

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

ANA LÚCIA DE OLIVEIRA BONFÁ

**FENÓTIPO OSTEABLÁSTICO, BIOFÍSICA E BIOMECÂNICA DO TECIDO ÓSSEO
EM UM MODELO DE RATAS INDUZIDAS À SÍNDROME DO OVÁRIO
POLICÍSTICO: ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Araraquara, SP
2017

ANA LÚCIA DE OLIVEIRA BONFÁ

**FENÓTIPO OSTEABLÁSTICO, BIOFÍSICA E BIOMECÂNICA DO TECIDO
ÓSSEO EM UM MODELO DE RATAS INDUZIDAS À SÍNDROME DO OVÁRIO
POLICÍSTICO: ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Montrezor

Araraquara, SP
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

B696f Bonfá, Ana Lucia de Oliveira

Fenótipo osteoblástico, biofísica e biomecânica do tecido ósseo de ratas induzidas à síndrome do ovário policístico: estudo *in vivo* e *in vitro*/Ana Lucia de Oliveira Bonfá. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2017.

60f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Montrezor

1. Síndrome do ovário policístico. 2. Células-tronco mesenquimais.
3. Esteróides ovarianos. 4. Osteoblastos. 5. Cultura de células.
I. Título.

CDU

577.1:66

ANA LÚCIA DE OLIVEIRA BONFÁ

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 28 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Henrique Montrézor (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA

Prof.ª Dr.ª Ana Paula de Souza Faloni
Universidade de Araraquara - UNIARA

Prof.ª Dr.ª Roberta Okamoto
Faculdade de Odontologia/UNESP/Araçatuba.

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

- Nome: **Ana Lucia de Oliveira Bonfá**
- Nascimento: 31/12/1960 - Santa Rita do Passa Quatro - SP
- CPF: 066.027.518-08

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 1980 - 1984: **Graduação em Enfermagem - Escola de Enfermagem Ribeirão Preto - USP**, Brasil - Ano de obtenção: 1984.
- 2014: Aluno de **Graduação em Medicina Veterinária - Universidade Central Paulista - UNICEP**, São Carlos, Brasil.
- 2015: Mestrado em **Medicina Regenerativa e Química Medicinal - Universidade de Araraquara, UNIARA**, Araraquara, Brasil. Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Montezor. Taxista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2012 - 2012: Curso: **Interpretação da Norma ABNT ISO/IEC 17025** - Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente, SVMMA - São Paulo, Brasil.
- 2010 - 2010: Curso: **Liderança, inteligência interpessoal e comunicação** - Brasil.
- 1999-1999: **Aprimoramento Técnico e Gerencial de Enfermagem** - Conselho Regional de Enfermagem, COREN, Brasil.
- 1996 - 1996: **Gerenciando a Qualidade Total em Serviços** - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte - Brasil.
- 1988 - 1988: **Capacitação Pedagógica** - Secretaria do Estado de Saúde de São Paulo - DRI-U Brasil.

4. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- 1985 - 1990: **Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP** - HCFMRP-USP. Vínculo: Enfermeira Setor Clínica Médica - 5º andar.
- 1992 - 1996: **Santa Casa de Misericórdia** - Araraquara - SP. Vínculo: Prestador de serviço terceirizado - Treinamento e supervisão de Enfermagem em Banco de Sangue.
- 1996 - vínculo atual: **Bonfá Serviço de Apoio Diagnóstico SS EPP** - Araraquara - SP. Vínculo: Sócio - proprietária.
- 2000 - vínculo atual: **Exata Serviço de Apoio Diagnóstico SS EPP** - Araraquara - SP. Vínculo: Sócio - proprietária.
- 2010 - 2015 - **Saúde Animal - Centro de Diagnóstico Laboratorial** - Araraquara - SP. Vínculo: Sócio - proprietária.

5. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- Apresentação de trabalhos:

“1- ‘Análise da viabilidade celular de Ósteo-1 e C2C12 desafiadas com diferentes concentrações de esteroides ovarianos, na ausência e na presença de soro fetal bovino: Estudo *in vitro* mimetizando ratas com ovário policístico” - trabalho apresentado no formato de painel durante a XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Centro de Convenções e Eventos Bourbon Cataratas - Foz do Iguaçu - PR, no período de 29 de agosto a 01 de setembro de 2016.

2- ‘**Estudos *in vitro* dos efeitos da Progesterona, Testosterona, Estradiol e soro fetal bovino sobre a viabilidade celular de Osteo1 e C2C12, mimetizando ratas com ovário policístico**’ - trabalho apresentado no formato de painel no Fórum Nacional de Pós-graduações em Biotecnologia, na Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ, nos dias 28, 29 e 30 de setembro de 2016.

3- ‘**Estudos *in vitro* das influências de esteroides sexuais ovarianos sobre a diferenciação de células tronco mesenquimais de ratas induzidas à Síndrome do Ovário Policístico**’, trabalho apresentado no formato de painel durante o X Congresso de Iniciação Científica da Uniara, na Universidade de Araraquara - UNIARA, Araraquara - SP, realizado no período de 03 a 06 de novembro de 2015.

- Trabalhos publicados :

1- **Effects of Ovarian Steroids on Osteoblast Viability and Mineralization**; Asian Journal of Biology, 2(3): 1-18, 2017; Article no.AJOB.34036; co-autor; trabalho publicado em 30 de maio de 2017.

5. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

2016 - Como otimizar sua pesquisa através dos ensaios Multiplex

2016 - Feira Regional de Profissões do Unicep

2016 - I Fórum de Pós-graduações em Biotecnologia

2015 - I Workshop: Química Inorgânica Medicinal

2015 - III SIMPOVET - Simpósio de Medicina Veterinária

2015 - II SIMPOVET - Simpósio de Medicina Veterinária

2015 - Workshop sobre Tecnologias Tridimensionais

2015 - X Congresso Iniciação Científica UNIARA

2015 - XXI Simpósio Regional de Saúde Animal do CRMV-SP

2014 - I SIMPOVET - Simpósio de Medicina Veterinária

Dedico este trabalho àqueles que foram meu alicerce, meu exemplo de amor e caráter. De onde estiverem, estão sempre comigo...

Yolanda Garcia de Oliveira, minha mãe
Benedicto Moraes de Oliveira, meu pai

Para **Beatriz e Rafael** pela benção de tê-los como filhos, seres que iluminam e dão sentido à minha vida.

Para **Reinaldo**, por tornar possível e estar ao meu lado nessa caminhada...

AGRADECIMENTOS

A **Deus** em primeiro lugar, por todas as bênçãos que recebo, pelo dom da vida, da saúde, inteligência, discernimento e a oportunidade do aprimoramento profissional e pessoal.

Às minhas irmãs **Ana Maria** e **Ana Cristina**, pelo amor incondicional que nos une.

Aos familiares: irmão, cunhados e sobrinhos que sempre me deram incentivo para a realização desse sonho, em especial à **Eloisa Bonfá** pela generosidade, apoio e principalmente pelo “chute inicial”.

Ao Prof. **Dr. Luís Henrique Montezor**, pela disponibilidade de me orientar, pela infinita boa vontade e paciência. Por tantos ensinamentos e amparo. Mais do que um orientador, eu recebi um amigo, uma pessoa quem admirar e seguir o exemplo.

Agradeço aos colaboradores Prof^a **Dr^a Janete Ap. Anselmo-Franci**, Faculdade de Odontologia - USP Ribeirão Preto, Prof^a **Dr^a Keiko Okino Neonaka** e **DDo Victor Fabrício** - UFSCAR São Carlos, Prof. Dr. **Jorge Alberto Achcar** – UNIARA.

Aos **professores** do Programa de Pós-graduação, pelo profissionalismo, conhecimento e seriedade. Pela colaboração para minha formação e desenvolvimento desse trabalho.

Aos **funcionários** da Uniara, pela solicitude, gentileza e educação, nas diversas vezes que necessitei dos mesmos, em especial à **Sandra Pavanelli**.

Aos **colegas** que caminharam comigo no Mestrado, pelo carinho e apoio nas horas mais difíceis. Não quero citar os nomes porque certamente estaria cometendo uma injustiça com alguém, tantas foram as pessoas que me ajudaram. Algumas que se tornaram muito queridas, amigos que encontrei. A presença de vocês fez toda diferença para que eu chegasse à conclusão desse processo.

Finalmente, agradeço à Capes, pelo apoio financeiro.

“Ninguém consegue realizar nada sem a colaboração de outros.”

“Agradecer é a forma mais forte de se conectar com Deus. Quanto maior nossa gratidão, mais bênçãos de amor, alegria, paz e virtudes positivas Ele nos enviará!”

Que Deus transforme minha gratidão em uma chuva de bênçãos sobre todos vocês.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes
Assim, em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Fernando Pessoa

**FENÓTIPO OSTEOBLÁSTICO, BIOFÍSICA E BIOMECÂNICA DO TECIDO ÓSSEO
EM UM MODELO DE RATAS INDUZIDAS À SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO:
ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

RESUMO

A síndrome do ovário policístico (SOP) apresenta sinais e sintomas metabólicos tão heterogêneos que interferem na qualidade de vida de um número significativo de mulheres em idade reprodutiva (até 12%). Alterações ovarianas, hormonais, ósseas e metabólicas são observadas em mulheres portadoras da SOP. Essas irregularidades estão relacionadas ao aparecimento de várias comorbidades que se agravam com o tempo (síndrome metabólica, obesidade, diabetes e osteoporose). Esse fato torna-se ainda mais relevante com o aumento da expectativa do tempo de vida da população atual. O principal objetivo deste trabalho foi estudar as relações entre as alterações ovarianas e plasmáticas dos esteroides sexuais (P4 e T), observadas em ratas induzidas à SOP com atividades ósseas *in vivo* e atividades celulares de osteoblastos *in vitro*. Para os experimentos *in vivo* foram utilizadas ratas Wistar adultas distribuídas em 6 grupos (n=5), após a indução à SOP com valerato de estradiol (VE): grupos controle (30, 45 e 60 dias) e grupos SOP (30, 45 e 60 dias). Foram analisados ciclo estral, massa corporal, massa ovariana, concentrações plasmáticas de P4, T e fosfatase alcalina. Também avaliadas as características biofísicas e biomecânicas dos fêmures e análise histológica dos ovários. Para os experimentos *in vitro* foram utilizadas células-tronco mesenquimais, obtidas dos fêmures das ratas dos experimentos *in vivo*, diferenciadas em osteoblastos em meio osteogênico e cultivadas em placas de 24 poços, separadas em grupos controle e SOP, na densidade de 30.000 células/mL/poço em estufa (37° C, 5% CO₂ e 95% de ar atmosférico) em períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias. Foram analisadas a viabilidade celular, a mineralização biológica e as concentrações de fosfatase alcalina no meio osteogênico nos diferentes tempos de cultura. Os resultados mostram que houve indução à SOP, confirmada pelas alterações dos ciclos estrais das ratas e pelas alterações plasmáticas de P4 e T. A análise histológica dos ovários mostrou a presença de cistos nos grupos SOP. Observou-se redução da carga máxima e do ponto de fratura da carga máxima para o grupo SOP 60 dias, bem como aumento nas concentrações de fosfatase alcalina nos grupos tratados. As culturas celulares mostraram que as células obtidas dos animais que foram induzidos à SOP tiveram menor viabilidade e menor mineralização. Desta forma, pode-se sugerir que ratas adultas induzidas à SOP com VE têm importantes alterações ósseas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Contudo, estudos moleculares e genéticos serão necessários para a compreensão dos mecanismos que relacionam as

alterações hormonais com as alterações ósseas.

Palavras-chave: síndrome ovário policístico; células-tronco mesenquimais; esteroides ovarianos; osteoblastos; cultura de células.

OSTEOBLASTIC, BIOPHYSICAL AND BIOMECHANICAL PHENOTYPE OF BONE TISSUE IN A RAT MODEL INDUCED TO POLYCYSTIC OVARY SYNDROME: *IN VIVO* AND *IN VITRO* STUDIES

ABSTRACT

Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is an endocrinopathy that can affect up to 12% of the population of women of reproductive age. Ovarian, hormonal, bone and metabolic changes are observed in women with PCOS. The main objective of this assignment was to study the relationships between ovarian and plasma sex steroids concentrations (P4 and T) changes observed in rats induced by PCOS with *in vivo* bone activities and *in vitro* osteoblast cell activities. For the *in vivo* experiments, Wistar adult rats distributed in 6 groups (n = 5) were used after induction to estradiol valerate: control groups (30, 45 and 60 days) and SOP groups (30, 45 and 60 days). The estrous cycle, body mass, ovarian mass, plasma P4 and T concentrations and alkaline phosphatase (in which latter, plasma concentrations and culture medium were analyzed at different times), biophysical and biometric characteristics of the femurs, histological analysis of the ovaries of the rats were analyzed, with a sample of each group, of the six groups studied. For the *in vitro* experiments, mesenchymal stem cells were obtained from the femurs of the rats of the *in vivo* experiments, differentiated into osteoblasts in osteogenic medium and cultured in 24 well plates, separated in control and SOP groups, at a density of 30.000 cells / mL / (37 ° C, 5% CO₂ and 95% atmospheric air) in experimental periods of 7, 14 and 21 days. Cell viability and biological mineralization were analyzed. The results show that there was induction of PCOS, confirmed by alterations in the estrous cycles of the rats and by plasma changes in P4 and T. The histological analysis of the ovaries showed the presence of cysts in the SOP 45 days and SOP 60 days groups. Changes in the bone patterns studied, specifically, reduction of maximum load and fracture point of the maximum load for the SOP group 60 days, as well as increased alkaline phosphatase concentrations in the treated groups compared to their respective control groups. Cell cultures show that the cells obtained from the animals that were induced to the SOP had less viability and lower mineralization, for some SOP groups, compared to the control groups. In this way, it can be suggested that Wistar adult rats induced to PCOS with EV have important bone alterations, both *in vivo* and *in vitro*. However, molecular and genetic studies will be necessary to understand the mechanisms that relate hormonal changes to bone changes.

Key-words: polycystic ovarian syndrome; mesenchymal stem cells; ovarian steroids; osteoblasts; cells culture.

