



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

MIRIANE CARNEIRO MACHADO SALGADO

**EFEITO DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA ASSOCIADA AO
CONSUMO DE ÁLCOOL NO CÔNDILO MANDIBULAR DE
RATAS**



2012

MIRIANE CARNEIRO MACHADO SALGADO

**EFEITO DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA ASSOCIADA AO
CONSUMO DE ÁLCOOL NO CÔNDILO MANDIBULAR DE RATAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Marchini

São José dos Campos

2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Marchini (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Universidade Estadual Paulista

Dr. Mateus Bertolini Fernandes dos Santos

Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP - Universidade Estadual Paulista

São José dos Campos, 26 de setembro de 2012.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Jorge e Vânia**, responsáveis pelo que sou, por toda minha formação pessoal e profissional. Por serem exemplos a ser seguidos, por toda a dedicação, muitas vezes abrindo ‘mão’ de suas vontades para atender as minhas, sem medir esforços. Vocês são meu alicerce, sem vocês essa jornada seria impossível. Amo muito vocês!*

*Ao meu marido, **Fernando**, por acreditar sempre em mim e entender minhas ausências, mesmo estando tão perto. Sem você ao meu lado este caminho seria mais difícil, você faz os meus dias mais alegres! Obrigada pelo apoio e paciência. Te amo!*

*Ao meu avô **Reinaldo** (in memoriam) por ter me “influenciado” na escolha de minha profissão. Saudades!*

*Às minhas irmãs, **Milene, Melina e Mirela**, por terem sido sempre amigas, companheiras e pacientes. Vocês são especiais demais, sem vocês ao meu lado minha vida não está completa. Amo vocês!*

*À minha avó **Marjese**, por tudo o que fez, desde o meu nascimento. Assim como meus pais, você participou de tudo em minha vida! Não tenho palavras suficientes para te agradecer, você é muito mais que uma avó! Eu amo você!*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, por ter me concedido uma família unida, onde o respeito e amor sempre estão presentes! Por ter permitido que eu chegasse até aqui, mostrando sempre o caminho a ser seguido!

Aos meus tios, tias, primos e primas, cunhados, sogra, e amigos, obrigada pelo apoio que sempre recebi de vocês! Vocês são especiais demais, amo cada um!

*Ao meu orientador **Leonardo Marchini**, por ter me aceito como sua orientada. Por acreditar e confiar em mim, por ser mais que um orientador, por me ajudar sempre em todos os momentos desta dissertação.*

*À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representada pelo diretor Prof. **Carlos Augusto Pavanelli**.*

*Ao programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal na pessoa da coordenadora Profa. Adj. **Cristiane Yumi Koga-Ito**.*

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela concessão da bolsa, processo número 2011/03447-0.

*Aos docentes do programa de pós-graduação em Biopatologia Bucal, em especial a profa. Adj. **Rosilene Fernandes da Rocha** por ter me acolhido quando aqui cheguei, e por toda a ajuda dispensada a mim.*

*Aos funcionários do departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, em especial **Ana Lourdes, Maria Salete e Walter**, pelo auxílio durante o preparo das lâminas.*

Aos funcionários da secretaria da 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 amigas **Adriana Marchini**, por ter confiado em mim para execução desta dissertação em conjunto com um outro projeto, **Tábata**, por ter gentilmente cedido os anticorpos para realização da imunistoquímica e ser tão prestativa durante os experimentos, não tenho palavras para agradecê-las.*

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Tecido ósseo, remodelação óssea	14
2.2 RANKL, sialoproteína óssea, osteocalcina	17
2.3 Deficiência estrogênica	20
2.4 Osteoporose	22
2.5 Osteoporose e fraturas	24
2.6 Álcool e tecido ósseo	26
2.7 Côndilo mandibular	28
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODO	31
5 RESULTADOS	44
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	73
8 REFERÊNCIAS	74
ANEXO	83

Salgado MCM. Efeito da deficiência estrogênica associada ao consumo de álcool no côndilo mandibular de ratas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

Tanto a deficiência estrogênica quanto o consumo excessivo de álcool apresentam efeito negativo no tecido ósseo. Considerando a ausência de trabalhos que investiguem a influência da osteoporose associada ao alcoolismo na região do côndilo mandibular, o objetivo desse estudo foi testar a hipótese de que a associação da deficiência estrogênica e consumo crônico de álcool apresentaram um efeito deletério na estrutura óssea do côndilo mandibular. Cinquenta e quatro ratas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), com 3 meses de idade, foram inicialmente divididas em 2 grupos: ovariectomizadas, ou Sham operadas. Um mês após as cirurgias os dois primeiros grupos foram subdivididos e receberam por 8 semanas diferentes dietas (Sham+dieta livre; Sham+álcool 20%; Sham+isocalórico; OVZ+dieta livre; OVZ+álcool 20%; OVZ+isocalórico). Foi possível avaliar que em todos os grupos ocorreu ganho no peso médio dos animais, sendo que o OVZ dieta livre foi o que apresentou maior ganho e o Sham isocalórico o menor. Os grupos Sham e OVZ álcool, consumiram em média o equivalente a 8,43 g de álcool absoluto por kg de peso/dia. Após o término do período de tratamento os animais foram sacrificados e as mandíbulas removidas. Após realizada a descalcificação, os côndilos foram incluídos em parafina. Realizaram-se seções de 3µm e 4µm para procedimentos imunoistoquímicos e análise histológica, respectivamente. Através da análise histológica, observou-se que os animais dos grupos Sham apresentaram mais osteoclastos em relação aos animais dos grupos Ovz. O grupo Ovz isocalórico foi o que apresentou maior porcentagem de área de osso trabeculado (65,10%) enquanto o Ovz dieta livre apresentou a menor (55,42%). A imunoistoquímica realizada com os anticorpos RANKL, BSP e OCC, apresentou positividade em osteoblastos, lacunas de osteócitos e condrócitos. Os osteoclastos foram marcados apenas pelo RANKL e BSP. Nas condições deste experimento, a associação do álcool e da deficiência estrogênica não causou efeitos deletérios no côndilo mandibular de ratas..

Palavras-chaves: Tecido ósseo. Deficiência estrogênica. Osteoporose. Côndilo mandibular. Álcool.

Salgado MCM. *Effect of estrogen deficiency associated with alcohol intake in the mandibular condyle of rats [dissertation]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2012.*

ABSTRACT

*Both estrogen deficiency as excessive consumption of alcohol have a negative effect on bone. Given the absence of studies that investigate the influence of osteoporosis associated with alcoholism in the region of the mandibular condyle, the objective of this study was to test the hypothesis that the association of estrogen deficiency and chronic consumption of alcohol had a deleterious effect on bone structure of the mandibular condyle . Fifty-four rats (*Rattus norvegicus*, Albinus variation, Wistar), aged 3 months, were initially divided into 2 groups: ovariectomized and Sham operated. A month after surgery the first two groups were subdivided and received different diets for 8 weeks (Sham + ad libitum diet; Sham + 20% alcohol; + Sham isocaloric; OVZ + ad libitum diet; OVZ + 20% alcohol; OVZ + isocaloric). The evaluation that occurred in all groups in mean weight gain of the animals, the OVZ ad libitum diet showed the highest gain and the lowest was Sham isocaloric. The groups Sham alcohol and Ovz alcohol consumed an average to 8.43 g of absolute alcohol per kg/day. After the treatment period the animals were sacrificed and the jaws removed. After de decalcification, the condyles were embedded in paraffin, to perform sections with 3µm and 4µm thick, for histological analysis and immunohistochemical procedures, respectively. Over histological analysis, it was observed that animals from the Sham groups had more osteoclasts than the animals from the Ovz groups. The Ovz isocaloric group showed the highest percentage of trabecular bone area (65.10%) while the Ovz ad libitum diet had the lowest. Immunohistochemistry performed with antibodies RANKL, BSP and OCC, was positive in osteoblasts, chondrocytes and osteocytes gaps. Osteoclasts were marked only by the BSP and RANKL. In this experiment conditions, the association of alcohol and estrogen deficiency caused no deleterious effects on the mandibular condyle of rats.*

Keywords: Bone tissue. Estrogen deficiency. Osteoporosis. Mandibular condyle. Alcohol.

1 INTRODUÇÃO

Na deficiência estrogênica, ocorre aumento na formação de osteoclastos, o que leva ao aumento do número e da atividade reabsortiva dessas células, bem como diminuição da síntese de osteoblastos. Estes eventos culminam no desequilíbrio da remodelação óssea, havendo maior reabsorção em relação a neoformação óssea, o que pode determinar a ocorrência de osteoporose (Faloni, Cerri, 2007).

A osteoporose é uma desordem esquelética crônica e progressiva, relacionada ao metabolismo ósseo, de origem multifatorial que acomete as pessoas idosas, tanto homens quanto mulheres, principalmente após a menopausa (Dervis, 2005; Pereira, Mendonça, 2006).

De acordo com os dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) a longevidade da população brasileira está aumentando, e a expectativa de vida em 2010 é de 73,48 anos. A PNAD (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios) de 2006 mostrou que os idosos alcançavam aproximadamente 19 milhões de pessoas. Assim, o número de pessoas propensas a desenvolver osteoporose, e conseqüentemente sofrer fraturas pode vir a aumentar. Considerando que a ocorrência de fraturas e a baixa capacidade de reparo dessas lesões resultam em alto custo do tratamento, a osteoporose representa um problema de saúde pública (Faloni, Cerri, 2007). Portanto, é de extrema importância a implementação de ações educacionais para prevenir a alta incidência dessa doença, que é relacionada com a idade, fumo e uso abusivo de álcool (Pinheiro et al., 2010).

Os efeitos da osteoporose são maiores nos ossos longos, como o fêmur, rádio ou nos ossos da coluna (Ejiri et al., 2008). Todavia,

há evidências que a osteoporose também ocorre em estruturas orais, do crânio e da face (Dervis, 2005). Jeffcoat (2005) concluiu existir relação entre perda óssea sistêmica e perda óssea nos maxilares. Portanto, a osteoporose pode ser detectada na região de atuação do cirurgião-dentista, pela análise das radiografias panorâmicas. A avaliação das radiografias pode auxiliar na identificação precoce dos pacientes susceptíveis, ou até mesmo na obtenção do diagnóstico da osteoporose (Oliveira et al., 2009). Dessa forma, é um assunto de grande interesse para clínicos e pesquisadores também da área odontológica, o que pode ser mensurado pelo fato do número de trabalhos desenvolvidos nessa área estar aumentando a cada ano (Ejiri et al., 2008).

Defeitos estruturais nos côndilos mandibulares foram encontrados em pacientes diagnosticadas com osteoporose severa pós menopausa. Isso indica a possibilidade da osteoporose poder alterar a estrutura dos côndilos mandibulares (Min et al., 2007).

A osteoporose pode ainda ser um fator de risco a mais para indivíduos que fazem ingestão excessiva de álcool, uma vez que o álcool provoca perda progressiva de osso (Maddalozzo et al., 2009). Indivíduos que fazem uso constante de álcool apresentam maior risco de sofrer fraturas quando comparados com indivíduos que não o fazem (Chakkalakal, 2005).

Dentre os principais problemas de saúde pública no Brasil, um dos mais graves é o consumo de álcool, fator determinante de mais de 10% de toda morbidade e mortalidade do país. É o terceiro maior fator de risco para problemas de saúde, possui grande responsabilidade como causa de adoecimento e morte no mundo todo, e é um dos principais fatores limitantes do desenvolvimento social e econômico dos países (Meloni, Laranjeira, 2004).

Considerando: 1) a deficiência estrogênica e sua relação com a osteoporose; 2) a osteoporose e suas implicações para a fragilidade óssea; 3) a alta incidência de fraturas do côndilo entre as

fraturas da face; 4) o alcoolismo e suas consequências para o tecido ósseo; e 5) a ausência de trabalhos que investiguem a influência da osteoporose associada ao alcoolismo na região do côndilo mandibular, o presente projeto tem como objetivo investigar os efeitos da deficiência estrogênica e do alcoolismo crônico no côndilo mandibular de ratas. Deste modo, a hipótese a ser testada neste projeto é que a associação de deficiência estrogênica e consumo crônico de álcool apresentarão um efeito deletério na estrutura óssea do côndilo mandibular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo, remodelação óssea

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 no osso, os osteoblastos e os osteoclastos. As primeiras são responsáveis pela formação do osso e os osteoclastos fazem a reabsorção óssea (Junqueira, Carneiro 2004; Nanci, 2008).

Os osteoblastos são células formadoras de osso, derivadas de células mesenquimais localizadas na medula óssea, baço ou fígado (Pivonka et al., 2008). Sintetizam proteínas colágenas e não colágenas da matriz, capazes de concentrar fosfato e cálcio, participando da mineralização óssea. São células arredondadas e cuboides, porém quando o osso não se encontra mais em formação os osteoblastos são levemente achatados (Junqueira, Carneiro, 2004; Nanci 2008; Trouvin, Goëb; 2010).

Os osteoblastos que durante a formação óssea tornam-se envolvidos dentro da matriz passam a ser chamados de osteócitos. O número de osteoblastos que se transformam em osteócitos varia de acordo com a velocidade de formação óssea, quanto mais rápida, mais osteócitos estão presentes por unidade de volume. Os osteócitos se localizam em lacunas, são essenciais para manutenção da matriz e sua morte é seguida por reabsorção da matriz (Junqueira, Carneiro, 2004; Nanci, 2008).

As células responsáveis pela reabsorção óssea são chamadas de osteoclastos, têm origem a partir de células hematopoiéticas e se diferenciam a fim de degradar o osso (Pivonka et al., 2008, Trouvin, Goëb, 2010). São células móveis, gigantes e multinucleadas, encontrados em contato com a superfície óssea, ocupando depressões escavadas, criadas por eles mesmos. Os osteoclastos são as únicas células capazes de efetuar a reabsorção óssea (Junqueira, Carneiro, 2004; Nanci, 2008; Pivonka et al., 2008).

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica que sofre intensa e contínua remodelação, processo de aposição no qual há reabsorção do osso antigo e substituição por osso neoformado (Amadei et al., 2006; Lerner, 2006; Faloni, Cerri, 2007). A taxa de remodelação de 30% a 100% ao ano é comum em crianças que se encontram em fase de crescimento; entretanto, a renovação óssea não cessa quando a maturidade é alcançada, porém ocorre mais lentamente (Nanci, 2008).

A remodelação óssea é um processo fisiológico constante, no qual a formação óssea é correspondente à reabsorção, e ocorre devido à ação dos osteoblastos e dos osteoclastos (Silvestrini et al., 2005; Pivonka et al., 2008). Essas células trabalham juntas, formando a “unidade básica multicelular”. Conseqüentemente, havendo modificações em qualquer uma dessas células é esperado que ocorra efeitos significantes na remodelação e homeostase óssea. (Pivonka et al., 2008).

Este processo ocorre em quatro fases: ativação de osteoclastos, reabsorção óssea, reversão (com inibição de osteoclastos e ativação de osteoblastos), e finalmente a formação óssea. O início ocorre com a osteoclastogênese: precursores de osteoclastos amadurecem em células multinucleadas que são atraídas pelas citocinas, hormônios e fatores de crescimento até a superfície óssea, onde se diferenciam em osteoclastos. Em seguida, com a ativação dos osteoclastos, ocorre a fase de reabsorção, na qual o osso é removido e uma lacuna de reabsorção é

criada, esta fase tem duração média de 10 a 14 dias. Na reversão, os osteoclastos sofrem apoptose, uma vez que a reabsorção já foi realizada, para permitir a neoformação óssea. Células mononucleares da linhagem de macrófagos e monócitos preparam a superfície para novos osteoblastos iniciarem a formação óssea, produzindo uma glicoproteína na qual os osteoblastos podem se aderir. Os fatores liberados da matriz óssea reabsorvida ou os fatores produzidos por osteoclastos ou por células mononucleares estimulam a fase de formação. Então a lacuna é preenchida por osso neoformado produzido por osteoblastos que foram recrutados ao local. Os osteoblastos, tornando-se maduros, sintetizam mais osteoprotegerina e menos RANKL, levando a uma redução na interação RANK/RANKL, e ainda resultando na inibição da atividade osteoclástica, permitindo assim que os osteoblastos reabasteçam as lacunas de reabsorção. Com a formação de um novo osso, os osteoblastos podem sofrer apoptose, se diferenciar em osteócitos ou ainda em células de revestimento ósseo achatadas. A fase de formação óssea é mais longa que as fases de reabsorção e reversão juntas, tendo uma duração de 6 a 9 meses (Amadei et al., 2006; Gallagher, 2008; Nanci, 2008; Trouvin, Gröeb, 2010).

