

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

**FERNANDA FERNANDES**

**ANÁLISE DO COLO FEMORAL DE RATAS ADULTAS E SENIS APÓS  
TRATAMENTO COM OCITOCINA**

**ARAÇATUBA**  
**2016**

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

**ANÁLISE DO COLO FEMORAL DE RATAS ADULTAS E SENIS APÓS  
TRATAMENTO COM OCITOCINA**

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

**Área de Concentração:** Fisiologia

**Orientada:** Fernanda Fernandes

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

**ARAÇATUBA**

**2016**

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

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Fernandes, Fernanda.

F363a

Análise do colo femoral de ratas adultas e senis após tratamento com ocitocina / Fernanda Fernandes. - Araçatuba, 2016

74 f.: il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles

1. Ocitocina 2. Envelhecimento 3. Osso e ossos 4. Doenças ósseas metabólicas I. Título.

CDD 612

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Fernanda Fernandes**

**Análise do colo femoral de ratas adultas e senis após tratamento com ocitocina**

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

**Área de Concentração:** Fisiologia

**Orientada:** Fernanda Fernandes

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

Aprovado em: 02/08/2016

Banca Examinadora

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

Instituição: FOA/UNESP

Prof. Dr. Edilson Ervolino

Instituição: FOA/UNESP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilma Clemi Colli

Instituição: UNIP

## **DADOS CURRICULARES**

**Nascimento:** 24.10.1991, Santo Antônio da Platina – PR.

**Filiação:** José Aparecido Fernandes

Maria Aparecida da Silva Fernandes

**2009/2012:** Curso de Graduação em Fisioterapia no Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* de Araçatuba – UNISALESIANO – Araçatuba – SP.

**2014/2016:** Curso de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Ciências Fisiológicas nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – FOA – Araçatuba – SP.

## DEDICATÓRIA

A Deus, companhia incessante, que me escuta, guia, instrui e é fonte de amor inesgotável cuidando de cada detalhe dos dias. Poder ir além é a mágica da fé!

Aos meus pais que, à luz Divina, emanam cuidado, inspiram confiança e dedicam-se a mim com amor e orgulho, fortalecendo-me em cada escolha. Seus exemplos de amor, união e vida deixam rastros aos quais seguirei sempre com muita segurança e paz no coração! Obrigada por estarem comigo sempre; obrigada por me conduzirem a ser quem sou; obrigada por me traduzirem em todos os momentos, o amor incondicional!

À minha irmã, Fabiana, que incondicionalmente sempre esteve e está ao meu lado. Obrigada por ser meu suporte, por me acompanhar em tudo e por me conhecer nos pequenos gestos. Deus presenteou-me duplamente quando me enviou você, minha irmã e amiga! Estamos e estaremos sempre juntas!

Ao Meu Menino Amor, Deucyr, por sonhar e viver os sonhos comigo, por ser o sorriso que motiva e ilumina, por acreditar incansavelmente na força da realização pela fé imensurável que nos move. Juntos aprendemos e nos fortalecemos dia após dia. Obrigada por ser sempre mais Amor, Carinho, Paciência, Leveza, Alento e Fortaleza nos momentos difíceis! Desfrutar a caminhada com você é Divino!

Aos meus avós (*in memoriam*) paternos, Maria e José, aos quais não conheci, mas cujas memórias relatadas evocam sentimento; aos avós maternos, Odília e Olímpio, fontes de carinho, proteção e saudade. Em especial ao meu avô Olímpio, com cuja presença pude compartilhar mais tempo e que intercedia a São José pela tranquilidade dos meus estudos.

À Dona Maria, mulher com espírito de batalha inigualável e exemplo de amor incondicional, da qual tive e tenho privilégio de receber amor e carinho.

Aos meus sogros, Irene e Dirceu, aos meus cunhados Thais, Herivelton e Maximiliano que sempre se preocupam e torcem por mim de forma muito especial.

Aos meus familiares de sangue e de coração que me acompanham em todas as conquistas e vibram comigo e aos meus amigos, em especial à “Gil” que, mesmo na ausência, está sempre presente rezando e torcendo por mim.

Aos meus “pequenos” amores: Miguel Antônio, meu afilhado, pelo carinho tão mágico e pela doçura do sorriso, e Allana, a criança que faz brotar sorrisos e

emoções inexplicáveis, com as quais sinto-me presenteada. Ensinam-me tanto!  
Deus cuide sempre dos sonhos sonhados para vocês!

Enfim, dedico a todos que estão comigo a somar em tantos aspectos de vida.  
Eu os amo muito! Muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

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

Ao Diretor da FOA / UNESP, Prof<sup>a</sup>. Tit. Wilson Roberto Poi e ao Vice-Diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho pelo apoio.

Ao apoio financeiro Do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de mestrado.

À FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo apoio nas viagens para realização das disciplinas.

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

Ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO) (Convênio FINEP 01.12.0530.00 - PROINFRA 01/2011) da FOA/UNESP pela utilização do aparelho de microtomografia.

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

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

Muito obrigada a todos!



## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Cássia Menegati Dornelles, pela oportunidade e direcionamento, por toda a paciência e disponibilidade de diálogo, por nortear e comemorar cada aprendizado, pelos conselhos e emoções compartilhadas neste trajeto, pelo suporte dos dias e por realizar com êxito e carinho seu trabalho. Muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Helena Penha de Oliveira pelos pareceres dados semestralmente e preocupação externada com a realização das minhas análises em relação aos meus prazos.

Ao Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto por realizar análises mesmo durante o seu descanso de final de semana, por além de contribuir com a parte prática do trabalho, também disponibilizou seu tempo para instruir-me quanto à teoria da minha pesquisa.

Aos Professores da Banca do Exame Geral de Qualificação (EGQ) Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Helena Penha de Oliveira e Prof. Dr. João Cesar Bedran de Castro pelas correções e contribuições ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino que, mesmo diante da correria dos dias, tanto me ajudou em minhas análises, disponibilizando seu tempo e espaço durante dias seguidos, e sempre esteve disposto a me ouvir nas decisões. Agradeço imensamente pelas contribuições imprescindíveis ao meu trabalho, por aceitar compor minha banca de defesa e contribuir ainda mais para o meu aprendizado científico.

A todos os Professores do Departamento de Ciências Básicas (DCB) pela convivência a somar em diferentes aspectos, mostrando que a atividade profissional vem acompanhada de companheirismo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica (FOA/UNESP) por permitir a realização de parte das minhas análises em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal (FMVA/UNESP) por instruir-me desde o meu ingresso no Mestrado e durante a realização da minha pesquisa com tanto carinho, alegria e bondade incomparáveis.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti do Departamento de Odontologia (FORP/USP) por permitir a realização de parte da minha pesquisa em seu laboratório, sempre muito atencioso e solícito.

Aos técnicos: Pedro do Laboratório de Biofísica (FMVA/UNESP) que, com muita paciência e alegria ímpar, contribuiu para o meu aprendizado, “Marcelinho” e “Gi” do Laboratório de Histologia (FOA/UNESP) pelos dias de aprendizado misturados com risos e sorrisos, Fabíola do Departamento de Odontologia (FORP/USP) que além de dias de trabalho em minhas análises disponibilizou ainda mais do seu tempo para rever detalhes imprescindíveis ao meu estudo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilma Cleli Colli, por aceitar ser minha banca de defesa e por contribuir grandemente com meu trabalho, visto seu vasto conhecimento e afinidade com o tema, a qual deu início a esta linha em nosso laboratório.

À Camila Tami Stringhetta Garcia, doutoranda e amiga, que desde os meus primeiros instantes na pesquisa não só me instruiu, mas me acompanhou em tantos momentos. Obrigada por permanecer sempre comigo, por ser assim tão especial e amiga, por me acolher em seus dias, em sua casa e até mesmo na casa dos seus pais. Então, agradeço especialmente não só a você, mas a sua família, Sandra, Claudemiro, Gabriel e Helena por sempre me receberem com tanto acolhimento e carinho. Guardo vocês em meu coração com grande sentimento de gratidão. Peço a Deus que abençoe sempre seus dias com muita luz, realização e amor, e que Ele cuide de nossa amizade assim como cuidou de mim ao colocá-la em meu caminho! Obrigada por tudo e por sempre!

Àqueles que estão ao meu lado durante todas as manhãs, tardes (e, às vezes, até noites, madrugadas) na atividade laboratorial (FOA/UNESP) e tanto me ajudam e contribuem para o meu crescimento: Samuel por disponibilizar seu tempo em encaminhar-me nas atividades rotineiras do laboratório desde quando me preparava para seleção do Mestrado até o momento, Camila por tanto companheirismo e amizade, Ângela por muitas vezes disponibilizar seu tempo para me ajudar em tantos momentos, Melise por, em pouco tempo de convívio, já ter me apoiado tanto e me direcionado em muitas ocasiões e Ricardo por compartilhar dicas e suporte na nossa caminhada de mestrandos. Agradeço também aos alunos de iniciação científica que dividiram e dividem tantos momentos conosco: Fabiana, minha irmã e parceira, Luiza, Flávia, Camila, Viviane e Adailton. Obrigada por todo

suporte e alegria de dias difíceis, principalmente em dias experimentais que pareciam intermináveis! Tornaram-se companheiros de vida!!!

A todos os companheiros de Departamentos que participaram das alegrias e tensões diárias, o convívio com cada um, em cada fase, proporcionou uma alegria diferente. Agradeço aos meus companheiros de turma Carlucci, Luiz e Amanda pelas emoções compartilhadas; ao Renato, Francielle e Luy pelas ajudas valiosas!

Aos companheiros de maratona de estudos durante o “Cursão” de Fisiologia: Lucas (FMRP/USP), Marielly (UFG), Monaliza (UFG), Elizângela (UFG) que diante dos tantos momentos de estudos compartilhados tornaram-se amigos de muitos momentos de alegria que se estendem até hoje, e também a Mayara (FMRP/USP) que partilhou momentos conosco em pouco tempo, mas tornou-se tão especial.

Aos alunos Karina e Leandro do Departamento de Farmácia (FCF/USP) pela grande ajuda em transportar, em seus cuidados, meus materiais enviados até o laboratório de análise. Agradeço a Karina por me socorrer num momento de dificuldade!

Ao aluno Rodrigo do Departamento de Odontologia (FORP/USP) pelos dias que voltou-se para realizar minhas análises de forma tão tranquila e contribuir para meu aprendizado ao ensinar-me passo a passo.

A todos vocês que são e tornaram-se tão especiais, muito obrigada!



Deus sempre se encarrega de preparar o caminho com pessoas que o ilumina. O meu MUITO obrigada a todas as luzes da minha caminhada!

*“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.*

*(Paulo Beleki)*

# RESUMO

FERNANDES, F. **Análise do colo femoral de ratas adultas e senis tratadas com ocitocina.** 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo analisar e comparar a ação da ocitocina (OT) no metabolismo ósseo de ratas Wistar cíclicas (12 meses) e acíclicas (18 meses/período de periostropausa). Os animais foram distribuídos em quatro grupos: (1) animais com 12 meses que receberam injeção com veículo NaCl (Veh/12); (2) animais com 12 meses que receberam injeção de OT (Ot / 12); (3) animais com 18 meses que receberam injeção com veículo NaCl (Veh/18); (4) animais com 18 meses que receberam injeção de OT (Ot / 18). Cada grupo foi composto por 8 animais. Os animais receberam duas injeções intraperitoneais de NaCl (0,15 M – grupo controle) ou OT (134 ug / kg – grupo tratado) com 12 horas de intervalo. Força, microarquitetura e biomarcadores ósseos [fosfatase alcalina (FAL) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)] foram analisados. Imunoistoquímica foi realizada para fator de transcrição relacionado com o Runt 2 (RUNX2), osterix (OSX), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), proteína óssea morfogenética 2 e 4 (BMP-2/4), periostina (PER), esclerostina (ESC) e TRAP. Os animais que receberam OT demonstraram melhora significativa na dosagem plasmática: aumento na FAL dos animais de 12 meses ( $p < 0,0001$ ) e 18 meses ( $p = 0,0138$ ); diminuição na TRAP dos animais de Ot / 12 ( $p = 0,0465$ ) e Ot / 18 ( $p = 0,0045$ ). Houve melhora nos parâmetros biomecânicos: força máxima (N) do grupo Ot / 18 ( $p = 0,0003$ ); rigidez óssea ( $\times 10^3 \text{N/mm}$ ) do grupo Ot / 12 ( $p = 0,0223$ ) e Ot / 18 ( $p = 0,0145$ ); microarquitetura óssea cortical do grupo Ot / 18 para Ct.Ar ( $\text{mm}^2$ ) ( $p = 0,0416$ ) e Ct.Po (%) ( $p = 0,0102$ ); microarquitetura óssea trabecular para Tb.N (1/mm) ( $p = 0,0016$ ) e Tb.Sp ( $p = 0,00010$ ); todos os grupos foram comparados ao seus respectivos controles (Veh/12; Veh/18). Em resumo, os resultados demonstraram que a administração de OT foi eficaz para prevenir a perda de massa óssea em ratas Wistar velhas com hipoestrogenismo, reforçando este agente anabólico como forte alternativa terapêutica para prevenção e tratamento da osteoporose (OP), reduzindo os índices da doença e fraturas osteoporóticas.

**Palavras-chave:** ocitocina, envelhecimento, osso e ossos, doenças ósseas metabólicas

# ABSTRACT

FERNANDES, F. **Analysis of the femoral neck in adults and old rats after treatment with oxytocin.** 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

## ABSTRACT

This study aimed to analyze and compare the acting of oxytocin (OT) on bone metabolism of cyclic (12 months) and acyclic Wistar rats (18 months/peri-estropause period). Animals were allocated to four groups: (1) animals with 12 months that received vehicle injection NaCl (Veh/12); (2) animals with 12 months that received OT injection (Ot / 12); (3) animals with 18 months that received vehicle (Veh/18) and (4) animals with 18 months that received OT injection (Ot / 18). Eight animals composed each group. The animals received two intraperitoneal injections of NaCl (0.15 M - control group) or OT (134 ug / kg - treated groups) with 12 hours apart. Bone strength, microarchitecture, and biomarkers [alkaline phosphatase (ALP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)] were assessed. Immunohistochemistry was performed for runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osterix (OSX), osteocalcin (OCN), osteopontin (OPN), bone morphogenetic protein 2 and 4 (BMP-2/4), periostin (PER), sclerostin (ESC) and TRAP. Animals that received OT showed significant improvements at plasma assay: increase in the ALP from the animals with 12 months ( $p < 0.0001$ ) and 18 months ( $p = 0.0138$ ); decrease in the TRAP from the Ot / 12 ( $p = 0.0465$ ) and Ot / 18 ( $p = 0.0045$ ). There was improvements at biomechanical parameters: maximum load (N) from the Ot / 18 ( $p = 0.0003$ ); bone stiffness ( $\times 10^3 \text{N/mm}$ ) from the Ot / 12 ( $p = 0.0223$ ) and Ot / 18 ( $p = 0.0145$ ); cortical bone microarchitecture from the Ot / 18 to Ct.Ar ( $\text{mm}^2$ ) ( $p = 0.0416$ ) and Ct.Po (%) ( $p = 0.0102$ ); trabecular bone microarchitecture to Tb.N (1/mm) ( $p = 0.0016$ ) and Tb.Sp. ( $p = 0.00010$ ); all groups compared to its respective controls (Veh/12; Veh/18). In summary, the results showed the OT administration was effective to prevent the bone loss in old Wistar rats with hypoestrogenism, reinforcing this anabolic agent as powerful therapeutic alternative to prevention and treatment for osteoporosis (OP), to reduce the rates of disease and osteoporotic fractures.

**Keywords:** oxytocin, aging, bone and bones, metabolic bone diseases

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Evolução dos grupos etários de ❶ 2.000 a ❷ 2.030 com enfoque para população idosa (65 anos mais) segundo o IBGE .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 26 |
| <b>Figura 2.</b> Taxas Brutas de Natalidade (TBN) e Mortalidade (TBM) de ❶ 2.000 a ❷ 2.030 com enfoque para TBN segundo o IBGE .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Pirâmide etária de ❶ 2.000 a ❷ 2.030 no Brasil com enfoque para a população feminina segundo o IBGE .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 28 |
| <b>Figura 4.</b> Imagem ilustrativa da Unidade Multicelular Óssea (BMUs) compostas por células ósseas osteoclásticas, osteoblásticas e osteócitos e processo de remodelamento ósseo que consiste ❶ recrutamento de precursores de células osteoclásticas e reabsorção óssea realizada por osteoclastos maduros, ❷ fase de reversão desempenhada por células do sistema imunológico (macrófagos), ❸ recrutamento de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs), diferenciação de osteoblastos, síntese de matriz osteoide e mineralização da matriz óssea, ❹ fase de quiescência com células de revestimento ósseo encerrando o ciclo de remodelamento (ADAPTADO de Servier Medical Art) ..... | 29 |
| <b>Figura 5.</b> Imagem ilustrativa do processo de recrutamento de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs), diferenciação em células osteoblásticas, presença de proteínas que participam da diferenciação, formação e mineralização da matriz osteoide, culminando com a formação de lacunas de osteócitos (ADAPTADO de Compton, 2014).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 31 |
| <b>Figura 6.</b> Imagem ilustrativa da presença de receptores de OT (Oxtr) e da modulação da OT em células ❶ osteoclásticas e ❷ osteoblásticas (ADAPTADO de Tamma, 2009) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 35 |
| <b>Figura 7.</b> Imagem ilustrativa das vias de ação estrogênica ❶ genômica e ❷ não-genômica sobre a estimulação da síntese de OT e seu receptor (Oxtr) (ADAPTADO de Colaianni, 2014) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 36 |
| <b>Figura 8.</b> ❶ Biotério com gaiolas devidamente identificadas ❷ Gaiola contendo 4 animais com acesso livre à água e ração .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 40 |
| <b>Figura 9.</b> Diagrama esquemático do experimento animal .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 41 |
| <b>Figura 10.</b> ❶ Dosagem sorológica para ensaio de marcadores bioquímicos de remodelação óssea (TRAP e FAL).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 43 |

**Figura 11.** ❶ Densitômetro DPX-ALPHA para análise de densitometria óssea ❷ Software de análise para pequenos animais.....43

**Figura 12.** ❶ Microtomógrafo Skyscan 1272 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) para análise de microtomografia óssea trabecular e cortical ❷ Imagem representativa do posicionamento crânio-caudal do fêmur no microtomógrafo ❸ Imagem de reconstrução cortical do colo femoral ❹ Imagem de reconstrução trabecular do colo femoral .....44