LISTA DE ABREVIATURAS DOS GRUPOS E TERMOS DA DISSERTAÇÃO

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Anidrase carbônica
AE-PCOS	The Androgen Excess and PCOS Society
BMPs	Proteínas morfogênicas ósseas
BMU	Unidades celulares básicas de remodelação
BSP	Bone sialoprotein - Sialoproteínas ósseas
Ca ²⁺	Íon cálcio
Cbfa1	Core-binding factor sub-unit alpha 1- também conhecido como gene RUNX2
CO ₂	Gás carbônico
DHEA	Dihidroandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
E2	Estradiol
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H ⁺	Íon hidrogênio
HCO ₃ ⁻	Íon bicarbonato
HPO ₄ ⁻	Íon fosfato
IL-6	Interleucina 6
LH	Hormônio luteinizante
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
NIH	Nacional Institutes of Health
Ocn	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina

Opn	Osteopontina
P4	Progesterona
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor de ativação do fator nuclear Kappa B
RANKL	Ligante para o receptor de ativação do fator nuclear NF Kappa B
RI	Resistência à insulina
RU486	Hormônio antiprogesterona
RUNX2	Runt-related transcription factor 2 - fator de transcrição de diferenciação osteoblastos
SOP	Síndrome do ovário policístico
T	Testosterona
TGF β	Fator de crescimento transformante beta
TNF	Fator de necrose tumoral
TP	Propionato de testosterona
VE	Valerato de estradiol

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Variação média da massa corporal em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 30 dias (barras pretas) (A). Variação média da massa dos ovários direito e esquerdo em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 30 dias (barras negras) (B).35
- Figura 2** – Variação média da massa corporal em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 45 dias (barras pretas) (A). Variação média da massa dos ovários direito e esquerdo em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 45 dias (barras negras) (B).36
- Figura 3** – Variação média da massa corporal em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 60 dias (barras pretas) (A). Variação média da massa dos ovários direito e esquerdo em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 60 dias (barras negras) (B).37
- Figura 4**– Variação média do índice gonadossomático (IGS) em porcentagem (%) das ratas controle e das ratas SOP 30 dias, SOP 45 dias e SOP 60 dias.38
- Figura 5** – Imagens fotográficas dos cortes histológicos dos ovários nos diferentes grupos, visualizadas em microscópio óptico, com aumento de 4x, 10x e 20x.39
- Figura 6** – Variação média dos dados biométricos dos fêmures das ratas controle, SOP 30 dias, SOP 45 dias e SOP 60 dias.40
- Figura 7** – Variação média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas controle, SOP 30 dias, SOP 45 dias e SOP 60 dias.41
- Figura 8** – Variação média das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/ml) (A) e testosterona (pg/ml) (B) para as ratas dos grupos controle 30, controle 45 dias, controle 60 dias, e grupos SOP 30 dias, SOP 45 dias e SOP 60 dias.42
- Figura 9** – Comparação da variação média das concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina entre os grupos controle e grupos SOP (30, 45 e 60 dias).43
- Figura 10** – Variação média da viabilidade de osteoblastos por redução do brometo de {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}(mtt), em comprimento de onda de 570 nanômetros.44
- Figura 11** – Comparação da variação média da viabilidade de osteoblastos por redução do brometo de {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}(mtt), em comprimento de onda de 570 nanômetros, entre os grupos controle (A) e os grupos SOP (B).45
- Figura 12** – Variação média da mineralização biológica de osteoblastos cultivados por 7 dias, 14 dias e 21 dias; nos grupos controle e SOP (30, 45 e 60 dias).46
- Figura 13** – Comparação da variação média da mineralização biológica de osteoblastos cultivados por 7 dias, 14 dias e 21 dias; nos grupos controle e SOP (30, 45 e 60 dias)47
- Figura 14** – Comparação da variação média da fosfatase alcalina no meio de cultura de osteoblastos, nos períodos de 7, 14 e 21 dias48
- Figura 15** - Imagens fotográficas das células ósseas dos grupos controle e SOP (30, 45 e 60 dias), após coloração com vermelho de alizarina nos diferentes tempos de cultura (7, 14 e 21 dias).49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	O Tecido Ósseo.....	19
1.2	Ciclo da remodelação óssea.....	22
1.3	Esteroides Ovarianos e Remodelação Óssea	24
1.3.1	Progestágenos	25
1.3.2	Andrógenos.....	25
1.3.3	Estrógenos.....	26
1.4	Síndrome do ovário policístico	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	Geral	29
2.2	Específicos.....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Experimentos <i>in vivo</i>	30
3.1.1	Animais.....	30
3.1.2	Avaliação do ciclo estral e controle de massa corpórea	30
3.1.3	Indução da SOP	31
3.1.4	Eutanásia.....	31
3.1.5	Obtenção do plasma.....	31
3.1.6	Dosagens plasmáticas dos esteroides ovarianos e fosfatase alcalina.....	32
3.1.7	Análise morfológica dos ovários	32
3.1.8	Índice Gonadossomático - IGS	33
3.1.9	Análises da qualidade do tecido ósseo.....	33
3.2	Experimentos <i>in Vitro</i>	34
3.2.1	Obtenção das células-tronco mesenquimais do estroma da medula óssea	34
3.2.2	Diferenciação das CTM em osteoblastos	35
3.2.3	Análise indireta da viabilidade celular	35
3.2.4	Análise dos nódulos de mineralização.....	36
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Experimentos <i>in vivo</i>	37
4.1.1	Análise das massas corpóreas e dos ovários.....	37
4.1.2	Grupo 30 dias.....	37
4.1.3	Índice Gonadossomático (IGS).....	40
4.1.4	Microscopia de luz: análise morfológica dos ovários.....	41
4.1.5	Ensaio biomecânicos	42
4.1.6	Dados Biofísicos	43
4.1.7	Esteroides ovarianos	44
4.1.8	Fosfatase alcalina.....	45
4.2	Experimentos <i>in vitro</i>	46
4.2.1	Análise da viabilidade celular dos osteoblastos.....	46
4.2.2	Análise da mineralização biológica dos osteoblastos	48
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	57

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS58

1 INTRODUÇÃO

1.1 O TECIDO ÓSSEO

Apesar do seu aspeto aparentemente inerte, o tecido ósseo é uma estrutura altamente dinâmica, cresce, remodela-se e mantém-se ativa durante toda a vida do organismo (JUDAS *et al.*, 2012). O tecido ósseo é constituído por uma fase mineral, formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, organizada numa matriz colágena. O osso compacto é formado em 90% de matriz extracelular, a qual possui de 30 a 35% de matéria orgânica colagenosa (colágeno tipo I) e não colagenosa: osteocalcina (Ocn), osteopontina (Opn), sialoproteína óssea, osteonectina, entre outras. A matéria inorgânica representa de 65 a 70% da matriz extracelular e é formada por cristais de hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (AVOLIO *et al.*, 2008; JUDAS *et al.*, 2012; SINGULANI, 2014).

Cerca de 80 a 90% do volume total do osso cortical está calcificado, enquanto que, o volume de osso trabecular calcificado é da ordem dos 15 a 25% e apresenta área de superfície na ordem de 20 vezes maior que o osso cortical, que lhe confere maior capacidade metabólica e resposta mais rápida aos estímulos. Deste modo, pode afirmar-se que o tecido ósseo cortical desempenha funções de suporte e proteção, estando localizado externamente em relação ao tecido ósseo trabecular, e este último constitui o eixo da função metabólica (KLEIN-NULEND *et al.*, 2015).

A combinação da matéria mineral e orgânica confere ao tecido ósseo propriedades biomecânicas únicas. As fibras de colágeno conferem certa elasticidade e alguma capacidade de resistência à propagação de fissuras e forças de tensão. A elasticidade do material significa que este readquire a sua forma inicial, quando cessa a força aplicada. Ao contrário, a plasticidade traduz-se por uma deformação permanente (JUDAS *et al.*, 2012).

Os cristais de hidroxiapatita proporcionam uma elevada dureza e resistência à compressão porém, quando a extensão da deformação ultrapassa determinado limite, ocorre a ruptura/fratura do material. Por exemplo, um osso longo desmineralizado permite a aplicação de forças significativas de distensão longitudinal ou o seu enrolamento em forma de "nó de gravata", sem se fraturar; ao contrário, a remoção da matriz orgânica de um osso longo, torna-o rígido, mas muito frágil às deformações e traumatismos diretos (JUDAS *et al.*, 2012).

O esqueleto ósseo é submetido a complexos mecanismos de renovações estruturais e funcionais ao longo da vida. Tais mecanismos são essenciais para garantir o desenvolvimento e a manutenção do tamanho, da forma e da integridade óssea (ZAIDI, 2007). No adulto, a atividade metabólica envolve predominantemente a remodelação, além de outras atividades como equilíbrio acidobásico (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006). A formação do tecido ósseo envolve, além das células osteoprogenitoras, um processo complexo, como a apoptose das células presentes no tecido cartilaginoso (condrócitos), que são substituídas pelas células do tecido ósseo (osteoblastos e osteócitos) (WOLFF *et al.*, 2012). Quando lesados, têm capacidade regenerativa isto é, o processo de reparação óssea é efetuado através da formação de osso novo e não pela formação de tecido fibroso (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006). Nesta permanente reorganização participam diversas células (células mesenquimais), provenientes da medula óssea e dos vasos sanguíneos no tecido conjuntivo, que assumem várias formas e funções e que constituem a série osteoblástica e a série osteoclástica, responsáveis pela constante formação, reabsorção, reparação e manutenção da microarquitetura óssea (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007; SINGULANI, 2014). Toda essa atividade está sob influência hormonal (WOLFF *et al.*, 2012).

As células da linhagem osteoblástica integram quatro subpopulações principais: os pré-osteoblastos, os osteoblastos maduros, as células de revestimento ósseo e os osteócitos, sendo todas elas consideradas como diferentes estádios funcionais da mesma célula (JUDAS *et al.*, 2012; SINGULANI, 2014). As células mesenquimais se diferenciam em células da linhagem osteoblástica através da ativação de genes, entre eles o gene *Cbfa1*, que também recebe o nome de *RUNX2*, que codifica um fator de transcrição responsável pela liberação de fatores de crescimento como interleucina-6 (IL-6), o fator de crescimento transformante (TGF- β) e codifica a expressão de proteínas específicas da matriz óssea, as proteínas morfogênicas ósseas: BMPs (RAISZ; RODAN, 1998; ANDRADE *et al.*, 2007).

As BMPs ativam a cascata de eventos moleculares que produzem a matriz óssea e tem importância fundamental no processo de mineralização, ou seja, na ligação do colágeno aos cristais minerais de hidroxapatita. Dentre outras proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão a osteopontina, a osteocalcina e a sialoproteína óssea, como também vários fatores de crescimento que ficam incorporados na matriz óssea (BARON; RAWADI, 2007). Da mesma forma, também secretam fatores locais de regulação responsáveis pela proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica. Apresentam numerosos prolongamentos citoplasmáticos, que se projetam para a matriz óssea e se comunicam com os prolongamentos dos osteócitos. Este fato permite o

estabelecimento de importantes relações entre os osteoblastos ativos na superfície óssea e os osteócitos que estão no seio da matriz calcificada (CAULEY, 2015). Terminado o período de secreção ativa, os osteoblastos achatam-se e transformam-se em células de revestimento ósseo ou em osteócitos, que ficam aprisionados em cavidades denominadas por lacunas ou osteoplastos.

As células de revestimento ósseo (*lining cells*) formam uma camada contínua de células achatadas que reveste a maior parte da matriz calcificada, situando-se ao longo das superfícies do endósteo. Estas células apresentam uma capacidade de síntese reduzida, sendo consideradas quiescentes ou de repouso. Porém, ao serem estimuladas, transformam-se em células osteoblásticas ativas, com isso, possuem um papel cada vez mais relevante nos processos de remodelação óssea (JUDAS *et al.*, 2012).

Os osteócitos são células altamente ramificadas, localizadas nas suas lacunas ósseas, comunicando-se entre si e com as células da superfície óssea, através de uma rede de canalículos, que contêm os seus numerosos prolongamentos citoplasmáticos e que permitem a passagem de nutrientes e de muitas outras substâncias. A viabilidade do osteócito depende deste processo de difusão de nutrientes e a vida da matriz óssea depende dos osteócitos (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006; SINGULANI, 2014).

Devido ao seu elevado número, complexa organização e disposição, os osteócitos percebem as alterações da matriz óssea e os estímulos mecânicos que atuam sobre o osso, sendo considerados mecanossensores. Estas informações são transmitidas às células da superfície que ativam os processos de remodelação óssea, caso necessário. O mecanismo de conversão de um sinal de natureza mecânica (força) para uma resposta celular de natureza bioquímica denomina-se mecanotransdução (ROBLING *et al.*, 2008).

Na série osteoclástica estão os monócitos e macrófagos diferenciados circulantes e outros tipos celulares, os monócitos presentes na medula óssea, os pré-osteoclastos e os osteoclastos (JUDAS *et al.*, 2012; PITOMBO, 2016). Essas células desempenham uma função essencial na remodelação e na renovação do tecido ósseo, são membros das células hematopoiéticas de linhagem mielóide dos monócitos-macrófagos. Sua função é regulada por diversos fatores: fator estimulador da colônia de monócitos 1 (CFS-1), fator de diferenciação dos osteoclastos (ODF), Inter leucinas (IL), vitamina D₃, fator de necrose tumoral α (TNF α) e partículas ósseas mineralizadas contendo osteocalcina (ANDRADE *et al.*, 2007).

Assim, o osteoclasto é uma célula sanguínea altamente especializada, com muitas características imunológicas. A semelhança filogenética entre os sistemas imunológicos e o osteo-articular resulta numa forte comunicação e integração entre ambos, sendo que o osteoclasto ocupa uma posição chave nessa integração (JUDAS *et al.*, 2012).

1.2 CICLO DA REMODELAÇÃO ÓSSEA

A atividade de remodelação óssea ocorre na superfície interna e central do ósteon ou Sistema de Havers (KLEIN-NULEND *et al.*, 2015). O processo de remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas Unidades Celulares Básicas de Remodelação Óssea (BMU), onde atuam conjuntamente osteoblastos e osteoclastos (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006).

O ciclo da remodelação óssea se inicia com alterações do meio extracelular na matriz óssea devido à ação de estímulos ambientais diversos como os de natureza mecânica, elétrica, química e magnética que são captados pelos osteócitos que os convertem em sinais e mensagens moleculares (óxido nítrico e prostaglandinas, alterações da carga elétrica, alterações na membrana plasmática com liberação de cálcio), que serão transmitidas às células efectoras por meio dos prolongamentos celulares e *gap junctions*, ativando a rede intracelular de comunicação (AVOLIO *et al.*, 2008).

Ao serem estimulados, osteoblastos ou precursores mesenquimais produzem fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos. Os osteoblastos expressam ainda (e na sua superfície) outra proteína transmembrana conhecida por RANKL (ligante para o receptor de ativação do fator nuclear kappa B) (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006). A proliferação e diferenciação dos progenitores formam pré-osteoclastos mononucleados que são recrutados da medula óssea para os locais onde a matriz óssea será reabsorvida (PITOMBO, 2016).

As células pré-osteoclásticas apresentam na sua superfície, um receptor transmembrana designado por RANK (receptor de ativação do fator nuclear kappa B) (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006; JUDAS *et al.*, 2012; SINGULANI, 2014). A interação do RANKL (presente na superfície dos osteoblastos) com o RANK leva à maturação dos osteoclastos. O contato célula-a-célula entre as linhagens osteoblástica e osteoclástica constitui um pré-requisito essencial para a maturação e ativação dos osteoclastos. Os osteoblastos sintetizam ainda outra proteína, a Osteoprotegerina (OPG), com uma alta afinidade para o RANKL, impedindo ou bloqueando a ligação do RANKL ao seu receptor RANK. Por este mecanismo, a OPG regula a população funcional dos osteoclastos, atuando localmente como um inibidor da osteoclastogênese, reduzindo a reabsorção óssea. Dessa forma, as células da linhagem osteoblástica podem controlar o desenvolvimento e a atividade osteoclástica em resposta a diferentes estímulos mecânicos, hormonais e inflamatórios, ajustando os níveis de expressão do RANKL e de OPG (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006; JUDAS *et al.*, 2012).

Cada BMU começa com o reconhecimento de uma área alvo definindo uma região onde o osso necessita ser substituído (fase de ativação), onde ocorre o recrutamento e migração de células da linhagem osteoclástica para o local, com o reforço dos mecanismos de osteoclastogênese, aos quais está normalmente o eixo RANKL/RANK/OPG. As células de revestimento liberam enzimas que iniciam a digestão da fina camada colagênica (endóstio), conduzindo a uma fácil exposição da matriz óssea mineralizada. A superfície de matriz óssea exposta atrai os pré-osteoclastos presentes na circulação sanguínea, contribuindo também para a sua maturação e ativação. Todo este processo é acompanhado por mecanismos de neoangiogênese (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006).

A reabsorção propriamente dita é um processo altamente organizado e sequencial constituído por duas fases consecutivas: a) a primeira fase consiste num processo de acidificação da matriz óssea (através da produção de prótons H^+ e ânions Cl^-), provocando a dissolução dos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. No interior do osteoclasto, a anidrase carbônica (AC) promove a conversão de gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) em íons hidrogénio (H^+) e bicarbonato (HCO_3^-). A acidificação, promovida pelos íons H^+ , contribui para a desmineralização da matriz óssea, ocorrendo a dissolução dos cristais de hidroxiapatita e consequente liberação de cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (HPO_4^-); b) na segunda fase, ocorre a degradação completa da fase orgânica por ação de enzimas proteolíticas lisossomais (catepsinas e metaloproteínas da matriz). Estas enzimas são responsáveis pela degradação das proteínas colagênicas e não-colagênicas da matriz. Os produtos da degradação da matriz orgânica são internalizados por meio de vesículas e transportados para o interior do osteoclasto, sendo posteriormente, conduzidos para o meio extracelular. No final desta etapa, verifica-se uma inversão/reversão nesta sequência, iniciando-se o processo de reparação observando-se, desta vez, a presença de células osteoprogenitoras que vão sintetizar novo colágeno e outras proteínas de matriz, preenchendo a cavidade de reabsorção com osteóide lamelar novo, que receberá deposição mineral e formará pontes de ligação de colágeno (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006; JUDAS *et al.*, 2012).

