



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

MIRIANE CARNEIRO MACHADO SALGADO

**REMODELAÇÃO ÓSSEA DO FÊMUR DE RATAS SUBMETIDAS AO
CONSUMO DE ÁLCOOL E/OU À DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO:
análise imunoistoquímica e histomorfométrica**

2016

MIRIANE CARNEIRO MACHADO SALGADO

REMODELAÇÃO ÓSSEA DO FÊMUR DE RATAS SUBMETIDAS AO CONSUMO DE ÁLCOOL E/OU À DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO: análise imunoistoquímica e histomorfométrica

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos

2016

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

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

Salgado, Miriane Carneiro Machado

Remodelação óssea do fêmur de ratas submetidas ao consumo de álcool e/ou à deficiência de estrógeno: análise imunistoquímica e histomorfométrica / Miriane Carneiro Machado Salgado. - São José dos Campos : [s.n.], 2016. 66 f. : il.

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

Orientador: Yasmin Rodarte Carvalho.

1. Alcoolismo . 2. Osteoporose. 3. Fêmur. I. Carvalho, Yasmin Rodarte , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Camila Porto de Deco

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Faculdade de Ciências da Saúde

Profa. Dra. Naira Correia Cusma Pelógia

Universidade de Taubaté (UNITAU)

Instituto Básico de Biociências

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adjunto Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 09 de novembro de 2016.

DEDICATÓRIA

À Deus pela minha vida!

*Aos meus filhos **Julia e Matheus!** Mesmo tão pequenos são capazes de me ajudar com um simples sorriso! A chegada de vocês transformou a minha vida, e fez dela muito melhor! À vocês todo o meu amor e dedicação!!*

*Aos meus pais **Jorge e Vânia,** que nunca mediram esforços para me ajudar em qualquer fase da minha vida. Vocês são responsáveis por toda a minha formação, não só profissional, mas também pessoal!. São exemplos pra mim! À vocês toda a minha gratidão! Amo muito vocês!*

*Ao meu marido, **Fernando,** por sempre aceitar e apoiar minhas decisões! Por entender minhas ausências! Por tornar meus dias mais alegres! Por estar sempre ao meu lado! Te amo!*

*Aos meus avós **Reinaldo** (in memorian) e **Marjese,** que são mais que simples avós, são amigos e companheiros! À vocês muito obrigada por toda ajuda ao decorrer de minha vida! Amo vocês!*

*Às minhas irmãs, **Milene, Melina e Mirela,** vocês completam a minha vida! O que seria de mim sem vocês? Estamos sempre unidas!! Minhas amigas e companheiras! Amo vocês!*

*À minha sobrinha **Helena,** você é como uma filha, alegre e encanta os meu dias! Te amo!*

Aos meu tios, primos, cunhados, sogra, o meu muito obrigada pelo constante apoio e confiança!

Enfim, à todos vocês Família, que sempre me ajudaram! Sou muito abençoada por ter pessoas tão especiais ao meu lado!

AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora **Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho**, por ter me aceito como sua orientada. Por estar sempre disposta a ajudar! Por ser uma professora tão competente! É um exemplo a ser seguido! Obrigada pela confiança!*

*Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José dos Campos, representada pelo diretor **Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara**.*

*Ao programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Ana Lia Anbinder**.*

*Aos meus ex-orientadores **Profa. Rosilene Fernandes da Rocha** e **Prof. Leonardo Marchini**, obrigada por todo apoio e ajuda!*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** – pela concessão da bolsa processo 2013/19517-3 e auxílio pesquisa.*

*À **CAPES** pela concessão da bolsa por 6 meses.*

Aos docentes do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, por toda a ajuda dispensada a mim.

*Aos funcionários do departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, em especial, **Walter, Salete e Ana Lourdes**, e da seção de Pós-graduação, pela atenção que sempre tiveram comigo.*

Aos amigos do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, a convivência com vocês

tornou essa jornada mais fácil de ser cumprida.

*Às alunas de iniciação científica **Ana Beatriz Gomes de Carvalho** e **Mariana Alcantara Lima**,
obrigada pelo apoio e ajuda!*

*À amiga **Elis Andrade de Lima Zutin**, obrigada por dispensar parte do seu tempo com o meu
trabalho! Sua ajuda foi fundamental para o andamento desta pesquisa!*

*À amiga **Gabriela de Fátima Santana Melo**, por toda ajuda, desde o início até os últimos
momentos da estatística! Você é especial! Você foi muito importante para a realização desta
pesquisa! Sua companhia tornou esse caminho mais agradável! Muito obrigada!*

*“Deus não perguntará quantas coisas boas você fez na vida, e sim quanto amor
você colocou naquilo que fez”.*

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 PROPOSIÇÃO.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Animais.....	16
3.1.1 Grupos experimentais.....	16
3.1.2 Dieta.....	17
3.1.3 Procedimentos cirúrgicos.....	18
3.1.4 Anestesia.....	18
3.1.5 Ovariectomia e cirurgia Sham.....	19
3.1.6 Eutanásia.....	19
3.1.7 Alterações de peso corpóreo e condição nutricional.....	19
3.2 Descalcificação das amostras.....	20
3.3 Análise histológica e imunoistoquímica.....	20
3.4 Análise histomorfométrica.....	23
4 RESULTADOS	27
4.1 Dieta e peso.....	27
4.2 Análise histológica	30
4.3 Análise histomorfométrica.....	33
4.4 Análise imunoistoquímica.....	35
4.4.1 RANKL.....	35
4.4.2 Osteoprotegerina.....	39
4.4.3 RANKL e OPG.....	43
4.4.4 Osteocalcina.....	45
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO	66

Salgado MCM. Remodelação óssea do fêmur de ratas submetidas ao consumo de álcool e/ou à deficiência de estrogênio: análise imunoistoquímica e histomorfométrica [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

RESUMO

O consumo excessivo de álcool constitui importante problema de saúde pública e possui ainda relação direta com a perda óssea mediante desequilíbrio da remodelação óssea, diminuição das taxas de reabsorção e também da osteogênese. A deficiência estrogênica também está diretamente associada à osteoporose, pois leva ao aumento da formação de osteoclastos e diminuição da síntese de osteoblastos, gerando um desequilíbrio no processo de remodelação óssea. A combinação de osteoporose e consumo de álcool pode ter efeito sinérgico e deletério sobre o tecido ósseo e tem sido objeto de estudos. O objetivo deste trabalho foi verificar possíveis alterações no metabolismo ósseo em fêmures de ratas submetidas ao alcoolismo crônico e deficiência estrogênica induzida por ovariectomia, por meio de análise histomorfométrica e imunoistoquímica. Foram utilizadas 90 ratas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com 3 meses de idade, divididas em 6 diferentes grupos de igual número (15), conforme o tipo de dieta e quanto à presença ou ausência hormonal: Grupo 1: ovariectomia simulada (Sham), água e dieta livre; Grupo 2: Sham tratado com doses diárias de solução alcoólica a 20%; Grupo 3: Sham e alimentação isocalórica aos grupos associados ao álcool, fornecida por meio de solução aquosa de sacarose e dieta sólida; Grupo 4: ovariectomia, água e dieta sólida livre; Grupo 5: ovariectomia tratado com doses diárias de solução alcoólica a 20%; Grupo 6: ovariectomia e alimentação isocalórica semelhante ao grupo 3. Após 8 semanas do início da dieta, fez-se a eutanásia de todos os animais, e os fêmures foram removidos. A análise da dieta mostrou que o grupo Ovz dieta livre foi o que mais ganhou peso e o que mais ingeriu ração, apresentando diferenças significativas com relação aos demais grupos. Os animais dos grupos álcool consumiram em média 16 gramas de álcool por dia, sendo que o Sham álcool consumiu mais álcool, quando comparado ao Ovz álcool. Através da histomorfometria foi observado que os animais ovariectomizados apresentaram menor quantidade de osso trabecular em porcentagem, do que os sham operados, porém, sem diferença significativa. Os marcadores da remodelação óssea, RANKL, Osteoprotegerina e Osteocalcina, utilizados nas reações imunoistoquímicas, não mostraram alterações significativas no processo de remodelação óssea. Concluiu-se que ratas adultas jovens, esquelotalmente imaturas, submetidas ao alcoolismo crônico moderado, à remoção dos ovários ou à associação de ambos, mantêm as características de remodelação óssea cortical e trabecular do fêmur preservadas.

Palavras-chave: Alcoolismo. Osteoporose. Fêmur.

Salgado MCM. Bone remodeling in the femur of rats submitted to alcohol and/or estrogen deficiency: Immunohistochemical and histomorphometric analysis [thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.

ABSTRACT

*Excessive alcohol consumption is an important public health problem and also has direct relation with bone loss by imbalancing bone turnover. Estrogen deficiency is directly associated with osteoporosis, because it leads to an unequal bone resorption and formation by increased osteoclast formation and decreased synthesis of osteoblasts. The combination of osteoporosis and consumption of alcohol can have deleterious and synergistic effect on bone tissue and has been the subject of several studies. The objective of this study will be to investigate possible changes in bone metabolism in femurs of rats submitted to chronic alcoholism and estrogen deficiency induced by ovariectomy. We used 90 rats (*Rattus norvegicus*, Albinus variation, Wistar) with 3 months old. The animals were divided into six different groups of equal number, according to the type of diet and the presence or absence of hormones: Group 1: sham ovariectomized (sham), water and free diet, Group 2: Sham treated daily with alcoholic solution of 20% and feed ad libitum; Group 3: Sham isocaloric nutritional control group – treated with liquid diet containing sucrose with the same average calories ingested on the eve by the alcohol group and solid diet; Group 4: ovariectomy, water and solid diet free; Group 5: ovariectomy treated daily with alcoholic solution of 20% and feed ad libitum; Group 6: ovariectomy isocaloric nutritional control group like group 3. After 8 weeks from the beginning of the diet, all animals were sacrificed and femurs were removed. Diet analysis showed that the OvX ad libitum was the group that ingested more feed and gained more weight, showing significant differences with the other groups. The animals of alcohol groups, consuming on average 16 grams of alcohol per day, Sham alcohol group consumed more alcohol, as compared to OVZ alcohol. Femurs were evaluated by histomorphometric analysis and immunohistochemical analysis, using the markers, RANKL, Osteoprotegerin and Osteocalcin. The histomorphometric analysis evidenced that ovariectomized animals showed, in percentage, a lower amount of trabecular, than the sham operated, but without significant differences. Markers of bone turnover in immunohistochemical reactions showed no significant changes in bone remodeling process. It was concluded that the combination of estrogen deficiency and moderate chronic alcohol consumption did not cause deleterious effects on bone remodeling of the femur of young adult rats.*

Keywords: Alcoholism. Osteoporosis. Femur.

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, constituído por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. Diferentes tipos celulares são responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da arquitetura óssea. Dois tipos de células estão presentes, os osteoblastos e os osteoclastos, sendo a primeira responsável pela formação e a segunda pela reabsorção óssea (Junqueira, Carneiro, 2008; Nanci, 2008; Henriksen et al., 2009; Khosla et al., 2012). Os osteoblastos que durante a formação óssea tornam-se envolvidos dentro da matriz passam a ser chamados de osteócitos. Estas células desempenham uma função importante no controle da remodelação óssea, reconhecem tensões mecânicas ocorridas no osso e o desenvolvimento de micro trincas, e ainda são capazes de desencadear a remodelação, provavelmente através da comunicação com as células de revestimento ósseo (Junqueira, Carneiro, 2013; Nanci, 2008; Bonewald, 2011; Khosla et al., 2012; Klein-Nulend et al., 2015).

A remodelação óssea consiste em um mecanismo de substituição ou reconstrução, com a finalidade de preservar a integridade, otimizar a função, prevenir a degradação óssea e o acúmulo de osso antigo. É um processo fisiológico constante, no qual a formação óssea é correspondente à reabsorção, e ocorre devido à ação dos osteoblastos e dos osteoclastos (Manolagas, 2000; Silvestrini et al., 2005; Pivonka et al., 2008). Consequentemente, havendo modificações em qualquer uma dessas células é esperado que ocorram efeitos significantes na remodelação e homeostase óssea. (Manolagas, 2000; Pivonka et al., 2008; Khosla et al., 2012; Sims, Vrahnas, 2014).

Como a remodelação ocorre na superfície óssea, e o osso trabecular apresenta maior superfície por unidade de volume do que o osso cortical, entende-se que no osso trabecular, este processo é maior e mais rápido do que no cortical, pelo menos inicialmente. As trabéculas mineralizadas são facilmente perfuradas, as BMUs (“unidades básicas multicelulares”) atravessam a superfície das trabéculas, resultando em perda da conectividade entre as mesmas, sendo assim, o osso trabecular é mais exposto à remodelação óssea, e por isso apresenta uma maior incidência de patologias ósseas (osteoporose, metástases e osteomielites), (Seeman,

2013; Manolagas, 2000). Mesmo ocorrendo maior perda óssea no osso trabecular do que no cortical, o resultado em valores absolutos é semelhante durante os 10 primeiros anos após a menopausa. Isso porque o osso trabecular compreende apenas 20% de todo o esqueleto e o cortical 80% (Eastell, 2013; Seeman, 2013). Após os 60 anos de idade, a perda óssea é mais prevalente no osso cortical (Zebaze et al., 2010).

Dentre os ossos longos, o fêmur apresentou redução na densidade mineral óssea e desequilíbrio na remodelação em estudos que analisaram os efeitos do álcool no tecido ósseo (Peris et al., 1992; Wezeman et al., 2000). A superfície superior do colo do fêmur é um local de rápida perda óssea e com o envelhecimento, esta região é vulnerável a tornar-se frágil (Seeman, 2013).

O sistema RANK/RANKL/OPG tem efeito modulador na remodelação óssea (López-Larramona et al., 2013). Muitos estudos têm demonstrado que esse sistema apresenta importante função no equilíbrio das atividades osteoblásticas e osteoclásticas, prevenindo a perda de osso e garantindo a renovação óssea (Mochizuki et al., 2012; Sung et al., 2013). O desequilíbrio nesse sistema é observado na ocorrência da osteoporose, osteopetrose, artrite reumatoide e doença periodontal (De Amorim et al., 2008).

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por perda de massa óssea e deterioração da microarquitetura, tendo como consequência aumento da fragilidade óssea e maior susceptibilidade à ocorrência de fraturas, principalmente em vértebras e fêmur (Eastell, 2013; Klein-Nuled et al., 2015). É uma doença comum do envelhecimento, cujas principais causas são a mudança hormonal e a diminuição de mobilidade decorrentes da idade e, ainda, susceptibilidade genética. A osteoporose é silenciosa, e predominante em mulheres, principalmente após a menopausa (Klein-Nulend et al., 2015).

Um importante fator associado à uma perda óssea na mulher é a diminuição ou ausência de estrógeno, que leva a um quadro de osteopenia e posterior osteoporose (Faloni, Cerri, 2007, Khosla et al., 2012). O estrógeno é um hormônio esteroide que inibe a reabsorção óssea, é essencial para a conservação do tecido ósseo pois é capaz de manter o equilíbrio entre a formação e a reabsorção (Amadei et al., 2006; Faloni, Cerri, 2007, Khosla et al., 2012, Chamouni, Oury, 2014). Este hormônio sexual é importante para o crescimento e manutenção do esqueleto feminino e masculino, induz apoptose de osteoclastos e tem efeito contrário nos osteoblastos.

Na deficiência de estrógeno, o grande aumento da reabsorção óssea está relacionado ao aumento da osteoclastogênese e à diminuição da apoptose de osteoclastos, e também à diminuição da formação óssea, devido ao aumento da apoptose de osteoblastos. Além disso, o atraso na apoptose de osteoclastos parece ser responsável pelas lacunas de reabsorção mais profundas, e dessa forma, a perfuração no osso trabecular pode ser associada à deficiência estrogênica (Manolagas, 2000; Khosla et al., 2012).

O abuso de álcool é considerado um fator de risco para o aparecimento da osteoporose (Chakkalakal, 2005). O álcool tem efeitos diretos sobre formação e a reabsorção óssea, ocasionando a diminuição da massa óssea (González-Reimers et al., 2011; López-Larramona et al., 2013). A indução de perda óssea produzida pelo álcool causa o desequilíbrio da remodelação óssea, com aumento das taxas de reabsorção e também diminuição de osteogênese (Chakkalakal, 2005). Principal componente das bebidas alcoólicas, o etanol, apresenta efeito tóxico aos órgãos vitais, sendo nocivo até mesmo em tecidos resistentes como os ossos (Soares et al., 2010).

O consumo excessivo de álcool é um relevante problema de saúde pública que contribui expressivamente para etiologia e manutenção de vários problemas sociais, econômicos e de saúde existentes no Brasil (Galduróz, Caetano, 2004).

De acordo com o II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas, realizado no Brasil, o consumo de álcool está cada vez maior. Em 2012, a proporção das pessoas que bebem 5 doses ou mais habitualmente passou para 39%, cresceu tanto entre homens quanto entre as mulheres aproximadamente 10 pontos percentuais em relação ao estudo anterior que era de 29%. Além do crescimento observado na quantidade de doses de bebidas alcoólicas ingeridas pela população, também foi observado crescimento significativo na frequência de consumo. Em 2006, 42% da população declarou beber pelo menos 1 vez por semana e 58% bebiam menos de uma vez por semana. Em 2012 a proporção dos que declaram beber pelo menos uma vez por semana subiu para 53%. Este aumento da frequência do consumo de álcool foi mais significativo entre as mulheres, passando de 27% em 2006 para 38% em 2012.

A perda de densidade mineral óssea, decorrente de doenças no fígado ocasionadas pelo alcoolismo crônico, é multifatorial e determinada por defeitos na

formação do tecido ósseo (López-Larramona et al., 2013). Do ponto de vista etiopatogênico, existem três principais fatores de risco: primeiro, o álcool tem efeito dose/dependente que é diretamente tóxico sobre os osteoblastos, ocasionando inibição da formação óssea e afetando a remodelação (Alvisa-Negrín et al., 2009). Segundo, alterações nutricionais e deficiência de vitamina D, esses dois fatores unidos, mais a perda de massa muscular decorrente do consumo de álcool, podem estar associados com o aumento do risco de desenvolvimento de fraturas ósseas (González-Reimers et al., 2011). Mudanças nos hábitos alimentares e deficiência de proteínas contribuem para a perda óssea (Molina-Pérez et al., 2000). E por último, tanto o alcoolismo quanto as doenças hepáticas causam desordens metabólicas e endócrinas que promovem a liberação de citocinas com efeitos deletérios sobre o tecido ósseo (López-Larramona et al., 2013).

