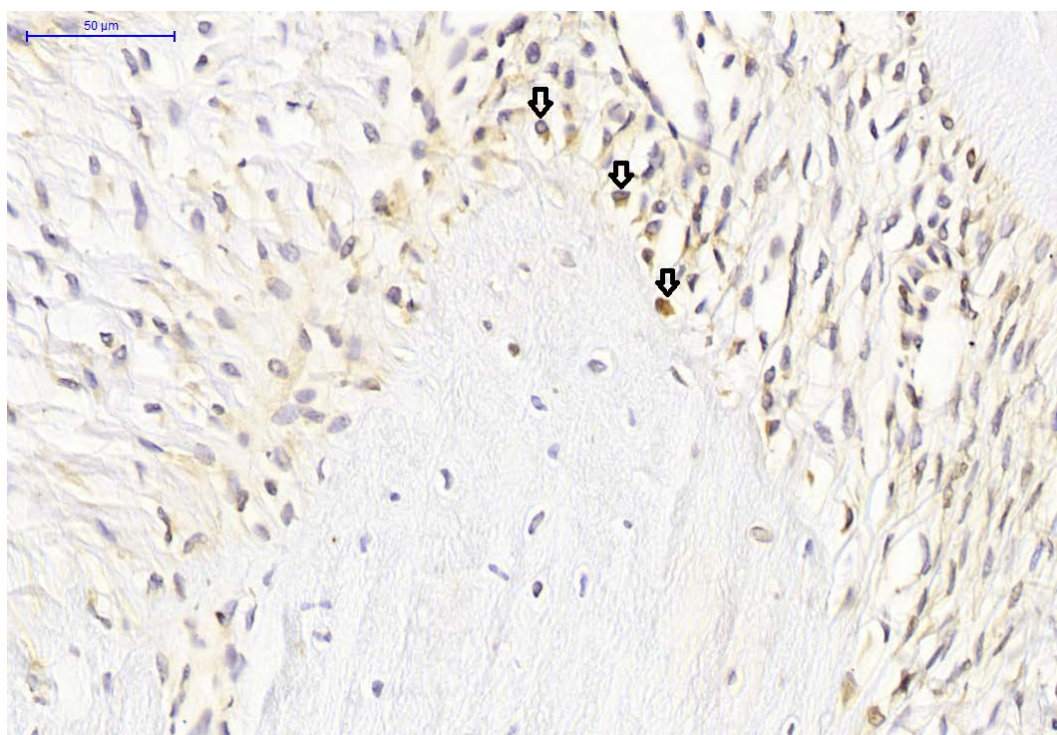


Figura 9 - Alguns exemplos de células consideradas como osteoblastos (setas), imunomarcadas para a OPG. Observar que os osteócitos, células aprisionadas na matriz óssea, são frequentemente encontrados na região da crista óssea alveolar, porém a imunomarcção para a OPG foi raramente encontrada (sham/iso - OPG).

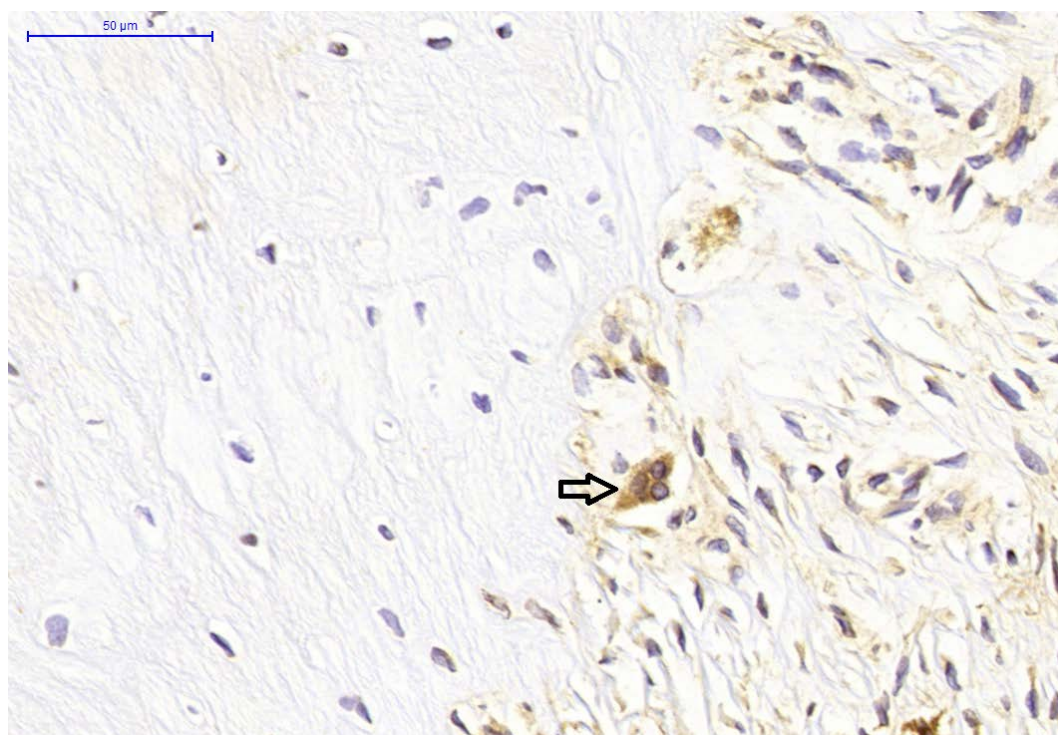


Figura 10 - Célula multinuclear imunomarcada para a OPG, considerada como osteoclasto (sham/iso - OPG).

Para a OPG, em relação ao número total de células ósseas imunomarcadas, os grupos para os quais houve maior imunomarcacão foram os sem deficiência estrogênica que não receberam dieta alcoólica (sham/iso, seguido do sham/dl). O grupo para o qual houve menor imunomarcacão foi o ovz/alc. Nos grupos ovariectomizados houve menor imunomarcacão para a OPG que nos seus respectivos controles (ovz/iso < sham/iso, ovz/dl < sham/dl e ovz/alc < sham/alc). No grupo sham/alc houve menos imunomarcacão para OPG que nos demais grupos sham (sham/alc < sham/dl < sham/iso) (Tabela 7).

Para o RANKL, diversas células consideradas como osteoblastos estavam imunomarcadas, sendo mais frequente nos grupos com dieta alcoólica (ovz/alc seguido pelo sham/alc) (Figura 11 e Tabela 7). De maneira geral, a imunomarcacão de células consideradas como osteócitos foi mais frequente para o RANKL, que para a OPG. Para o

RANKL, a maior imunomarcção para osteócitos foi encontrada no grupo sham/alc e a menor no grupo sham/iso (Figura 11 e Tabela 7). Raras células consideradas como osteoclastos foram observadas, sendo que algumas delas apresentaram imunomarcção para a RANKL (Figura 12 e Tabela 7). É interessante notar que a maior quantidade de osteoclastos imunomarcados para o RANKL foi observada no grupo ovariectomizado que recebeu dieta alcoólica (ovz/alc).