Grande parte dos osteoblastos sofre apoptose por ação do fator de necrose tumoral (TNF) liberado pelas células medulares vizinhas, uma minoria permanece presa à matriz em mineralização, transformando-se em osteócitos (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006).

A regulação local da formação e da função das células ósseas sofre influência de fatores autócrinos e parácrinos secretados pelas mesmas (fatores de crescimento, citocinas e prostaglandinas). Entre os fatores sistêmicos associados à homeostase óssea estão o paratormônio (PTH), calcitonina, 1,25 dihidroxi-vitamina D_3 , glicocorticoides e o estrógeno. Vários autores

colocam o estrogênio como um fator sistêmico de grande importância para a homeostase do tecido ósseo, visto que a diminuição das taxas hormonais do mesmo está intimamente relacionada com a ocorrência da osteoporose (GÓMEZ-AMBROSI *et al.*, 2008; KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012; KLEIN-NULEND *et al.*, 2015).

1.3 ESTEROIDES OVARIANOS E REMODELAÇÃO ÓSSEA

Estudos realizados na década de 1940 por Albright e Reisfenstein relacionam a deficiência de andrógenos e estrógenos com deficiências no metabolismo ósseo. Tais estudos iniciaram as pesquisas visando a compreensão das ações dos hormônios esteroides sobre o esqueleto ósseo saudável e relacionados a patologias. Manolagas e colaboradores (2002) mostram que os estrógenos e os andrógenos diminuem o número de ciclos de remodelação óssea por meio da atenuação da taxa de ativação dos osteoclastos e dos osteoblastos, modulando a transcrição de genes responsáveis pela osteoclastogênese e/ou diferenciação de células mesenquimais. Sabe-se que o estradiol inibe a osteoclastogênese, inibindo o fator de transcrição RUNX-2 (*Runt-related transcription factor 2* - proteína codificada pelo gene RUNX) e a reabsorção óssea mediante a inserção de RANKL nas membranas dos osteoblastos, justificando a ação de “proteção” óssea (MARTIN *et al.*, 2015; RESENDE *et al.*, 2010).

Segundo Klein-Nulend (2015), as sinalizações químicas iniciadas por osteócitos mecanossensíveis são dependentes de estradiol (E2). Há correlações entre a osteoporose, a idade e os níveis plasmáticos de esteroides sexuais, principalmente em mulheres após a menopausa, em decorrência da redução dos níveis plasmáticos dos mesmos.

Os esteroides sexuais podem apresentar efeitos não genômicos sobre as atividades de células ósseas. Além disso, há resultados que mostram efeitos anti-apoptóticos de estrógenos e andrógenos sobre osteoblastos cultivados *in vitro* (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012). Esses hormônios atuam no desenvolvimento e na manutenção do esqueleto em homens e mulheres. Os níveis plasmáticos de E2 e T diminuem com o aumento da idade em ambos os sexos e, desta forma, contribuem com a redução da massa óssea e com o aumento dos riscos de fraturas (CAULEY, 2015).

Receptores de andrógenos estão presentes em osteoclastos, osteoblastos e osteócitos; portanto, esses esteroides têm ações sobre reabsorção óssea, síntese da matriz óssea e manutenção desta matriz, respectivamente (BALASCH, 2003). Os andrógenos estimulam a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, além de elevar a síntese de proteínas da matriz extracelular e estimular a mineralização da mesma (NOTELOVITZ, 2002a, 2002b).

A viabilidade celular de osteoblastos mantidos em cultura durante 48 horas e 72 horas, na ausência e na presença de soro fetal bovino é significativamente influenciada por diferentes concentrações de P4, E2 e T (BRANCAGLIÃO et al., 2015).

1.3.1 Progestágenos

Os progestágenos são esteroides sexuais femininos produzidos pelo corpo lúteo ou pela placenta. São precursores dos esteroides sexuais estrógenos e andrógenos, bem como da síntese de cortisol pelo córtex das suprarrenais (WOLFF *et al.*, 2012). O papel funcional dos progestágenos na prevenção das perdas ósseas é bem menos compreendido do que as funções androgênicas e estrogênicas. Receptores de P4 foram identificados em osteoblastos e osteoclastos humanos (SLOOTWEG *et al.*, 1992; WEI *et al.*, 1993). No entanto, ainda não é claro se as atividades dos progestágenos no osso podem ser atribuídas às suas ações progestacionais ou por outras ações (BALASCH, 2003).

1.3.2 Andrógenos

Os andrógenos são hormônios masculinos produzidos pelos testículos nos homens e pelas células da teca nas mulheres. Agem de forma significativa sobre mecanismos fisiológicos que controlam as atividades ósseas e musculares. As ações dos andrógenos podem ser classificadas como diretas e indiretas. As ações diretas são consequência da ligação da T aos seus receptores nucleares das células ósseas e as ações indiretas dependem da conversão da T em E2. Esta conversão depende da atividade da enzima CYP19A1 (P450 aromatase) presente na matriz mitocondrial das células ósseas, que aromatiza androstenediona e T em E2 (BALASCH, 2003).

Como são precursores de estrógenos, apresentam várias funções similares aos mesmos, tais como: aumentar a atividade dos osteoblastos, inibir a retirada de cálcio do organismo ao diminuir a formação e atividade dos osteoclastos, estimular o crescimento longitudinal dos ossos longos na puberdade, assim como causando a ossificação do disco epifisário. Com a diminuição da secreção desse hormônio, a atividade osteoclástica é maior do que a osteoblástica, reduzindo potencialmente a formação óssea. Os principais tipos de andrógenos são testosterona e androstenediona (KLEIN-NULEND et al., 2015; PITOMBO, 2016; WOLFF et al., 2012).

1.3.3 Estrógenos

Os estrógenos são esteroides responsáveis pelo fenótipo feminino como aparência física, sexual e emocional. São produzidos principalmente pelas células da granulosa nos folículos ovarianos a partir dos andrógenos. O estradiol, tal como outros esteroides sexuais, é obtido a partir de colesterol (PITOMBO, 2016).

Na mulher, os osteoclastos apresentam receptores alfa ($ER\alpha$) para estrógenos, assim esses hormônios atuam diminuindo sua atividade de reabsorção. Os mecanismos de ação do estrógeno sobre o tecido ósseo não estão completamente elucidados, apesar de algumas vias de ação desse hormônio já serem conhecidas (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012).

O estrógeno atua sobre as células osteoprogenitoras levando à diminuição dos níveis de RANKL e ao aumento dos níveis de OPG. A OPG liga-se ao RANKL, que apresenta taxas reduzidas, e impede sua ligação com o RANK, inibindo desta forma, a fusão dos precursores de osteoclastos e conseqüentemente a formação de pré-osteoclastos e osteoclastos.

Segundo Faloni (2007) o estrógeno inibe proteases produzidas por osteoclastos, promovendo sua apoptose, reduzindo indiretamente a reabsorção óssea. Também atua sobre as células T promovendo diminuição dos níveis de $TNF-\alpha$ (*Tumor Necrosis Factor Alfa*) e conseqüentemente redução dos níveis de M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e RANKL. Desta forma, a fusão dos precursores de osteoclastos e a formação de pré-osteoclastos e osteoclastos também ficam diminuídas; assim como o estrógeno atua sobre os monócitos ocasionando redução dos níveis de $TNF-\alpha$ e IL-1. Como ambas as citocinas induzem a produção de IL-6, M-CSF e GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), a fusão dos precursores de osteoclastos e a conseqüente formação de pré-osteoclastos e osteoclastos são reduzidas (FALONI; CERRI, 2007).

1.4 SÍNDROME DO OVÁRIO POLICÍSTICO

A síndrome do ovário policístico (SOP) é uma das mais comuns endocrinopatias que atingem, com prevalência aproximada de 6% a 10%, mulheres em idade reprodutiva (DULEBA, 2012). É uma das mais frequentes causas de hiperandrogenismo e anovulação, com subseqüentes complicações sociais, psicológicas e econômicas (AZZIZ *et al.*, 2009). Está associada não somente a sequelas reprodutivas e estéticas, mas também a um significativo aumento de risco originário das disfunções metabólicas decorrentes, tais como a resistência à insulina (RI), com conseqüente hiperinsulinemia compensatória, dislipidemias, aumento do estresse oxidativo e

disfunção endotelial (GEORGOPOULOS *et al.*, 2009).

A RI e a hiperinsulinemia interferem diretamente na esteroidogênese ovariana, com aumento da produção de andrógenos (hiperandrogenismo), contribuindo com o quadro de anovulação crônica (KOGURE *et al.*, 2012). Somando-se a essas alterações, adicionam-se ovários policísticos, hipersecreção do hormônio luteinizante (LH), disfunções menstruais, hirsutismo e infertilidade (RESENDE *et al.*, 2010).

A SOP foi descrita pela primeira vez por Stein e Leventhal em 1935 e até hoje, devido à grande heterogeneidade clínica e laboratorial, seu diagnóstico constitui um desafio para clínicos e estudiosos do assunto. O termo síndrome tem origem grega e traduz uma associação de características (sinais, sintomas e fenômenos) que ocorrem juntas com frequência, sendo que a presença de uma delas mostra a necessidade de se pesquisar a presença de outras características, e ainda é desconhecida a razão pela qual elas ocorrem em conjunto. Consequentemente, nenhum critério isolado é suficiente para seu diagnóstico clínico, sendo, portanto, um diagnóstico de exclusão, ou seja, doenças que mimetizam seu fenótipo devem ser excluídas (MARCONDES; BARCELLOS; ROCHA, 2011).

Somente em 1990 foi elaborado o primeiro consenso com relação ao diagnóstico, estabelecendo uma definição clínica e prática para a SOP pelo *National Institutes of Health* - Consenso do NIH (DULEBA, 2012). De acordo com esse documento, a SOP seria consequente a um quadro de anovulação crônica hiperandrogênica, devendo ser definida pela presença de disfunção menstrual e excesso androgênico, podendo ser de ordem clínica (hiperandrogenismo) ou laboratorial (hiperandrogenemia) (MARCONDES; BARCELLOS; ROCHA, 2011). Posteriormente, dois outros Consensos foram elaborados, sendo um deles em 2003 pela *European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society of Reproductive Medicine* (Consenso de Rotterdam) e o outro em 2006 pela *The Androgen Excess and PCOS Society (AE-PCOS Society)*, onde foi estabelecido que a SOP pode apresentar até nove fenótipos diferentes, variando conforme a presença de hiperandrogenismo e disfunção ovariana, sendo que para auxiliar o diagnóstico e contemplar essa heterogeneidade, é necessária a presença de, pelo menos dois critérios: oligo e/ou anovulação ou ovários policísticos à ultrassonografia e evidências clínicas ou laboratoriais de excesso androgênico (MARCONDES; BARCELLOS; ROCHA, 2011).

A produção de andrógenos na mulher, decorre principalmente de células ovarianas (células da teca), tendo como precursor o colesterol e complexos enzimáticos específicos expressos nas células esteroidogênicas (KRISHNAN; MUTHUSAMI, 2017; RESENDE *et al.*, 2010). O hiperandrogenismo prevalente nessas mulheres contribui para a adiposidade visceral e pode

ampliar os fenótipos metabólicos adversos da SOP através do agravamento da deposição de gordura corporal, predominantemente abdominal, fato que tem sido observado independente da existência de obesidade (BARBER; FRANKS, 2013). Evidências clínicas das ações androgênicas sobre a massa óssea de mulheres com hirsutismo, doença do ovário policístico e tumores ovarianos secretores de andrógenos, demonstram aumento da densidade óssea entre outras alterações causadas pelo hiperandrogenismo característico dessa síndrome (CASTELO-BRANCO et al., 2003; ZBOROWSKI et al., 2000).

Existe alta prevalência de síndrome metabólica em mulheres com SOP, estimada entre 34% e 46%, segundo estudos realizados nos EUA, através do *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (BARBER; FRANKS, 2013). Além da gordura na região abdominal, os andrógenos promovem um intenso efeito fisiológico na composição corporal. Em longo prazo, essas disfunções podem evoluir para comorbidades tais como: diabetes do tipo 2, hipertensão arterial, aterosclerose, alterações cardio e cérebro vasculares e osteoporose (DULEBA, 2012).

Estima-se que 200 milhões de pessoas em todo o mundo sejam atingidas pela osteoporose, a mais importante doença musculoesquelética, não-artrítica, que afeta não somente os idosos, mas também as mulheres de meia-idade. No Brasil, a cada ano, 70 mil pessoas fraturam o colo do fêmur, sendo que pelo menos 20% morrem de complicações nos primeiros seis meses e metade nunca mais tem uma vida independente (AMADEI; PEREIRA; CARVALHO, 2006).

Atualmente, o aparecimento das alterações fisiológicas provocadas pelas desordens endócrinas observadas na SOP vem crescendo consideravelmente devido ao aumento da expectativa de vida da população (SINGULANI, 2014).

Uma vez que as comorbidades supracitadas interferem diretamente na qualidade de vida das mulheres, torna-se necessário o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos associados às alterações ósseas observadas em pacientes com SOP.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar as relações entre as alterações ovarianas e plasmáticas dos esteroides sexuais (progesterona e testosterona) observadas em ratas induzidas à SOP e o metabolismo ósseo *in vivo*, bem como as atividades celulares de osteoblastos *in vitro*.

2.2 ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- 1- Induzir a SOP em ratas Wistar adultas utilizando dose única de valerato de estradiol;
- 2- Quantificar e analisar as alterações plasmáticas de progesterona, testosterona e fosfatase alcalina nas fêmeas induzidas à SOP, bem como nas fêmeas controle;
- 3- Identificar e analisar a presença de possíveis alterações morfológicas ovarianas dos animais tratados, bem como dos grupos controle;
- 4- Analisar as alterações biofísicas (carga máxima, rigidez e ponto de fratura na carga máxima) e biométricas (volume ósseo, densidade óssea e densidade mineral) dos fêmures das ratas induzidas à SOP;
- 5- Obter células-tronco mesenquimais das medulas dos fêmures das ratas induzidas à SOP e diferenciá-las *in vitro* em osteoblastos;
- 6- Analisar a viabilidade celular e a mineralização dos osteoblastos cultivados até 21 dias;
- 7- Analisar e quantificar os níveis de fosfatase alcalina nos meios de cultura dos grupos estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.1.1 Animais

Foram utilizadas 29 ratas Wistar adultas (massa corporal média 204,2g +/- 11,04g) obtidas do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP. Os animais foram alojados em gaiolas padrão, divididos em grupos de 5 animais por gaiola, identificados individualmente nas caudas e mantidos no Biotério da Universidade de Araraquara, UNIARA, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e luminosidade (ciclos 12h x 12h). Água e ração foram oferecidas *ad libitum*.

3.1.2 Avaliação do ciclo estral e controle de massa corpórea

A verificação dos ciclos estrais foi realizada manualmente, com a coleta de lavado vaginal utilizando-se um conta gotas, inserido no início da vagina das ratas (não profundamente) onde foi injetado e aspirado um volume de aproximadamente 1,0 mL de solução salina 0,9%. Em seguida, uma gota do aspirado foi colocada em uma lâmina de vidro histológica, a qual foi examinada ao microscópico óptico, usando objetivas de 10x e 40x de aumento. Três tipos celulares foram reconhecidos: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos. Na observação do lavado vaginal, de acordo com o tipo celular predominante, pode-se determinar a fase do ciclo estral das ratas (pró-estro, estro, metaestro e diestro) (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

A verificação do ciclo estral teve a periodicidade de 3x/semana, durante 4 semanas antes do procedimento de indução hormonal à SOP (27/05/16 a 20/06/16), para checar a ocorrência de ciclos estrais normais e consecutivos. Foram utilizadas no experimento ratas que apresentaram quatro ciclos normais e consecutivos (BRAWER, 1986; MONTREZOR *et al.*, 2015). Após a indução, a verificação dos ciclos estrais continuou até a realização da eutanásia dos animais, conforme o tempo de duração dos grupos.