Os objetivos da remodelação são principalmente manter a massa óssea, reparar micro-fraturas, que podem causar uma fratura maior, prevenir acúmulo de osso “velho”, e manter a homeostase mineral, promovendo acesso aos locais de armazenamento de cálcio e fósforo (Lerner, 2006; Pivonka et al., 2008). A homeostase entre o cálcio e o fósforo é mantida coordenando as fases de formação e de reabsorção (Aoki et al., 2010).

Em uma pessoa saudável, a remodelação ocorre corretamente, isto é, a quantidade de osso reabsorvido está equilibrada pelo osso formado. Já em algumas doenças, como a osteoporose, e com a idade, a reabsorção é maior que a formação, resultando em uma maior perda óssea (Nanci, 2008; Trouvin, Gröeb, 2010).

O equilíbrio entre as atividades osteoblásticas e osteoclásticas está sob influência de diversos fatores sistêmicos e locais, como as citocinas, fatores de crescimento e prostaglandinas, paratormônio, calcitonina, glicocorticóides e o estrógeno. Dentre os fatores sistêmicos o estrógeno é de grande importância para a homeostase, sendo um hormônio que inibe a reabsorção óssea (Faloni, Cerri, 2007; Aoki et al., 2010).

2.2 RANKL, sialoproteína óssea, osteocalcina

O RANKL, é uma citocina que pertence à família do fator de necrose tumoral – TNF (Silvestrini et al., 2005; De Amorim et al., 2008; Gallagher, 2008; Trouvin, Goëb, 2010). A sialoproteína óssea (BSP) e a osteocalcina (OCC) são algumas das proteínas não colágenas da matriz óssea. As proteínas não-colágenas apresentam papel importante na organização da matriz colágena e na regulação da formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita (Ganss et al., 1999).

O ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β – RANKL, aumenta a atividade e prolonga o tempo de vida dos osteoclastos pela diminuição da apoptose. É produzido por osteoblastos, linfócitos T e B (Eghbali-Fatourehchi et al., 2003; Trouvin, Goëb, 2010), ativa a reabsorção óssea e está principalmente envolvido na fase final da reabsorção (Gallagher, 2008).

Encontrada na superfície de osteoblastos, interage com o receptor RANK – receptor ativador do fator nuclear kappa β – presente na superfície de células precursoras de osteoclastos (Silvestrini et al., 2005; De Amorim et al., 2008; Pivonka et al., 2008; Trouvin, Goëb, 2010). A interação RANK/RANKL induz a formação de osteoclastos, promovendo seu desenvolvimento e a fusão em osteoclastos multinucleados. Essa

interação é regulada pela osteoprotegerina (OPG) citocina que pertence à família do receptor do fator de necrose tumoral – TNF) (Pivonka et al., 2008; Trouvin, Goëb, 2010).

A osteoprotegerina é produzida por células da medula óssea e osteoblastos, se liga ao RANKL para evitar a interação com o RANK e assim inibir a formação de osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção óssea (Silvestrini et al., 2005; Pivonka et al., 2008; Trouvin, Goëb, 2010). A interação OPG/RANK/RANKL é fundamental para o processo de osteoclastogênese e é crítica para a regulação da remodelação óssea (Trouvin, Goëb, 2010). O desequilíbrio no sistema OPG/RANK/RANKL é observado na ocorrência da osteoporose, osteopetrose, artrite reumatoide e doença periodontal (De Amorim et al., 2008). Após a menopausa, a perda óssea ocorre devido ao favorecimento da atividade do RANKL sobre a osteoprotegerina. O decréscimo nos níveis de estrógeno resulta na diminuição da atividade da osteoprotegerina e ao aumento da atividade do RANKL, levando ao aumento da reabsorção e perda óssea (Gallagher, 2008).

O RANKL é mediador da formação, função e sobrevivência dos osteoclastos, está relacionado à perda óssea, sendo, portanto, o principal mediador da reabsorção óssea osteoclástica (Miheller et al., 2007; Stolina et al., 2007).

A sialoproteína óssea (BSP) é uma das mais importantes proteínas não-colágenas da matriz extracelular do osso, produzida por osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e condrócitos hipertróficos (Valverde et al., 2008). Pertence à família de proteínas denominadas SIBLING (do inglês: small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein), acredita-se que essas são de fundamental importância no desenvolvimento, na remodelação e na mineralização óssea (Malaval et al., 2008; Monfoulet et al., 2010).

Estudos “in vitro” sugeriram que a sialoproteína óssea pode iniciar a formação de cristais de hidroxiapatita na matriz óssea, ou

seja, promover a mineralização; pode ainda participar tanto na formação como na remodelação óssea (Valverde et al., 2008). A BSP é uma potente reguladora da diferenciação e da atividade de osteoblastos, sendo de fundamental importância na fase inicial da osteogênese (Malaval et al., 2008; Monfoulet et al., 2010).

A sialoproteína óssea também é reconhecida por induzir adesão celular, aumentar a síntese de osteoclastos e a reabsorção do osso. Muitas doenças metabólicas do osso caracterizadas por excessiva reabsorção como osteoporose pós menopausa, doença de Paget, artrite reumatoide podem estar associadas com níveis elevados e anormais da sialoproteína óssea no líquido sinovial (Valverde et al., 2008).

O processo de mineralização é resultado da deposição de cálcio na matriz óssea orgânica, a participação das proteínas não-colágenas da matriz óssea, como a sialoproteína óssea, a osteocalcina e a osteopontina, neste processo é de extrema importância (Luvizuto et al., 2010a).

A osteocalcina é uma pequena proteína encontrada exclusivamente em tecidos mineralizados (Lerner, 2006; Miheller et al., 2007), produzida por osteoblastos e incorporada na matriz orgânica do osso, estando associada à remodelação e perda da densidade mineral óssea (Lerner, 2006; Parker et al., 2010), e em doenças com remodelação óssea acelerada é encontrada em maior quantidade (Rapuri et al., 2000).

A osteocalcina é considerada uma marcadora da atividade osteoblástica, sendo assim da formação óssea (Rapuri et al., 2000; Lerner, 2006; Parker et al., 2010). É expressa nos estágios finais da diferenciação de osteoblastos nos processos de mineralização e maturação óssea (Ishigaki et al., 2002; Luvizuto et al., 2010a). Além disso, é indicadora da remodelação óssea, sendo sintetizada por osteoblastos e torna-se incorporada na matriz óssea por ligação com a hidroxiapatita de uma forma que depende da presença de cálcio (Luvizuto et al., 2010a).

2.3 Deficiência estrogênica

O estrógeno é um hormônio esteroide que inibe a reabsorção óssea. Produz ações fisiológicas, incluindo efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, ações no metabolismo de minerais, carboidratos, proteínas e lipídeos (Amadei et al., 2006; Faloni, Cerri, 2007).

A principal fonte de estrógeno circulante são os ovários. Importante para o crescimento e manutenção do esqueleto feminino, este hormônio sexual induz apoptose de osteoclastos e tem efeito contrário nos osteoblastos, ou seja, anti-apoptose (Manolagas et al., 2002).

Estudos mostram que a diminuição ou ausência de estrógeno leva a uma perda óssea, desenvolvendo-se o quadro de osteopenia e posterior osteoporose (Faloni, Cerri, 2007).

A diminuição de estrógeno é o fator determinante e responsável pela ocorrência da osteoporose após a menopausa, sendo a perda óssea mais intensa nos cinco primeiros anos após a menopausa (Amadei et al., 2006).

Embora os receptores de estrógenos estejam presentes em osteoblastos, a principal atuação deste hormônio é na reabsorção óssea (Amadei et al., 2006). O estrógeno inibe a reabsorção, atuando sobre a via RANK/RANKL/OPG relacionada à formação dos osteoclastos. Quando o estrógeno age sobre osteoblastos/células mesenquimais osteoprogenitoras, promove redução dos níveis de RANKL (ligante de RANK) e aumento da produção de OPG (competidor de RANK). Dessa forma, a OPG liga-se ao RANKL e impede a interação do mesmo com o RANK (presente em osteoclastos), inibindo assim a fusão dos precursores de osteoclastos (Faloni, Cerri, 2007).

Depois da menopausa, a perda óssea relacionada com a idade é devido ao desequilíbrio em favor da atividade do RANKL sobre a

osteoprotegerina (OPG). Com a diminuição do estrógeno, ocorre também diminuição de osteoprotegerina (OPG) e o aumento do RANKL, causando um aumento da reabsorção e perda óssea. Para reverter este quadro, tratamentos com estrógeno são prescritos para mulheres na menopausa, dessa forma, o equilíbrio em favor da atividade de OPG sobre o RANKL é restaurado e a perda óssea é prevenida em mulheres pós-menopausa. (Gallagher, 2008).

A perda de massa óssea ocorre em decorrência do desequilíbrio da remodelação, o qual determina maior reabsorção em relação à neoformação óssea (Manolagas, 2000; Faloni, Cerri, 2007).

Alguns estudos mostraram que osteócitos, osteoblastos e/ou as células de revestimento ósseo em apoptose são fagocitadas por osteoclastos (Cerri et al., 2003). Diante da deficiência de estrógeno, é possível observar aumento da apoptose de osteócitos. As células em apoptose apresentam modificações em sua membrana plasmática, que são entendidas como sinais para sua remoção por fagócitos. Dessa forma, a apoptose dos osteócitos pode possivelmente se constituir em um fator quimiotático para osteoclastos. Portanto, a deficiência de estrógeno que causa a morte de osteócitos, talvez possa desencadear ao aumento do recrutamento e da atividade de osteoclastos (Tomkinson et al., 1998; Moreira, Barcinski, 2004; Faloni, Cerri, 2007).

Sendo assim, diante da deficiência de estrógeno, ocorre aumento na formação de osteoclastos, no tempo de sobrevivência dos mesmos e conseqüentemente aumento do número e da atividade reabsortiva dos osteoclastos. Por outro lado, a síntese de matriz óssea pelos osteoblastos é diminuída. Esses eventos desencadeiam o desequilíbrio da remodelação óssea, com maior reabsorção em relação à formação, o que determina a ocorrência de osteoporose (Manolagas, 2000; Faloni, Cerri, 2007).

A deficiência de estrógeno acelera a remodelação óssea e diminui a massa óssea tanto nos ossos longos como nas vértebras e

ainda aumenta a área medular nos côndilos mandibulares (Tanaka et al., 1998; Nakajima et al., 2000). Dessa forma, previsíveis alterações osteoporóticas podem ocorrer nos côndilos, sendo estas mais prováveis em mulheres do que em homens (Nakajima et al., 2000).

Deco et al. (2011) avaliaram a osseointegração de implantes em fêmur de ratas que foram submetidas à deficiência estrogênica a ao consumo de álcool. Os autores utilizaram 96 ratas, os animais foram divididos primeiro em dois grupos, ovariectomizados (Ovz) e ovariectomia simulada (Sham), depois foram então divididos em seis grupos, Sham dieta livre, Sham álcool, Sham isocalórico, Ovz dieta livre, Ovz álcool, Ovz isocalórico. Em todos os animais foi realizada a colocação dos implantes em ambos os fêmures, após 30 dias da realização da ovariectomia ou ovariectomia simulada. Os resultados do estudo mostraram que os animais pertencentes aos grupos Ovz álcool e Ovz isocalórico apresentaram a pior osseointegração. Os autores concluíram que a associação da deficiência estrogênica, e o consumo de álcool, assim como a associação do consumo reduzido de nutrientes e a deficiência estrogênica prejudicaram a osseointegração dos implantes.

2.4 Osteoporose

Caracteriza-se pela perda de massa óssea, comprometimento da microarquitetura do tecido ósseo, predispondo ao aumento do risco de fratura, dor, deformidade e incapacidade física. Além da perda de massa óssea, ocorre também redução da densidade e da qualidade do tecido ósseo. Sendo assim, os ossos tornam-se menos resistentes, a quantidade de tecido ósseo é menor, o osso apresenta amplos canais de reabsorção e a superfície torna-se irregular. Desse modo, há uma fragilidade esquelética e, conseqüentemente, o aumento do risco de fraturas (Dervis, 2005; Jeffcoat, 2005; Amadei et al., 2006;

Pereira, Mendonça, 2006; Faloni, Cerri, 2007; Melhus et al., 2010; Trouvin; Goëb, 2010).

Os fatores de risco para desenvolvimento da osteoporose são inúmeros. Dentre esses a idade é um importante: entre 35 a 40 anos pode ser observado o início da perda óssea em ambos os gêneros, embora nas mulheres esse processo se acelere nos primeiros 5 anos após a menopausa. A osteoporose é mais comum em mulheres do que em homens, principalmente após a menopausa, devido à deficiência de estrógeno ser responsável pela perda óssea neste período. Já nos homens, o hipogonadismo é associado à osteoporose e fraturas. Outros fatores como a desnutrição, ausência de exercícios físicos (por diminuir a absorção de cálcio), e o consumo de álcool e tabaco (que inibem a multiplicação de células ósseas) são tidos como fatores de risco para a osteoporose (Dervis, 2005; Jeffcoat, 2005; Geurs, 2007).

A osteoporose pode ser classificada em dois tipos primária e secundária. Os homens desenvolvem apenas a primária, onde ocorre perda de osso, entretanto, as mulheres apresentam os dois tipos. A primeira fase tem início com a menopausa, predominantemente nos ossos trabeculares, causada pela deficiência de estrogênio, resultando no desproporcional aumento da reabsorção comparada com a formação óssea. Aproximadamente depois de 4 a 8 anos, a segunda fase inicia-se, exibindo uma perda persistente e mais lenta tanto de osso cortical como de trabecular, resultado de uma formação óssea diminuída (Lerner, 2006).

Nayak et al. (2009) fizeram um estudo sobre os fatores associados com o diagnóstico e tratamento da osteoporose em idosos. Os resultados mostraram que os indivíduos com fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose podiam ser sub-diagnosticado e sub-tratado. Sendo assim, tem-se uma grande oportunidade para alterar a prática clínica promovendo o diagnóstico e tratamento da osteoporose.

Estudos epidemiológicos mostraram correlações entre a osteoporose e algumas condições dos ossos da maxila e da mandíbula

tais como: aumento do número de dentes perdidos, baixa densidade mineral óssea da mandíbula, severa reabsorção do rebordo residual, diminuição da densidade mineral óssea do côndilo mandibular, doença periodontoal crônica destrutiva, dores relacionadas ao seio maxilar e fraturas. As principais alterações podem ser observadas na cortical mandibular, as quais dependem da idade e da perda óssea presente. (Faloni, Cerri, 2007; Ejiri et al., 2008; Oliveira et al., 2009). Na literatura, há relatos que a densidade óssea mandibular pode ser indicativa da densidade óssea sistêmica (Jeffcoat, 2005). Existe também uma relação entre a osteoporose causada pela menopausa e disfunções temporomandibulares (DTM), porém esta relação ainda não está totalmente elucidada (Tanaka et al., 1999).

Na disfunção temporomandibular, os ossos podem apresentar mudanças, e a reabsorção ocorre nos côndilos e nos componentes temporais da articulação, e pode variar de pouca diminuição de osso cortical para uma grave destruição (Dervis, 2005). Sintomas de DTM foram observados em mulheres com perda óssea sistêmica e mandibular (Yamada et al., 1997). Miyake et al., em 1995, observaram defeitos condilares bilaterais em pacientes com osteoporose severa.

2.5 Osteoporose e fraturas

Com o avanço da idade, os indivíduos passam a ter um maior risco para a ocorrência de fraturas decorrentes da osteoporose, principalmente fraturas no quadril, que podem desencadear morbidade, mortalidade e altos custos. No Brasil, as quedas estão em segundo lugar para as causas de morte (Nayak et al., 2009; Pinheiro et al., 2010).

Pinheiro et al. (2010) realizaram um estudo denominado “Estudo Brasileiro sobre a Osteoporose (BRAZOS)”. Nesta pesquisa foram entrevistados 2420 indivíduos (70% mulheres e 30% homens), com

40 anos ou mais de idade, de 150 municípios das cinco regiões do país. Os autores relataram uma alta frequência das quedas, principalmente entre as mulheres, indivíduos com 60 anos ou mais e que sofreram quedas anteriormente. Encontraram ainda que as quedas recorrentes foram reportadas por 15,5% dos homens e 25,6% das mulheres, e em ambos os gêneros foram mais significantes entre os indivíduos mais velhos, magros e baixos. O medo de sofrer mais uma queda também foi analisado: entre as mulheres, 59,8% relataram possuir medo, enquanto apenas 42,3% entre os homens. Entre o gênero feminino, as quedas em 63% dos casos ocorrem em casa, durante as atividades diárias. Já para o gênero masculino 65% ocorrem fora da residência.