**Figura 13.** ❶ Máquina de Ensaio Universal EMIC/Mod DL3000 ❷ Ensaio de compressão da cabeça do fêmur ❸ Esquema da curva Força X Deslocamento obtido do ensaio mecânico. Região elástica compreende a deformação do corpo de prova e retorno do mesmo à sua forma original. Região plástica compreende a deformação irreversível do corpo de prova. Ponto de ruptura compreende o primeiro instante após o registro da força máxima (N) .....45

**Figura 14.** ❶ Região de interesse da análise histomorfométrica – tecido ósseo trabecular do colo femoral ❷ Aumento de x 400 do tecido ósseo trabeculado da região do colo femoral.....46

**Figura 15.** ❶ Etapa de lavagem das lâminas silanizadas em PBS durante o procedimento de imunoistoquímica ❷ Etapa de recuperação do antígeno em tampão citrato na panela de pressão durante o procedimento de imunoistoquímica ❸ Lâminas coradas em hematoxilina (imagem: OCN e TRAP) e em *fast green* (imagem: RUNX2) .....47

**Figura 16.** Marcadores sorológicos de remodelação óssea em ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Concentração sorológica de ❶ Fosfatase Alcalina (FAL) e ❷ Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12= animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18= animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12; \* vs Veh/18.....50

**Figura 17.** Parâmetros biomecânicos de ❶ Conteúdo Mineral Ósseo (CMO), ❷ Área e ❸ Densidade Mineral Óssea areal (DMOa) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12 = animais de 12 meses que



receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12; \* vs Veh/18.....51

**Figura 18.** Parâmetros de microarquitetura óssea cortical para ❶ Área Óssea Cortical (Ct. Ar) e ❷ Porcentagem de Poros Corticais (Ct. Po) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12, \* vs Veh/18 .....52

**Figura 19.** Parâmetros de microarquitetura óssea trabecular para ❶ Razão entre o volume ósseo da amostra e o volume da amostra (BV/TV); ❷ Número de Trabéculas (Tb.N); ❸ Espessura das Trabéculas (Tb.Th) ❹ Separação das Trabéculas (Tb.Sp) e ❺ Grau de Anisotropia (DA) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12= animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18= animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12; \* vs Veh/18.....53

**Figura 20.** Parâmetros biomecânicos de ❶ força máxima e ❷ rigidez de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12; \* vs Veh/18 .....54

**Figura 21.** Fotomicrografia com coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) demonstrando a ❶ morfologia óssea e o ❷ gráfico demonstrando a área óssea da região de interesse (colo femoral) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito

do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade.....55

**Figura 22.** Gráficos que mostram o padrão de imunorreatividade para ❶ Fator de transcrição relacionado com o runt 2 (RUNX2), ❷ Osterix (OSX), ❸ Osteocalcina (OCN), ❹ Osteopontina (OPN), ❺ Proteína Óssea Morfogenética 2 e 4 (BMP-2/4), ❻ Periostina (PER), ❼ Esclerostina (ESC) e ❽ Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* não paramétrica seguida por pós-teste de *Newman-Keuls*. Abreviaturas: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT .....56

**Figura 23.** Fotomicrografias que mostram o padrão de imunorreatividade para ❶ Fator de transcrição relacionado com o runt 2 (RUNX2), ❷ Osterix (OSX), ❸ Osteocalcina (OCN), ❹ Osteopontina (OPN), ❺ Proteína Óssea Morfogenética 2 e 4 (BMP-2/4), ❻ Periostina (PER), ❼ Esclerostina (ESC) e ❽ Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* não paramétrica seguida por pós- teste de *Newman-Keuls*. Contracoloração com *fast-green* para RUNX2 e OSX. Contracoloração com hematoxilina para OCN, OPN, BMP-2/4, PER, ESC e TRAP. Barras de escala: 20µm. Ampliação original: × 400 e x 800 .....57

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Peso corporal inicial (11 e 17 meses) e final (12 e 18 meses) e peso uterino/100g de peso corporal de animais Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. Abreviaturas e símbolos: Veh/12= animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18= animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; + vs Veh/12 (p = 0,0488).....49

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\mu\text{g}$ : micrograma
- $\mu\text{L}$ : microlitro
- $\mu\text{mol}$ : micromol
- $\mu\text{W}$ : microwatt
- ANOVA: análise de Variância
- ATF-4: *Activating transcription factor 4*
- BMP: proteína morfogênica óssea
- BMP-2: proteína morfogênica óssea 2
- BMU: unidade multicelular óssea
- BSP: sialoproteína óssea
- BV/TV: razão entre o volume ósseo da amostra e o volume da amostra
- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ : hidroxiapatita
- $\text{Ca}^{2+}$ : cálcio
- $\text{CA}_2$ : anidrase carbônica
- CATK: catepsina K
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- $\text{cm}^2$ : centímetros quadrado
- CMO: conteúdo mineral ósseo
- COL-1: colágeno tipo-1
- CTM: célula tronco mesenquimal
- CTR: receptor de calcitonina
- Ct.Ar: área cortical
- Ct.Th: espessura cortical
- DA: grau de anisotropia
- DAB: diaminobenzidina
- DEXA: *dual-energy x-ray absorptiometry*
- DMO: densidade mineral óssea
- $\text{E}_2$ : estrógeno
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM: erro padrão da média

- ESC: esclerostina
- FAL: fosfatase alcalina
- FGF: fator de crescimento fibroblástico
- g: gramas
- g/cm<sup>2</sup>: gramas por centímetros quadrado
- h: hora
- IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IGF: fator de crescimento insulínico
- IL-1: interleucina tipo 1
- L: litro
- M: molar
- MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*
- M-CSF: fator estimulante da colônia de monócitos
- mg: miligrama
- MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio
- min: minutos
- mJ: milijoule
- mL: mililitro
- mm: milímetro
- mm<sup>2</sup>: milímetros quadrado
- mM: milimol
- N: Newtons
- NaCl: solução fisiológica de cloreto sódio a 0,9%
- NaOH: hidróxido de sódio
- NF-κB: fator nuclear kappa B
- NO: *nitric oxide*
- nm: nanômetros
- °C: graus Celsius
- OCN: osteocalcina
- OP: osteoporose
- OPG: osteoprotegerina
- OPN: osteopontina

- OSX: osterix
- OT: ocitocina
- Ot /12: animais de 12 meses que receberam ocitocina
- Ot /18: animais de 18 meses que receberam ocitocina
- OVX: ovariectomia
- Oxtr: receptor de OT
- PBS: tampão fosfato salina
- PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
- PER: periostina
- pH: potencial de hidrogênico
- *p*HMB: *p*-hidroxi benzoato de mercúrio
- *p*NP: *p*-nitrofenilo
- *p*NPP: fosfato de *p*-nitrofenilo
- $\text{PO}_4^{3-}$ : fosfato
- PTH: paratormônio
- RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$
- RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$
- RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
- RPM: rotações por minuto
- RUNX2: fator de transcrição relacionado com o runt 2
- s: segundos
- SERMs: moduladores seletivos do receptor de estrógeno
- Sham: cirurgia placebo
- TBM: taxa bruta de mortalidade
- TBN: taxa bruta de natalidade
- Tb.N: número de trabéculas
- Tb.Sp: separação trabecular
- Tb.Th: espessura trabecular
- TGF- $\alpha$ : fator de crescimento transformante  $\alpha$
- TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante  $\beta$
- TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$
- TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

- TRH: terapia de reposição hormonal
- U: unidade
- U/L: unidades por litro
- v: volume
- Veh/12: animais de 12 meses que receberam veículo
- Veh/18: animais de 18 meses que receberam veículo
- vs: *versus*
- Wnt: via de sinalização intracelular Wnt

# SUMÁRIO

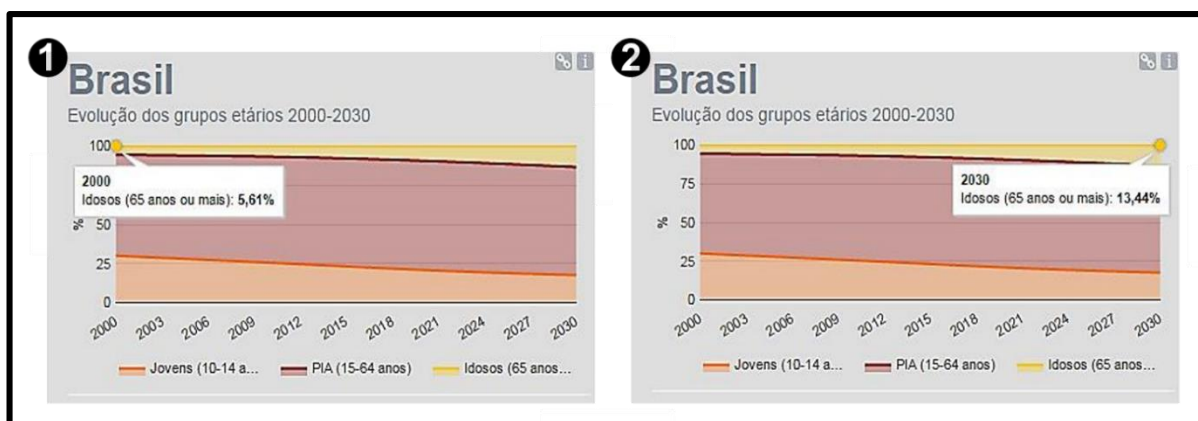
|                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                              | 26 |
| 2. OBJETIVOS .....                                               | 38 |
| 2.1. Objetivo geral .....                                        | 38 |
| 2.2. Objetivos específicos .....                                 | 38 |
| 3. METODOLOGIA .....                                             | 40 |
| 3.1. Animais .....                                               | 40 |
| 3.2. Ciclo Estral .....                                          | 40 |
| 3.3. Administração de Ocitocina e Veículo .....                  | 41 |
| 3.4. Coleta das Amostras .....                                   | 41 |
| 3.5. Ensaio de Marcadores Bioquímicos de Remodelação Óssea ..... | 42 |
| 3.6. Densitometria Óssea .....                                   | 43 |
| 3.7. Microtomografia Óssea .....                                 | 43 |
| 3.8. Ensaio Mecânico .....                                       | 44 |
| 3.9. Processamento histológico das amostras .....                | 45 |
| 3.9.1. Análise Histomorfométrica .....                           | 45 |
| 3.9.2. Análise Imunoistoquímica .....                            | 46 |
| 3.10. Análise Estatística .....                                  | 47 |
| 4. RESULTADOS .....                                              | 49 |
| 4.1. Peso corporal e uterino .....                               | 49 |
| 4.2. Marcadores de remodelação óssea .....                       | 49 |
| 4.3. Densitometria óssea .....                                   | 50 |
| 4.4. Microarquitetura óssea .....                                | 51 |
| 4.5. Força e rigidez óssea .....                                 | 53 |
| 4.6. Histomorfometria do colo femoral .....                      | 54 |
| 4.7. Imunoistoquímica .....                                      | 55 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                               | 59 |
| 6. CONCLUSÃO .....                                               | 65 |
| REFERÊNCIAS .....                                                | 67 |
| ANEXO .....                                                      | 74 |



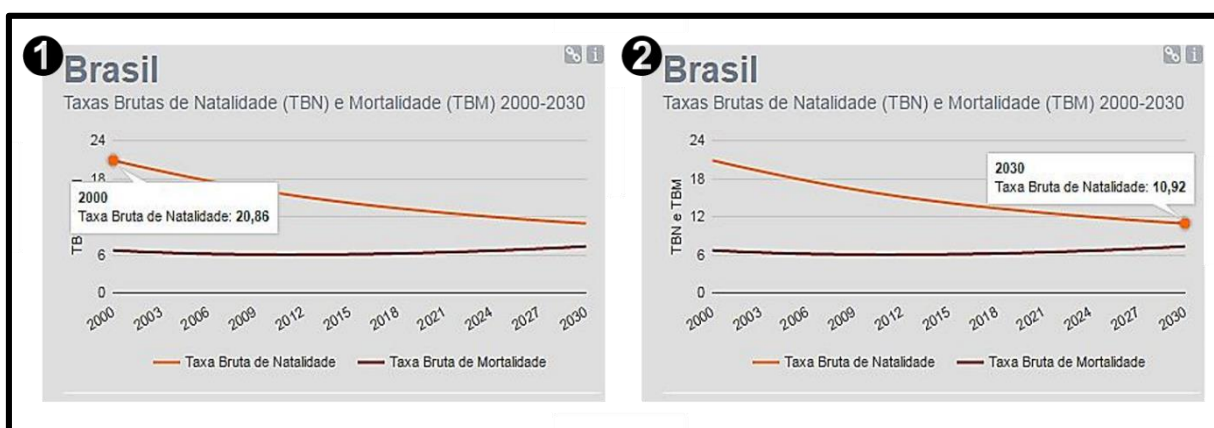
## INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Frente aos avanços científicos e tecnológicos e as transformações sociais, é cada vez mais notável o aumento na população idosa. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que no ano de 2.000 a população com 65 anos ou mais no Brasil era de 5,61% e, em suas projeções para 2.030 esta porcentagem eleva-se para 13,44% - aumento de 7,83% desta população (Figura 1). Em contraste, o índice da população jovem (10 a 14 anos) passará de 30,04% para 17,59% e as taxas de natalidade apresentarão diminuição de 20,86% para 10,92% (Figura 2) neste mesmo período, ilustrando assim, o cenário do envelhecimento populacional.



**Figura 1.** Evolução dos grupos etários de 1 2.000 a 2 2.030 com enfoque para população idosa (65 anos mais) segundo o IBGE

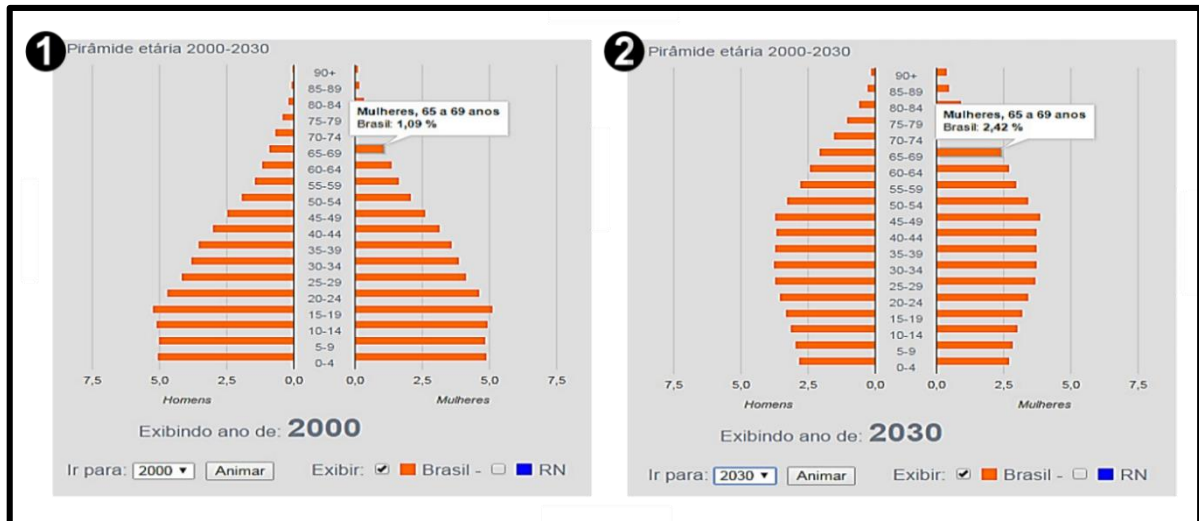


**Figura 2.** Taxas Brutas de Natalidade (TBN) e Mortalidade (TBM) de 1 2.000 a 2 2.030 com enfoque para TBN segundo o IBGE

Entretanto, o aumento na longevidade não tem garantido qualidade de vida, já que com o aumento da expectativa de vida, cresce o número de doenças crônico-degenerativas. Tendo em vista a persistência e permanência destas doenças,

observa-se impacto grande na demanda financeira dos sistemas de saúde pública, o que decorre do tratamento da doença, bem como da diminuição da capacidade funcional, perda da produtividade e, ainda assim, elevado número de óbitos. No arsenal de doenças crônico-degenerativas, entre as mais graves, está a osteoporose (OP), doença que eleva os índices de morbidade, mortalidade e diminui qualidade de vida dos portadores. Estudos apontam que 200 milhões de pessoas ao redor do mundo tem OP e esta estimativa aumenta junto ao crescente envelhecimento populacional. Os custos para o setor da saúde já são consideráveis, no entanto, já se pode prever que estes dupliquem até 2050. Neste contexto eleva-se a necessidade de implementação de diretrizes para o diagnóstico, prevenção e tratamento da osteoporose (REGINSTER et al., 2006; DEXTER et al., 2010).

Em se tratando do número de idosos, a população feminina encontra-se em maior proporção. Mulheres entre 65 e 69 anos representavam 1,09% da população no ano de 2.000, e em 2.030, projeções do IBGE indicam que esta porcentagem será de 2,72%, fato este que pode ser justificado pelo maior suporte de carga de doenças e de declínio funcional por parte das mulheres, hipoteticamente relacionados à carga genética, diferenças hormonais e sociais. Porém, por razões intrínsecas ao organismo feminino, nota-se maior acometimento de alguns sistemas corporais, como, por exemplo, o sistema ósseo (Figura 3). O envelhecimento feminino é marcado pela menopausa, fenômeno que caracteriza o término da vida reprodutiva em decorrência da diminuição na concentração de estrógeno ( $E_2$ ), hormônio que age de forma a proteger o organismo feminino. Estas modificações podem, então, resultar em diminuição da massa óssea – osteopenia, e subsequente OP. A diminuição nas concentrações de estrógeno contribui para o aumento do turnover ósseo, com taxa de reabsorção superior à de formação óssea, já que este hormônio é um dos responsáveis por inibir formação de citocinas pró-reabsorção e aumentar produção de fatores antirreabsortivos (PINHEIRO et al., 2009 e 2010; BAYLISS et al., 2012).