A combinação de osteoporose e consumo de álcool pode ter efeito sinérgico e deletério sobre o tecido ósseo (Maddalozzo et al., 2009; Deco et al., 2011; Marchini et al., 2012). Estudos da osteoporose em pacientes com doenças crônicas no fígado, como a cirrose biliar primária demonstraram uma função deficiente dos osteoblastos (Guañabens, Parés, 2012).

O RANKL é uma citocina da família do fator de necrose tumoral – TNF (De Amorim et al., 2008; Gallagher, 2008). É produzido por osteoblastos, linfócitos T e B (Eghbali-Fatourechí et al., 2003), ativa a reabsorção óssea e está principalmente envolvido na fase final da reabsorção (Gallagher, 2008). O RANKL é secretado por osteoblastos e interage com o receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$) presente na superfície de células precursoras de osteoclastos (De Amorim et al., 2008; Pivonka et al., 2008; Wang et al., 2014). A interação RANK/RANKL estimula a diferenciação de osteoclastos, promovendo sua ativação e inibindo sua apoptose, essa interação é regulada pela osteoprotegerina (Pivonka et al., 2008; Trouvin, Goëb, 2010).

A osteoprotegerina (OPG) é uma citocina que pertence à família do receptor do fator de necrose tumoral – TNF, produzida por células da medula óssea e osteoblastos. É capaz de inibir a ativação dos osteoclastos e a apoptose dos osteoblastos, através de sua ligação com o RANKL, impedindo que ocorra a interação RANK/RANKL (Moschen et al., 2005; Leibbrandt, Penninger, 2008; Gonzalez-Calvin et al., 2009), assim a formação de osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção

óssea também são inibidas (Silvestrini et al., 2005; Pivonka et al., 2008; Trouvin, Goëb, 2010).

A osteocalcina é uma pequena proteína encontrada exclusivamente em tecidos mineralizados (Lerner, 2006; Miheller et al., 2007) e corresponde a 40% das proteínas não colágenas do osso (Manolagas, 2000). É considerada uma marcadora da atividade osteoblástica (Rapuri et al., 2000; Parker et al., 2010), expressa nos estágios finais da diferenciação de osteoblastos, nos processos de mineralização e maturação óssea (Ishigaki et al., 2002). É produzida e secretada por osteoblastos maduros (Manolagas, 2000; Parker et al., 2010; Rodrigues et al., 2012).

Portanto, considerando: 1) o alcoolismo e suas consequências para o tecido ósseo; 2) a deficiência estrogênica e suas implicações para a fragilidade óssea e 3) evidências de que o estrógeno regula a taxa de apoptose das células ósseas, este estudo teve como objetivo verificar os efeitos do alcoolismo crônico associado à deficiência estrogênica em fêmur de ratas.

2 PROPOSIÇÃO

Investigar os efeitos do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica em osso longo (fêmur) de ratas, a fim de testar a hipótese de que a associação de deficiência estrogênica e consumo crônico de álcool apresenta um efeito deletério na remodelação óssea do fêmur.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este estudo, utilizaram-se 90 ratas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar com 3 meses de idade). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP e mantidos em temperatura ambiente e alimentados com dietas controladas de acordo com o grupo experimental. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia, Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, sob o protocolo nº 01/2013-PA/CEP, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e a Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 (ANEXO A).

3.1.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em seis grupos (n=15 em cada grupo) conforme o tipo de dieta administrada e presença ou ausência hormonal, como mostra o quadro 1. Em cada gaiola foram mantidos 5 animais do mesmo grupo.

Quadro 1- Grupos experimentais

Grupos	Dieta livre	Álcool	Isocalórico
Ovariectomia simulada (SHAM)	G1	G2	G3
Ovariectomia	G4	G5	G6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Grupo 1: Grupo SHAM dieta livre: animais submetidos à ovariectomia simulada, receberam água e dieta sólida livre;

Grupo 2: Grupo SHAM associado ao consumo de álcool: animais submetidos à ovariectomia simulada, receberam doses diárias de 20% de álcool;

Grupo 3: Grupo SHAM isocalórico: animais submetidos à ovariectomia simulada, receberam alimentação isocalórica ao grupo associado ao álcool, fornecida por meio de solução aquosa de sacarose;

Grupo 4: Grupo ovariectomizado dieta livre: animais submetidos à ovariectomia, receberam água e dieta sólida livre;

Grupo 5: Grupo ovariectomizado associado ao consumo de álcool: animais submetidos à ovariectomia, receberam doses diárias de 20% de álcool;

Grupo 6: Grupo ovariectomizado isocalórico: animais submetidos à ovariectomia, receberam alimentação isocalórica ao grupo associado ao álcool, fornecida por meio de solução aquosa de sacarose.

O tratamento dos animais baseou-se em trabalhos previamente realizados na mesma instituição e departamento do presente estudo (Deco et al., 2011; Marchini et al., 2012; Salgado et al., 2015).

3.1.2 Dieta

Um mês após a realização das cirurgias (ovariectomia e Sham), os animais iniciaram a dieta, de acordo com cada grupo, dieta alcoólica, isocalórica e livre.

A dieta sólida empregada para todos os grupos foi a ração comercial comum (Labina, Purina do Brasil, Paulínia-SP). Para G2 e G5, que receberam álcool, forneceram-se 50 gramas de ração diariamente por animal. No dia seguinte, as porções restantes eram pesadas, e obtinha-se a quantidade média de ração ingerida, que era fornecida para os animais G3 e G6, que formavam os grupos isocalóricos. Os animais dos grupos G1 e G4 receberam dieta sólida livre, sendo registradas as quantidades médias consumidas.

Aos animais dos grupos, G2 e G5, foi oferecido álcool etílico. Inicialmente estes animais passaram por período de adaptação à dose de álcool por nove dias (três dias

a 5%, três dias a 10% e três dias a 15%). Posteriormente, administrou-se a dieta por oito semanas, por meio de soluções preparadas diariamente na concentração alcoólica de 20%.

Os grupos G2 e G5, que receberam 50 mL de solução alcoólica por animal, iniciaram um dia antes de G3 e G6, que receberam dieta isocalórica. No dia seguinte, media-se a solução restante dos grupos G2 e G5, sendo registrada a média ingerida. Então, uma solução de sacarose P.A. com as mesmas calorias da solução alcoólica era preparada diariamente e fornecida aos grupos isocalóricos correspondentes (G3 e G6).

3.1.3 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em sala cuidadosamente limpa, utilizando-se álcool 70%; e com instrumentais devidamente esterilizados. O cirurgião e os auxiliares usaram aventais esterilizados em autoclave, além de materiais descartáveis como máscaras e luvas estéreis.

3.1.4 Anestesia

Para promover anestesia geral foram utilizados: cloridrato de ketamina 1,16 g/10 ml (Dopalen® - Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), anestésico geral, e cloridrato de xilazina 2,3 g/100 ml (Anasedan® - Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), substância com propriedades sedativas, analgésicas, e relaxante muscular.

Inicialmente, preparou-se uma solução com uma mistura de 0,5 ml de cloridrato de Ketamina e 0,8 ml de cloridrato de xilazina. Em seguida, para promover anestesia, em cada animal foi injetado via intramuscular, 0,1 ml da solução para cada 100 g de peso, de forma que um animal pesando 300 g recebeu 0,3 ml da solução.

3.1.5 Ovariectomia e cirurgia SHAM

As ratas pertencentes aos grupos G4, G5 e G6 foram ovariectomizadas aos três meses de idade. Após anestesia, foi realizada depilação da região abdominal lateral e antissepsia com álcool iodado, e incisão longitudinal com extensão aproximada de 1 cm na pele e musculatura da região lateral do corpo, próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela. Utilizou-se lâmina de bisturi nº15. O ovário foi identificado e exposto, realizou-se ligadura da parte superior da trompa com o fio de seda nº4, para se obter hemostasia, sendo estes procedimentos realizados bilateralmente. O ovário foi removido juntamente com a gordura circundante e pequena porção do útero. Ao final dos procedimentos, as camadas musculares e a pele foram suturadas com fio de seda nº4. Por fim, fez-se nova antissepsia com álcool iodado na região operada.

Nos animais do grupo SHAM, G1, G2 e G3, todos os procedimentos acima foram feitos, para simulação do estresse cirúrgico, exceto a hemostasia e remoção dos ovários. Portanto, após a exposição dos ovários, os mesmos foram recolocados na cavidade abdominal.

3.1.6 Eutanásia

Transcorridas 8 semanas do início da administração das dietas, todos os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por perfusão cardíaca com formalina a 4% (com o objetivo de obter uma melhor fixação do tecido ósseo).

3.1.7 Alterações de peso corpóreo e condição nutricional

No início do experimento e imediatamente antes da eutanásia, todos os animais foram pesados em balança semi-analítica com a finalidade de verificar se o tratamento

interferiu no peso dos mesmos, para isso empregou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Alterações no peso} = (\text{Peso Final} - \text{Peso Inicial}) / \text{Peso inicial} \times 100$$

Diariamente registrou-se os valores de ração e dieta líquida consumida por gaiola. A partir desses dados foram calculadas as médias de consumo por animal para os grupos experimentais, considerando ração ingerida (g e Kcal), solução líquida (ml e Kcal), dieta total (Kcal) e percentual correspondente às dietas líquida e sólida.

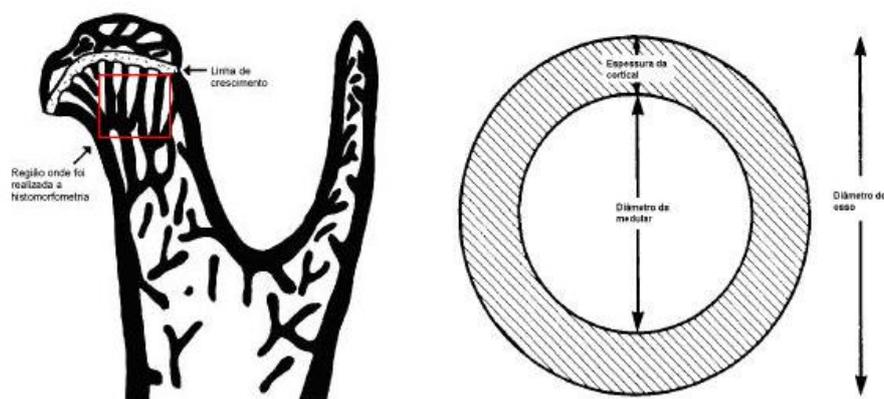
3.2 Descalcificação das amostras

Após a eutanásia, os fêmures foram removidos, limpos e colocados em solução de formol a 10% por 48 horas. A seguir, as amostras foram colocadas em solução de EDTA, para a descalcificação.

3.3 Análise histológica e imunoistoquímica

Depois de realizada a descalcificação obteve-se 2 fragmentos de cada fêmur, um abrangendo a região da cabeça até o trocânter menor, destinado ao corte longitudinal para observação do tecido ósseo medular da região do colo do fêmur; e um corte transversal na região da diáfise destinado à observação do tecido ósseo cortical (Figura 1), (Parfitt et al., 1987; Raffi et al., 1997; Dempster et al., 2013).

Figura 1 – Ilustração dos cortes realizados



Legenda: À esquerda, corte longitudinal, na região do colo do fêmur, à direita, corte transversal da diáfise do fêmur.

Fonte: Adaptados de Wrosnky e Shen (1997); Dempster et al. (2013).

Foram realizados cortes longitudinais com 4 mm de espessura em cada região, os quais foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica e histomorfométrica, e secções de 3 μ m estendidas em lâminas silanizadas, para as reações imunoistoquímicas.

Nas reações imunoistoquímicas utilizou-se os seguintes marcadores: RANKL, Osteocalcina e Osteoprotegerina.

O clone, a titulação, o tempo e a temperatura de incubação dos anticorpos, e a recuperação antigênica encontram-se listados no quadro 2, a seguir.

Quadro 2 - Titulação, tempo e temperatura de incubação, e recuperação antigênica dos anticorpos

ANTICORPO	CLONE	DILUIÇÃO	INCUBAÇÃO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA
RANKL	ab 45039	1:100	4° C, overnight	Proteinase K
Osteocalcina (OCC)	ab 13420	1:100	4° C, overnight	Ácido Cítrico
Osteoprotegerina (OPG)	ab 73400	1:100	4° C, overnight	Pepsina

Fonte: Elaborado pelo autor.

As lâminas foram preparadas para as reações imunoistoquímicas mediante a

realização dos seguintes procedimentos:

- a) desparafinização em 2 banhos de xilol por 15 minutos cada, a temperatura ambiente;
- b) reidratação em uma série de etanol em concentrações decrescentes, absoluto, 95%, 90%, 80% e 70% por duas vezes seguidas cada, sendo por 5 minutos os banhos de álcool absoluto e por 3 minutos os demais, para cada imersão;
- c) lavagem em água corrente por 10 minutos e passagem em água destilada;
- d) recuperação antigênica. Colocação das lâminas em uma cuba de vidro contendo ácido cítrico a 10 mM pH 6,0; para o anticorpo OCC, as cubas foram levadas ao microondas (700 w) por 6 minutos, divididos em 2 ciclos de 3 minutos cada, potência 5. Para o anticorpo OPG utilizou-se a pepsina, pH 1,8; as lâminas foram imersas na solução e levadas à estufa a 60° C por 10 minutos, e em seguida, à estufa a 37° C por 50 minutos. Para o anticorpo RANKL, a proteinase K foi usada. Dispensou-se sobre os cortes uma quantidade de proteinase K suficiente para cobri-los, por 6 minutos a temperatura ambiente. Para a recuperação com ácido cítrico e pepsina, foi necessário esfriar em temperatura ambiente por 30 minutos;
- e) lavagem em água corrente por 10 minutos seguidas por duas passagens em água destilada;
- f) bloqueio da peroxidase endógena tecidual: incubação com peróxido de hidrogênio 20 volumes (150 ml) e álcool metílico (150 ml), por 5 minutos, por duas vezes;
- g) lavagem em água corrente e água destilada e imersão por duas vezes em tampão Tris (pH 7,4), durante 5 minutos cada;
- h) incubação com soro albumina bovina (BSA) por 1 hora, em câmara úmida, para bloqueio dos anticorpos inespecíficos;
- i) incubação dos anticorpos primários de acordo com a titulação, tempo e temperatura listados no quadro 2.

Todos os procedimentos a seguir foram precedidos por duas lavagens em Tris (pH 7,4), durante 5 minutos cada:

- a) incubação do anticorpo secundário ENVISION (Dual Link System-HRP– DAKO CO., Califórnia, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente;
- b) lavagem;
- c) incubação com solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB), por 2 minutos;
- d) lavagem em água corrente e água destilada.

Posteriormente, realizou-se a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer, desidratação em etanol, clareamento em xilol e montagem com Permount. Os controles negativos foram feitos com a substituição do anticorpo primário pela solução usada para diluir o anticorpo (diluyente universal DAKO, Carpinteria, CA, Estados Unidos da América) e os controles positivos realizados conforme instruções do fabricante do anticorpo primário, RANKL, linfonodo de rato Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com marcação de linfonodos e centro germinativo; OPG, fígado de rato Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), que marca hepatócitos; e OCC tecido ósseo.

3.4 Análise histomorfométrica

A análise histológica foi realizada em microscópio de luz, para se observar o aspecto geral do tecido ósseo cortical e trabecular. Neste último analisou-se a espessura das trabéculas, sua interconectividade, presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, entre outros aspectos.

Para as análises histomorfométrica e imunoistoquímica, as imagens das lâminas foram fotografadas e capturadas por meio de câmera digital de alta resolução AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz, (Axiophot 2, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A câmera apresenta-se conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA) contendo um

programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision Release 4.7.2).

Na região do colo de fêmur as imagens foram obtidas com aumento de 50 vezes, e na diáfise com aumento de 25 vezes.

Após serem realizadas as fotos, na região do colo do fêmur, a área ocupada por trabéculas ósseas foi submetida a um software de análise de imagem (Axiovision Release 4.7.2), que forneceu a área em micrometros quadrados. A região avaliada era composta por osso trabecular e espaços medulares. Para o cálculo da área ocupada apenas por trabéculas ósseas, a seguinte metodologia foi usada: primeiro calculou-se a área total da imagem em micrometros quadrados, a seguir as áreas dos espaços medulares foram medidas e somadas, e por último foram subtraídas da área total. Dessa maneira, o resultado final correspondia à área ocupada por osso trabecular. Foram realizadas três fotos por animal, de três diferentes lâminas (profundidades de corte diferentes). Obteve-se a área média em μ^2 de cada animal, e posteriormente, a área média em porcentagem, para comparação estatística (Figura 2), (Haddad et al., 2014).

Na região da diáfise, foram analisados o diâmetro do osso, diâmetro do canal medular e espessura da cortical, medidos em micrometros (Figura 3), (Parfitt et al., 1987; Dempster et al., 2013). Para essas variáveis, realizaram-se cinco medições em várias direções, com o objetivo de se obter uma maior fidelidade, usando-se a média simples como resultado (Moraes, 2006).

Para as análises das reações de imunohistoquímica foram realizadas fotografias da região do colo do fêmur. As áreas mais marcadas foram selecionadas e duas fotos de cada lâmina, de diferentes regiões, com aumento de 400 vezes foram obtidas. A seguir, as imagens foram abertas no programa Image J, a fim de se realizar a análise quantitativa, onde contava-se o número total de células (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) da região e depois o número de células marcadas. Para a OPG e OCC contou-se osteoblastos e osteócitos, e para RANKL osteoblastos, osteoclastos e osteócitos foram contados.

Os resultados foram tabelados e submetidos a testes estatísticos. Para os dados obtidos sobre a dieta e o peso fez-se a análise de variância ANOVA GLM (General Linear Models) e teste de comparação Múltipla de Tukey (Post Hoc).