Foi verificada a medida da massa corpórea de todos os animais na ocasião de sua chegada ao Biotério da UNIARA, no dia da indução hormonal, semanalmente a partir do dia da indução e no final de cada etapa experimental (dias das eutanásias).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIARA, sob protocolo nº 018/2016, de 21 de março de 2016 e foram

realizados seguindo as normas vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.1.3 Indução da SOP

A indução para ovário policístico foi realizada com dose única de valerato de estradiol. O hormônio foi dissolvido em óleo mineral e administrado via intramuscular na dose de 2 mg/0,2 ml/rata. Os animais controle receberam injeção intramuscular de 0,2 ml de óleo mineral. Após a injeção hormonal, os animais foram divididos em 6 grupos (n=5): grupo 30 dias após indução (SOP 30); grupo 45 dias após indução (SOP 45) e grupo 60 dias após indução (SOP 60). Para cada grupo SOP houve um grupo controle: controle 30 dias (C 30), controle 45 dias (C 45) e controle 60 dias (C 60). Os tempos propostos após a indução relacionam-se ao tempo necessário para que seja instalada a SOP (BRAWER, 1986; PEREIRA *et al.*, 2014; MONTREZOR *et al.*, 2015).

3.1.4 Eutanásia

Ao final de cada período experimental (30, 45 e 60 dias), os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestésicos (Ketamina: 240 mg/Kg e Xilazina: 30mg/Kg) via intraperitoneal. O procedimento foi realizado no Biotério da Universidade de Araraquara, UNIARA.

3.1.5 Obtenção do plasma

Imediatamente após a eutanásia, foi coletado sangue por meio de punção cardíaca e/ou arco aórtico com seringas de 5 mL e agulhas 30x7, acondicionado em tubos a vácuo de 10 mL com heparina e mantidos em gelo. O sangue foi centrifugado (300 rpm x 20 minutos) para a separação do plasma que foi acondicionado em tubos do tipo *eppendorfs* e congelado a -20° C para posteriores análises de: P4, T e fosfatase alcalina.

3.1.6 Dosagens plasmáticas dos esteroides ovarianos e fosfatase alcalina

As dosagens plasmáticas de progesterona e testosterona foram realizadas com *kits* comerciais de radioimunoensaio (RIE) com duplo anticorpo. Os limites inferiores para as detecções de P4 e T foram 0,02 ng/mL e 5,0 ng/mL respectivamente. A variação do coeficientes intra-ensaios foram de 7,5% para a progesterona e 4% para a testosterona. As dosagens foram realizadas no Laboratório da Prof.^a Dr.^a Janete Aparecida Anselmo-Franci, na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As dosagens plasmáticas de fosfatase alcalina foram realizadas em analisador automático Cobas Integra 400 - Roche, por ensaio colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial, Roche, em conformidade com as recomendações do IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*), padronizado para determinação da fosfatase alcalina desde 1983, de acordo com o seguinte princípio: em presença dos íons magnésio e zinco, o p-nitrofenil fosfato é clivado pelas fosfatases em fosfato e em p-nitrofenol.



O p-nitrofenol liberado é diretamente proporcional à atividade catalítica da ALP, a qual é determinada pela medida do aumento da absorvância a 409 nm (IFCC, 1984).

3.1.7 Análise morfológica dos ovários

Após a eutanásia, foi realizada uma incisão na parede abdominal de todas as ratas para a coleta dos ovários. Os mesmos foram pesados e fixados em solução de formaldeído 4% (preparada a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, à temperatura ambiente por 24 horas.

Em seguida, os ovários foram lavados em água corrente por 2 horas, desidratados em graduações crescentes de álcool (70°, 80°, 90° e 100° GL), diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina.

Para análise morfológica em microscopia de luz, visando a comprovação da formação de cistos ovarianos, cortes histológicos de 4 micras de espessura foram obtidos e corados. As lâminas foram confeccionadas na Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara.

3.1.8 Índice Gonadossomático - IGS

Imediatamente antes da eutanásia foram mensuradas as massas corpóreas dos animais e posteriormente dos ovários, após a retirada e limpeza dos tecidos adjacentes dos mesmos. Os valores obtidos foram utilizados para a determinação do índice gonadossomático: [(massa dos ovários/massa corpórea) x100].

3.1.9 Análises da qualidade do tecido ósseo

Após as eutanásias, os fêmures direitos foram retirados, limpos (retirado o máximo possível de tecidos muscular e tendinoso), embalados em papel alumínio, identificados e mantidos sob refrigeração. Os fêmures foram utilizados para a determinação da densidade mineral óssea (DMO) e para o conteúdo mineral ósseo (CMO). A DMO do fêmur direito foi calculada usando o Princípio de Arquimedes, isto é, obtendo a medida da massa do osso no ar e medindo novamente a massa corpórea após submergir num volume específico de água destilada. A partir desses dois parâmetros, a densidade foi então calculada utilizando-se a fórmula:

$$D = (w1 / w1 - w2) \times P \text{ (1)}$$

Onde: D = densidade,

W = massa (w1 - massa no ar e w2 - massa na água)

P = densidade da água em determinada temperatura, expressa em g/cm³.

A composição de todo o fêmur direito foi determinada pelas diferentes pesagens do osso. Para essa análise, foi feita a consideração de que o mesmo é basicamente composto por três principais elementos: água, matriz orgânica e matriz mineral. Dessa forma, os fêmures passaram por um processo de retirada total do ar em seu interior, ficando 24 horas submersos em água destilada, sob vácuo. Em seguida, os fêmures foram pesados ao serem retirados da água, enquanto saturados com a água destilada (massa úmida - mw). Posteriormente, foram colocados em estufa a 100° C durante 24 horas para evaporação de toda água e, no dia seguinte, foram pesados novamente (massa seca - md). Finalmente, para obtenção da massa mineral, os fêmures foram

levados ao forno a 800° C (mufla), durante 48 horas, acondicionados em barcas de cerâmica, das quais foram feitas pesagem inicial, antes de serem colocadas no forno e pesagem final, após o resfriamento das mesmas. A diferença entre essas duas pesagens é a massa da matéria mineral (massa das cinzas - *ma*) (MUHAMMAD *et al.*, 2013).

O percentual de água, matéria orgânica e mineral foram calculados da seguinte forma:

$$\% \text{ água} = \% W = 100 (mw - md)/mw$$

$$\% \text{ orgânica} = \% O = 100 (md - ma)/mw$$

$$\% \text{ cinzas} = \% A = 100 ma/mw.$$

As propriedades biomecânicas dos fêmures das fêmeas foram avaliadas pelo ensaio de flexão em 3 pontos. A tensão de ruptura (N), a rigidez extrínseca (N/mm), a tenacidade (mJ) e a resiliência (mJ) foram analisadas por software e calculadas a partir da curva de carga/deflexão, registrados a parâmetros padronizados de célula de carga a 2000 N de capacidade a velocidade de 5 mm/min (MARTIN, 1990).

3.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

3.2.1 Obtenção das células-tronco mesenquimais do estroma da medula óssea

As células-tronco mesenquimais do estroma da medula óssea foram isoladas das ratas controle 30, 45 e 60 dias e dos grupos SOP 30, 45 e 60 dias, de acordo com o protocolo de Wang (WANG *et al.*, 2012a).

Após a eutanásia, o fêmur esquerdo das fêmeas de cada grupo experimental e controle foi exposto e removido com auxílio de bisturi, dissecado e transferido para um tubo Falcon contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com NaHCO₃, L-glutamina, 10% de soro fetal bovino, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os tubos foram levados para o fluxo laminar esterilizado previamente por 20 minutos com luz ultravioleta. Após limpeza final dos fêmures e retirada de todo resto de tecidos adjacentes, as epífises proximal e distal foram seccionadas em condições assépticas, com auxílio de um alicate cirúrgico. Segregados da medula óssea foram extraídos e suspensos em meio de cultura. Para tanto, a medula foi "lavada" (*flushing*) com o meio de cultura DMEM, com o auxílio de seringa (20 mL) e agulha (25x8) estéreis. A suspensão celular foi centrifugada (10.000 rpm por 4 minutos

a 4° C), o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 150 µL de meio.

As células obtidas dos animais controle foram acondicionadas em uma garrafa de cultura de 100 mL e as obtidas dos animais SOP em outra garrafa, sendo feito um “pool” de células nas garrafas de cada grupo. Inicialmente, as células foram semeadas em 15 mL de meio DMEM e as garrafas de cultura foram mantidas em estufa a 37° C, 5% CO₂ e 95% de ar atmosférico. O meio de cultura foi trocado após 48 horas, até que as células atingissem confluência de 70-80% (aproximadamente 3 dias de cultura). Depois de atingida a confluência, as células de cada garrafa foram transferidas para placas (controle e SOP) de cultura de 24 poços, na densidade de 30.000 células/mL/poço. Foram realizadas cultura das células, com amostras em triplicata, por 7, 14 e 21 dias.

3.2.2 Diferenciação das CTM em osteoblastos

A diferenciação das CTM em osteoblastos foi induzida com meio de diferenciação osteogênico (ácido ascórbico, β-glicerofosfato e dexametasona) (MANIATOPOULOS; SODEK; MELCHER, 1988), adicionado ao meio controle (DMEM). As células foram cultivadas em placas de 24 poços na densidade de 30.000 células/mL/poço em estufa (37° C, 5% CO₂ e 95% de ar atmosférico) em períodos experimentais de 7, 14 e 21 dias a partir da adição do meio osteogênico às células dos grupos controle e grupos SOP. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas e congelado a -20° C para análises posteriores de fosfatase alcalina e osteocalcina.

3.2.3 Análise indireta da viabilidade celular

Ao final de cada período de cultura (7, 14 e 21 dias), a viabilidade celular foi avaliada por meio de ensaio colorimétrico MTT, brometo de {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}, um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis.

Após a remoção do meio de cultura de cada poço e lavagem dos mesmos com PBS gelado, foi adicionado 100 µL de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço e as placas foram incubadas em estufa por 4 horas. Após esse período de incubação, foi adicionado 100 µL de solução de isopropanol ácido em cada poço e foi realizada homogeneização para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de cultura de 96 poços para medida colorimétrica em leitor de microplacas (570 nm). Os resultados da viabilidade indireta das células foram expressos em absorbância (MOSMANN, 1983).

3.2.4 Análise dos nódulos de mineralização

Ao final do 7º, 14º e 21º dias de cultura, os meios de cultura foram removidos dos poços e os mesmos foram lavados com PBS gelado e preenchidos com formaldeído a 10% (v/v) por 30 minutos. Posteriormente, os poços foram lavados com água deionizada e foi adicionado 1 mL da solução de vermelho de alizarina (*Alizarin Red*), que cora em vermelho áreas de mineralização ricas em Ca^{2+} . Após 30 minutos, os poços contendo a solução de alizarina foram lavados novamente com água deionizada e, após a secagem dos mesmos em temperatura ambiente, foram obtidas imagens de cada poço com sistema de câmera digital acoplado ao microscópio óptico de luz invertida.

A quantificação da mineralização foi realizada segundo o método descrito por Gregory (GREGORY *et al.*, 2004). Após a secagem dos poços, foi adicionado 450 μL da solução de ácido acético a 10% (v/v) a cada poço previamente corado com o vermelho de alizarina. As placas foram mantidas sob agitação por 30 min. Em seguida, foi adicionado 150 μL de NH_4OH a 10% em todos os poços. Posteriormente, 150 μL de cada poço foi transferido para poços de microplacas (196 poços) para medida colorimétrica em leitor de microplacas em comprimento de ondas de 405 nm. Os resultados foram expressos como mineralização biológica.

Foram realizadas dosagens de fosfatase alcalina do meio de cultura, a partir de amostra retirada ao final de cada período de cultura (7, 14 e 21 dias), de cada um dos grupos estudados, ficando portanto, 3 amostras por grupo, num total de 18 amostras.

As dosagens de fosfatase alcalina no meio de cultura foram também realizadas em analisador automático Cobas Integra 400 - Roche, por ensaio colorimétrico, utilizando-se *kit* comercial, Roche e seguindo os mesmos padrões descritos nas dosagens plasmáticas.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Minitab (Minitab Statistical Software, U.S.A), por meio de teste paramétrico ou não paramétrico, para dados independentes e mais de duas amostras, seguindo modelo ANOVA. Para os testes de igualdade das médias nos modelos ANOVA realizados foram feitos usando testes paramétricos (distribuição F de Snedecor). A normalidade e a variância constante foram verificadas a partir de gráficos dos resíduos para todos os casos. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%, exceto para as dosagens de fosfatase alcalina, que foi de 10%.

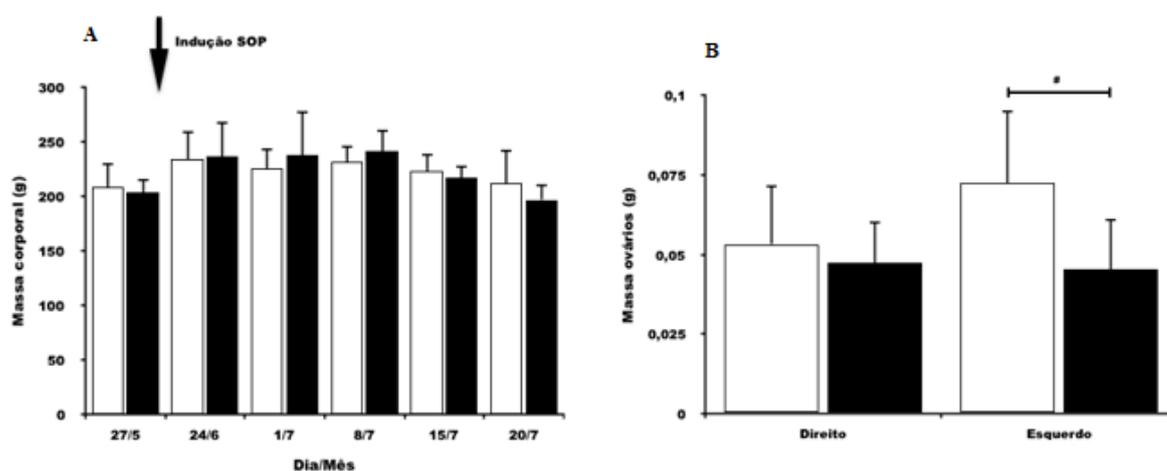
4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.1.1 Análise das massas corpóreas e dos ovários

4.1.2 Grupo 30 dias

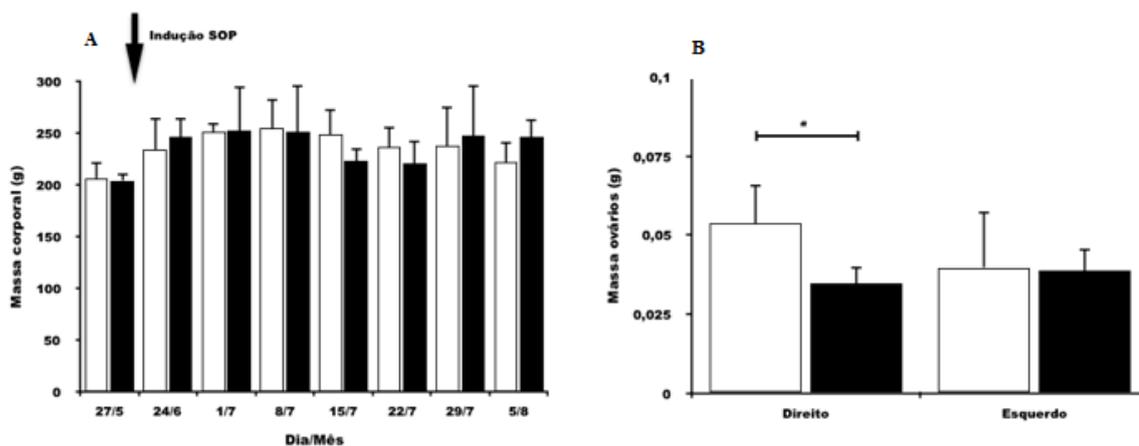
Figura 1 – Variação média da massa corporal em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 30 dias (barras pretas) (A). Variação média da massa dos ovários direito e esquerdo em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 30 dias (barras negras) (B). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença para ovário esquerdo entre ratas controle e ratas SOP 30 dias. $p < 0,05$.