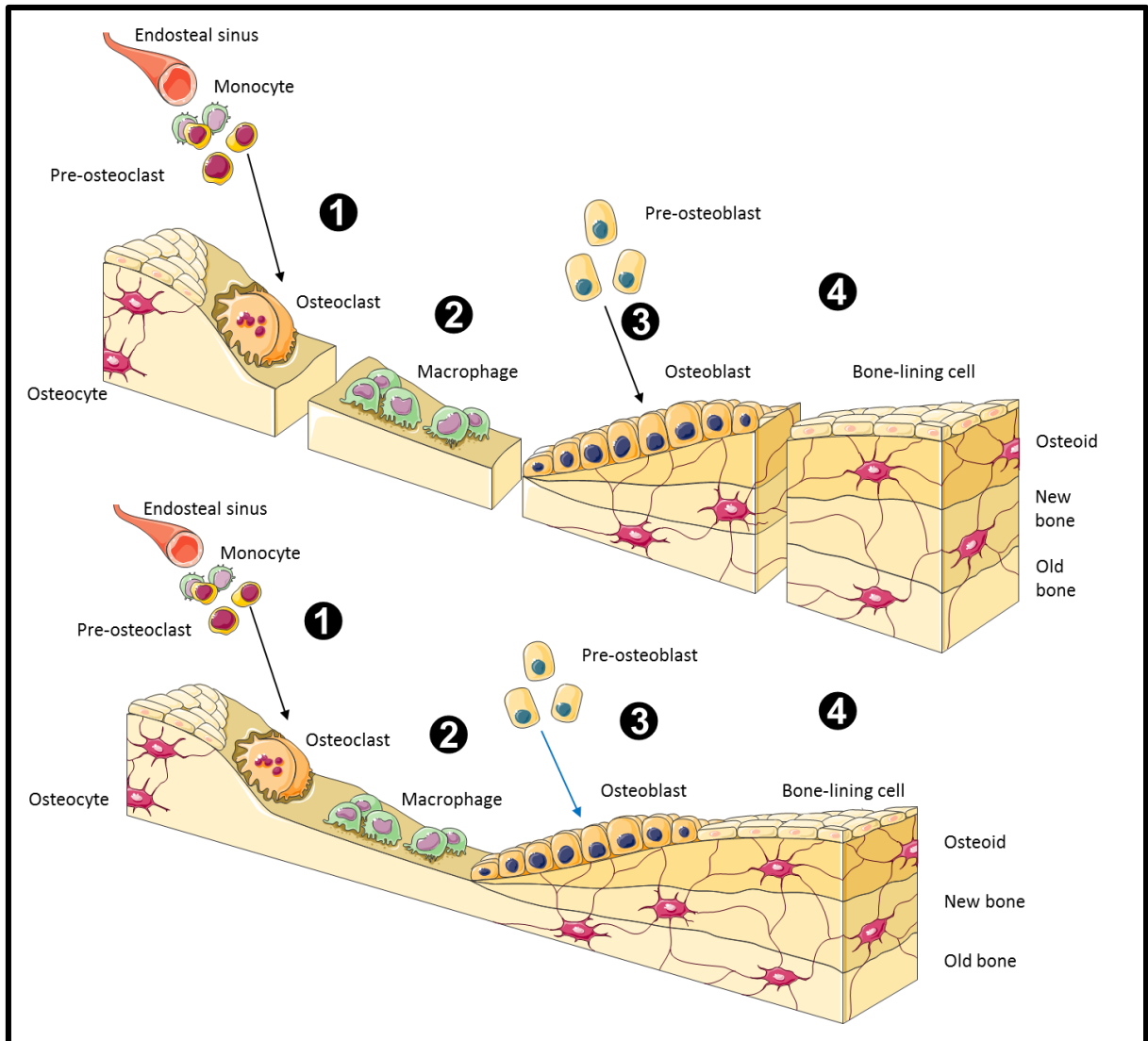
**Figura 3.** Pirâmide etária de ❶ 2.000 a ❷ 2.030 no Brasil com enfoque para a população feminina segundo o IBGE

Após atingir o pico de massa óssea por volta dos 30 anos, os indivíduos iniciam perda que varia de 0,3% a 0,5% de sua massa óssea a cada ano. Em mulheres na pós-menopausa, porém, a diminuição acelerada da massa óssea após a última menstruação pode ser até 10 vezes maior que a observada no período de pré-menopausa. Nos primeiros 5 a 10 anos que seguem a última menstruação essa perda pode ser de 2% a 4% ao ano para osso trabecular e de 1% ao ano para osso cortical (RADOMINSKI, et al., 2004; AMADEI et al., 2006).

O osso é órgão ativo constituído por matriz extracelular orgânica, composto por colágeno tipo I (COL 1), proteoglicanas e proteínas não colagenosas como fosfatase alcalina (FAL), osteocalcina (OCN), sialoproteína óssea (BSP), osteonectina, osteopontina (OPN) e proteína óssea morfogenética (BMP). Também é composto por matriz inorgânica, rica em íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) que se depositam como cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), além de fatores de crescimento e citocinas importantes para a regulação do remodelamento ósseo. (COMPSTON et al., 2001; YOUNG, 2003; BOSKEY, 2006; VIGUET-CARRIN et al., 2006).

A integridade funcional e estrutural óssea no esqueleto adulto é moldada continuamente através do processo de remodelação óssea. Este processo é complexo e regulado, principalmente, por células do tecido ósseo: osteoclastos que reabsorvem o osso e osteoblastos que depositam matriz óssea em lacunas de reabsorção. A atividade destas células é rigorosamente regulada para garantir que a homeostase óssea seja mantida e os osteócitos, células mais abundantes do tecido

ósseo (95% de todas as células ósseas), são responsáveis por emitirem sinais a estes tipos celulares. O conjunto destas células, juntamente ao suprimento dos vasos sanguíneos é chamado de Unidade Óssea Multicelular (BMUs) (Figura 4) (BOYLE et al., 2003; TERPOS et al., 2015; PRIDEAUX et al., 2016).



**Figura 4.** Imagem ilustrativa da Unidade Multicelular Óssea (BMUs) compostas por células ósseas osteoclásticas, osteoblásticas e osteócitos e processo de remodelamento ósseo que consiste ❶ recrutamento de precursores de células osteoclásticas e reabsorção óssea realizada por osteoclastos maduros, ❷ fase de reversão desempenhada por células do sistema imunológico (macrófagos), ❸ recrutamento de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs), diferenciação de osteoblastos, síntese de matriz osteoide e mineralização da matriz óssea, ❹ fase de quiescência com células de revestimento ósseo encerrando o ciclo de remodelamento (ADAPTADO de Servier Medical Art)

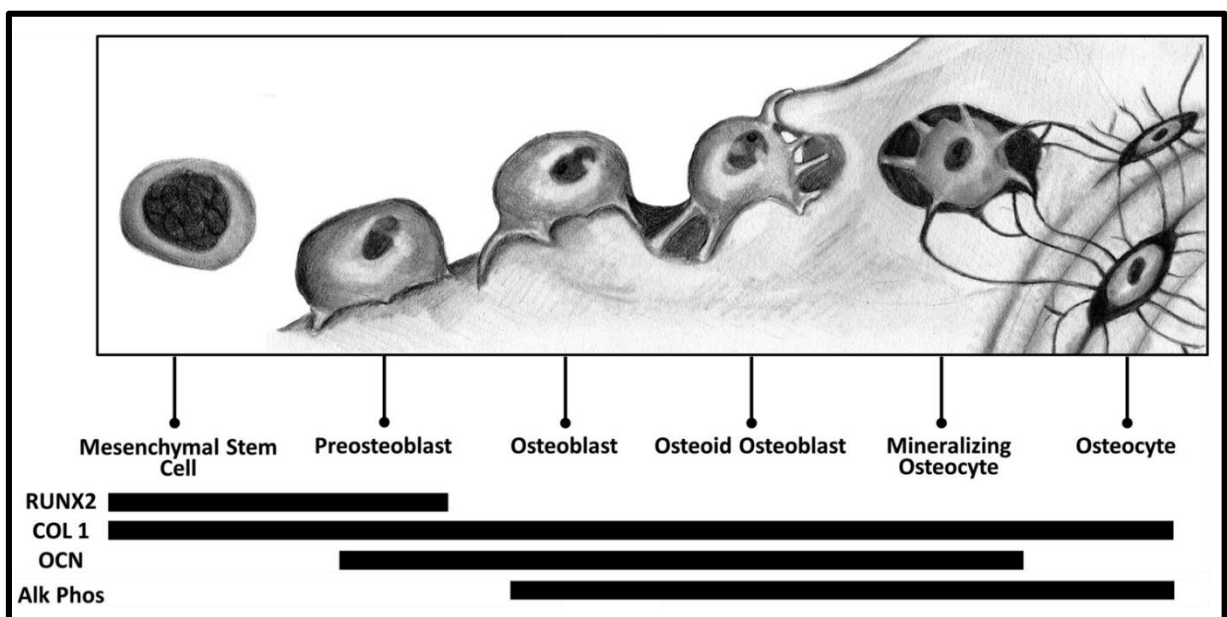
Estudos demonstram que o processo de remodelação ocorre quando, fisiologicamente, a carga mecânica provoca microfissuras na matriz óssea mineralizada (LEMAIRE et al., 2008; ROSA et al., 2015). Os osteócitos, células numerosas e que possuem complexa organização e disposição, são responsáveis por captar estas alterações da matriz óssea e, num processo chamado de

mecanotransdução (mecanismo que converte sinais mecânicos em resposta bioquímica), enviam sinais às células da superfície óssea, osteoclastos e osteoblastos, desencadeando o processo de remodelação (LIU et al., 2016).

A remodelação óssea inicia-se com a reabsorção do tecido ósseo, a qual depende do recrutamento de precursores de osteoclastos (osteoclastogênese). Os osteoclastos são células móveis, arredondadas, gigantes, multinucleadas, de origem hematopoiética e que possuem quantidade grande de lisossomas. A sua maturação e ativação são mediadas por citocinas que estimulam a diferenciação e a proliferação dos osteoclastos através do contato com as células precursoras e da liberação de fator estimulante da colônia de monócito (M-CSF), que aumenta a capacidade de sobrevivência dos precursores de osteoclastos, e do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), que induz, em conjunto com M-CSF, a expressão de genes que tipificam a linhagem osteoclástica: fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K (CATK), receptor de calcitonina (CTR), anidrase carbônica 2 (CA<sub>2</sub>) e integrinas da classe  $\beta 3$ . Outros fatores intervêm na massa óssea, tais como hormônios sistêmicos e fatores de crescimento. Após período de reabsorção, osteoclastos entram em apoptose em decorrência da liberação de fatores que estimulam também a formação óssea pelos osteoblastos (MANOLAGAS, 2000; KULAR et al., 2012).

Os osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais (CTMs) que se originam do estroma da medula óssea, são células mononucleares, com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvido, que se dispõem lado a lado na superfície óssea em formato cuboide quando muito ativas ou ligeiramente achatadas quando inativas. A formação óssea é desencadeada pela presença de fatores que recrutam e diferenciam células osteoprogenitoras (Figura 5), como o fator de transcrição relacionado com o Runt 2 (RUNX2), que comprometem células tronco mesenquimais com a linhagem óssea, e osterix que diferenciam pré-osteoblastos em osteoblastos maduros. Além destes, a osteoblastogênese é influenciada por fatores de crescimento como a proteína morfogenética óssea (BMP) da superfamília de fatores transformadores de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que estimula a diferenciação dos precursores de osteoblastos e induzem células não-osteogênicas a diferenciarem-se em células da linhagem de osteoblastos, fator de crescimento insulínico (IGF), 1,25- hidroxivitamina

D, paratormônio (PTH), E<sub>2</sub> e a via de transdução de sinal Wnt/ $\beta$ -Catenina. Osteoblastos diferenciados na lacuna de reabsorção sintetizam matriz orgânica chamada de matriz osteoide e controlam sua mineralização pela síntese dos componentes orgânicos (COL1, FAL, BSP e OCN) e inorgânicos (cristais de hidroxiapatita) na matriz extracelular, os quais são marcadores fenotípicos característicos deste tipo celular. Portanto, a diferenciação dos osteoblastos passa por três fases: proliferação (várias proteínas da matriz extracelular são sintetizadas – TGF- $\beta$  e pró-colágeno), maturação (pico de FAL, essencial para a mineralização) e mineralização (expressão de proteínas como OCN, OPN, BSP). No final da atividade osteoformadora, os osteoblastos envoltos por matriz calcificada, tornam-se osteócitos, diferenciam-se em células de revestimento ou sofrem apoptose (MANOLAGAS, 2000; KINI et al., 2012; KULAR et al., 2012).



**Figura 5.** Imagem ilustrativa do processo de recrutamento de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs), diferenciação em células osteoblásticas, presença de proteínas que participam da diferenciação, formação e mineralização da matriz osteoide, culminando com a formação de lacunas de osteócitos (ADAPTADO de Compton, 2014)

Os osteócitos encontrados no interior da matriz óssea (Figura 5), ocupam lacunas das quais partem os canalículos que se interconectam com outros osteócitos, estabelecendo contato através de junções comunicantes, por onde passam pequenas moléculas e íons de um osteócito para outro, permitindo assim, a transdução do sinal mecânico em sinal bioquímico (mecanotransdução). Este acoplamento celular é altamente regulado por fatores locais e sistêmicos que ajudam a manter a homeostase óssea (RAGGATT et al., 2010; KULAR et al., 2012).

Uma proteína envolvida com a resposta aos sinais mecânicos e que tem sido vista como mediador estrutural importante, equilibrando adaptação do tecido ósseo em resposta a estes estímulos, é a periostina (PER), produzida preferencialmente por osteoblastos e osteócitos (CONWAY et al., 2014). Outra proteína que responde à carga mecânica é a esclerostina (ESC), liberada por osteócitos e que inibe a formação óssea pela via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (DUROSIER et al., 2013). Estudo tem demonstrado interação destas proteínas, de forma que PER regula ESC pela supressão da expressão do gene SOST, que codifica ESC, contribuindo assim, para o anabolismo ósseo (BONNET et al., 2012).

Deste modo, ao longo da vida, o tecido ósseo é constantemente renovado através do remodelamento ósseo, o qual é caracterizado pela sequência de eventos ativação-reabsorção-formação (Figura 4) que envolve mecanismos regulatórios intracelulares, influência hormonal, fatores locais e sistêmicos. Desequilíbrios nestes fatores propiciam a osteopenia e OP, principalmente pelo fato do processo de formação ocorrer de forma mais lenta que o de reabsorção (KULAR et al., 2012).

Interações sistêmicas, realizadas pelo sistema endócrino, ocorrem por meio da liberação de diversos hormônios, entre eles o PTH, calcitonina, insulina, hormônio do crescimento (GH), hormônios esteroides e da tireoide, bem como de fatores locais como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), a interleucina 1 (IL-1), fator de crescimento fibroblástico (FGF), TGF  $\alpha$  e  $\beta$  e fator de crescimento epidérmico (EGF) (YOUNG, 2003; AMADEI et al., 2006). Células osteoblásticas possuem receptores para diversos fatores, como o PTH, glicocorticoides, GH, IL-1, TNF- $\alpha$ , prostaglandinas e hormônios sexuais. Dentre eles, os hormônios sexuais tem função importante no crescimento ósseo e na manutenção do pico de massa óssea. Amadei e seus colaboradores (2006) afirmam que a diminuição de estrógenos contribui para a progressiva redução da massa óssea, e assim, com a ooforectomia em jovens, ou na menopausa precoce, pode-se observar acelerada perda óssea com instalação mais rápida do quadro de OP.

Eriksen e colaboradores (1988) descreveram a presença de receptores estrogênicos em osteoblastos ou em células de linhagem osteoblástica e detectaram receptores funcionais de estrógeno em células ósseas humanas. Komm e colaboradores (1988) encontraram diversos locais de ligação do estrógeno em núcleos de células de ratas. Ambos relataram a presença de RNA mensageiro



(RNAm) estrogênico em cada população de células óssea estudadas. Embora os receptores de estrógeno estejam predominantemente em osteoblastos, há maior evidência da atuação desse hormônio é na reabsorção óssea. Amadei et al. (2006) afirma que a ligação de citocinas nos receptores osteoblásticos provoca a liberação de fatores que agem sobre a linhagem osteoclástica estimulando sua atividade. É possível que a ligação do estrógeno ou de seus análogos aos receptores dos osteoblastos iniba a liberação de fatores estimuladores dos osteoclastos ou aumente a atividade dos fatores inibidores dos mesmos. Estudos sugerem que os estrógenos podem prevenir perda óssea excessiva antes e após a menopausa pela indução da apoptose dos osteoclastos. Entretanto, os mecanismos de atuação do estrógeno não estão plenamente esclarecidos, sabe-se que envolve a interação de molécula ligante e seu receptor (HUGHES et al., 1996; SAXON et al., 2012).

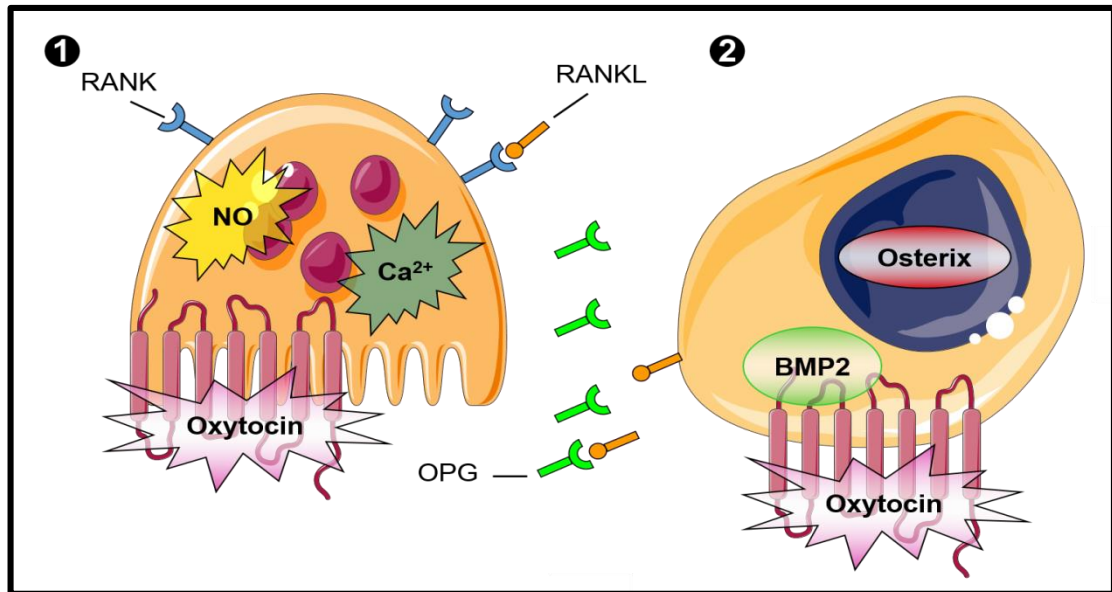
Kular e colaboradores (2012) descreveram a ligação de RANK, presente nas células precursoras de osteoclastos, com seu ligante RANKL, presente nas células osteoblásticas, células T e células endoteliais, como fatores essenciais na osteoclastogênese. A ligação RANK e RANKL resulta na estimulação da diferenciação de osteoclastos e ativação dessas células que resultam na reabsorção óssea. Descrevem também a presença do receptor osteoprotegerina (OPG) como antagonista da reabsorção óssea, já que este, ligando-se ao RANKL, inibe a reabsorção óssea, mantendo a integridade da mesma (SUZUKI et al., 2003; LITTLE, 2011). Steeve e colaboradores (2004) afirmaram que tanto os estrógenos quanto o TGF- $\beta$  aumentam a produção de OPG, diminuindo, conseqüentemente, a diferenciação e a ativação dos osteoclastos, bem como induzindo a apoptose dessas células. Além disto, por direta influência da queda na concentração estrogênica no período de pós-menopausa, através da relação RANK/RANKL/OPG, nota-se diminuição na expressão RANKL, aumento na formação, função e sobrevivência osteoclástica, o que predispõe à perda de massa óssea, enfraquecimento da microarquitetura e fraturas ósseas.