Para os idosos a prevalência de quedas recorrentes pode variar de 10 a 40%. Os fatores de risco associados à quedas são o gênero feminino, idade avançada, baixo peso, ocorrência de fraturas e quedas, uso de psicotrópicos, fraqueza muscular, velocidade de marcha reduzida, sedentarismo, ingestão de álcool, presença de “perigos” em casa, como tapetes. Além desses fatores, a presença de algumas patologias como artrite, depressão, diabetes mellitus, osteoporose, incontinência urinária, doença de Parkinson, derrame e tontura, são fatores de risco (Pinheiro et al., 2010).

O osso da região facial que é mais comumente afetado por fraturas é a mandíbula (Sawakazi et al., 2010). Em um estudo realizado por Yamamoto et al. em 2010, foi verificado que 2/3 das fraturas da região maxilo-facial ocorrem nesse mesmo osso, sendo a região de côndilo de maior acometimento, seguida respectivamente por sínfise, corpo, região alveolar, ângulo e ramo. Acidentes de trânsito, quedas e violência são as causas mais comuns de fraturas condilares, que podem ocorrer por traumas diretos ou indiretos; ou seja, um trauma que ocorre na região da sínfise pode resultar em fraturas no côndilo, com ou sem fraturas na sínfise (Yamamoto et al., 2010).

2.6 Álcool e tecido ósseo

O consumo excessivo do álcool resulta em uma perda óssea progressiva e ao aumento do risco para o desenvolvimento da osteoporose e conseqüentemente para fraturas decorrentes da osteoporose (Rapuri et al., 2000; Chakkalakal, 2005).

Estudos em animais mostraram que o álcool inibe a formação óssea, e estudos em humanos revelaram uma histologia anormal do osso, com redução de regiões de formação e de mineralização óssea (Hansen et al., 2000). O álcool inibe a formação óssea através da diminuição no número e da proliferação de osteoblastos e na formação de osteoides (Rapuri et al., 2000). Revelaram ainda que 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).

Além disso, Rapuri et al. (2000) mostraram evidências que o efeito do álcool pode contribuir para a redução da remodelação óssea, os autores observaram em mulheres após a menopausa um aumento da densidade mineral óssea o que pode ter ocorrido principalmente pela redução da remodelação como evidenciado pela diminuição dos marcadores de reabsorção óssea. Sendo assim, concluiu-se que o consumo moderado de álcool apresenta um efeito protetor para o osso, entretanto, os resultados encontrados devem ser avaliados com atenção uma vez que o consumo abusivo de álcool provoca efeitos indesejáveis ao metabolismo ósseo.

Chakkalakal et al. (2002) observaram que a reparação óssea dos animais que ingeriram álcool apresentou-se inferior que dos animais do grupo controle, mostrando que após 13 semanas de consumo, o álcool causa deficiência no resultado da reparação óssea.

Rocha (2005) estudou o efeito do consumo crônico de álcool no fêmur de 70 ratos machos e fêmeas. Os animais foram divididos por gênero e separados em grupos: controle (receberam água e ração à vontade), álcool (receberam álcool nas concentrações de 10, 20 e 30%) e isocalórico (receberam solução de sacarose em concentração correspondente ao valor calórico da concentração alcoólica). Após 8 semanas de dieta os animais foram sacrificados e os fêmures removidos para análises. A autora observou que tanto nos machos como nas fêmeas a espessura da cortical não foi alterada, porém a porcentagem de osso trabeculado diminuiu tanto nas fêmeas que ingeriram álcool a 30% como nos machos, sendo nestes nas três concentrações alcoólicas. Quanto a densidade óptica, esta apresentou-se reduzida apenas nas concentrações de 30% tanto nas fêmeas como nos machos. A autora encontrou dificuldades de trabalhar com animais ingerindo álcool 30%, já que muitos morreram antes do final do experimento. A autora concluiu que o álcool promoveu efeito mais evidente no osso trabecular que no cortical, diminuição da massa óssea e osteopenia.

Nackaerts et al. (2009) mostraram que mulheres de meia idade que reportaram consumir álcool moderadamente, tiveram uma redução da densidade mineral óssea, e da largura cortical da mandíbula, quando comparadas com mulheres de mesma idade que nunca ingeriram álcool, ou seja, a densidade mineral óssea diminuiu com o aumento do consumo de álcool, e a largura da cortical mandibular dessas mulheres é 0,27mm mais fina que das que nunca consumiram álcool.

O estudo de Marchini et al. (2012) associou o consumo crônico de álcool à deficiência estrogênica, e revelou que existe influência na qualidade do osso alveolar e mudanças na composição de minerais. Os autores observaram uma diminuição significativa da relação cálcio e fósforo, na região da crista óssea alveolar.

2.7 Côndilo mandibular

O côndilo é uma estrutura anatômica de articulação posicionada entre o crânio e a mandíbula (Fujita et al., 2001). É uma parte distinta da mandíbula, pois a cartilagem condilar serve tanto como placa de crescimento e como uma cartilagem articular, desempenha uma função importante na mastigação (Nakajima et al., 2000).

Na mandíbula, a quantidade de osso trabecular diminui continuamente de acordo com a idade e o gênero, sendo mais evidente em mulheres que em homens. A mandíbula tem características únicas funcionais e estruturais. Durante a mastigação, pressões mecânicas dos dentes são transmitidas ao osso trabecular, e os efeitos das movimentações mandibulares ocorrem tanto no corpo como no côndilo. Assim, as forças oclusais podem afetar o crescimento condilar. A reabsorção óssea vertical após a perda de elementos dentários é o principal fator contínuo e irreversível da reabsorção do côndilo (Choi et al., 2012).

Estudos prévios realizados por Fujita et al. (1998) demonstraram que a ovariectomia e a orquiectomia influenciam a remodelação óssea do côndilo, observando uma diminuição do volume de osso trabecular e sugerindo que os hormônios sexuais, como o estrógeno, influenciam fortemente o metabolismo ósseo nesta estrutura.

Os efeitos da idade e da ovariectomia no côndilo mandibular de ratas foram estudados por Tanaka et al. (1998), utilizando 72 ratas fêmeas os autores realizaram as cirurgias de ovariectomia e a ovariectomia simulada (Sham) e após 7, 14, 30 e 60 dias, oito animais de cada grupo foram sacrificados, os côndilos foram analisados por meio de imagens radiográficas. Os resultados mostraram que o aumento da massa óssea no grupo Sham foi considerado uma mudança devido ao envelhecimento, e a redução de massa óssea no grupo ovariectomizado

devido à deficiência estrogênica. Entretanto, a área medular no grupo Sham foi diminuindo com o decorrer dos dias e para o grupo Ovz manteve-se intacta. Portanto, os autores concluíram que a deficiência de estrógeno induzida pela ovariectomia suprime o aumento de massa óssea que ocorre durante o envelhecimento no côndilo mandibular de ratas e se o mesmo efeito ocorrer em humanos, pode-se ter perda de massa óssea após a menopausa.

Nakajima et al. (2000) provocaram a deficiência de estrógenos em ratas através da ovariectomia e concluíram que esta é capaz de causar efeitos negativos no volume ósseo no côndilo mandibular.

Já em 2001, Fujita et al. estudaram se a largura do côndilo mandibular poderia sofrer alterações por distúrbios dos hormônios sexuais em camundongos ovariectomizados e orquiectomizados. Observaram que os animais ovariectomizados e orquiectomizados apresentaram uma diminuição do volume do osso trabecular sendo diferente estatisticamente dos grupos controle. Para os autores, essa diminuição do volume de osso trabecular causada pela ovariectomia e orquiectomia é devido ao aumento dos osteoclastos. Os autores concluíram que a redução dos hormônios sexuais podem sim influenciar a morfogênese do côndilo mandibular em camundongos.

Choi et al. (2012) analisaram 31 côndilos mandibulares de cadáveres humanos, com idade média de 64,9 anos, sendo de 18 homens e 13 mulheres. Os espécimes foram classificados em três tipos: grupo 1 (dentados, presença de incisivos até molares), grupo 2 (dentados de incisivos até pré molares, e ausência de molares) e grupo 3 (ausência de incisivos até pré molares, e presença de molares). Os autores observaram que a densidade do osso trabecular dos côndilos mandibulares está associada com a presença dos dentes molares, a média da relação de osso trabecular foi maior nos homens em todos os grupos, mostrando que há diferenças significativas entre os gêneros.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi verificar os efeitos da deficiência estrogênica e do alcoolismo crônico no côndilo mandibular de ratas e testar a hipótese de que a associação da deficiência estrogênica e consumo crônico de álcool possa apresentar um efeito deletério na estrutura óssea do côndilo mandibular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da FO-SJC sob o protocolo nº 012/2011-PA/CEP (Anexo A).

4.1 Animais

Para esse trabalho foram utilizadas 54 ratas (*Ratus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) com três meses de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP e mantidos em temperatura ambiente, alimentados com dieta sólida e líquida controladas, dependendo do grupo experimental.

4.1.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos conforme o quadro abaixo:

Quadro 1 – Grupos experimentais

Grupos	Dieta livre	Álcool a 20%	Isocalórico
Ovariectomia simulada (Sham)	G1 (n=9)	G2 (n=9)	G3 (n=9)
Ovariectomia (Ovz)	G4 (n=9)	G5 (n=9)	G6 (n=9)

A dieta foi administrada por 8 semanas, após as cirurgias, por já ter sido observado que após este tempo de consumo, o osso já apresenta efeitos deletérios devido ao álcool (Rocha, 2005; Deco et al., 2011). Da mesma forma, a concentração do álcool, 20%, também foi escolhida por mostrar-se eficaz em proporcionar alterações ósseas (Rocha, 2005). O uso de animais isocalóricos como forma de controle foi presente em diferentes estudos, através da simulação da deficiência nutricional provocada pelo consumo de álcool (Chakkalakal et al., 2002; Rocha, 2005; Maddalozo et al., 2009; Deco et al., 2011, Marchini et al., 2012).

G1: Sham dieta livre: os animais foram submetidos à ovariectomia simulada (os ovários foram expostos, mas não retirados); e receberam água e ração à vontade.

G2: Sham álcool: os animais foram submetidos à ovariectomia simulada (os ovários foram expostos, mas não retirados); receberam 20% da dieta líquida em álcool e ração à vontade.

G3: Sham isocalórico: os animais foram submetidos à ovariectomia simulada (os ovários foram expostos, mas não retirados); receberam a mesma quantidade de calorias ingeridas pelo grupo álcool no dia anterior.

G4: Ovz dieta livre: os animais foram submetidos à deficiência estrogênica mediante a retirada dos ovários; receberam água e ração à vontade.

G5: Ovz álcool: os animais foram submetidos à deficiência estrogênica mediante a retirada dos ovários; receberam 20% da dieta líquida em álcool e ração à vontade.

G6: Ovz isocalórico: os animais foram submetidos à deficiência estrogênica mediante a retirada dos ovários; receberam a mesma quantidade de calorias ingeridas pelo grupo álcool no dia anterior.

4.1.2 Dieta dos animais

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

Aos animais G2 e G5 ofereceu-se uma solução aquosa de álcool etílico, obtida pela mistura de álcool absoluto (ABS.ACS-99,5^o, Ecibra, Santo Amaro, São Paulo) e água potável. Inicialmente estes animais passaram por período de adaptação de nove dias (três dias a 5%, três dias a 10% e três dias a 15%). Posteriormente, foram administradas por oito semanas soluções preparadas diariamente na concentração alcoólica de 20%.

Os grupos G2 e G5, que receberam álcool, iniciaram um dia antes de G3 e G6, que eram isocalóricos. A solução isocalórica foi preparada dissolvendo-se 266 g de sacarose em 1 litro de água e os cálculos foram feitos levando-se em consideração a concentração alcoólica utilizada no presente estudo (20%), a densidade do álcool absoluto (0,787g/ml) e os valores calóricos da sacarose (4,1 kcal/g) e do

álcool (7,1 kcal/g). Além da solução isocalórica, os grupos G3 e G6, receberam água à vontade.

4.2 Procedimentos Cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em sala cuidadosamente limpa, utilizando-se álcool 70%, e com instrumentais devidamente esterilizados.

4.2.1 Anestesia

Os fármacos utilizados nos procedimentos anestésicos e suas respectivas concentrações foram: cloridrato de xilazina 2,3g/100ml (Anasedan[®] - Vetbrands, Jacareí - Brasil), substância sedativa e relaxante muscular; e cloridrato de ketamina 1,16g/10ml (Dopalen[®] – Vetbrands, Jacareí - Brasil), um anestésico geral.

Inicialmente preparou-se uma solução com 0,8 ml de cloridrato de xilazina e 0,5 ml de cloridrato de ketamina. Para promover a anestesia geral cada animal recebeu, por via intramuscular, 0,1ml/100g de peso da solução previamente preparada, de forma que um animal de 300g recebeu 0,3 ml da solução.

4.2.2 Ovariectomia e cirurgia Sham

As ratas pertencentes aos grupos G4, G5 e G6 foram ovariectomizadas aos três meses de idade. Após anestesia, depilação da região abdominal lateral e antissepsia com álcool iodado, sofreram incisão longitudinal com extensão aproximada de 1cm na pele e musculatura da região lateral do corpo, próxima ao nível dos rins e baixo da última costela. Utilizou-se lâmina de bisturi número 15. O ovário foi identificado e exposto e se realizou uma ligadura logo abaixo para realização da hemostasia, por meio de ligação da parte superior da trompa com o fio de seda nº4 (Ethic/Johnson & Johnson – São José dos Campos-SP), 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 o fio de seda nº4 (Ethic/Johnson & Johnson – São José dos Campos-SP). Por fim, realizou-se nova antissepsia com álcool iodado na região operada.

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

Após as cirurgias os animais receberam dose única de antibiótico benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000UI (Pentabiótico – FortDodge), por via intramuscular na dose de 1,35 ml/kg. Receberam também dose de 1 mg/kg de antiinflamatório (diclofenaco sódico 75 mg, Voltaren injetável – Geigy).

4.2.3 Sacrifício dos animais

Transcorridas 8 semanas do início da administração das dietas, todos os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão cardíaca com formalina a 4% (com o objetivo de obter uma melhor fixação dos cortes histológicos).