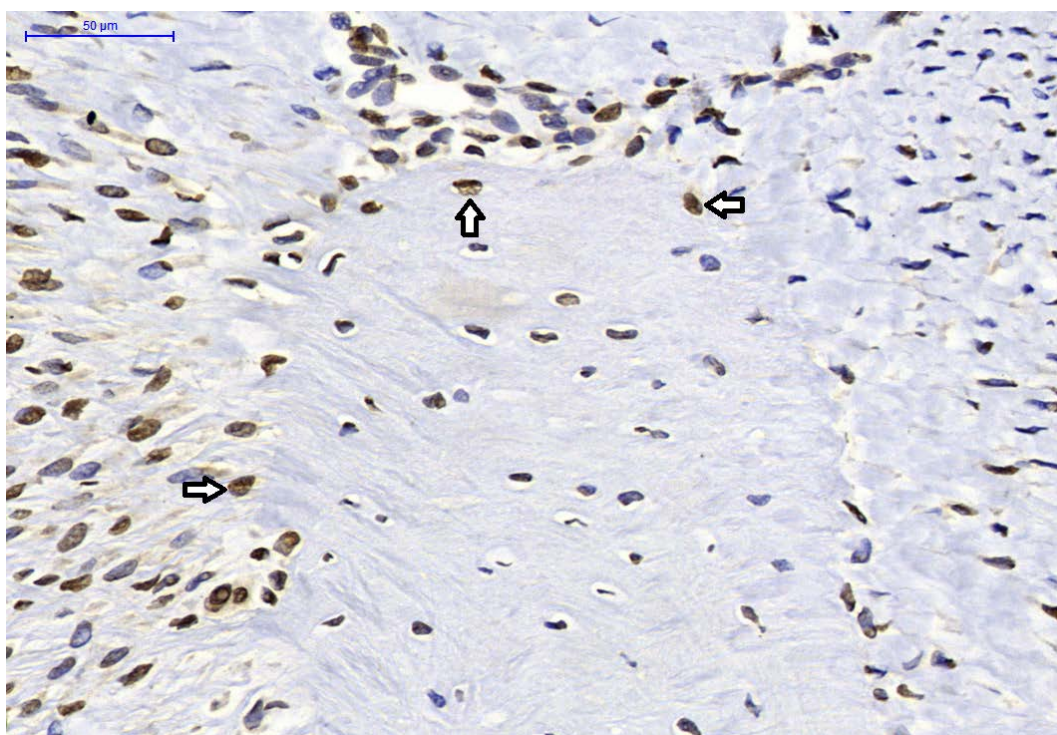


Figura 11 - Exemplos de imunomarcção para o RANKL em células consideradas como osteoblastos (setas horizontais) e osteócito (seta vertical) (sham/alc - RANKL).

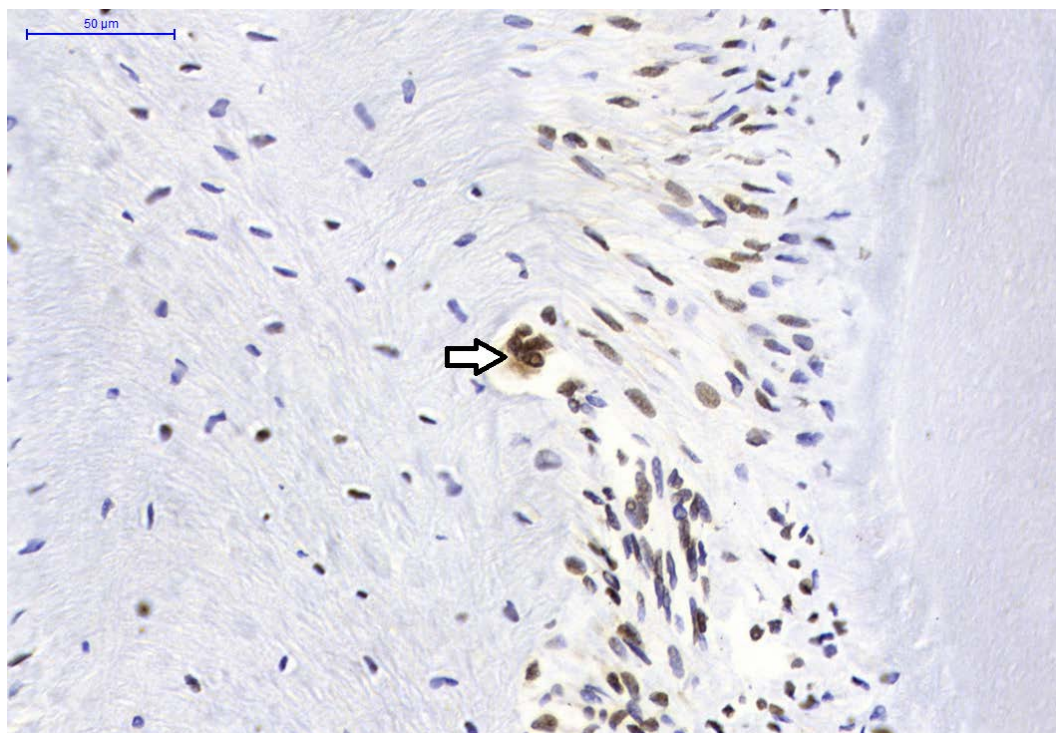


Figura 12 - Célula multinuclear, considerada como osteoclasto imunomarcada para o RANKL (ovz/iso - RANKL).

Para o RANKL, em relação ao número total de células ósseas imunomarcadas, os grupos para os quais houve maior imunomarcação foram aqueles submetidos à dieta alcoólica (ovz/alc, seguido do sham/alc). Por outro lado, a menor imunomarcação foi observada nos grupos sem deficiência estrogênica que não receberam dieta alcoólica (sham/iso seguido pelo sham/dl). Nos grupos ovariectomizados houve maior imunomarcação que nos seus respectivos controles (ovz/iso > sham/iso, ovz/dl > sham/dl e ovz/alc > sham/alc). No grupo sham/alc houve maior imunomarcação que nos demais grupos sham (sham/alc > sham/dl > sham/iso).

4.4 Resultados da imunomarcção de fibroblastos e células inflamatórias

Essas avaliações foram realizadas de forma semiquantitativa, utilizando uma escala numérica de 0 a 3, conforme descrito no capítulo Material e Métodos. Os resultados podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8 - Análise semiquantitativa (escala de 0 a 3) da quantidade de fibroblastos e células inflamatórias imunomarcadas

	fibroblastos (escala de 0-3)	células inflamatórias (escala de 0-3)
OPG - ovz/alc	1,00	0,29
OPG - ovz/iso	2,00	0,57
OPG - ovz/dl	1,43	0,71
OPG - sham/alc	1,57	0,71
OPG - sham/iso	2,29	1,14
OPG - sham/dl	2,43	1,00
RANKL - ovz/alc	2,21	2,21
RANKL - ovz/iso	1,93	2,00
RANKL - ovz/dl	1,86	1,79
RANKL - sham/alc	1,71	1,79
RANKL - sham/iso	0,93	1,07
RANKL - sham/dl	1,21	1,29

Para os fibroblastos, em lâminas nas quais foi avaliada a imunomarcção para OPG, o grupo cujos valores foram mais altos foram os sem deficiência estrogênica que não receberam álcool (sham/dl,

seguido pelo sham/iso). O grupo para o qual os valores foram menores foi o ovz/alc. Nos grupos ovariectomizados os valores foram menores, se comparados aos seus respectivos controles (ovz/iso < sham/iso, ovz/dl < sham/dl e ovz/alc < sham/alc). No grupo sham/alc os valores foram menores que nos demais grupos sham (sham/alc < sham/iso < sham/dl) (Tabela 8). Tanto os fibroblastos do tecido conjuntivo gengival quanto os do ligamento periodontal foram observados imunomarcados para a OPG. No entanto, deve-se considerar que a maior quantidade de imunomarcção foi observada nos fibroblastos do ligamento periodontal. A Figura 13 mostra uma grande quantidade de células consideradas como fibroblastos (alongadas, de aspecto fusiforme) imunomarcadas para a OPG na região do ligamento periodontal.