A OP, doença crônica progressiva, incapacitadora irreversível, é caracterizada por diminuição da massa óssea (LANYON et al., 2009) e por deterioração da microarquitetura óssea, conduzindo a fragilidade óssea e aumento da suscetibilidade a fraturas (MANOLAGAS, 2000). Esta pode ser causada por hiperparatireoidismo, hipercortisolismo, hipogonadismo, abuso ou mal uso de alguns medicamentos, baixa

concentração de estrógeno e cálcio e falta de carga mecânica sobre o osso que acompanha o estilo de vida sedentário (PINHEIRO et al., 2010). Entre os tratamentos para OP estão às terapias hormonais e antirreabsortivas: Terapia de Reposição Hormonal (TRH), Moduladores Seletivos de Receptores de Estrógeno (SERMs), Bifosfonatos, Calcitonina, Cálcio, Vitamina D, Fluoretos e PTH. Além destes, alternativa que está sendo estudada como promessa terapêutica é a ocitocina (OT), demonstrado a interferência de controle central na formação óssea. (BAYLINK et al., 1999; LEITE, 1999; LÓPEZ, 2000; RADOMINSKI et al., 2004; COLLI et al., 2012; QUIROS-GONZALEZ, 2014; COSMAN et al., 2014).

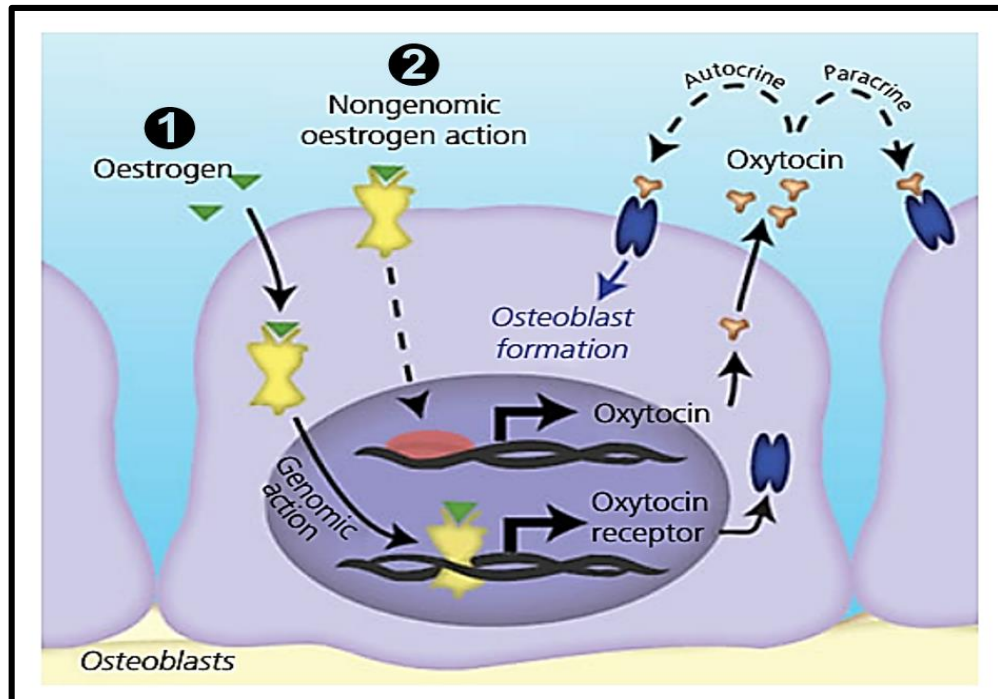
A OT é hormônio peptídico sintetizado em núcleos hipotalâmicos e armazenado na neurohipófise, classicamente envolvido com a gravidez (contração uterina) e lactação (ejeção do leite). Pouco se sabe sobre sua ação no metabolismo ósseo, porém, pesquisas já evidenciaram a importante ação da OT na sinalização intracelular de vários tecidos. Além de seus efeitos clássicos, os receptores de OT estão também expressos na pituitária, rim, ovário, testículo, timo, coração, endotélio vascular, mioblastos, células de pancreáticas, adipócitos, células cancerosas e no tecido ósseo em osteoblastos e osteoclastos humanos, indicando assim, efeitos da OT na remodelação e controle da homeostase óssea (COPLAND et al., 1999; COLUCCI et al., 2002; TAMMA et al., 2009; COLAIANNI et al., 2013).

Estudos descreveram a ação direta da OT sobre o esqueleto através da estimulação na formação de osteoblastos e modulação na formação e função de osteoclastos (COLAIANNI et al., 2013). Em células osteoblásticas, OT estimula a diferenciação para fenótipo mineralizante pela *up-regulation* de BMP-2, que controla a expressão de Schnurri-2 e 3, Osterix e ATF-4 (*Activating transcription factor 4*). Em células osteoclásticas, porém, OT exerce efeito dual. Estimula formação de osteoclastos de forma direta pela estimulação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e sinalização MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) e de forma indireta por *up-regulation* de RANK-L e *down-regulation* de OPG. Por outro lado, OT inibe a reabsorção óssea por osteoclastos maduros pelo aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e síntese de óxido nítrico (NO) (Figura 6) (COLAIANNI, 2014).



**Figura 6.** Imagem ilustrativa da presença de receptores de OT (Oxtr) e da modulação da OT em células ❶ osteoclásticas e ❷ osteoblásticas (ADAPTADO de Tamma, 2009)

A regulação da síntese de OT e de seu receptor (Oxtr) é mediada pela ação estrogênica e também de forma autócrina. O estrógeno é hormônio que controla a atividade osteoblástica, cujas células são capazes de sintetizar OT. Desta forma, pesquisas tem demonstrado que o estrógeno pode agir através de dois mecanismos distintos sobre a regulação da OT e seu receptor: via não-genômica e genômica. Quando o estrógeno liga-se ao seu receptor na membrana citoplasmática de células osteoblásticas, ocorre o desencadeamento de sinais e estimulação da transcrição e síntese de OT no núcleo destas células. Sendo assim, OT sai da célula osteoblástica para exercer seus efeitos de forma autócrina e parácrina (sobre outros osteoblastos), estimulando a formação dos mesmos, o que caracteriza o mecanismo de ação via não-genômica. Por outro lado, o estrógeno pode ligar-se ao seu receptor no citoplasma e, desta forma, estimular a transcrição e síntese de Oxtr em osteoblastos, caracterizando a via de ação genômica (Figura 7) (COLAIANNI et al., 2014).



**Figura 7.** Imagem ilustrativa das vias de ação estrogênica ❶ genômica e ❷ não-genômica sobre a estimulação da síntese de OT e seu receptor (Oxtr) (ADAPTADO de Colaianni, 2014)

Assim como o estrógeno age mediando a síntese de OT e seu receptor, o inverso também parece acontecer. Estudos mostraram que em camundongos *Oxtr<sup>-/-</sup>*, a ação do estrógeno no metabolismo ósseo é atenuada, sugerindo que sua ação é, em partes, dependente do receptor de OT intacto (COLAIANNI et al., 2014).

Embora haja muitos estudos envolvendo a fisiopatologia, as formas de prevenção e tratamento para OP, ainda é necessário desenvolver pesquisas que busquem alternativas para a prevenção e tratamento da doença. A elucidação sobre os mecanismos da ação da OT faz dela uma das promessas, principalmente neste período de envelhecimento do organismo feminino que expressam alteração na secreção de hormônios ovarianos. Estudo de nosso laboratório realizado com ratas velhas (24 meses) tratadas com OT para análise da formação óssea após exodontia demonstrou atuação estimuladora da OT no reparo, pois os animais apresentaram melhora nos parâmetros de formação e diminuição na reabsorção óssea durante o processo de reparação alveolar (COLLI et al., 2012). Diante destes achados, ressalta-se a importância da realização de estudos para elucidar a atuação da OT em tecidos que não estão em processo de reparação, principalmente em fêmures de ratas adultas e na pré-estropausa para prevenção e tratamento da OP.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com OT no remodelamento ósseo do colo femoral de ratas Wistar adultas e senis.

### 2.2. Objetivos específicos

Com base nas evidências obtidas na revisão de literatura sistemática e resultados preliminares, algumas hipóteses foram formuladas com o objetivo de estabelecer e melhor compreender a ação da OT no metabolismo ósseo durante o período de envelhecimento:

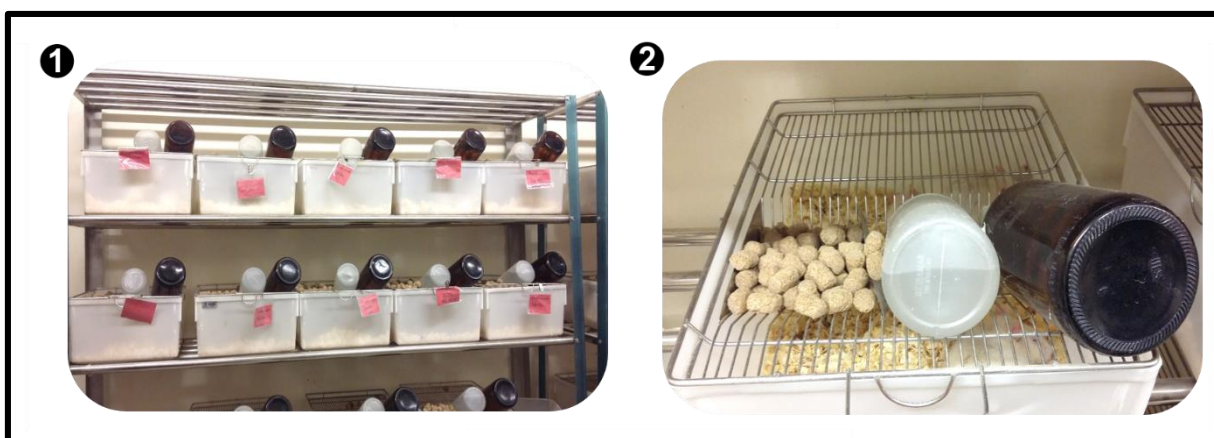
- Testar a hipótese de que, *in vivo*, à semelhança do que ocorre em humanos, a estrutura óssea cortical e trabecular na região do colo femoral de ratas cíclicas apresentam maior área, melhores propriedades biomecânicas e índices dos marcadores de remodelamento ósseo em relação às ratas acíclicas.
- Testar a hipótese de que a OT proporciona melhora da qualidade óssea trabecular e cortical em ratas acíclicas, diminuindo os riscos de osteopenia e osteoporose primária.

## **METODOLOGIA**

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Animais

Foram utilizadas 32 ratas da linhagem Wistar com 12 e 18 meses. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, com oito animais cada: 1 - animais de 12 meses que receberam veículo (NaCl; Veh/12), 2 - animais de 12 meses que receberam ocitocina (Ot/12), 3 - animais de 18 meses que receberam veículo (Veh/18) e 4 - animais de 18 meses que receberam OT (Ot/18). As ratas foram mantidas em gaiolas coletivas (4 animais/caixa) em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo de luz (12/12h) e umidade ( $55 \pm 10\%$ ) controlados e acesso livre à água e ração (Figura 8). O protocolo experimental foi aprovado (2014-01379) pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba (FOA/UNESP).



**Figura 8.** ❶ Biotério com gaiolas devidamente identificadas ❷ Gaiola contendo 4 animais com acesso livre à água e ração

#### 3.2. Ciclo Estral

O esfregaço vaginal foi colhido para verificação do ciclo estral, segundo a técnica de Long & Evans (1922), e analisado a fresco ao microscópio óptico antes e após período de tratamento para divisão e acompanhamento dos grupos experimentais. Como critério de inclusão somente foi utilizado nesse estudo ratas de 12 meses com ciclo estral regular (apresentando as fases diestro, proestro, estro, metaestro) e ratas de 18 meses com irregularidade do ciclo estral (aciclicidade). Após a confirmação da regularidade (12 meses) e irregularidade (18 meses) do ciclo estral, os animais foram submetidos aos tratamentos com veículo (Veh) ou OT (Figura 9).



### 3.3. Administração de Ocitocina e Veículo

Trinta e cinco dias antes de completarem suas respectivas idades (12 e 18 meses), os animais receberam 2 injeções intraperitoneais com 12 horas de intervalo (7h – 19h) de solução fisiológica (0,9%; Veh/12 e 18) ou OT (134 µg/kg - Ot / 12 e 18 meses) (Sigma Aldrich, Munich, Germany) (Tamma et al., 2009; Colli et al., 2012) (Figura 9).

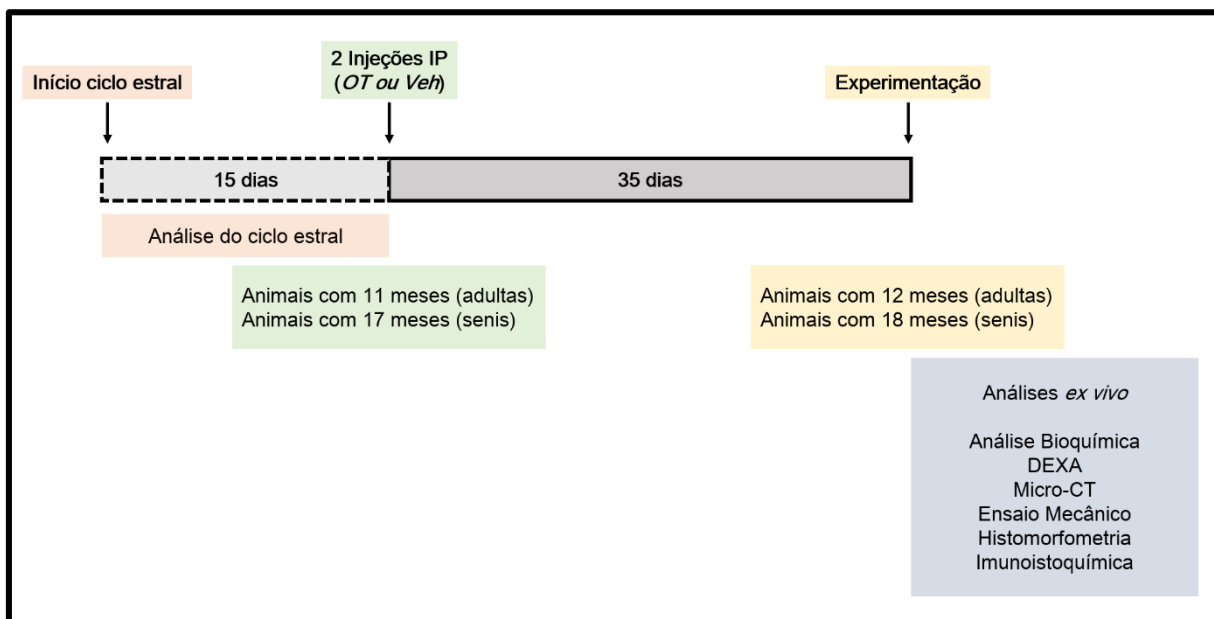


Figura 9. Diagrama esquemático do experimento animal

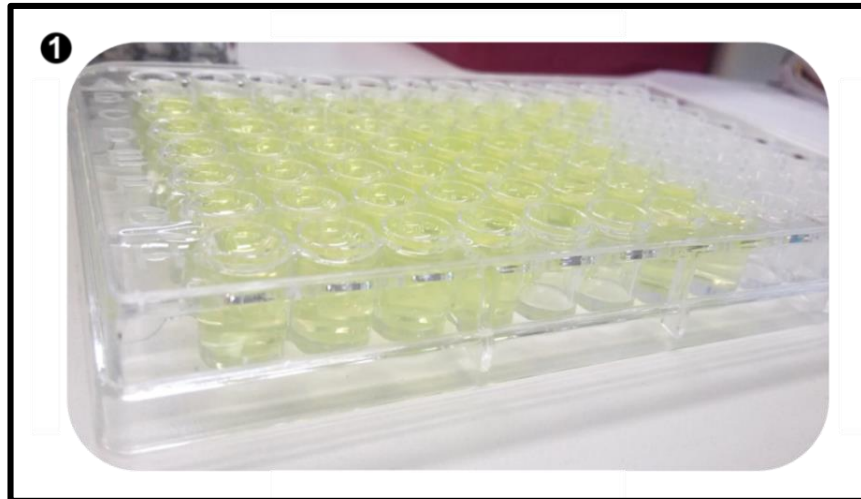
### 3.4. Coleta das Amostras

Após este período, os animais foram decapitados e a coleta sanguínea foi realizada. O sangue foi centrifugado (soro: 2.500 RPM; 15 min; 20°C) e armazenado para dosagem sorológica de marcadores de atividade celular do metabolismo ósseo. Logo após a coleta sanguínea, foi realizada a retirada asséptica dos fêmures. Os fêmures direitos foram armazenados em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e em seguida em freezer -20°C para análise de densitometria, microarquitetura óssea e ensaio mecânico. Os fêmures esquerdos foram imediatamente processados para análise histológica. Após coleta sanguínea e óssea, o útero foi retirado e seu peso foi registrado. O peso corporal dos animais foi registrado antes e após o período de tratamento.

### 3.5. Ensaios de Marcadores Bioquímicos de Remodelação Óssea

A atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) (U/L) no soro foi determinada por ensaio colorimétrico utilizando o protocolo adaptado de GRANJEIRO et al. (1997) e JANCKILA et al. (2006) (Figura 10). Resumidamente, alíquota de 25 µL de soro foi submetida ao ensaio em 0,5 mL de mistura reacional que consiste em fosfato de p-nitrofenilo 10mM (pNPP), acetato de sódio 100mM, pH 5,8, tartarato de sódio 50 mM e p-hidroxi benzoato de mercúrio 1 mM (pHMB), este atua por inibição das fosfatases de baixo peso molecular (LAIDLER et al., 1982). A reação foi iniciada por adição do substrato e prosseguiu durante 1h, mantido em banho a 37°C. O ensaio foi terminado por adição de 0,25mL de NaOH 1M, e a absorvância a 405 nm determinada para especificar a quantidade de p-nitrofenolato (pNP) formada durante a reação. Os controles sem enzima foram incluídos em cada ensaio para ajustar a hidrólise não-enzimática de pNPP. Unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar 1µmol de pNPP por min a 37°C.