Os dados referentes às análises histomorfométrica e imunohistoquímica foram submetidos a testes de normalidade (teste de Kolmogorov – Smirnov) e foram considerados paramétricos. A estatística foi realizada utilizando a análise de variância One Way ANOVA e o teste de comparação múltipla de Tukey. Para a realização dos testes, utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, Estados Unidos da América). Os gráficos foram feitos no programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Estados Unidos da América).

Todas as comparações foram feitas com níveis de significância de 0,1%, 1% e 5%.

Antes de se iniciar as análises das lâminas, todas as lâminas foram codificadas, para não permitir a identificação do grupo, possibilitando uma leitura cega das mesmas.

4 RESULTADOS

4.1 Dieta e peso

O grupo que mais consumiu ração foi o Ovz dieta livre (G1) (média = 22,54 g), apresentando diferença estatística com os demais grupos (Tabela 1). Observou-se ainda que a média da ingestão de ração pelos grupos isocalóricos (12,44 g) foi muito próxima da média ingerida pelos grupos álcool (12,36 g), uma vez que os grupos isocalóricos consumiram toda a ração que lhes foi oferecida (Tabela 2).

Tabela 1 – Valores de p para ingestão de ração

	Ovz álcool	Ovz isocalórico	Ovz dieta livre	Sham álcool	Sham isocalórico
Ovz isocalórico	NS				
Ovz dieta livre	<0,001*	<0,001*			
Sham álcool	NS	NS	<0,001*		
Sham isocalórico	NS	NS	<0,001*	NS	
Sham dieta livre	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*

Legenda: NS – $p > 0,05$ – valores não significativos.

* $p < 0,0001$ – valores extremamente significativos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Análise descritiva da interação dos fatores principais para ingestão de ração

Ração (Interações)		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	N	IC
OVZ	Álcool	11,66	11,61	2,15	18%	8,71	21,67	61	0,54
	Isocalórico	12,16	12,00	1,40	12%	10,72	16,55	61	0,35
	Livre	22,54	21,55	4,57	20%	16,03	32,20	55	1,21
SHAM	Álcool	13,06	12,78	2,70	21%	10,00	23,67	61	0,68
	Isocalórico	12,71	12,00	2,16	17%	10,66	20,00	61	0,54
	Livre	20,54	19,89	2,73	13%	17,44	28,17	55	0,72

Fonte: Elaborada pelo autor.

Quanto à dieta líquida, os líquidos avaliados foram solução de álcool (20%), solução de sacarose (26,6%) e água, para os grupos álcool, isocalórico, e dieta livre, respectivamente. O grupo que ingeriu maior quantidade de líquidos foi o Sham dieta livre, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos. E o grupo que ingeriu menor quantidade de líquidos foi o Ovz álcool, que apresentou diferença estatisticamente significativa dos grupos Sham dieta livre e Sham álcool (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Valores de p para ingestão de líquidos

	Ovz álcool	Ovz isocalórico	Ovz dieta livre	Sham álcool	Sham isocalórico
Ovz isocalórico	NS				
Ovz dieta livre	NS	NS			
Sham álcool	<0,001***	NS	<0,01**		
Sham isocalórico	NS	NS	NS	<0,05*	
Sham dieta livre	<0,001***	<0,001***	<0,001***	<0,01**	<0,001***

Legenda: NS – $p > 0,05$ – valores não significativos.

* $p < 0,05$ – valores significativos.

** $p < 0,01$ – valores muito significativos.

*** $p < 0,0001$ – valores extremamente significativos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Descritivas da interação dos fatores principais para ingestão de bebidas

Bebida (Interações)		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	N	IC
OVZ	Álcool	27,06	28,37	9,12	34%	10,82	42,92	61	2,29
	Isocalórico	30,21	34,58	10,07	33%	3,10	45,25	61	2,53
	Livre	28,47	26,61	5,06	18%	22,14	39,82	57	1,31
SHAM	Álcool	33,93	32,83	11,17	33%	21,00	50,83	61	2,80
	Isocalórico	28,90	32,77	9,99	35%	2,27	42,03	61	2,51
	Livre	40,42	41,67	4,60	11%	29,67	46,77	61	1,15

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os grupos SHAM álcool e Ovz álcool, fez-se uma análise detalhada do padrão de consumo do álcool em diferentes unidades de medida (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios da ingestão de álcool por dia/animal

Valores médios ingeridos	OVZ álcool	SHAM álcool	Média
Solução alcoólica 20% (por animal/dia em ml)	27,06	33,93	30,50
Álcool absoluto (por animal/dia em ml)	5,41	6,79	6,10
Álcool absoluto (por animal/dia em gramas) *	4,26	5,34	4,80
Álcool absoluto (por Kg de peso/dia em gramas) **	14,20	17,80	16,00
Ração (g/dia/animal)	11,66	13,06	12,36
Ração (kcal/dia/animal) ***	27,82	31,16	29,49
Álcool (kcal/dia/animal) ****	30,25	37,91	34,08
Total de kcal/dia/animal (ração + álcool)	58,07	69,07	63,57
% de calorias da dieta provenientes do álcool	52,09	54,89	53,49

*considerando-se que 1000 ml de álcool equivalem a 787 g.

** os cálculos levaram em consideração um animal com peso médio de 300 g.

*** considerando que 1 g da ração Labina® (Purina do Brasil) contém aproximadamente 2,386 kcal.

**** considerando que 1 g de álcool etílico absoluto contém aproximadamente 7,1 kcal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em todos os grupos houve ganho de peso médio, em percentual, sendo que o Ovz dieta livre foi o que obteve o maior ganho de peso (64,67%), e o SHAM álcool o menor (19,50%), (Tabela 6).

Tabela 6 - Alterações de peso

Peso (Interações)	Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	N	IC
Álcool	34,00	33,83	8,86	26%	19,14	53,70	14	4,64
OVZ Isocalórico	42,21	42,17	18,81	45%	5,21	76,27	14	9,85
Livre	64,67	64,59	10,12	16%	51,42	81,63	12	5,73
Álcool	19,50	19,20	6,59	34%	7,27	32,50	15	3,33
SHAM Isocalórico	21,19	19,20	7,04	33%	14,44	36,44	15	3,57
Livre	36,40	35,55	8,98	25%	22,00	55,12	15	4,55

Fonte: Elaborada pelo autor.

A diferença de alteração de peso entre os grupos SHAM e Ovz foi estatisticamente significativa, sendo que os animais dos grupos Ovz apresentaram

maior ganho de peso médio 46,08%. Com relação à dieta, os animais que recebiam dieta livre foram os que mais ganharam peso 48,96% e os do grupo álcool os que menos 26,50% (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Descritivas do Fator Principal para alteração de peso

Peso (Fator Principal)		Média	Mediana	Desvio Padrão	CV	Min	Max	N	IC	P-valor
Grupo	OVZ	46,08	43,31	18,36	40%	5,21	81,63	40	5,69	<0,001*
	SHAM	25,69	22,00	10,69	42%	7,27	55,12	45	3,12	
	Álcool	26,50	24,25	10,61	40%	7,27	53,70	29	3,86	
Dieta	Isocalórico	31,34	24,48	17,42	56%	5,21	76,27	29	6,34	<0,001*
	Livre	48,96	51,42	17,08	35%	22,00	81,63	27	6,44	

*valor considerado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 8 - Valores de p para alterações de peso

	Ovz álcool	Ovz isocalórico	Ovz dieta livre	Sham álcool	Sham isocalórico
Ovz isocalórico	NS				
Ovz dieta livre	<0,001***	<0,001***			
Sham álcool	<0,01**	<0,001***	<0,001***		
Sham isocalórico	<0,05*	<0,001***	<0,001***	NS	
Sham dieta livre	NS	NS	<0,001***	<0,01**	<0,001***

Legenda: NS – $p > 0,05$ – valores não significativos.

* $p < 0,05$ – valores significativos.

** $p < 0,01$ – valores muito significativos.

*** $p < 0,0001$ – valores extremamente significativos.

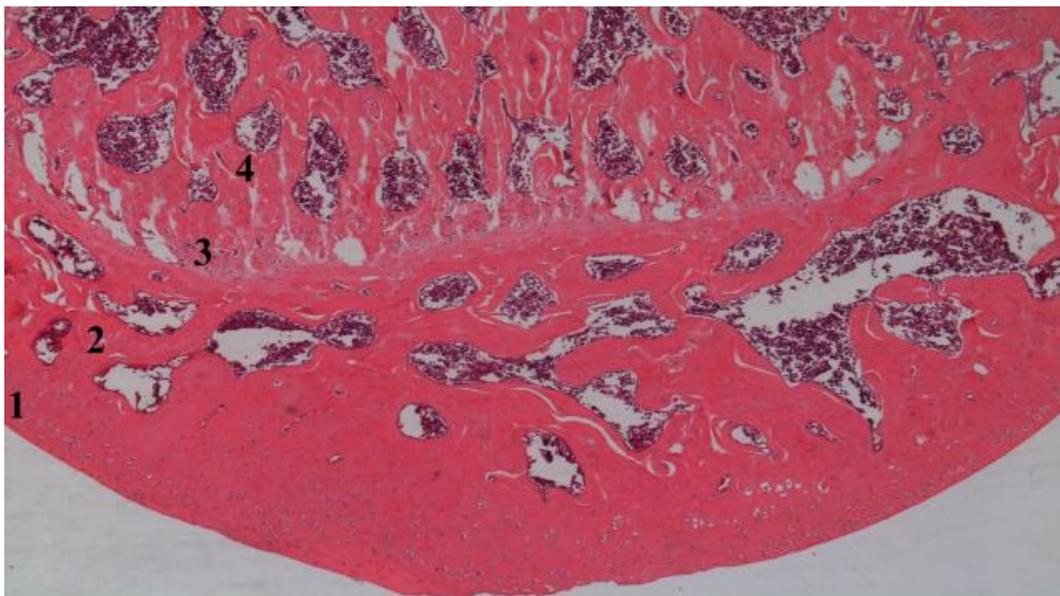
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Análise histológica

Pode-se avaliar que os fêmures são constituídos por osso trabecular e cortical.

Na região da cabeça do fêmur pôde-se observar a seguinte ordem de organização, a partir da superfície em direção à diáfise: cartilagem hialina/ osso trabecular/ cartilagem hialina/ osso trabecular (Figura 4).

Figura 4 – Imagem histológica da cabeça do fêmur



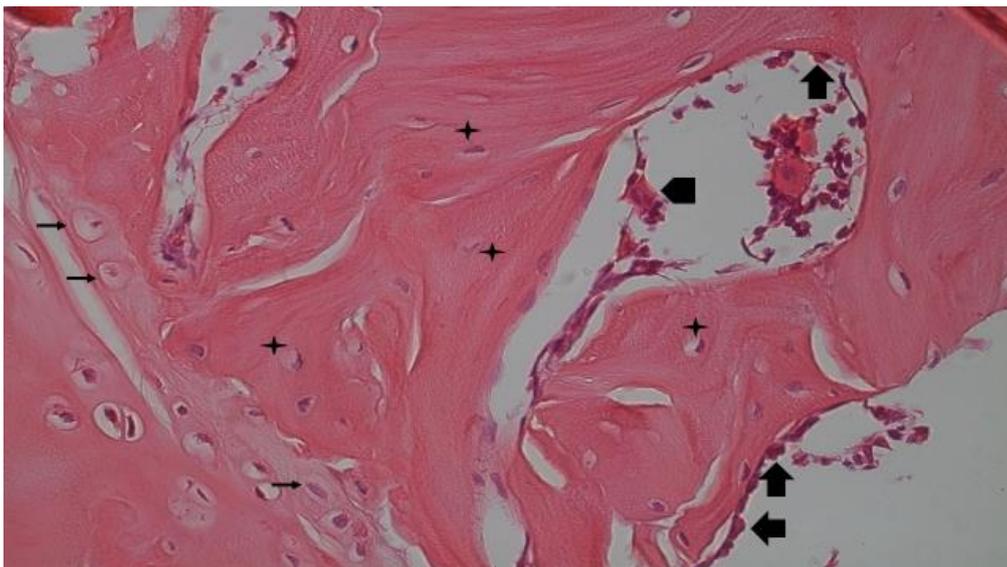
Legenda: 1) Superfície do fêmur recoberta por cartilagem hialina; 2) Osso cortical apresentando trabéculas ósseas; 3) Cartilagem hialina; 4) Osso trabecular. Aumento original de 50x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A superfície era recoberta por cartilagem hialina com muitos condrócitos. Logo abaixo, foram encontradas trabéculas ósseas contendo osteoblastos, osteoclastos e tecido medular, depois dessas trabéculas uma nova camada de cartilagem hialina era vista, seguida de uma região com maior quantidade de osso esponjoso, exibindo trabéculas ósseas com osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Entre as trabéculas, os espaços medulares continham tecido medular ósseo e, por vezes, hemácias e tecido adiposo (Figuras 5, 6 e 7).

O colo do fêmur apresentava osso cortical e trabecular. Quando analisadas as primeiras lâminas de cada fêmur, pôde-se ver uma maior quantidade de osso cortical, e conforme o corte era aprofundado a quantidade de osso esponjoso aumentava.

Na região da epífise pode-se observar uma pequena quantidade de osso cortical, principalmente na região periférica e muitas trabéculas ósseas no interior.

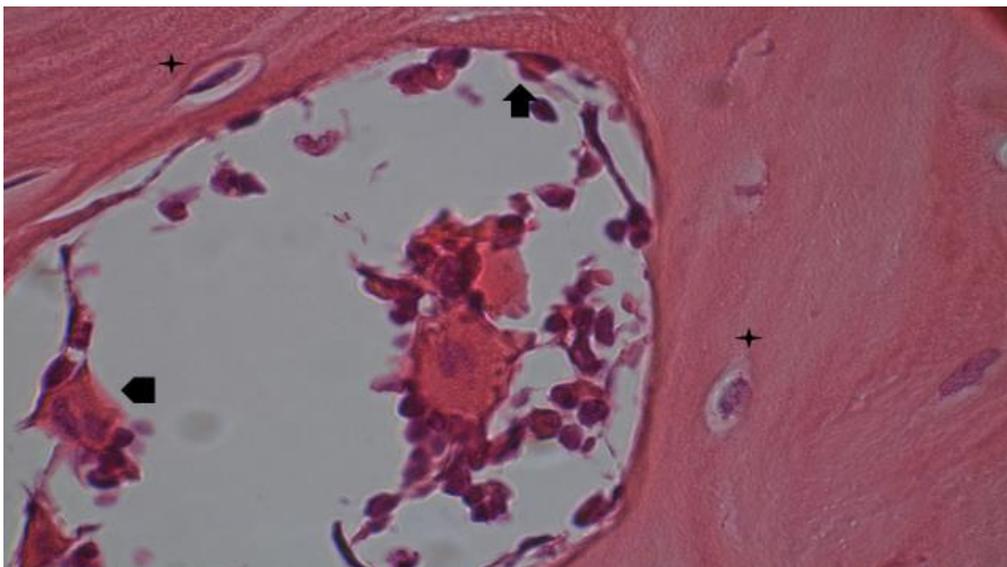
Figura 5 – Imagem histológica do fêmur



Legenda: Condrócitos (→), osteócitos (★) e osteoblastos (▶). Aumento original de 400x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

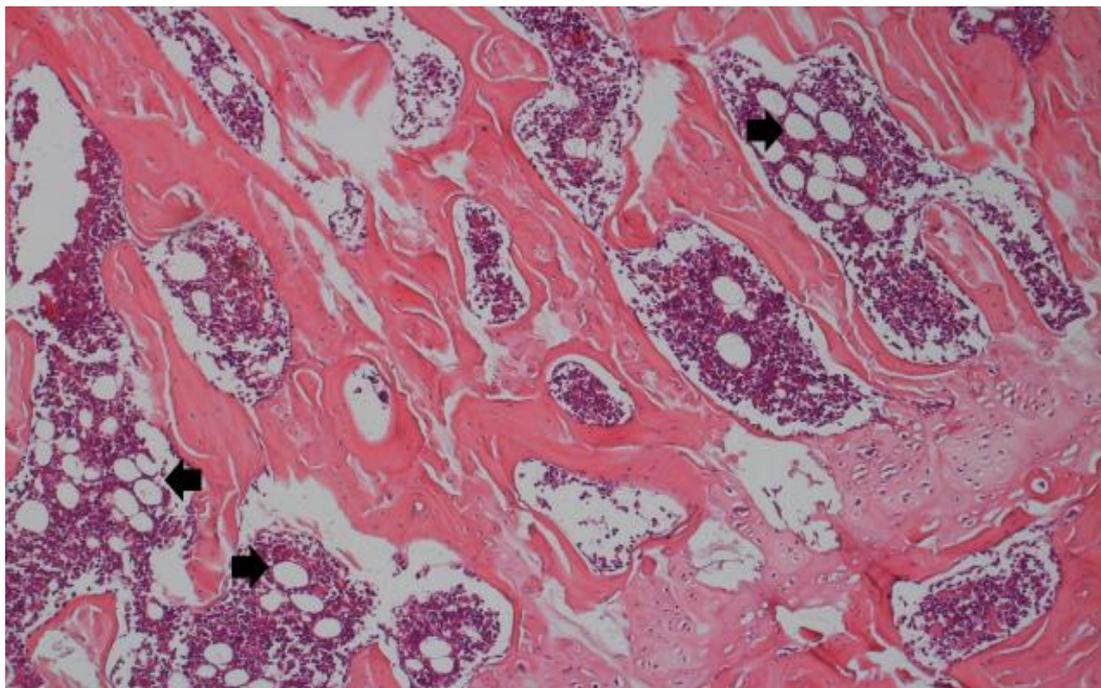
Figura 6 – Imagem histológica do fêmur destacando as células ósseas trocar



Legenda: Osteócitos (★), osteoblasto (▶) e osteoclasto (▶). Aumento original de 1000x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 – Imagem histológica do fêmur



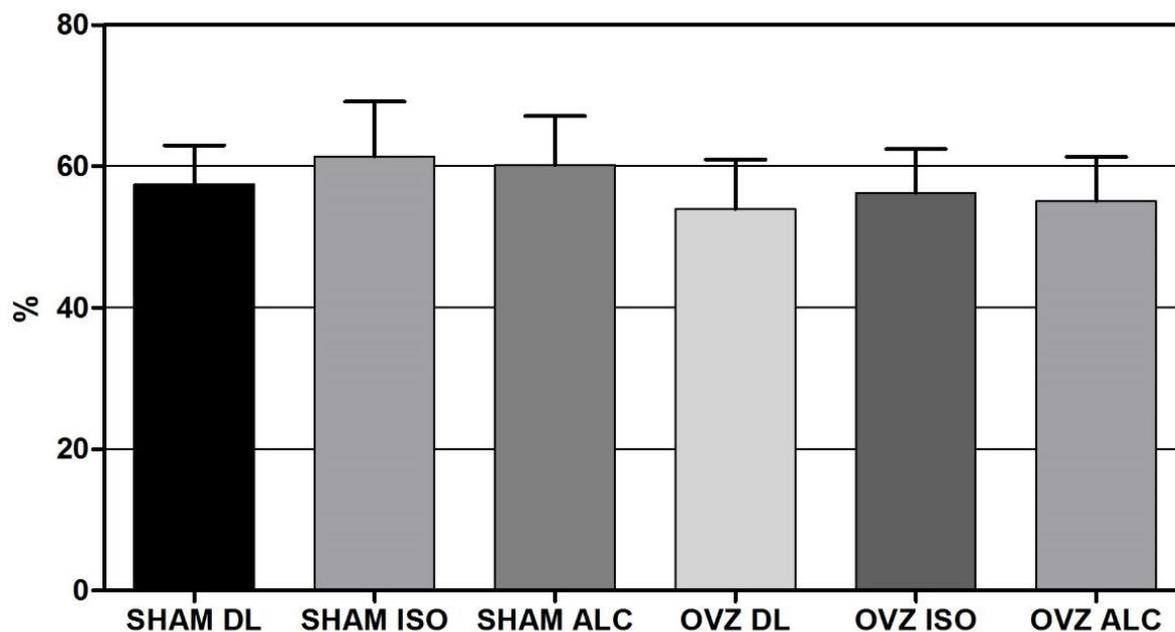
Legenda: Entre as trabéculas ósseas, tecido medular e tecido adiposo, este último destacado pelas setas. Aumento original de 100x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Análise histomorfométrica

A histomorfometria foi realizada tanto no corte longitudinal (região da cabeça e colo do fêmur) quanto no transversal (diáfise).