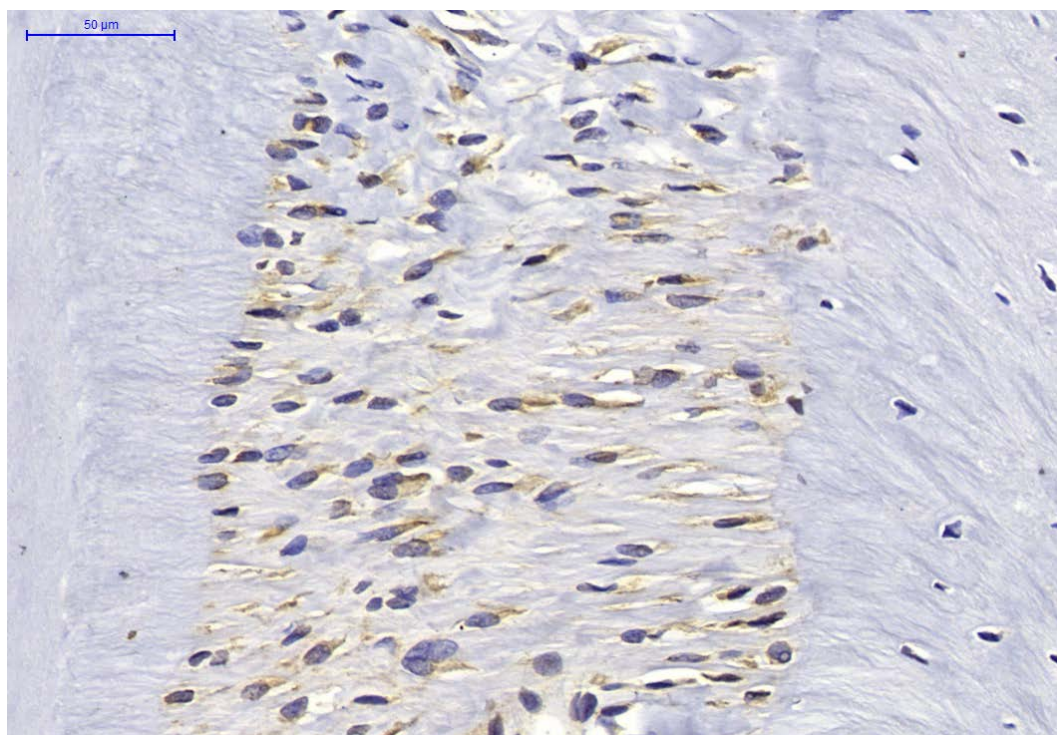


Figura 13 - Grande quantidade de células consideradas como fibroblastos (alongadas, de aspecto fusiforme), imunomarcadas para a OPG, na região do ligamento periodontal (ovz/iso - OPG).

Houve pouca imunomarcção de células inflamatórias para a OPG, o que foi refletido por baixos valores numéricos na análise semiquantitativa. Os grupos cujos valores foram mais altos foram os sem deficiência estrogênica que não receberam dieta alcoólica (sham/iso, seguido pelo sham/dl). O grupo para o qual os valores foram menores foi o ovz/alc. Nos grupos ovariectomizados os valores foram menores, se comparados aos seus respectivos controles (ovz/iso < sham/iso, ovz/dl < sham/dl e ovz/alc < sham/alc). No grupo sham/alc os valores foram menores que nos demais grupos sham (sham/alc < sham/dl < sham/iso) (Tabela 8).

Para os fibroblastos, em lâminas nas quais foi avaliada a imunomarcção para RANKL, o grupo cujos valores foram mais altos foi o ovz/alc. Os menores valores foram encontrados nos grupos sem deficiência estrogênica que não receberam dieta alcoólica (sham/iso, seguido pelo sham/dl). Nos grupos ovariectomizados os valores foram maiores, se comparados aos seus respectivos controles (ovz/iso > sham/iso, ovz/dl > sham/dl e ovz/alc > sham/alc). No grupo sham/alc os valores foram maiores que nos demais grupos sham (sham/alc > sham/dl > sham/iso) (Tabela 8). Tanto os fibroblastos do tecido conjuntivo gengival quanto os do ligamento periodontal foram observados imunomarcados para a RANKL. No entanto, deve-se considerar que a maior quantidade de imunomarcção foi observada em fibroblastos do ligamento periodontal.

Para as células inflamatórias, em lâminas nas quais foi avaliada a imunomarcção para o RANKL, o grupo com valores mais altos foi o ovz/alc. Os grupos com valores mais baixos foram os sem deficiência estrogênica que não receberam dieta alcoólica (sham/iso, seguido pelo sham/dl). Nos grupos ovariectomizados os valores foram maiores, se comparados aos seus respectivos controles (ovz/iso > sham/iso, ovz/dl > sham/dl e ovz/alc > sham/alc). No grupo sham/alc os valores foram maiores que nos demais grupos sham (sham/alc > sham/dl > sham/iso) (Tabela 8). Houve maior imunomarcção de células

inflamatórias para o RANKL, se comparada à OPG. A Figura 14 mostra o tecido conjuntivo gengival com diversas células inflamatórias imunomarcadas para o RANKL.

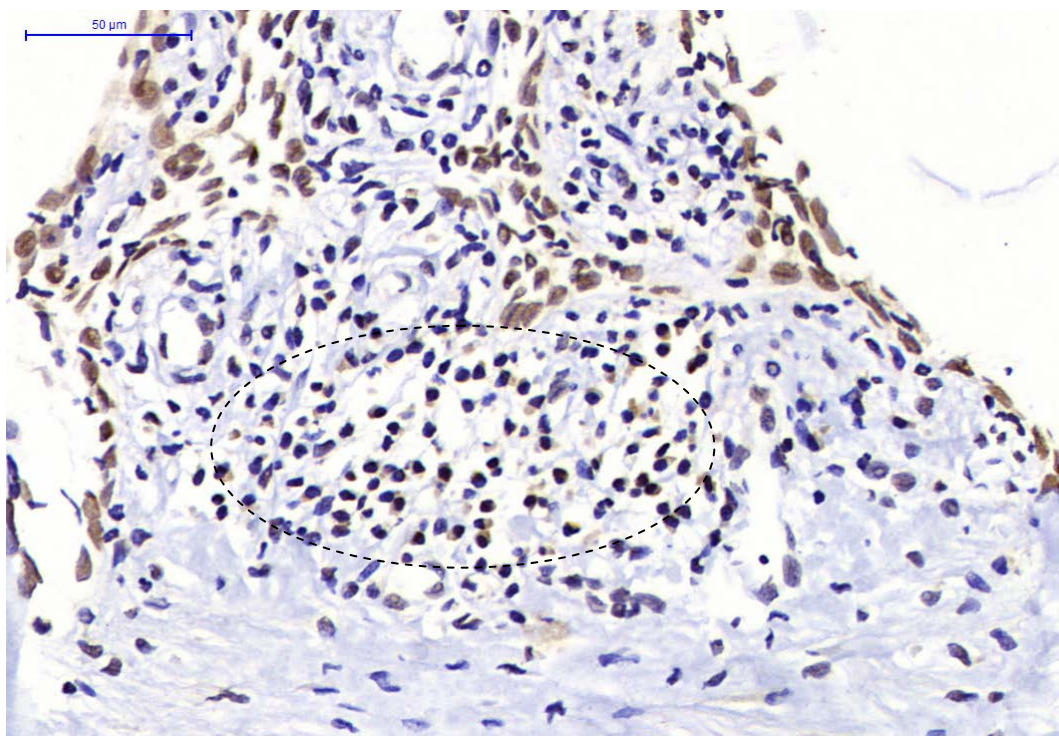


Figura 14 - Na área em destaque, podem ser visualizadas diversas células inflamatórias imunomarcadas para o RANKL (ovz/alc - RANKL).