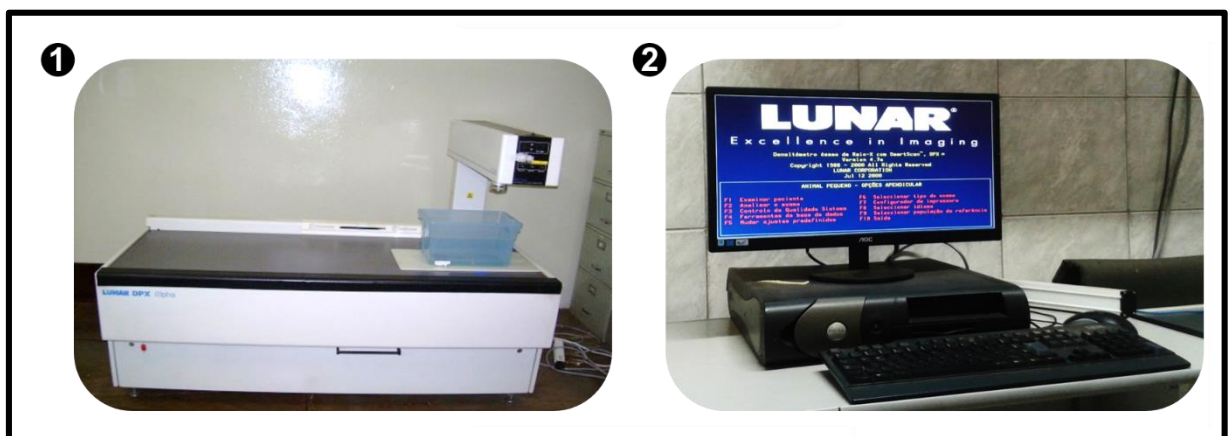
O marcador plasmático de formação óssea, fosfatase alcalina (FAL) (U/L), foi determinado utilizando ensaio colorimétrico que dosa a formação dependente do tempo de p-nitrofenilo (pNP) a partir de pNPP em conformidade com o protocolo adaptado de CHAVES NETO e colaboradores (2011). O protocolo usado 25µL de soro num volume total de 0,5 mL contendo 2,5 mM de pNPP, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 2 mM, tampão glicina 25mM, pH 9,4. A reação foi iniciada por adição do substrato, e procedeu-se durante 30 min, mantido em banho a 37°C. O ensaio foi terminado pela adição de 0,25 mL de solução 1M de hidróxido de sódio (NaOH), e a absorbância a 405 nm determinada para determinar a quantidade de pNP formado durante a reação. Unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima que é necessária para hidrolizar 1µmol de pNPP por min a 37°C.



**Figura 10. 1** Dosagem sorológica para ensaio de marcadores bioquímicos de remodelação óssea (TRAP e FAL)

### 3.6. Densitometria Óssea

O conteúdo mineral ósseo (CMO; g) e a área óssea ( $\text{cm}^2$ ) foram analisados nos fêmures direitos dos animais, utilizando o DEXA (*dual-energy x-ray absorptiometry*), densitômetro modelo DPX-ALPHA, com software especial para pequenos animais (Figura 11). Esses dados foram utilizados para a determinação da densidade mineral óssea areal (DMOa;  $\text{g}/\text{cm}^2$ ) de todos os animais experimentais.

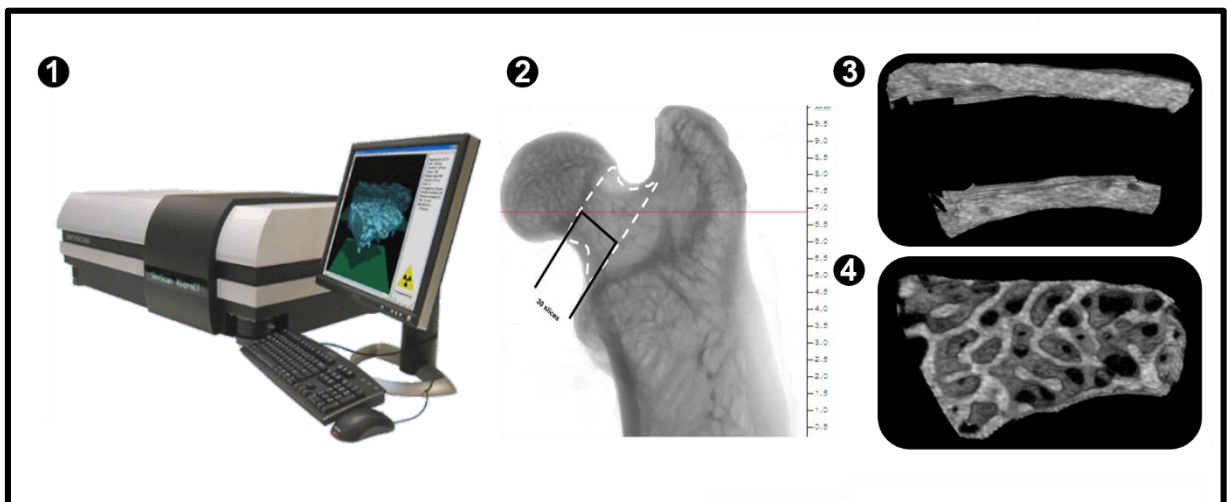


**Figura 11. 1** Densitômetro DPX-ALPHA para análise de densitometria óssea **2** Software de análise para pequenos animais

### 3.7. Microtomografia Óssea

Realizada com microtomógrafo computadorizado Skyscan 1272 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), utilizado para avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea (Figura 12). O fêmur foi posicionado craniocaudalmente para obtenção de “slices” com resolução de  $12 \times 12 \times 12 \mu\text{m}$  (TATSUMI et al., 2008). A

região de interesse de osso esponjoso e cortical foi manualmente interpolada para análise de 30 slices (fatias) na região do colo femoral, 2 mm abaixo da primeira imagem óssea escaneada. Os parâmetros analisados no osso trabeculado incluem: Porcentagem do Volume Ósseo (BV/TV) (%), Espessura das Trabéculas (Tb.Th) (mm), Número de Trabéculas (Tb.N), Separação das Trabéculas (Tb.Sp) (mm), Grau de Anisotropia (DA). Na análise do osso cortical foi analisado: Área Óssea Cortical (Ct.Ar) (mm<sup>2</sup>), Espessura Cortical Média (Ct.Th) (mm), Porcentagem da Porosidade Cortical (Ct. Po) (%).

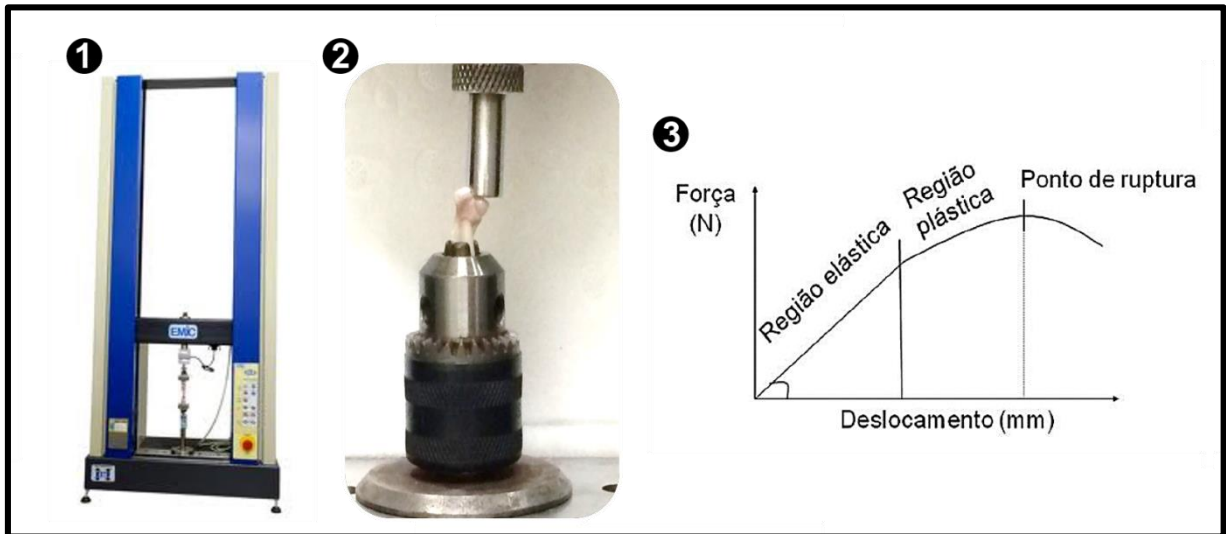


**Figura 12.** ❶ Microtomógrafo Skyscan 1272 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica) para análise de microtomografia óssea trabecular e cortical ❷ Imagem representativa do posicionamento crânio-caudal do fêmur no microtomógrafo ❸ Imagem de reconstrução cortical do colo femoral ❹ Imagem de reconstrução trabecular do colo femoral

### 3.8. Ensaio Mecânico

O teste biomecânico permite conhecer algumas propriedades do tecido ósseo através do ensaio de compressão, como, por exemplo, a força máxima (N) sustentada pelo mesmo antes de sofrer fratura, e a rigidez ( $\times 10^3 \text{N/m}$ ) (DALMOLIN et al., 2013). O ensaio mecânico deste estudo foi realizado com distância entre apoio de 20 mm em superfície e com velocidade de aplicação da carga (força) de 0,25 mm/min, na Máquina de Ensaio Universal EMIC/Mod DL3000 (Figura 13). Os valores foram registrados em sistemas computacionais do próprio fabricante, que fornece diretamente os valores de força máxima admitidos pelo fêmur. Na análise biomecânica foi avaliada, por meio da curva de força X deslocamento, a resistência óssea, analisando a força máxima (N) admitida pelo tecido ósseo e rigidez

( $\times 10^3 \text{N/m}$ ). A distância do vão de apoio foi de 20 mm, e a célula de carga utilizada de 2000N.



**Figura 13.** ❶ Máquina de Ensaio Universal EMIC/Mod DL3000 ❷ Ensaio de compressão da cabeça do fêmur ❸ Esquema da curva Força X Deslocamento obtido do ensaio mecânico. Região elástica compreende a deformação do corpo de prova e retorno do mesmo à sua forma original. Região plástica compreende a deformação irreversível do corpo de prova. Ponto de ruptura compreende o primeiro instante após o registro da força máxima (N)

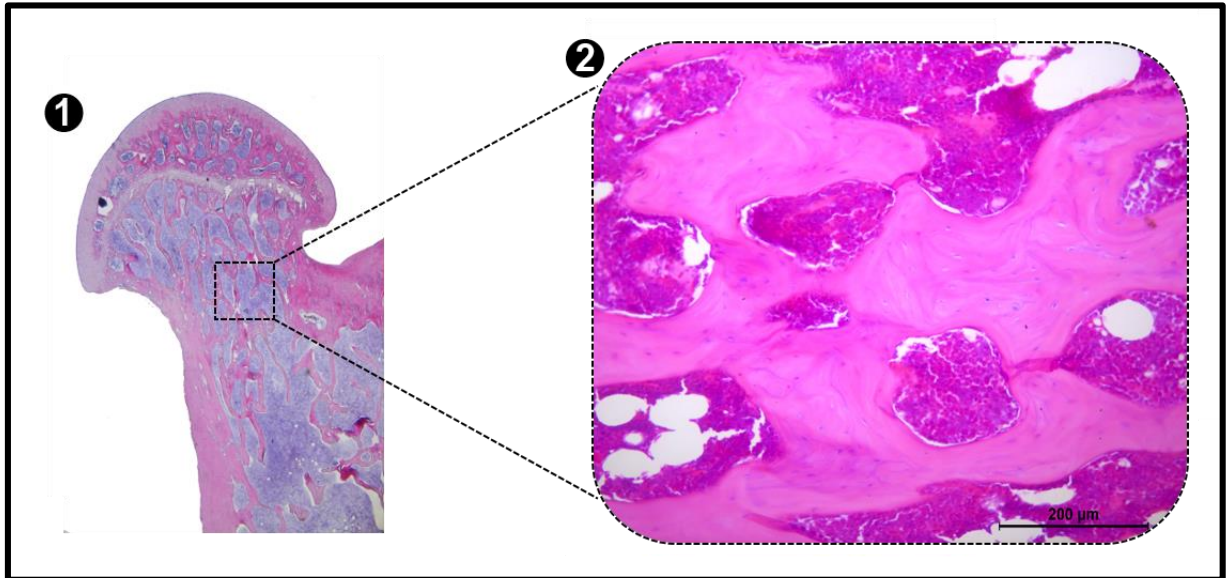
### 3.9. Processamento histológico das amostras

Os fêmures esquerdos foram fixados em formalina neutra (10%), durante 24 horas, em temperatura ambiente. Após este período, os fêmures foram lavados em água corrente por 24 horas e descalcificados em solução de EDTA (10%). Após descalcificados, foram lavados em água corrente (24 horas), desidratados, diafanizados e incluídos em parafina pelo método de rotina. Nos blocos obtidos, foram efetuados cortes semi-seriados com 3 micrômetros de espessura ao longo do plano coronal da região epifisária proximal do fêmur. Os cortes para análise histomorfométrica foram colocados em lâminas foscas, lapidadas e posteriormente coradas com hematoxilina e eosina, e os cortes para análise imunoistoquímica para proteínas do metabolismo ósseo foram colocados em lâminas silanizadas.

#### 3.9.1. Análise Histomorfométrica

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por câmera digital acoplada a microscópio óptico (Leica DM400 B LED, Wetzlar, Germany) com aumento original de 200x e salvas em computador. A área ( $853.333.333 \mu\text{m}^2$ ) da região trabecular do colo do fêmur (Figura 14) foram analisados com auxílio do

programa de processamento de imagens baseado em Java (ImageJ, National Institutes of Health, versão 51.52.0.0) com 2.4 de distância em pixels. Os dados foram apresentados como percentual de área óssea.



**Figura 14.** ❶ Região de interesse da análise histomorfométrica – tecido ósseo trabecular do colo femoral ❷ Aumento de x 400 do tecido ósseo trabeculado da região do colo femoral

### 3.9.2. Análise Imunoistoquímica

No estudo proposto foram realizadas marcações imunoistoquímica nos cortes histológicas dos fêmures (epífise proximal) dos animais. Foram utilizados anticorpos primários (diluição 1:100) contra RUNX2 (Goat anti-RUNX2 – SC8566), OSTERIX (AB22552), OCN (Goat anti-osteocalcin – SC18319), OPN (Goat anti-osteopontin – SC10593), BMP-2/4 (Goat anti-BMP – SC9003), PER (Goat anti-periostin – SC67233), ESC (Goat anti-esclerostin – ORB100211) e TRAP (Goat anti-TRAP - SC 30832). Os anticorpos secundários (1:200) foram anti-coelho biotinilado. A técnica para imunomarcacão foi adaptada de GARCIA et al. (2014) e apresenta os seguintes passos: recuperação do antígeno; bloqueio da peroxidase endógena; bloqueio de sítios inespecíficos; incubação em anticorpo primário; incubação em anticorpo secundário; sistema avidina-biotina para amplificação do sinal; evidenciación da imunomarcacão utilizando diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. A imunomarcacão foi definida como coloração acastanhada presente no núcleo celular (RUNX2, OSX) ou citoplasma celular (OCN, OPN, BMP-2/4, PER, ESC e TRAP). As pontuações de imunomarcacão para Runx2, OSX, OPN, BMP-2/4, PER, ESC e TRAP foram adaptadas de FARIA et al. (2008): escore 3 indica alto padrão, mais de



8 células imunorreativas (IR) por área; escore 2 indica padrão moderado, de 3 a 7 células IR por área; escore 1 indica baixo padrão, menos de 3 células IR por área; e escore 0 indica ausência de imunomarcção. Apenas as células TRAP-positivas multinucleadas perto da superfície óssea foram quantificadas. As pontuações de imunomarcção para OCN foram adaptadas de GARCIA et al. (2014): escore 3 indica alto padrão, aproximadamente 75% de células IR por área; escore 2 indica padrão moderado, cerca de 50% de células IR por área; escore 1 indica baixo padrão, cerca de 25% de células IR por área; e escore 0 indica ausência de imunomarcção. Estas pontuações de imunomarcção foram comparadas entre os grupos experimentais. A especificidade das marcações foi confirmada através da exclusão do anticorpo primário em lâminas controle. Todas as incubações dos anticorpos foram realizadas em câmara úmida à temperatura de 25°C (Figura 15).



**Figura 15.** ❶ Etapa de lavagem das lâminas silanizadas em PBS durante o procedimento de imunoistoquímica ❷ Etapa de recuperação do antígeno em tampão citrato na panela de pressão durante o procedimento de imunoistoquímica ❸ Lâminas coradas em hematoxilina (imagem: OCN e TRAP) e em fast green (imagem: RUNX2)

### 3.10. Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do *GraphPad Prism* 6.0, expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . Os dados foram submetidos ao Teste T para verificar ação da OT em cada idade (+ vs Veh/12; \* vs Veh/18) e Análise de Variância (ANOVA) *TWO-WAY* seguida pelo *pós teste* de *Tukey* para verificar ação da OT ao longo da idade e interação OT e tratamento (\* interação significativa de OT e idade). A análise imunoistoquímica foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* não paramétrico seguida por *pós-teste* de *Newman-Keuls* (+ vs Veh/12; \* vs Veh/18).

## **RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Peso corporal e uterino

A análise dos pesos inicial e final dos animais com 12 ou com 18 meses evidenciou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. Também verificamos que não houve interação idade e tratamento com OT para o peso corporal (Tabela 1).

O acompanhamento do ciclo estral das ratas com 18 meses evidenciou as fases de diestro e metaestro persistente e caracterizou o período de periostropausa. O peso do útero desses animais contribuiu para caracterizar a aciclicidade estral uma vez que os animais de 18 meses apresentaram menor peso uterino ( $p = 0,0488$ ) e menor volume de líquido em seu interior em comparação com os animais de 12 meses que apresentam ciclo regular e maior concentração de líquido. Quando considerado o tratamento, observamos que este não foi eficaz em estimular o tecido endometrial, visto que não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais.