4.2.4 Delineamento experimental

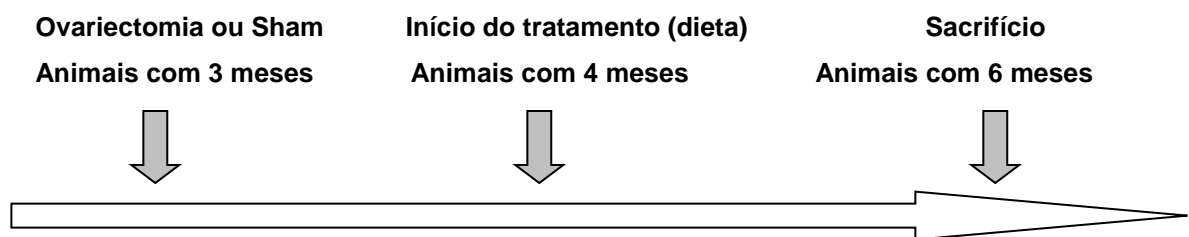
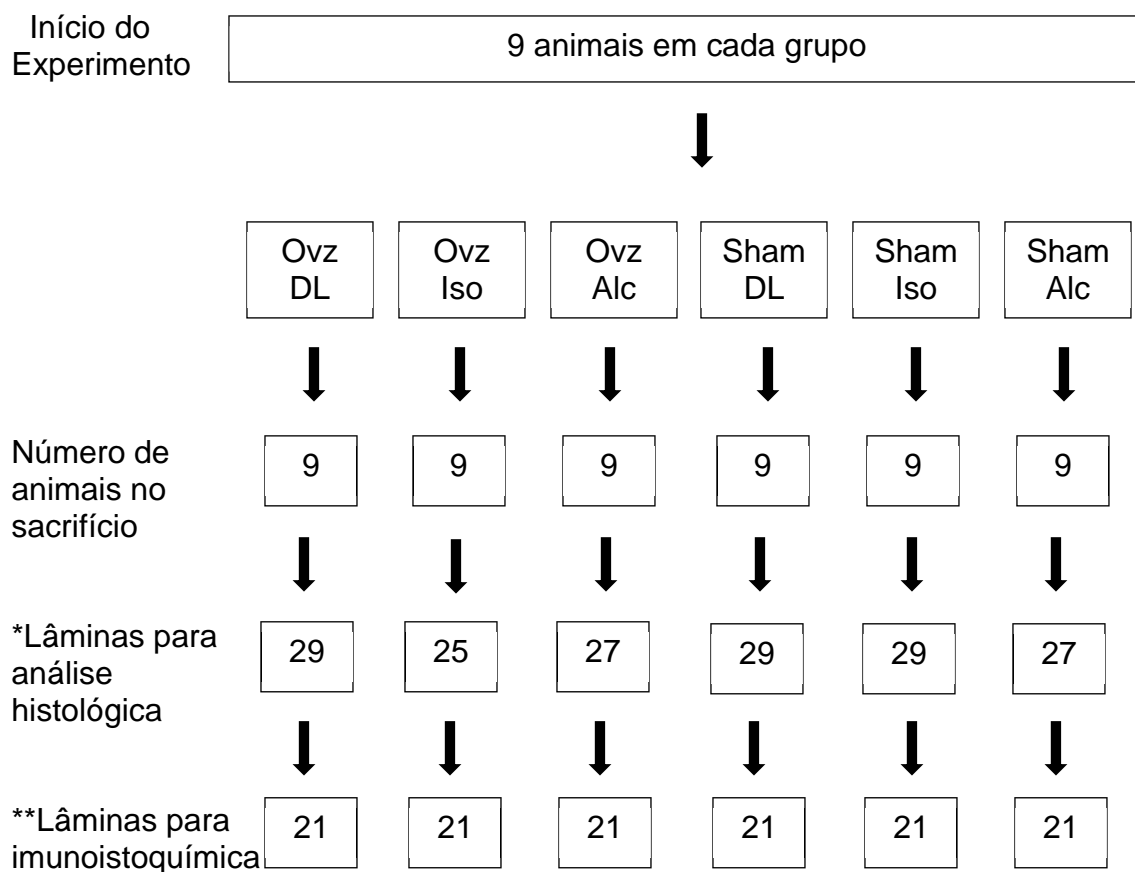


Figura 1 - Delineamento experimental

4.2.5 Fluxograma do experimento



* Mínimo de 25 e máximo de 29 lâminas (algumas vezes foi necessário realizar mais de três lâminas por cõndilo para uma melhor análise)

** Sendo 7 para cada anticorpo

Figura 2 - Fluxograma

4.3 Avaliações de alterações de peso corpóreo e condição nutricional

4.3.1 Peso corpóreo

No início do experimento e imediatamente antes do sacrifício todos os animais foram pesados em balança semi-analítica (Micronal B600) com a finalidade de verificar se o tratamento interferiu no desenvolvimento dos mesmos.

$$\text{Alterações no peso: (\%)} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

4.3.2 Condição nutricional

Diariamente foram registrados os valores médios da 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.

4.4 Análise histológica e imunoistoquímica

Após o sacrifício as mandíbulas foram limpas e colocadas em solução de formol a 10% por 48 horas. A seguir, as amostras foram descalcificadas em solução de EDTA, por aproximadamente 3 meses, para posterior inclusão em parafina. Cortes histológicos foram realizados no côndilo no plano frontal. Secções de 3 μm foram então estendidas em lâminas silanizadas para imunoistoquímica e de 4 μm em lâminas para coloração de rotina com hematoxilina e eosina. Posteriormente os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados com séries decrescentes de etanol.

Os marcadores imunoistoquímicos utilizados foram a Sialoproteína Óssea (BSP – LF – 87), Osteocalcina (OCC – FL – 110: sc-30044), e RANKL (N-19: sc-7628).

O anticorpo BSP (LF-87) foi gentilmente cedido pelo Dr Larry W. Fisher, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA.

Os anticorpos OCC (FL-110: sc-30044) e RANKL (N-19: sc-7628) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology®, CA, USA.

Os anticorpos, titulação, tempo e temperatura de incubação, e recuperação antigênica encontram-se listados no quadro a seguir.

Quadro 2 – Anticorpo, titulação, tempo e temperatura de incubação, e recuperação antigênica.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	INCUBAÇÃO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA
Sialoproteína Óssea (BSP)	1:100	1 hora, temperatura ambiente	Citrato
Osteocalcina (OCC)	1:100	4° C, overnight	Citrato
RANKL	1:75	4° C, overnight	Pepsina

As lâminas foram então preparadas para as reações imunoistoquímicas mediante a realização dos seguintes procedimentos:

- a) eliminação de pigmentos formólicos pelo tratamento com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, por 10 min em temperatura ambiente;
- b) lavagem em água corrente por 10 min e passagem em água destilada;
- c) colocação das lâminas em uma cuba de vidro contendo ácido cítrico a 10mM pH 6,0. As cubas foram levadas ao microondas (700w) por 15 minutos, divididos em 3 ciclos de 5 minutos cada (para recuperação antigênica). Para o anticorpo RANKL utilizou-se Pepsina, pH 1,8; as lâminas serão imersas na solução e levadas à estufa a 60°C por 10 minutos, e em seguida, à estufa à 37°C por 50 min;
- d) incubação com peróxido de hidrogênio a 6% e metanol 1:1, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena tecidual;
- e) lavagem em água corrente e água destilada e imersão por duas vezes em tampão Tris (pH 7,4), durante 5 minutos cada;
- f) incubação com soro albumina bovina (BSA) por 1 hora, em câmara úmida, para eliminação dos anticorpos inespecíficos;
- g) incubação dos anticorpos primários de acordo com a titulação, tempo e temperatura listados na tabela 1;

Todos os procedimentos a seguir precedem duas lavagens em Tris (pH 7,4), durante 5 minutos cada;

- a) incubação com o anticorpo secundário, (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat – DAKO CO., Califórnia, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente;
- b) lavagem;
- c) exposição ao complexo terciário estreptavidina-peroxidase (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat – DAKO), por 30 minutos à temperatura ambiente;
- d) lavagem;
- e) incubação com solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB), por 2 minutos;
- f) 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 pelo soro-albumina bovina. Controles positivos foram realizados conforme instruções do fabricante do anticorpo primário.

4.5 Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica da área de osso trabecular foi utilizado o programa *Image-J* por planimetria por contagem de pontos. Possibilitando a confecção de um retículo composto por 192 pontos, resultantes da intersecções das linhas verticais (12) e horizontais

(16), posicionado sobre cada imagem histológica para a contagem. Depois da confecção do retículo, denominado *grid* pelo programa, fez-se a contagem. Para a contagem, considerou-se apenas os pontos que recaíram sobre osso trabecular, excluindo os pontos sobre osteócitos, espaços medulares, osteoblastos, osteoclastos e células da medula óssea. Finalizada a contagem, fez-se uma tabela no Microsoft Excel, com os dados obtidos. Para o cálculo da área, os dados foram submetidos a testes estatísticos.

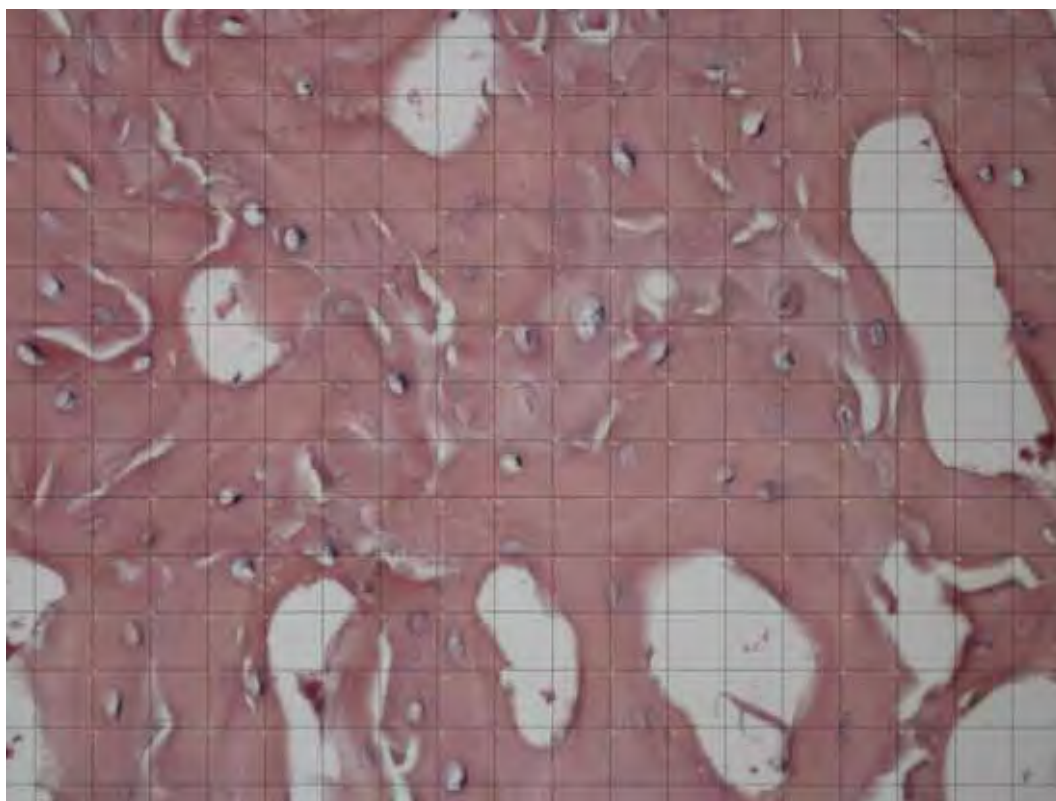


Figura 3 - Imagem microscópica de uma área do osso trabecular do côndilo mandibular, já com o retículo e realizada a contagem de pontos. Aumento original de 400x.

4.6 Análise dos dados obtidos

Os resultados foram analisados com base nos aspectos histológicos, histomorfométricos e imunoistoquímicos.

As imagens das lâminas histológicas e de imunoistoquímica 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).

Os valores obtidos da análise histomorfométrica foram submetidos a testes de variância Anova e Tukey com nível de significância de 5%. As alterações de peso, variações na ingestão de ração e de líquidos também foram submetido a análise estatística, através dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com nível de significância de 5%.

Para realização da análise imunoistoquímica, para todos os períodos e anticorpos utilizados classificou-se a intensidade da imunomarcção das lacunas de osteócitos, osteoblastos, osteoclastos e condrócitos como sendo leve (+), moderada (++) ou intensa (+++) (Adeyemo et al., 2008; Kim et al., 2009).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação nas alterações de peso corpóreo e avaliação nutricional

5.1.1 Alterações no peso dos animais

Em todos os grupos houve ganho no peso médio dos animais durante o experimento. O grupo que obteve maior ganho de peso, em percentual, foi o Ovz dieta livre (ganho médio de 40,83% \pm 8,59%), considerado estatisticamente diferente de todos os outros grupos. O grupo que menos ganhou peso foi o Sham isocalórico (ganho médio de 4,10% \pm 7,25%), também estatisticamente diferente dos demais, com exceção dos grupos Sham álcool e Ovz álcool.

Os valores das alterações de peso em percentual foram comparados, conforme descritos nas tabelas 1 e 2 (testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância de 5%).

Tabela 1 - Análise descritiva comparando as alterações de peso em percentual nos vários grupos experimentais

Peso (alterações %)	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Média	24,66	40,83	11,94	9,79	4,10	14,02
Mediana	23,73	40,00	14,00	9,62	2,13	14,58
Desvio Padrão	6,35	8,59	7,71	11,27	7,25	6,36
Q1	20,37	33,33	4,00	7,41	0,00	10,42
Q3	28,00	48,08	18,00	15,38	8,51	18,18
N	9	9	9	9	9	9
IC	4,15	5,61	5,04	7,36	4,73	4,16
p-valor	<0,001*					

Q1 - 1º quartil

Q3 - 3º quartil

N - tamanho da amostra (considerando-se o número de animais em cada grupo)

IC - intervalo de confiança

* valor considerado estatisticamente significativo

Tabela 2 - Valores de p comparando as alterações de peso em percentual

	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso
Ovz livre	0,001*				
Sham álcool	0,003*	<0,001*			
Ovz álcool	0,002*	<0,001*	0,860		
Sham iso	<0,001*	<0,001*	0,063	0,085	
Ovz iso	0,005*	<0,001*	0,453	0,480	0,012*

* diferença estatisticamente significativa

5.1.2 Variações na ingestão de ração

O grupo que mais consumiu ração foi o Ovz dieta livre (19,26 g \pm 4,05), diferente estatisticamente de todos os outros grupos, com exceção do Sham dieta livre. Pode-se notar ainda que a ingestão de ração pelos grupos isocalóricos foi semelhante à média ingerida pelos grupos álcool [(9,62 + 9,16) / 2 = 9,39], revelando que os grupos isocalóricos consumiram toda a ração que lhes foi dada.

Os dados referentes ao consumo de ração foram descritos e comparados nas tabelas 3 e 4 (testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância de 5%).

Tabela 3 - Comparação entre os grupos experimentais para ingestão de ração em gramas

Ração (g/dia/animal)	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham isso	Ovz iso
Média	19,02	19,26	9,62	9,16	9,39	9,39
Mediana	18,16	17,88	9,90	9,03	9,32	9,32
Desvio Padrão	3,16	4,05	0,83	0,82	0,64	0,64
Q1	17,00	17,28	8,87	8,47	8,82	8,82
Q3	19,17	19,97	10,28	9,72	9,86	9,86
N	56	56	56	56	56	56
IC	0,83	1,06	0,22	0,21	0,17	0,17
p-valor	<0,001*					

Q1 - 1º quartil

Q3 - 3º quartil

N - tamanho da amostra (considerando 56 dias de tratamento dietético)

IC - intervalo de confiança

* valor considerado estatisticamente significativo

Tabela 4 - Valores de p para ingestão de ração

	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso
Ovz livre	0,988				
Sham álcool	<0,001*	<0,001*			
Ovz álcool	<0,001*	<0,001*	0,008*		
Sham iso	<0,001*	<0,001*	0,083	0,070	
Ovz iso	<0,001*	<0,001*	0,083	0,070	1,000

* diferença estatisticamente significativa

5.1.3 Variações na ingestão de líquidos

Os líquidos avaliados foram solução alcoólica (20%), solução de sacarose (26,6%) e água, de acordo com os grupos álcool, isocalórico e dieta livre, respectivamente.

Os animais dos grupos isocalóricos não ingeriam todo o líquido que lhes era oferecido, mesmo sendo oferecido a estes uma solução de sacarose equivalente a solução alcoólica consumida pelos grupos álcool.

O grupo Ovz álcool ingeriu em média de 16,00 ml \pm 1,48 de solução alcoólica por dia/animal, enquanto o Ovz isocalórico ingeriu 10,23 ml \pm 2,20 de solução isocalórica (diferença estatisticamente significativa).

O grupo Sham álcool ingeriu 16,14 ml \pm 1,11, enquanto o Sham isocalórico 10,78 ml \pm 2,26 (diferença estatisticamente significativa).

Porém, quando o grupo Sham álcool foi comparado com o Ovz álcool, e o Sham isocalórico com o Ovz isocalórico não houve diferenças significativas entre eles ($p=0,155$ e $p=0,154$, respectivamente).

As tabelas 5 e 6 apresentam os dados relativos ao consumo de líquidos (testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância de 5%).

Tabela 5 - Comparação entre os grupos experimentais para ingestão de líquidos em mililitros

Líquido (ml/dia/animal)	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Média	34,44	34,55	16,14	16,00	10,78	10,23
Mediana	34,25	34,14	15,83	15,54	10,46	10,05
Desvio Padrão	2,30	3,12	1,11	1,48	2,26	2,20
Q1	32,91	32,67	15,21	15,13	8,86	8,54
Q3	35,44	36,66	16,52	16,41	11,77	11,47
N	56	56	56	56	56	56
IC	0,60	0,82	0,29	0,39	0,59	0,58
p-valor	<0,001*					

Q1 - 1º quartil

Q3 - 3º quartil

N - tamanho da amostra (considerando 56 dias de tratamento dietético)

IC - intervalo de confiança

* valor considerado estatisticamente significativo

Tabela 6 - Valores de p para ingestão de líquidos

	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso
Ovz livre	0,664				
Sham álcool	<0,001*	<0,001*			
Ovz álcool	<0,001*	<0,001*	0,155		
Sham iso	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	
Ovz iso	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,154

* diferença estatisticamente significativa

5.1.4 Cálculo da média de álcool ingerida por kg de peso/dia

A quantidade de álcool absoluto consumida por Kg de peso de animal/dia foi avaliada e encontra-se descrita no quadro 3. O cálculo da quantidade foi realizado considerando animais com peso aproximado de 300 gramas. Os resultados indicam que os animais ingeriram o equivalente a 8,43 g de álcool absoluto por kg de peso/dia.