Na análise da figura 1A observa-se que, para os animais do grupo 30 dias, não houve diferença significativa de massa corporal entre os grupos SOP e controle, como também não houve diferença significativa dentro dos grupos controle e SOP. Na análise da variação média de massa dos ovários direito e esquerdo (figura 1B), observa-se diferença estatística entre os grupos SOP e controle para a massa dos ovários esquerdos, onde a massa média do grupo controle foi maior que o massa média do grupo SOP. Não houve variações das massas ovarianas entre o grupo controle nem entre o grupo SOP 30 dias.

Grupo 45 dias

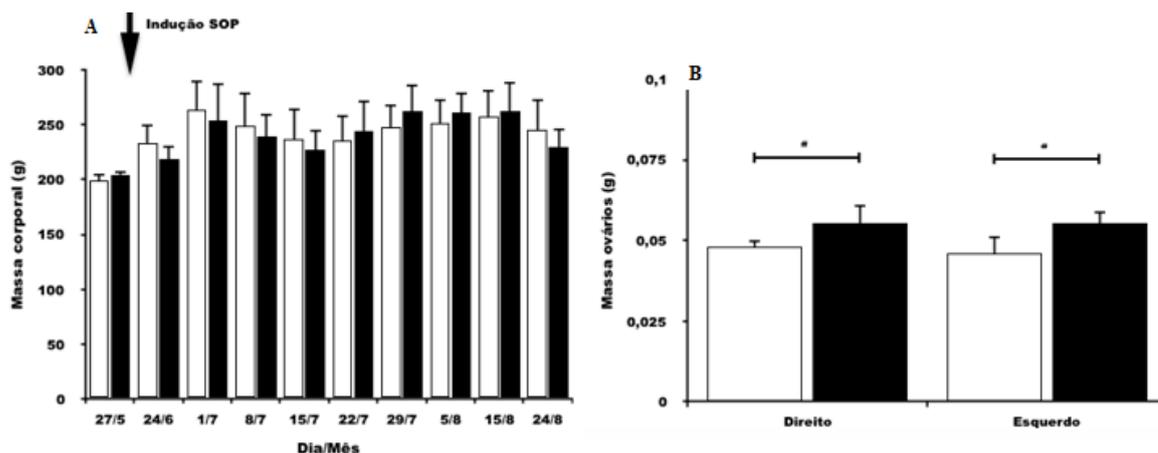
Figura 2 – Variação média da massa corporal em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 45 dias (barras pretas) (A). Variação média da massa dos ovários direito e esquerdo em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 45 dias (barras negras) (B). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença para ovário direito entre ratas controle e ratas SOP 45 dias. $p < 0,05$.



Na figura 2A observa-se que a variação média da massa corporal no grupo 45 dias não apresentou diferença significativa entre os grupos SOP e controle, como também não houve diferença significativa no grupo controle e no grupo SOP. Na análise da variação média de massa dos ovários direito e esquerdo (Fig. 2B) observa-se diferença estatística entre os grupos controle e SOP para o ovário direito, onde a massa média do grupo controle foi maior que a massa média do grupo SOP. Não houve diferença significativa entre o grupo SOP nem entre o grupo controle.

Grupo 60 dias

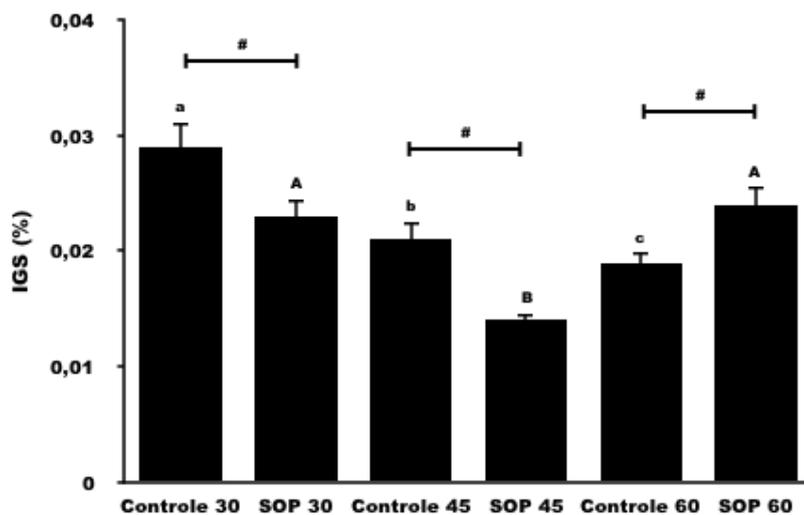
Figura 3 – Variação média da massa corporal em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 60 dias (barras pretas) (A). Variação média da massa dos ovários direito e esquerdo em gramas (g) das ratas controle (barras brancas) e das ratas SOP 60 dias (barras negras) (B). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença para ovários direito e esquerdo entre ratas controle e ratas SOP 60 dias. $p < 0,05$.



Na figura 3A observa-se que a variação média da massa corporal no grupo 45 dias não apresentou diferença significativa entre os grupos SOP e controle, como também não houve diferença significativa no grupo controle e nem no grupo SOP. Na análise da variação média de massa dos ovários direito e esquerdo (Fig.3B) observa-se que o grupo SOP apresentou maior massa dos ovários, tanto do direito quanto do esquerdo, comparado com o grupo controle. Não houve diferença significativa entre o grupo SOP e nem entre o grupo controle.

4.1.3 Índice Gonadossomático (IGS)

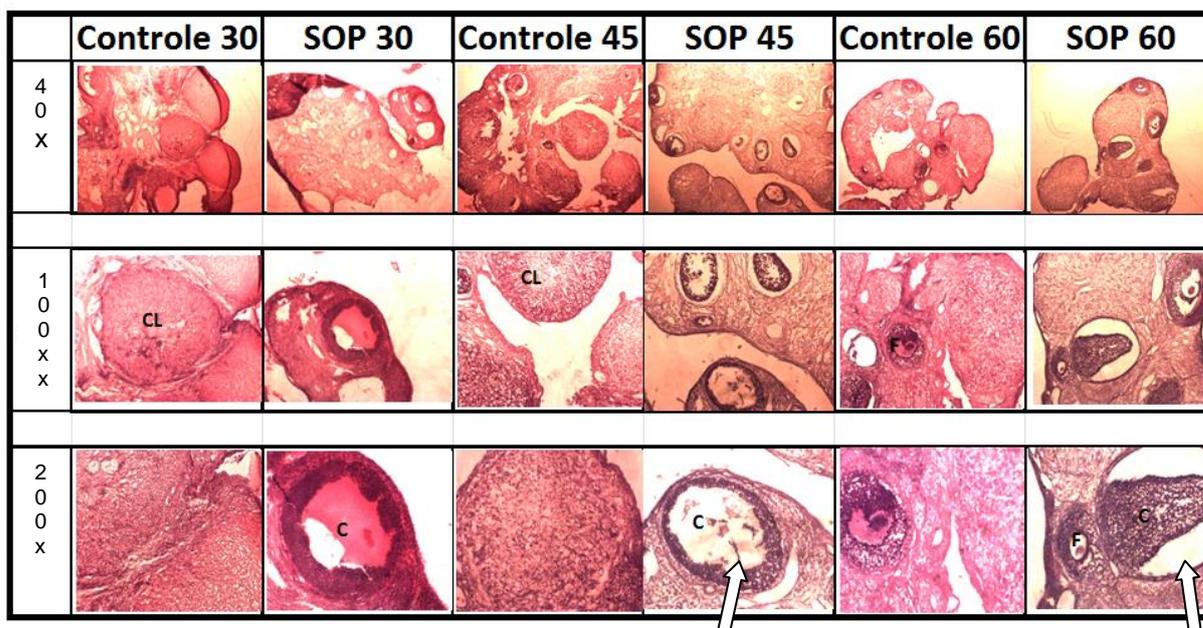
Figura 4– Variação média do índice gonadossomático (IGS) em porcentagem (%) das ratas controle e das ratas SOP 30 dias, SOP 45 dias e SOP 60 dias. Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre ratas controle e ratas SOP. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos controle. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos SOP. $p < 0,05$.



Na análise da figura 4 observa-se que o IGS foi maior para o grupo controle em relação ao grupo SOP 30 dias; foi maior para o grupo controle em relação ao grupo SOP 45 dias e foi maior para o grupo SOP 60 dias em relação ao seu controle. Quando comparado entre os grupos, o grupo controle 30 dias foi maior que o controle 45 dias e ambos foram maiores que o grupo controle 60 dias. Em relação aos grupos SOP, observa-se que o grupo SOP 45 dias apresentou menor IGS comparado aos grupos SOP 30 e SOP 60 dias.

4.1.4 Microscopia de luz: análise morfológica dos ovários

Figura 5 – Fotomicrografias dos cortes histológicos representativos dos ovários nos diferentes grupos, visualizadas em microscópio de luz, com aumento de 4x, 10x e 20x. **CL**= Corpo lúteo, **C**= cistos, **F**= folículos normais.

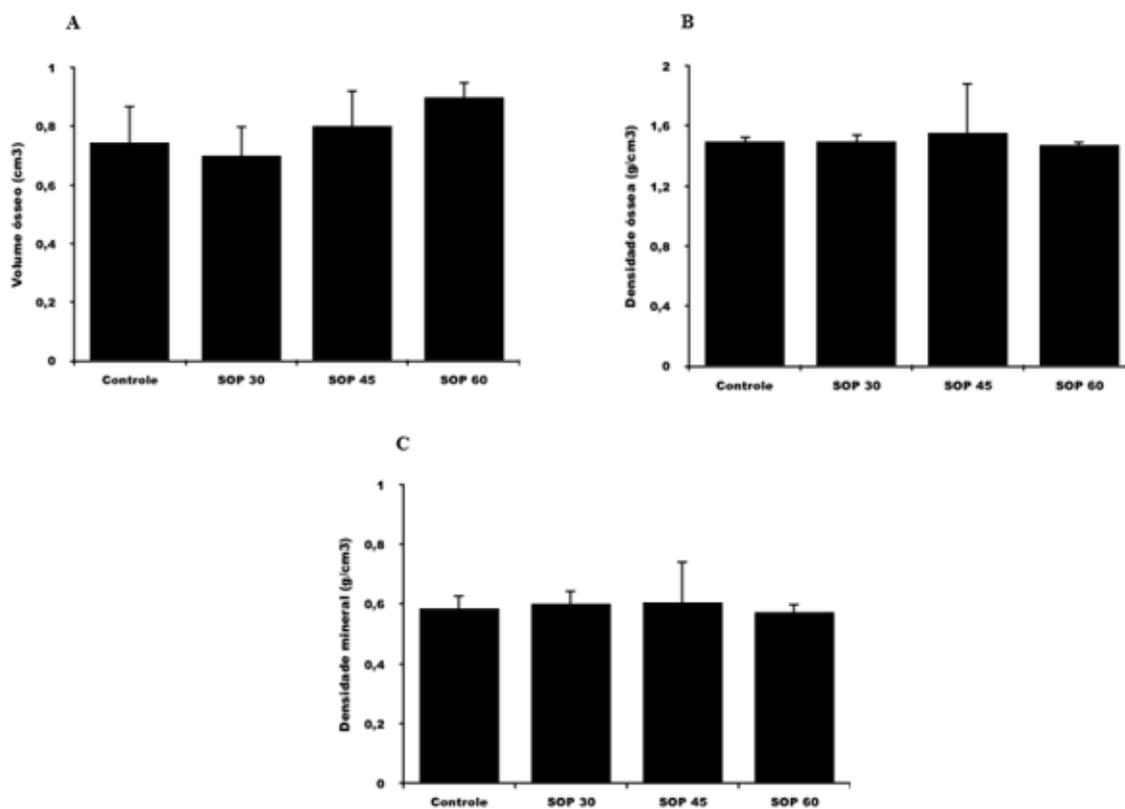


Na análise dos cortes histológicos dos ovários, conforme mostra a figura 5, observa-se a presença de corpos lúteos e folículos normais nos grupos controle e no grupo SOP 60 dias, bem como a presença de cistos nos grupos SOP, em maior número no grupo SOP 45 dias, seguido do grupo SOP 60 dias. As setas brancas indicam um aglomerado de células da granulosa em processo degenerativo no antro do folículo em um ovário pós-tratamento.

4.1.5 Ensaios biomecânicos

Varição média dos dados biofísicos dos fêmures das ratas

Figura 6 – Varição média dos dados biométricos dos fêmures das ratas controle, SOP 30 dias, SOP 45 dias e SOP 60 dias. Volume ósseo, em centímetro cúbico (cm^3) (A). Densidade óssea, em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3) (B). Densidade mineral, em gramas por centímetro cúbico (g/cm^3) (C). Os resultados são apresentados em média \pm DPM.

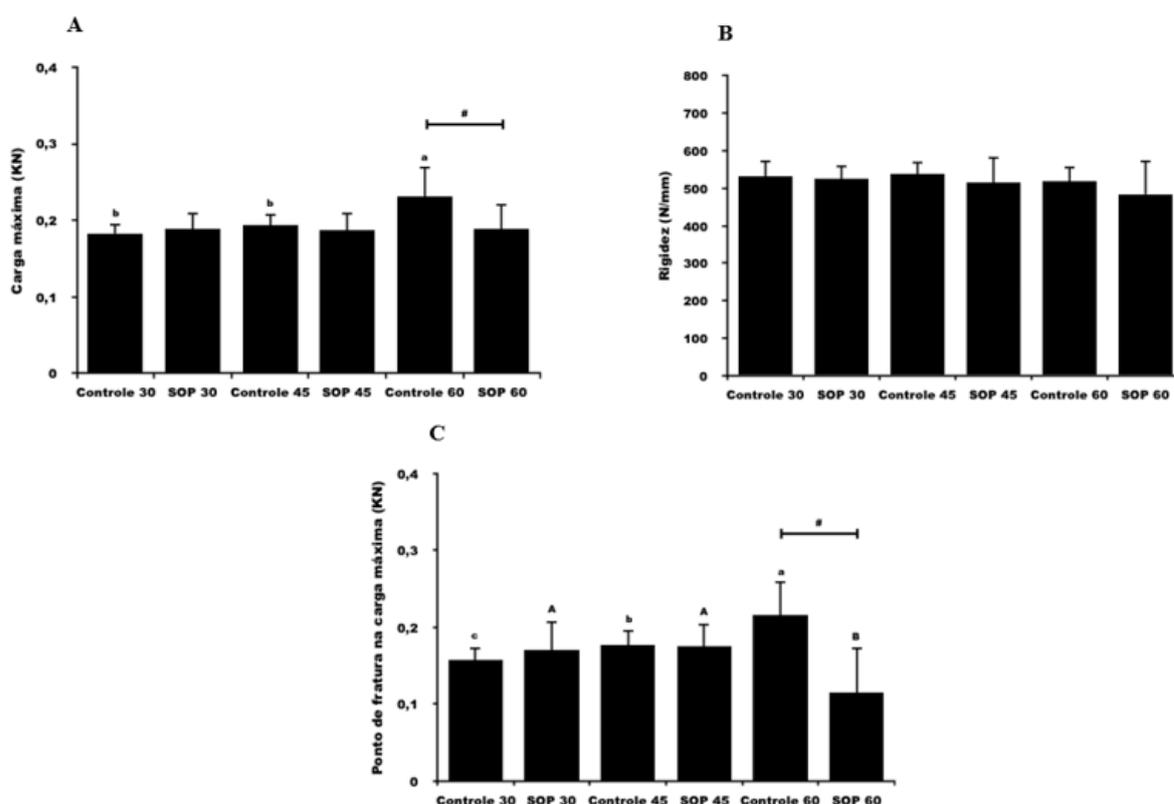


Na análise da figura 6, onde foram avaliados os dados biofísicos dos fêmures: volume ósseo (Fig. 6A), densidade óssea (Fig. 6B) e densidade mineral (Fig. 6C) dos grupos controle e SOP, não foram observadas diferenças significativas entre os valores obtidos referentes aos dados analisados.

4.1.6 Dados Biofísicos

Varição média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas

Figura 7 – Varição média dos dados biomecânicos dos fêmures das ratas controle, SOP 30 dias, SOP 45 dias e SOP 60 dias. Carga máxima, em Kilonewton (KN) (A). Rigidez, em Newton por milímetro (N/mm) (B). Ponto de fratura na carga máxima, em Kilonewton (KN) (C). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre ratas controle e ratas SOP 60 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos controle. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos SOP. $p < 0,05$.