5 DISCUSSÃO

A análise estatística da imunomarcção (%) para a OPG mostrou resultados importantes. Tanto a deficiência estrogênica, quanto o consumo de álcool, foram associados a uma diminuição da porcentagem de imunomarcção para a OPG. Os grupos ovariectomizados apresentaram significativamente menor porcentagem de imunomarcção para a OPG, se comparados os seus respectivos controles. Por outro lado, o grupo sem deficiência estrogênica que recebeu álcool (sham/alc) apresentou significativamente menor imunomarcção para a OPG quando comparado aos demais grupos sham. Esses resultados estão de acordo com o que seria esperado na hipótese inicial deste experimento. Deve-se considerar que tanto a deficiência estrogênica (Lerner, 2006a; Lupsa, Insogna, 2015), quanto o consumo de álcool (Maurel et al., 2012; Mikosch, 2014) são considerados possíveis fatores de risco para a osteoporose. Baixos níveis de OPG podem diminuir a proteção contra a perda óssea, aumentando o risco de reabsorção óssea e de osteoporose. Por outro lado, níveis elevados OPG inibem a osteoclastogênese (Lerner, 2006a; Walsh, Choi, 2014; Nagy, Penninger, 2015). Em estudos com animais, o tratamento com injeções intraperitoniais de OPG reduziu a perda óssea trabecular no fêmur de camundongos ovariectomizados, prejudicando a atividade de osteoclastos (Shimizu-Ishiura et al., 2002). Em outro estudo, injeções intraperitoniais de OPG inibiram a osteoclastogênese induzida pelo consumo de álcool e promoveram a proliferação de osteoblastos, no fêmur de camundongos (Zhang et al., 2002).

Na análise da imunomarcção para o RANKL (%) foi observado que o grupo sham/alc apresentou maior imunomarcção se

comparado aos demais grupos sham que não receberam álcool (sham/iso e sham/dl) e que esses resultados foram estatisticamente significativos, sugerindo que o álcool possa estar relacionado a um aumento da expressão de RANKL, o que também foi observado em outros estudos (Chen JR et al., 2008; Callaci et al., 2009).

Ainda em relação à análise da imunomarcção (%) para o RANKL também foi observado que, quando considerados apenas os valores médios, todos os grupos ovariectomizados apresentaram maior porcentagem de imunomarcção, se comparados os seus respectivos controles, porém não houve diferença estatística para todos os grupos. Houve diferença significativa apenas entre o grupo com deficiência estrogênica que recebeu dieta isocalórica (ovz/iso) e o grupo sem deficiência estrogênica que recebeu o mesmo tipo de dieta (sham/iso). Isso está parcialmente de acordo com a hipótese inicial deste experimento (para o qual se esperava que a ovariectomia aumentasse a expressão de RANKL).

Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos ovz/alc e sham/alc, nem entre os grupos ovz/dl e sham/dl, na avaliação da imunomarcção (%) para o RANKL. Esses resultados, se avaliados isoladamente, não estariam de acordo com a hipótese inicial deste trabalho, mediante a qual a ovariectomia estaria associada a um aumento significativo da expressão de RANKL. No entanto, uma possível explicação para isso pode estar em uma análise mais detalhada do tratamento dietético. Em relação aos grupos álcool, deve-se considerar que o grupo sham/alc ingeriu significativamente mais solução alcoólica que o grupo ovz/alc ($p < 0,001$) (Figura 7 e Tabela 1). Considerando que tanto o álcool (Chen JR et al., 2008; Callaci et al., 2009) quanto a deficiência estrogênica (Lerner, 2006a) estejam relacionados a um aumento nos níveis de RANKL (conforme a hipótese inicial deste estudo), pode-se supor que o maior consumo de álcool por parte do grupo sham/alc possa ter tornado a diferença entre os dois grupos (sham/alc e

ovz/alc) não significativa. Em relação aos grupos com dieta livre, poderia-se considerar o fato do grupo ovz/dl ter ingerido uma quantidade significativamente maior de ração se comparado ao grupo sham/dl ($p<0,01$), promovendo um maior aumento da incidência de forças mastigatórias no grupo ovz/dl. Um estudo prévio sugere que forças mecânicas geradas pela incidência de forças da mastigação podem parcialmente proteger o osso alveolar de possíveis efeitos nocivos da deficiência de estrogênio (Mavropoulos et al., 2014). Isso poderia, teoricamente, explicar porque o grupo ovz/dl não apresentou uma expressão de RANKL significativamente maior que o sham/dl.

Considerando a discussão acima descrita, os resultados do presente experimento sugerem que a ovariectomia teve um papel importante na elevação dos níveis de RANKL. Essa afirmativa está baseada no aumento da expressão de RANKL, com diferença estatística, quando os grupos isocalóricos ovz e sham foram comparados, já que na comparação entre esses grupos não houve influência significativa no consumo de álcool ou ração.

Outra consideração importante a ser feita, em relação ao RANKL, está no tipo de anticorpo utilizado. Para este estudo, optou-se pela utilização de um anticorpo com especificidade pelo RANKL ligado à membrana. A escolha desse anticorpo foi baseada no fato de que o RANKL ligado à membrana parece ser mais eficiente na indução da perda óssea se comparado ao RANKL na forma solúvel (Nakashima et al., 2000; Walsh, Choi, 2014).