No corte longitudinal, analisou-se a porcentagem de osso trabecular. Os grupos ovariectomizados exibiram menor quantidade em porcentagem de osso trabecular dos que os Sham operados. O grupo Sham isocalórico apresentou a maior quantidade em porcentagem de osso trabecular (61,40) e o Ovz dieta livre a menor (53,95). Entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 8).

Figura 8 – Gráfico da porcentagem de osso trabecular



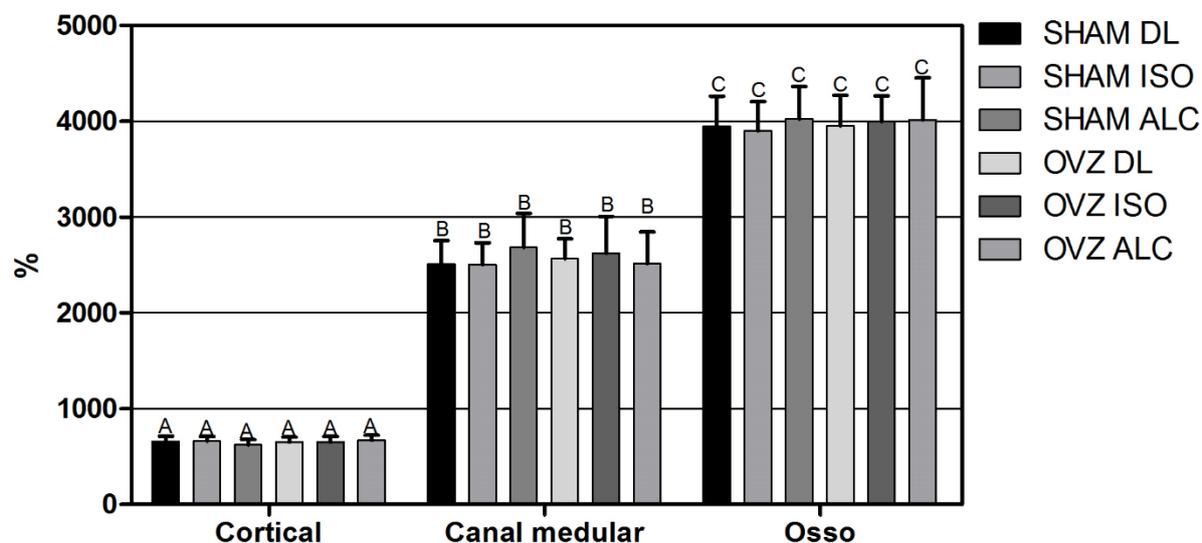
Legenda: Valores das médias (barras) e desvios padrões (linhas acima das das barras) para a quantidade (%) de osso trabecular.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na diáfise do fêmur, foram analisados o diâmetro ósseo, diâmetro do canal medular e espessura da cortical. Observando cada variável separadamente, não houve diferença significativa entre os grupos, a diferença ocorreu entre as variáveis (Figura 9).

Para as variáveis, diâmetro ósseo e diâmetro do canal medular, o grupo Sham álcool obteve os maiores valores, 4023 μ e 2682 μ , respectivamente; e o Sham isocalórico os menores 3898 μ e 2503 μ , respectivamente. Quanto à espessura da cortical, o grupo Ovz álcool apresentou o maior valor (668,80 μ), e o Sham álcool o menor (622,40 μ).

Figura 9 – Gráfico do diâmetro ósseo



Legenda: Valores das médias (barras) e desvios padrões (linhas acima das das barras) para a espessura da cortical, diâmetro do canal medular e diâmetro ósseo.

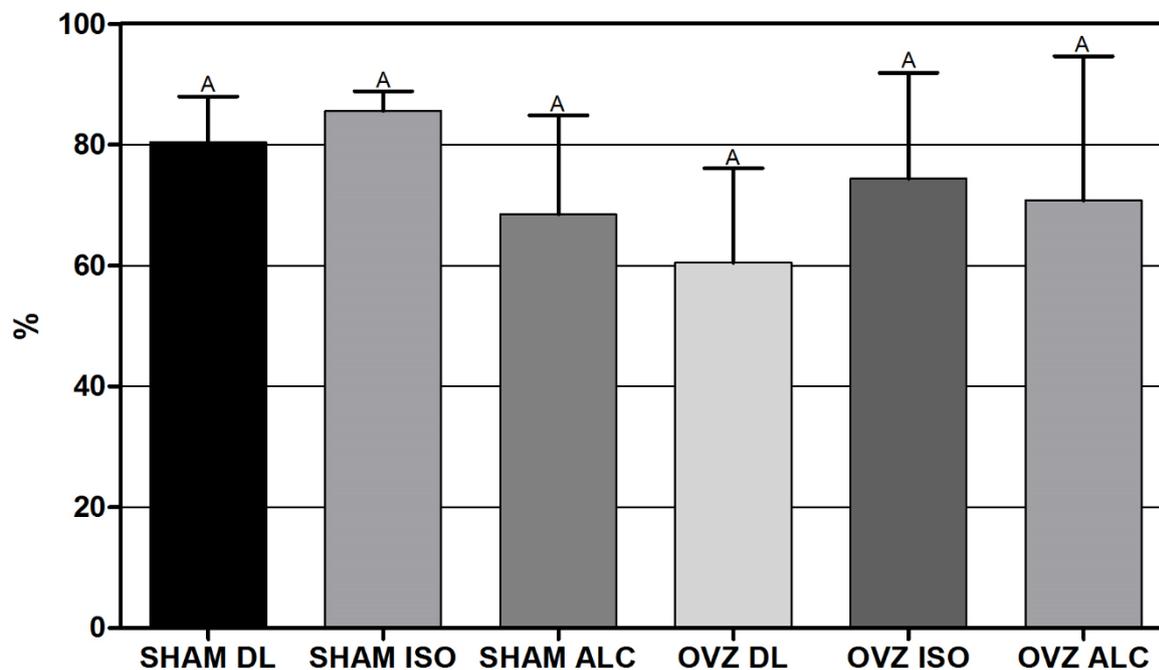
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Análise imunohistoquímica

4.4.1 RANKL

O grupo que apresentou a maior quantidade em porcentagem de células imunomarcadas foi o Sham isocalórico (85,55), e o grupo Ovz dieta livre (60,45) a menor. Os resultados entre os grupos não foram estatisticamente significativos (Figura 10).

Figura 10 – Gráfico da porcentagem de imunomarcação das células para o anticorpo RANKL

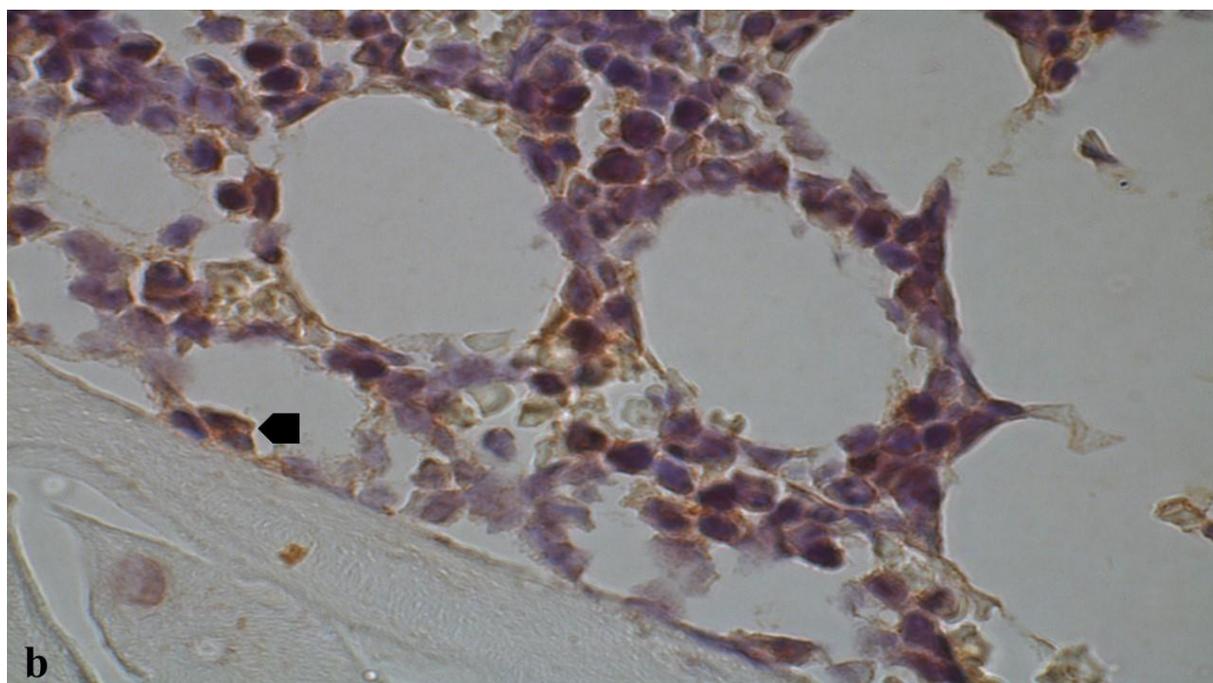
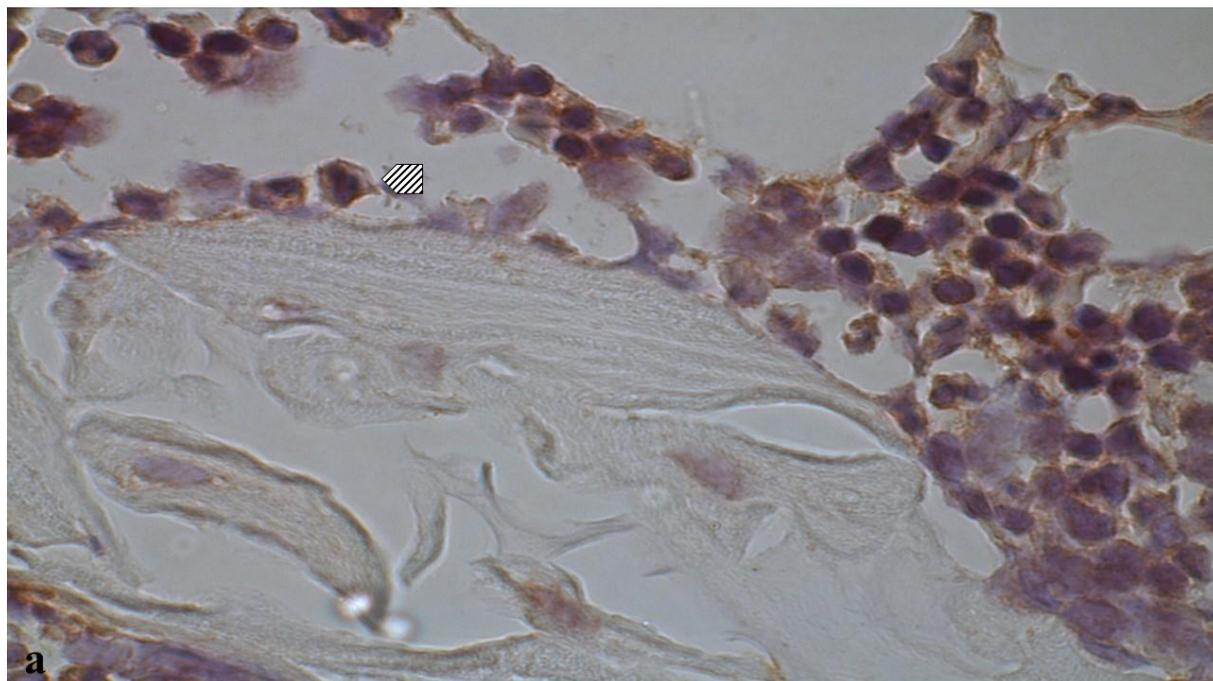


Legenda: Valores das médias (barras) e desvios padrões (linhas acima das das barras) para a Porcentagem de imunomarcação das células para o anticorpo RANKL.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os grupos Sham exibiram maior porcentagem de células marcadas (77,04) quando comparados com os ovariectomizados que tiveram 68,94%, entretanto, esses resultados não foram significativos.

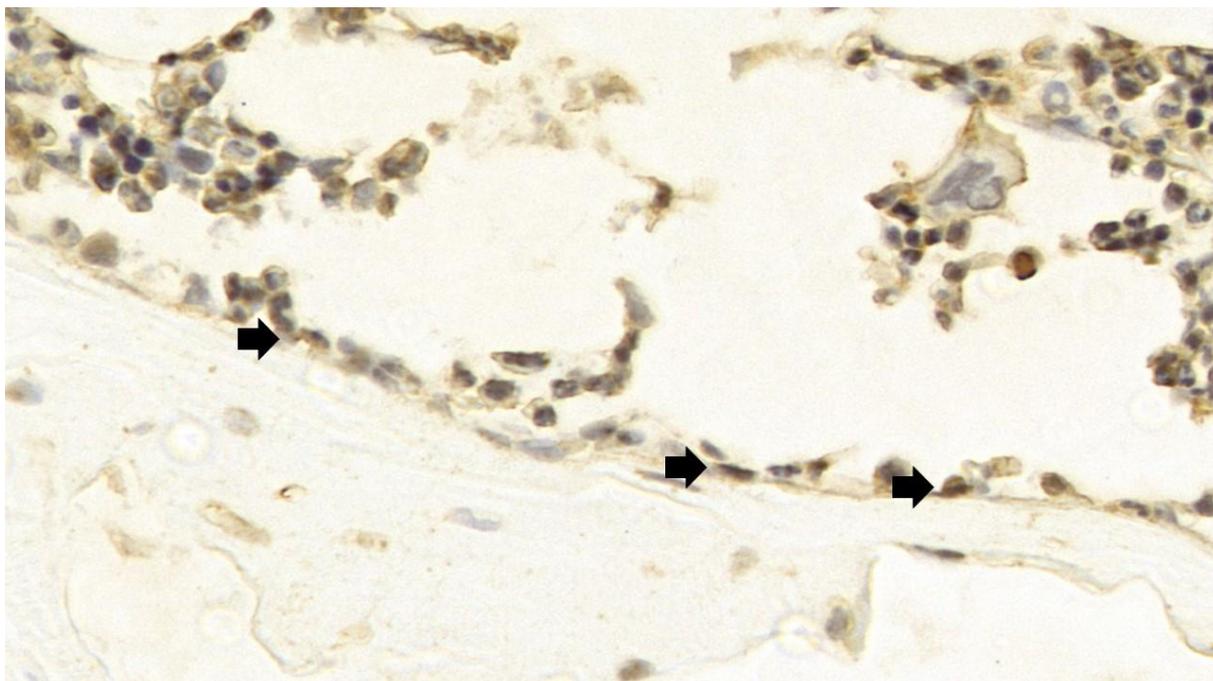
O RANKL foi expresso por osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células da medula óssea e condrócitos (Figuras 11,12, 13 e 14).