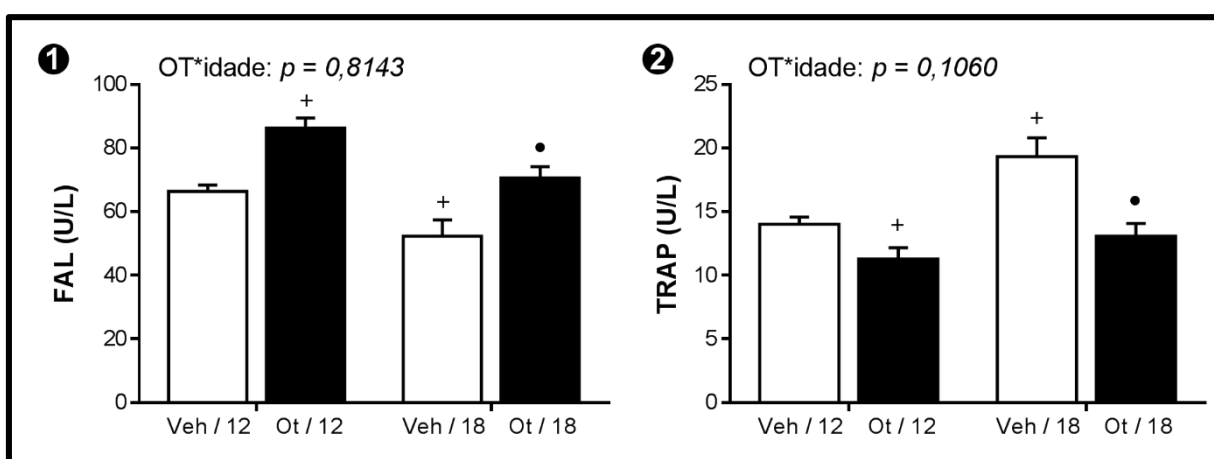
| Grupo    | Peso Inicial (g)  | Peso Final (g)     | Peso do útero (g)  |
|----------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Veh / 12 | 367.5 $\pm$ 7.13  | 367.5 $\pm$ 11.10  | 0.733 $\pm$ 0.032  |
| Ot / 12  | 357.5 $\pm$ 11.84 | 351.25 $\pm$ 13.12 | 0.711 $\pm$ 0.040  |
| Veh / 18 | 390.5 $\pm$ 11.35 | 386.4 $\pm$ 12.38  | 0.629 $\pm$ 0.034+ |
| Ot / 18  | 415.7 $\pm$ 18.37 | 406.4 $\pm$ 17.82  | 0.699 $\pm$ 0.069  |

**Tabela 1.** Peso corporal inicial (11 e 17 meses) e final (12 e 18 meses) e peso uterino/100g de peso corporal de animais Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. Abreviaturas e símbolos: Veh/12= animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18= animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; + vs Veh/12 ( $p = 0,0488$ )

### 4.2. Marcadores de remodelação óssea

Com a finalidade de verificar se OT exerce ação na remodelação óssea, foi realizada a determinação sérica de marcador de formação (FAL) e de reabsorção (TRAP) óssea. Quando comparados os animais com 12 e 18 meses do grupo veículo, foi verificada diminuição ( $p = 0,0066$ ) de FAL nos animais mais velhos. Após 35 dias do tratamento com OT foi verificado aumento na FAL sérica dos animais com

12 meses ( $p < 0,0001$ ) e 18 meses ( $p = 0,0138$ ) quando comparados aos seus respectivos veículos. A TRAP foi significativamente maior nos animais com 18 meses quando comparados com animais com 12 meses ( $p = 0,0057$ ). Entretanto, verificou-se que após a administração de OT ocorreu diminuição na TRAP sérica nos animais com 12 meses ( $p = 0,0465$ ) e 18 meses ( $p = 0,0045$ ), quando comparados com os seus veículos. A análise em two-way ANOVA demonstrou não haver diferença estatística significativa na interação do tratamento com OT e a idade em relação aos biomarcadores ósseos, mostrando que o tratamento e a idade afetam estes parâmetros de maneira independente. Estes resultados estão expressos na Figura 16.



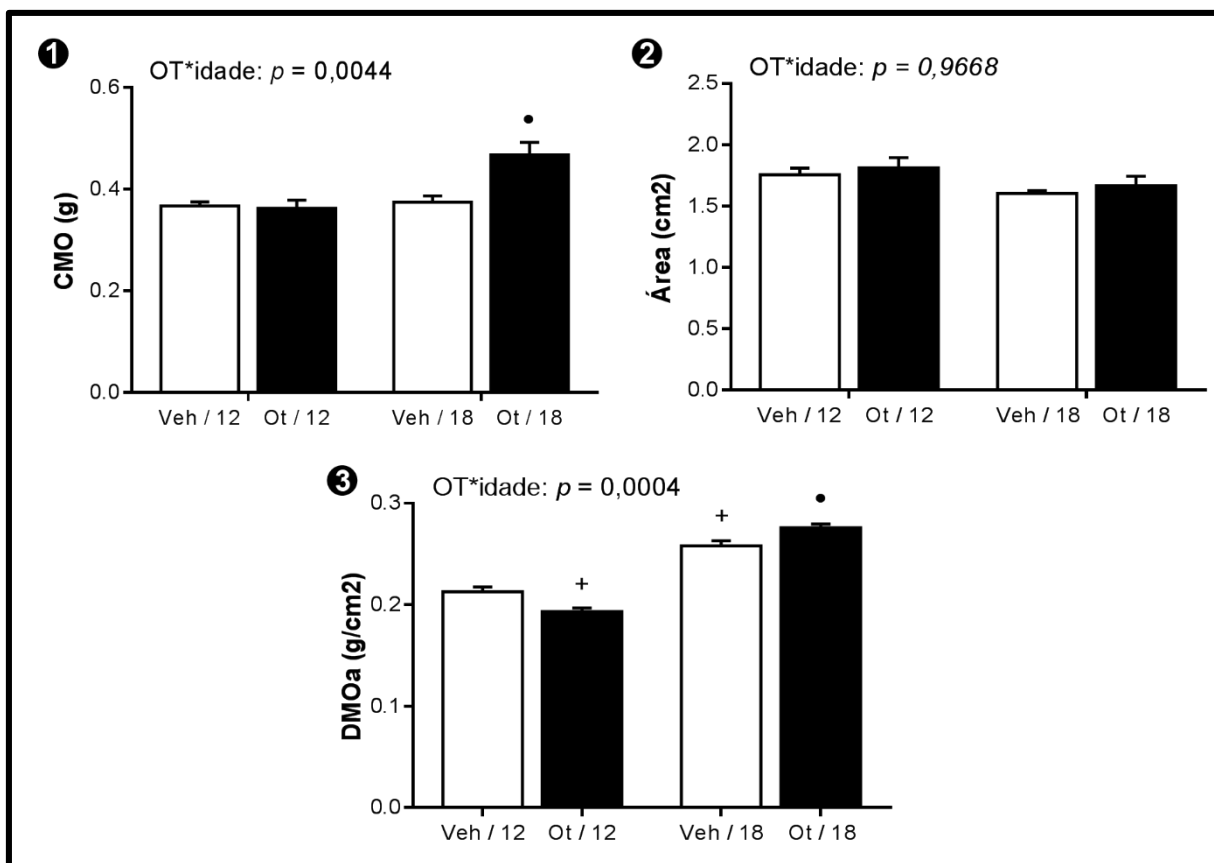
**Figura 16.** Marcadores sorológicos de remodelação óssea em ratos Wistar adultos e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Concentração sorológica de ❶ Fosfatase Alcalina (FAL) e ❷ Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP). Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12= animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18= animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12; • vs Veh/18

#### 4.3. Densitometria óssea

Após 35 dias do tratamento com OT foi verificado aumento na DMOa dos animais que receberam OT de 12 meses ( $p = 0,0036$ ) e de 18 meses ( $p = 0,0556$ ) quando comparados aos seus respectivos veículos. Quando comparados com os animais do grupo Veh/12, os animais Veh/18 ( $p < 0,0001$ ) apresentaram aumento da DMO. A análise *two-way ANOVA* demonstrou interação significativa entre o tratamento com OT e a idade ( $p = 0,0004$ ).

Para o parâmetro de CMO, os animais de 12 meses não apresentaram diferença estatística após tratamento com OT, enquanto que os animais Veh/18

apresentaram aumento do CMO quando comparada ao seu respectivo veículo ( $p = 0,0556$ ). A análise *two-way ANOVA* não demonstrou interação significativa entre o tratamento com OT e a idade. E para o parâmetro de área óssea não houve diferenças estatisticamente significantes. Estes dados estão demonstrados na Figura 17.



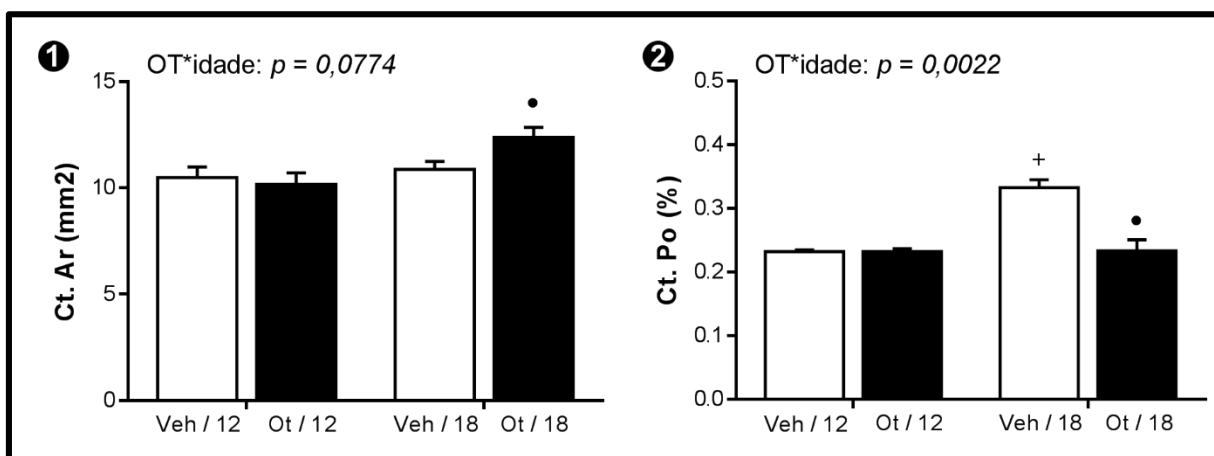
**Figura 17.** Parâmetros biomecânicos de ❶ Conteúdo Mineral Ósseo (CMO), ❷ Área e ❸ Densidade Mineral Óssea areal (DMOa) de ratos Wistar adultos e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviações e símbolos: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12; + vs Veh/18

#### 4.4. Microarquitetura óssea

A reconstrução 3D das imagens da microtomografia óssea cortical e trabecular do colo femoral dos animais experimentais obtidas através da microtomografia óssea está demonstrada nas Figura 18 e 19.

Os resultados da microtomografia óssea da cortical do colo femoral evidenciam que não houve diferença para os parâmetros analisados Ct.Ar e Ct.Po no grupo Ot/12 quando comparado aos grupo Veh/12. Para os grupos de animais

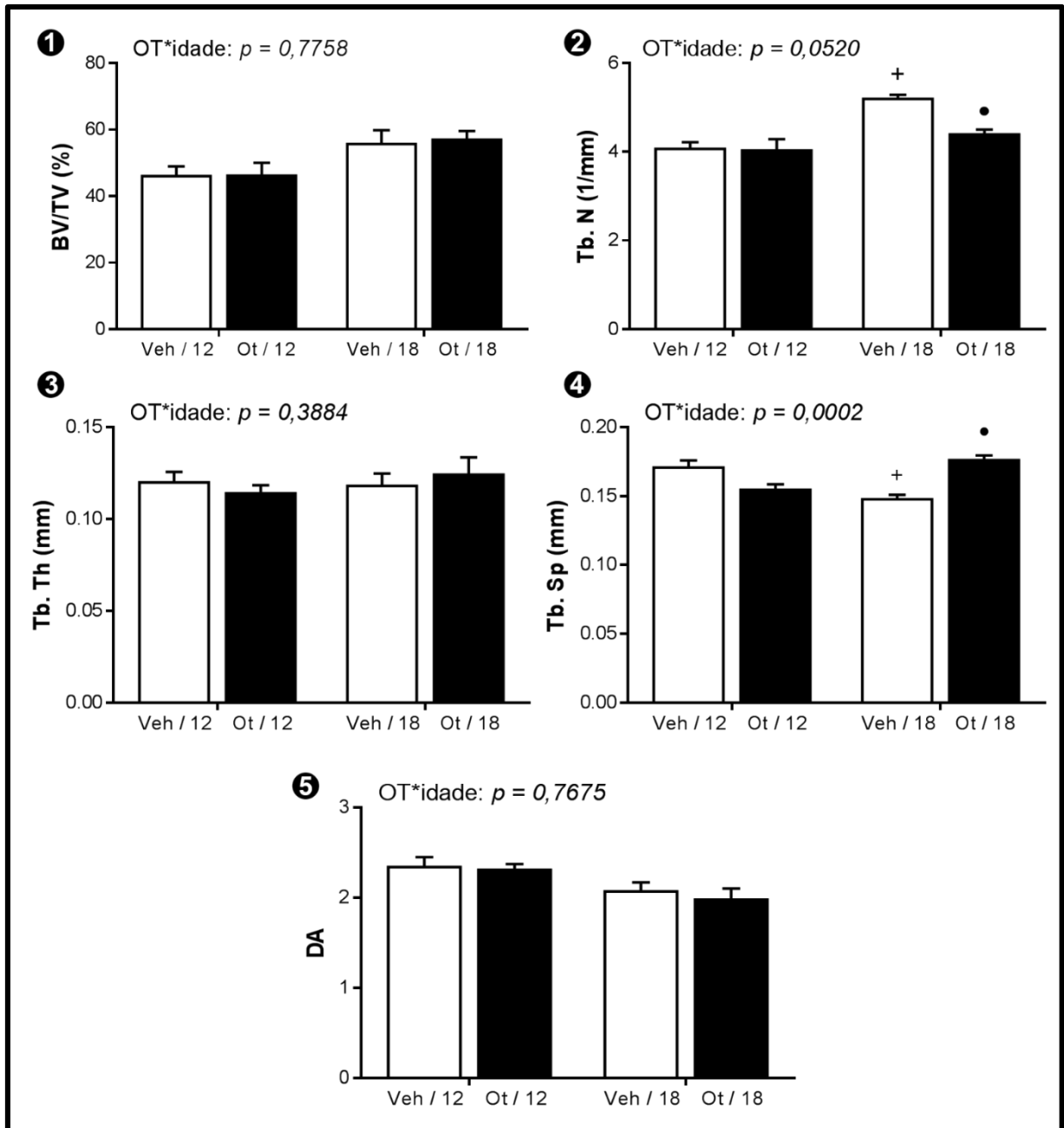
de 18 meses observamos que Ct.Ar foi maior ( $p = 0,0416$ ) e Ct.Po foi menor no grupo Ot/18 ( $p = 0,0102$ ) quando comparados com Veh/18. Quando se compara o grupo Veh/18 ao Veh/12 não foi observado diferença para Ct.Ar, porém, houve aumento significativo de Ct.Po ( $p = 0,0015$ ). A análise two-way ANOVA demonstrou que Ct.Ar e Ct.Po apresentaram interação entre o tratamento com OT e a idade ( $p = 0,0774$  e  $p = 0,0022$ ) (Figura 18).



**Figura 18.** Parâmetros de microarquitetura óssea cortical para ❶ Área Óssea Cortical (Ct. Ar) e ❷ Porcentagem de Poros Corticais (Ct. Po) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA two-way, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12, \* vs Veh/18

Os resultados da microtomografia óssea do trabeculado do colo femoral evidenciam que para os parâmetros BV/TV, Tb.Th e DA não foram observadas diferenças significantes. Os parâmetros Tb.N e Tb.Sp não foram significativamente diferentes entre os grupos Veh e Ot de 12 meses. Porém, nos animais com 18 meses observamos que Tb.N foi menor e Tb.Sp foi maior no grupo de animais Ot / 18 ( $p = 0,0016$  e  $p = 0,00010$ , respectivamente) quando comparado com Veh/18.

Quando comparado ao Veh/12, os animais do grupo Veh/18 ( $p = 0,0006$ ) demonstraram significativo aumento no Tb. N e diminuição de Tb.Sp ( $p = 0,0096$ ). A análise two-way ANOVA demonstrou não haver interação significativa do tratamento com OT e a idade para Tb.N, porém foi significativa entre tratamento com OT e idade para Tb.Sp ( $p = 0,0002$ ) (Figura 19).



**Figura 19.** Parâmetros de microarquitetura óssea trabecular para ❶ Razão entre o volume ósseo da amostra e o volume da amostra (BV/TV); ❷ Número de Trabéculas (Tb.N); ❸ Espessura das Trabéculas (Tb.Th) ❹ Separação das Trabéculas (Tb.Sp) e ❺ Grau de Anisotropia (DA) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12= animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18= animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12; • vs Veh/18

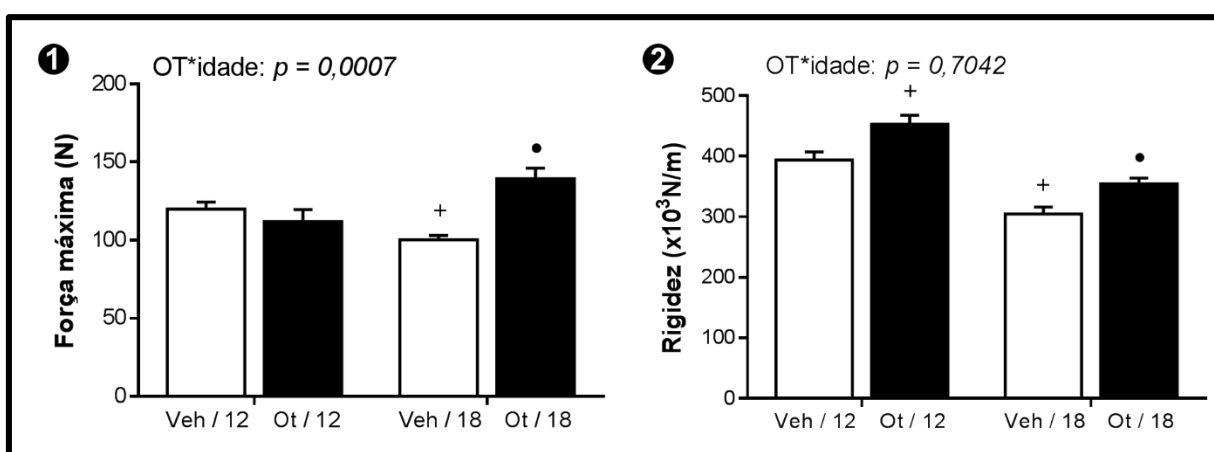
#### 4.5. Força e rigidez óssea

Nos dados de ensaio mecânico, os animais do grupo Ot/12 não apresentaram maior resistência óssea a força (N) aplicada quando comparados ao grupo Veh/12. Entretanto, os animais do grupo Ot/18 ( $p = 0,0003$ ) apresentaram melhora

extremamente significativo neste parâmetro quando comparados ao grupo Veh/18. A análise two-way ANOVA demonstrou interação extremamente significativa no tratamento com OT e a idade para o parâmetro de força máxima ( $p = 0,0007$ ), demonstrando que o tratamento com OT é influenciado pela idade do animal.