No presente estudo, em todas as análises realizadas (porcentagem de imunomarcção, número total de células ósseas imunomarcadas e avaliação da imunomarcção de fibroblastos e células inflamatórias), os grupos sem deficiência estrogênica que não receberam álcool (sham/iso e sham/dl) apresentaram as maiores marcações para a OPG e as menores para o RANKL. Por outro lado, o grupo no qual a dieta alcoólica foi associada à deficiência estrogênica (ovz/alc) apresentou a

menor imunomarcção para a OPG e a maior imunomarcção para o RANKL, sugerindo um efeito negativo da associação entre deficiência estrogênica e consumo de álcool. Aumentos dos níveis de RANKL, concomitantemente à diminuição da OPG, estão associados a uma maior quantidade de RANKL disponível para a ligação com o RANK, favorecendo a osteoclastogênese e consequentemente a perda óssea (Clarke, 2008; Walsh, Choi, 2014; Nagy, Penninger, 2015). É interessante notar que no grupo ovz/alc também foi encontrado o maior número médio de osteoclastos marcados para o RANKL, o que pode sugerir uma tendência em favor da reabsorção. Em relação à análise estatística da porcentagem de imunomarcção, para a OPG, o grupo ovz/alc foi diferente estatisticamente de todos os outros grupos experimentais e para o RANKL, a diferença ocorreu para a maioria dos grupos, incluindo ambos os grupos sem deficiência estrogênica que não consumiram álcool (sham/iso e sham/dl). Estudos prévios em vértebras (Callaci et al., 2006), fêmur (Deco et al., 2011; Lodi et al., 2016) e tecidos periodontais (Marchini et al., 2012; Alonso et al., 2016) também observaram efeitos negativos da associação entre deficiência estrogênica e consumo de álcool, em animais. Marchini et al. (2012), verificaram um decréscimo da relação cálcio/fósforo, na região do ápice da crista óssea alveolar (mesma região avaliada no presente estudo), quando a deficiência estrogênica foi associada ao consumo de álcool. Alonso et al. (2016) verificaram um aumento da severidade do processo inflamatório bem como desorientação das fibras do ligamento periodontal, quando a deficiência estrogênica e consumo de álcool foram associados. É interessante notar que, em ambos os estudos que avaliaram a região periodontal (Marchini et al., 2012; Alonso et al., 2016), os resultados acima descritos foram obtidos sem a necessidade de indução de periodontite experimental.

No presente experimento, uma diminuição da quantificação da OPG e um aumento do RANKL foram observados nos tecidos periodontais, quando o álcool foi associado à deficiência

estrogênica, em animais. Esses resultados são relevantes, uma vez que os fatores estudados estão associados a um aumento da susceptibilidade a uma progressão mais rápida da doença periodontal (Lerner, 2006b; Amaral et al., 2009; Genco, Borgnakke, 2013). Em um estudo em humanos, Hassan et al. (2015) verificaram uma diminuição na expressão de OPG, no fluído crevicular gengival, saliva e tecidos gengivais em indivíduos com doença periodontal. Em outro estudo, altos níveis de RANKL e baixos níveis de OPG foram previamente observados em indivíduos com doença periodontal (Crotti et al., 2003).

A expressão de RANKL e OPG são importantes determinantes da integridade do esqueleto e da massa óssea (Boyce, Xing, 2007). No entanto, a expressão dessas proteínas não é restrita as células do tecido ósseo e uma grande diversidade de tipos celulares podem expressar RANKL e OPG. Nos tecidos periodontais, a expressão imunoistoquímica de RANKL e OPG pode ser visualizada em vários tipos de células como, por exemplo, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células inflamatórias, fibroblastos e células endoteliais (Luvizuto et al., 2011; Sağlam et al., 2015; Gennaro et al., 2015). Por esse motivo, para este estudo, o ápice da crista óssea alveolar foi inicialmente avaliado mediante a utilização de um programa computacional, que possibilita uma estimativa geral da área imunomarcada, sem levar em consideração o tipo celular. Posteriormente, algumas células foram avaliadas individualmente.

Em relação aos tipos celulares imunomarcados para OPG e RANKL foi observado que todos os tipos celulares avaliados neste estudo (osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, células inflamatórias e fibroblastos) apresentaram imunomarcção para ambos os anticorpos. Esses mesmos tipos celulares foram encontrados imunoistoquimicamente marcados para OPG e RANKL em outros trabalhos que avaliaram os tecidos periodontais (Luvizuto et al., 2011; Sağlam et al., 2015; Gennaro et al., 2015).

Foram consideradas como osteoblastos, as células uninucleares em íntimo contato com a crista óssea alveolar. Essas células são importantes fontes de RANKL e OPG, não só pela frequência com que expressam essas proteínas (no presente estudo, considerando apenas as células ósseas, os osteoblastos foram os que mais expressaram RANKL e OPG), como também pela proximidade física com o tecido ósseo, o que realça a importância dessas células no processo de regulação do metabolismo ósseo (Kearns et al., 2008).

Em relação aos osteócitos, a literatura relata que a expressão de RANKL e OPG pode ser uma importante maneira pela qual essas células contribuem para regular o processo de reabsorção óssea. Portanto, a ideia de que os osteócitos representam apenas o destino final dos osteoblastos, que ficaram aprisionados na matriz óssea, está atualmente ultrapassada. (Xiong, O'Brien, 2012; Bellido, 2014; Capulli et al., 2014).

No que se refere aos osteoclastos, a expressão de RANKL pode ser facilmente explicada pela sua afinidade com o receptor RANK, presente na superfície de células precursoras de osteoclastos (Grimaud et al., 2003; Clarke, 2008; Walsh, Choi, 2014). Por outro lado, a expressão de OPG em osteoclastos, pode ser mais difícil de entender, já essas células são responsáveis pelo processo de reabsorção óssea e a OPG é uma proteína que protege contra a perda óssea. Uma possível explicação para isso pode estar associada ao fato de que a expressão de OPG por osteoclastos poderia estar relacionada a um aumento da indução da apoptose de osteoclastos (Kang et al., 2014, Liu et al., 2015). Isso ajudaria a entender o efeito protetor da OPG contra a perda óssea, mesmo quando observada em osteoclastos.

No presente estudo, a imunomarcagem para células inflamatórias foi mais raramente encontrada para a OPG, se comparada ao RANKL. A expressão de RANKL em células inflamatórias merece uma consideração especial, já que células inflamatórias têm sido consideradas

como fontes primárias de RANKL em caso de problemas periodontais (Kawai et al., 2006; Chen B et al., 2014). Na doença periodontal, a presença de bactérias periodontopatogênicas gera uma resposta inflamatória do hospedeiro, a qual pode aumentar a expressão de diversas citocinas osteoclastogênicas como, por exemplo, o RANKL. Isso estimula o desenvolvimento e atividade de osteoclastos, gerando perda do osso alveolar num processo no qual a inflamação induz à osteólise (Lerner, 2006b; Di Benedetto et al., 2013).

Os fibroblastos, especialmente os presentes no ligamento periodontal, foram frequentemente imunomarcados, tanto para a OPG quanto para o RANKL. Fibroblastos do ligamento periodontal podem desempenhar um papel relevante na remodelação do osso alveolar e o sistema RANK/RANKL/OPG é considerado crucial nesse processo. Fibroblastos do ligamento periodontal produzem primariamente OPG, a qual tem um importante papel na inibição da osteoclastogênese. No entanto, essas células também podem contribuir para a formação e ativação de osteoclastos mediante a expressão de RANKL, especialmente quando são associados estímulos bacterianos ou aplicação de cargas mecânicas, como acontece na periodontite ou na movimentação ortodôntica (Sokos et al., 2015).

Para que se tenha uma ideia da importância do RANKL e da OPG no controle dos processos de reabsorção óssea, um anticorpo monoclonal inibidor de RANKL (liberado para uso em humanos), que mimetiza a ação da OPG, tem sido recentemente utilizado no tratamento de algumas doenças que afetam o metabolismo ósseo, como a osteoporose. Apesar de ser um medicamento relativamente novo, os resultados têm sido bastante promissores e, em alguns casos, substitui o tradicional tratamento com bifosfonatos. O papel terapêutico de inibidores de RANKL ressalta, de forma adicional, a importância do RANKL e da OPG em patologias ósseas (Schieferdecker et al., 2014; Min, 2015).