Figura 11 - Imagem da reação imunoistoquímica, expressão do anticorpo RANKL em osteoclastos



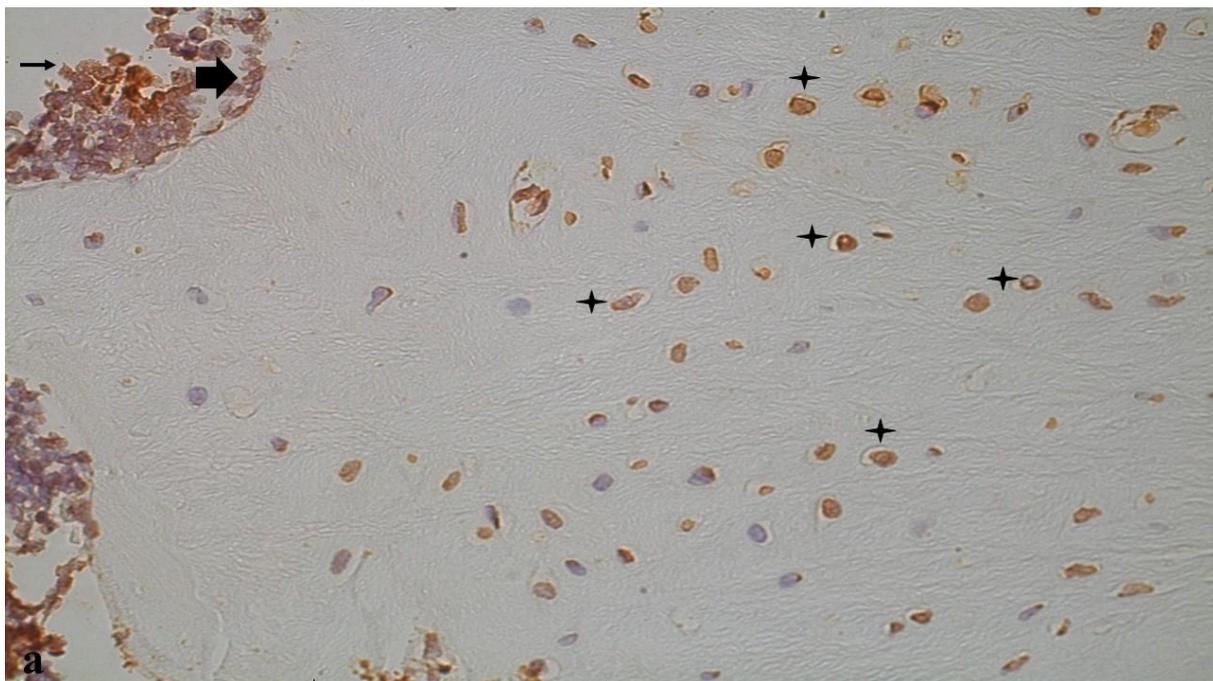
Legenda: a) Osteoclasto exibindo marcação moderada sendo destacada pela seta. Aumento original de 1000x; b) Na seta, osteoclasto fortemente marcado. Aumento original de 1000x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Imagem da reação imunoistoquímica, expressão do anticorpo RANKL em osteoblastos



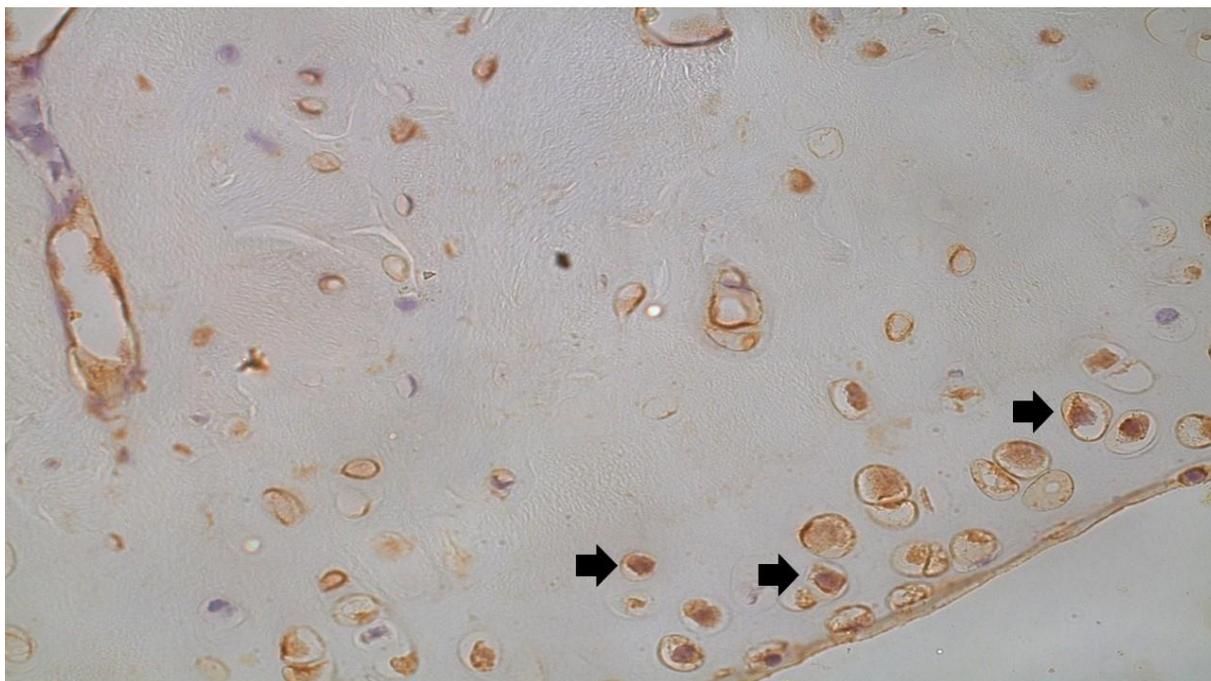
Legenda: Osteoblastos exibindo marcação. Aumento original de 400x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 - Imagem da reação imunoistoquímica, anticorpo RANKL



Legenda: Osteócitos (\blackstar), osteoblastos (\blacktriangleright) e células da medula óssea (\blacktriangleright) exibindo marcação. Aumento original de 400x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 - Imagem da reação imunoistoquímica, expressão do anticorpo RANKL em condrócitos

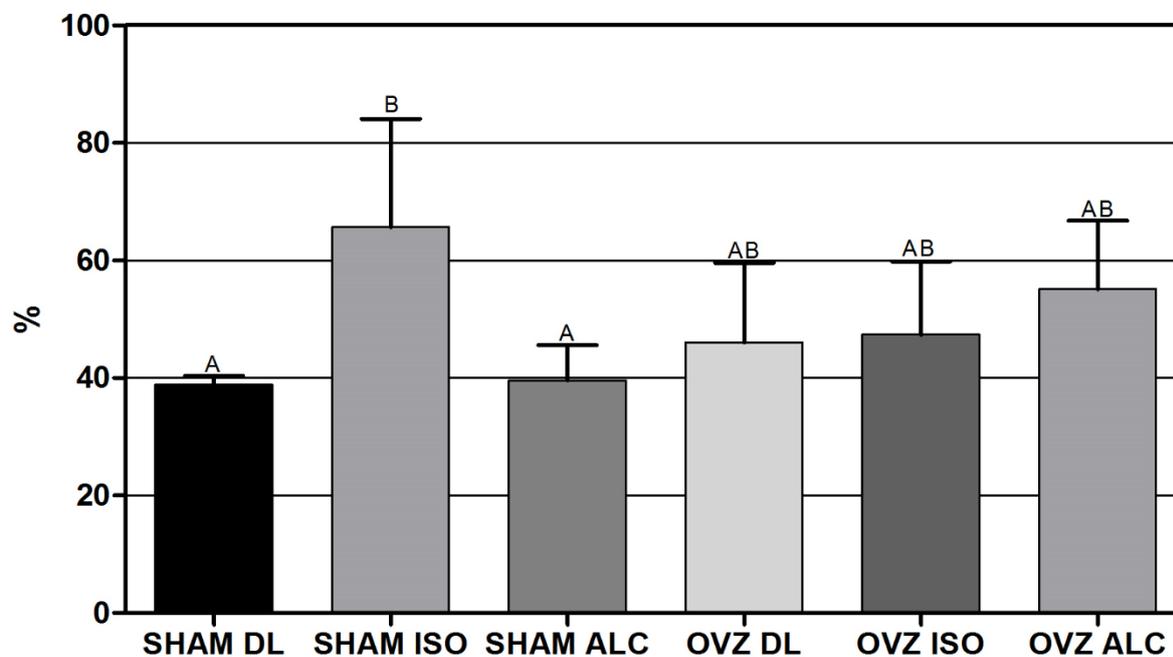


Legenda: Condrócitos exibindo marcação. Aumento original de 1000x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.2 Osteoprotegerina

Os resultados mostraram que o grupo com maior porcentagem de imunomarcção foi o Sham isocalórico, sendo que este foi estatisticamente diferente do Sham dieta livre e Sham álcool. A menor porcentagem encontrada para OPG ocorreu no grupo Sham dieta livre, que foi diferente apenas do Sham isocalórico (Figura 15, Tabela 9).

Figura 15 – Gráfico da porcentagem de imunomarcção das células para a osteoprotegerina



Legenda: Valores das médias (barras) e desvios padrões (linhas acima das das barras) para a porcentagem de imunomarcção das células para a OPG.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 – Valores de p para imunomarcção da OPG

	Ovz álcool	Ovz isocalórico	Ovz dieta livre	Sham álcool	Sham isocalórico
Ovz isocalórico	NS				
Ovz dieta livre	NS	NS			
Sham álcool	NS	NS	NS		
Sham isocalórico	NS	NS	NS	<0,05*	
Sham dieta livre	NS	NS	NS	NS	<0,05*

Legenda: NS – $p > 0,05$ – valores não significativos.

* $p < 0,05$ – valores significativos.

** $p < 0,01$ – valores muito significativos.

*** $p < 0,001$ – valores extremamente significativos.

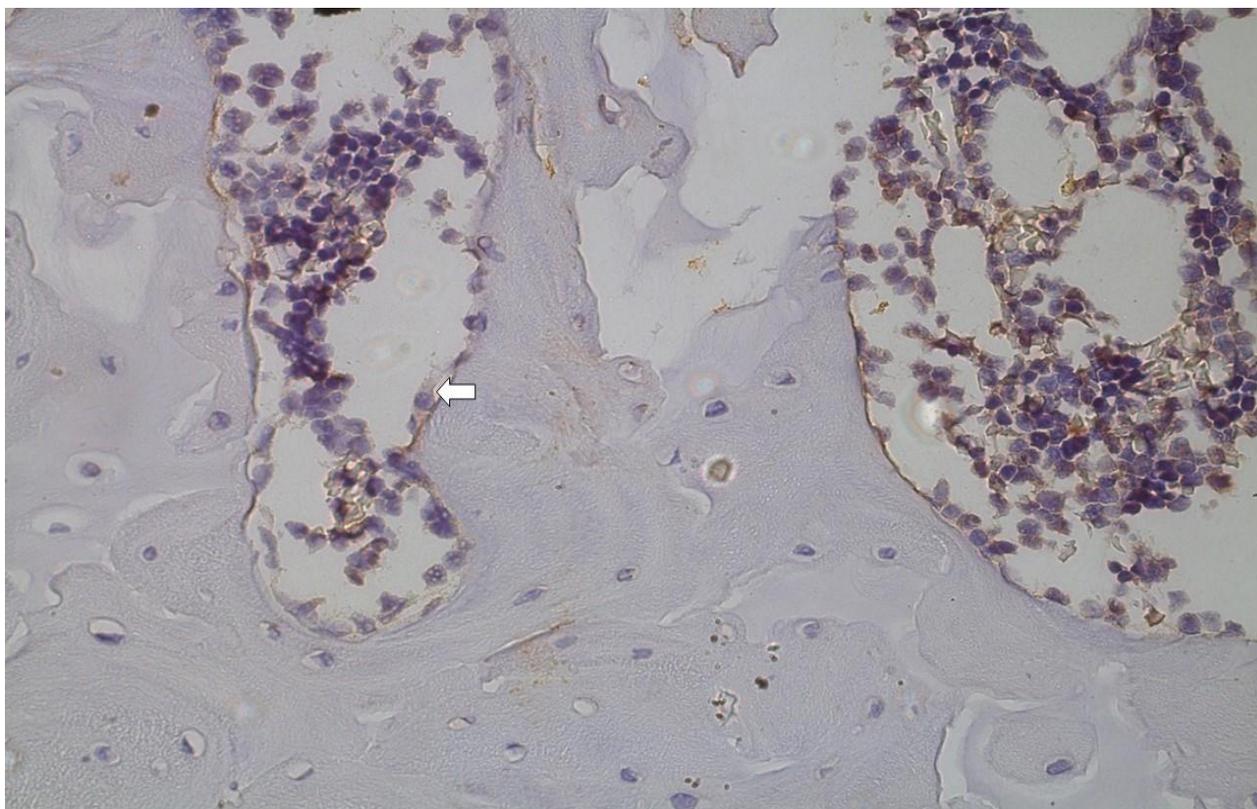
Fonte: Elaborada pelo autor.

Entre os grupos, Sham e Ovz, as médias em porcentagem das células marcadas foram muito próximas, sendo 48,03 e 49,52, respectivamente, dessa forma,

não houve diferença estatisticamente significativa.

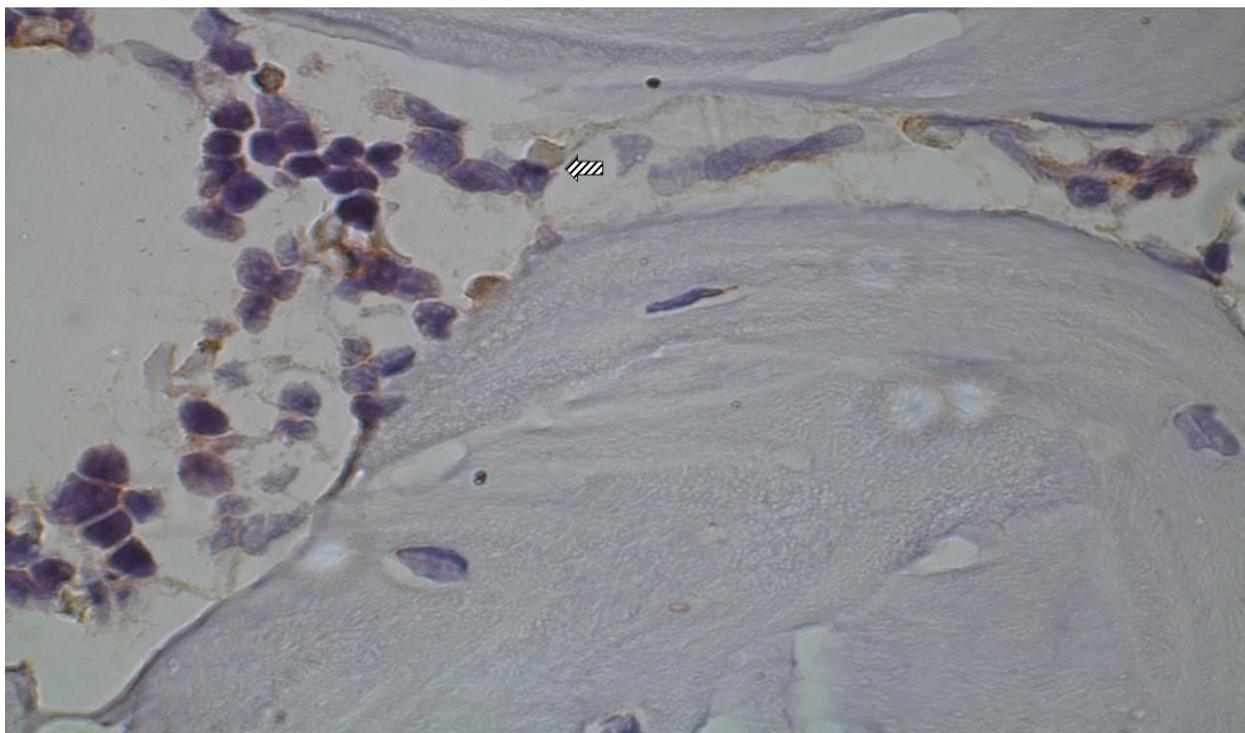
A osteoprotegerina foi expressa por osteoblastos, osteócitos, células da medula óssea e condrócitos (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Figura 16 - Reação imunoistoquímica, anticorpo OPG



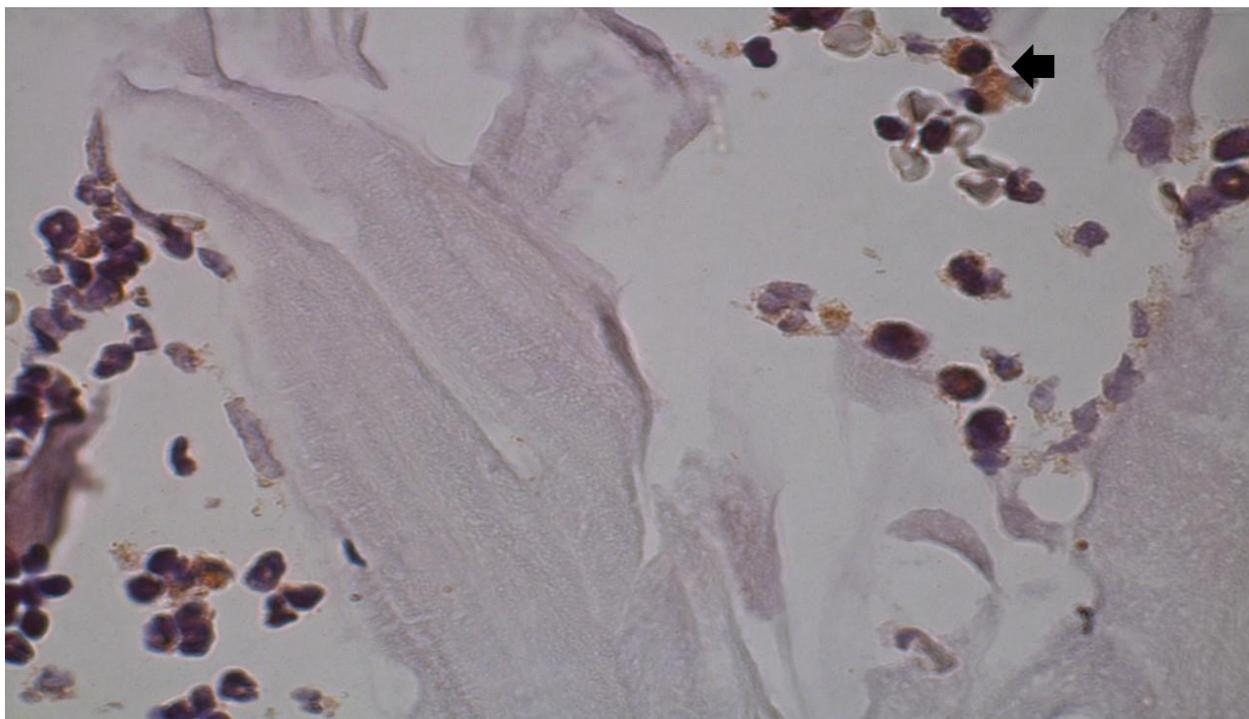
Legenda: Marcação leve de osteoblasto, destacada pela seta. Aumento original de 400x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 - Reação imunoistoquímica, anticorpo OPG