Na figura 7 observa-se a variação média dos dados biofísicos obtidos na análise dos fêmures das ratas. Observa-se diferença significativa na análise de carga máxima (Fig. 7A) entre os grupos controle. O grupo controle 60 dias apresentou maior carga máxima comparado aos demais grupos controle (30 dias e 45 dias), que não diferiram entre si. Não se observa diferença entre os grupos SOP. Houve diferença significativa entre o grupo SOP 60 dias e seu grupo controle, sendo que o controle 60 apresentou valor de carga máxima maior que o grupo SOP.

Os resultados para a análise da rigidez dos fêmures são apresentados na figura 7B. Não se observou diferença significativa entre os grupos analisados.

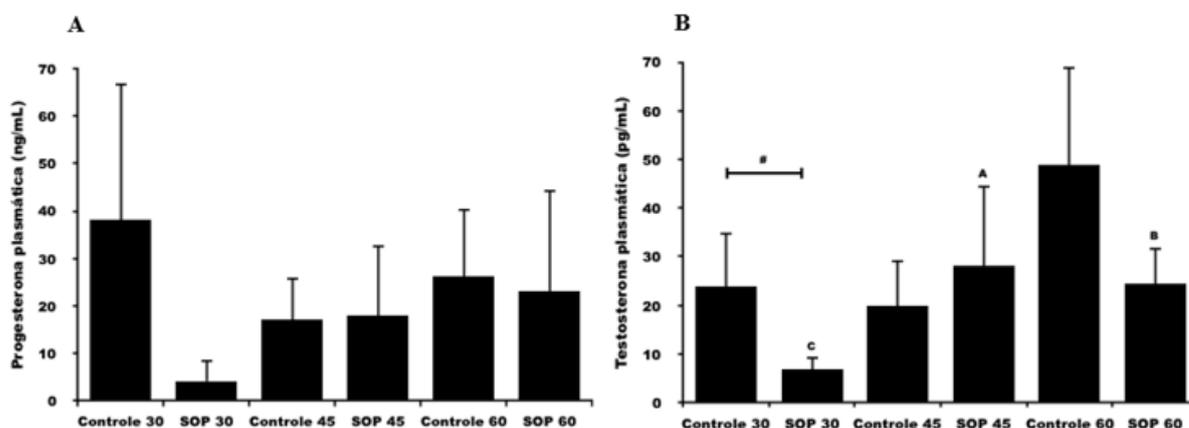
Para os resultados da análise do ponto de fratura na carga máxima (Fig. 7C), observa-se diferença significativa entre os grupos controle, onde o grupo controle 60 foi maior que o grupo controle 45 e ambos foram maiores que o grupo controle 30 dias. Também se observa diferença

entre os grupos SOP, sendo que o grupo SOP 60 apresentou menor índice no ponto de fratura comparado aos grupos SOP 30 e SOP 45 dias, sendo que entre esses não há diferença. No grupo 60 dias, observa-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo SOP, sendo o grupo controle maior que o grupo SOP.

4.1.7 Esteroides ovarianos

Variação média das concentrações plasmáticas de progesterona e testosterona

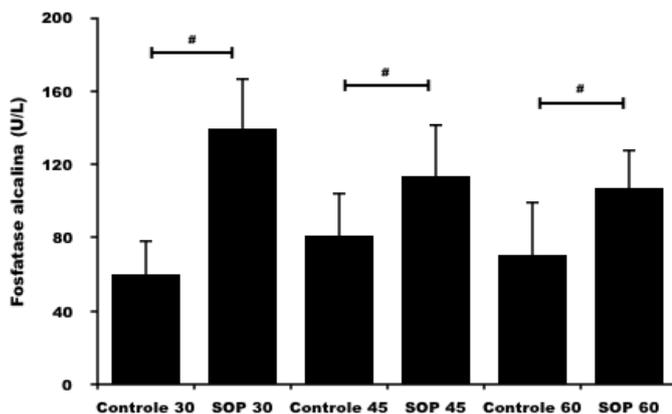
Figura 8 – Variação média das concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) (A) e testosterona (pg/mL) (B) para as ratas dos grupos controle 30, controle 45 dias, controle 60 dias, e grupos SOP 30 dias, SOP 45 dias e SOP 60 dias. Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre ratas controle e ratas SOP. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos SOP. $p < 0,05$.



Os resultados para as variações plasmáticas dos esteroides ovarianos são apresentados na figura 8. Não foram observadas diferenças significativas entre as variações plasmáticas de progesterona para os grupos avaliados (Fig. 8A). Os resultados para as variações plasmáticas de testosterona são apresentados na figura 8B. Observa-se diferença entre os grupos controle 30 dias e SOP 30 dias, onde nota-se maior concentração plasmática para o grupo controle. Observa-se que entre os grupos SOP, há maior concentração plasmática de T para o grupo 45 dias, seguida pelo grupo 60 dias e ambos são maiores que o grupo 30 dias. Não há diferença significativa entre os grupos controle.

4.1.8 Fosfatase alcalina

Figura 9 – Comparação da variação média das concentrações plasmáticas de fosfatase alcalina entre os grupos controle e grupos SOP (30, 45 e 60 dias). Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre grupo controle e grupo SOP. $p < 0,10$.

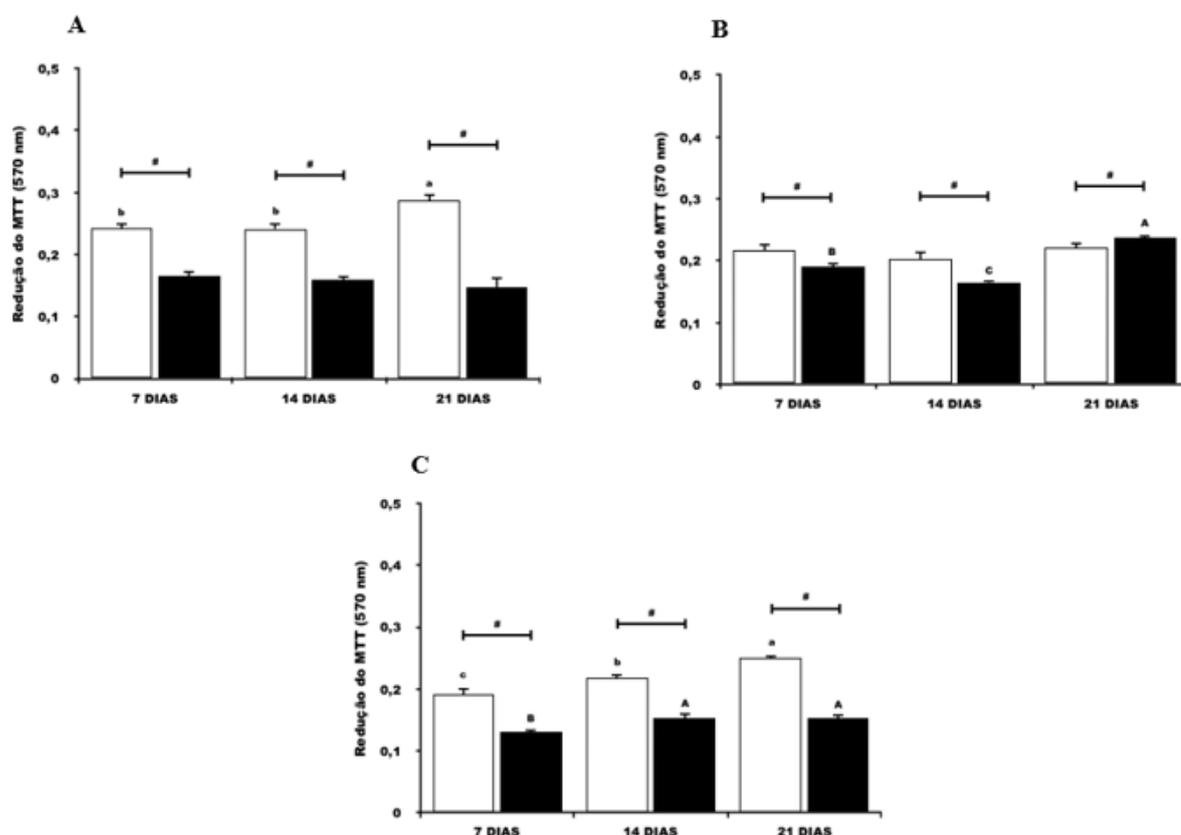


Os resultados para as variações plasmáticas de fosfatase alcalina são apresentados na figura 9. Observa-se diferenças entre as variações plasmáticas de fosfatase alcalina entre os grupos controle e os seus respectivos grupos SOP, sendo as maiores concentrações observadas nos grupos SOP. Não há diferenças significativas entre os grupos controle nem entre os grupos SOP.

4.2 EXPERIMENTOS IN VITRO

4.2.1 Análise da viabilidade celular dos osteoblastos

Figura 10 – Variação média da viabilidade de osteoblastos por redução do brometo de {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}(MTT), em comprimento de onda de 570 nanômetros. As células foram cultivadas por 7 dias, 14 dias e 21 dias. Grupo SOP 30 dias (A). Grupo SOP 45 dias (B). Grupo SOP 60 dias (C). Barras brancas representam os grupos controle e as barras pretas representam os grupos SOP. Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre ratos controle e ratos SOP. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos controle. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos SOP. $p < 0,05$.



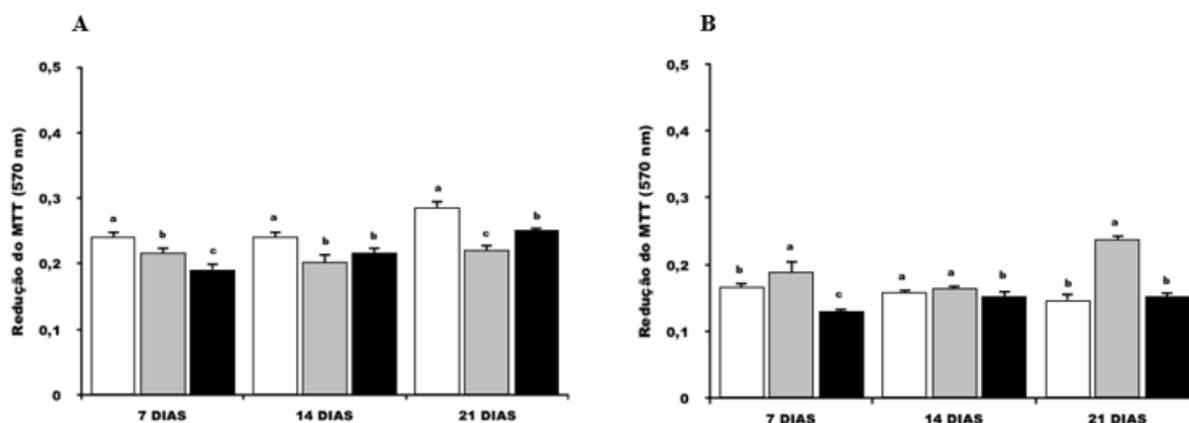
Na figura 10 observa-se a variação média da viabilidade celular pela redução do MTT ao longo de 7, 14 e 21 dias de cultura de células. Observa-se para o grupo 30 dias (Fig. 10A) que, para todos os tempos de cultura, houve diferença significativa entre os grupos controle e seus respectivos grupos SOP, sendo a maior viabilidade para os grupos controle. Comparando-se entre os grupos controle, observa-se que com 21 dias de cultura houve maior viabilidade celular em relação às culturas de 7 e 14 dias, que não diferiram entre si. Entre os grupos SOP não houve diferença estatística. Os resultados para o grupo 45 dias estão apresentados na Fig. 10B. Nota-se que, para todos os tempos de cultura, houve diferença significativa entre os grupos controle e seus respectivos grupos SOP. Na cultura de 21 dias, a viabilidade do grupo SOP foi maior que seu grupo controle. Para as culturas de 7 dias e 14 dias, observa-se maior viabilidade para os grupos

controle comparada aos seus respectivos grupos SOP. Não se observa diferença significativa entre os grupos controle. Entre os grupos SOP, nota-se maior viabilidade celular para a cultura de 21 dias, seguida da cultura de 7 dias e ambas são maiores que a cultura de 14 dias.

Os resultados para o grupo 60 dias estão apresentados na figura 10C. Nota-se que, para todos os tempos (7, 14 e 21 dias) de cultura, houve diferença significativa entre os grupos controle e seus respectivos grupos SOP, sendo observada maior viabilidade para os grupos controle. Quando comparado entre os grupos controle, nota-se maior viabilidade celular para cultura de 21 dias, seguida da cultura de 14 dias, sendo ambas maiores que a cultura de 7 dias. Entre os grupos SOP, nota-se que as culturas de 14 e 21 dias apresentaram maior viabilidade comparadas à cultura de 7 dias.

Comparação da viabilidade celular entre os grupos controle e SOP

Figura 11 – Comparação da variação média da viabilidade de osteoblastos por redução do brometo de {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}(MTT), em comprimento de onda de 570 nanômetros, entre os grupos controle (A) e os grupos SOP (B). As células foram cultivadas por 7 dias, 14 dias e 21 dias. Barras brancas representam os grupos 30 dias, as barras cinza representam os grupos 45 dias e as barras pretas representam os grupos 60 dias. Os resultados são apresentados em média \pm DPM. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos dentro do tempo de cultura. $p < 0,05$.



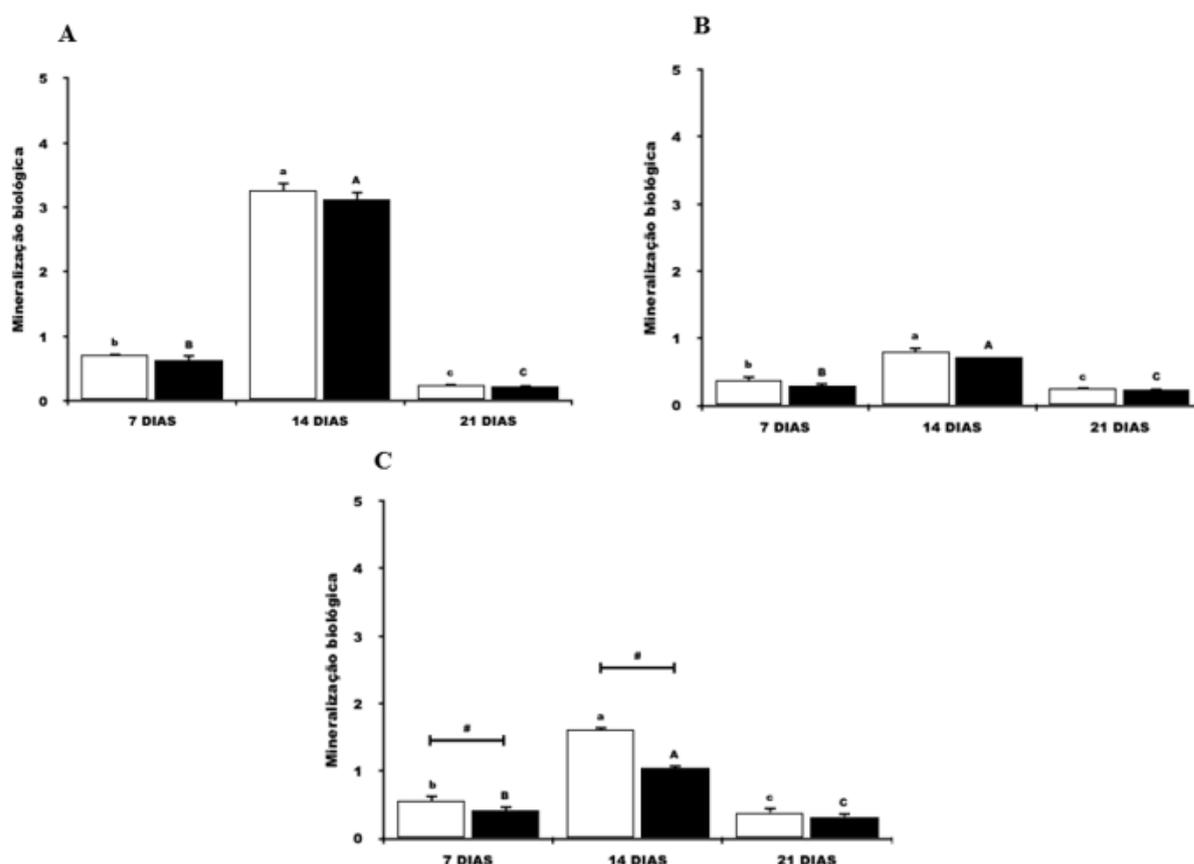
Na figura 11 apresentam-se os resultados das comparações da viabilidade celular entre os grupos controle e entre os grupos SOP dentro dos tempos de cultura (7 dias, 14 dias e 21 dias). Para as comparações entre os grupos controle (Fig. 11A), observa-se que para a cultura de 7 dias, o grupo 30 dias apresenta a maior viabilidade celular, seguido do grupo 45 dias e ambos são maiores que o grupo 60 dias. Para o tempo de cultura de 14 dias, o grupo 30 dias apresenta maior viabilidade comparado aos grupos 45 e 60 dias, que não diferem entre si. Para o tempo de cultura de 21 dias, o grupo 30 dias apresenta maior viabilidade, seguido do grupo 60 dias, sendo ambos

maiores que o grupo 45 dias. Comparando-se entre os grupos SOP (Fig. 11B), observa-se para o tempo de cultura de 7 dias que o grupo 45 dias apresenta maior viabilidade celular, seguido do grupo 30 dias, sendo ambos maiores que o grupo 60 dias. Para o tempo de cultura de 14 dias, observa-se o grupo 60 dias apresenta menor viabilidade comparado aos grupos 30 e 45 dias, que não diferem entre si. E, finalmente, para o tempo de cultura de 21 dias, o grupo 45 dias apresenta maior viabilidade comparado aos demais grupos, que não diferem entre si.