No presente estudo, tanto o consumo de álcool quanto a ovariectomia, diminuíram a expressão de OPG nos tecidos periodontais. Futuros estudos poderiam verificar se esses efeitos poderiam ser revertidos com utilização de medicamentos que mimetizam a ação da OPG.

A análise do tratamento dietético também mostrou alguns resultados importantes. O grupo ovariectomizado com dieta livre ganhou mais peso e ingeriu a maior quantidade de ração, diferindo significativamente de todos os outros grupos experimentais.

Aumentos no ganho de peso devido à ovariectomia também foram encontrados em outros estudos (Marchini et al., 2012, 2014; Yang et al., 2016). Em mulheres, as alterações hormonais, devido à menopausa, podem estar associadas com excesso de peso e obesidade (Brończyk-Puzoń et al., 2015). Em animais knockout, a ausência dos receptores de estrógeno tipo alfa foi relacionada à hiperplasia e hipertrofia de adipócitos, tanto em machos quanto em fêmeas (Heine et al., 2000). Uma possível explicação para a maior ingestão de alimentos no grupo ovariectomizado com dieta livre pode estar relacionada à influência do estrógeno em regiões responsáveis controle do apetite no hipotálamo. Acredita-se que a presença de estrogênio possa diminuir o apetite e que sua ausência aumente a ingestão de alimentos (Frank et al., 2014).

Apesar dos grupos com dieta alcoólica terem tido livre acesso à ração, eles ingeriram uma quantidade significativamente menor se comparados aos grupos com dieta livre. Deve ser ressaltado que o álcool é uma substância com alto valor calórico (7,1 Kcal/g), mas baixa qualidade nutricional. Assim, o animal substitui alimentos nutricionalmente importantes pelo álcool, já que esse gera uma sensação de saciedade (Lieber, 2000). No presente experimento, para controlar a influência dessa variável, foram utilizados grupos isocalóricos, para os quais foi oferecida uma dieta com uma quantidade de calorias semelhante à ingerida pelos

grupos álcool. Deve-se considerar que uma adequada nutrição é importante para a manutenção da qualidade óssea (Kueper et al., 2015).

Os problemas nutricionais relacionados ao consumo de álcool não se resumem apenas à redução do aporte de alimentos. Os efeitos do alcoolismo sobre o estado nutricional são complexos e a redução do aporte de alimentos é apenas uma das variáveis envolvidas. Há diversas outras variáveis que não puderam ser controladas no presente estudo. Por exemplo, o alcoolismo pode alterar as funções gastrointestinais normais, prejudicando a absorção e digestão de nutrientes (Lieber, 2000; Moreno Otero, Cortes, 2008). Adicionalmente, o consumo excessivo de álcool tem sido associado a um decréscimo dos níveis séricos de vitamina D (Alvisa-Negrin et al., 2009). A vitamina D é importante para a absorção intestinal de cálcio e incorporação deste elemento químico no osso. A deficiência de vitamina D diminui a qualidade óssea e aumenta o risco de osteoporose (Carmeliet et al., 2015). Segundo Cauley (2015) a associação entre deficiência de hormônios esteróides sexuais e baixos níveis de Vitamina D, aumenta o risco de fraturas ósseas. No presente estudo, a deficiência de hormônios sexuais (por ovariectomia) foi uma das variáveis analisadas. Além disso, o consumo de álcool sobrecarrega o sistema hepático, o que afeta o metabolismo normal de alimentos nutricionalmente importantes (Moreno Otero, Cortes, 2008; Cederbaum, 2012). Devido aos seus efeitos tóxicos, o álcool não pode ser armazenado pelo organismo, como acontece com gorduras e carboidratos, sofrendo metabolização preferencial se comparado a outros nutrientes (Schutz, 2000; Cederbaum, 2012).

Nos animais dos grupos álcool, os resultados mostraram que 53,49% das calorias diárias da dieta foram provenientes do álcool. Estudos prévios realizados com metodologia semelhante, utilizando dietas nas quais foram administradas soluções alcoólicas a 20% verificaram que 37,83% (Marchini et al., 2012), 44,5% (Marchini et al., 2014) e 46,87% (Carvalho et al., 2016) das calorias diárias da dieta eram provenientes do

álcool. Essas comparações sugerem que existem diferenças na ingestão de álcool, quando utilizados diferentes grupos de animais, mostrando a importância de mensurar o consumo de álcool a cada experimento. Deve-se considerar que o consumo de álcool a valores superiores a 10% dos requerimentos diários de energia já pode ser considerado um consumo excessivo (Gaddini et al., 2016). Levando em consideração essa premissa pode-se considerar que os animais do presente estudo foram submetidos a um consumo excessivo de álcool. Os efeitos adversos do álcool sobre os ossos são normalmente observados no consumo excessivo e não no moderado (Maurel et al., 2012; Mikosch, 2014; Gaddini et al., 2016).

Este estudo tem algumas limitações. Em primeiro lugar é preciso considerar que a imunolocalização das proteínas analisadas foi feita utilizando-se solução de diaminobenzidina como cromógeno. Apesar de essa técnica ser largamente utilizada em imunoistoquímica, deve-se considerar que a coloração acastanhada obtida mediante a utilização dessa solução, não segue a lei de Beer-Lambert. De maneira simplificada, essa lei descreve um relacionamento linear entre a concentração de um composto e a quantidade de luz que é absorvida pela amostra. Portanto a intensidade da imunomarcção não está diretamente relacionada com a concentração da substância, nem com a quantificação das moléculas em números absolutos (Van der Loos, 2008). Como não foi possível quantificar o número de moléculas de RANKL e OPG presentes nos tecidos, optou-se por não fazer o cálculo da relação RANKL/OPG. No entanto, é importante considerar que a técnica foi útil para comparar os grupos experimentais bem como observar a imunolocalização das moléculas nos tecidos. Adicionalmente, a análise computadorizada realizada no presente estudo não permitiu separar com precisão absoluta as áreas imunomarcadas das não imunomarcadas, sendo feita apenas uma estimativa da imunomarcção (%). Por outro lado, deve-se considerar que análises computadorizadas tem como vantagem o fato de

serem menos subjetivas que análises qualitativas por inspeção visual. (Rizzardi et al., 2012).

Outra limitação deste estudo está no fato de não ter sido feita a análise da quantificação sanguínea de álcool, sendo avaliado apenas o consumo. Uma análise da quantificação sanguínea de álcool (preferencialmente em diferentes momentos do tratamento) deveria ser considerada em outros estudos. É importante ressaltar que a concentração sanguínea de álcool pode variar em função do momento da ingestão (Norberg et al., 2003), além disso podem haver variações no consumo durante o tratamento (Carnicella et al., 2014). Adicionalmente deve-se considerar que os ratos consumiram solução alcoólica à vontade, num processo de autoadministração. A quantidade consumida foi calculada a partir da quantidade oferecida e da solução restante, não sendo possível controlar eventuais pequenas perdas da solução alcoólica durante o processo de ingestão.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, na região do ápice da crista óssea alveolar e tecidos adjacentes, em ratas:

- a) o consumo de álcool foi relacionado a um decréscimo na expressão imunoistoquímica de OPG e a um aumento na expressão imunoistoquímica de RANKL;
- b) a ovariectomia foi relacionada a um decréscimo na expressão imunoistoquímica de OPG (independentemente do tratamento dietético) e a um aumento na expressão imunoistoquímica de RANKL (apenas em animais tratados com dieta isocalórica);
- c) a associação entre ovariectomia e consumo de álcool foi relacionada à mais acentuada diminuição da expressão imunoistoquímica de OPG e ao mais acentuado aumento da expressão imunoistoquímica de RANKL.