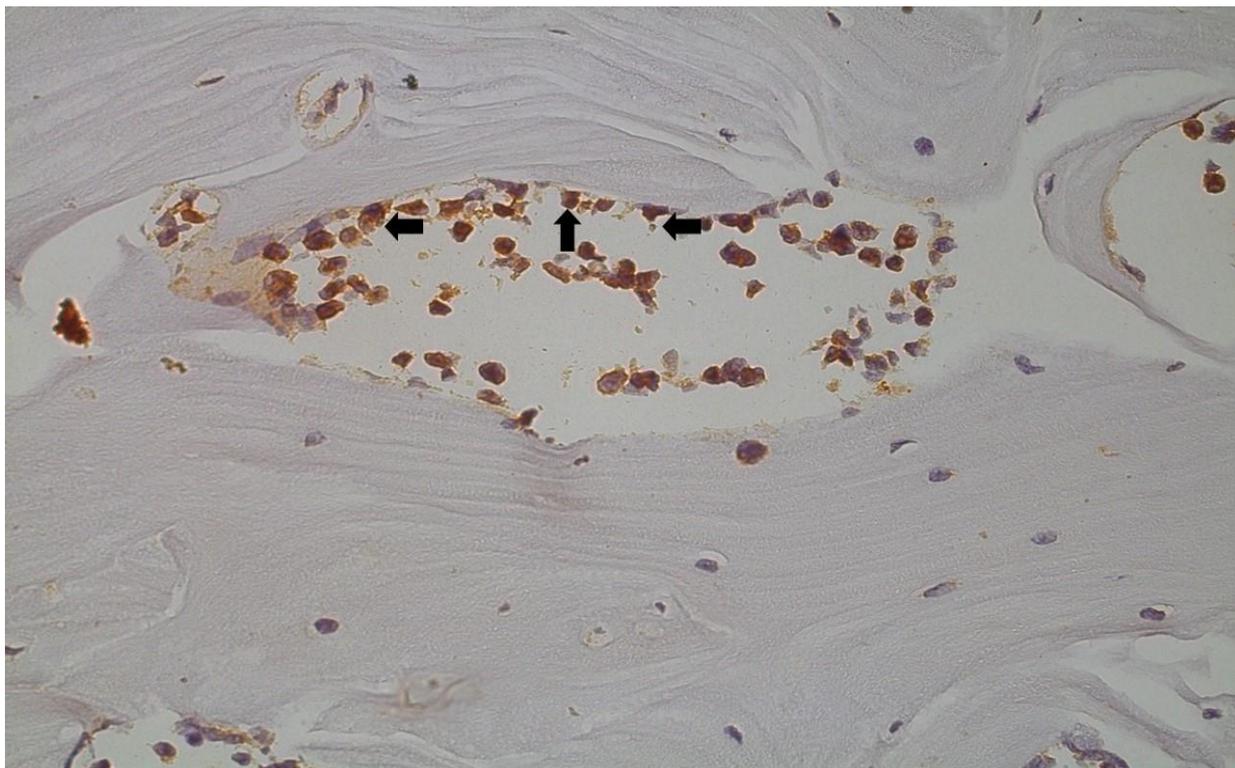
Legenda: Osteoblasto exibindo marcação moderada. Aumento original de 1000x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 - Reação imunoistoquímica, anticorpo OPG



Legenda: Na seta, osteoblastos marcados fortemente pela OPG. Aumento original de 1000x.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Reação imunoistoquímica, anticorpo OPG

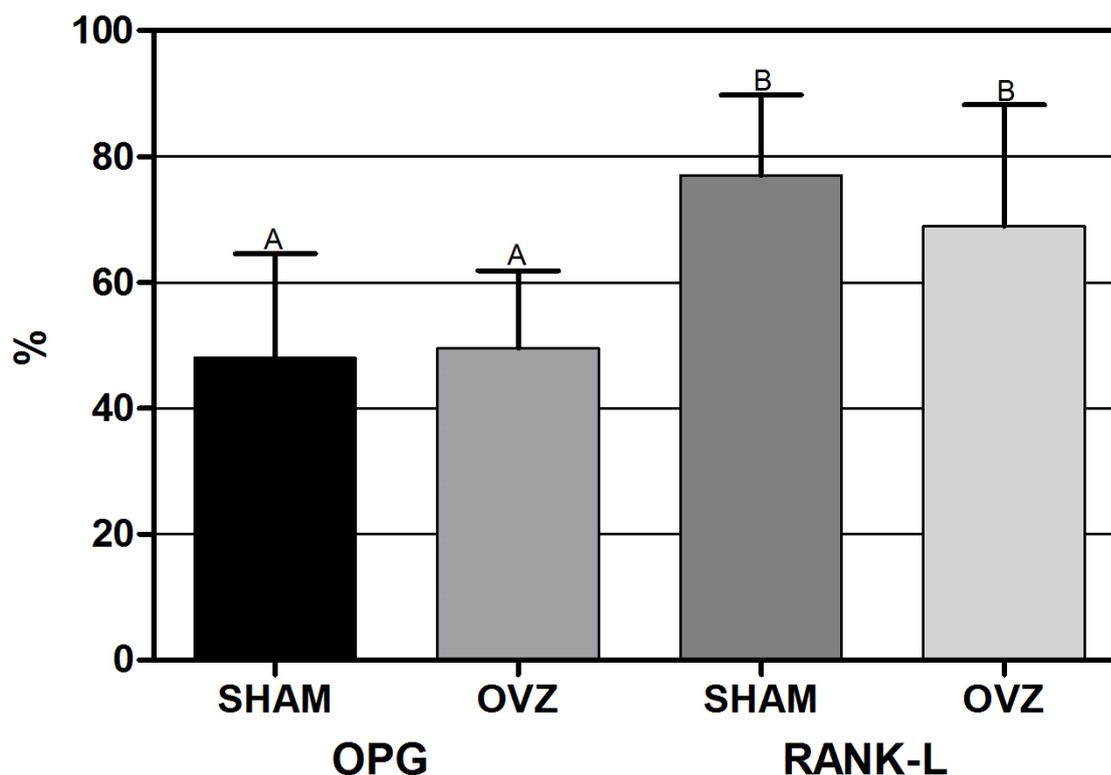


Legenda: Osteoblastos marcados fortemente pela OPG. Aumento original de 400x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.3 RANKL e Osteoprotegerina

A comparação dos marcadores RANKL e osteoprotegerina mostrou que ocorreu diferença estatisticamente significativa (Figura 20 e Tabelas 10 e 11).

Figura 20 - Gráfico da porcentagem de imunomarcção das células para o anticorpo RANKL e OPG, nos grupos Sham e OVZ, independentes da dieta



Legenda: Valores das médias (barras) e desvios padrões (linhas acima das das barras) para a Porcentagem de imunomarcção das células para o anticorpo OPG e RANKL, nos grupos SHAM e OVZ.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 – Valores de p RANKL e OPG

	OVZ RANKL	Sham RANKL	OVZ OPG
Sham RANKL	NS		
OVZ OPG	<0,05*	<0,001***	
Sham OPG	<0,01**	<0,001***	NS

Legenda: NS – $p > 0,05$ – valores não significativos.

* $p < 0,05$ – valores significativos.

** $p < 0,01$ – valores muito significativos.

*** $p < 0,001$ – valores extremamente significativos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 11 – Porcentagens médias de imunomarcaco das células ósseas para OPG e RANKL e proporo OPG/RANKL e RANKL/OPG por grupo

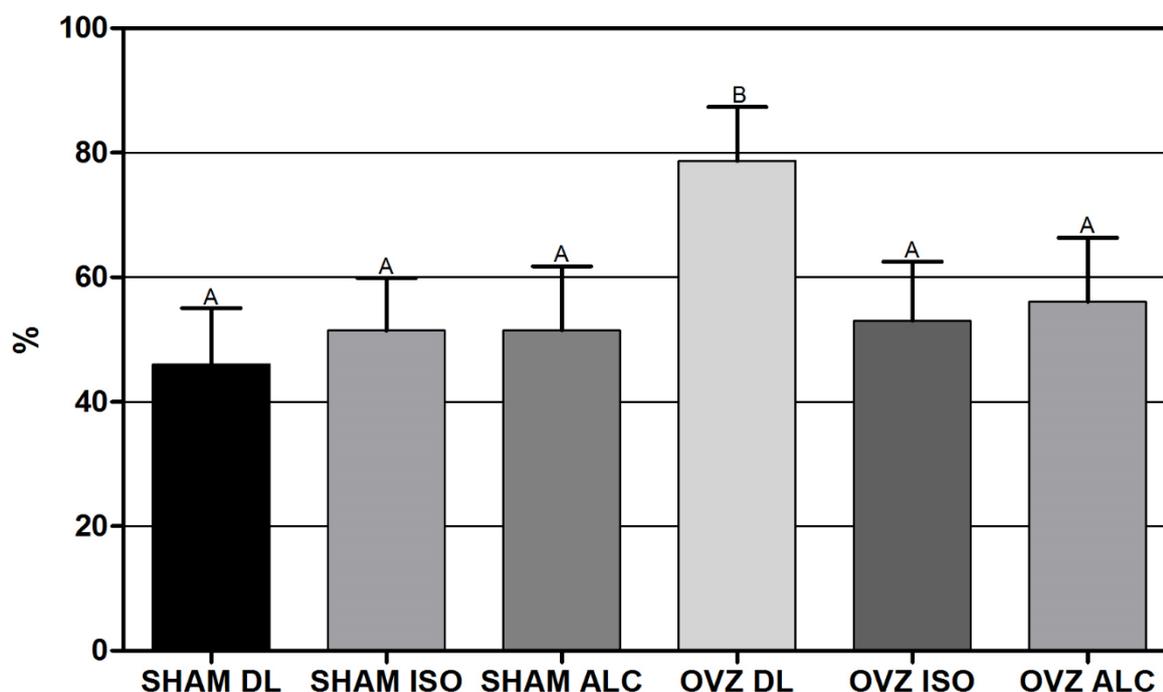
	RANKL	OPG	OPG/RANKL	RANKL/OPG
Sham dieta livre	80,44	38,33	0,47	2,09
Sham isocalórico	85,55	65,67	0,76	1,30
Sham lcool	68,52	39,60	0,57	1,73
OVZ dieta livre	60,45	46,06	0,76	1,31
OVZ isocalórico	74,37	47,37	0,63	1,56
OVZ lcool	70,78	55,13	0,77	1,28

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4.4 Osteocalcina

A maior quantidade de células imunomarcadas foi encontrada no grupo Ovz dieta livre (78,66%), sendo este diferente estatisticamente dos demais. O Sham dieta livre foi o grupo que exibiu menor quantidade de células imunomarcadas (46,03%), apresentando diferença apenas do Ovz dieta livre (figura 21, tabela 12).

Figura 21 – Gráfico da porcentagem de imunomarcção das células para o anticorpo OCC



Legenda: Valores das médias (barras) e desvios padrões (linhas acima das das barras) para a porcentagem de imunomarcção das células para o anticorpo OCC.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12 – Valores de p para imunomarcção da OCC

	Ovz álcool	Ovz isocalórico	Ovz dieta livre	Sham álcool	Sham isocalórico
Ovz isocalórico	NS				
Ovz dieta livre	<0,05*	<0,05*			
Sham álcool	NS	NS	<0,05*		
Sham isocalórico	NS	NS	<0,05*	NS	
Sham dieta livre	NS	NS	<0,05*	NS	NS

Legenda: NS – $p > 0,05$ – valores não significativos.

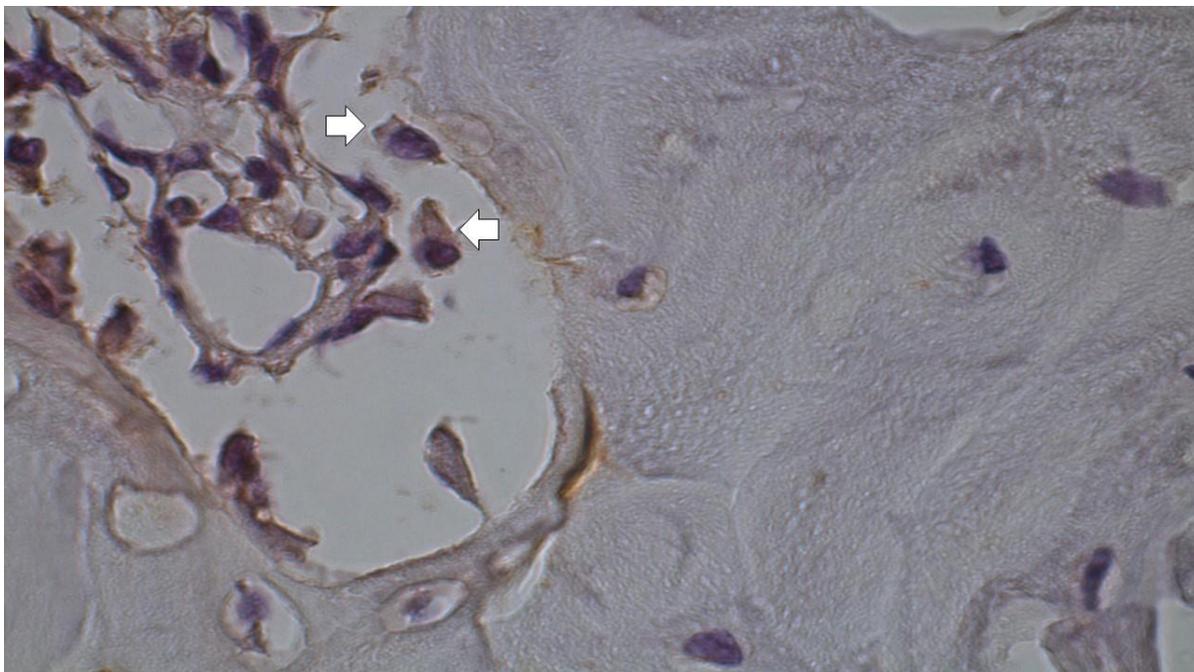
* $p < 0,05$ – valores significativos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os grupos ovariectomizados apresentaram resultados significativos em relação aos grupos Sham, as médias em porcentagem das células imunomarcadas nos dois grupos foram 62,10 e 49,38; respectivamente.

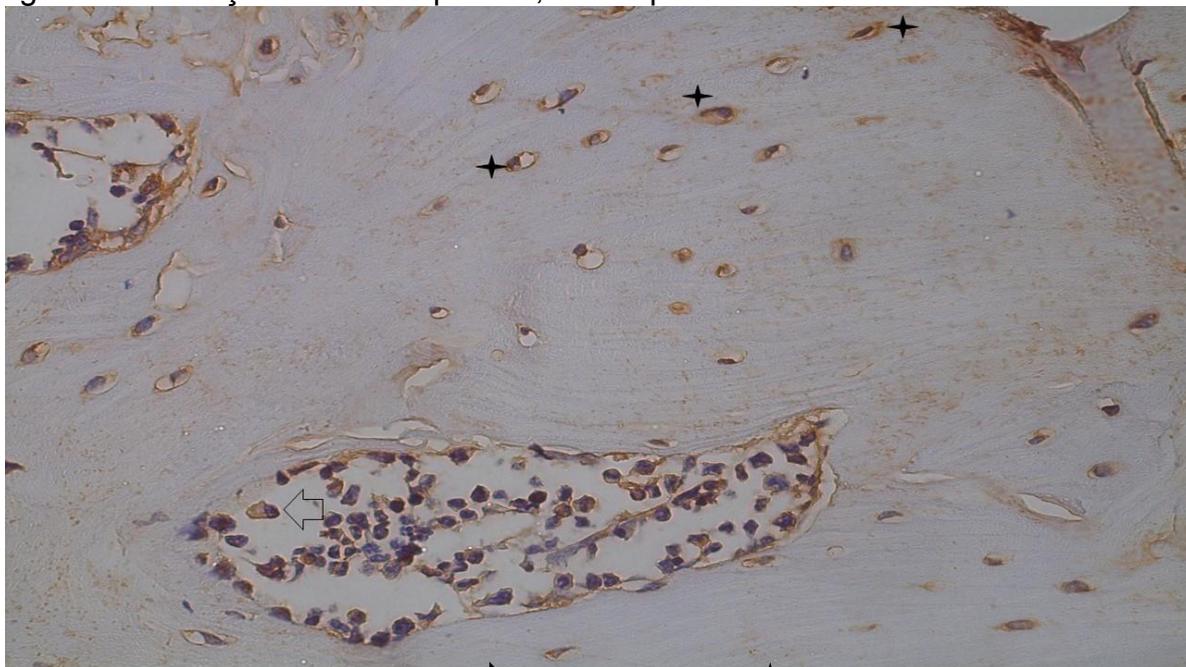
A osteocalcina foi expressa por osteoblastos, osteócitos, células da medula óssea e condrócitos (figura 22, 23, 24, 25).