4.2.2 Análise da mineralização biológica dos osteoblastos

Varição média da mineralização biológica de osteoblastos

Figura 12 – Varição média da mineralização biológica de osteoblastos cultivados por 7 dias, 14 dias e 21 dias. Grupo SOP 30 dias (A). Grupo SOP 45 dias (B). Grupo SOP 60 dias (C). Barras brancas representam os grupos controle e as barras pretas representam os grupos SOP. Os resultados são apresentados em média \pm DPM. # indica diferença entre ratos controle e ratos SOP. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos controle. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos SOP. $p < 0,05$.



Os resultados sobre a mineralização biológica das células mantidas em cultura são apresentados na figura 12. Observa-se que para o grupo 30 dias (Fig. 12A), tanto as células dos grupos controle quanto as células dos grupos SOP apresentam respostas semelhantes. As células

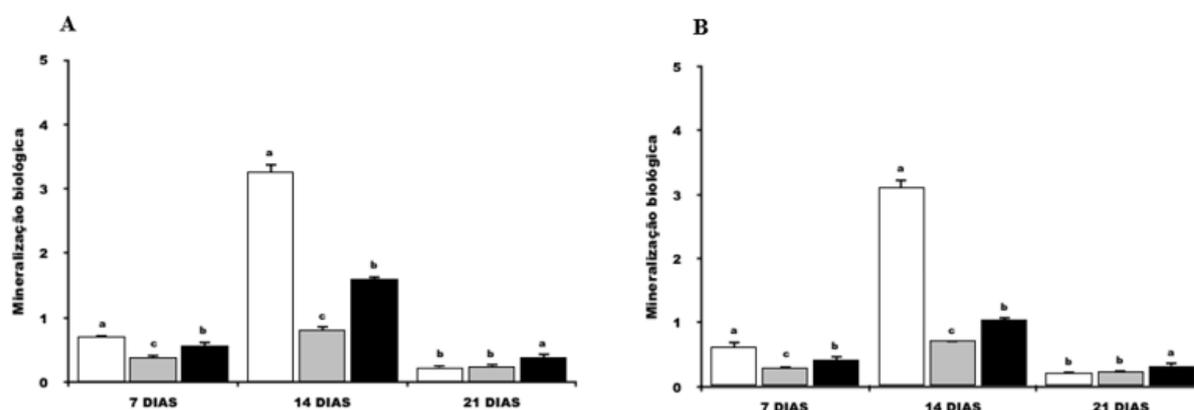
mantidas por 14 dias em cultura apresentam maior mineralização, seguidas do grupo 7 dias de cultura e ambos os grupos com maiores mineralizações comparados ao grupo 21 dias de cultura. Não há diferença significativa entre os grupos controle e SOP para nenhum dos dias de cultura estudados.

A mineralização biológica para os grupos controle e SOP 45 dias está representada na figura 12B. As respostas de mineralização foram semelhantes entre os grupos controle e SOP. Para ambos os grupos, observa-se maior mineralização para as culturas de 14 dias, seguidas das culturas de 7 dias, sendo ambas maiores que as culturas de 21 dias. Não há diferenças significativas entre os grupos controle e SOP para os tempos de cultura analisados.

Nota-se na figura 12C os resultados da mineralização biológica para os grupos controle e SOP 60 dias. Para as culturas celulares mantidas por 14 dias, para ambos os grupos (controle e SOP) observa-se as maiores mineralizações, seguidas do tempo 7 dias e ambos os tempos de cultura são maiores em relação ao tempo 21 dias. Quando se compara entre os grupos controle e SOP 60 dias, observa-se que para as culturas celulares de 7 dias e de 14 dias, os grupos controle têm maiores mineralizações comparados aos grupos SOP.

Comparação da mineralização biológica entre os grupos controle e os grupos SOP

Figura 13 – Comparação da variação média da mineralização biológica de osteoblastos cultivados por 7 dias, 14 dias e 21 dias. Grupos controle (A) e grupos SOP (B). Barras brancas representam os grupos 30 dias, as barras cinza representam os grupos 45 dias e as barras pretas representam os grupos 60 dias. Os resultados são apresentados em média \pm DPM. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos dentro do tempo de cultura. $p < 0,05$.

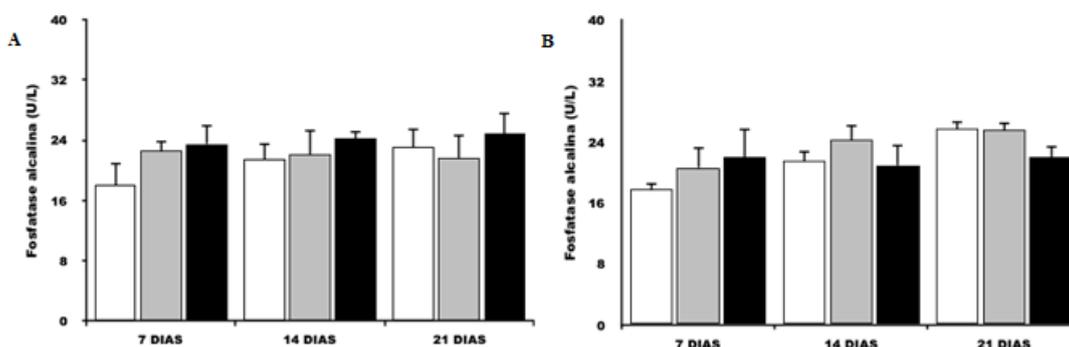


Os resultados das comparações das mineralizações biológicas entre os grupos controle e entre os grupos SOP para os tempos de cultura 7, 14 e 21 dias estão na figura 13. Observam-se para os grupos controle (Fig. 13A), no tempo de cultura 7 dias, que as células do grupo 30 dias têm maior mineralização, seguida do grupo 60 dias e ambas são maiores que o grupo 45 dias. Para as células mantidas em cultura por 14 dias, observa-se que o grupo 30 dias mostra maior mineralização, seguido do grupo 60 dias e ambos são maiores que o grupo 45 dias. Para as células cultivadas por

21 dias, observa-se que o grupo 60 dias apresenta maior mineralização comparado aos grupos 30 dias e 45 dias, que não diferem entre si. Para os grupos SOP (Fig. 13B), o grupo 30 dias mostra maior mineralização na cultura de 7 dias, seguido do grupo 60 dias, sendo ambos maiores que o grupo 45 dias. Mineralização com padrão semelhante observa-se para as células cultivadas por 14 dias. O grupo controle mostra maior mineralização, seguido do grupo 60 dias e ambos são maiores que o grupo 45 dias. Finalmente, para as células cultivadas por 21 dias, observa-se que o grupo 60 dias mostra maior mineralização, comparado aos demais grupos (30 e 45 dias) que não diferem entre si.

Comparação da variação média da fosfatase alcalina no meio de cultura de osteoblastos

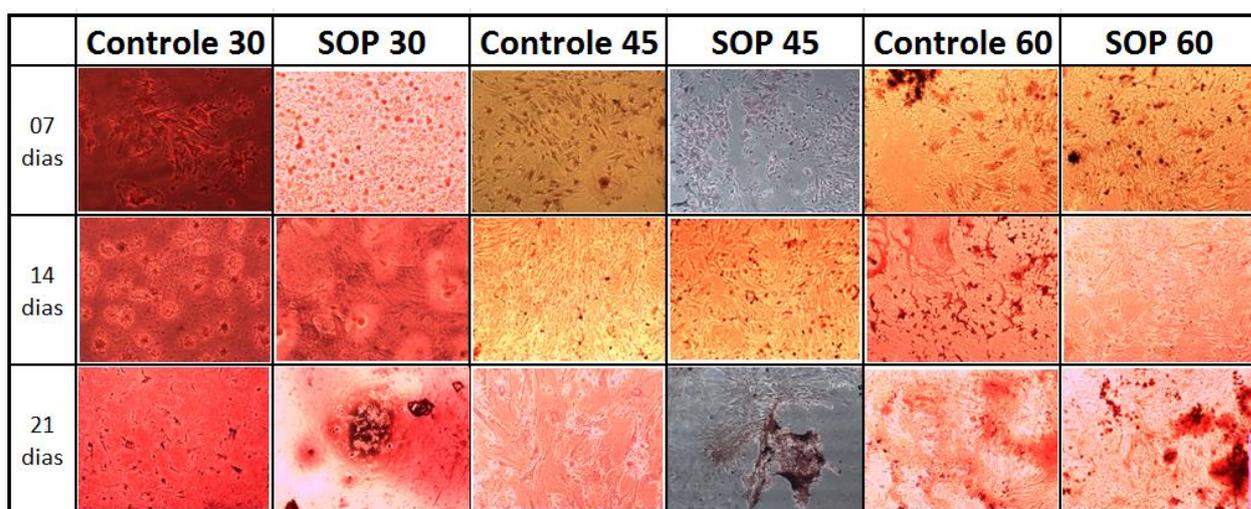
Figura 14 – Comparação da variação média da fosfatase alcalina no meio de cultura de osteoblastos cultivados por 7 dias, 14 dias e 21 dias. Grupos controle (A) e grupos SOP (B). Barras brancas representam os grupos 30 dias, as barras cinza representam os grupos 45 dias e as barras pretas representam os grupos 60 dias. Os resultados são apresentados em média \pm DPM.



Na figura 14 estão representados os resultados da comparação da variação média da concentração de fosfatase alcalina no meio de cultura de osteoblastos, nos tempos de 7, 14 e 21 dias. Observa-se que não há diferenças significativas entre as concentrações de fosfatase alcalina entre os grupos controle e os seus respectivos grupos SOP, em todos os tempos de cultura; como também não há diferenças significativas entre os grupos controle nem entre os grupos SOP.

Imagem das células ósseas dos grupos controle e SOP nos tempos de cultura, após coloração com Alizarina

Figura 15 – Fotomicrografias das células ósseas dos grupos controle (30, 45 e 60 dias) e SOP (30, 45 e 60 dias) após coloração com vermelho de Alizarina (*Alizarin red*) nos diferentes tempos de cultura (7, 14 e 21 dias), colhidas em microscópio óptico com aumento de 100x.



Fonte :próprio autor

As fotomicrografias das células ósseas, nos vários tempos de cultura (7, 14 e 21 dias), após coloração com vermelho de Alizarina são mostradas na figura 14, visualizadas em microscópio de luz com aumento de 100 x. Observa-se que para os grupos 30, 45 e 60 dias, tanto as células dos grupos controle quanto as células dos grupos SOP apresentam respostas de coloração semelhantes nos tempos 7 e 14 dias de cultura. As células mantidas por 21 dias em cultura apresentam maior coloração nos grupos SOP, quando comparadas aos respectivos controles.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi realizado o controle dos ciclos estrais das ratas com a determinação das suas fases e, de acordo com os tipos celulares encontrados (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002) pode-se concluir que houve alterações dos ciclos das ratas tratadas com VE. Houve anestro e, provavelmente, anovulação, o que é um dos critérios para que se possa confirmar que houve indução da SOP.

Após a administração do VE (grupo SOP) houve mudança na dinâmica dos ciclos estrais dos animais: 2 dias após a indução, de acordo com as observações dos lavados vaginais, 80% dos animais estavam em estro (presença predominante de células corneificadas) e 20% na transição proestro-estro (presença de células epiteliais e corneificadas). No 4º dia, as fêmeas estavam em metaestro (presença de leucócitos, células epiteliais e células corneificadas na mesma proporção) e se mantiveram assim por 10 dias. Após esse período, voltaram a apresentar mudança nos ciclos, porém de forma irregular. Os grupos controle continuavam ciclando regularmente. Esse padrão irregular dos ciclos estrais é um indicativo da instalação da SOP (BRAWER, 1986). Além disso, as lâminas histológicas dos ovários comprovaram a presença dos cistos nas ratas induzidas à SOP.

Tem sido descrito na literatura alterações ovarianas em ratas induzidas à SOP por VE, principalmente, redução no tamanho dos ovários (SHI e VINE, 2012). Os dados do presente estudo corroboram com a literatura. Observaram-se alterações nas massas dos ovários das ratas dos grupos controle e SOP, ora com diminuição, ora com aumento nos grupos SOP. Outro fator importante que relaciona a massa dos ovários com a massa corporal é o IGS. Nossos dados demonstram que houve alterações significativas dos IGS entre os grupos controle e SOP. Observou-se que o IGS foi maior para os grupos controle em relação aos grupos SOP 30 dias e SOP 45 dias. O IGS do grupo SOP 60 dias é maior que seu respectivo grupo controle. Desta forma, pode-se sugerir que as alterações metabólicas, principalmente de massa corporal em relação às massas ovarianas, indicam diminuição da atividade ovariana durante a maior parte dos períodos experimentais. O grupo SOP 60 dias apresentou aumento nesta relação, por aumento das massas de ambos os ovários, o que pode sugerir retomada das atividades ovarianas após 60 dias da indução. Segundo Shi e Vine (2012), a indução do ovário policístico com o valerato de estradiol mantém-se, em média, por 8 semanas. Tais alterações metabólicas induzidas pela SOP podem sugerir que as funções ovarianas estão comprometidas, pois apresentaram alterações das massas ovarianas, comprovadas pela presença de cistos ovarianos e pelo menor número de corpos lúteos. Além disso, disfunções ovarianas comprometem a esteroidogênese folicular e, conseqüentemente, atividades ósseas dependentes dos esteroides ovarianos.

Vários modelos de estudo têm sido utilizados para indução aguda de SOP em ratas por meio de injeções diárias ou implantes subcutâneos de hormônios, tais como dihidroepiandrosterona (DHEA), propionato de testosterona (PT), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) e antiprogesterona (RU486). As concentrações plasmáticas de esteroides ovarianos observadas nesses modelos variam de acordo com o hormônio utilizado para a indução. Na indução com DHEA, PT e RU486, as concentrações plasmáticas de T e LH são aumentadas e as concentrações plasmáticas de P4 diminuem no modelo de indução com PT. Na indução com DHT, os níveis plasmáticos de T não se alteram e os de P4 estão diminuídos, indicando anovulação (SHI; VINE, 2012). O valerato de estradiol (VE) é um estrógeno de ação prolongada e sua administração tem efeito no eixo hipotálamo-hipófise, resultando em liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que por sua vez vai aumentar a liberação de LH, que é considerado um fator chave no desenvolvimento da SOP (SHI; VINE, 2012). Uma dose única de VE (2 mg/0,2 ml/rata) em uma fêmea adulta jovem induz anovulação e ovários policísticos (BRAUER, 1986; PEREIRA *et al.*, 2014; MONTREZOR *et al.*, 2015).