Quadro 3 – Valores médios da ingestão de álcool por dia/animal

Ingestão de álcool	Ovz álcool	Sham álcool	Média
Média da ingestão de solução alcoólica 20% (por animal/dia em ml)	16,00ml	16,14ml	16,07 ml
Média da ingestão de álcool absoluto (por animal/dia em ml)	3,20 ml	3,23 ml	3,21 ml
*Média da ingestão de álcool absoluto (por animal/dia em gramas)	2,52 g	2,54 g	2,53 g
**Média da ingestão de álcool absoluto (por Kg de peso/dia em gramas)	8,39 g	8,47 g	8,43 g

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

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

5.1.5 Porcentagem de calorias da dieta provenientes do álcool

A porcentagem de calorias da dieta provenientes do álcool foi calculada e os resultados revelaram que em média 44,5% das calorias da dieta eram provenientes do álcool (quadro 4).

Quadro 4 - Porcentagem de calorias da dieta provenientes do álcool

Grupo	álcool (g)	álcool (kcal)	ração (g)	ração (kcal)	calorias totais da dieta (kcal)	calorias da dieta provenientes do álcool (%)
Ovz álcool	2,52	17,89	9,16	21,86	39,75	45,01
Sham álcool	2,54	18,03	9,62	22,95	40,99	44,00
Média	2,53	17,96	9,39	22,40	40,37	44,50

Os cálculos levaram em consideração que:

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

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

5.2 Análise histológica

Pode-se avaliar que os cêndilos mandibulares são constituídos por osso trabecular, recoberto por uma fina camada de osso compacto. Na superfície, o mesmo é recoberto por cartilagem hialina, abaixo da cartilagem observa-se trabéculas ósseas que na maioria das vezes são preenchidas por células da medula óssea. Dentre essas células estão presentes osteoclastos e osteoblastos (Figuras 4, 5 e 6).

Os grupos ovariectomizados e Sham, apresentaram de uma maneira geral, as características citadas acima, entretanto na maioria dos cêndilos dos animais Sham foram observados osteoclastos, o que não ocorreu nos ovariectomizados. Nos grupos Sham álcool e Sham dieta livre todos os cêndilos apresentaram osteoclastos. Apenas em três cêndilos do Sham isocalórico não foram encontrados osteoclastos, já para o grupo Ovz isocalórico em dois cêndilos foram observados, assim como quatro cêndilos do Ovz dieta livre e três do Ovz álcool apresentaram estas células.

Os osteoblastos foram células mais presentes, tanto para os grupos Ovz como para os Sham. Somente dois cêndilos dos animais ovariectomizados não apresentaram osteoblastos, sendo um do grupo isocalórico e um do álcool.

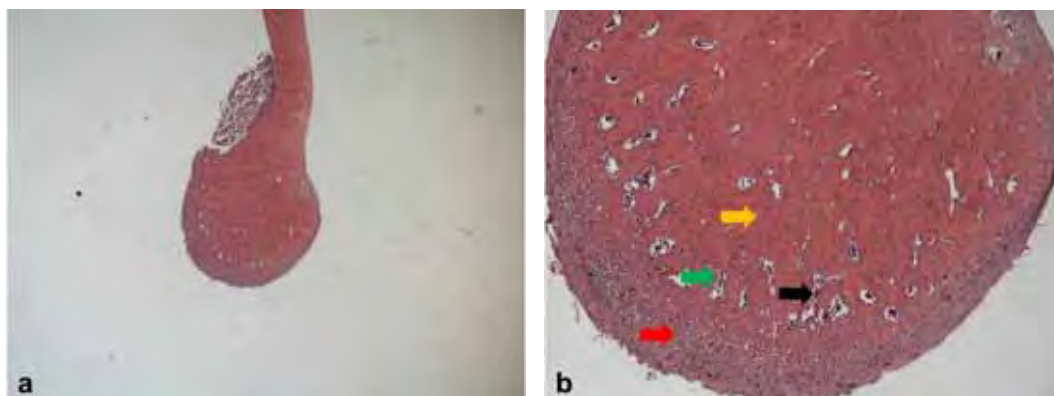


Figura 4 – HE. a) Imagem microscópica panorâmica do côndilo mandibular. Aumento original de 25x. b) Imagem microscópica panorâmica do côndilo mandibular. Observa-se a cartilagem hialina recobrindo o côndilo (➡), a presença de trabéculas ósseas (➡) e no seu interior células (➡). Circundando as trabéculas ósseas nota-se a presença de osso trabecular (➡). Aumento original de 100x.

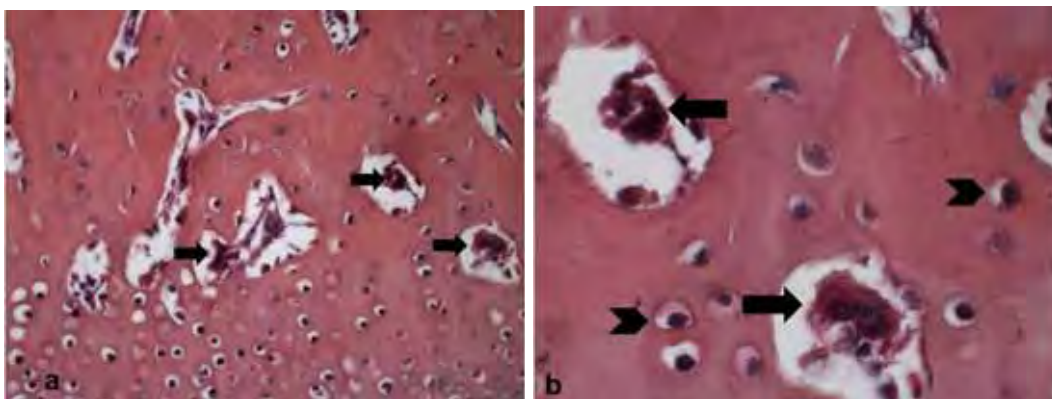


Figura 5 – HE. a) Imagem microscópica mostrando osteoclastos próximos à área de cartilagem (➡). Aumento original de 400x. b) Mesma imagem microscópica anterior mostrando osteoclastos em maior aumento (➡) e lacunas de osteócitos (➡) Aumento original de 1000x.

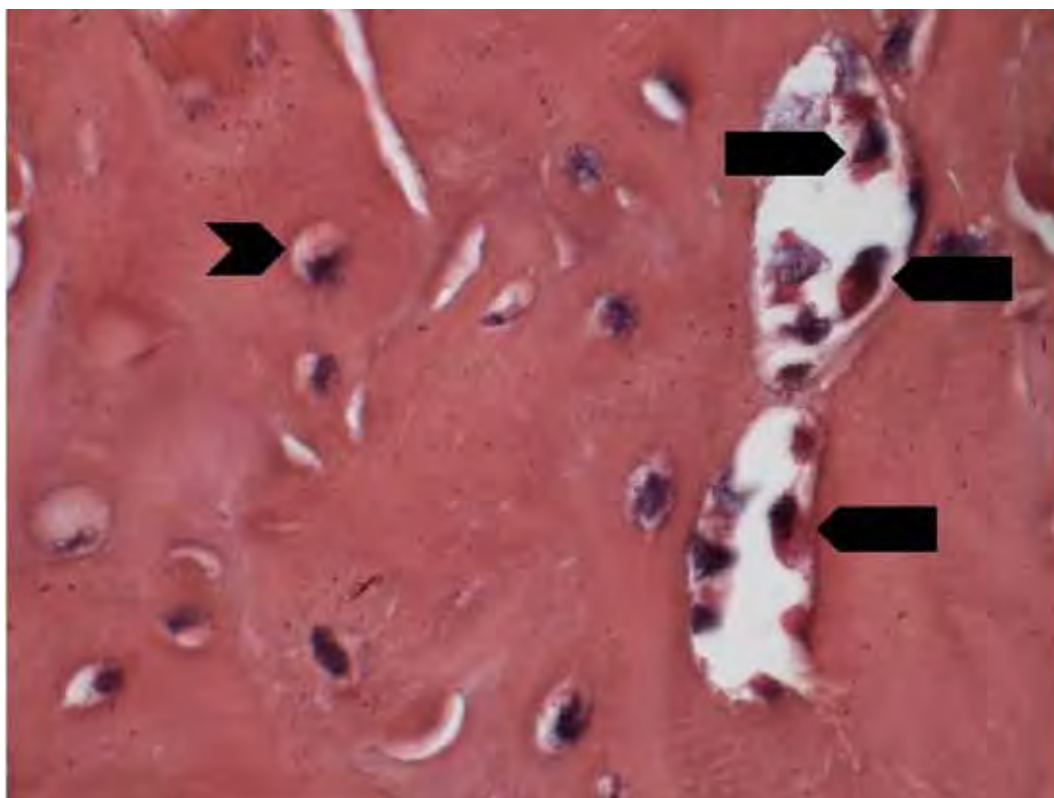


Figura 6 – HE. Imagem microscópica do côndilo mandibular onde observa-se osteoblastos (■) e lacunas de osteócitos (➤). Aumento original de 1000x.

5.3 Análise histomorfométrica

A análise da porcentagem da área de osso trabeculado nos diferentes grupos mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre estes, como pode ser observado na tabela 7 (Teste Anova).

Apenas entre os grupos Ovz isocalórico e Ovz dieta livre observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo o primeiro com maior porcentagem de área de osso trabeculado 65,10% e o segundo com a menor 55,42%. Tabela 8 (Comparação Múltipla de Tukey).

Tabela 7 – Comparação entre os grupos experimentais para % da área de osso trabeculado

Área %	OVZ Álcool	OVZ Dieta Livre	OVZ Isocalórico	SHAM Álcool	SHAM Dieta Livre	SHAM Isocalórico
Média	57,83%	55,42%	65,10%	59,72%	56,09%	63,29%
Mediana	57,81%	57,29%	66,14%	59,89%	54,68%	63,54%
Desvio Padrão	12,79%	12,81%	11,18%	12,76%	14,00%	9,53%
CV	22,1%	23,1%	17,2%	21,4%	25,0%	15,1%
Min	36,45%	30,72%	40,10%	32,29%	32,39%	37,50%
Max	80,20%	76,04%	86,45%	88,54%	86,45%	80,72%
N	27	29	25	27	29	29
IC	4,83%	4,66%	4,38%	4,81%	5,09%	3,47%
P-valor	0,019*					

* diferença estatisticamente significativa

Tabela 8 – Valores de p para % de área de osso trabeculado

	OVZ Álcool	OVZ Dieta Livre	OVZ Isocalórico	Sham Álcool	Sham Dieta Livre
OVZ Dieta Livre	0,978				
OVZ Isocalórico	0,275	0,049*			
Sham Álcool	0,993	0,779	0,613		
Sham Dieta Livre	0,995	1,000	0,083	0,879	
Sham Isocalórico	0,558	0,149	0,994	0,886	0,229

* diferença estatisticamente significativa

5.4 Análise imunoistoquímica

5.4.1 RANKL

O RANKL foi expresso por osteoblastos, osteoclastos, lacunas de osteócitos e condrócitos. Nos osteoblastos dos animais dos grupos Sham, a marcação encontrada apresentou as 3 variações de intensidade, nos grupos Ovs isocalórico e dieta livre a marcação variou de

leve a moderadamente, e no Ovz álcool houve variação entre moderada e intensa. Os grupos Sham apresentaram marcação positiva nos osteoclastos que variavam entre leve, moderada e intensa. Entretanto, nas ratas ovariectomizadas, os osteoclastos foram intensamente marcados nos 3 grupos, álcool, dieta livre e isocalórico (figura 7).

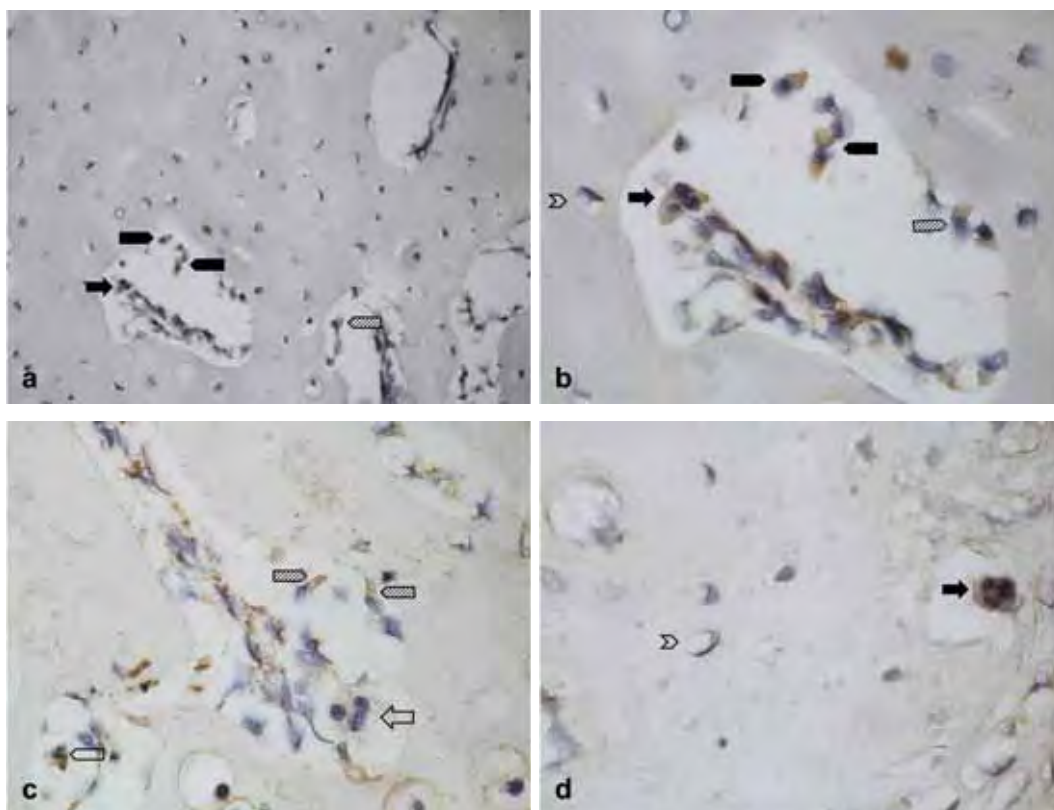


Figura 7 – RANKL. a) Marcação intensa de osteoclastos (➡) e osteoblastos (➤). Marcação moderada de osteoblastos (▨). Aumento original de 400x. b) Marcação intensa de osteoclastos (➡) e de osteoblastos (➤), osteoblastos com marcação moderada (▨), e lacunas de osteócitos com marcação leve (Σ). Aumento original de 1000x. c) Osteoclasto (➡) e osteoblasto (➤) levemente marcados, e osteoblastos com marcação moderada (▨). Aumento original de 1000x. d) Osteoclasto com marcação intensa (➡) e lacunas de osteócitos levemente marcadas (Σ). Aumento original de 1000x.

Nas lacunas de osteócitos foi observada uma variação da marcação, sendo encontradas as 3 intensidades em todos os grupos Sham e Ovz. Os condrócitos foram as células que apresentaram maior variação de expressão do RANKL para os animais ovariectomizados, no

grupo isocalórico foram encontradas as 3 variações de marcação, já no Ovz álcool observou-se marcação moderada e leve, e no Ovz dieta livre os condrócitos apresentaram apenas marcações leves. Em todos os grupos Sham foram observadas as 3 intensidade de marcação (Figuras 8 e 9).

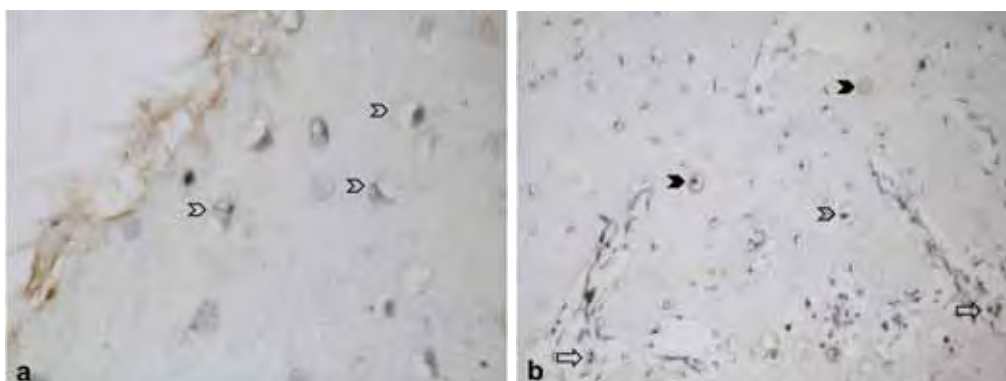


Figura 8 – RANKL. a) Lacunas de osteócitos com marcação leve (Σ). Aumento original de 1000x. b) Lacunas de osteócitos marcadas com intensidade entre forte (▶) e moderada (Σ), osteoclastos com marcação leve (⇨). Aumento original de 400x.