Figura 22 – Reação imunoistoquímica, anticorpo OCC



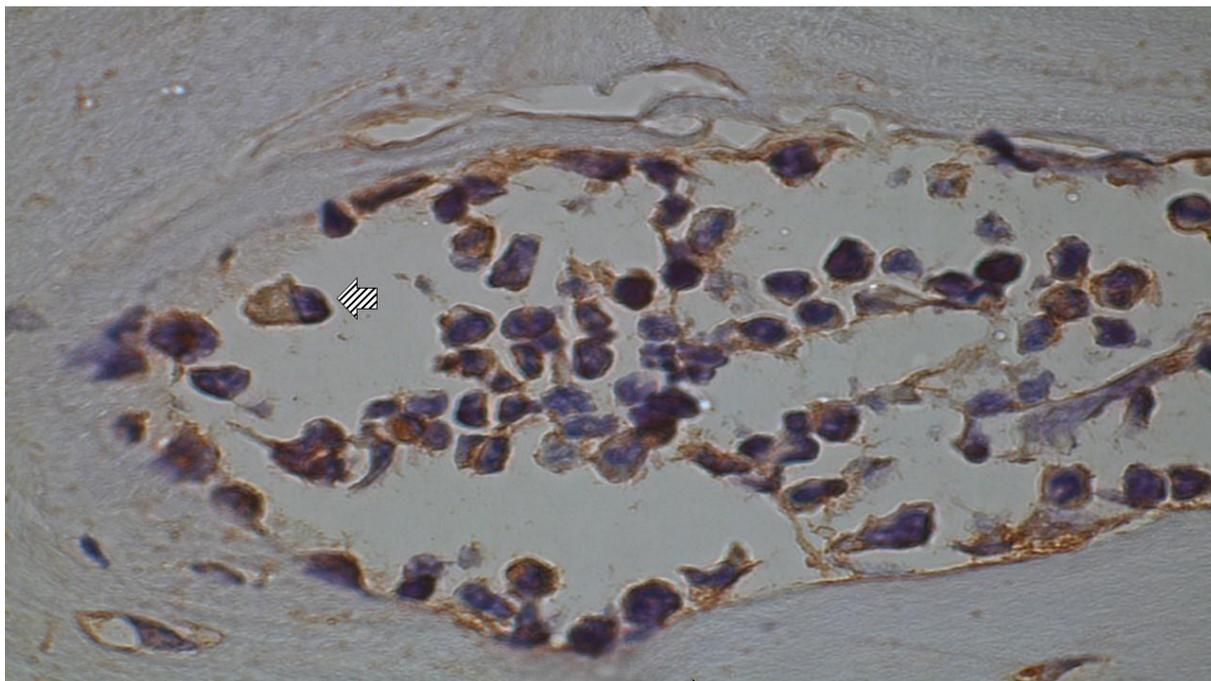
Legenda: Marcação leve de osteoblastos. Aumento original de 100x
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 – Reação imunoistoquímica, anticorpo OCC



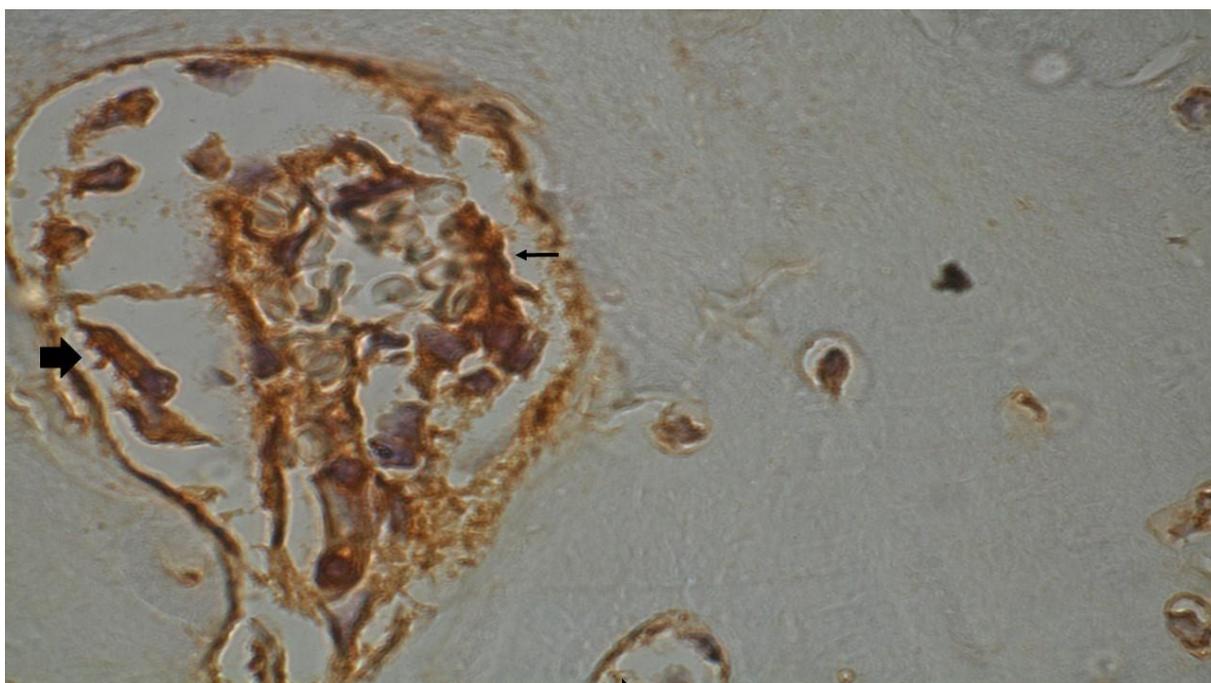
Legenda: Marcação de osteoblastos (→) e de osteócitos (*). Aumento original de 400x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 – Reação imunoistoquímica, anticorpo OCC



Legenda: Osteoblastos exibindo marcação moderada (▨→). Aumento original de 1000x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25 – Reação imunoistoquímica, anticorpo OCC



Legenda: d) Marcação intensa de osteoblastos (■→) e células de medula óssea (■→). Aumento original de 1000x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Na literatura, parece haver um consenso de que a deficiência de estrógeno aumenta a remodelação óssea, alterando seu equilíbrio em favor da reabsorção, que pode causar a osteoporose (Tera et al., 2014). Para a indução da deficiência de estrógeno, sabe-se que a ovariectomia realizada em ratas é reconhecida como adequado modelo de estudo (McCann et al., 2008; Said et al., 2008; Oliver et al., 2013; Tera et al., 2014).

A deficiência de estrógeno decorrente da ovariectomia causa perda óssea em vários locais do esqueleto, sendo esta perda mais evidente nos ossos trabeculares (Jiang et al., 2003; Melhus et al., 2010). Existem muitas similaridades metabólicas entre a perda óssea induzida por ovariectomia em ratas e a perda óssea decorrente da menopausa em mulheres, como o aumento da remodelação óssea, desequilíbrio da formação e reabsorção, e diminuição da absorção de cálcio pelo intestino (Oliver et al., 2013).

Em ratos, a remodelação óssea dos ossos longos, tem início por volta dos três meses de idade e torna-se predominante depois dos seis meses (Gaddini et al., 2016), e ainda esses animais continuam a crescer até o décimo mês de vida, quando se considera o tecido ósseo maduro (Lelovas et al., 2008). Portanto, estudos que realizam ovariectomia em ratas de 3 ou 5 meses de idade, para simular adultos humanos podem ter problemas na interpretação dos resultados, pois a densidade mineral óssea nessa fase não será diminuída como em humanos, mas sim terá um menor aumento no pico de massa óssea, quando comparados com os animais do grupo controle (Lelovas et al., 2008), ou ainda, pode-se ter um aumento da densidade mineral óssea e na rigidez dos ossos, devido ao tecido ósseo ser imaturo (Bagi et al., 1997).

Em mulheres após a menopausa, a reabsorção aumenta em 90% enquanto a formação apenas 45%, sendo ainda maior em osso trabecular do que em cortical (Jiang et al., 2003; McCann et al., 2008; Melhus et al., 2010).

No presente estudo, os animais submetidos à ovariectomia apresentaram menor quantidade de osso trabecular em relação aos animais Sham operados, apesar desta diferença não ter sido significativa. Entretanto, o período de três meses após a

remoção dos ovários foi considerado suficiente para que ocorresse uma significativa perda de massa óssea no fêmur de ratas ovariectomizadas (Hernandes et al., 2012). A diminuição da matriz óssea no fêmur de ratas com deficiência estrogênica (ovariectomizadas com 2 meses de idade e analisadas após 3 meses) também foi observada por Haddad et al. (2014). Utilizando microtomografias, Hsu et al. (2016), constataram alterações na microarquitetura do osso trabecular na cabeça do fêmur e na mandíbula de ratas ovariectomizadas aos 2 meses de vida e que sofreram eutanásia aos 5 meses.

Nos trabalhos citados acima, as idades dos animais são correspondentes à idade usada no presente estudo, porém, a metodologia empregada difere da escolhida para este trabalho. Hernandez et al. (2012), analisaram a perda óssea utilizando radiografias, densitometria e análise histomorfométrica. Concluíram que a análise histológica não pode ser quantitativamente comparada com os métodos da densitometria óssea e de radiografias convencionais, porém, todos são qualitativamente válidos para avaliar a perda óssea decorrentes da ovariectomia.

Haddad et al. (2014), provocou a deficiência de estrógeno através da ovariectomia, entretanto, as ratas foram tratadas com alendronato de sódio com duas concentrações diferentes (1 mg/kg e 2 mg/kg), recebendo esse medicamento duas vezes na semana, por noventa dias, os autores concluíram que os animais que receberam concentrações de 1mg/kg apresentaram diminuição da matriz óssea, semelhante a encontrada nos animais ovariectomizados sem administração de medicamentos.

As alterações do osso trabecular no fêmur e na mandíbula foram detectadas através de microtomografias, no estudo feito por Hsu et al. (2016), método considerado como “padrão ouro” para avaliação da microarquitetura do osso trabecular (Bouxsein et al., 2010).

As alterações de peso também foram analisadas por Chakkalakal et al. (2002) e Deco et al. (2011), e assim como no presente estudo, verificaram que em todos os grupos houve ganho de peso médio. Os animais ovariectomizados apresentaram maior ganho de peso do que os Sham operados, que foi relatado por Kimura et al. (2002), e Haddad et al. (2014), mostrando que a ovariectomia pode estar relacionada à diminuição de receptores de leptina no hipotálamo, causando diminuição da saciedade, maior ingestão de alimentos e conseqüentemente, ganho de massa

corpórea (Frank et al., 2014; Haddad et al., 2014). Além disso, existe a possibilidade de ocorrer diminuição do gasto energético em fêmeas com deficiência estrogênica, o que também facilitaria no ganho de massa corpórea (Richard, 1986).

Os animais do grupo álcool ingeriram uma quantidade menor de ração quando comparados com os animais que recebiam dieta livre, isso deve-se ao fato de que o álcool é uma substância que apresenta alto valor calórico (7,1 kcal/g), mas baixa nutrição, sendo que o álcool produz uma sensação de saciedade (Lieber, 2000). Os grupos isocalóricos foram utilizados com a finalidade de tentar estabelecer um relativo parâmetro nutricional com os grupos álcool (Rocha, 2005; Maddalozzo et al., 2009; Marchini et al., 2012; Salgado et al., 2015). Dessa forma, esses grupos foram usados como controle nutricional simulando a deficiência associada à dieta alcoólica.

O consumo de álcool é um dos fatores de risco para o aparecimento da osteoporose, tem efeitos diretos sobre formação e a reabsorção óssea, ocasionando a diminuição da massa óssea (González-Reimers et al., 2011; López-Larramona et al., 2013).

Estudos em animais mostraram que o álcool é capaz de induzir a osteopenia inibindo a formação óssea, sem efeitos indiretos ou moduladores sobre os hormônios que regulam os tecidos mineralizados, e afeta tanto o osso esponjoso quanto o cortical (Sampson, 1997). A diminuição da formação óssea e o aumento da reabsorção podem indicar que o álcool não apenas inibe a atividade osteoblástica, mas também estimula a atividade osteoclástica (Chakkalakal, 2005).

Tanto para animais como para humanos, é muito difícil definir o que é o consumo leve, moderado e excessivo de álcool (Maurel et al., 2012, Gaddini et al., 2016), alguns autores classificam o consumo de álcool de acordo com a quantidade em gramas ingeridas, sendo leve para o consumo de 1-10 g de álcool por dia, moderado para 11-30 g, e excessivo maior que 30 g por dia (Ganry et al., 2000, Maurel et al., 2012) e outros de acordo com a porcentagem de calorias provenientes do álcool (Maddalozzo et al., 2009; Marchini et al., 2012; Salgado et al., 2015; Carvalho et al., 2016; Gaddini et al., 2016). Os animais neste trabalho, ingeriram em média 16 g de álcool por dia, o que, segundo os autores acima, pode ser considerado consumo moderado.

Por outro lado, neste estudo, 53,49% das calorias diárias foram provenientes do álcool, embora estudos anteriores do nosso grupo, com metodologia semelhante

(álcool a 20%), tenham obtido 37,83% (Marchini et al., 2012), 44,5% (Salgado et al., 2015) e 46,87% (Carvalho et al., 2016). Este achado sugere que os animais foram submetidos ao consumo excessivo de álcool, já que, segundo Gaddini et al., 2016, quando o álcool contribui com mais de 10% da energia diária, o consumo pode ser considerado excessivo. Em alcoolistas, é comum que 40 a 60% das calorias diárias sejam provenientes do álcool, porém, essas calorias não estão relacionadas a proteínas, vitaminas ou sais minerais, causando deficiências nutricionais (Lieber, 2000).

Acredita-se que os efeitos prejudiciais do álcool no osso são notados perante o uso abusivo do mesmo e não com consumo moderado (Berg et al., 2008; Alvisa-Negrin et al., 2009),

Os efeitos do álcool no esqueleto nem sempre são prejudiciais, são dependentes da dose administrada e da idade (Maddalozzo et al., 2009). O consumo crônico e excessivo de álcool é capaz de desequilibrar a remodelação óssea, causando uma lenta mas progressiva perda óssea em ratos com esqueleto maduro (Gaddini et al., 2016). No entanto, no presente estudo as ratas sofreram eutanásia com 6 meses de idade, faixa etária em que ainda não são consideradas “maturas esquelétalmente”, possivelmente um dos motivos pelos quais a perda óssea que foi encontrada não ter sido significativa. De acordo com a literatura, a idade de 6 meses de ratas corresponde a um adulto de 30 anos (Sampson, 2002).

O consumo moderado de álcool está relacionado com pequenas alterações na geometria, densidade e microarquitetura óssea (Gaddini et al., 2016). Pesquisas mostraram uma correlação positiva entre o consumo moderado de álcool e maior densidade mineral óssea, especialmente em mulheres na pós-menopausa (Ganry et al., 2000; Rapuri et al., 2000), e ainda que esse consumo aumenta os níveis de estradiol na mulher após a menopausa, apresentando efeito protetor (Rocha, 2005).

Em 2000, Ganry et al. estudaram o efeito da ingestão de álcool na densidade mineral óssea em mulheres idosas. Os autores encontraram que o uso moderado de álcool (11 – 29 g/dia) foi associado ao aumento significativo da densidade mineral óssea do trocânter dos fêmures das idosas. As mulheres que não ingeriram, as que fizeram uso pequeno e as que beberam muito não apresentaram aumento na densidade mineral óssea. Sendo assim, os resultados mostraram que o efeito benéfico sobre a densidade mineral óssea ocorreu apenas com o consumo moderado,

fornecido por três copos de vinho por dia, doses maiores que essa apresentam efeitos prejudiciais ao tecido ósseo.

Neste trabalho, o consumo de álcool pelas ratas foi considerado moderado, levando em conta a média de ingestão de 16 g/dia e os resultados histomorfométricos e imunoistoquímicos que não mostraram alterações significativas no processo de remodelação óssea. Gaddini et al. (2016), afirmam que o consumo pode ser considerado excessivo quando mais de 10% das calorias diárias são provenientes do álcool e, no presente estudo, 53,49% das calorias diárias foram provenientes do álcool. No entanto, no consumo excessivo ocorrem efeitos nocivos do álcool no tecido ósseo, o que não foi observado por nós.

A espessura da cortical óssea não foi alterada no estudo feito por Rocha (2005), usando diferentes concentrações de álcool (10, 20 e 30%), em ratas de 6 meses de vida, assim como foi visto no presente estudo.

De modo geral, os ossos longos e a coluna são mais sensíveis à deficiência de estrógeno, no entanto, existem discrepâncias notáveis de acordo com a idade dos animais, com a localização óssea e o tempo do estudo, dificultado assim, a comparação dos resultados de diferentes estudos (Francisco et al. 2011; Liu et al., 2015).

Dentre os ossos longos, o fêmur apresentou redução na densidade mineral óssea e desequilíbrio na remodelação em estudos que analisaram os efeitos do álcool no tecido ósseo (Peris et al., 1992; Wezeman et al., 2000). Rocha, 2005 analisou o efeito do consumo crônico de álcool em fêmur de ratas, às quais foram administradas por 8 semanas soluções de álcool a 10%, 20% e 30%. O autor concluiu que a maior concentração de álcool apresentou efeito deletério para o tecido ósseo, tendo sido observada diminuição do percentual do trabeculado ósseo. A superfície superior do colo do fêmur é um local de rápida perda óssea e com o envelhecimento, esta região torna-se vulnerável e frágil (Seeman, 2013). Entretanto, no presente estudo as análises histológicas e histomorfométricas dos diferentes grupos não mostraram alterações causadas somente pelo álcool ou deficiência estrogênica, ou pela associação dos dois fatores.

Em 2013, Oliver et al. observaram radiograficamente, que ratas de 10 semanas ovariectomizadas apresentaram uma perda de 30% na espessura da cortical óssea do fêmur, após 12 meses da ovariectomia, quando comparadas com as ratas do grupo

controle, assim como no estudo realizado por Moraes, 2006, que encontrou resultados significativos entre os animais do grupo controle e os animais ovariectomizados, através da histomorfometria na diáfise do fêmur (ratas adultas foram ovariectomizadas e sofreram eutanásia após 1 mês). Esses achados diferem dos encontrados no presente estudo, em que não foram observadas diferenças significativas na espessura da cortical entre os grupos, assim como nos estudos desenvolvidos por Rocha (2005) e Sukenari et al. (2015), que também utilizaram ratas ovariectomizadas.

As primeiras alterações na espessura do osso cortical e no diâmetro do canal medular em fêmur e tíbia são percebidas entre 90 e 120 dias após a ovariectomia (Yamamoto et al., 1995). O diâmetro ósseo e o diâmetro medular não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes grupos, corroborando com o estudo de Moraes (2006).

Os marcadores imunoistoquímicos utilizados foram o RANKL, a osteoprotegerina (OPG), e a osteocalcina (OCC). A OPG e a OCC foram expressas por osteoblastos, osteócitos, células da medula óssea e condrócitos. O RANKL, além dessas células também apresentou marcação em osteoclastos. A marcação dos condrócitos não era objetivo do estudo, mas os achados imunoistoquímicos dos anticorpos utilizados revelaram uma reação positiva.

Concordando com os resultados obtidos neste trabalho, Mahabir et al. (2014), não encontraram alterações nos marcadores bioquímicos da remodelação óssea em mulheres no período após a menopausa, que fizeram uso de álcool em diferentes quantidades (sem álcool, 15 g por dia e 30 g por dia) durante 8 semanas.