Os resultados deste experimento permitiram concluir que, tanto a deficiência estrogênica quanto a dieta alcoólica, foram relacionados à diminuição da expressão de OPG e ao aumento da expressão de RANKL. Esses resultados são compatíveis com uma maior predisposição à reabsorção óssea e foram ainda mais evidentes no grupo no qual a deficiência estrogênica e o consumo de álcool foram avaliados de forma associada.

7 REFERÊNCIAS*

AlJehani YA. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. *Int J Dent*. 2014;2014:182513. doi: 10.1155/2014/182513

Alonso JMSL, Souza DM, Balducci I, Rocha RF. Periodontal inflammation induced by chronic ethanol consumption in ovariectomized rats. *Braz Dent Sci*. 2016 Jan-Mar;19(1):60-9.

Alves RC, Félix SA, Rodriguez-Archilla A, Oliveira P, Brito J, Dos Santos JM. Relationship between menopause and periodontal disease: a cross-sectional study in a Portuguese population. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Jul 15;8(7):11412-9.

Alvisa-Negrin J, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, Garcia-Valdecasas-Campelo E, Valls MR, Pelazas-Gonzalez R, et al. Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol*. 2009 Sep-Oct;44(5):468-75.

Amaral Cda S, Vettore MV, Leao A. The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *J Dent*. 2009 Sep;37(9):643-51.

Amaral Cda S, da Silva-Boghossian CM, Leao AT, Colombo AP. Evaluation of the subgingival microbiota of alcoholic and non-alcoholic individuals. *J Dent*. 2011 Nov;39(11):729-38.

Bannach SV, Teixeira FB, Fernandes LM, Ferreira RO, Santana LN, Fontes-Junior EA, et al. Alveolar bone loss induced by chronic ethanol consumption from adolescence to adulthood in Wistar rats. *Indian J Exp Biol*. 2015 Feb;53(2):93-7.

Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int*. 2014 Jan;94(1):25-34.

Blair HC, Athanasou NA. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol*. 2004 Jan;19(1):189-99.

Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1:S1.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 31 mar 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Brończyk-Puzoń A, Piecha D, Nowak J, Koszowska A, Kulik-Kupka K, Dittfeld A, et al. Guidelines for dietary management of menopausal women with simple obesity. *Prz Menopauzalny*. 2015 Mar;14(1):48-52.

Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Wezeman FH. Binge alcohol treatment increases vertebral bone loss following ovariectomy: compensation by intermittent parathyroid hormone. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006 Apr;30(4):665-72.

Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif Tissue Int*. 2009 Jun;84(6):474-84.

Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:3-12.

Carmeliet G, Dermauw V, Bouillon R. Vitamin D signaling in calcium and bone homeostasis: a delicate balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015 Aug;29(4):621-31.

Carnicella S, Ron D, Barak S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol*. 2014 May;48(3):243-52.

Carvalho IC, Dutra TP, De Andrade DP, Balducci I, Pacheco-Soares C, Rocha RF. High doses of alcohol during pregnancy cause DNA damages in osteoblasts of newborns rats. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2016 Feb;106(2):122-32.

Cauley JA. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids*. 2015 Jul;99(Pt A):11-5.

Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis*. 2012 Nov;16(4):667-85.

Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *Biomed Res Int*. 2014;2014:731039. doi: 10.1155/2014/731039

Chen JR, Shankar K, Nagarajan S, Badger TM, Ronis MJ. Protective effects of estradiol on ethanol-induced bone loss involve inhibition of reactive oxygen species generation in osteoblasts and downstream activation of the extracellular signal-regulated kinase/signal transducer and activator of transcription 3/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand signaling cascade. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Jan;324(1):50-9.

Christenson ES, Jiang X, Kagan R, Schnatz P. Osteoporosis management in post-menopausal women. *Minerva Ginecol.* 2012 Jun;64(3):181-94.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Nov;3 Suppl 3:S131-9.

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2003 Aug;38(4):380-7.

De Vries TJ, Schoenmaker T, Wattanaroonwong N, Van den Hoonaard M, Nieuwenhuijse A, Beertsen W, et al. Gingival fibroblasts are better at inhibiting osteoclast formation than periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2006 May 15;98(2):370-82.

Deco CP, da Silva Marchini AM, Barbara MA, de Vasconcellos LM, da Rocha RF, Marchini L. Negative effects of alcohol intake and estrogen deficiency combination on osseointegration in a rat model. *J Oral Implantol.* 2011 Dec;37(6):633-9.

Di Benedetto A, Gigante I, Colucci S, Grano M. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:503754. doi: 10.1155/2013/503754

Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1221-30.

Frank A, Brown LM, Clegg DJ. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. *Front Neuroendocrinol.* 2014 Oct;35(4):550-7.

Gaddini GW, Turner RT, Grant KA, Iwaniec UT. Alcohol: A Simple Nutrient with Complex Actions on Bone in the Adult Skeleton. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016 Apr;40(4):657-71.

Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013 Jun;62(1):59-94.

Gennaro G, Claudino M, Cestari TM, Ceolin D, Germino P, Garlet GP, et al. Green Tea Modulates Cytokine Expression in the Periodontium and Attenuates Alveolar Bone Resorption in Type 1 Diabetic Rats. *PLoS One.* 2015 Aug 13;10(8):e0134784. doi: 10.1371/journal.pone.0134784

Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol*. 2003 Nov;163(5):2021-31.

Hassan SH, El-Refai MI, Ghallab NA, Kasem RF, Shaker OG. Effect of periodontal surgery on osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid, saliva, and gingival tissues of chronic periodontitis patients. *Dis Markers*. 2015;2015:341259. doi: 10.1155/2015/341259

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 7;97(23):12729-34.

Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, et al. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *J Dent Res*. 2008 May;87(5):456-60.

Kang JH, Ko HM, Moon JS, Yoo HI, Jung JY, Kim MS, et al. Osteoprotegerin expressed by osteoclasts: an autoregulator of osteoclastogenesis. *J Dent Res*. 2014 Nov;93(11):1116-23.

Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006 Sep;169(3):987-98.

Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008 Apr;29(2):155-92.

Kling JM, Clarke BL, Sandhu NP. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review. *J Womens Health (Larchmt)*. 2014 Jul;23(7):563-72.

Kueper J, Beyth S, Liebergall M, Kaplan L, Schroeder JE. Evidence for the adverse effect of starvation on bone quality: a review of the literature. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:628740. doi: 10.1155/2015/628740

Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006a Jul;85(7):584-95.

Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006b Jul;85(7):596-607.

Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med.* 2000 Jan;67(1):84-94.

Liu W, Xu C, Zhao H, Xia P, Song R, Gu J, et al. Osteoprotegerin Induces Apoptosis of Osteoclasts and Osteoclast Precursor Cells via the Fas/Fas Ligand Pathway. *PLoS One.* 2015 Nov 16;10(11):e0142519. doi: 10.1371/journal.pone.0142519

Lodi KB, Marchini AMPS, Santo AME, Rode SM, Marchini L, Rocha RF. The influence of alcohol consumption in conjunction with sex hormone deficiency on Ca/P ratio in rats. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:3797139. doi: 10.1155/2016/3797139

Luo K, Ma S, Guo J, Huang Y, Yan F, Xiao Y. Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:316134. doi: 10.1155/2014/316134

Lupsa BC, Insogna K. Bone Health and Osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015 Sep;44(3):517-30.

Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol.* 2011 Oct;56(10):984-90.

Macari S, Duffles LF, Queiroz-Junior CM, Madeira MF, Dias GJ, Teixeira MM, et al. Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. *Arch Oral Biol.* 2015 Feb;60(2):333-41.

Macari S, Ajay Sharma L, Wyatt A, Knowles P, Szawka RE, Garlet GP, et al. Osteoprotective Effects of Estrogen in the Maxillary Bone Depend on ER α . *J Dent Res.* 2016 Jun;95(6):689-96.

Marchini AM, Deco CP, Lodi KB, Marchini L, Santo AM, Rocha RF. Influence of chronic alcoholism and oestrogen deficiency on the variation of stoichiometry of hydroxyapatite within alveolar bone crest of rats. *Arch Oral Biol.* 2012 Oct;57(10):1385-94.

Marchini AM, Gonçalves LL, Salgado MC, do Prado RF, Marchini L, Carvalho YR, et al. Alcoholic and isocaloric diet, but not ovariectomy, influence the apoptosis of bone cells within the alveolar bone crest of rats. *Arch Oral Biol.* 2014 Apr;59(4):424-33.

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffre C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int.* 2012 Jan;23(1):1-16.

Mavropoulos A, Kiliaridis S, Rizzoli R, Ammann P. Normal masticatory function partially protects the rat mandibular bone from estrogen-deficiency induced osteoporosis. *J Biomech*. 2014 Aug 22;47(11):2666-71.

Mikosch P. Alcohol and bone. *Wien Med Wochenschr*. 2014 Jan;164(1-2):15-24.

Min YK. Update on denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015 Mar 27;30(1):19-26.

Moreno Otero R, Cortes JR. [Nutrition and chronic alcohol abuse]. *Nutr Hosp*. 2008 May;23 Suppl 2:3-7. Spanish.

Moss HB. The impact of alcohol on society: a brief overview. *Soc Work Public Health*. 2013;28(3-4):175-7.

Nagy V, Penninger JM. The RANKL-RANK Story. *Gerontology*. 2015;61(6):534-42.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Sep 7;275(3):768-75.

Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(1):1-31.

Oballe HJ, Gaio EJ, Spuldaro T, Cavagni J, Gomez R, Rösing CK. Effects of alcohol and/or tobacco exposure on spontaneous alveolar bone loss in rat. *Braz Dent J*. 2014;25(3):197-202.

OpenWetWare [internet]. Sean Lauber: ImageJ: threshold analysis; 2012. [acesso em 26 Mar 2016]. Disponível em: http://openwetware.org/index.php?title=Sean_Lauber:ImageJ_-_Threshold_Analysis&oldid=595746

Orrico SR, Gonçalves D, Galeazzi ST, Giro G, Takayama L, Pereira RM. The influence of loss of bone mass on induced periodontal disease: a radiographic and densitometric study of female rats. *J Periodontol*. 2005 Sep;76(9):1436-42.

Rizzardi AE, Johnson AT, Vogel RI, Pambuccian SE, Henriksen J, Skubitz AP, et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. *Diagn Pathol*. 2012 Jun 20;7:42.

Sağlam M, Köseoğlu S, Hatipoğlu M, Esen HH, Köksal E. Effect of sumac extract on serum oxidative status, RANKL/OPG system and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2015 Jan-Feb;23(1):33-41.

Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, et al. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res*. 1999 Sep;14(9):1486-92.

Salgado MCM, Marchini AMPS, Tera TM, Rocha RF, Marchini L. Effects of estrogen deficiency combined with chronic alcohol consumption on rat mandibular condyle. *Braz J Oral Sci*. 2015 Jan-Mar;14(1):16-22.

Schieferdecker A, Voigt M, Riecken K, Braig F, Schinke T, Loges S, et al. Denosumab mimics the natural decoy receptor osteoprotegerin by interacting with its major binding site on RANKL. *Oncotarget*. 2014 Aug 30;5(16):6647-53.

Schutz Y. Role of substrate utilization and thermogenesis on body-weight control with particular reference to alcohol. *Proc Nutr Soc*. 2000 Nov;59(4):511-7.

Shimizu-Ishiura M, Kawana F, Sasaki T. Osteoprotegerin administration reduces femoral bone loss in ovariectomized mice via impairment of osteoclast structure and function. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2002;51(5):315-25.

Singh A, Sharma RK, Siwach RC, Tewari S, Narula SC. Association of bone mineral density with periodontal status in postmenopausal women. *J Investig Clin Dent*. 2014 Nov;5(4):275-82.

Sokos D, Everts V, de Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontal Res*. 2015 Apr;50(2):152-9.

Tanner T, Pääkkilä J, Karjalainen K, Kämppi A, Järvelin MR, Patinen P, et al. Smoking, alcohol use, socioeconomic background and oral health among young Finnish adults. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2015 Oct;43(5):406-14.

Van der Loos CM. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *J Histochem Cytochem.* 2008 Apr;56(4):313-28.

Wade SW, Strader C, Fitzpatrick LA, Anthony MS, O'Malley CD. Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries. *Arch Osteoporos.* 2014;9(1):182.

Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:511.

Watts NB. Insights from the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW). *Nat Rev Endocrinol.* 2014 Jul;10(7):412-22.

Weitzmann MN. The Role of Inflammatory Cytokines, the RANKL/OPG Axis, and the Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:125705. doi: 10.1155/2013/125705

World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2014. Geneva: World Health Organization; 2014. [acesso em 14 Abr 2016]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112736/1/9789240692763_eng.pdf

Xiong J, O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 2012 Mar;27(3):499-505.

Yang HJ, Lim JH, Park KJ, Kang S, Kim DS, Park S. Methyl jasmonate treated buckwheat sprout powder enhances glucose metabolism by potentiating hepatic insulin signaling in estrogen-deficient rats. *Nutrition.* 2016 Jan;32(1):129-37.

Zhang J, Dai J, Lin DL, Habib P, Smith P, Murtha J, et al. Osteoprotegerin abrogates chronic alcohol ingestion-induced bone loss in mice. *J Bone Miner Res.* 2002 Jul;17(7):1256-63.

Zhao R. Immune regulation of osteoclast function in postmenopausal osteoporosis: a critical interdisciplinary perspective. *Int J Med Sci.* 2012;9(9):825-32.

ANEXO – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F: (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / tango@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **05/2013-PA/CEP**, sobre
“Influência do alcoolismo crônico e da eficiência estrogênica sobre
o metabolismo ósseo na crista óssea alveolar de ratas”, sob a
responsabilidade da Profa.Assist.Dra. **ROSILENE FERNANDES DA**
ROCHA, tendo como orientada a aluna Adriana Mathias Pereira da Silva
Marchini, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação
Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal –
CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta
CEUA.

São José dos Campos, 23 de agosto de 2013.


Profa.Adjunto CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Vice-Coordenadora em exercício

Serão utilização os mesmos animais (90 ratas) da aluna Miriane Carneiro. Machado Salgado,
cujo orientador é o Professor Dr. Leonardo Marchini - projeto aprovado no Comitê de ética
protocolo: 1/2013)