A rigidez óssea foi significativamente maior nos animais dos grupos Ot /12 ( $p = 0,0223$ ) e Ot/18 ( $p = 0,0145$ ) quando comparados aos seus controles Veh/12 e Veh/18. Houve diminuição da rigidez no grupo Veh/18 ( $p = 0,0030$ ) quando comparado ao Veh/12. A análise two-way ANOVA demonstrou que a interação no tratamento com OT e a idade não foi significativa.

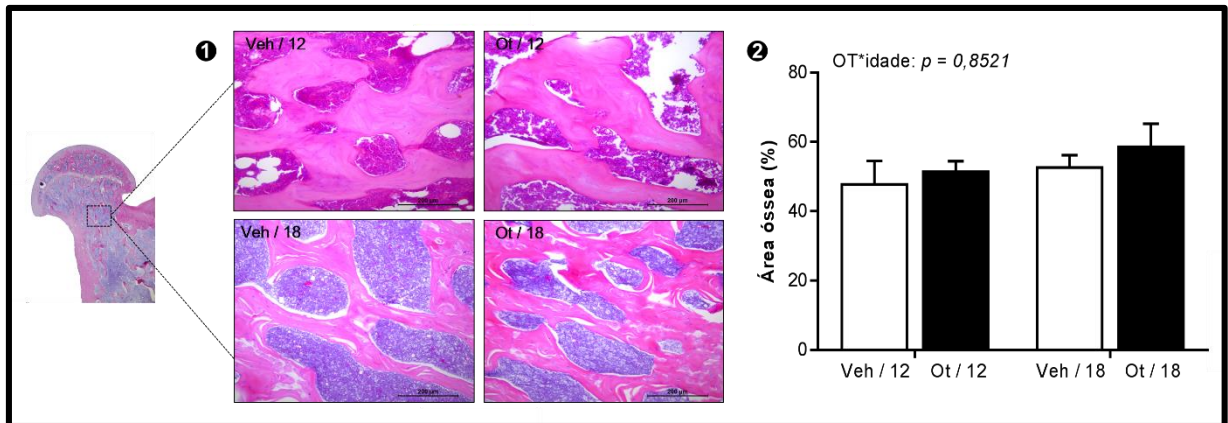
Os dados de força máxima e rigidez óssea estão apresentados na Figura 20.



**Figura 20.** Parâmetros biomecânicos de ❶ força máxima e ❷ rigidez de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA two-way, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade, + vs Veh/12; \* vs Veh/18

#### 4.6. Histomorfometria do colo femoral

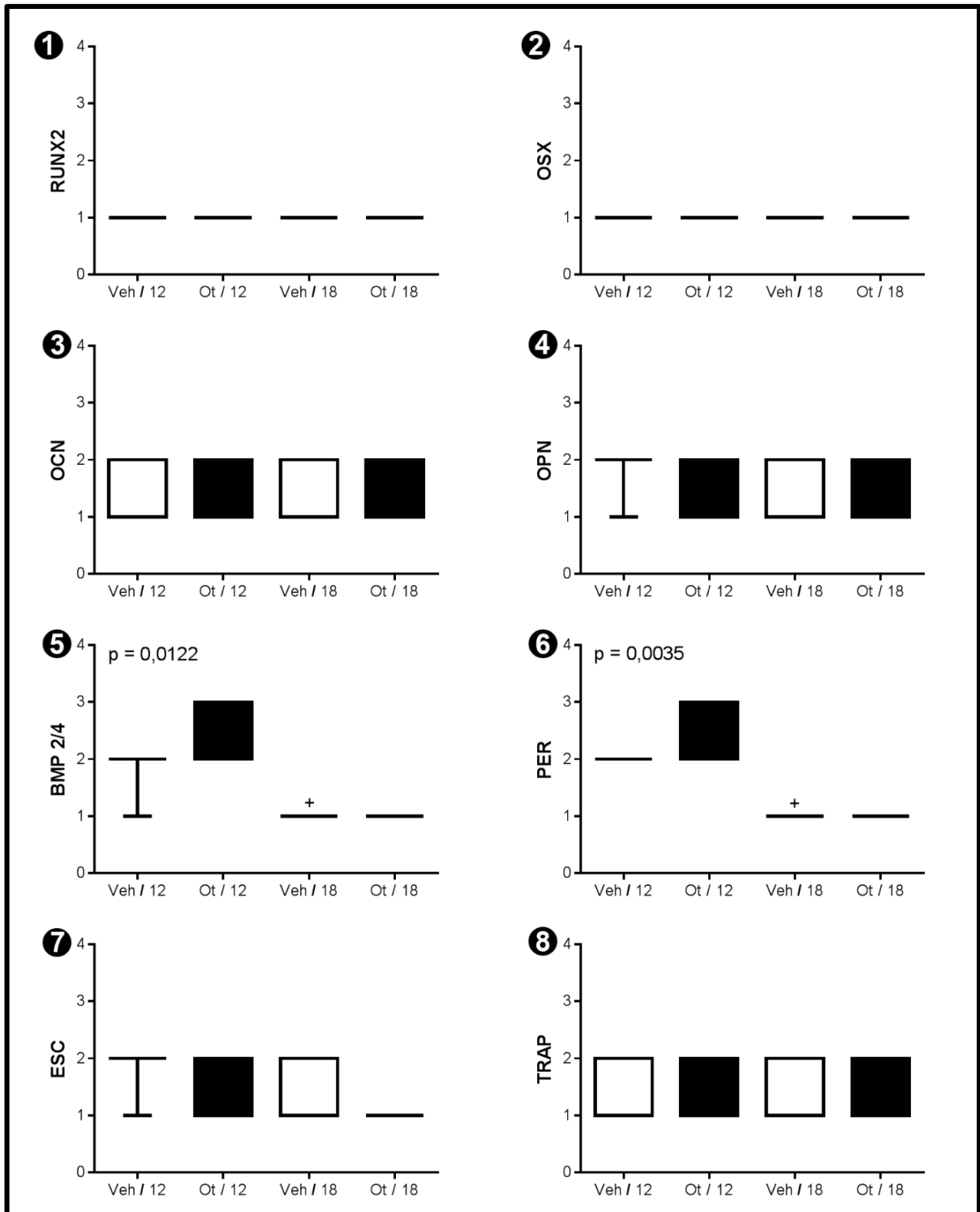
Para a histomorfometria do colo femoral de ratas Wistar (12 e 18 meses) tratadas com OT (Figura 21), os resultados demonstraram que não houve efeito significativo da OT ou da idade para este parâmetro. A interação de ambos também não apresentou resultado significativo, mostrando que o tratamento com OT independentemente da idade não altera a porcentagem na área óssea do colo femoral em ratas Wistar.



**Figura 21.** Fotomicrografia com coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) demonstrando a ❶ morfologia óssea e o ❷ gráfico demonstrando a área óssea da região de interesse (colo femoral) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. Cada coluna representa a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com Teste T e ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ) para analisar o efeito do tratamento OT em cada idade e ao longo do envelhecimento, e quaisquer interações (OT\*idade). Abreviaturas e símbolos: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT; \* interação significativa de OT e idade

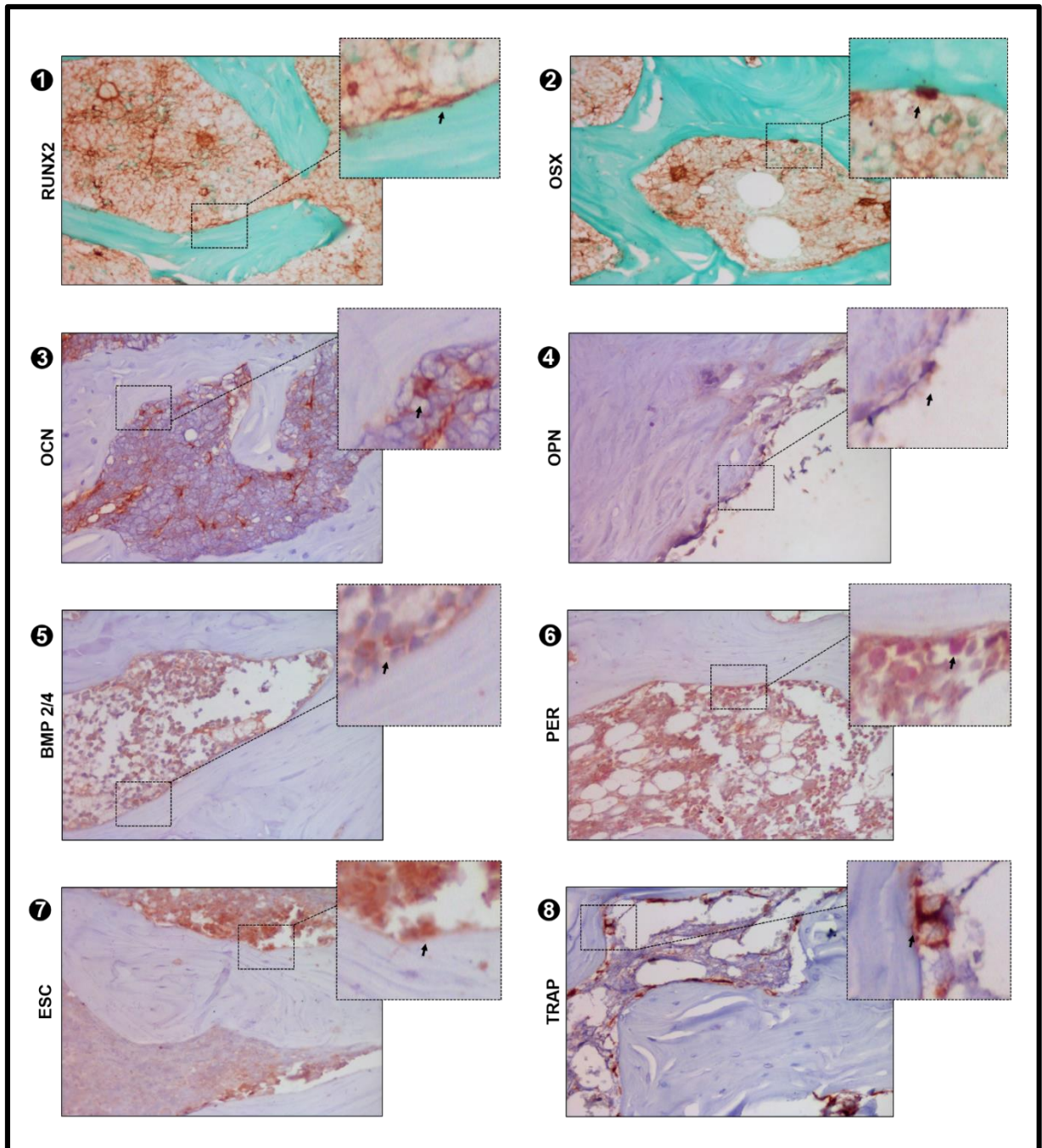
#### 4.7. Imunoistoquímica

Os resultados obtidos (Figura 22 e 23) na análise da técnica de imunoistoquímica não apresentaram diferença estatística para RUNX2, OSX, OCN, OPN, ESC e TRAP nos grupos experimentais. Porém, houve diferenças estatisticamente significantes em BMP-2/4 e PER quando comparados os seus grupos controle (Veh/12 e 18), demonstrando diminuição destas proteínas com o decorrer da idade.



**Figura 22.** Gráficos que mostram o padrão de imunorreatividade para ❶ Fator de transcrição relacionado com o runt 2 (RUNX2), ❷ Osterix (OSX), ❸ Osteocalcina (OCN), ❹ Osteopontina (OPN), ❺ Proteína Óssea Morfogenética 2 e 4 (BMP-2/4), ❻ Periostina (PER), ❼ Esclerostina (ESC) e ❽ Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) de ratos Wistar adultos e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* não paramétrica seguida por pós-teste de *Newman-Keuls*. Abreviações: Veh/12 = animais de 12 meses que receberam veículo; Ot/12= animais de 12 meses que receberam OT; Veh/18 = animais de 18 meses que receberam veículo; Ot/18= animais de 18 meses que receberam OT





**Figura 23.** Fotomicrografias que mostram o padrão de imunorreatividade para ❶ Fator de transcrição relacionado com o runt 2 (RUNX2), ❷ Osterix (OSX), ❸ Osteocalcina (OCN), ❹ Osteopontina (OPN), ❺ Proteína Óssea Morfogenética 2 e 4 (BMP-2/4), ❻ Periostina (PER), ❼ Esclerostina (ESC) e ❽ Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) de ratas Wistar adultas e senis após a administração de solução fisiológica (Veh) ou OT. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* não paramétrica seguida por pós- teste de *Newman-Keuls*. Contracoloração com *fast-green* para RUNX2 e OSX. Contracoloração com hematoxilina para OCN, OPN, BMP-2/4, PER, ESC e TRAP. Barras de escala: 20µm. Ampliação original: × 400 e × 800

**DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelam atuação positiva da OT no metabolismo ósseo de fêmeas Wistar, demonstrados pela diminuição na porcentagem de poros na região cortical do colo femoral bem como em melhores parâmetros biomecânicos (força máxima e rigidez óssea), principalmente durante o período de periostropausa (18 meses), diminuindo o risco de fraturas.

A osteoporose primária é associada a diferentes fatores (ALMEIDA, 2012), porém, muitos estudos demonstraram que a diminuição na concentração plasmática do esteroide sexual feminino, estrógeno, contribui significativamente para o aumento na taxa de remodelamento, danos aos parâmetros de microarquitetura e diminuição da força óssea, o que resulta em aumento no risco de fraturas (JULIET e COMPSTON, 2001; AMADEI et al., 2006). Dados de nosso laboratório evidenciaram que em ratas Wistar, o período de alterações na regularidade do ciclo estral ocorre entre 17 e 18 meses, com diminuição na concentração estrogênica, caracterizando o início da senescência reprodutiva nestes animais, sendo denominado de periostropausa (FERREIRA et al., 2015; NICOLA et al., 2016). Este período nas ratas corresponde ao período de perimenopausa em mulheres. Portanto, com a finalidade de estudarmos a atuação da OT como agente anabólico e possível ferramenta na prevenção para evitar a ocorrência de osteoporose, determinamos protocolo experimental para análises na região do colo femoral de fêmeas no período de periostropausa. Os animais experimentais com 12 meses apresentaram ciclo estral regular, sugerindo sincronismo no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Este eixo neuroendócrino integra informações de tecidos específicos e determina ações e respostas coordenadas para o organismo. Alterações no eixo geram efeitos anabólicos diretos e indiretos sob o metabolismo ósseo promovendo aumento na formação de matriz óssea (COMPSTON, 2001). Exemplo destas respostas é a influência no ciclo de remodelamento ósseo, sensível à concentração plasmática de estradiol. Mediante o exposto, faz-se necessário relatar que a concentração plasmática de E<sub>2</sub> em ratas com 12 meses é menor (150 pg/mL; COLLI, 2012) quando comparado com ratas de 4 meses (340 pg/mL; FERREIRA et al., 2015). Nos animais utilizados neste estudo, com 18 meses, a concentração plasmática de estradiol detectada foi de 29,2 pg/mL e a irregularidade nas fases do ciclo estral bem

caracterizada. Possivelmente, a diminuição na secreção plasmática bem como a não ocorrência de ritmicidade na secreção do esteróide contribuíram significativamente para ação da OT sobre os parâmetros ósseos de ratas no período do envelhecimento (18 meses).

É de conhecimento que a qualidade óssea resulta da composição heterogênea do tecido ósseo bem como da mineralização, morfologia, microarquitetura e presença de microfissuras (BOSKEY, 2006; 2013). Destacamos também a influência significativa da região cortical na rigidez e resistência óssea em relação à região trabecular (SCHAFFLER et al., 1988; AUGAT et al., 2006). Com base nestes estudos, pode-se afirmar que a rigidez do osso e a força máxima que suporta são determinadas, em grande parte, pela integridade do osso cortical. Esta integridade é comprometida no período do envelhecimento pelo aumento no número de poros, como evidenciado neste estudo. Nossos resultados corroboram com os obtidos com mulheres na pós-menopausa, em quem a porosidade cortical do fêmur proximal foi associada a fraturas não vertebrais (AHMED et al., 2015). Além disto, estudo *in vitro* demonstrou que aumento de 4 % da porosidade cortical aumenta em 84 % a propagação de fissuras (VILAYPHIOU et al., 2016). Neste estudo verificamos que o tratamento com OT foi eficaz na redução da porosidade e consequentemente contribuiu para melhora de parâmetros biomecânicos no período de envelhecimento das fêmeas.

A análise dos parâmetros na microarquitetura trabecular evidenciou que em ratas com 18 meses, o número de trabéculas é maior, sugerindo que a maior trabecularização resulta de ação ativa dos osteoclastos e menor atividade dos osteoblastos. Entretanto, a espessura destas trabéculas não é menor significativamente quando comparadas com ratas cíclicas com 12 meses e que já passaram pelo pico de massa óssea (9 meses) (LELOVAS et al., 2008). Além disso, verificamos que o número e a espessura das trabéculas no grupo de animais com 18 meses e que receberam OT é semelhante ao das ratas adultas com 12 meses. Estudo realizado por Elabd e colaboradores (2008), com animais jovens e tratados com OT, não evidenciou melhoras para estes mesmos parâmetros. A análise dos resultados obtidos por Miyakoshi (2004) após o tratamento com PTH, hormônio cuja ação no metabolismo ósseo é anabólica, revelou que PTH não foi eficaz em restaurar completamente a estrutura trabecular. Outro grupo de pesquisadores (BERANGER et al., 2014) demonstrou que o tratamento com OT foi eficaz em

normalizar os parâmetros BV/TV, Tb.Sp e Tb.N. Porém, o estudo foi realizado em animais OVX, com dez semanas, ou seja, os animais apresentaram diminuição da massa óssea em decorrência da diminuição na concentração plasmática estrogênica, mas não sofrem as alterações em decorrência do processo natural do envelhecimento. Além disso, a região escolhida como análise foi à metáfise distal do fêmur, a qual não é comumente afetada em mulheres na menopausa.