Ratas induzidas à SOP com VE tendem a apresentar concentrações plasmáticas de esteroides ovarianos menores do que nos animais controle. As concentrações plasmáticas de T estão diminuídas e as concentrações plasmáticas de P4 estão aumentadas (SHI; VINE, 2012). Contrapondo tais resultados, Montrezor *et al.* (2015), demonstraram que os níveis plasmáticos de P4, E2 e T estão aumentados em ratas induzidas à SOP com VE.

Os nossos resultados demonstram que as concentrações plasmáticas de P4, variaram tanto no grupo controle quanto no grupo SOP, sugerindo que, mesmo sem significância estatística, houve influência endócrina sobre os padrões corporais e biológicos observados (massa corporal, massa ovariana, ciclo estral). Em relação aos níveis plasmáticos de P4 nos grupos SOP 30 e 45, observou-se reduções de 89,14% e 11,58%, respectivamente, em relação aos seus respectivos grupos controle. Apesar das variações plasmáticas de P4 não serem estatisticamente significativas, tais variações hormonais não podem ser desconsideradas do ponto de vista biológico. Sendo assim, pode-se sugerir que os ovários das ratas induzidas à SOP apresentaram menores formações de corpos lúteos, indicando disfunções ovulatórias, além de anestros e ciclos irregulares, comprovados durante as análises dos esfregaços vaginais das ratas.

Variações plasmáticas de T mostram diferenças significativas entre os grupos SOP, com maior concentração para o grupo SOP 45 dias e entre os grupos controle e SOP 30 dias. Nos grupos SOP 45 dias e SOP 60 dias houve aumento de 419,46% e 364,19%, respectivamente, em relação ao grupo SOP 30 dias. Desta forma, de acordo com os padrões dos esteroides sexuais analisados, a indução da SOP com VE alterou as concentrações plasmáticas dos mesmos,

provavelmente devido alterações na esteroideogênese ovariana e/ou alterações nas conversões de androstenediona e T em estradiol pelo tecido adiposo (WANG et al., 2012b). Essa suposição pode ser sustentada pelo aumento da massa corporal das ratas, observações macroscópicas de aumento de tecido adiposo abdominal, alterações da massa ovariana e do IGS. Em concentrações plasmáticas fisiológicas, a T tem importante efeito sobre a dinâmica óssea, principalmente em relação ao aumento da atividade osteoblástica ((BALASCH, 2003).

Entretanto, em níveis plasmáticos elevados, como no caso da SOP, pode-se observar alterações nas funções da T sobre as células ósseas, inclusive com redução da mineralização (GREGORIOU et al., 2000; ZBOROWSKI et al., 2000) Em estudos *in vitro*, doses de T acima dos níveis fisiológicos demonstraram redução da viabilidade dos osteoblastos, assim como redução da mineralização óssea (BRANCAGLIÃO et al., 2017).

Marcadores bioquímicos podem mostrar a ocorrência de atividade osteogênica e, uma vez que a formação óssea é dependente da ação dos osteoblastos, os marcadores de formação, na realidade, medem produtos decorrentes da ação destas células (VIEIRA, 1999). Os nossos resultados demonstraram que, nas dosagens plasmáticas (*in vivo*), foram encontrados níveis mais elevados da fosfatase alcalina nos grupos experimentais, quando comparados aos grupos controle, comprovando o aumento da atividade osteoblástica nos mesmos.

De outra forma, esse padrão não se repetiu nas dosagens realizadas nas amostras *in vitro* do meio de cultura, onde não houve diferença significativa entre grupos controle e SOP. Há relatos de efeitos controversos de esteroides ovarianos sobre as atividades da fosfatase alcalina, síntese de colágeno tipo-I, síntese de osteocalcina e mineralização da matriz extracelular (KAPUR; REDDI, 1989; TAKEUCHI; KAKUSHI; TOHKIN, 1994). O que também se percebe em nossos resultados é que as concentrações de fosfatase alcalina não variaram nas culturas celulares, independente das células serem oriundas de ratas tratadas ou controle. Tais resultados são diferentes daqueles obtidos dos experimentos *in vivo*.

As condições de cultura são ideais para estudos específicos para uma determinada célula e/ou tecido; contudo, não é raro que resultados obtidos *in vitro* sejam diferentes daqueles obtidos *in vivo*. Sendo assim, é fundamental um bom desenho experimental para que os resultados possam auxiliar às respostas levantadas para cada experimento.

Diante dos nossos resultados *in vitro*, pode-se sugerir que as atividades biológicas que modulam as ações da fosfatase alcalina sejam dependentes, por exemplo, de fatores que não estavam presentes no meio de cultura utilizado nos experimentos.

Sabe-se que os andrógenos estimulam a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, além de elevar a síntese de proteínas da matriz extracelular e estimular a mineralização da mesma

(NOTELOVITZ, 2002a, 2002b). Estudos demonstraram que alterações causadas pelo hiperandrogenismo promoveram um aumento da densidade óssea em mulheres com SOP (CASTELO-BRANCO et al., 2003; ZBOROWSKI et al., 2000) e relacionam essas alterações com mudanças na dinâmica óssea, especificamente entre a produção e reabsorção da matriz óssea, bem como a diferenciação de células-tronco mesenquimais em linhagem osteoblástica e osteoclástica (SINGULANI, 2014). No presente trabalho, observaram-se alterações ósseas *in vivo* e *in vitro*. Verificou-se diferença significativa no valor da carga máxima dos fêmures entre o grupo SOP 60 dias e seu grupo controle, onde o controle apresentou valor maior que o grupo SOP o que se repetiu para os resultados da análise do ponto de fratura na carga máxima, onde o grupo SOP 60 dias apresentou menor índice no ponto de fratura comparado ao seu grupo controle. Tais alterações ósseas corroboram com a literatura de que a SOP pode influenciar a resistência óssea, diminuindo-a (JUDAS *et al.*, 2012).

Tais alterações podem ser dependentes das ações dos esteroides sobre a dinâmica óssea. Resultados *in vitro* mostram que quando células ósseas da linhagem OSTEO-1 foram desafiadas com hormônios esteroides mimetizando concentrações plasmáticas de ratas induzidas à SOP, houve redução significativa da mineralização biológica (BRANCAGLIÃO *et al.*, 2017).

A diferenciação de CTM em osteoblastos pode ser induzida com adição de meio de diferenciação osteogênico em meio de cultura padrão (MANIATOPOULOS; SODEK; MELCHER, 1988).

Os nossos resultados mostraram que as culturas celulares realizadas foram adequadas, ou seja, houve diferenciação das CTM em osteoblastos. Tal afirmação pode ser sustentada pela viabilidade e mineralização celulares ao longo dos períodos de culturas. As células se mantiveram viáveis ao longo do período de 21 dias de cultura, com menor viabilidade para as células obtidas dos fêmures dos animais induzidos para SOP, exceção ao grupo SOP 45, para 21 dias de cultura. Desta forma, podemos sugerir que a indução à SOP diminui a viabilidade celular *in vitro*. Além disso, nossos resultados mostram que houve variações na mineralização biológica entre os grupos controle e SOP, principalmente para o grupo SOP 60 dias, onde houve diminuição da mineralização do grupo SOP em relação ao grupo controle durante 14 dias de cultura. Sendo assim, a indução da SOP diminuiu a mineralização biológica *in vitro*, e esses dados reforçam resultados de estudos anteriores, os quais demonstraram que a SOP altera a dinâmica óssea *in vivo* e *in vitro* (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2003; KLEIN-NULEND *et al.*, 2015; BRANCAGLIÃO *et al.*, 2017); como também pode-se sugerir que a redução da mineralização biológica *in vitro* seja a causa das alterações na carga máxima e no ponto de fratura na carga máxima, observadas nos fêmures da ratas induzidas à SOP.

Além disso, pudemos observar variações nos resultados obtidos *in vivo*, quando repetidos *in vitro*; o que reforça a importância desse modelo de estudo: a interface *in vivo* - *in vitro* no mesmo modelo experimental, para a compreensão dos mecanismos que relacionam as alterações hormonais da SOP com as alterações ósseas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados parciais obtidos pode-se concluir que:

- a) Houve a indução da SOP pela injeção com VE que pode ser confirmada pelas alterações dos ciclos estrais das ratas, pelas alterações plasmáticas dos hormônios e marcadores bioquímicos analisados;
- b) Constatou-se a formação de cistos ovarianos, identificados na análise histológica dos grupos induzidos à SOP;
- c) Observou-se alterações nos padrões ósseos estudados, especificamente, redução da carga máxima e do ponto de fratura da carga máxima para o grupo SOP 60 dias;
- d) A obtenção das CTM e a diferenciação das mesmas em osteoblastos foram realizadas adequadamente e os resultados mostram que as células obtidas dos animais que foram induzidos à SOP tiveram menor viabilidade e menor mineralização comparado aos grupos controle;
- e) A análise da fosfatase alcalina demonstrou que, *in vivo*, houve maior atividade em todos os grupos de animais induzidos à SOP, o que não foi observado nas culturas *in vitro*;
- f) Sendo assim, podemos sugerir que ratas Wistar adultas induzidas à SOP com VE têm importantes alterações ósseas, tanto *in vivo* quanto *in vitro* e que o modelo experimental se mostrou eficaz para o presente estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADEI, S. U.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006.

ANDRADE, A. D. et al. Biologia óssea : uma revisão da literatura. v. 4, n. 6, p. 659–662, [s.d.].

AVOLIO, G. et al. O papel da vitamina D 3 e da osteocalcina no metabolismo ósseo : uma análise necessária para se otimizar a osseointegração. **Revista Inst Ciencia e Saúde**, v. 26, n. 3, p. 347–350, 2008.

AZZIZ, R. et al. **The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report.** [s.l: s.n.]. v. 91

BALASCH, J. Sex steroids and bone: Current perspectives. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 3, p. 207–222, 2003.

BARBER, T. M.; FRANKS, S. Adipocyte biology in polycystic ovary syndrome. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 373, n. 1–2, p. 68–76, 5 jul. 2013.

BARON, R.; RAWADI, G. Targeting the Wnt/ β -Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2635–2643, jun. 2007.

BRANCAGLIÃO, L. et al. In Vitro Effects of FBS and Ovarian Steroids on Osteoblast Viability. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 1 Supplement, p. 685–689, 2015.

BRANCAGLIÃO, L. et al. Effects of Ovarian Steroids on Osteoblast Viability and Mineralization. **The Asian Journal of Biology**, v. 2(3), p. 1–18, 2017.

BRAWER, J. R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 3, p. 647–655, 1 out. 1986.

CASTELO-BRANCO, C. et al. Secreting ovarian tumors may protect women from osteoporosis. **Gynecologic Oncology**, v. 88, n. 2, p. 149–152, 2003.

CAULEY, J. A. Estrogen and bone health in men and women. **Steroids**, v. 99, p. 11–15, 2015.

DULEBA, A. J. Medical management of metabolic dysfunction in PCOS. **Steroids**, v. 77, n. 4, p. 306–311, 10 mar. 2012.

FALONI, A. D. S.; CERRI, P. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 2, p. 181–188, 2007.

GEORGOPOULOS, N. A. et al. Basal metabolic rate is decreased in women with polycystic ovary syndrome and biochemical hyperandrogenemia and is associated with insulin resistance.

Fertility and Sterility, v. 92, n. 1, p. 250–255, 2009.

GÓMEZ-AMBROSI, J. et al. The Bone-Adipose Axis in Obesity and Weight Loss. **Obesity Surgery**, v. 18, n. 9, p. 1134–1143, 19 set. 2008.

GREGORIOU, O. et al. Bone mineral density in women with idiopathic hirsutism. **Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 364–368, 2000.

GREGORY, C. A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77–84, jun. 2004.

INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY (IFCC) 1), 2) IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. v. 21, n. 1983, p. 731–748, 1984.

JUDAS, F. et al. Estrutura E Dinâmica Do Tecido Ósseo. **Cerâmica**, p. 51, 2012.

KAPUR, S. P.; REDDI, A. H. Influence of testosterone and dihydrotestosterone on bone-matrix induced endochondral bone formation. **Calcified Tissue International**, v. 44, n. 2, p. 108–113, 1989.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576–581, 2012.

KLEIN-NULEND, J. et al. Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. **Journal of Biomechanics**, v. 48, n. 5, p. 855–865, 2015.

KOGURE, G. S. et al. Análise de força muscular e composição corporal de mulheres com Síndrome dos Ovários Policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, n. 7, p. 316–322, 2012.

KRISHNAN, A.; MUTHUSAMI, S. Hormonal alterations in PCOS and its influence on bone metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 2, p. R99–R113, 2017.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A. H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell and Tissue Research**, v. 254, n. 2, p. 317–330, 1988.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. .; TANNO, A. . Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. **Brazilian Journal Biology**, v. 62, n. 4, p. 609–614, 2002.

MARCONDES, J. A. M.; BARCELLOS, C. R. G.; ROCHA, M. P. Dificuldades e armadilhas no diagnóstico da síndrome dos ovários policísticos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 1, p. 6–15, fev. 2011.

MARTIN, A. et al. Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. **Bone**, v. 75, p. 96–104, jun. 2015.

MARTIN, R. B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **Journal of Biomechanics**, v. 23, n. 10, p. 1021–1029, jan. 1990.

MONTREZOR, L. H. et al. Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in rats with polycystic ovaries. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 217, p. 17–24, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NOTELOVITZ, M. Overview of bone mineral density in postmenopausal women. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 47, n. 1 Supplement, p. 71–81, 2002a.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertility and Sterility**, v. 77, n. 4, p. S34–S41, 2002b.

PEREIRA, V. M. et al. Downregulation of natriuretic peptide system and increased steroidogenesis in rat polycystic ovary. **Peptides**, v. 60, p. 80–85, 2014.

PITOMBO, J. C. P. **Impacto de andrógenos na diferenciação e atividade de osteoclastos em cultura celular**. [s.l.] UNESP - Araraquara, 2016.

RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. Embriology and cellular biology of bone. In: AVIOLI, L. V.; KRANE, S. M. (Eds.). . San Diego: Academic Press, 1998. p. 1–22.

RESENDE, L. O. T. DE et al. Concentração dos hormônios esteroides no fluido folicular de folículos ovarianos maduros e imaturos de pacientes com síndrome dos ovários policísticos submetidas à fertilização in vitro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 9, p. 447–453, 2010.

ROBLING, A. G. et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 9, p. 5866–5875, 2008.

SHI, D.; VINE, D. F. Animal models of polycystic ovary syndrome: A focused review of rodent models in relationship to clinical phenotypes and cardiometabolic risk. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 1, p. 185–193, 2012.

SINGULANI, M. P. **Análise do potencial osteogênico de células estromais derivadas da medula óssea de ratas adultas e senis submetidas ou não ao treinamento de força**. [s.l.] UNESP - Araçatuba, 2014.

SLOOTWEG, M. C. et al. OESTROGEN AND PROGESTOGEN SYNERGISTICALLY STIMULATE HUMAN AND RAT OSTEOBLAST PROLIFERATION. **Journal of**

Endocrinology, v. 133, n. 2, p. R5–R8, 1 maio 1992.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 415–422, 1999.

WANG, H. et al. Impairment of osteoblast differentiation due to proliferation-independent telomere dysfunction in mouse models of accelerated aging. **Aging Cell**, v. 11, n. 4, p. 704–713, 2012a.

WANG, L. et al. The expression of sex steroid synthesis and inactivation enzymes in subcutaneous adipose tissue of PCOS patients. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 132, n. 1–2, p. 120–126, 2012b.

WEI, L. L. et al. Evidence for Progesterone Receptors in Human Osteoblast-like Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 195, n. 2, p. 525–532, set. 1993.

WOLFF, R. B. et al. Aspectos moleculares dos esteroides sexuais sobre a cartilagem e os ossos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 4, p. 493–497, 2012.

ZAIDI, M. Skeletal remodeling in health and disease. **Nature Medicine**, v. 13, n. 7, p. 791–801, jul. 2007.

ZBOROWSKI, J. V. et al. Bone mineral density, androgens, and the polycystic ovary: The complex and controversial issue of androgenic influence in female bone. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 10, p. 3496–3506, 2000.