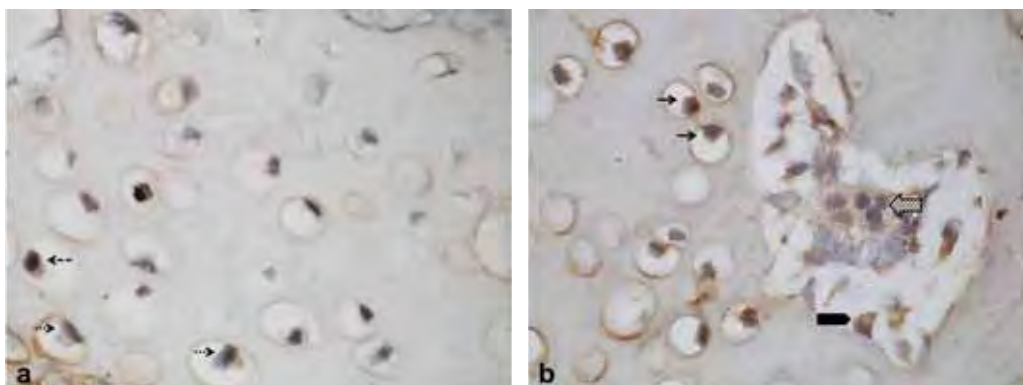


Figura 9 – RANKL. a) Marcação moderada (→) e leve (···→) de condrócitos. Aumento original de 1000x. b) Marcação intensa de condrócitos (→) e osteoblasto (■), osteoclasto moderadamente marcado (⇨). Aumento original de 1000x.

Todos os grupos experimentais apresentaram variações de intensidades das marcações entre leve, moderada e intensa. O predomínio destas variações pode ser observado na tabela 9.

Tabela 9 – Apresenta a intensidade de marcação predominante em cada tipo celular, nas lâminas avaliadas na imunohistoquímica do anticorpo RANKL

RANKL	Osteoblastos	Osteoclastos	Lacunas de osteócitos	Condrócitos
Sham álcool	++	+	+++	+
Sham isocalórico	+++	+	++	+
Sham dieta livre	+++	++	+	++
Ovz álcool	++	+++	+	++
Ovz isocalórico	++	+	+	+
Ovz dieta livre	++	+++	++	+

+ significa marcação leve

++ significa marcação moderada

+++ significa marcação intensa

5.4.2 Sialoproteína óssea (BSP)

A BSP reagiu positivamente com osteoblastos, lacunas de osteócitos e condrócitos. Em todos os grupos encontrou-se osteoblastos marcados, entretanto, essas marcações variaram desde leve a intensa nos animais dos três grupos Sham. Nos grupos Ovz dieta livre e isocalórico observou-se osteoblastos marcados com intensidade leve e forte; e no Ovz álcool a variação ocorreu entre leve e moderada (figura 10).

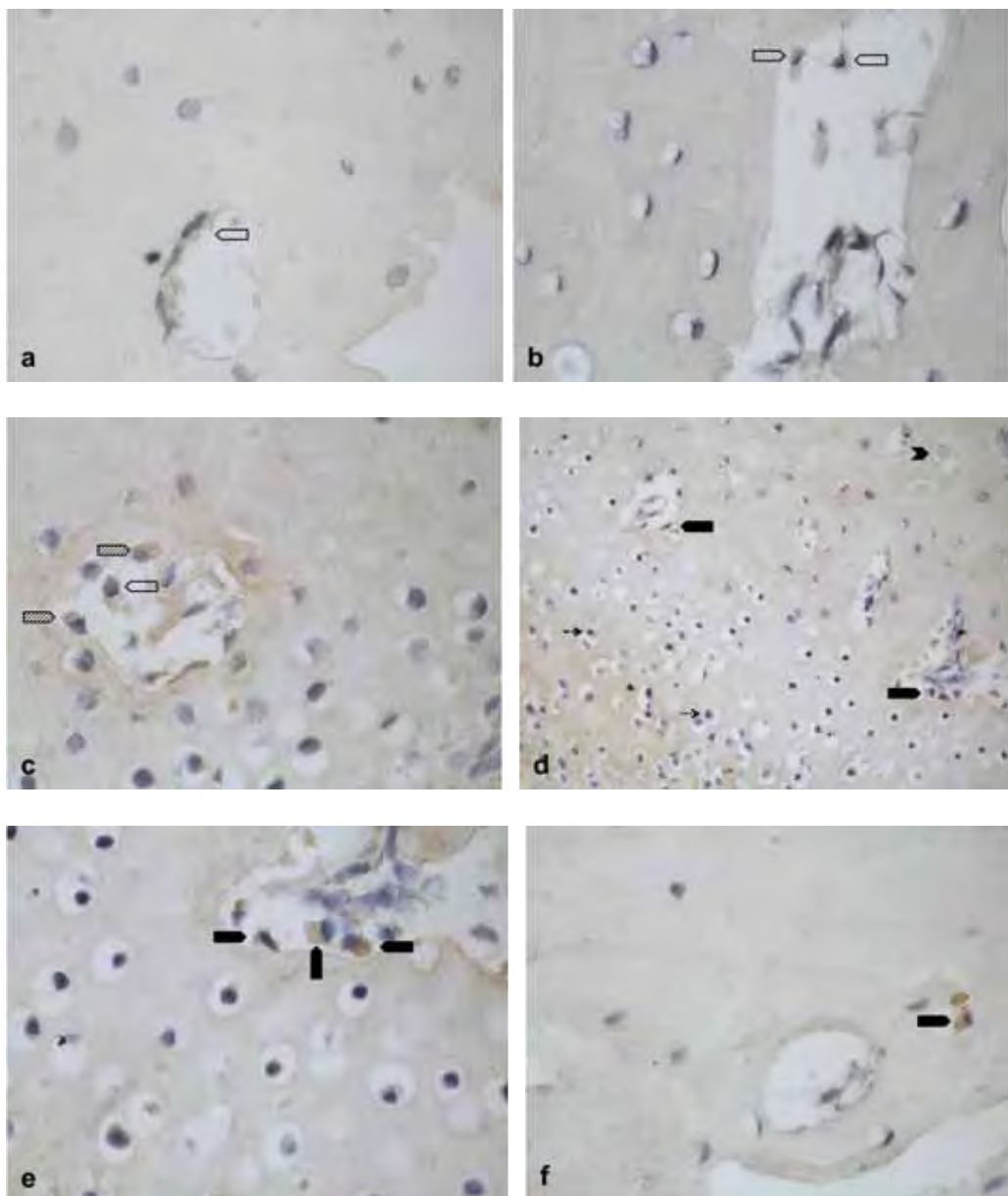










Figura 10 – Sialoproteína óssea. a) e b) Osteoblastos marcados com intensidade leve (). Aumento original de 1000x. c) Osteoblastos com marcação fraca () e moderada (). Aumento original de 100x. d) Osteoblastos e lacunas de osteócitos intensamente marcados (, ), condrócitos com marcação variando entre fraca () e moderada (). Aumento original de 400x. e) e f) Marcação intensa de osteoblastos (). Aumento original de 1000x.

A marcação de osteoclastos ocorreu somente nos animais Sham operados. O grupo Sham álcool apresentou as 3 intensidades de marcação, no Sham dieta livre os osteoclastos foram marcados leve e

moderamente, e ainda no Sham isocalórico apenas osteoclastos com marcação moderadas foram vistos (figura 11).

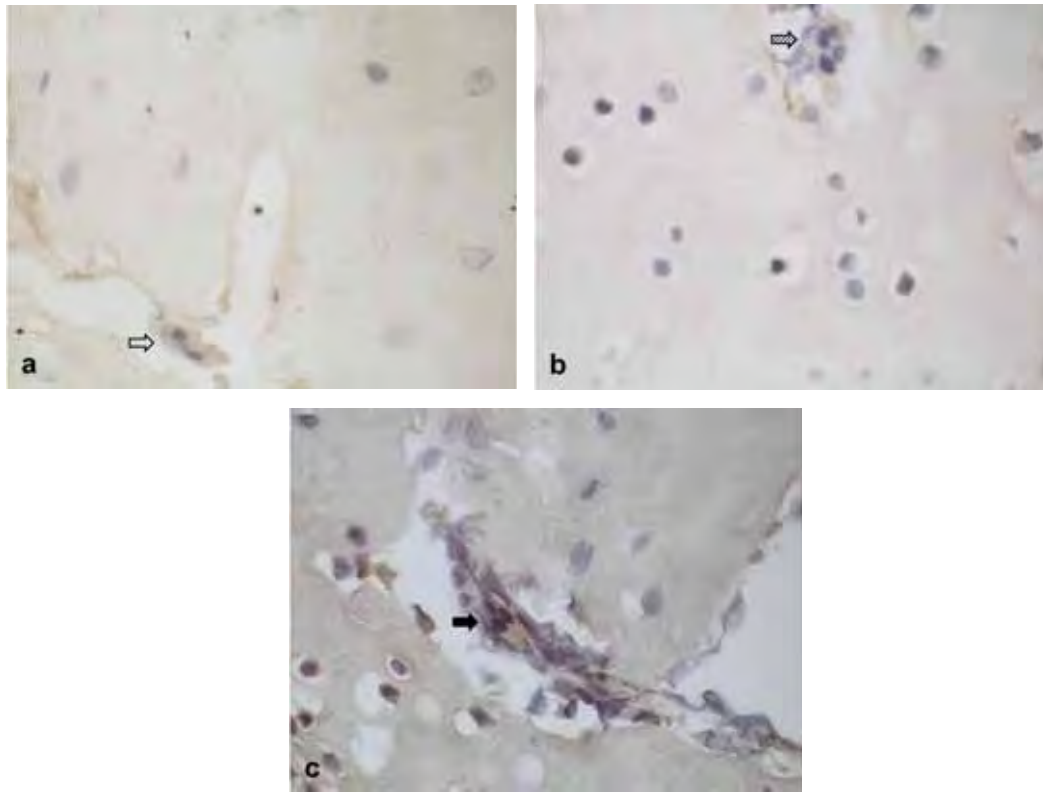


Figura 11 – Sialoproteína óssea. Osteoclastos. a) Marcação leve (⇨). b) Moderadamente marcado (⇨). c) Marcação intensa (⇨) Aumento original de 1000x.

As lacunas de osteócitos apresentaram marcações variando entre em leve e moderada em todos os grupos experimentais (figura 12).

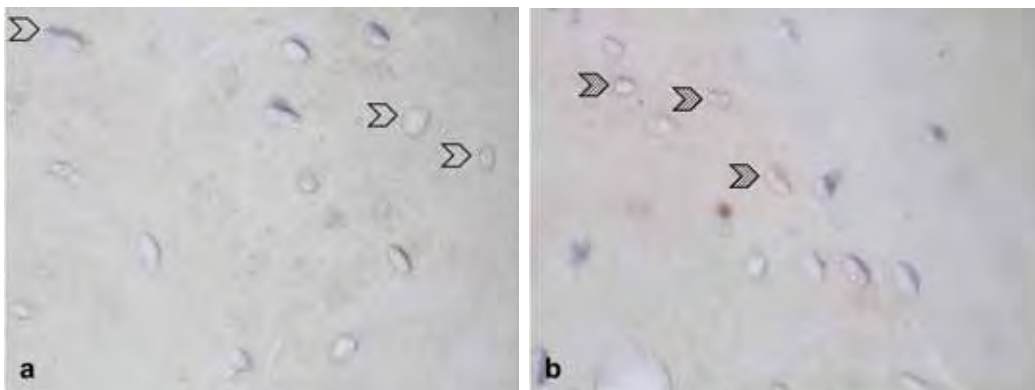


Figura 12 - Sialoproteína óssea. Marcação de lacunas de osteócitos. a) Marcação leve (Σ). b) Marcação moderada (Σ). Aumento original de 1000x.

Os condrócitos também apresentaram uma variação da intensidade de marcação, sendo que os grupos Sham dieta livre e Sham álcool apresentaram as 3 intensidades, os grupos Sham isocalórico e Ovx dieta livre apresentaram marcações variando entre moderada e leve, o grupo Ovx álcool apenas a intensidade leve e o Ovx isocalórico não apresentou marcação (figura 13).

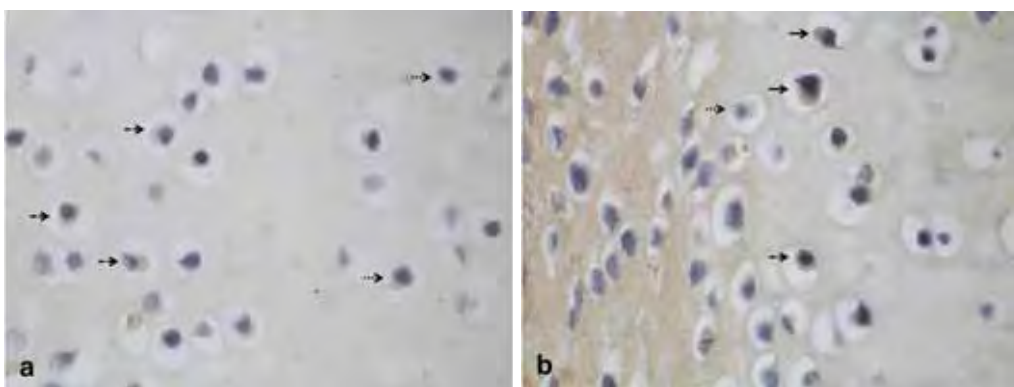


Figura 13 - Sialoproteína óssea. Condrócitos. a) Marcação leve (•••→) e moderada (→) b) Marcação intensa (→), moderada (→) e leve (•••→). Aumento original de 1000x.

As marcações da BSP apresentaram variações de intensidades, o predomínio destas de acordo com o grupo e com o tipo celular pode ser observado na tabela 10.

Tabela 10 – Apresenta a intensidade de marcação predominante em cada tipo celular, nas lâminas avaliadas na imunohistoquímica do anticorpo sialoproteína óssea (BSP)

BSP	Osteoblastos	Osteoclastos	Lacunas de osteócitos	Condrócitos
Sham álcool	++	+	+	++
Sham isocalórico	++	++	+	+
Sham dieta livre	+	+	+	+++
Ovz álcool	++	-	+	+
Ovz isocalórico	+++	-	+	-
Ovz dieta livre	+++	-	+	++

+ significa marcação leve
 ++ significa marcação moderada
 +++ significa marcação intensa
 - significa ausência de marcação

5.4.3 Osteocalcina (OCC)

A osteocalcina foi expressa por osteoblastos, lacunas de osteócitos e condrocitos. As três variações de intensidade de marcação foram vistas nos osteoblastos dos grupos Sham álcool, Ovz dieta livre e Ovz isocalórico. Nos grupos Sham dieta livre e Sham isocalórico apenas foram vistos osteoblastos marcados leve e moderadamente, e o grupo Ovz álcool apresentou marcação leve (figura 14).