A diferenciação e maturação de osteoclastos é regulada por hormônios e citocinas que modificam a síntese de OPG e RANKL pelas células estromais. Geralmente quando ocorre aumento na proporção de RANKL/OPG, o número e a atividade de osteoclastos também aumentam (Wang et al., 2014).

Após a menopausa, o decréscimo nos níveis de estrógeno resulta na diminuição da atividade da osteoprotegerina (OPG) e no aumento da atividade do RANKL, levando ao aumento de reabsorção óssea (Gallagher, 2008). No presente trabalho, os grupos ovariectomizados apresentaram menor porcentagem de células imunomarcadas pela osteoprotegerina quando comparadas com o RANKL. No entanto, observou-se que a porcentagem de imunomarcagem das células pelo RANKL era sempre maior do que pela OPG também nos Sham operados.

Entre os grupos sham operados, o Sham álcool apresentou menor porcentagem de células imunomarcadas para o RANKL, o que não está de acordo com a hipótese inicial do presente estudo, já que se esperava encontrar maior expressão do RANKL nos grupos álcool, como foi observado em outros estudos (Chen et al., 2008; Callaci et al., 2009).

Nos animais ovariectomizados, a maior porcentagem de células imunomarcadas pela OPG ocorreu no grupo álcool, níveis aumentados da osteoprotegerina em pacientes alcoólatras já foram relatados por Garcia-Valdecasas-Campelo (2006), e foram interpretados como um mecanismo compensatório da osteopenia.

A proporção OPG/RANKL é significativamente maior em alcoólatras (Santori et al., 2008), acredita-se que o aumento da OPG é uma medida de proteção contra a perda óssea induzida pelo álcool. Entretanto, analisando os grupos deste estudo, encontrou-se maior proporção para o Ovz álcool (0,77), mas sem diferença significativa com relação ao Ovz isocalórico e Ovz dieta livre, e no grupo Sham álcool a proporção foi menor (0,57) que no grupo Sham isocalórico que não fez uso de álcool. Estes achados sugerem que apenas o álcool não apresentou alterações no tecido ósseo, mas a associação deste com a deficiência de estrógeno pode ter iniciado uma perda óssea, que teria resultado em um aumento compensatório da expressão da osteoprotegerina, que segundo os autores acima aumenta com o consumo do álcool.

A expressão da OCC em osteoblastos, no estudo feito por Wattanachanya et al. (2015), mostrou que esta proteína é expressa por osteoblastos maduros, indicando que esta proteína é marcadora da fase final de formação óssea. Ramirez-Yañez et al. (2004), relataram a expressão da OCC em condrócitos, e acreditam que esta pode estar relacionada com o estágio de maturação dos mesmos, sugerindo que os condrócitos hipertróficos desenvolveram um marcador fenotípico de mineralização da matriz, semelhante aos osteoblastos, mostrando que a OCC é uma indicadora da maturação tardia de condrócitos. Esses achados estão em concordância com Salgado et al. (2015) e com o presente estudo, em que tanto os osteoblastos quanto os condrócitos exibiram a marcação da OCC.

A ovariectomia alterou a expressão da osteocalcina no estudo realizado por Luvizuto et al. (2010), em que os autores verificaram expressão mais fraca deste marcador no grupo ovariectomizado, o que atribuíram à apoptose de osteoblastos que

a ovariectomia provoca. Contudo, a expressão da OCC foi verificada através de análise semi-quantitativa, baseada nas intensidades de marcação, diferindo das análises do presente estudo. Salgado et al. (2015) analisaram a expressão da OCC no côndilo mandibular de ratas, e observaram que a ovariectomia não alterou a expressão da OCC, assim como no presente estudo.

Os níveis séricos da OCC refletem diretamente na síntese de osteoblastos e consequentemente nas atividades dessas células (Hozuki et al., 2010). Os níveis da osteocalcina aumentam com a idade, e após a menopausa em mulheres idosas (Oana-Roxana et al., 2016), e diminuem na presença do álcool (Gardini et al., 2016, Calacci et al., 2009).

Os grupos ovariectomizados expressaram maior quantidade de osteocalcina, dentre esses, o Ovz dieta livre apresentou maior imunomarcação das células, o que pode estar relacionado ao aumento dos níveis séricos da osteocalcina em mulheres após a menopausa (Oana-Roxana, et al., 2016).

Os resultados encontrados neste estudo permitem sugerir que a idade das ratas, o período de consumo de álcool (oito semanas) e a intensidade moderada do consumo de álcool, podem não terem sido suficientes para promover alterações significativas no processo de remodelação óssea.

6 CONCLUSÃO

As condições experimentais deste estudo permitiram concluir que ratas adultas jovens, esquelotalmente imaturas, submetidas ao alcoolismo crônico moderado, à remoção dos ovários ou à associação de ambos, mantêm as características de remodelação óssea cortical e trabecular do fêmur preservadas.

REFERÊNCIAS*

- Alvisa-Negrin J, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, Garcia-Valdecasas-Campelo E, Valls MRA, Pelazas-Gonzalez R, et al. Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol*. 2009;44(5):468-75.
- Amadei SA, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(1):5-12.
- Bagi CM, Ammann P, Rozzoli R, Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int*. 1997;61:336-44.
- Berg KM, Kunins HV, Jackson JL, Nahvi S, Chaudhry A, Harris KA, et al. Association between alcohol consumption and both osteoporotic fracture and bone density. *Am J Med*. 2008;121(5):406-18.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011;26(2):229-38.
- Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif Tissue Int*. 2009;84(6):474-84.
- Carvalho ICS, Dutra TP, De Andrade DP, Balducci I, Pacheco-Soares C, Rocha RF. High doses of alcohol during pregnancy cause DNA damages in osteoblasts of newborn rats. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2015. doi:10.1002/bdra.23468.
- Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29(12):2077-90. Review.
- Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Lybarger DL, et al. Chronic ethanol consumption results in deficient bone repair in rats. *Alcohol and Alcoholism*. 2002;37(1):13-20.
- Chamouni A, Oury F. Reciprocal interaction between bone and gonads. *Arch Biochem Biophys*. 2014;1(561):147-53.
- Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *Biomed Res Int*. 2014;2014:731039. doi:10.1155/2014/731039.

*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM: c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

De Amorim FPLG, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, Da Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Hist.* 2008;39:401-8.

Deco CP, Marchini AMPS, Bárbara MAM, Vasconcellos LMR, Rocha RF, Marchini L. Negative effects of alcohol intake and estrogen deficiency combination on osseointegration in a rat model. *J Oral Implantol.* 2011;37(6):633-9.

Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kani JA, Malluche H, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2013;28(1):2-17.

Eastell R. Identification and management of osteoporosis in older adults. *Medicine.* 2013;41(1):47-52.

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

Faloni APS, Cerri PS. Cellular and molecular mechanisms of the estrogen in the bone resorption. *Rev Odontol UNESP.* 2007;36(2):181-8.

Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res.* 2011;29(2):189-96

Frank A, Brown LM, Clegg DJ. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. *Front Neuroendocrinol.* 2014;35(5):550-7.

Gaddinni GW, Turner RT, Grant KA, Iwaniec UT. Alcohol: a simple nutrient with complex actions on bone in the adult skeleton. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(4):657-71.

Galduróz JCF, Caetano R. Epidemiology of alcohol use in Brazil. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26 Suppl 1:3-6.

Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas.* 2008;60(1):65-9.

Ganry O, Baudoin C, Fardellone P. Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women. *Am J Epidemiol.* 2000;151(8):773-80.

Garcia-Valdecasas-Campelo E, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, De La Vega-Prieto MJ, Milena-Abril A, Sánchez-Pérez MJ, et al. Serum osteoprotegerin and rankl levels in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol.* 2006;41(3):261-6.

Gonzalez-Calvin JL, Mundi JL, Casado-Caballero FJ, Abadia AC, Martin-Ibañez JJ. Bone mineral density and serum levels of soluble tumor necrosis factors, estradiol,

and osteoprotegerin in postmenopausal women with cirrhosis after viral hepatitis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4844-50.

González-Reimers E, Alvisa-Negrín J, Santolaria-Fernández F, Martín-González MC, Hernández-Betancor I, Fernández-Rodríguez CM, et al. Vitamin D and Nutritional Status are Related to Bone Fractures in Alcoholics. *Alcohol Alcohol.* 2011;46(2):148–55.

Guañabens N, Parés A. Osteoporosis en la cirrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol.* 2012;35(6):411-20.

Haddad PT, Salazar M, Hernandes L. Histomorfometria da matriz orgânica do fêmur de ratas ovariectomizadas tratadas com alendronato de sódio. *Rev Bras Ortop.* 2015;50(1):100-04. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbo.2014.01.021>

Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone.* 2009;44(6):1026-33.

Hernandez L, Ramos AL, Micheletti KR, Santi AP, Cuoghi OA, Salazar M. Densitometry, radiography, and histological assessment of collagen as methods to evaluate femoral bones in an experimental model of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2012;23(2):467-73.

Hozuki T, Imai T, Tsuda E, Matsumura A, Yamamoto D, Toyoshima T, et al. Response of serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to risedronate monotherapy and combined therapy with vitamin K(2) in corticosteroid-treated patients: A pilot study. *Intern Med.* 2010;49:371–6.

Hsu PY, Tsai MT, Wang SP, Chen YJ, Wu J, Hsu JT. Cortical bone morphological and trabecular bone microarchitectural changes in the mandible and femoral neck of ovariectomized rats. *Plos One* 2016. Apr 29;11(4):e0154367. doi: 10.1371/journal.pone.0154367. eCollection 2016.

Ishigaki R, Takagi M, Igarashi M, Ito K. Gene expression and immunohistochemical localization of osteonectin in association with early bone formation in the developing mandible. *Histochem J.* 2002;34(1-2):57-66.

Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab.* 2003;21(6):388-95.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metabol.* 2012;23(11):576-81.

Klein-Nulend J, van Oers RFM, Bakker AD, Bacabac RG. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. *J Biomech.* 2015;48(5):855-65.

- Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, et al. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(4):1349-53.
- Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: Regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1143:123-50.
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma Se, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008;58(5):424-30.
- Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006;85(7):584-95.
- Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mt Sinai J Med*. 2000;67(1):84-94.
- Liu XL, Li CL, Cai WX, Zheng LW. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clin Oral Impl Res*. 2015;26(4):392-8.
- Laranjeira R. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) – 2012. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD) – UNIFESP, 2014.
- López-Larramona G, Lucendo AJ, González-Delgado L. Alcoholic liver disease and changes in bone mineral density. *Rev Esp Enferm Dig*. 2013;105(10) :609-21.
- Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia Jr IRG, Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*. 2010;46(4):1021-9.
- Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CHT, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, et al. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int*. 2009;20:1529-38.
- Mahabir S, Baer DJ, Pfeiffer RM, Li Y, Watkins BA, Taylor PR. Low to moderate alcohol consumption on serum vitamin D and other indicators of bone health in postmenopausal women in a controlled feeding study. *Eur J Clin Nutr*. 2014;68(11):1267-70.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21(2):115-37.
- Marchini AMPS, Deco CP, Lodi KB, Marchini L, Santo AME, Rocha RF. Influence of chronic alcoholism and oestrogen deficiency on the variation of stoichiometry of hydroxyapatite within alveolar bone crest of rats. *Arch Oral Biol*. 2012;57(10):1385-94. doi:10.1016/j.archoral-bio.2012.04.011.

- Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffre C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int.* 2012;23:1-16.
- McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, et al. Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res.* 2008;26(3):384-93.
- Melhus G, Brorson SH, Baekkevold ES, Andersson G, Jemtland R, Olstad OK, et al. Gene expression and distribution of key bone turnover markers in the callus of estrogen-deficient, vitamin D-depleted rats. *Calcif Tissue Int.* 2010;87(1):77-89.
- Miheller P, Muzes G, Rácz K, Blázovits A, Lakatos P, Herszényi L, et al. Changes of OPG and RANKL concentrations in Crohn's disease after infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(11):1379-84.
- Mochizuki A, Takami M, Miyamoto Y, Nakamaki T, Tomoyasu S, Kadono Y, et al. Cell adhesion signaling regulates RANK expression in osteoclast precursors. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e48795.
- Moraes FP. Análises histológica e morfométrica no fêmur de ratas (*Rattus norvegicus*) com osteoporose induzida. [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2006.
- Moschen AR, Kaser A, Stadlmann S, Millonig G, Kaser S, Mühlechner P, et al. The RANKL/OPG system and bone mineral density in patients with chronic liver disease. *J Hepatol.* 2005;43(6):973-83.
- Nanci A. Ten Cate, histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- Oana-Roxana P, Popescu M, Novac L, Mogoantă L, Pavel LP, Vicas RM. Postmenopausal osteoporosis – clinical, biological and histopathological aspects. 2016;57(1):121-30.
- Oliver RA, Yu Y, Yee G, Low AK, Diwan AD, Walsh WR. Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats. *Osteoporosis Int.* 2013;24(10):2581-9.
- Parfitt AM, Drezner MC, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2(6):595–610.
- Parker BD, Bauer DC, Ensrud KE, Ix JH. Association of osteocalcin and abdominal aortic calcification in older women: the study of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int.* 2010;86:185-91.
- Peris P, Parès A, Guañabens N, Pons F, Martínez de Osaba MJ, Caballeria J, et al. Reduced spinal and femoral bone mass and deranged bone mineral metabolism in

chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol*. 1992;27(6):619-25.

Pivonka P, Zimak J, Smith DW, Gardiner BS, Dunstan CR, Sims NA, et al. Model structure and control of bone remodeling: A theoretical study. *Bone*. 2008;43:249-63.

Raffi MB, Mendez MC, Riet-Correa F. Estudos histomorfométricos e histológico das lesões ósseas causadas por flúor em aves. *PesqVet Bras*. 1997;17(2):69-76.

Ramirez-Yañez GO, Daley TJ, Symons AL, Young WG. Incisor disocclusion in rats affects mandibular condylar cartilage at the cellular level. *Archs Oral Biol*. 2004;49(5):393-400.

Rapuri PB, Gallagher JC, Balhorn KE, Ryschon KL. Alcohol intake and bone metabolism in elderly women. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:1206-13.

Richard D. Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol*. 1986;250(2):245-9.

Rocha RF. Influência ao consumo crônico de álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas. [tese de livre-docência]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2005.

Rodrigues AM, Caetano-Lopes J, Vale AC, Vidal B, Lopes A, Aleixo I, et al. Low osteocalcin/collagen type I bone gene expression ratio is associated with hip fragility fractures. *Bone*. 2012;51(6):981-89.

Said F, Ghoul-Mazgar S, Ruhin B, Abdellaoui M, Chlaghmi F, Safta S, et al. Mandibular bone alterations of ovariectomized rats under vitamin D insufficiency. *Histol Histopathol*. 2008;23(4):479-85.

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

Sampson HW. Alcohol, osteoporosis, and bone regulating hormones. *Alcohol ClinExp Res*. 1997;21(3):400-3.

Sampson HW. Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. *Alcohol Research & Health*. 2002;26(4):292-98.

Santori C, Ceccanti M, Diacinti D, Attilia ML, Toppo L, D'Erasmus E et al. Skeletal turnover, bone mineral density, and fractures in male chronic absusers of alcohol. *J Endocrinol Invest*. 2008;31(4):321-6.

Seeman E. Age and menopause related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure. *J Gerontol A BiolSci Med Sci*. 2013;68(10):1218-25.

Silvestrini G, Ballanti P, Patacchiolo F, Leopizzi M, Gualtieri N, Monazzi P, et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in

fêmur and tibia of the rat. *J Mol Hist.* 2005;36(1-2):59-67.

Sims NA, Vrahnas C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch BiochemBiophys.* 2014;561:22-8.

Sukenari T, Horii M, Ikoma K, Kido M, Hayashi S, Hara Y, et al. Cortical bone water changes in ovariectomized rats during the early postoperative period: objective evaluation using sweep imaging with fourier transform. *J Magn Reson Imaging.* 2015;42(1):128-35.

Sung B, Prasad S, Yadav VR, Gupta SC, Reuter S, Yamamoto N, et al. RANKL signaling and osteoclastogenesis negatively regulated by cardamonin. *PLoS ONE.* 2013;8(5): e64118.

Tera TM, Prado RF, De Marco AC, Santamaria MP, Jardini MAN. The RANK/ RANKL/ OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. *Braz Oral Res.* 2014;28(1):1-9.

Trouvin AP, Goëb V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *ClinInterv Aging.* 2010;5:345-54.

Wattanachanya L, Wang L, Millard SM, Lu WD, O'Carroll D, Hsiao EC, et al. Assessing the osteoblast transcriptome in a model of enhanced bone formation due to constitutive Gs-G protein signaling in osteoblasts. *Exp Cell Res.* 2015;33(2):289-302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.02.009>.

Wang C, Wang W, Xu X, Yuan X, Gou W, Wang A, et al. Bone microstructure and regional distribution of osteoblast and osteoclast activity in the osteonecrotic femoral head. *PLoS ONE.* 2014;9(5):e96361.

Wezeman FH, Emanuele MA, Moskal SF, Steiner J, Lapaglia N. Alendronate administration and skeletal response during chronic alcohol intake in the adolescent male rat. *J Bone Miner Res.* 2000;15(10):2033-41.

Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1186-94.

Wronsky TJ, Shen LM. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. 1997;20(1):55-61.

Yamamoto N, Jee WSS, Ma YF. Bone histomorphometric changes in the femoral neck of aging and ovariectomized rats. *Anat Rec.* 1995;243(2):175-85.

Zebaze RMD, Ghasem-Zadek-A, Bohte A, Iuliana-Burns S, Mirams M, Price RI, et al. Intracortical remodeling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet.* 2010;375(9727):1729-36.

Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 2006;4(2):111-21.

ANEXO A – Certificado de Comitê de Ética em Pesquisa

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

CERTIFICADO
CEUA - Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 1/2013-PA/CEP, sobre “Influência do alcoolismo crônico e da deficiência esterogênica sobre o metabolismo ósseo no fêmur de ratas”, sob a responsabilidade de **LEONARDO MARCHINI**, tendo como orientada a aluna de Pós-Graduação Miriane Carneiro Machado Salgado, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por esta CEUA.

São José dos Campos, 10 de maio de 2013.


Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador

Obs:- Para este trabalho serão utilizados 90 ratas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar com 3 meses de idade).