A associação dos resultados de microestrutura óssea cortical e trabecular com as análises séricas de FAL e TRAP nos permite sugerir ação anabólica de OT no processo de remodelação óssea de ratas no período do envelhecimento. A ação periférica de OT proporcionou aumento na atividade da FAL, marcador bioquímico importante que pode estar associado a formação óssea. Além disso, verificamos que nos animais tratados com OT, ocorreu diminuição de TRAP, a qual pode indicar atividade reabsortiva em osteoclastos (MINKIN, 1982). Correlacionado a estes resultados, podemos destacar aumento na DMO areal verificado nas ratas com 18 meses. Estudos realizados por Breuil e colaboradores (2011; 2014) associaram altas concentrações de OT com alta DMO bem como concentração plasmática de OT 55% mais baixa em mulheres com osteoporose quando comparado com mulheres que não apresentaram osteoporose. Estudos experimentais com animais jovens visando correlacionar hipoestrogenismo com a concentração plasmática de OT detectaram diminuição em 45% da OT plasmática em camundongos e 35 % em ratos Wistar, quando comparados grupos OVX e sham (ELABD et al., 2008). Entretanto, estudo realizado em nosso laboratório com ratas intactas e no período de envelhecimento não detectou diminuição na concentração plasmática de OT entre as ratas acíclicas com 18 meses quando comparado com as ratas cíclicas com 12 meses (COLLI, 2012). Portanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem ação anabólica da OT administrada no período da periostropausa.

A massa óssea é mantida pelo equilíbrio entre a formação do osso pelos osteoblastos, que partilham precursor comum mesenquimal com adipócitos, e a reabsorção óssea pelos osteoclastos. Com o envelhecimento, a composição de medula óssea se desloca e favorece a formação de adipócitos, aumento da atividade dos osteoclastos e diminuição das funções de osteoblastos, resultando em osteoporose. Sendo o processo de remodelação do osso controlado, principalmente, pelo ambiente local e considerando que osteoblastos e osteoclastos expressam o receptor OT, analisamos a imunorreatividade de proteínas envolvidas com a

formação, maturação e reabsorção da matriz óssea. Estudos indicam que BMPs modulam a diferenciação osteogênica por regular a expressão de fatores de transcrição cruciais em prol a osteoblastogênese tal como Runx2 e suprimir a expressão de fatores de transcrição em prol da adipogênese, Ppar $\gamma$  (LEE et al., 2010; LIU et al., 2013). Ressaltamos também que BMP2 são modulados, positivamente, em resposta à tensão mecânica por *down-regulation* à expressão gênica de Sost e o produto proteico esclerotina (VAN BEZOOIJEN et al., 2007). As proteínas não colagenosas são produzidas por osteoblastos e são determinantes para a formação, mineralização e reabsorção óssea, modulando de forma positiva e negativa o processo de mineralização óssea. Está evidenciado que Opn é necessária para o início da formação de cristais e pode impedir a precipitação prematura de cristais de fosfato de cálcio que não possuem a estrutura bem coordenada de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . A Ocn atua como quimioatrato para o recrutamento e diferenciação de células progenitoras de osteoclastos, regulando o crescimento e o tamanho dos cristais de hidroxiapatita (ROACH, 1994). Os resultados obtidos evidenciam diminuição na expressão de proteínas envolvidas com processo de mineralização da matriz extracelular, como a BMP-2/4 e periostina, nos animais 18 meses quando comparados aos de 12 meses, evidenciando alteração na formação e mineralização óssea ocorrida no período do envelhecimento. Entretanto, a análise dos resultados obtidos na imunoistoquímica não revelou diferença significativa após o tratamento com OT em ambas às idades estudadas, evidenciando a necessidade de análises em regiões específicas, como a região cortical do colo femoral.

Há escassez na literatura de dados que avaliem o envelhecimento ósseo fisiológico, pois a maioria dos estudos (ELABD et al., 2008; BERANGER et al., 2014) apresenta dados de osteoporose induzida em animais extremamente jovens ou adultos, os quais não passaram pelo pico de massa óssea (9 meses) (LELOVAS et al., 2008). Além disso, estes estudos avaliam sítios de remodelamento que geralmente não sofrem fratura espontânea, como tíbia e região distal do fêmur (BERANGER et al., 2014; 2015). Trabalhos que avaliam o colo femoral, região que sofre fratura espontânea em decorrência de fragilidade óssea, são escassos na literatura (STRINGHETTA-GARCIA et al., 2015). A fratura de colo femoral é condição associada ao aumento da comorbidade e mortalidade devido à submissão do indivíduo a procedimentos cirúrgicos e aos riscos de complicações, como

infecção e tromboembolismo, além do risco elevado de recidiva (AHMED et al., 2013). Estudos revelam que as fraturas de quadril aumentam de 1 a 3% ao ano como consequência do envelhecimento populacional (CUMMINGS et al., 2002), e a taxa de mortalidade intra-hospitalar em razão deste tipo de fratura corresponde a 1,6%, enquanto que num período de 6 meses, esta taxa aumenta para 13,5% (HANNAN et al., 2001; HOLROYD et al., 2008). Desta forma, o presente trabalho é pioneiro em analisar a ação da OT no colo femoral em ratas que já atingiram o pico de massa óssea e estrógeno deficientes.

Portanto, nosso estudo demonstrou que com o envelhecimento há diminuição significativa na força máxima e rigidez óssea, bem como aumento no número de poros corticais. Porém, o tratamento somente com duas injeções intraperitoneais de OT promoveu melhora nestes parâmetros, além de aumentar a área óssea cortical.

**CONCLUSÃO**



## **6. CONCLUSÃO**

Com base nas informações descritas até o momento, concluímos que animais adultos apresentam melhor qualidade óssea do colo femoral comparadas aos animais senis, e que a OT é estratégia anabólica válida para prevenção da osteoporose primária nos organismos envelhecidos. Ressaltamos ainda, a importância destes dados como base para o direcionamento de pesquisas clínicas.

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

Ahmed, LA; *et al.* Progressively increasing fracture risk with advancing age after initial incident fragility fracture: the Thomso study. *J Bone Miner Res* 28(10):2214-21, 2013.

Ahmed, LA; *et al.* Measurement of cortical porosity of the proximal femur improves identification of women with nonvertebral fragility fractures. *Osteoporos Int.* v. 26. p. 2137–2146, 2015.

Allena, R; Cluzel, C. Identification of anisotropic tensile strength of cortical bone using Brazilian test. *J Mech Behav Biomed Mater.* 38:134-42, 2014.

Almeida, M. Aging mechanisms in bone. *BoneKEY Reports.* v. 1. n. 102. p. 1-7, 2012.

Amadei, SU; *et al.* A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.

Andrade, A, Pinto, Sc, Oliveira, Rs (2002) Animais de Laboratório: criação e experimentação [online] Editora FIOCRUZ 388p.

Augat, P; Schorlemmer, S. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. *Age and Ageing.* v. 35, n. 2. p. 27-31, 2016.

Baylink, DJ; Strong, DD.; Mohan, S. The diagnosis and treatment of osteoporosis: future prospects. *Mol Med Today.* 5:133–140, 1999.

Bayliss, L; Mahoney; MJ; Monk, P. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Sugery.* v. 30, n. 2. p. 47–53, 2012.

Beranger, GE, *et al.* Oxytocin reverses osteoporosis in a sex-dependent manner. *Front Endocrinol (Lausanne).* 19(6):81, 2015.

Beranger, GE; *et al.* Oxytocin reverses ovariectomy-induced osteopenia and body fat gain. *Endocrinology.* 155(4): 1340-1352, 2014.

Bonnet, N; Conway, SJ; Ferrari, SL. Regulation of beta catenin signaling and parathyroid hormone anabolic effects in bone by the matricellular protein periostin. *PNAS.* v.109. n. 37. p. 15048–15053, 2012.

Boskey, AL. Mineralization, structure and function of bone. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, p.201-212, 2006.

Boskey, AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEY Reports.* v. 2. n. 447. p. 1-11, 2013.

Boyle, W; Simonet, W; Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v. 423, n. 6937. p. 337-42, 2003.

Breuil, V; *et al.* Oxytocin, a New Determinant of Bone Mineral Density in Post-Menopausal Women: Analysis of the OPUS Cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 99(4):E634–E641, 2014.

Breuil, V; *et al.* Oxytocin and bone remodelling: relationships with neurohypothalamic hormones, bone status and body composition. *Joint Bone Spine*. v.78, n. 6. p. 611-5, 2011.

Chan, GK; Duque, G. Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology*. v. 48, n. 2. p. 62-71, 2002.

Chaves Neto, AH; Sasaki, KT; Nakamune, ACMS. Protein phosphatase activities in the serum and saliva of healthy children. *RPG. Revista de Pós-Graduação* 18 (2), 90-5, 2011.

Claire Durosier, C; *et al.* Association of Circulating Sclerostin With Bone Mineral Mass, Microstructure, and Turnover Biochemical Markers in Healthy Elderly Men and Women. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 98. n.9. p.3873–3883, 2013.

Colaïanni, G; *et al.* The Oxytocin-Bone Axis. *J Bone Joint Surg Am*. v.96, n. 19. p. 1659 -1668, 2014.

Colaïanni, R; *et al.* The oxytocin-bone axis. *Journal of Neuroendocrinology*, p. 53–57, 2013.

Colli, VC; *et al.* Oxytocin promotes bone formation during the alveolar healing. *Archives of Oral Biology*. v. 57, n. 9. p. 1290–1297, 2012.

Colli, VC. Análise da ação da ocitocina sobre a remodelação óssea alveolar em ratos wistar de 12, 18 e 24 meses. 2012. 70 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/100955>>

Colucci, S; *et al.* Human osteoclasts express oxytocin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 297, n. 3. p. 442-5, 2002.

Compston, JE. Sex Steroids and Bone. *Physiol Rev*. v. 81, n.1. p. 419-447, 2001

Compton, JT; *et al.* A Review of Osteocyte Function and the Emerging Importance of Sclerostin. *J Bone Joint Surg Am*. v. 96, n.19. p. 1659 -1668, 2014.

Compston, JE. Sex steroids and bone. *Physiol. Rev.*, v. 81, n. 1, p. 419-447, Jan. 2001.

Conway, SJ; *et al.* The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell. Mol. Life Sci*. n. 71. p. 1279–1288, 2014.

Copland, JA; *et al.* Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts. *Endocrinology*. v. 140, n. 9. p. 4371-4, 1999.

Cosman, F; *et al.* Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int.* v. 25, n. 7. p. 2359–2381, 2014.

Cummings, SR; Melton, III. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 359:1761–67, 2002.

Dalmolin, F; *et al.* Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos - fundamentos teóricos. *Ciência Rural.* v.43, n.9, p.1675-1682, 2013.

Dexter, PR. Preparing for an Aging Population and Improving Chronic Disease Management. *AMIA Annu Symp Proc.* v. 2010. p. 162–166.

Elabd, C; *et al.* Oxytocin Controls Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Reverses Osteoporosis. *Stem Cells*, p. 2399–2407, 2008.

Eriksen, EF; *et al.* Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblas-like cells. *Science*, v. 241, p. 84-6, 1988.

Faria, PE; *et al.* Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling, *Clin. Oral Implants Res.* 19 (4), p. 393–401, 2008.

Ferreira, LB; *et al.* Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. *Experimental Gerontology* 72:157–161, 2015.

Garcia, VG; *et al.* Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats, *J. Periodontal Res.* 49 (5), p. 584–594, 2014.

Girasole, G; Giuliani, N. The physiopathology of osteoporosis: the role of local factors. *Ann Ital Med Int.* v. 10. p. 9-17, 1995.

Granjeiro, JM; Taga, EM; Aoyama H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. *An Acad Bras Cienc* 69(4):451-60, 1997.

Hannan, EL; *et al.* Mortality and Locomotion 6 Months After Hospitalization for Hip Fracture Risk factors and Risk-Adjusted Hospital Outcomes. *JAMA* 285(21):2736-2742, 2001.

Holroyd, C; Cooper, C; Dennison, E. Epidemiology of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 22(5):671-85, 2008.

Hughes, DE; *et al.* Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*, v. 2, n. 10, p. 1132-6, 1996.

Janckila, AJ; *et al.* Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. *J Leukoc Biol.* 77(2):209-18, 2005.

Kini, U; Nandeesh, B.N. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. "In": Ignac Fogelman, Gopinath Gnanasegaran, Hans van der Wall. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. Editora Springer. p. 29-57, 2012.

Komm, BS; *et al.* Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*, v. 241, n. 4681, p. 81-3, 1988.

Kular, J; *et al.* An overview of the regulation of bone remodeling at the cellular level. *Clin Biochem.* v. 45, n.12. p. 863-73, 2012.

Laidler, PM; *et al.* Human liver acid phosphatases: cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 216(2):512-21, 1982.

Lanyon, LE; Sugiyama, T; Price, JS. Regulation of Bone Mass: Local Control or Systemic Influence or Both? *IBMS Bone*, p. 218-226, 2009.

Lee, SJ; *et al.* Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*, v. 31, n. 21, p. 5652-5659, Jul. 2010.

Leite, MOR. Tratamento da Osteoporose Pós-Menopausa. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 43, n. 6, 1999.

Lelovas, PP; *et al.* The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *Comparative Medicine* 58(5):424–430, 2008.

Lemaire, T; *et al.* Mécanotransduction du remodelage osseux: rôle des fissures à la périphérie des ostéons. *C. R. Mécanique.* v. 336, n. 4. P. 354-362, 2008.

Little, N; Rogers, B; Flannery, M. Bone formation, remodelling and healing. *Surgery* v.29, n. 4. p. 141-145, 2011.

Liu, DD; *et al.* TGF- $\beta$ /BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, v. 114, v. 5, p. 1105-1114, May 2013.

Liu, C; *et al.* Mechanical loading up-regulates early remodeling signals from osteocytes subjected to physical damage. *J Biomech.* v. 48, n.16. p. 4221-8, 2016.

Long, JA; Evans, HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, 6: 1-148, 1922.

López, FJ. New approaches to the treatment of osteoporosis. *Current Opinion in Chemical Biology.* n. 4, p. 383–393, 2000.

Manolagas, SC; Jilka, RL. Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling - Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *N Engl J Med.* v. 332. p. 305-311, 1995.

Manolagas, SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* v. 21, n.2. p. 115-37, 2000.

Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 34 (3):285-90, 1982.

Miyakoshi, N. *Effects of Parathyroid Hormone on Cancellous Bone Mass and Structure in Osteoporosis.* Bentham Science. v. 10, n. 21. p. 2615 – 2627, 2016.

Pinheiro, MM; *et al.* The burden of osteoporosis in Brazil: regional data from fractures in adult men and women – The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Bras J Rheumatol.* v. 50, n. 2. p. 113-27, 2010.

Pinheiro, MM; *et al.* Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporosis International.* v. 20. p. 399, 2009.

Pinheiro, MM; *et al.* The burden of osteoporosis in Brazil: regional data from fractures in adult men and women – The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Bras J Rheumatol.* v.50, n. 2. p. 113-27, 2010.

Prideaux, M; Findlay, DM; Atkins, GJ. Osteocytes: The master cells in bone remodelling, *Curr Opin Pharmacol.* v. 28, p. 24-30, 2016.

Quiros-Gonzalez, I; *et al.* Central genes, pathways and modules that regulate bone mass. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* v. 561, n. 1. p. 130–136, 2014.

Radominski, SC; *et al.* Osteoporose em Mulheres na Pós-Menopausa. *Rev Bras Reumatol.* v. 44, n. 6. p. 426-34, 2004.

Raggatt, LJ; Partridge, NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* v.285. p. 25103–8, 2010.

Reginster, JY; Burlet, N. Osteoporosis: a still increases prevalence. *Bone.* v. 38, n. 2. p. 4-9, 2006.

Rosa, N.; *et al.* From mechanical stimulus to bone formation: A review. *Medical Engineering & Physics.* v. 37, n. 8. p. 719–728, 2015.

Saxon, LK; *et al.* Estrogen receptors alpha and beta have different gender-dependent effects on the adaptiver to load bearing in cancellous and cortical bone. *Endocrinology*, v. 153, n.5. p. 2254-66, 2012.

Schaffler, MB; Burr, DB. Stiffness of compact bone: Effects of porosity and density. *Journal of biomechanics.* v. 21, n. 1. p. 13-16, 1988.

Shahnazari, M; *et al.* Differential Maintenance of Cortical and Cancellous Bone Strength Following Discontinuation of Bone-Active Agents. *JBMR.* v. 26, n. 3. p. 569–581, 2011.

Steeve, KT; *et al.* IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 15, p. 49-60, 2004.

Stringhetta-Garcia, CT; *et al.* The effects of strength training and raloxifene on bone health in aging ovariectomized rats. *Bone* 85:45–54, 2015.

Roach, HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell. Biol. Int.*, v. 18, n. 6, p. 617-628, Jun. 1994.

Suzuki, R; *et al.* The reaction of osteoclasts when releasing osteocytes from osteocytic lacunae in the bone during bone modeling. *Tissue & Cell*, v. 35. p. 189–197, 2003.

Tamma, R; *et al.* Oxytocin is an anabolic bone hormone. *PNAS*. v. 106, n. 17. p. 7149–7154, 2009.

Tatsumi, S; *et al.* Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone mineral metabolism in rodents. *Endocrinology* 149:634-41, 2008.

Terpos, E; Christoulas, D. Involvement of osteocytes in cancer bone niche, *Bone Cancer*, p.65-72, 2015.

Van Bezooijen, RL; *et al.* Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J. Bone. Miner. Res.*, v. 22, n. 1, p. 19-28, Jan. 2007.

Viguet-Carrin, S; Garnero, P; Delmas, PD. The role of collagen in bone strength, *Osteoporos Int.* v. 17, n. 3. p. 319-36, 2006.

Vilayphiou, N; *et al.* Age-related changes in bone strength from HR-pQCT derived microarchitectural parameters with an emphasis on the role of cortical porosity. *Bone*. v. 83. p. 233–240, 2016.

Young, MF. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis International*. v. 14, n. 3. p. 35-42, 2003.





## ANEXO

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Análise do colo femoral de ratas senis após tratamento com ocitocina**", Processo FOA nº 2014-01379, sob responsabilidade de Rita Cássia Menegati Dornelles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 16 de Dezembro de 2014.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 31 de Outubro de 2016.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 01 de Dezembro de 2016.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Analysis of femoral neck of senile rats after treatment with oxytocin**", Protocol FOA nº 2014-01379, under the supervision of Rita Cássia Menegati Dornelles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 16, 2014.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** October 31, 2016.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** December 01, 2016.

**Profa. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende**  
Vice-Coordenadora da CEUA  
CEUA Vice-Coordinator