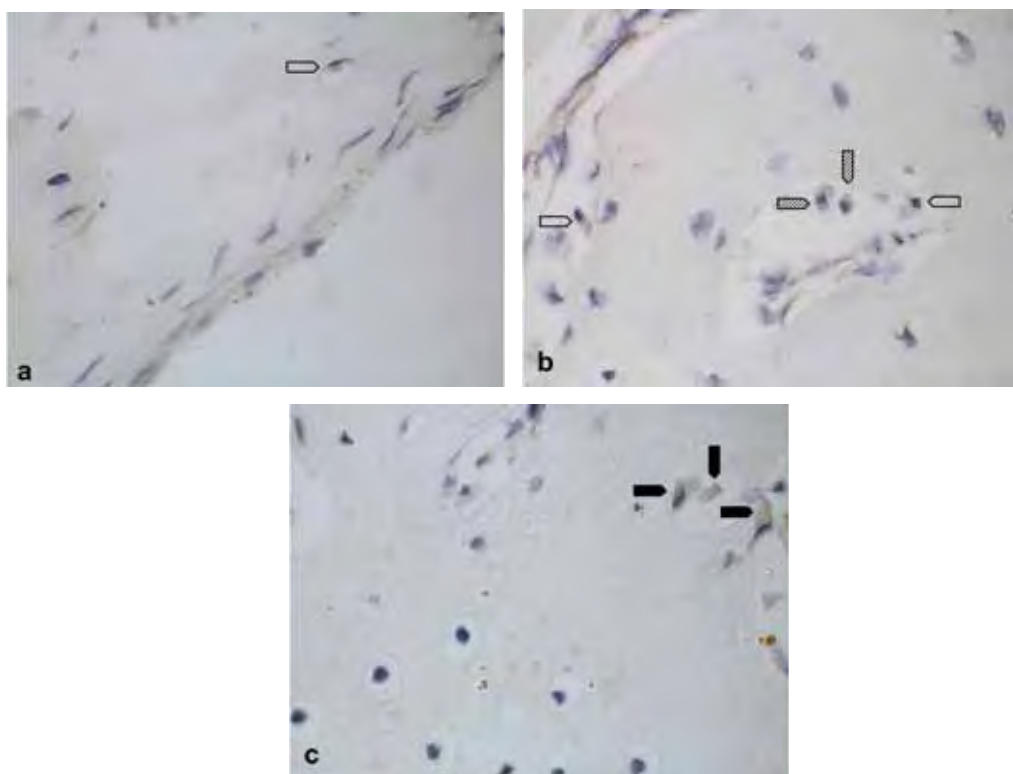






Figura 14 – Osteocalcina. Osteoblastos. a) Marcação leve (). b) Marcação leve () e moderada (). c) Marcação intensa (). Aumento original de 1000x.

As lacunas de osteócitos também apresentaram variação das 3 intensidades nos animais Sham álcool, O vz dieta livre e O vz isocalórico. Nos animais Sham dieta livre a marcação variou entre leve e moderada, assim como no O vz álcool. O grupo Sham isocalórico foi o único que apresentou marcação leve das lacunas de osteócitos (figura 15).

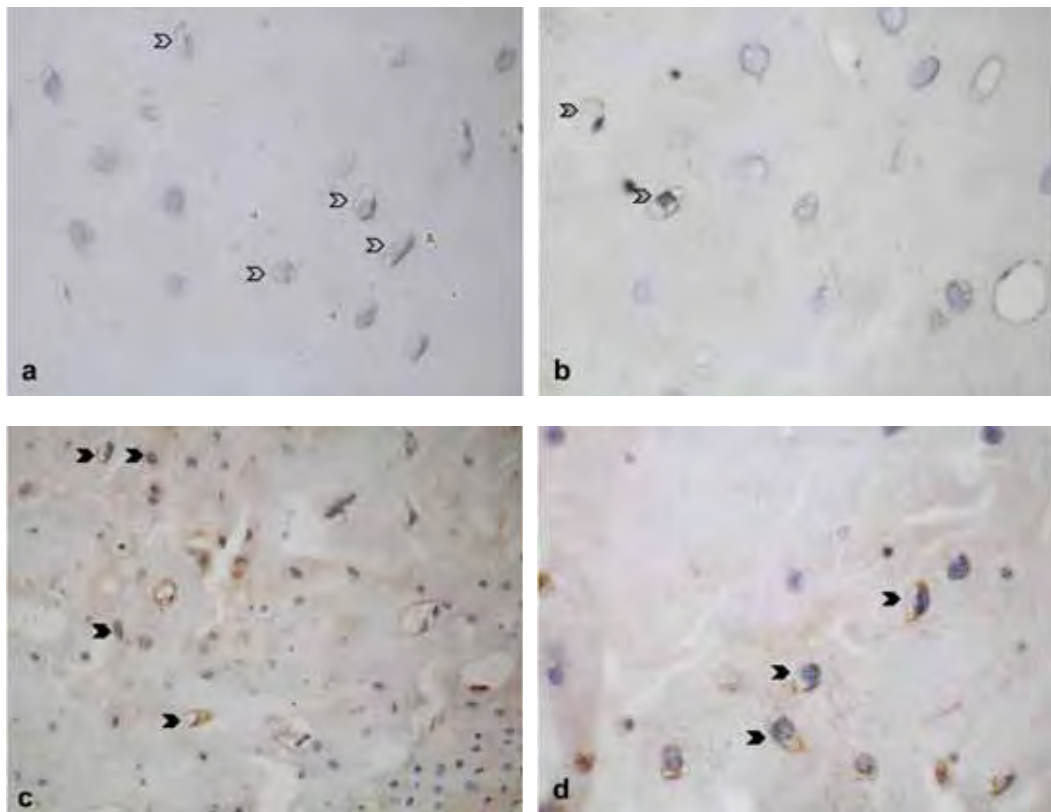


Figura 15 – Osteocalcina. Lacunas de osteócitos. a) Marcação leve (Σ). b) Marcação moderada (ΣΣ). Aumento original de 1000x. c) Marcação intensa (ΣΣΣ). Aumento original de 400x. d) Marcação intensa (ΣΣΣ). Aumento original de 1000x.

Em todos os grupos encontrou-se marcação de condrócitos. Os grupos Sham álcool e Sham dieta livre apresentaram as três variações de marcações. No grupo Ovz álcool houve marcação entre leve e moderada, e no Ovz dieta livre, Ovz e Sham isocalórico somente marcação leve (figura 16).

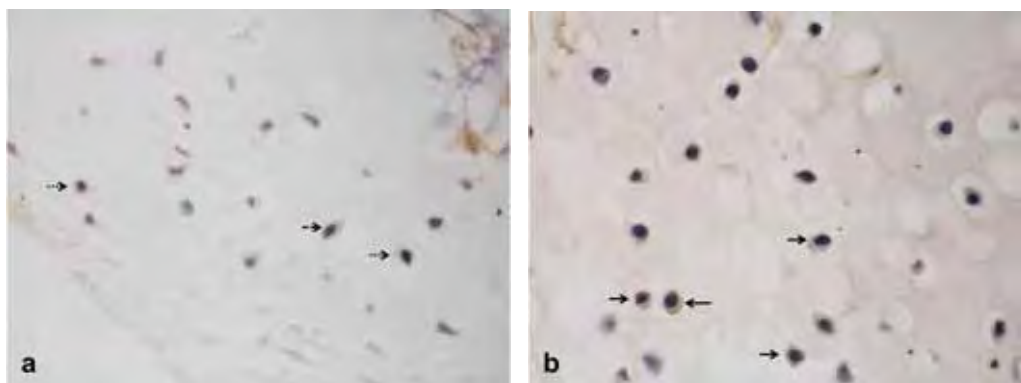


Figura 16 – Osteocalcina. Condrócitos. a) Marcação leve ($\cdots\rightarrow$) e moderada ($- \rightarrow$). b) Marcação intensa (\rightarrow). Aumento original de 1000x.

As marcações da OCC apresentaram variações de intensidades, o predomínio destas de acordo com o grupo e com o tipo celular pode ser observado na tabela 11.

Tabela 11 – Apresenta a intensidade de marcação predominante em cada tipo celular, nas lâminas avaliadas na imunohistoquímica do anticorpo osteocalcina (OCC)

OCC	Osteoblastos	Osteoclastos	Lacunas de osteócitos	Condrócitos
Sham álcool	+	-	+	+
Sham isocalórico	+	-	+	+
Sham dieta livre	+	-	+	+
Ovz álcool	+	-	+	+
Ovz isocalórico	+	-	+	+
Ovz dieta livre	++	-	+	+

+ significa marcação leve
 ++ significa marcação moderada
 +++ significa marcação intensa
 - significa ausência de marcação

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, ratas foram escolhidas como modelo animal, com o objetivo de superar as dificuldades dos estudos em humanos (pequeno número de pacientes dispostos a colaborar, idade variável, duração do consumo, padrão de abuso do álcool, interferência dos fatores de risco e ainda o controle nutricional), de acordo com Lieber (2000) e Turner (2000).

A metodologia referente ao tratamento dos animais foi baseada em estudos anteriores feitos na mesma instituição e departamento (Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal (Rocha, 2005; Deco et al., 2011; Marchini et al., 2012).

A ovariectomia realizada em ratas é reconhecida como adequado modelo de estudo da osteoporose pós-menopausa. A deficiência de estrógeno decorrente da ovariectomia resulta na perda de osso em vários locais do esqueleto, tendo esta perda efeito mais evidente nos ossos trabeculares (Jiang et al., 2003; Melhus et al., 2010). É considerada um bom modelo para a investigação da perda óssea em ossos trabeculares decorrentes da deficiência de estrógeno, uma vez que a perda de osso cortical é mínima (Luvizuto et al., 2010b).

A associação da ovariectomia e do álcool foi estudada, por existir relatos na literatura, de que somente a ovariectomia não promove efeitos no osso mandibular, requerendo dessa forma, uma associação com outros fatores que induzem uma significativa perda óssea mandibular (von Wowern, 2001; Jiang et al., 2003).

O côndilo mandibular foi a estrutura óssea escolhida para avaliação por sua importância para o funcionamento do sistema

mastigatório, por ser estrutura afetada frequentemente por fraturas (Yamamoto et al., 2010) e por existirem relatos de que a ovariectomia induz a perda óssea no corpo e no côndilo mandibular (Fujita et al., 1998; Tanaka et al., 1998; Nakajima et al., 2000; Tanaka et al., 2000; Fujita et al., 2001; Ulku et al, 2012).

O peso dos animais no decorrer do experimento foi um dos parâmetros avaliados, e em todos os grupos houve um ganho de peso médio dos animais, o que também foi relatado por Chakkalakal et al. (2002) e Deco et al. (2011). No presente trabalho o grupo Ovz dieta livre foi o que mais obteve ganho de peso, estatisticamente diferente de todos os outros grupos, assim como ocorreu no estudo de Marchini et al. (2012), e discordando do estudo realizado por Deco et al. (2011) que não encontraram diferenças estatisticamente significativas.

Quanto à ingestão de ração, o grupo Ovz dieta livre também foi o que mais consumiu, concordando mais uma vez com os achado de Marchini et al. (2012). A ovariectomia pode aumentar a ingestão de comida e o ganho de peso (Guyard et al., 1991). Kimura et al. (2002) observaram que os animais ovariectomizados apresentaram um aumento do peso corpóreo em relação aos Sham operados. Os grupos que consumiram álcool ingeriram uma quantidade bem menor de ração que os grupos que recebiam a dieta livre, o que já era esperado, pelo álcool ser uma substância com baixo valor nutricional e elevado teor energético, causando aos animais uma sensação de saciedade. Da mesma forma, Deco et al. (2011) observaram que os animais que consumiram álcool tiveram menor ingestão de ração quando comparados aos animais do grupo controle. Portanto, as alterações de peso dos animais dos grupos Sham e Ovz álcool mostraram que o álcool afeta o peso dos animais, assim como foi verificado por Maddalozzo et al. (2009), o qual relatou que os animais que receberam álcool ganharam 25% menos peso que os animais do grupo controle.

Os animais ingeriram uma média de 8,43 g de álcool por kg de peso/dia. Este resultado sugere que os animais foram submetidos ao consumo crônico e excessivo de álcool, considerado um dado importante, pois 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). Broulik et al. (2010) observaram que seus animais consumiram 7,6 g de etanol a 95%/kg de peso/dia, assim como Marchini et al. (2012) que relataram que 8,76 g de álcool foram consumidos pelos seus animais por kg de peso/dia, valores próximos ao encontrado em nosso estudo. Ainda de acordo com Broulik et al. (2010), o consumo de álcool pelos animais seria equivalente ao consumo diário de 2,5 litros de cerveja ou 1 litro de vinho para um homem adulto.

Como previamente relatado na literatura, o indivíduo etilista não se alimenta adequadamente, devido ao fornecimento para o organismo de calorias oriundas do álcool. Neste estudo, em média 44,5% das calorias totais da dieta foram derivadas do álcool, com essa média considera-se que houve um elevado consumo de álcool. Entretanto, essas calorias provenientes do álcool são vazias, ou seja, não estão relacionadas a proteínas, vitaminas ou sais minerais, levando à deficiências nutricionais pela baixa ingestão de nutrientes (Lieber, 2000; Rocha, 2005).

Optou-se por utilizar grupos isocalóricos com a finalidade de tentar estabelecer um relativo parâmetro nutricional com os grupos álcool (Rocha, 2005; Maddalozzo et al., 2009; Marchini et al., 2012). Sendo assim, os grupos isocalóricos foram usados como controle nutricional simulando a deficiência associada à dieta alcoólica. Contudo, uma das limitações deste estudo foi não ter conseguido que os animais dos grupos isocalóricos consumissem exatamente a mesma quantidade de calorias dos grupos álcool, quando considerada a ingestão de líquidos. Portanto, os grupos isocalóricos ingeriram menor volume de sacarose se

comparado aos grupos álcool, ocasionando aos grupos isocalóricos uma dieta ainda mais restrita em calorias se comparado aos grupos álcool. Para que esta limitação não volte a acontecer, devem ser realizadas mudanças na inclinação dos recipientes (exemplo: colocando algum objeto embaixo dos recipientes para que esses fiquem mais inclinados, facilitando a ingestão de todo o líquido, pois neste experimento ocorreu de restar sempre uma pequena quantidade da solução no recipiente) com solução isocalórica ou ainda alterações na forma de administração desta solução, em estudos futuros. Em relação à dieta sólida, o objetivo do estudo foi alcançado, os animais dos grupos isocalóricos consumiram toda a quantidade de ração que lhes era fornecida (média de 9,39 g/dia/por animal).

Os resultados histológicos encontrados mostraram que os grupos ovariectomizados apresentaram um número menor de osteoclastos em relação aos grupos Sham. Entretanto, não se sabe se este resultado é estatisticamente significativo, pois a análise realizada foi qualitativa e não quantitativa. Este achado não era o esperado, pois é sabido que a deficiência estrogênica causa aumento na formação de osteoclastos, e aumento na sobrevivência dos mesmos, ocasionando assim um aumento no número de osteoclastos (Faloni, Cerri, 2007). Ainda, a deficiência de estrogênio está associada com o aumento da reabsorção em relação à formação óssea, causando uma excessiva perda de osso, deste modo, o aumento da reabsorção é devido ao aumento da osteoclastogênese e a diminuição da apoptose de osteoclastos (Manolagas, 2000; Eghbali-Fatourehchi et al., 2003;). Na osteoporose pós-menopausa, o número de osteoclastos assim como o número de osteoblastos estão aumentados (Lerner, 2006). O metabolismo ósseo no côndilo mandibular é fortemente influenciado por hormônios sexuais, principalmente o estrogênio, sugerindo que a ausência do mesmo influencia a remodelação óssea no côndilo, podendo levar a alterações degenerativas na articulação temporo-mandibular (Fujita et al., 2001; Ulku

et al.2012). Na literatura existe relato de que a diminuição do volume ósseo trabecular causado pela ovariectomia aumenta o número de osteoclastos (Fujita et al., 2001).

Contudo, Tanaka et al. (1999) observaram diminuição tanto de osteoclastos e osteoblastos em ambos os grupos Ovz e Sham, após 60 dias de realizadas as cirurgias, tornando-se esses escassos, mostrando que os côndilos dos animais ovariectomizados apresentam sim um número reduzido de osteoclastos, assim como no presente estudo. No entanto, não é possível afirmar que houve redução dos osteoclastos dos côndilos do grupo Sham, pois a análise de toda a amostra ocorreu depois de 60 dias da cirurgia, diferindo da realizada por Tanaka et al. (1999) que analisou em diversos tempos.

Diferindo dos nossos resultados, Tanaka et al. (2000) encontraram que o número de osteoclastos nos animais ovariectomizados foi mais elevado do que nos animais Sham. Os mesmos autores relataram que na região anterior do côndilo depois de transcorridos 14 e 30 dias das cirurgias, e na região posterior do côndilo após 7 dias, o número de osteoclastos foi significativamente maior nos grupos ovariectomizados. Observaram ainda, que o volume ósseo na região anterior do grupo Sham aumentou com a idade enquanto que no grupo Ovz não houve alteração. Na região posterior, no grupo Sham não ocorreu mudança de volume ósseo e no grupo Ovz houve perda de volume.

Alterações na qualidade do osso quando ocorreu associação da deficiência de estrógeno e do consumo de álcool foram previamente relatadas por Deco et al. (2011) e Marchini et al. (2012). Os primeiros autores encontraram efeitos negativos na ósseo-integração de implantes realizados em fêmures de ratas, já Marchini et al. (2012) notaram uma diminuição na proporção de cálcio e fósforo na região da crista alveolar em ratas ovariectomizados que ingeriram álcool.

Entretanto, os resultados histomorfométricos revelaram que a associação da ovariectomia e do álcool não alteraram a quantidade

de osso trabeculado no côndilo mandibular, pois o grupo Ovz álcool não foi diferente dos demais grupos. Somente os grupos Ovz dieta livre e Ovz isocalórico apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Este resultado aponta que a dieta parece ter influência na quantidade de osso trabecular em ratas ovariectomizadas, uma vez que as ratas do grupo Ovz dieta livre foram as que mais consumiram ração. No entanto, em ratas Sham operadas não houve diferença entre os grupos de dieta livre e isocalórico. Contudo, estudos futuros são necessários para uma melhor avaliação da dieta para as ratas ovariectomizadas.

O RANKL e a BSP foram expressos por osteoblastos, osteoclastos, lacunas de osteócitos e condrócitos. A OCC apresentou marcação em todas essas células, com exceção dos osteoclastos. Entretanto, a marcação dos condrócitos não era objetivo do estudo, mas os achados imunoistoquímicos dos três anticorpos utilizados revelaram uma reação positiva.

A marcação de osteoblastos, osteoclastos, lacunas de osteócitos e condrócitos pelo RANKL foi também relatada por Silvestrini et al. (2005). Os autores encontraram em tíbia e fêmur de ratos que os osteoblastos apresentaram variações na intensidade de marcação, entretanto, as três variações foram vistas. Nas lacunas de osteócitos e nos osteoclastos os autores apenas citaram que houve marcação, mas não evidenciaram a sua intensidade. Em condrócitos hipertróficos e maduros a expressão do RANKL foi intensa.

Carda et al. (2005) fizeram um estudo do desenvolvimento da articulação temporomandibular em humanos. Através da imunoistoquímica, os autores relataram marcação intensa e moderada do RANKL em osteoblastos, os osteoclastos e os condrócitos apresentaram variações nas intensidades de marcação.

Os osteoblastos reagiram positivamente com o RANKL no estudo realizado por Luvizuto et al. (2010b), no reparo ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas. A expressão deste marcador foi mais intensa

após 7 dias da cirurgia, devido à intensa taxa de remodelação. Aos 42 dias, último período avaliado, a marcação mostrou-se diminuída devido a diminuição da taxa de remodelação óssea, principalmente nos grupos Sham e no grupo Ovz tratado com raloxifeno.

A imunorreatividade do RANKL em condrócitos foi observada por De Amorim et al. (2008) que avaliaram a expressão deste marcador no reparo de fraturas ósseas de tíbias de ratas diabéticas. Além dessa célula, os autores relataram a expressão em fibroblastos, células endoteliais, células na periferia do osso, osteócitos e células da medula óssea.

Em 1995, Pinero et al. utilizando o mesmo anticorpo deste estudo, anti-BSP LF-87, em mandíbulas de ratos recém-nascidos, relataram expressão intensa em osteoblastos e leve em osteoclastos, porém nenhuma marcação foi vista em lacunas de osteócitos, apresentando algumas diferenças do nosso estudo, em que houve variação de marcação para os osteoblastos, osteoclastos e lacunas de osteócitos.

A sialoproteína óssea reagiu positivamente, algumas vezes com os condrócitos da camada mais profunda da cartilagem do côndilo, próximos da área de interface osso e cartilagem. Este resultado está em concordância com o estudo de Sun et al. (2010) que analisaram através da imunistoquímica o côndilo mandibular de ratas de 2, 5 e 8 semanas de vida. Os autores detectaram a BSP na cartilagem do côndilo mandibular duas semanas após o nascimento, na matriz extracelular devido o rápido crescimento das camadas articular e de pré condroblásticos, entretanto, depois de 5 a 8 semanas do nascimento a expressão desta proteína foi percebida nas camadas mais profundas da cartilagem. Especificamente, na quinta semana a expressão da BSP foi muito forte na matriz extracelular e dentro das células das camadas de pré-condroblastos e de condroblastos. Ainda em concordância com o nosso estudo, Melhus et al. (2010) também observou a expressão da BSP

em alguns condrócitos na interface osso cartilagem de tíbias de ratas submetidas a ovariectomia e falsa ovariectomia. Isto porque esta proteína não colágena pode ser encontrada em tecidos cartilagosos em mineralização (Sun et al., 2010).

Min et al., 2007 avaliaram a expressão da BSP na ATM de camundongos de 4 meses de idade que foram divididos em dois grupos: ovariectomizados e controle. O sacrifício ocorreu após uma, quatro e oito semanas de realizada a cirurgia. Os autores encontraram que a BSP apresentou marcação positiva no côndilo mandibular, em todos os períodos para o grupo controle, no grupo Ovz houve marcação intensa na primeira semana após a ovariectomia, tanto nas células da cartilagem como nas ósseas, porém a intensidade da marcação foi diminuindo com o tempo e na oitava semana apenas uma marcação fraca foi observada. De uma forma geral, a expressão da BSP no grupo Ovz foi mais fraca do que no grupo controle. Sendo a BSP uma marcadora de formação óssea, a expressão fraca dessa no grupo Ovz indica que diante da deficiência de estrógeno as atividades osteoblásticas sofrem alterações podendo afetar a formação óssea da ATM de camundongos adultos.

Fazendo uso dos mesmos marcadores do presente estudo, Tera (2010), avaliou a expressão imunoistoquímica dos marcadores de formação (BSP e OCC) e reabsorção óssea (RANKL) no processo de reparação do enxerto ósseo autógeno *onlay*, recoberto ou não por membrana de Politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), em ratas com deficiência estrogênica. A análise imunoistoquímica foi realizada em diversos períodos e estruturas, entretanto, optou-se por relatar somente as mesmas estruturas encontradas neste estudo assim como o mesmo tempo. O RANKL apresentou marcação em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Após 60 dias da ovariectomia, notou-se que os osteoblastos exibiam marcação moderada, os osteoclastos leve, e nas lacunas de osteócitos a marcação variava de leve a moderada. A autora encontrou

para a BSP a expressão desta, em osteoblastos, osteócitos (núcleo e lacuna), osso neoformado. No mesmo período, 60 dias após a ovariectomia, observou-se que os osteoblastos e as lacunas de osteócitos apresentaram marcação variando de leve a moderada. Com a OCC a imunorreatividade foi vista em osteoblastos e osteócitos, no mesmo período de 60 dias, a marcação mostrou-se intensa tanto para osteoblastos como para osteócitos. Concluiu-se que a expressão dos marcadores imunohistoquímicos foi alterada pela presença da membrana de PTFE-e não pela deficiência estrogênica.

A expressão da osteocalcina foi claramente alterada pela ovariectomia no estudo realizado por Luvizuto et al. (2010a), os grupos Sham, Ovz/E₂ (injeção subcutânea de estradiol) e Ovz/RLX (administração por gavagem de raloxifeno) apresentaram marcação intensa da osteocalcina no processo de reparo alveolar de ratas, quando comparada com a marcação da osteocalcina nos grupos Ovz/O (injeção subcutânea de óleo de milho). Os autores acreditam que a expressão mais fraca da OCC no grupo Ovz/O talvez seja resultado da apoptose de osteoblastos que a ovariectomia provoca. Sendo contrário ao nosso estudo, em que não foi observado que a ovariectomia alterou a expressão da OCC.

A marcação da osteocalcina em osteoblastos e em lacunas de osteócitos observada em nosso estudo, está em concordância com os achados de Luvizuto et al. (2010a) e Wittenburg et al. (2009), sendo que os últimos autores avaliaram a expressão da osteocalcina em biópsias de osso trabecular humano e encontraram resultados positivos.

A expressão da osteocalcina nos condrócitos pode estar relacionada com um estágio de maturação dos mesmos, sugerindo que os condrócitos hipertróficos desenvolveram um marcador fenotípico de mineralização da matriz, semelhante aos osteoblastos, como foi relatado por Ramirez-Yañez et al., 2004, que também encontraram condrócitos

marcados pela osteocalcina, mostrando que esta é uma indicadora da maturação tardia de condrócitos.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a associação da deficiência estrogênica e do consumo crônico de álcool não provocou efeitos deletérios no côndilo mandibular, uma vez que os animais que foram submetidos à deficiência estrogênica e ao consumo de álcool não apresentaram resultados estatísticos, histológicos e imunoistoquímicos diferentes dos demais animais.

8 REFERÊNCIAS*

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, et al. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(7):651-59.

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.

Aoki S, Honma M, Kariya Y, Nakamichi Y, Ninomiya T, Takahashi N, et al. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2010;25(9):1907-21.

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.

Broulik PD, Rosenkrancová J, Růžička P, Sedláček R, Zíma T. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol Res.* 2010;54(4):599-604.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM: c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Carda C, Silvestrini G, Ferraris MEG, Peydró A, Bonucci E. Osteoprotegerin (OPG) and RANKL expression. And distribution in developing human craniomandibular joint. *Tiss Cell*. 2005;37(3):247-55.

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 & Alcoholism*. 2002;37(1):13-20.

Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29(12):2077-90.

Choi DY, Sun KH, Won SY, Lee JG, Hu KS, Kim KD, et al. Trabecular bone ratio of the mandibular condyle according to the presence of teeth: a micro-CT study. *Surg Radiol Anat*. 2012;34(6):519-26.

Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res*. 2003;38(2):223-26.

De Amorim FPL, 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(4):401-08.

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):633-39.

Dervis E. Oral implication of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(3):349-56

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):1211-30.

Ejiri S, Tanaka M, Watanabe N, Anwar RB, Yamashita E, Yamada K, et al. Estrogen deficiency and its effect on the jaw bones. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(5):409-15.

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

Fujita T, Kawata T, Tokimasa C, Kaku M, Kawasoko S, Tanne K. Influences of ovariectomy and orchietomy on the modeling of mandibular condyle in mice. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1998;18(3):164-70.

Fujita T, Kawata T, Tokimasa C, Kohno S, Kaku M, Tanne K. Breadth of the mandibular condyle affected by disturbances of the sex hormones in ovariectomized and orchietomized mice. *Clin Orthod Res*. 2001;4(3):172-6.

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

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):79-98.

Geurs NC. Osteoporosis and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007;44:29-43.

Guyard B, Fricker J, Brigant L, Betoulle D, Apfelbaum M. Effects of ovarian steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. *Metabolism*. 1991;40(5):529-33.

Hansen SA, Folsom AR, Kushi LH, Sellers TA. Association of fractures with caffeine and alcohol in postmenopausal women: the Iowa women's health study. *Public Health Nutrition*. 2000;3(3):253-61.

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.

Jeffcoat M. The association between osteoporosis and oral bone loss. *J Periodontol.* 2005;76(11):2125-32.

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.

Kim YD, Song WW, Kim SS, Kim GC, Hwang DS, Shin SH, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand, receptor activator of nuclear factor κ B, and osteoprotegerin, following low-level laser treatment on deproteinized bovine bone graft in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(4):577-84.

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.

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.

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.* 2010a;46(4):1021-9.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SMD, Okamoto T, Dornelles RCM, Garcia Jr IR, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010b;55(1):52-9.

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(9):1529-38.

Malaval L, Wade-Guéye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirn R, Chen F, et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2008;205(5):1145-53.

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.

Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:385-409.

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.

Meloni JN, Laranjeira R. Custo social e de saúde do consumo de álcool. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26(Suppl 1):7-10.

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, Mu zes 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.

Min HJ, Lee MJ, Kim JY, Cho SW, Park HD, Lee SI, et al. Alteration of BMP-4 and Runx2 expression patterns in mouse temporomandibular joint after ovariectomy. *Oral Dis.* 2007;13(2):220-27.

Miyake M, Oda Y, Iwanari S, Kudo I, Igarashi T, Honda K, et al. A case of osteoporosis with bilateral defects in the mandibular processes. *J Nihon Univ School Dent.* 1995;37(2):108-14.

Monfoulet L, Malaval L, Aubin JE, Rittling SR, Gadeau AP, Fricain JC, et al. Bone sialoprotein, but not osteopontin, deficiency impairs the mineralization of regenerating bone during cortical defect healing. *Bone.* 2010;46(2):447-52.

Moreira MEC, Barcinski MA. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An Acad Bras Ciênc.* 2004;76(1):93-115.

Nackaerts O, Horner K, Jacobs R, Karayianni K, Mitsea A, Berkas L, et al. Is self-reported alcohol consumption associated with osteoporotic mandibular bone loss in women? *Eur J Oral Sci.* 2009;117(1):7-12.

Nakajima M, Ejiri S, Tanaka M, Toyooka EI, Kohno S, Osawa H. Effect of intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) on the mandibular condyle of ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(1):9-17.

Nanci A. Ten Cate, histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro:Elsevier;2008.

Nayak S, Roberts MS, Greenspan SL. Factors associated with diagnoses and treatment of osteoporosis in older adults. *Osteoporosis Int.* 2009;20(11):1963-7.

Oliveira LSAF, Neves FS, Torres MGC, Campos PSF. Características radiográficas dos portadores de osteoporose e o papel dos cirurgiões-dentistas no diagnóstico. *R Ci Med Biol.* 2009;8(1):85-90.

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(3):185-91.

Pereira SEM, Mendonça LMC. Osteoporose e osteomalacia. In: Freitas EV, Py L, Cançado FAX, Doll J, Gorzoni ML, editors. Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro:Guanabara-Koogan;2006 p.798-814.

Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios – PNAD. Rio de Janeiro,2006;27:1-125. www.ibge.gov.br

Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT. Bone matrix proteins in osteogenesis and remodeling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, α_2 HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Archs Oral Biol.* 1995;40(2):145-55.

Pinheiro MM, Reis Neto ET, Machado FS, Omura S, Yang JHK, Szejnfeld J, et al. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. *Rev Saúde Pública.* 2010;44(3):479-85.

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(2):249-63.

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(5):1206-13.

Rocha RF. Influência do consumo de álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas [tese de livre docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2005.

Sawazaki R, Júnior SML, Asprino L, Moreira RWF, De Moraes M. Incidence and patterns of mandibular condyle fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(6):1252-9.

Stolina M, Kostenuik PJ, Dougall WC, Fitzpatrick LA, Zack DJ. RANKL inhibition: from mice to men (and women). *Adv Exp Med Biol.* 2007;602:143-50.

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.

Sun Y, Gandhi V, Prasad M, Yu W, Wang X, Zhu Q, et al. Distribution of Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins (SIBLING) in the condylar cartilage of rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(3):272-81.

Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. *J Prosthet Dent.* 1998;79(6):685-90.

Tanaka M, Ejiri S, Nakajima M, Kohno S, Ozawa H. Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. *Bone.* 1999;25(3):339-47

Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. Region-specific bone mass changes in rat mandibular condyle following ovariectomy. *J Dent Res.* 2000;79(11):1907-13.

Tera TM. Imunolocalização dos marcadores de formação e reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em ratas com deficiência estrogênica [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2010.

Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res.* 1998;13(8):1243-50.

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

Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24(11):1693-701.

Ulku SZ, Akdag MZ, Yavuz I, Celik MS, Ketani MA. Can histological and histomorphometrical changes be induced in rat mandibular condyle following ovariectomy and long-term extremely low frequency magnetic field exposure? *Biotechnol Biotechnol Eq*. 2012;26(2):2916-20.

Valverde P, Zhang J, Fix A, Zhu J, Ma W, Tu Q, et al. Overexpression of bone sialoprotein leads to an uncoupling of bone formation and bone resorption in mice. *J Bone Miner Res*. 2008;23(11):1775-88.

von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. *Clin Oral Invest*. 2001;5(2):71-82.

Wittenburg G, Volkel C, Mai R, Lauer G. Immunohistochemical comparison of differentiation markers on paraffin and plastic embedded human bone samples. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60(Suppl 8):43-49.

Yamada M, Ito M, Hayashi K, Sato H, Nakamura T. Mandibular condyle bone mineral density measurement by quantitative computed tomography: gender-related difference in correlation to spine bone mineral density. *Bone*. 1997;21(5):441-45.

Yamamoto K, Kuraki M, Kurihara M, Matsusue Y, Marakami K, Horita S, et al. Maxillofacial fractures resulting from falls. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(7):1602-07.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisas

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



CERTIFICADO **Comitê de Ética em Pesquisa** **Envolvendo Animais**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **12/2011-PA/CEP**, sobre
“Efeito da deficiência estrogênica associada ao consumo de álcool
no côndilo mandibular de ratas, sob a responsabilidade de
LEONARDO MARCHINI, tendo como orientada a aluna de Mestrado
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 este Comitê de Ética.

São José dos Campos, 14 de setembro de 2011.

Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador