

Kênia Mara Magalhães Campos Cardoso

**Avaliação *in vitro* de condrócitos da cartilagem articular e da
diferenciação osteogênica das células tronco da medula óssea extraídas
da prole de ratas tratadas com etanol**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal
Área: Patologia Animal
Orientadora: Prof^ª. Dra. Natália de Melo Ocarino
Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Rogéria Serakides
Prof^ª. Dra. Amanda M. S. Reis

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária-UFMG
2020**

C268a Cardoso, Kênia Mara Magalhães Campos – 1984.
Avaliação In Vitro de condrócitos da cartilagem articular e da diferenciação osteogênica das células tronco da medula óssea extraídas da prole de ratas tratadas com etanol/ Kênia Mara Magalhães Campos Cardoso – 2020.

89p.: il.

Orientadora: Natália de Melo Ocarino
Coorientadoras: Rogéria Serakides
Amanda Maria Sena Reis

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Ratos - Teses - 2- Células tronco - Teses – 3- Cartilagem - Teses - I- Ocarino, Natália de Melo - II – Serakides, Rogéria – III – Reis, Amanda Maria Sena – IV -Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V – Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

KÊNIA MARA MAGALHÃES CAMPOS CARDOSO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Patologia Animal.

Aprovado(a) em 28 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Natalia de Melo Ocarino

Prof(a). Dr.(a). Natalia de Melo Ocarino
Presidente - Orientador(a)

Amanda Maria Sena Reis

Prof(a). Dr.(a). Amanda Maria Sena Reis

Rogéria Serakides

Prof(a). Dr.(a). Rogéria Serakides

Eliane Gonçalves de Melo

Prof(a). Dr.(a). Eliane Gonçalves de Melo

Bruno

Prof(a). Dr.(a). Bruno Machado Bertassoli

Esse trabalho é dedicado ao meu Senhor “... porque Dele, e por Ele e para Ele são todas as coisas...” Romanos 11:36

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele e Ele tudo fará”. Salmos 37:5

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu Deus e Senhor da minha vida. Nada seria possível se Deus, pela sua infinita graça, não tivesse assim permitido. Obrigada meu Deus, por me direcionar e fortalecer em tantos momentos difíceis e por me permitir tantos momentos felizes durante estes dois anos.

Agradeço ao meu amor André, meu companheiro na alegria e na tristeza, sempre me impulsionando e me ajudando em cada etapa deste processo. A minha filha Beatriz, minha princesa amada que é a minha grande motivação para querer fazer melhor a cada dia.

Aos meus queridos e amados pais, Elias e Ivis, e meu irmão amado Kildare que sempre acreditaram e me incentivaram a nunca desistir dos sonhos. Aos meus sogros, Cirene e Arildo, que mesmo à distância sempre me ajudaram e me estimularam a seguir em frente. Às minhas cunhadas, Patrícia e Priscila, e meus sobrinhos Gabriel e Geovanna por serem fonte de alegria e amor aos meus dias.

Agradeço aos meus pastores Felipe e Andreza, fieis amigos e companheiros que sempre intercederam e apoiaram em todo o tempo pela minha vida. Aos meus compadres, Juliana e Ronaldo, que em todo o tempo me deram motivos para sorrir e acreditar que é possível e que não há limites para os nossos sonhos.

À minha irmã, que Deus me presenteou neste curso, Lorena, você é e sempre será minha irmã querida e tudo que passamos juntas durante estes dois anos ficará para a eternidade. À minha irmã de mestrado Gabriela, sempre meiga e companheira, que sempre me ensinou que o importante é seguir a dança e não desistir. Aos meus amigos do Núcleo de Células Tronco Fabiana, Fabrício, Débora, Camila, Carla, Layla, Bruna e Léo e as nossas IC's Débora e Flávia por cada risada, por cada ajuda, por cada etapa vencida, por cada objetivo alcançado; vocês sempre farão parte dessa história.

Agradeço à professora e orientadora Natália de Melo Ocarino que um dia acreditou em mim e me deu a oportunidade de viver e realizar este sonho. Nunca esquecerei o dia, em que recebi o seu e-mail que dizia: “os sonhos se tornam realidade”.

Obrigada às professoras Rogéria Serakides e Amanda Reis por serem minhas co-orientadoras, por cada ensinamento e por cada ajuda em todo o tempo. A carreira de vocês, orientadora e co-orientadoras, me inspira ao que eu quero ser, até onde eu posso chegar e os limites que posso ultrapassar. Hoje, também sou professora, em uma carreira ainda muito inicial, é verdade, mas percebo que os caminhos da educação são longos e árduos e, que a maior dádiva de um professor está muito mais em aprender com os alunos do que ensiná-los. Obrigada a vocês por me proporcionar essa experiência tão maravilhosa.

Obrigada a cada ratinho que cedeu a sua própria vida para que esse experimento pudesse ser realizado. As vidas de vocês tem um valor inestimável e através delas esperamos que muitas outras vidas possam ser salvas.

Agradeço a todos os professores do setor de Patologia Veterinária da UFMG por todo o conhecimento transmitido e por toda a dedicação de vocês.

Agradeço aos meus colegas de mestrado que entraram junto comigo nesse barco Matheus, Jéssica Carolina, Ana Carolina e Agna por cada momento vivido juntos!

Agradeço às técnicas do laboratório de histopatologia, Leimar, Natália e Valéria, que sempre com um sorriso nos lábios puderem me ajudar com todos os trabalhos que fizemos juntas. Agradeço ao técnico Luís que sempre me ajudou com muita gentileza e alegria todos os momentos.

Agradeço a cada funcionário da UFMG desde os porteiros, funcionários da limpeza, técnicos da esterilização e lavanderia que, de forma gentil e prestativa, sempre me ajudam durante cada passo.

Agradeço aos membros da banca de avaliação de mestrado: os titulares Professora Natália Ocarino, Professora Rogéria Serakides, Professora Eliane Gonçalves, Professora Amanda Sena e o doutor Bruno Bertassoli e aos suplentes Professora Carla Osório e Professora Jankerle Neves Boeloni sem os quais essa finalização do curso não seria possível.

Agradeço à Escola de Veterinária da UFMG e o apoio financeiro concedido pela FAPEMIG, CAPES e CNPQ que acreditaram que investir em educação e ciência ainda é o melhor caminho para mudar o nosso Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO.....	18
OBJETIVOS	22
CAPÍTULO 1: Revisão de literatura	23
1. <i>Participação dos condrócitos na formação e crescimento ósseos endocondrais e fatores que estimulam e inibem sua atividade.....</i>	<i>23</i>
2. <i>Participação das células tronco mesenquimais da medula óssea no crescimento ósseo endocondral e fatores que estimulam e inibem sua diferenciação em osteoblastos.....</i>	<i>28</i>
3. <i>Farmacocinética do etanol nos organismos materno, fetal e neonatal.....</i>	<i>30</i>
4. <i>Efeitos in vivo e in vitro do etanol sobre células cartilaginosas, ósseas e células tronco mesenquimais.....</i>	<i>37</i>
CAPÍTULO 2: Avaliação, in vitro, do efeito do consumo materno de etanol sobre os condrócitos da cartilagem articular dos neonatos cultivados em meio condrogênico.....	40
Resumo.....	40
Abstract.....	41
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	44
Resultados.....	49
Discussão.....	54
Conclusão.....	58
CAPÍTULO 3: Efeito do consumo materno de etanol durante a gestação e lactação sobre a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais de medula óssea de ratos ao desmame.....	58
Resumo.....	58
Abstract.....	59
Introdução.....	60
Material e Métodos.....	62
Resultados.....	67
Discussão.....	73
Conclusão.....	78
REFERÊNCIAS	78
ANEXO	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR Tempo Real (capítulo 2).....	49
Tabela 2	Média e desvio padrão do consumo diário de ração, ganho de peso final da mãe, tempo de gestação (dias), e tamanho da ninhada das ratas submetidas (grupo etanol) ou não (grupo controle) ao consumo de etanol a partir do nono dia de gestação.....	50
Tabela 3	Média e desvio padrão do peso (g) e comprimento dos neonatos das ratas submetidas (grupo etanol) ou não (grupo controle) ao consumo de etanol a partir do nono dia de gestação.....	50
Tabela 4	Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR Tempo Real (capítulo 3).....	66
Tabela 5	Média e desvio padrão do consumo diário de ração, ganho de peso final da mãe, tempo de gestação (dias), e tamanho da ninhada das ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do processo de formação óssea endocondral. Fonte: Adaptado de Degnin et al. 2010.....	24
Figura 2	Esquema da farmacocinética do etanol. Fonte: adaptado de Jones, 2011 e Jones 2019.....	34
Figura 3	Culturas de condrócitos de neonatos filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio condrogênico. A) Média e desvio padrão da redução do MTT em cristais de formazan. B) Média e desvio padrão da atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT. *p < 0,05.....	51
Figura 4	(A) Fotomicroscopia da porcentagem de área coberta por células nas culturas em monocamada (2D) de condrócitos de neonatos filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio condrogênico. B) Média e desvio padrão da porcentagem de área coberta por células dos grupos controle e etanol. *p < 0,05.....	52
Figura 5	(A) Fotomicroscopia da porcentagem de área PAS ⁺ de culturas em 3D de condrócitos de neonatos filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação aos 21 dias de cultivo em meio condrogênico. B) Média e desvio padrão da porcentagem de área PAS positivas dos grupos controle e etanol. p > 0,05.....	53
Figura 6	Quantificação relativa da expressão gênica (média ± desvio padrão) em culturas de condrócitos de neonatos filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação aos 21 dias de cultivo em meio condrogênico. *p < 0,05.....	54
Figura 7	Média e desvio padrão do peso da ninhada ao desmame das ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação. * p<0,05.....	68
Figura 8	(A) Fotomicroscopia da redução do MTT em cristais de formazan. (B) Média ± desvio padrão da redução do MTT em formazan em culturas de CTM-MO de filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05.....	69

Figura 9	(A) Fotomicroscopia da atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT. (B) Média \pm desvio padrão da atividade de fosfatase alcalina em culturas de CTM-MO de filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05.....	70
Figura 10	(A) Fotomicroscopia da porcentagem de células por lamínula, H&E. (B) Média \pm desvio padrão da porcentagem de células por campo em culturas de CTM-MO de filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05.....	71
Figura 11	(A) Fotomicroscopia dos nódulos mineralizados, Von Kossa. (B) Média \pm desvio padrão da área mineralizada média por nódulo. C) Número de nódulos mineralizados por lamínula. D) Área mineralizada total por lamínula em culturas de CTM-MO de filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação aos 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05.....	72
Figura 12	Quantificação relativa da expressão gênica (média \pm desvio padrão) em CTM-MO em culturas de CTM-MO de filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação 21 dias de diferenciação osteogênica. BMP-2, Osteocalcina, Runx-2, Colágeno tipo 1 e Osteopontina *p < 0,05.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância
ADH : Álcool Desidrogenase
BAC: Concentração Alcoólica Sanguínea
BMPS: Proteínas Morfogenéticas Do Osso
COL-1: COLÁGENO TIPO I
COL-2: COLÁGENO TIPO II
CTM: Células Tronco Mesenquimais
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
FASD: Espectro das Desordens Fetais Alcoólicas
FGF: Fator De Crescimento Fibroblástico
HE: Hematoxilina-Eosina
IHH: Indian Hedgehog
MMPS: Metaloproteinases De Matriz
MTT: {*Brometo De [3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-Difeniltetrazolio]*}
PAS: Ácido Periódico De Schiff
PBS: Solução Tampão De Fosfato Padrão
RT-PCR: Reação Em Cadeia Da Polimerase Em Tempo Real
PEE: Exposição Pré Natal ao Etanol
PTH: Paratormônio
PTHRP: Peptídeo Relacionado ao Paratormônio
SAF: Síndrome Alcoólica Fetal
SFB: Soro Fetal Bovino
SNK: Student Newman Keuls
VEGF: Fator De Crescimento Do Endotélio Vascular

RESUMO

Foram realizados dois estudos para avaliar os efeitos do consumo materno de etanol sobre os condrócitos da cartilagem articular e na diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) da prole. Foram utilizadas 13 ratas Wistar adultas distribuídas em dois grupos experimentais, grupo controle e o grupo tratado com etanol. As ratas do grupo etanol e controle, receberam por gavagem diária, a partir do nono dia de gestação, solução alcoólica 40% e água destilada, respectivamente até o trigésimo dia de lactação. No dia do parto, foram eutanasiados quatro neonatos por fêmea e, aos 30 dias de lactação, três filhotes por fêmea. O primeiro estudo avaliou, *in vitro*, o efeito do consumo materno de etanol sobre os condrócitos da cartilagem articular. Os condrócitos foram extraídos das cartilagens articulares e cultivados em meio condrogênico por sete, 14 e 21 dias. Foram realizados os testes de conversão do MTT, atividade de fosfatase alcalina, porcentagem de células por campo e porcentagem de áreas PAS⁺ em cultura 3D. Aos 21 dias, foi realizada a quantificação dos transcritos gênicos para agrecano, Sox-9, colágeno tipo II, colágeno X, Runx-2 e VEGF pelo RT-PCR em tempo real. O segundo estudo avaliou o efeito do consumo materno de etanol durante a gestação e lactação sobre a diferenciação osteogênica CTM-MO dos filhotes ao desmame. As CTM-MO foram extraídas dos membros pélvicos e cultivadas em meio osteogênico por sete, 14 e 21 dias. Foram realizados os testes de conversão do MTT, atividade de fosfatase alcalina e porcentagem de células por campo. Aos 21 dias, foram realizados a quantificação do tamanho médio dos nódulos mineralizados e a quantificação dos transcritos gênicos para osteopontina, osteocalcina, BMP-2, Runx-2 e colágeno tipo I por RT-PCR em tempo real. As médias foram comparadas pelo teste t de *student* e as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. Os neonatos das mães que receberam etanol foram menos pesados quando comparados aos neonatos controle. A cultura dos condrócitos do grupo etanol apresentou maior conversão de MTT, maior atividade de fosfatase alcalina e maior porcentagem de células relação ao grupo controle em todos os períodos. Não houve diferença entre ambos os grupos na porcentagem de áreas PAS⁺ em cultura 3D. Houve maior expressão de colágeno tipo II e menor expressão de Sox-9 no grupo etanol

em relação ao grupo controle. O peso dos filhotes, ao desmame, das mães que receberam etanol foi significativamente menor quando comparado ao controle. As CTM-MO do grupo etanol apresentaram menor conversão de MTT aos sete dias de diferenciação osteogênica porém maior atividade de fosfatase alcalina, maior porcentagem de células, maior tamanho médio dos nódulos mineralizados bem como maior expressão de BMP-2, osteopontina e osteocalcina. Conclui-se que o consumo materno de etanol durante a gestação e lactação altera, *in vitro*, o fenótipo e a atividade de síntese dos condrócitos dos neonatos bem como aumenta a diferenciação osteogênica das CTM-MO da prole ao desmame.

Palavras chave: álcool, cartilagem, células tronco, cultura celular, diferenciação osteogênica

ABSTRACT

Two studies were performed to evaluate the effects of maternal ethanol consumption on articular cartilage chondrocytes and on osteogenic differentiation of offspring bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). Thirteen adult female Wistar rats were divided into two experimental groups, the control group and the ethanol-treated group. The rats of the ethanol and control group received by daily gavage, from the ninth day of gestation, 40% alcohol solution and distilled water, respectively until the thirtieth day of lactation. On the day of delivery, four newborns were euthanized per female and, at 30 days of lactation, three pups per female. The first study evaluated in vitro the effect of maternal ethanol consumption on articular cartilage chondrocytes. Chondrocytes were extracted from articular cartilage and cultivated in chondrogenic medium for seven, 14 and 21 days. MTT conversion tests, alkaline phosphatase activity, percentage of cells per field and percentage of PAS⁺ areas in 3D culture were performed. At 21 days, the quantification of gene transcripts for aggrecan, Sox-9, collagen type II, collagen X, Runx-2 and VEGF was performed by real-time RT-PCR. The second study evaluated the effect of maternal ethanol consumption during pregnancy and lactation on BMMSCs osteogenic differentiation of pups at weaning. The BMMSCs were extracted from the pelvic limbs and cultured in osteogenic medium for seven, 14 and 21 days. MTT conversion, alkaline phosphatase activity and cell percentage per field tests were performed. At 21 days, the average size of the mineralized nodules was quantified and the gene transcripts were quantified for osteopontin, osteocalcin, BMP-2, Runx-2 and collagen I by real-time RT-PCR. Means were compared by Student's t-test and differences were considered significant if $p < 0.05$. Neonates of mothers receiving ethanol were less heavy when compared to control neonates. The chondrocyte culture of the ethanol group showed higher MTT conversion, higher alkaline phosphatase activity and higher percentage of cells compared to the control group in all periods. There was no difference between both groups in the percentage of PAS⁺ areas in 3D culture. There was higher expression of collagen type II and lower expression of Sox-9 in the ethanol group compared to the control group. The weight of pups at weaning of mothers receiving ethanol was significantly lower when compared to control. BMMSCs ethanol group showed lower MTT conversion after seven days of osteogenic differentiation but

higher alkaline phosphatase activity, increased percentage of cells larger average size of mineralized nodules as well as increased expression of BMP-2, osteopontin and osteocalcin. In conclusion, maternal ethanol consumption during pregnancy and lactation alters, *in vitro*, the phenotype and chondrocyte synthesis activity of neonates, as well as increases the osteogenic differentiation of BMMSCs from weaning offspring

Keywords: alcohol, cartilage, stem cells, cell culture, osteogenic differentiation

INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas alcóolicas durante a gestação está associado a distúrbios do desenvolvimento físico da prole, bem como deficiências cognitivas e de aprendizado englobadas na Síndrome Alcólica Fetal (SAF) ou Espectro das desordens fetais alcóolicas (FASD). Apesar dos riscos, a ingestão de etanol por mulheres gestantes é bastante comum (Dörrie et al., 2014). Esses efeitos deletérios surgem porque o etanol ingerido pela gestante atravessa a barreira placentária expondo o feto à mesma concentração alcólica que a mãe, porém com maiores dificuldades de metabolização e eliminação, uma vez que o metabolismo fetal é significativamente mais lento (Kaup et al., 2001).

Sabe-se que as consequências do consumo materno de etanol para a prole são diferentes conforme o período gestacional em que ocorre a ingestão. Quando o consumo ocorre nos primeiros três meses, geralmente são observadas anomalias neurológicas e malformações congênitas cardiovasculares. Quando o período é o segundo trimestre, aumentam os riscos de abortamento. Já o consumo no terceiro trimestre está associado ao baixo crescimento fetal e redução do perímetro cranial (Kaup et al., 2001). Os efeitos tóxicos do etanol podem continuar no período pós-natal, por meio da lactação, uma vez que o etanol também pode estar presente no leite materno em concentrações semelhantes às do sangue (Messias et al., 2006). Sabe-se que filhos de mães que consumiram etanol durante a lactação, o retardo do crescimento ósseo se manteve ao longo da vida, sendo observado nas crianças e adolescentes pelo menos até os 14 anos de idade (Day et al., 2002). Apesar dos efeitos conhecidos, os mecanismos pelos quais a exposição pré e pós-natal ao etanol causam as alterações esqueléticas como redução do perímetro cranial, baixo crescimento fetal e pós natal são pouco conhecidos. Nossa hipótese é que essa substância compromete tanto a formação quanto o crescimento ósseos endocondrais.

O desenvolvimento ósseo é um processo complexo e que depende de inúmeros fatores. Dois processos estão envolvidos na formação e crescimento do esqueleto são eles a ossificação (formação) endocondral e o crescimento endocondral (Degnin et al., 2010).

A ossificação ou formação óssea endocondral é o processo de formação intra-uterina da maioria dos ossos do esqueleto, incluindo dos ossos longos, que se dá a partir de um

molde cartilaginoso. Os condrócitos hipertróficos do centro desse molde induzem a invasão vascular por meio da síntese de fatores de crescimento, dentre eles o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e direcionam a diferenciação das células do pericôndrio em osteoblastos, que secretam matriz óssea por sobre o molde cartilaginoso, dando origem à formação dos centros de ossificação (Kronenberg, 2003). Após o nascimento, os condrócitos da cartilagem articular e da placa epifisária, que são os resquícios desse molde cartilaginoso, continuam proliferando-se e diferenciando-se para promover o crescimento ósseo endocondral pós-natal (Dao et al., 2012). A placa epifisária é composta por quatro zonas distintas representadas pela zona de repouso, zona de proliferação, zona pré-hipertrófica e zona hipertrófica. Já a cartilagem articular é formada pelas zonas superficial, média e profunda (Camarero-Espinosa et al., 2016). A diferenciação e a maturação das células cartilaginosas da placa epifisária e da cartilagem articular permitem que ocorra a invasão vascular que carrega células tronco mesenquimais e células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos para secretar matriz óssea sob a matriz cartilaginosa, promovendo assim o crescimento ósseo pós-natal (Las Heras et al., 2012).

Diversos fatores de transcrição, dentre eles o Runx-2 e o Sox-9, são necessários para a adequada formação e crescimento ósseos endocondrais. O Sox-9 é essencial para a sobrevivência celular, para a conversão das células condroprogenitoras em condrócitos, para a maturação de condrócitos (Ikegami et al., 2011) e para a expressão de agrecan (Kronenberg, 2003) e de colágeno tipo II, sendo este último, o principal componente da matriz extracelular (MEC) (Shi et al., 2015). Posteriormente, à medida que os condrócitos amadurecem e sofrem hipertrofia, tem início a síntese de colágeno tipo X (Castagnola et al., 1986).

Na vida pós-natal, o colágeno tipo II, juntamente com o agrecan, são os principais responsáveis pela resistência da cartilagem (Ikeda et al., 2014). O Runx2, por sua vez, é importante na placa de crescimento e atua aumentando a proliferação e coordenando a maturação dos condrócitos (Yoshida et al., 2004). Sua expressão é elevada no estágio final da condensação celular para a formação do molde cartilaginoso, reduzindo nos condrócitos proliferativos e aumentando novamente nos condrócitos pré-hipertróficos e

hipertróficos. A ausência de Runx-2 está associada à redução no número de condrócitos hipertróficos e à ineficiência da mineralização da matriz (Kronenberg, 2003).

A vascularização é necessária no processo de ossificação intra-uterina e também na vida pós-natal (Maes, 2013). Para que ocorra a ossificação endocondral, é necessário que a cartilagem, que é avascular, seja invadida por vasos sanguíneos. Essa vascularização é um dos eventos responsáveis pelo início do crescimento longitudinal dos ossos. A vascularização em todos os estágios do desenvolvimento fetal é coordenada pelo VEGF (Maes, 2013). A inibição do VEGF em ratos com 24 dias de idade resulta em menor invasão vascular da zona hipertrófica da placa de crescimento, reduzindo a formação de osso trabecular e resultando em morte celular (Zelzer et al., 2004).

Estudo demonstrou que a exposição pré-natal ao etanol (PEE) é capaz de alterar também a estrutura da cartilagem de crescimento da tíbia de ratos, uma vez que ocorre redução na espessura da zona de repouso e aumento da espessura da zona hipertrófica, resultando em ossos mais curtos (Snow e Keiver, 2007). Esses dados sugerem que a PEE afeta os estágios iniciais do crescimento ósseo. Day et al. (2002) constataram que o retardo do crescimento ósseo se mantém ao longo da vida, sendo observado em crianças e adolescentes pelo menos até os 14 anos de idade. Em modelo murino, constatou-se que o etanol afeta o desenvolvimento ósseo de formas diferentes, sendo a ulna, o rádio, a tíbia e o sacro os ossos mais sensíveis, o que sugere que o efeito tóxico do etanol não seja homogêneo no organismo (Simpson et al., 2005). De modo distinto do que foi observado por Snow e Kiever (2007), Simpson et al. (2005) observaram que o etanol afeta estágios avançados do processo de ossificação endocondral em ratos. Apesar de todas essas constatações, não há estudos que descrevam os efeitos do etanol sobre a síntese dos constituintes da matriz cartilaginosa de ratos com PEE.

No que se refere à exposição pós-natal ao etanol, acredita-se que os efeitos deletérios ao crescimento do filhote possam ser decorrentes também de má nutrição em consequência de menor capacidade de sucção pelo filhote (Murillo-Fuentes et al., 2001) associada à falha na ejeção do leite devido a atividade supressora do etanol sobre a liberação de ocitocina materna (Giglia, 2010). Além disso, o etanol prejudica a absorção e o

metabolismo de vitaminas e minerais, agravando ainda mais o quadro de má nutrição (Murillo-Fuentes et al., 2001).

Tanto na formação quanto no crescimento ósseo endocondrais, a participação das CTMs da medula óssea é fundamental. As CTM se diferenciam em células osteoprogenitoras e posteriormente em osteoblastos, células responsáveis em sintetizar a matriz osteóide formada basicamente por colágeno tipo I. O restante da matriz óssea orgânica consiste de proteínas não colagênicas dentre elas a osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea e fosfatase alcalina (Roach, 1994). Essas proteínas são essenciais para a mineralização da matriz osteóide.

Chavassieux e colaboradores 1993 demonstraram que a adição de etanol em culturas de osteoblastos humanos promoveu efeito inibitório sobre a atividade da fosfatase alcalina bem como redução da expressão de osteocalcina porém, os resultados obtidos foram bastante variáveis dependendo da dose e do tempo de administração do etanol (Chavassieux et al., 1993). Já em culturas de CTMs, a adição do etanol promoveu efeitos deletérios significativos como aumento da senescência prematura das células bem como um menor poder de diferenciação osteogênica quando comparadas ao grupo controle. Nesse mesmo estudo demonstrou-se que os efeitos deletérios são dose-dependentes (Chen et al., 2017). As CTMs tratadas com etanol manifestaram redução expressiva dos nódulos de mineralização bem como redução da expressão gênica para genes importantes durante o processo de ossificação tais como a fosfatase alcalina, osteocalcina e colágeno tipo I, indicando que o etanol tem influência negativa importante sobre a osteogênese em seres humanos (Gong e Wezeman, 2004). Contudo, os efeitos do consumo materno de etanol durante a lactação sobre o potencial de diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea de seus filhotes é desconhecido.

O presente estudo visou esclarecer alguns mecanismos pelos quais o consumo materno de etanol interfere na formação óssea fetal por meio da avaliação dos condrócitos da cartilagem articular dos neonatos e avaliar o efeito no crescimento ósseo pós-natal por meio do potencial de diferenciação osteogênica das CTM dos filhotes ao desmame.

HIPÓTESE

- O consumo materno de etanol durante a gestação reduz a atividade dos condrócitos da cartilagem articular (Capítulo 2).
- O consumo materno de etanol durante a gestação e lactação reduz a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea dos filhotes ao desmame (Capítulo 3).

OBJETIVO

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do consumo materno de etanol durante a gestação e lactação sobre a condrogênese e a diferenciação de células tronco mesenquimais da medula óssea na diferenciação osteogênica em filhotes de ratas Wistar ao nascimento e ao desmame.

Objetivos específicos

- Avaliar, *in vitro*, a atividade dos condrócitos de ratos neonatos de até 2 dias de vida, de mães que receberam etanol a partir do nono dia de gestação por meio da conversão do MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT, porcentagem de células por campo aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio condrogênico e porcentagem de área PAS⁺ em culturas tridimensionais aos 21 dias de cultivo. Avaliar a expressão dos transcritos gênicos SOX-9, agrecano, colágeno tipo II, colágeno X, Runx-2 e VEGF por RT-PCR em tempo real aos 21 dias de cultivo (Capítulo 2).
- Avaliar *in vitro*, o potencial de diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea de filhotes ao desmame provenientes de mães que receberam etanol a partir do nono dia de gestação até o final da lactação por meio da conversão do MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT, porcentagem de células por campo coradas pelo hematoxilina/eosina aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio osteogênico e avaliação dos nodulos mineralizados pela coloração de Von Kossa aos 21 dias de cultivo. Avaliar a expressão dos transcritos gênicos BMP-2, Runx-2, colágeno tipo I, osteocalcina e osteopontina por RT-PCR em tempo real aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Participação dos condrócitos na formação e crescimento ósseos endocondrais e fatores que estimulam e inibem sua atividade

A maior parte do esqueleto apendicular e axial é formada durante um processo complexo e dependente de múltiplos fatores, conhecido como formação óssea endocondral que acontece durante a vida intra-uterina (Staines et al., 2013). Neste processo, células mesenquimais embrionárias passam por condensação e posteriormente sofrem diferenciação em condroblastos e condrócitos (Kronenberg, 2003). Os condroblastos se proliferam e iniciam a produção de matriz extracelular composta principalmente por colágeno do tipo II e proteoglicanos que darão origem a um molde cartilaginoso que servirá de base para a formação do tecido ósseo (Staines et al., 2013).

Vários fatores estão envolvidos no processo de amadurecimento, proliferação e diferenciação do tecido cartilaginoso e a correta coordenação entre esses fatores é determinante para o surgimento de um tecido saudável. Assim, falhas no processo de coordenação e interação entre esses fatores, são muitas vezes, causas de diversas doenças osteo-articulares (Nishimura et al., 2012).

Os condrócitos, ainda no processo de amadurecimento, começam a se multiplicar e secretar a matriz extracelular que tem como característica importante, o fato de ser avascular, recebendo nutrição através da vascularização presente no pericôndrio, um tecido conjuntivo fibroso amplamente vascularizado (Ortega et al., 2004). A medida em que os condrócitos se desenvolvem e se especializam, eles adquirem morfologia e funções diferenciadas, sendo então denominados condrócitos hipertróficos, que se acumulam no centro desse molde cartilaginoso (Degnin et al., 2010). Os condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos, secretam matriz já não mais rica em colágeno do tipo II, mas predominantemente do tipo X, além das proteínas como osteopontina e metaloproteinase 13. São esses condrócitos os responsáveis por secretar os fatores de crescimento do endotélio vascular que proporcionarão a invasão vascular no centro do

molde cartilaginoso, iniciando o processo de ossificação primária (Kronenberg, 2003; Degnin et al., 2010) (Figura 1).

Com o desenvolvimento do centro de ossificação primária, os condrócitos continuam a se proliferar, ampliando a estrutura cartilaginosa e esta, progressivamente, vai sendo substituída por tecido ósseo dando origem ao osso trabecular (Degnin et al., 2010). Os resquícios do molde cartilaginoso do processo de formação óssea endocondral, se tornará a placa epifisária e a cartilagem articular, que na vida pós-natal são responsáveis por conduzir e determinar o crescimento linear do osso (Las Heras et al., 2012).

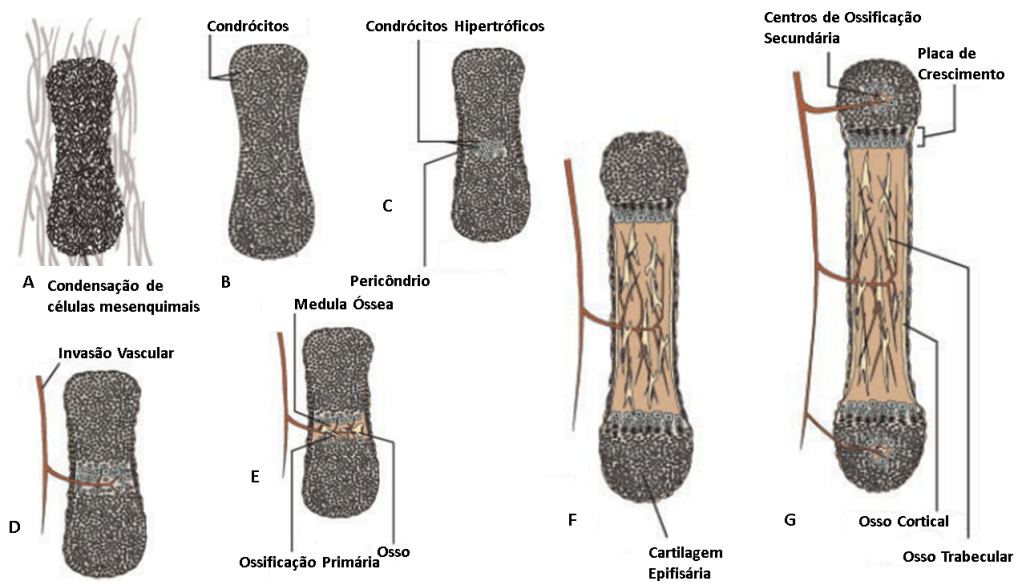


Figura 1. Esquema do processo de formação óssea endocondral. Fonte: Adaptado de Degnin et al. 2010.

Na placa epifisária, os condrócitos se organizam em quatro zonas distintas, cercadas por matriz e são muito bem definidas em morfologia e funções, sendo essas: zona de condrócitos em repouso, zona de condrócitos em proliferação, zona de condrócitos hipertróficos e zona de ossificação primária (Staines et al., 2013). As células da zona de repouso, também denominadas como zona primária ou zona germinativa, são condroblastos pouco diferenciados, pequenos, com citoplasma escasso, dispostos aleatoriamente, com baixo poder de proliferação (Kronenberg, 2003; Staines et al., 2013). À medida em que os condroblastos vão se diferenciando, eles começam a se

multiplicar intensamente e se dispor em colunas, assumindo um formato achatado e com o citoplasma mais vacuolizado, elevando a atividade secretora, produzindo uma matriz rica em colágeno do tipo II e agrecano (Staines et al., 2013). Acredita-se que a orientação colunar dos condrócitos proliferativos, seja determinada por fatores secretados pelos condrócitos da zona de repouso (Abad et al., 2002). Seguindo o processo de amadurecimento e diferenciação, os condrócitos iniciam a etapa de hipertrofia, aumentando o volume celular em cerca de 4 vezes do tamanho original (Staines et al., 2013). Além das mudanças na morfologia, os condrócitos hipertróficos da placa de crescimento, vão gradativamente reduzindo a produção de colágeno do tipo II e aumentando a produção de colágeno do tipo X, além de condronectina, osteopontina e elevando a produção de fosfatase alcalina, sendo essa última, o principal indicador de maturação dos condrócitos hipertróficos (Sun e Kandel, 1999; Staines et al., 2013). Os condrócitos hipertróficos, também são responsáveis por secretar VEGF, induzindo a invasão vascular e posteriormente o início da zona esponjosa primária, com o tecido ósseo primário (Kronenberg, 2003).

➤ *Fatores que interferem na morfologia e atividade dos condrócitos:*

- *Sox-9:*

O Sox-9 é um fator de transcrição gênica da família dos SRY e tem sua função associada a várias etapas do desenvolvimento. No que se refere aos condrócitos, sabe-se que o Sox-9 é intensamente secretado por condrócitos da zona proliferativa e pré-hipertrófica, no entanto, sua expressão é bruscamente reduzida em condrócitos hipertróficos maduros (Hattori et al., 2010). Acredita-se que o Sox-9 seja fundamental durante o processo de diferenciação dos condrócitos, uma vez que estudos utilizando animais transgênicos que não expressavam o Sox-9, verificaram que os condroblastos permaneciam na zona germinativa e não iniciavam o processo de proliferação (Akiyama et al., 2002). Juntamente com o Sox-9, o Sox-5 e o Sox-6, participam auxiliando o Sox-9 na ativação do colágeno do tipo II, fundamental na produção de matriz extracelular (Akiyama et al., 2002; Shi et al., 2015).

- *Runx*

O Runx é um fator de transcrição gênica muito importante no processo de diferenciação e maturação dos condrócitos (Las Heras et al., 2012). Especificamente, o Runx-2 tem seu papel principal na indução da hipertrofia dos condrócitos, inibindo a transcrição do colágeno do tipo II e estimulando o colágeno do tipo X, característico dos condrócitos hipertróficos (Mackie et al., 2011). Estudos com camundongos transgênicos, em que houve inativação do gene Runx-2, mostraram que os animais apresentavam uma zona hipertrófica intensamente reduzida e ausência da produção do colágeno X, indicando que a interação entre os dois fatores, são determinantes para as etapas finais de maturação dos condrócitos nos processos de formação e crescimento ósseos endocondrais (Zheng et al., 2003). Em modelos murinos transgênicos, com hiperestimulação do Runx-2, foi possível observar aceleração da hipertrofia e mineralização nas placas de crescimento, bem como mineralização inclusive nos anéis cartilagosos traqueais (Ueta et al., 2001). O Runx-1 tem um papel menos importante, provavelmente está envolvido nas etapas iniciais de diferenciação dos condrócitos, enquanto que o Runx-3, é apontado com um auxiliar na da hipertrofia juntamente com o Runx-2 (Las Heras et al., 2012). Porém, animais com ausência da expressão do Runx-2, tem uma discreta hipertrofia e maturação, pela expressão dos outros membros da família Runx, sendo um papel auxiliar de menor importância (Kronenberg, 2003).

- *Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)*

Existem diversos tipos de proteínas morfogenéticas ósseas (Bone Morphogenetic Protein) e cada uma delas está associada a etapas diferentes do processo de formação óssea (Kronenberg, 2003). No entanto, sabe-se que a função principal das BMPs está associado à condensação das células mesenquimais, fundamental durante a formação óssea endocondral (Las Heras et al., 2012). Destaca-se o papel desempenhado pela BMP-2 e BMP-6 secretadas pelos condrócitos hipertróficos e que desempenham uma função de estimulação na hipertrofia celular e expressão do colágeno X associado (Caron et al., 2013). Por outro lado, a BMP-7 secretada por condrócitos proliferativos, tem como função principal estimular a proliferação, bem como regular negativamente a hipertrofia e estimular a expressão do colágeno do tipo II (Caron et al., 2013).

- *Fator de crescimento fibroblástico (FGF)*

O fator de crescimento fibroblástico (Fibroblast Growth Factor) também é estudado como um fator de influência sobre o desenvolvimento e crescimento ósseos endocondrais (Kronenberg, 2003). Os FGFs compartilham de uma família com aproximadamente 22 tipos já descritos. De modo genérico, os FGF são conhecidos como estimulantes da proliferação celular associados a inúmeras doenças, inclusive em neoplasias como fibrossarcoma (Sahni et al., 1999). No entanto, no que se refere a proliferação e maturação dos condrócitos, os diferentes tipos de FGFs têm papéis tanto estimulantes quanto inibitórios (Kato e Iwamoto, 1990). O FGF-2 é amplamente expresso nos estágios iniciais de condensação do mesênquima e estudos apontam que a sua sinalização, induz o início da expressão do Sox-9, levando a diferenciação e proliferação dos condrócitos (Kronenberg, 2003).

- *Indian Hedgehog (Ihh) e Peptídeo Relacionado ao PTH (PTHrP)*

O Indian Hedgehog é também um importante fator regulador da proliferação e diferenciação de condrócitos. Esse fator é expresso principalmente por condrócitos pré-hipertróficos e também é considerado um dos importantes fatores que estimulam a hipertrofia dos condrócitos (Kronenberg, 2003). O peptídeo relacionado ao paratormônio é secretado pelas células do pericôndrio e seus receptores estão nos condrócitos proliferativos (St-jacques et al., 1999). A liberação do Ihh por condrócitos pós mitose, quando acontece juntamente com a produção da peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP), ocasiona um feedback negativo sobre a maturação dos condrócitos proliferativos (St-jacques et al., 1999). A liberação do PTHrP permite que os condrócitos continuem a se proliferar e o Ihh sinaliza para que os condrócitos prossigam no processo de maturação. Quando os condrócitos completam o processo de maturação, eles deixam de produzir o Ihh e conseqüentemente o PTHrP, permitindo que outros condrócitos proliferativos avancem no processo de maturação (St-jacques et al., 1999).

- *Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)*

O fator de crescimento do endotélio vascular é um outro importante fator envolvido no processo de formação óssea endocondral (Las Heras et al., 2012). O VEGF é sintetizado

pelos condrócitos hipertróficos e tem como função principal induzir a invasão vascular no tecido cartilaginoso (Las Heras et al., 2012) A invasão vascular, juntamente com a expressão das metaloproteínases (MMP), são fundamentais para promover a apoptose dos condrócitos, degradação da matriz cartilaginosa que posteriormente será substituída por células osteoprogenitoras e matriz óssea, dando continuidade ao processo de formação óssea endocondral (Nagao et al., 2017).

2. Participação das células tronco mesenquimais da medula óssea no crescimento ósseo endocondral e fatores que estimulam e inibem sua diferenciação em osteoblastos

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes capazes de se diferenciar, a partir de um estímulo específico (Caplan, 1991), em várias linhagens como osteogênica, condrogênica, adipogênica, etc, além de possuir alta viabilidade e capacidade de auto-renovação com senescência limitada (Asari et al., 2012). Essas células podem ser encontradas em vários órgãos e a sua quantidade pode variar de acordo com o local. Dentre os principais sítios de CTM tem-se: líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e placenta (Bobiset al., 2006), medula óssea e o tecido adiposo (Murphy et al., 2003).

Estima-se que apenas 0,01% das células obtidas do estroma da medula óssea sejam de fato CTM (Heng et al., 2004). O isolamento das células tronco, leva em consideração, primeiramente, a capacidade das mesmas em se aderirem ao plástico das garrafas de cultivo celular (Payushina et al., 2006), apresentarem morfologia fibroblastóide e capacidade em se diferenciarem principalmente em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Prockop et al., 2001).

Marcadores de membrana celular também se tornam aliados, ao determinar a pureza do cultivo de CTM, no entanto, não são específicos, podendo ser expressos por outros tipos celulares. Entretanto, por meio da combinação entre marcadores expressos e não expressos, pode-se determinar as características fenotípicas da cultura de CTM (Payushina et al., 2006). Pesquisadores têm demonstrado que as CTMs possuem expressão de CD105, CD73, CD90 (Thy-1), CD44, CD71, CD106, CD124, CD54,

CD144, CD166, CD115, CD29, HLA-ABC, Sca-1, RT1A (MHC-I) e Stro-1 (Lin et al. 2013). Em contrapartida, essas células não expressam marcadores de células tronco hematopoiéticas/endoteliais como: CD45, CD34 (Sun et al., 2009).

As CTMs participam do processo de formação da massa óssea de forma contínua desde o processo de formação óssea endocondral onde as mesmas são atraídas ao centro de ossificação primária, se diferenciando em osteoblastos que sintetizarão matriz osteóide (Caplan, 1987; Kronenberg, 2003). Após o nascimento, o osso passa por contínuos processos de remodelação e reparos ao longo de toda a vida do indivíduo e as CTMs têm importante papel ao se diferenciarem em condroblastos ou osteoblastos que participarão do processo de remodelagem e reparo ósseos (Olmsted-Davis et al., 2003).

In vitro, para que ocorra a diferenciação osteogênica das CTM, é preciso que essas sejam cultivadas em um meio específico com fatores indutores dessa diferenciação (Payushina et al., 2006). O meio osteogênico é composto por meio de cultivo básico DMEM acrescido de antifúngico e antibióticos, soro fetal bovino 10%, β -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona (Ocarino et al., 2008; Alves et al., 2016).

A dexametasona age como indutora da fase inicial da diferenciação (Panetta et al., 2009) enquanto o β -glicerofosfato e o ácido ascórbico são necessários para as fases mais tardias onde ocorre a mineralização da matriz extracelular. O ácido ascórbico é um cofator na hidroxilação dos resíduos de lisina e de prolina do colágeno I, aumentando a síntese de proteínas não colagênicas da matriz como a osteocalcina, osteonectina, osteopontina e sialoproteína óssea (Jaiswal et al., 1997; Payushina et al., 2006). A presença da atividade da fosfatase alcalina aliada à formação de nódulos de mineralização, são importantes indicadores de diferenciação osteogênica (Eslaminejad e Taghiyar, 2010).

In vivo, a diferenciação osteogênica das CTM em osteoblastos é dependente de um micro ambiente onde se observa a ação direta de inúmeros fatores que influenciam o metabolismo ósseo, bem como a ação indireta advinda da associação entre esses fatores (Jaiswal et al., 1997; Hanna et al., 2018). Importantes fatores de transcrição gênica atuam durante o processo de diferenciação osteogênica das CTM como o Runx-2, Wnt e osterix, sendo o Wnt o responsável pela indução da fosfatase alcalina (Nakashima et al.,

2002). Já o Osterix tem um papel importante durante o processo de formação óssea, sendo responsável por ativar a degradação da matriz cartilaginosa através da ativação da metaloproteinase 13, além de ativar o Runx-2. Este tem o papel regulador da síntese das proteínas que compõem a matriz óssea colagênica e não colagênica (Nefussi et al., 1997; Nishimura et al., 2012) que desempenham papel chave na formação da matriz óssea (Ortega et al., 2004). Além desses fatores, podemos citar o importante papel osteoindutor das BMPs sendo principalmente as BMP-2, BMP-4, BMP 6, BMP 7 e BMP 9 as de maior importância (Atasoy-Zeybek et al., 2019). Os FGF ou fatores de crescimento fibroblástico são fatores de indução de crescimento celular, comumente avaliados e encontrados em células proliferativas de origem mesenquimal (Sahni et al., 1999). Quando combinados com os BMPs, produzem um efeito sinérgico, capaz de potencializar a proliferação celular das células osteoprogenitoras (Kato & Iwamoto, 1990; Hanada et al., 1997). Fatores endócrinos também contribuem significativamente para a diferenciação osteogênica no processo *in vivo*, sendo os hormônios de crescimento GH, estrógeno, calcitonina, glicocorticoides, testosterona e hormônios da tireóide importantes nesse processo (Datta et al., 2008).

Assim, qualquer substância que diminua o potencial de diferenciação osteogênica das CTMs influenciam, diretamente, a massa óssea devido a redução na síntese de matriz osteóide. Dentre essas substâncias, tem-se o etanol cujo consumo materno durante a gestação e lactação, por meio da ingestão de bebidas alcoólicas tem sido apontado como causa de alterações ósseas como menor perímetro cranial e retardo do crescimento ósseo da prole que se mantém ao longo da vida do indivíduo predispondo-o, até mesmo, ao desenvolvimento de doenças osteoarticulares na fase adulta (Burgos e Medeiros 2002; Giglia, 2010). Porém, os mecanismos pelos quais o etanol causa as alterações na formação e crescimento ósseos são pouco compreendidos.

3. Farmacocinética do etanol nos organismos materno, fetal e neonatal

O etanol é uma substância amplamente consumida em todo o mundo sob a forma de bebidas alcoólicas e seu consumo tem sido associado a uma diversidade de doenças dos sistemas cardiovascular, nervoso, hepático e esquelético, bem como predisposição a alguns tipos de cânceres e desordens psicossociais (WHO, 2018). Além disso, o

consumo de etanol durante a gestação está associado a um conjunto de alterações físicas, psicológicas, sociais, neurológicas e de aprendizagem englobadas na FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*) que abrange, além dos defeitos congênitos da Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) as desordens neuro-psicossociais (Detering et al., 1978; Mesquita e Segre, 2009; Popova et al., 2017). Estima-se que uma em cada 67 mulheres que consumiram bebida alcoólica durante a gestação, dará à luz a uma criança com SAF, o que resulta em cerca de 119.000 indivíduos nascendo com SAF todos os anos na população mundial (Popova et al., 2017).

O etanol ou álcool (C_2H_5OH) é uma molécula psicoativa, pequena, hidrossolúvel que se distribui através de difusão passiva, pois não necessita de outras moléculas para ser transportado, passando através das membranas celulares com relativa facilidade (Jones, 2011; Cederbaum, 2013; Jones, 2019).

A absorção do etanol se inicia ainda na boca em quantidades mínimas no entanto, sua absorção é significativa no estômago, duodeno e jejuno (Jones, 2011). O ambiente estomacal é importante para influenciar a velocidade de absorção do etanol e, sabe-se que sua absorção quando o estômago está cheio é mais lenta quando comparada a ingestão em períodos de jejum (Cederbaum, 2013). A taxa de esvaziamento estomacal elevada favorece o aumento do gradiente de concentração duodenal, contribuindo com uma maior absorção do etanol pelo intestino, sendo essa uma explicação possível para que o etanol seja absorvido mais lentamente quando o estômago está cheio (Cederbaum, 2013).

Devido a grande facilidade de transporte, as moléculas de etanol são perceptíveis no sangue quase imediatamente após a sua ingestão sendo sua concentração, no sangue, denominada de BAC (*blood alcohol concentration*) (Wilkinson, 1980). O equilíbrio das concentrações de etanol no organismo é variável de acordo com a quantidade de sangue que esse tecido recebe bem como, a proporção de água de cada tecido, uma vez que essa molécula é altamente hidrossolúvel e praticamente não se dissolve em gorduras e óleos, além de possuir a capacidade de passar pelas membranas celulares (Cederbaum, 2013). Desta forma é possível entender que tecidos altamente vascularizados e com elevado

conteúdo aquoso tendem a equilibrar as concentrações de etanol mais rapidamente (Jones, 2011).

As proteínas plasmáticas não interferem em sua distribuição, uma vez que o etanol não se liga às moléculas proteicas presentes no plasma sanguíneo (Cederbaum, 2013). Outros fatores estão relacionados à distribuição do álcool pelo organismo, sendo eles a idade, sexo e a massa corporal. Homens tendem a distribuir o etanol ingerido mais rapidamente pelo organismo do que as mulheres, mesmo quando consumido em condições idênticas. Portanto, a maior quantidade de gordura no organismo, faz com que a BAC em mulheres se mantenha elevada por mais tempo que em homens (Wilkinson, 1980; Mumenthaler et al., 1999; Jones, 2011).

Parte da metabolização do etanol se inicia ainda no estômago e é denominado de metabolismo de primeira passagem estomacal (Matsumoto e Fukui, 2002) entretanto, a maior parte da metabolização do etanol acontece no fígado (Jones, 2019). No fígado, sua metabolização ocorre por reações oxidativas e não oxidativas (Agarwal e Goedde, 1990; Seitz e Oneta, 1998; Seitz et al., 1996; Vaglenova et al., 2003, Swift, 2003) sendo as oxidativas realizadas por três vias (Li e Bosron, 1987).

A primeira via, é catalisada pela enzima citossólica álcool desidrogenase (ADH) (DiPadova et al., 1987) localizada no citoplasma de hepatócitos e em sítios extra-hepáticos (Bosron et al., 1993). Ela converte o etanol a acetaldeído, que por sua vez, será catalisado pela enzima mitocondrial aldeído desidrogenase (ALDH) resultando em acetato e NADH. Grande parte do acetato deixa o fígado e circula para os tecidos periféricos, onde será oxidado em Acetil CoA, originando dióxido de carbono e água (Lee et al., 2006).

O sistema microsomal hepático de oxidação do etanol (MEOS) é a segunda via de metabolização realizada pela enzima CYP2E1 (proteínas do complexo do citocromo P-450). Nessa via, há consumo de NADPH e O₂, produzindo H₂O e radicais livres (Zelner e Koren, 2013; Jones, 2019).

A terceira via é a da catalase encontrada na fração peroxisomal. É utilizada quando há necessidade de reduzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e não produz NADH (Deng e Deitrich, 2008).

Em todas as vias, ocorre formação de acetaldeído que por ser tóxico pode estar envolvido em desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e aumento dos radicais livres. Além disso, interfere na cadeia transportadora de elétrons causando alterações mitocondriais e inibindo processos de reparação do DNA (Addolorato et al., 1997) (Figura 2).

O metabolismo não-oxidativo é mínimo, e pode acontecer por pelo menos dois caminhos, em um o etanol reage com ácidos graxos livres em uma reação catalisada por éster etílico de ácido graxo, e a outra leva a formação de fosfátidiletanol através de uma reação do etanol com a enzima fosfolipase D (Laposata, 1999; Best e Laposata, 2003; Zakhari, 2006; Zelner e Koren, 2013).

Diferentemente de outras drogas psicotrópicas, ao ser metabolizado no interior do hepatócito, a molécula de etanol produz energia liberando cerca de 7,1 kcal por grama de etanol e tais calorías, denominadas vazias, estão associadas a redução de consumo de alimento e desnutrição muitas vezes secundária ao consumo contínuo dessa substância (Yeomans, 2010; Jones, 2019) (Figura 2).

A excreção do etanol se dá primordialmente pelo sistema urinário, onde o resultado do metabolismo oxidativo do etanol resulta em acetato e este será excretado através da urina. No entanto, cerca de 2 a 10% do etanol, antes mesmo de ser metabolizado, é eliminado através da respiração, da urina e do suor, sendo a taxa de eliminação por essas vias dependente da taxa de filtração glomerular, frequência respiratória e níveis de concentração sanguínea de etanol (Jones, 2011; Jones, 2019) (Figura 2).

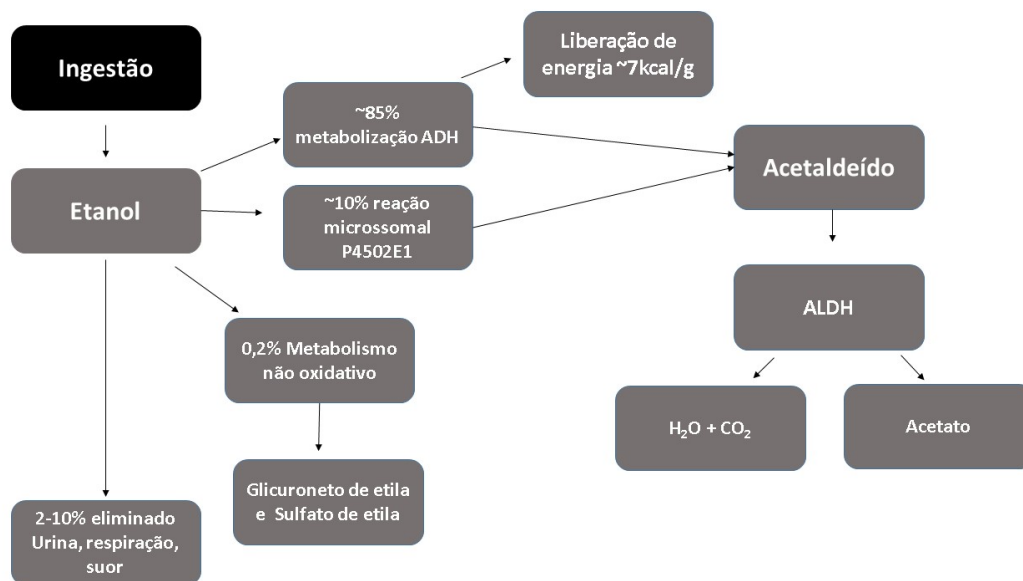


Figura 2. Esquema da farmacocinética do etanol. (Fonte: adaptado de Jones, 2011 e Jones 2019)

Os estudos sobre a farmacocinética do etanol durante a gestação têm implicações éticas significativas e por isso, há décadas, se utilizam modelos animais a fim de se compreender a absorção, distribuição, metabolização e excreção do etanol durante a gestação (Ungerer, 2012).

Durante a gestação, o etanol presente na circulação materna, tem a capacidade de se transferir livremente para a circulação sanguínea placentária, atingindo o feto com concentrações idênticas às da mãe (Idänpään-Heikkilä et al., 1972). Entretanto, o etanol em mulheres gestantes, já foi utilizado com o intuito de prevenir o trabalho de parto prematuro, utilizando-se injeções intravenosas de etanol que levaram a redução da contratilidade uterina, por redução dos níveis de ocitocina maternos (Idänpään-Heikkilä et al., 1972). Ao atravessar a barreira placentária, o etanol é carregado através da circulação sanguínea fetal e tem seu metabolismo hepático semelhantemente ao que ocorre no indivíduo adulto, no entanto mais lento devido às reduzidas quantidades da enzima ADH (Idänpään-Heikkilä et al., 1972). Além disso, o etanol, diluído no líquido amniótico, é recapturado pelo feto, aumentando ainda mais seu tempo de exposição ao álcool (Burd et al., 2012). Como consequência imediata nos fetos, é possível identificar hipoglicemia e alteração do equilíbrio ácido-base devida a ação tóxica do etanol na circulação fetal (Idänpään-Heikkilä et al., 1972).

Além disso sabe-se que o etanol é uma substância teratogênica e que seus efeitos são variáveis de acordo com a fase da gestação em que é consumido: no primeiro trimestre, eleva-se a possibilidade de alterações neurológicas, no segundo trimestre, abortamento e no terceiro trimestre, o risco é mais elevado para deformidades físicas, baixo crescimento e redução do perímetro cranial (Kaup, 2001).

Estudo recente abordando a epigenética e a genética, aponta que existe uma variação individual importante que pode fazer com que os efeitos do etanol sejam mais intensos ou não sobre os fetos, incluindo a quantidade de ADH materno que por sua vez aceleraria a metabolização hepática do etanol, reduzindo a exposição pré-natal (Ramsay, 2010). Apesar de tamanha importância, ainda são escassos os trabalhos que buscam elucidar a farmacocinética do etanol durante a gestação e no feto.

No que se refere a concentração de etanol na placenta, sabe-se que a difusão do etanol pela placenta é livre, devido às elevadas concentrações de água, permitindo que cerca de 1 hora após a ingestão de etanol pela mãe, as concentrações placentárias e BAC sejam idênticas (Burd et al., 2012). Por ser um órgão metabolicamente ativo, estimou-se que talvez a placenta humana pudesse ser um órgão capaz de metabolizar parte do etanol, no entanto tal hipótese não foi confirmada, levando a crer que a placenta serve apenas como um órgão difusor do etanol da mãe para o feto (Burd et al., 2012).

A metabolização do etanol no organismo fetal é reduzida em comparação com o organismo adulto, estimando-se que a principal via de metabolização no feto seja por meio da ADH (Burd et al., 2012). Tal enzima, foi identificada em fetos a partir de 2 meses de gestação em quantidades que variam de 5 a 10% do organismo adulto. Já a P450 foi identificada em fígados fetais entre a 19 e 24ª semana de gestação, com sua atividade reduzida a cerca de 50% da atividade no indivíduo adulto, o que demonstra claramente que o metabolismo do etanol no feto é infinitamente menor, aumentando o risco de sofrer danos tóxicos por etanol (Burd et al., 2012).

Estudo utilizando modelos murinos demonstrou que o etanol também interfere na liberação da ocitocina materna, ocasionando, além da redução da contratilidade uterina já descrita anteriormente, redução na ejeção do leite, sendo este um dado de grande importância para avaliar a saúde dos neonatos (Fuchs, 1969). Outro dado de grande

relevância foi apontado nos estudos de Chen e Nyomba, (2004), em que filhotes de ratos expostos ao etanol durante a gestação, nasceram menores quando comparados ao grupo controle, além de terem desenvolvido um aumento da resistência a insulina e um maior risco de contrair diabetes do tipo II (Chen e Nyomba, 2004).

Durante a amamentação, o etanol se difunde no leite materno devido a sua característica de alta hidrossolubilidade e, por difusão passiva, reflete os níveis sanguíneos de etanol cerca de 30 a 60 minutos após a sua ingestão (Giglia, 2010). Fatores que influenciam a concentração do álcool presente no leite materno são os mesmos já correlacionados como a concentração sanguínea, peso corporal aliado a taxa de gordura e massa magra corporais, além da velocidade do esvaziamento estomacal (Giglia e Binns, 2006; Giglia, 2010). O etanol interfere diretamente sobre as taxas de prolactina maternas, no entanto, apesar de se elevarem imediatamente após o consumo de etanol, as taxas normalizam em poucas horas. Tal fato indica que, provavelmente, a prolactina não seja tão significativa para promover a redução dos níveis de leite materno, sendo provavelmente e taxa de ocitocina materna reduzida de maior importância para promover tal efeito (Mennella e Pepino, 2008).

No entanto, em decorrência de questões éticas, não são possíveis de se realizarem estudos que comprovem os efeitos do etanol na amamentação diretamente em bebês humanos, fazendo-se necessários estudos indiretos em materiais de autópsia, bem como modelos experimentais que tentem esclarecer vias e alterações provocadas pelo consumo de etanol durante a lactação (Barbosa et al., 2011).

Sabe-se que o consumo de etanol durante a gestação afeta o desenvolvimento psicomotor em bebês variando os seus efeitos dose-dependentes (Giglia, 2010).

No que se refere a metabolização do etanol pelos neonatos, estudos demonstram que a capacidade de eliminação e metabolização, ainda que menores que o indivíduo adulto, são quantitativamente maiores que o feto, alterando a capacidade de metabolização para cerca de 83% do organismo adulto (Burd et al., 2012). No entanto, a quantidade de ADH no fígado do recém-nascido é cerca de 10 vezes menor do que a quantidade obtida em fígados de adultos (Tran et al., 2007) sugerindo que outras enzimas possam assumir parte da metabolização hepática do etanol, como por exemplo a catalase, além de se ter

aumento expressivo da taxa de filtração glomerular, associada a eliminação respiratória e pela sudorese e eliminado a via de recaptção do etanol através do líquido amniótico (Burd et al., 2012).

4. Efeitos *in vivo* e *in vitro* do etanol sobre células cartilagenosas, ósseas e células tronco mesenquimais

O etanol é uma substância amplamente consumida em todo o mundo, e seu consumo durante a gestação leva ao desenvolvimento de anomalias físicas englobadas na Síndrome Alcoólica Fetal (SAF) que se manifesta principalmente em deformidades crânio-faciais, baixo crescimento e ganho de peso (Popova et al., 2017).

Uma das hipóteses para tais manifestações é que o etanol interfere diretamente sobre a atividade dos condroblastos/condrócitos que posteriormente servirão de molde cartilagenoso para a formação e crescimento ósseos endocondrais (Pan et al., 2016). Diversos trabalhos buscam elucidar as vias de atuação e os mecanismos pelos quais o etanol interfere na atividade dos condrócitos (Snow e Keiver 2007; Pan et al., 2016; Tamiasso et al., 2019).

Estudos *in vivo*, realizados por Miralles-Flores e Delgado-Baeza (1992) demonstram que a exposição pré-natal ao etanol reduz significativamente o tamanho da placa de crescimento em tíbias de ratos, principalmente pela redução da zona hipertrófica . A redução da zona hipertrófica também foi observada em ratos expostos ao etanol durante a gestação, no entanto, apesar de ossos significativamente mais curtos, a cartilagem de crescimento demonstrava aumento da zona de repouso (Snow e Keiver, 2007). Contudo, os efeitos da exposição pré-natal ao etanol sobre as cartilagens de crescimento são contraditórios. Pan et al. (2016) demonstraram que ratos expostos ao etanol durante a vida intrauterina, apresentaram acúmulo de condrócitos na zona hipertrófica, decorrente de menor capacidade dos mesmos de sofrer apoptose. Os efeitos contraditórios provavelmente se devem aos protocolos de administração materna do etanol, bem como, as doses de etanol administradas e a idade da prole estudada.

In vitro, os efeitos do etanol sobre a cultura de condrócitos também já foram descritos. Condrócitos da cartilagem articular de ratos neonatos cultivados em meio condrogênico com concentrações variáveis de etanol entre 0,05% a 0,5% apresentaram aumento da

produção em matriz cartilaginosa com redução da expressão de agrecan, sendo o efeito mais significativo nas concentrações mais elevadas de etanol, reforçando a hipótese de que as alterações provocadas pelo etanol são dose-dependentes (Tamiasso et al., 2019).

A relação entre o consumo de etanol e seus efeitos nas células ósseas também já foram evidenciados. Os primeiros estudos relacionando consumo crônico de etanol com perda de massa óssea, datam de 1965, por Saville e posteriormente, várias pesquisas foram realizadas com o intuito de descobrir os mecanismos pelos quais o consumo de etanol pode interferir na formação e manutenção da massa óssea (Chavassieux et al., 1993; Gong e Wezeman 2004; Keiver e Weinberg 2004; Simpson et al., 2005; Snow e Keiver 2007).

A interferência do consumo de etanol sobre o metabolismo ósseo já foi avaliada sobre a perspectiva de que o etanol interfere sobre a absorção de nutrientes essenciais para a saúde óssea como cálcio e magnésio além da vitamina D, bem como a interferência negativa sobre os níveis de paratormônio (Laitinen e Valimaki, 1991). Uma avaliação realizada com homens que consumiram álcool regularmente, apontou uma tendência a manifestarem fraturas não traumáticas por esmagamento em vértebras da coluna, além de apresentarem maior tempo para mineralização e formação de ósteons indicando que o consumo regular de etanol afeta diretamente o metabolismo ósseo (Crilly et al., 1988).

Estudos utilizando camundongos que receberam uma dieta líquida rica em etanol, concluíram que o consumo regular de etanol promoveu nesses animais uma redução da espessura do osso trabecular e esponjoso, bem como um afastamento das trabéculas, além da elevação da osteoclastogênese, podendo ser uma outra via importante pelo qual o etanol afeta negativamente a massa óssea (Dai et al., 2000).

CTM derivadas da medula óssea de humanos quando cultivadas em meio de diferenciação osteogênico acrescido de 50mM de etanol, apresentaram redução significativa da diferenciação osteoblástica caracterizada pela menor expressão gênica do colágeno tipo I e menor formação de nódulos de mineralização (Gong e Wezeman, 2004). Resultados semelhantes foram observados por Friday e Howard, (1991) que demonstraram que a adição de etanol em culturas de CTM humanas promoveu redução da proliferação celular e na produção e atividade da fosfatase alcalina, sendo um aspecto

importante para reafirmar a influência negativa do etanol sobre as células ósseas (Friday e Howard, 1991).

Contudo, os efeitos do consumo materno de etanol durante a gestação e lactação sobre o fenótipo e atividade de síntese *in vitro* de condrócitos articulares da prole e sobre o potencial de diferenciação osteogênica *in vitro* das CTM da medula óssea de seus filhotes são desconhecidos.

CAPÍTULO 2

Fenótipo e atividade de síntese de condrócitos articulares mantidos em cultura 2D e 3D in vitro extraídos de ratos neonatos com exposição pré-natal ao consumo materno de etanol

RESUMO

Treze Ratas Wistar adultas gestantes, com 60 dias de idade, foram distribuídas em dois grupos: um tratado com etanol e o outro controle. O grupo etanol recebeu do dia 9 até o final da gestação, diariamente, por sonda oro-gástrica, uma solução de etanol a 40% na dose de 12,5ml/kg e o grupo controle recebeu água destilada. Foram selecionados aleatoriamente quatro neonatos de cada mãe, que foram pesados, medidos pela metodologia *Crown-rump-length* (osso frontal ao sacro) e avaliados quanto as características físicas. Destes neonatos, os condrócitos foram extraídos das cartilagens articulares do fêmur e da tíbia e cultivados em meio condrogênico a 37°C e 5% CO₂. Aos 7, 14 e 21 dias de cultivo, foram realizados os ensaios de atividade da fosfatase alcalina (FA), da conversão do MTT em formazan e porcentagem de células em cultura 2D por campo. Aos 21 dias, foi realizada a porcentagem de áreas PAS⁺ em culturas 3D, assim como a avaliação da expressão dos transcritos gênicos para agrecan, Sox-9, colágeno tipo II, colágeno X, Runx-2 e VEGF pelo RT-PCR em tempo real. Para cada variável, foram calculados a média e o desvio padrão, com comparação das médias pelo teste t de *student*. O peso dos neonatos do grupo etanol foi significativamente menor quando comparado ao controle. O grupo etanol apresentou atividade da FA, conversão do MTT e porcentagem de células significativamente maiores aos 7, 14 e 21 dias. Houve maior expressão de colágeno tipo II e menor expressão do Sox-9 no grupo etanol. Não houve diferença na expressão de agrecan, colágeno X, Runx-2 e VEGF entre grupos. Conclui-se que o consumo de etanol durante a gestação altera o fenótipo e a atividade de síntese dos condrócitos da prole, sendo este um dos mecanismos pelo qual há comprometimento da formação óssea endocondral causada pelo consumo materno de etanol.

Palavras-chave: álcool, cartilagem, condrócitos, gestação, rata

ABSTRACT

Thirteen adult female Wistar rats were divided into two groups: one treated with ethanol and the other control. From the 9th to the end of gestation, the ethanol group received a 40% ethanol solution daily at the dose of 12.5ml / kg, and the control group received distilled water. Four newborns from each mother were randomly selected and weighed (*Crown-rump-length*), measured and evaluated for physical characteristics. From these neonates, the chondrocytes were extracted from the articular cartilages of the femur and tibia and cultivated in a chondrogenic medium at 37°C and 5% CO₂. At 7, 14 and 21 days of cultivation, alkaline phosphatase (FA) activity tests, MTT conversion to formazan and cell percentage per field were performed. At 21 days, the percentage of aerial PAS + in 3D cultures was performed, as well as the evaluation of gene transcript expression for aggrecan, Sox-9, collagen type II, collagen X, Runx-2 and VEGF by real-time RT-PCR. For each variable, the mean and standard deviation were calculated, comparing the means by Student's t-test. The weight of the ethanol group neonates was significantly lower when compared to the control. The ethanol group showed significantly higher AF activity, MTT conversion and cell percentage at 7, 14 and 21 days. There was higher expression of collagen type II and lower expression of Sox-9 in the ethanol group. There was no difference in expression of aggrecan, collagen X, Runx-2 and VEGF between groups. In conclusion, ethanol consumption during pregnancy alters the phenotype and synthesis activity of offspring chondrocytes, which may be one of the mechanisms by which endochondral bone formation is compromised by maternal ethanol consumption.

Keywords: alcohol, cartilage, chondrocytes, pregnancy, rat

INTRODUÇÃO

O processo de formação do esqueleto é complexo e dependente de inúmeros fatores (Simpson et al., 2005). A formação pré-natal e o crescimento pós-natal dos ossos do esqueleto ocorrem pelos processos intra-membranoso ou endocondral (Degnin et al., 2010)

A ossificação ou formação óssea endocondral é o processo de formação intra-uterina ou pré-natal da maioria dos ossos do esqueleto, incluindo dos ossos longos, que se dá a partir de um molde cartilaginoso (Nishimura et al., 2012). Os condrócitos hipertróficos do centro desse molde induzem a invasão vascular por meio da síntese de fatores de crescimento, dentre eles o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Em seguida ocorre a diferenciação das células tronco mesenquimais (CTM) do pericôndrio em osteoblastos, que secretam matriz óssea por sobre o molde cartilaginoso, dando origem à formação dos centros de ossificação no período pré-natal (Kronenberg, 2003). Após o nascimento, os condrócitos da cartilagem articular e da placa epifisária, que são os resquícios desse molde cartilaginoso, continuam proliferando-se e diferenciando-se para promover a ossificação ou crescimento ósseo endocondral pós-natal (Dao et al., 2012). A diferenciação e a maturação das células cartilaginosas da placa epifisária e da cartilagem articular permitem que ocorra a invasão vascular que carrega células tronco mesenquimais e células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos para secretar matriz óssea sob a matriz cartilaginosa, promovendo assim o crescimento ósseo pós-natal (Las Heras et al., 2012).

Diversos fatores de transcrição, dentre eles o Runx2 e o Sox9, são necessários para a adequada formação e crescimento ósseos endocondrais. O Sox9 é essencial para a sobrevivência celular, para a conversão das células condroprogenitoras em condrócitos, para a maturação de condrócitos (Hattori et al., 2010) e para a expressão de agrecan (Kronenberg, 2003) e de colágeno tipo II, sendo este último, o principal componente da matriz extracelular (MEC) (Shi et al., 2015). Posteriormente, à medida que os condrócitos amadurecem e sofrem hipertrofia, tem início a síntese de colágeno tipo X (Castagnola et al., 1986). O fator Runx2 tem importante papel atuando na placa de crescimento, aumentando a proliferação e coordenando a maturação dos condrócitos (Zheng et al., 2003). Sua expressão é elevada no estágio final da condensação celular para a formação do molde cartilaginoso, reduzindo nos condrócitos proliferativos e aumentando novamente nos condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos. A ausência de Runx2 está associada à redução no número de condrócitos hipertróficos e à ineficiência da mineralização da matriz (Kronenberg, 2003).

O controle dessas etapas é fundamental para que a formação e o crescimento ósseos ocorram de maneira adequada. Sabe-se que várias substâncias exógenas podem interferir neste controle ocasionando alterações tanto na formação quanto no crescimento do esqueleto dentre elas o etanol (Burgos e Medeiros, 2002). O etanol ingerido por mulheres gestantes por meio do consumo de bebidas alcoólicas, atravessa a barreira placentária atingindo a circulação fetal (Kaup et al., 2001; Snow e Keiver, 2007). Estudos já comprovaram que a exposição pré-natal ao etanol é responsável por alterações esqueléticas como baixo crescimento fetal e redução do perímetro cranial (Day et al., 2002).

Entretanto, uma limitação dos estudos em seres humanos é a dificuldade em afirmar que as alterações observadas nos indivíduos que sofreram a exposição pré-natal ao etanol (PEE) são decorrentes exclusivamente do etanol, tendo em vista que sua associação a fatores ambientais e ao uso de outras drogas é frequente. Grande parte das mulheres que consome etanol durante a gestação também são tabagistas e o cigarro, por si só, já causa danos ao feto (Dörrie et al., 2014). Por isso e pelas razões éticas que impedem que mulheres gestantes sejam incluídas em determinados experimentos, os modelos murinos tem sido bastante utilizados para esclarecer os danos causados pelo consumo de etanol no período pré-natal (Ni et al., 2018).

Em modelo murino, a PEE causou retardo da ossificação endocondral ocasionado pela descontinuidade do processo de amadurecimento dos condrócitos com conseqüente supressão da osteoclastogênese, fundamental para o processo de formação óssea endocondral (Pan et al., 2016). A PEE é também capaz de alterar a estrutura da cartilagem da tíbia de ratos em crescimento, uma vez que ocorre redução na espessura da zona de repouso e aumento da zona hipertrófica, resultando em ossos mais curtos (Snow e Keiver, 2007). Em outro estudo, constatou-se também que o etanol afeta *in vivo* o desenvolvimento ósseo de formas distintas, dependendo do sítio ósseo, sendo a ulna, o rádio, a tíbia e o sacro de ratos mais sensíveis ao efeito do etanol (Simpson et al., 2005).

Ao contrário da hipótese de que a formação endocondral *in vivo* possa ser afetada por inibição da diferenciação das células tronco em condrócitos, alguns estudos têm

comprovado exatamente o contrário, uma vez que o etanol aumentou *in vitro* a diferenciação condrogênica de células tronco embrionárias (Kulyk e Hoffman, 1996; Hoffman e Kulyk, 1999).

No entanto, apesar das evidências de que o etanol altera a formação e o crescimento endocondral *in vivo*, este parece ser o primeiro estudo que avaliou o fenótipo e a atividade de síntese de condrócitos articulares *in vitro* extraídos de ratos neonatos com exposição pré-natal ao consumo materno de etanol, a fim de compreender a patogênese das alterações da formação óssea endocondral causadas pelo etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, nos laboratórios de Experimentação Animal e Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal do Complexo de Pesquisa Avançada em Medicina Veterinária e no laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob protocolo nº119/16.

Animais e manejo

Foram utilizadas 13 ratas Wistar com dois meses de idade alojadas em caixas plásticas e submetidas ao regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro recebendo ração comercial e água à vontade. Após duas semanas de adaptação, foi realizada citologia vaginal em todas as ratas para identificação da fase do ciclo estral conforme metodologia descrita por Marcondes (2002). As ratas que estavam em fase de proestro ou estro foram colocadas com machos (um macho para cada duas fêmeas) durante o período escuro. A cópula foi confirmada mediante visualização de espermatozoides na citologia vaginal marcando este dia, como o dia zero de gestação. Após a confirmação da cópula, as ratas foram separadas em caixas individuais constituindo dois grupos experimentais: 1) grupo controle (n=6) e 2) grupo etanol (n=7). As ratas do grupo 2, a partir do nono dia de gestação, receberam por gavagem diária, solução de etanol a 40%

(12,5 mL /Kg PV totalizando 4g de etanol/kg segundo Pan et al., 2016) duas horas após o início do ciclo claro. O grupo controle recebeu água destilada como placebo no mesmo esquema posológico. Todos os animais foram pesados nos dias 0 , 9 e 18 de gestação. As ratas foram avaliadas quanto a quaisquer alterações de comportamento, como excitabilidade, agressividade e letargia excessiva durante todo o período experimental. O consumo diário de ração por animal e o ganho de peso foram determinados ao longo de todo o periodo experimental. No dia do parto, todos neonatos foram avaliados a fim de se identificar quaisquer deformidades físicas ou alterações de comportamento. Foram selecionados, aleatoriamente, quatro neonatos de cada mãe e os mesmos foram eutanasiados com sobredose de Tiopental (100 mg/Kg) por via intraperitoneal, medidas pela metodologia *Crown-rump-length* (osso frontal ao sacro) e pesados.

Consumo diário de ração das ratas (g)

A partir do zero dia de gestação durante seis semanas, as ratas receberam 500g de ração disponível à vontade. A cada sete dias as sobras foram pesadas para se estabelecer uma média da quantidade consumida por dia em gramas por animal e por grupo sucessivamente. A média e o desvio padrão foram determinados para cada grupo.

Ganho de peso das ratas (g)

Nos dias 0, 9 e 18 dias de gestação, as ratas foram pesadas para se estabelecer o ganho de peso em gramas de cada rata por grupo. A média e o desvio padrão foram determinados para cada grupo.

Extração e cultivo em meio condrogênico dos condrócitos da cartilagem articular dos neonatos

Foi realizada antissepsia da pele dos neonatos com solução de iodopolvidona e álcool iodado para extração dos membros pélvicos. As cartilagens articulares das cabeças dos fêmures e das extremidades proximais das tíbias foram extraídas, lavadas com uma solução de tampão fosfato salino (PBS) 0,15M e em seguida, fragmentadas e colocadas em meio DMEM baixa glicose acrescido de gentamicina (60 mg/L), penicilina

(100UI/mL), estreptomicina (100mg/mL), anfotericina B (25mg/L), 5% de soro fetal bovino (SFB- Sorali, Brasil) e colagenase tipo I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1,5 mg/mL. Os fragmentos de cartilagem foram incubados em estufa a 5% de CO₂ e 37°C por 12 horas.

Após esse período, o material foi centrifugado por 10 minutos, a 2000g lavado com PBS 0,15M e, novamente centrifugado por 10 minutos a 2000g. Os *pellets* foram ressuspensos em meio condrogênico contendo DMEM baixa glicose enriquecido de gentamicina (60 mg/L), penicilina (100UI/mL), estreptomicina (100mg/mL) e anfotericina B (25mg/L), 1% de soro fetal bovino, ácido ascórbico (50µg/mL), dexametasona (10⁻⁷M), 6,25 µg/mL de insulina, 6,25 µg/mL de transferrina, 1mM de piruvato e 1,25 µg/mL de BSA e transferidos para garrafas de cultivo T-25 e cultivados em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após, confluência de 80 a 90 % as células foram repicadas e transferidas para garrafas T-75 sendo novamente repicadas até a terceira passagem. A troca de meio foi realizada duas vezes por semana.

Aos sete, 14 e 21 dias de cultivo 2D em meio condrogênico, foram realizados os testes de conversão do MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina e porcentagem de células por campo. Aos 21 dias, foram realizadas a porcentagem de áreas PAS⁺ em cultura 3D e a quantificação dos transcritos gênicos para agrecan, Sox-9, colágeno tipo II, colágeno X, Runx-2 e VEGF pelo RT-PCR em tempo real.

Teste de conversão do MTT em cristais de formazan

As células foram transferidas para placas de cultivo de 24 poços na concentração de 2 × 10⁴ células por poço. O teste de conversão de MTT {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]*} em cristais de formazan foi realizado aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio condrogênico. Foram utilizados 210 µL de meio condrogênico e 170 µL de MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)(5mg/mL). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 2 horas o que permitiu observar ao microscópio óptico a formação dos cristais de formazan. Em seguida, foram adicionados 210µL de SDS – 10% HCl e novamente incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 12 horas. No dia seguinte, foram transferidos 100 µL de cada poço para placas de 96 poços e a leitura ocorreu em espectrofotômetro com comprimento de onda

de 595 nm. A média e o desvio padrão foram calculados em sextuplicata para cada grupo experimental.

Teste da atividade da fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT

As células foram transferidas para placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 células por poço. Após 7, 14 e 21 dias de cultivo, os meios de cultivo foram removidos e cada poço foi lavado com solução de PBS 0,15 M estéril e foram adicionados 200 μ L de solução BCIP/NBT (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4 mL de NBT {nitro-blue tetrazoliumchloride} e 3,3mL de BCIP {5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidinesalt}). As placas foram incubadas em estufa a 5% CO₂ e 37°C por 2 horas. Após esse período, foram adicionados 210 μ L de SDS 10% HCl e novamente incubadas em estufa por 12 horas. Após este período, foram transferidos de cada poço, 100 μ L para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 595 nm. As médias e desvio padrão foram calculados em sextuplicada para cada grupo experimental.

Porcentagem de área coberta por células em monocamada (cultura 2D)

As células foram transferidas para placas de 24 poços contendo lamínulas plásticas de 13mm de diâmetro na concentração de 2×10^4 células por poço. Após 7, 14 e 21 dias de cultivo, as lamínulas foram lavadas duas vezes com solução de PBS 0,15M e fixadas com solução de paraformoldeído 4% por 24 horas. Posteriormente, foram lavadas com água destilada e coradas pela coloração de ácido periódico Schiff (PAS). A porcentagem de área coberta por células foi determinada em 8 campos na objetiva de 10 x, com o uso da grátícula de 121 pontos. As médias e desvio padrão foram calculados em sextuplicata para cada grupo experimental.

Porcentagem de áreas PAS positivas em cultura 3D

As células foram transferidas para tubos falcon de 15 mL, na concentração de $1,5 \times 10^6$ células por tubo e centrifugadas a 2000g por 10 minutos. As células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 21 dias. Após esse período, o meio foi removido e os *pellets* foram lavados com solução de PBS 0,15M por duas vezes e em seguida, fixados em parafolmoldeído 4% por 24 horas. Após este período, os *pellets* foram

desidratados em uma sequência de álcoois em concentração seriada iniciando em 70% a 100% e posteriormente, incluídos em parafina. Os *pellets* foram cortados em micrótomo em espessura de 4 micrômetros e corados pelo PAS. As áreas PAS⁺ foram determinadas utilizando-se microscópio óptico e grátula de 121 pontos, por 2 campos, visualizados em objetiva de 40x. As médias e desvio padrão foram calculados em sextuplicata para cada grupo experimental.

Avaliação da expressão dos transcritos gênicos *agrecan*, *Sox-9*, colágeno tipo II, colágeno X *Runx-2* e *VEGF* pelo RT-PCR em tempo real.

As células foram transferidas para garrafas T-25 na concentração de 25×10^4 células por garrafa e mantidas em meio condrogênico por um período de 21 dias. O processo resumido incluiu utilizar 1 µg de RNA, extraídos pelo trizol, para a síntese de cDNA utilizando o Kit Super Script III Platinum Two-Step qPCR kit com SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O q- RT-PCR foi realizado em termociclador Smart Cycler II (Cepheid, Carpinteria, CA, USA). A primeira etapa de amplificação de q-RT-PCR foi iniciada com a transcrição reversa por 120 segundos a 50°C, seguido por PCR com os seguintes parâmetros 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Ao final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram utilizados para obtenção dos valores CT. A expressão gênica foi calculada utilizando $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde os valores das amostras foram calculadas em relação ao GAPDH C_t. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (tabela 1). A média e o desvio padrão foram determinados em quadruplicata para cada grupo experimental.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo Real

Gene	Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')	Nº acesso
GAPDH	<i>forward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA <i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM_002046
Agregano	<i>forward</i> : CACACGCTACACACTGGACT <i>reverse</i> : TCACACTGGTGGAAAGCCATC	NM_022190.1
Colágeno tipo II	<i>forward</i> : GTTCACGTACACTGCCCTGA <i>reverse</i> : AAGGCGTGAGGTCTTCTGTG	NM_012929.1
Runx-2	<i>forward</i> : GCGTCAACACCATCATTCTG <i>reverse</i> : CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348
Sox-9	<i>forward</i> : CCCGATCTGAAGAAGGAGAGC <i>reverse</i> : GTTCTTCACCGACTTCCTCCG	NW_0473432
VEGF	<i>forward</i> : GCCCAGACGGGGTGGAGAGT <i>reverse</i> : AGGGTTGCCAGGCTGGGAA	NW_00111033.1
Colágeno X	<i>forward</i> : GAAACAGGTGTCTGACTTAC <i>reverse</i> : TACTTCCAGTGGAATAGAAG	XM_001053056.3

Análise Estatística

O delineamento foi realizado inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste t *student* utilizando o programa *GraphpadInstat* 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Consumo diário de ração das ratas(g) e ganho de peso das ratas (g)

As ratas de ambos os grupos experimentais não apresentaram alterações de comportamento quando comparadas ao grupo controle. O grupo de ratas que recebeu etanol apresentou consumo diário de ração significativamente menor quando comparado ao controle. Entretanto, não houve diferença significativa no ganho de peso dos animais. Além disso, o tempo de gestação e o tamanho da ninhada também não diferiram significativamente entre grupos (Tabela 2).

Tabela 2 . Média e desvio padrão do consumo diário de ração, ganho de peso do início ao final da mãe, tempo de gestação (dias), e tamanho da ninhada das ratas submetidas (grupo etanol) ou não (grupo controle) ao consumo de etanol a partir do nono dia de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Etanol
Consumo diário de ração (g)	32,5 ± 1,2 A	27,4 ± 2,5 B
Ganho de peso (mãe) do início ao final da gestação (g)	58,6 ± 3,7 A	60,2 ± 10,5 A
Tempo de gestação (dias)	21,3 ± 0,5 A	22,0 ± 0,0 A
Tamanho da ninhada	10,0 ± 0,0 A	10,4 ± 2,0 A

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$).

Peso e medidas dos neonatos

O peso dos neonatos das mães que receberam etanol foi significativamente menor quando comparado ao peso dos neonatos do grupo controle (Tabela 3). Entretanto, não houve diferença estatística quanto a medida dos neonatos na comparação entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Média e desvio padrão do peso (g) e comprimento dos neonatos das ratas submetidas (grupo etanol) ou não (grupo controle) ao consumo de etanol a partir do nono dia de gestação

Variável	Grupo	
	Controle	Etanol
Peso dos neonatos(g)	6,5 ± 0,16A	6,06 ± 0,09B
Comprimento dos neonatos (cm)	4,73 ± 0,04A	4,82 ± 0,07A

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p \leq 0,05$)

Conversão do MTT em cristais de formazan e atividade da fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT

Os condrócitos do grupo etanol apresentaram maior conversão do MTT em cristais de formazan quando comparado ao grupo controle aos 7, 14 e 21 dias de cultivo (Figura 3A). O mesmo resultado foi observado na atividade de fosfatase alcalina, o qual o grupo etanol apresentou maior atividade quando comparado ao grupo controle aos 7, 14 e 21 dias de cultivo (Figura 3B).

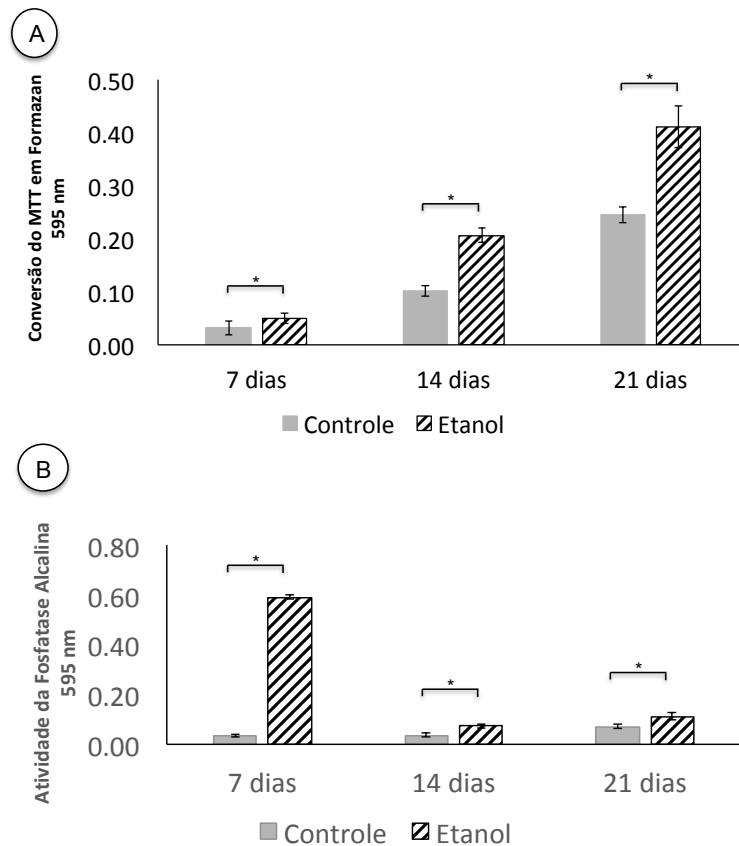


Figura 3. Culturas de condrócitos de neonatos filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio condrogênico. A) Média e desvio padrão da redução do MTT em cristais de formazan. B) Média e desvio padrão da atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT. * $p < 0,05$.

Porcentagem de áreas cobertas por células em cultura de condrócitos em monocamada (2D) e porcentagem de áreas PAS positivas por campo em cultura 3D de condrócitos

As culturas do grupo etanol apresentaram porcentagem de área coberta por células significativamente maior em comparação a cultura do grupo controle aos 7, 14 e 21 dias de cultivo (Figura 4). Na cultura tridimensional não houve diferença significativa entre grupos na porcentagem de áreas PAS⁺ (Figura 5).

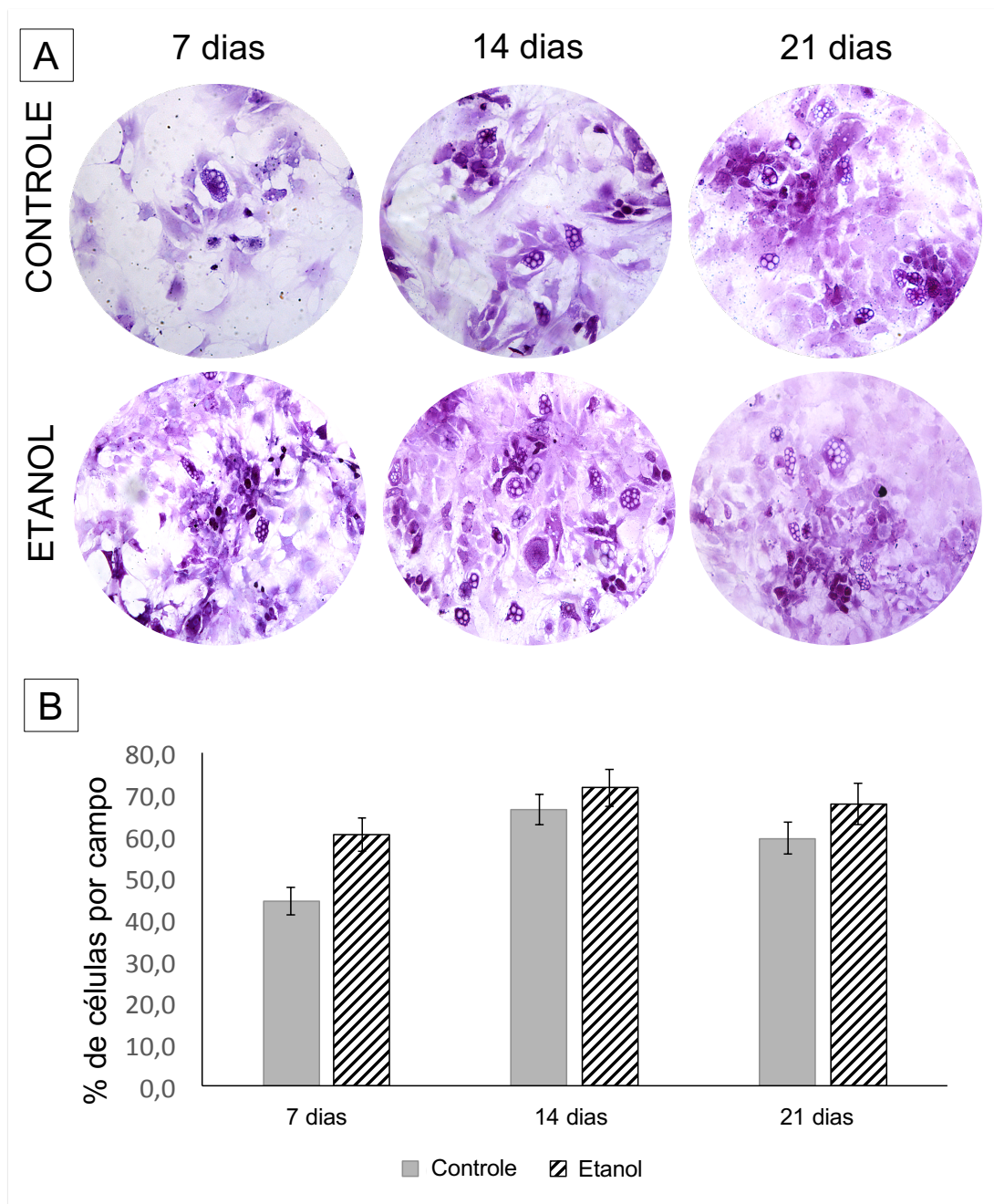


Figura 4. (A) Fotomicroscopia da porcentagem de área coberta por células nas culturas em monocamada (2D) de condrócitos de neonatos filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio condrogênico. B) Média e desvio padrão da porcentagem de área coberta por células dos grupos controle e etanol. * $p < 0,05$.

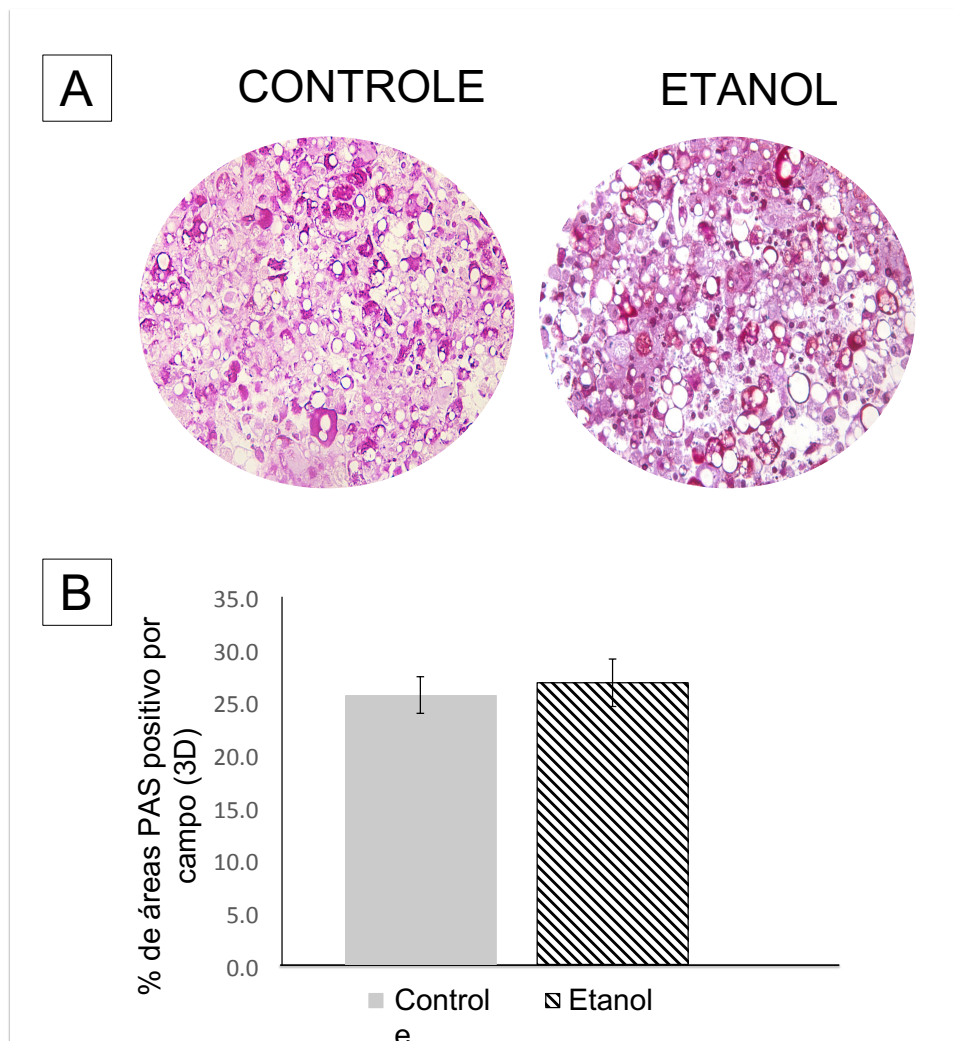


Figura 5. (A) Fotomicroscopia da porcentagem de área PAS positivas de culturas em 3D de condrócitos de neonatos filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação aos 21 dias de cultivo em meio condrogênico. B) Média e desvio padrão da porcentagem de área PAS positivas dos grupos controle e etanol. $p > 0,05$.

Avaliação da expressão dos transcritos gênicos agrecano, Sox-9, Colágeno tipo II, colágeno X, Runx-2 e VEGF pelo RT-PCR em tempo real.

Não houve diferença estatística entre a expressão dos transcritos gênicos agrecano, Runx-2, colágeno X e VEGF do grupo etanol quando comparado ao grupo controle. Entretanto, houve maior expressão do transcrito gênico colágeno tipo II no grupo etanol quando comparado ao grupo controle e menor expressão Sox-9 no grupo etanol quando comparado ao grupo controle (Figura 6).

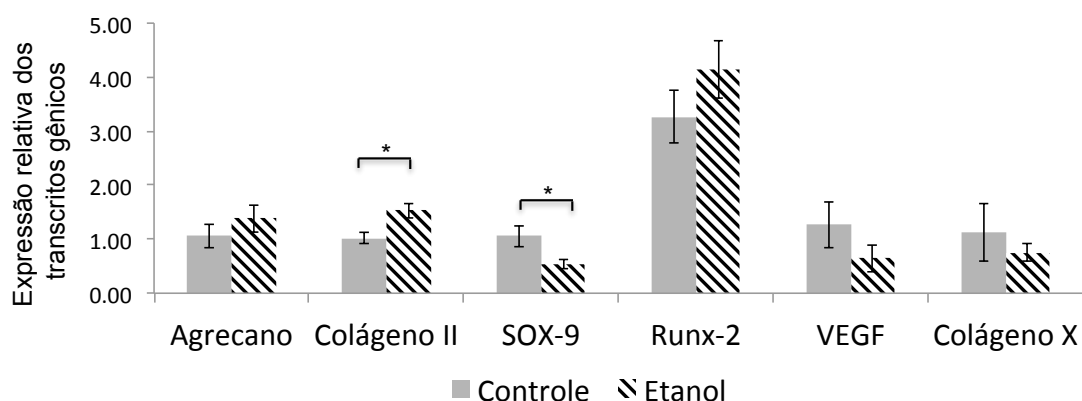


Figura 6. Quantificação relativa da expressão gênica (média \pm desvio padrão) em culturas de condrócitos de neonatos filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação aos 21 dias de cultivo em meio condrogênico. * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Os efeitos do etanol são considerados dose-dependentes (Dyer et al., 1998), ou seja, podem variar de acordo com o volume consumido diariamente, sendo classificado como consumo discreto, moderado ou intenso (Ganry et al., 2000). No presente estudo, as ratas do grupo etanol receberam uma dose diária considerada intensa durante a gestação o que promoveu redução de peso dos neonatos e alterrou o fenótipo e a atividade de síntese dos condrócitos da prole, podendo ser este um dos mecanismos pelo qual há comprometimento da formação óssea endocondral causada pelo consumo materno de etanol.

Em relação ao tamanho da ninhada e ganho de peso das mães durante a gestação, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Diferentemente, Abel (1978), demonstrou redução no ganho de peso das ratas submetidas à ingestão de etanol do primeiro ao último dia de gestação e com metade da concentração alcoólica utilizada no presente experimento, além de redução do tamanho da ninhada. No presente estudo, apesar de não ter sido observada diferença significativa no tamanho dos filhotes, os neonatos do grupo etanol foram significativamente mais leves quando comparados aos do grupo controle. Acredita-se que o peso reduzido dos neonatos do grupo etanol possa estar associado a uma menor massa óssea ao nascimento. Essa suspeita se apoia em

resultados demonstrados por Pan et al. (2016), que, utilizando metodologia idêntica ao do presente estudo avaliando fetos de 20 dias de gestação, apontaram redução intensa da matriz óssea associada a redução do comprimento femoral devido ao acúmulo significativo de condrócitos da zona hipertrófica da cartilagem de crescimento nos animais que foram submetidos ao efeito do etanol na vida intra-uterina.

Os efeitos do consumo materno de etanol sobre a histomorfometria de condrócitos das cartilagens de crescimento da prole tem sido estudados (Simpson et al., 2005; Snow e Keiver, 2007; Pan et al., 2016). Miralles-flores e Delgado-Baeza (1992) demonstraram que ratos com 15 dias, filhos de mães que receberam dieta líquida com 36% de solução alcoólica dos 30 dias antes da gestação até o final da lactação, apresentaram redução expressiva do tamanho da placa de crescimento decorrente da redução significativa dos condrócitos hipertróficos. Já Snow e Keiver (2007) demonstraram em ratos com 21 dias que foram submetidos ao efeito intra-uterino do etanol, redução intensa da zona de repouso e acúmulo anormal dos condrócitos da zona hipertrófica. A heterogeneidade de resultados provavelmente se deve à diferenças metodológicas quanto às concentrações da solução alcoólica administrada para a mãe bem como o período de administração e a idade da prole estudada.

Os condrócitos do grupo que recebeu etanol, apresentaram maior conversão de MTT em cristais de formazan, em todos os tempos avaliados o mesmo acontecendo com a atividade de fosfatase alcalina e a porcentagem de área coberta por células. Tanto o ensaio de MTT quanto de atividade de fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT são testes colorimétricos e influenciados pelo número de células na cultura. Ficou evidente que a cultura dos condrócitos do grupo etanol apresentou maior cobertura celular quando comparado ao grupo controle, em todos os períodos estudados demonstrando maior atividade proliferativa ou menor apoptose dos condrócitos justificando os maiores valores de MTT e atividade de FA.

Apesar da maior celularidade da cultura observada no grupo etanol, não houve diferença significativa entre grupos na porcentagem de áreas PAS⁺ que refletem o conteúdo de proteoglicanos da matriz. Sabe-se que os condrócitos em proliferação são responsáveis pela síntese da matriz cartilaginosa rica em proteoglicano e colágeno do tipo II

(Kronenberg, 2003). A medida em que os condrócitos se hipertrofiam, a síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II reduz, dando lugar a síntese do colágeno do tipo X (Kronenberg, 2003). A expressão relativa do transcrito agrecan semelhante entre os grupos pode justificar o conteúdo de proteoglicanos semelhante uma vez que o agrecan é o principal proteoglicano presente na cartilagem. Apesar disso, a expressão relativa de colágeno tipo II foi significativamente superior no grupo etanol.

A matriz cartilaginosa é composta principalmente por fibrilas de colágeno associadas a macromoléculas de proteoglicanos que se ligam a moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados. A expressão dos diferentes tipos de colágeno durante a condrogênese ocorre de forma temporal e de acordo com o nível de diferenciação celular. Observa-se expressão inicial de colágeno I pela células indiferenciadas, seguida pelo colágeno tipo II pelas células em proliferação e finalmente colágeno X pelas células maduras. Entretanto, o colágeno tipo II é o que predomina na cartilagem articular. A síntese do colágeno tipo II é mais intensa nos estágios iniciais da formação óssea endocondral, sendo este colágeno responsável por conferir resistência a cartilagem (Shinomura et al., 2012). A medida em que esses condrócitos vão amadurecendo e hipertrofiando, a síntese de colágeno tipo II vai reduzindo e sendo substituída pelo colágeno tipo X (Castagnola et al., 1986; Kronenberg, 2003).

Estudos *in vitro* demonstram que células mesenquimais, derivadas dos primórdios faciais em embriões de galinha aos 21 dias, apresentam maior diferenciação condrogênica quando cultivadas com etanol mediante aumento da expressão de agrecan e colágeno tipo II (Hoffman e Kulyk 1999). *In vitro*, a adição de etanol em culturas de condrócitos de ratos neonatos cultivadas com adição de etanol, apresentaram alteração do fenótipo e da atividade de síntese devido a redução da atividade de fosfatase alcalina, redução de matriz PAS positiva e diminuição de expressão de agrecan e que esses efeitos foram dose dependentes (Tamiasso, et al., 2019). Entretanto, nenhum estudo avaliou os efeitos do consumo materno de etanol sobre o fenótipo e atividade de síntese, *in vitro*, de condrócitos articulares da prole ao nascimento objetivo do presente estudo. Provavelmente, além dos efeitos dose e período dependentes, os efeitos do etanol diferem sobre o tipo de célula cultivada. O grupo etanol demonstrou menor expressão de Sox -9 quando comparada a do grupo controle. O Sox-9 é um transcrito gênico

fundamental nas etapas iniciais relacionadas a diferenciação, proliferação e maturação dos condrócitos, iniciando o processo de hipertrofia (Akiyama et al., 2002; Kronenberg, 2003). No entanto, a medida em que os condrócitos bem diferenciados se hipertrofiam, o Sox-9 diminui a sua expressão (Yano et al., 2005; Shi et al., 2015). É imprescindível que haja a redução da expressão do SOX-9 para que haja hipertrofia dos condrócitos, bem como subsequentemente a expressão de VEGF (Hattori et al., 2010). Ao correlacionar os resultados de menor expressão do transcrito Sox-9 com a maior expressão do colágeno tipo II, podemos supor que a exposição pré-natal ao etanol leva a diferenciação e proliferação dos condrócitos, sem contudo, atingir o ápice de maturidade dos condrócitos hipertróficos.

Não houve diferença estatística em relação a expressão dos transcritos gênicos Runx-2 e VEGF. Sabe-se que o Runx-2 e o VEGF são transcritos gênicos importantes no processo de formação óssea endocondral. O Runx-2 atua no processo de maturação dos condrócitos, e que, juntamente com a fosfatase alcalina, atua como marcador importante de condrócitos hipertróficos, tendo o papel fundamental na condensação celular que dará origem ao molde cartilaginoso que será posteriormente substituído por tecido ósseo (Zheng et al., 2003; Garimella et al., 2004). Já o VEGF tem como função principal desencadear a invasão vascular no final do processo de hipertrofia e maturação dos condrócitos (Degnin et al., 2010), propiciando assim a chegada de células tronco mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos, bem como a presença de condroclastos necessários para a fagocitose da matriz cartilaginosa e dos condrócitos apoptóticos (Simpson et al., 2005). Portanto, com base nos resultados obtidos, o etanol parece não interferir na expressão desses transcritos gênicos, ou que no momento avaliado, tais fatores não estivessem mais com sua expressão aumentada.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o consumo de etanol durante a gestação altera o fenótipo e a atividade de síntese dos condrócitos da prole, por aumentar a porcentagem de células em culturas 2D bem como a conversão do MTT em cristais de formazan a atividade da fosfatase alcalina, além de reduzir a expressão do Sox-9 e aumentar a expressão do colágeno II, podendo ser este um dos mecanismos pelo qual há comprometimento da formação óssea endocondral causada pelo consumo materno de etanol.

CAPÍTULO 3

Efeito do consumo materno de etanol durante a gestação e lactação sobre a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais de medula óssea de ratos ao desmame

RESUMO

Foram utilizadas 13 ratas Wistar adultas distribuídas em dois grupos experimentais, grupo controle e o grupo tratado com etanol. As ratas do grupo etanol e controle, receberam por gavagem diária, a partir do nono dia de gestação, solução alcoólica 40%, correspondendo a dose de 4g/kg e água destilada, respectivamente até o trigésimo dia de lactação. No trigésimo dia de lactação três filhotes por fêmea foram eutanasiados para ser avaliado o efeito do consumo materno de etanol durante a gestação e lactação sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) dos filhotes. As CTM-MO foram extraídas do fêmur e tíbia e cultivadas em meio osteogênico por 7, 14 e 21 dias. Foram realizados os testes de conversão do MTT, atividade de fosfatase alcalina e porcentagem de células. Aos 21 dias, foram realizadas a quantificação do tamanho médio dos nódulos mineralizados, bem como % área média mineralizada por nódulo e número de nódulos por lamínula e a quantificação dos transcritos gênicos para osteopontina, osteocalcina, BMP-2, Runx-2 e colágeno tipo I por RT-PCR em tempo real. As médias foram comparadas pelo teste de SNK e as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$. O peso dos filhotes das mães

que receberam etanol foi significativamente menor quando comparado ao controle. As CTM do grupo etanol apresentaram menor conversão de MTT aos sete dias de diferenciação osteogênica porém maior atividade de fosfatase alcalina e maior porcentagem de células aos 14 e 21 dias em relação ao controle. Não houve diferença no número de nódulos mineralizados apesar da maior expressão de BMP-2, osteopontina e osteocalcina no grupo etanol. Conclui-se que o consumo materno de etanol durante a gestação e lactação aumenta, *in vitro* o potencial de diferenciação osteogênica das CTM-MO da prole, por aumentar a área média mineralizada por nódulo assim como aumentar a expressão dos transcriptos gênicos osteocalcina, osteopontina e BMP-2.

Palavras-chave: álcool, células tronco, diferenciação osteogênica, gestação, lactação

ABSTRACT

Thirteen adult female Wistar rats were divided into two experimental groups, the control group and the ethanol-treated group. The rats of the ethanol and control group received by daily gavage, from the ninth day of gestation, 40% alcohol solution and distilled water, respectively until the thirtieth day of lactation. On the thirtieth day of lactation three pups per female were euthanized. To evaluate the effect of maternal ethanol consumption during pregnancy and lactation on osteogenic differentiation of pups' bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs). The BMMSCs were extracted from the pelvic limbs and cultured in osteogenic medium for seven, 14 and 21 days. MTT conversion, alkaline phosphatase activity and cell percentage tests were performed. At 21 days, the average size of the mineralized nodules was quantified and the gene transcripts were quantified for osteopontin, osteocalcin, BMP-2, Runx-2 and collagen I by real-time RT-PCR. Means were compared by test t and differences were considered significant if $p < 0.05$. The weight of the puppies of the mothers who received ethanol was significantly lower when compared to the control. The ethanol group BMMSCs showed lower MTT conversion at seven days of osteogenic differentiation but higher alkaline phosphatase activity and higher percentage of cells at 14 and 21 days compared to control. There was no difference in the number of mineralized nodules despite the higher expression of BMP-2, osteopontin and osteocalcin in the ethanol group. It is concluded that maternal ethanol consumption

during pregnancy and lactation increases *in vitro* the potential for osteogenic differentiation of offspring BMMSCs from weaning by increasing bone matrix synthesis and mineralization.

Keyword: alcohol, stem cells, osteogenic differentiation, pregnancy, lactation

INTRODUÇÃO

O crescimento ósseo pós-natal se dá por meio de três tipos de crescimento sendo o endocondral que ocorre basicamente por meio da cartilagem articular e placa epifisária e os crescimentos intramembranoso e aposicional (Serakides, 2016).

Após o nascimento, os condrócitos da cartilagem articular e da placa epifisária, proliferam-se e diferenciam-se para promover a ossificação ou crescimento ósseo endocondral pós-natal (Dao et al., 2012). A placa epifisária é composta pelas zonas de repouso, proliferação, pré-hipertrófica e hipertrófica. Já a cartilagem articular é formada pelas zonas superficial, média e profunda (Camarero-Espinosa et al., 2016). A diferenciação e a maturação das células cartilaginosas da placa epifisária e da cartilagem articular permitem que ocorra a invasão vascular que carrega células tronco mesenquimais e células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos para sintetizar matriz osteóide sob a matriz cartilaginosa, promovendo assim o crescimento ósseo pós-natal (Las Heras et al., 2012). Cerca de 90% da matriz osteóide é formada por colágeno tipo I e o restante por proteínas não colagênicas dentre elas a osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea e fosfatase alcalina (Roach, 1994). Essas proteínas são essenciais para a mineralização da matriz osteóide e são consideradas marcadores da diferenciação osteogênica *in vitro*.

Vários fatores influenciam o crescimento ósseo endocondral, como fatores genéticos, hormonais e nutricionais (Kronenberg, 2003). Sabe-se que o consumo materno de algumas substâncias durante o período lactacional pode promover alterações no crescimento da prole de forma direta e indireta. A forma direta se dá pela transferência da substância para a prole através do leite e a forma indireta por modificar a

constituição do leite e/ou capacidade de ejeção ou sucção do mesmo e por comprometer a absorção intestinal de nutrientes (Giglia, 2010 ; Valsoni et al., 2011; Jansson, 2018; Reis et al., 2018).

Uma destas substâncias é o etanol consumido por mulheres lactantes por meio de ingestão de bebidas alcoólicas (Dörrie et al., 2014). Sabe-se que o etanol está presente no leite materno em concentrações semelhantes às do sangue (Messias et al., 2006) e, acredita-se que seu efeito deletério no crescimento ósseo pós-natal se deva também a menor capacidade de sucção pelo filhote (Murillo-Fuentes et al., 2001) associada à falha na ejeção do leite devido a atividade supressora do etanol sobre a liberação de ocitocina materna (Giglia, 2010). Além disso, ele prejudica a absorção e o metabolismo de vitaminas e minerais, agravando ainda mais o quadro de má nutrição (Murillo-Fuentes et al., 2001).

Apesar dos efeitos conhecidos, os mecanismos pelos quais a exposição pós-natal ao etanol causa as alterações esqueléticas como redução do perímetro cranial, baixo crescimento fetal e pós natal são pouco esclarecidos. Nossa hipótese é que essa substância compromete o crescimento ósseo endocondral, bem como o crescimento aposicional, por alterar a capacidade de diferenciação osteogênica das CTM-MO em osteoblastos comprometendo a síntese de matriz osteóide por sobre o arcabouço cartilaginoso comprometendo o crescimento ósseo longitudinal.

In vitro, estudos demonstraram que a adição do etanol em culturas de células tronco mesenquimais humanas, promoveu efeitos deletérios significativos como aumento da senescência prematura das células, bem como, menor potencial de diferenciação osteogênica quando comparadas ao grupo controle (Chen et al., 2017). Gong e Wezeman, (2004) demonstraram que CTM tratadas com etanol manifestaram redução expressiva dos nódulos de mineralização bem como redução da expressão gênica para genes importantes durante o processo de ossificação como a fosfatase alcalina, osteocalcina e colágeno tipo I, indicando que o etanol tem influência negativa importante sobre a osteogênese em seres humanos. O efeito negativo também foi descrito em culturas de osteoblastos humanos onde promoveu efeito inibitório sobre a atividade da

fosfatase alcalina e redução da expressão de osteocalcina porém, os resultados obtidos foram dose e tempo dependentes (Chavassieux et al., 1993).

Estudos *in vitro*, por promoverem um microambiente, se limitam a avaliação do efeito direto da substância sobre a célula não permitindo avaliar os efeitos de seus metabólitos e da relação intrínseca e extrínseca com outros fatores presentes *in vivo*. *In vivo*, o etanol é submetido à metabolização a acetaldeído que por ser tóxico, pode estar envolvido em desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e aumento dos radicais livres. Além disso, interfere na cadeia transportadora de elétrons causando alterações mitocondriais e inibindo processos de reparação do DNA (Addolorato et al., 1997).

Estudar os efeitos do consumo materno de etanol durante a gestação e lactação sobre o potencial de diferenciação osteogênica *in vitro* das CTM da medula óssea da prole é pertinente e permite avaliar o efeito do consumo materno dessa substância no crescimento ósseo pós-natal e esse constitui o objetivo do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, nos laboratórios de Experimentação Animal e Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal do Complexo de Pesquisa Avançada em Medicina Veterinária e no laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob protocolo nº119/16.

Animais e manejo

Foram utilizadas 13 ratas Wistar com dois meses de idade alojadas em caixas plásticas e submetidas ao regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro recebendo ração comercial e água à vontade. Após duas semanas de adaptação, foi realizada citologia vaginal em todas as ratas para identificação da fase do ciclo estral conforme metodologia descrita por Marcondes (2002). As ratas que estavam em fase de proestro ou estro foram colocadas com machos (um macho para cada duas fêmeas) durante o

período escuro. A cópula foi confirmada mediante visualização de espermatozóides na citologia vaginal marcando este dia, como o dia zero de gestação. Após a confirmação da cópula, as ratas foram separadas em caixas individuais constituindo dois grupos experimentais: 1) grupo controle (n=6) e 2) e grupo etanol (n=7). As ratas do grupo 2, a partir do nono dia de gestação, receberam por gavagem diária, solução de etanol a 40% (12,5 mL /Kg PV totalizando 4g de etanol/kg segundo Pan et al., 2016) duas horas após o início do ciclo claro. O grupo controle recebeu água destilada como placebo no mesmo esquema posológico. Todos os animais foram pesados nos dias 0 , 9 e 18 de gestação. As ratas foram avaliadas quanto a quaisquer alterações de comportamento durante todo o período experimental. No dia do parto, os neonatos avaliados e foram amamentados até 30 dias de idade. As mães permaneceram recebendo solução alcoólica e água destilada, conforme o grupo, por todo o período de lactação. Aos 30 dias de lactação, três filhotes de cada mãe foram pesados e eutanasiados com superdosagem de Tiopental (100mg/kg) por via intraperitoneal.

Extração e cultivo das células tronco mesenquimais da medula óssea da prole em meio indiferenciado (DEMEM) e meio osteogênico

Após tricotomia e antissepsia com iodo polvidona e álcool iodado em toda a região pélvica, os fêmures e tíbias foram removidos e dissecados de todo o tecido conectivo. Em fluxo laminar, foram retiradas as epífises dos fêmures e tíbias para a extração da medula óssea. Os canais medulares foram lavados com DMEM baixa glicose e a medula óssea foi então transferidos para tubos falcon de 30mL que foram centrifugados por 10 minutos a 1400g. Os *pellets* foram ressuspenso em solução de DMEM baixa glicose enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina B (25µg/L) (Sigma, USA) e 10% de soro fetal bovino (Sorali, Brasil) e cultivados em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultivo foi trocado para remoção das células não aderentes. As trocas de meios foram realizadas a cada 4 dias e os repiques ocorreram após confluência de 80 a 90 % das células. As células foram submetidas a caracterização fenotípica e posteriormente submetidas a diferenciação osteogênica. A diferenciação osteogênica foi induzida pela substituição do meio básico por meio osteogênico constituído de DMEM baixa glicose

(Gibco, USA) com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL), anfotericina (25µg/L) e enriquecido com vitamina C (50 µg/mL), β glicerofosfato (10 mM), dexametasona (0,1 µM) além de 10% de soro fetal bovino (SFB). Aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio osteogênico, foram realizados os testes de conversão do MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina e porcentagem de células por campo. Aos 21 dias, foi realizada a quantificação do número de nódulos mineralizados e a expressão relativa dos transcritos gênicos para osteopontina, osteocalcina, BMP-2, RUNX-2 e colágeno I por RT PCR tempo real.

Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea da prole

Células de terceira passagem foram ressuspensas na concentração de 1×10^6 células em PBS 0,15M e transferidas para placas de 96 poços com anticorpo primário por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com PBS e incubadas com um anticorpo secundário com conjugado fluorescente (AlexaFluor 488, Molecular Probes, OR, USA) por 30 minutos a 4°C. As amostras foram analisadas utilizando-se citômetro FAC Scan (Becton Dickinson, NY, USA) e os dados analisados utilizando Cellquest software Becton Dickinson. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-CD45 (clone 69 mouse), anti-CD90 (clone Ox-7 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse) e anti-CD54 (clone 1A29 mouse) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Teste de conversão de MTT em cristais de formazan

As CTMs foram transferidas para placas de 24 poços na concentração de 1×10^4 células por poço e após aderência, o meio básico foi substituído por meio osteogênico. Após 7, 14 e 21 dias de diferenciação, cada grupo foi submetido ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]} em formazan conforme metodologia descrita no capítulo 2.

Teste de atividade da fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT

As CTMs foram transferidas para placas de 24 poços na concentração de 1×10^4 células por poço e após aderência, o meio básico foi substituído por meio osteogênico. Após 7, 14 e 21 dias de diferenciação, cada grupo foi submetido ao teste de atividade de

fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT conforme metodologia descrita no capítulo 2.

Porcentagem de células por campo

As CTMs foram transferidas para placas de 24 poços na concentração de 1×10^4 células por poço contendo lamínulas plásticas de 13 mm. Após aderência, o meio básico foi substituído por meio osteogênico e aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação, as lamínulas foram lavadas duas vezes com solução de PBS 0,15M e fixadas com solução de paraformoldeído 4% por 24 horas. Em seguida, foram lavadas com água destilada e coradas pela hematoxilina e eosina. A porcentagem de células foi determinada em aumento de $10\times$, em 8 campos com uso de uma gráticula contendo 121 pontos. As médias e desvio padrão foram calculados em sextuplicata para cada grupo estudado.

Nódulos mineralizados

As CTMs foram transferidas para placas de 24 poços na concentração de 1×10^4 células por poço contendo lamínulas plásticas de 13 mm. Após aderência, o meio básico foi substituído por meio osteogênico e aos 21 dias de diferenciação, as lamínulas foram lavadas duas vezes com solução de PBS 0,15M e fixadas com solução de paraformoldeído 4% por 24 horas. Em seguida, foram lavadas com água destilada e coradas pelo Von Kossa para visualização dos nódulos mineralizados. Foram realizadas a contagem de nódulos mineralizados por lamínula em aumento de $4\times$, cálculo da área mineralizada pela média (mm^2) do nódulo e área mineralizada total (mm^2) por lamínula pelo *Prism Statistical software* (Graphpad, San Diego, CA) e pelo Image J. As médias e desvio padrão foram calculados em sextuplicata para cada grupo estudado.

Avaliação da expressão dos transcritos gênicos Runx-2, colágeno do tipo I, BMP-2, osteocalcina e osteopontina por RT-PCR tempo real

As células foram transferidas para garrafas T-25 na quantidade de 25×10^4 células por garrafa. Após aderência, o meio básico foi substituído por meio osteogênico e aos 21 dias de diferenciação foi realizada a avaliação da expressão gênica relativa de osteopontina, osteocalcina, BMP-2, RUNX-2 e colágeno tipo I.

Resumidamente, 1 µg de RNA, extraído por trizol, foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III Platinum Two-Step qPCR kit com SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O RT-PCR foi realizado em um termociclador Smart Cycler II (Cepheid, Carpinteria, CA, EUA). A primeira etapa de amplificação de qRT-PCR foi iniciada com a transcrição reversa por 120seg a 50°C, seguido por PCR com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15seg a 95°C e 30seg a 60°C. Ao final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores CT. A expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde os valores das amostras foram calculadas em relação a valores de GAPDH C_t . Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *rattus norvegicus* (Tabela 4). A média e o desvio padrão foram determinados em quadruplicata para cada grupo experimental.

Tabela 4. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR Tempo Real

Gene	Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')	Nº acesso
GAPDH	<i>foward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA <i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM 002046
BMP-2	<i>Foward</i> : AGTGACTTTTGGCCACGACG <i>Reverse</i> : GCTCCGCTGTTGTGTTG	NM 006133
Colágeno 1	<i>Foward</i> : ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC <i>Reverse</i> : CAGGGAAGCCTTTTCTCCT	NM 60440
Osteocalcina	<i>Foward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT <i>Reverse</i> : AGAGAGAGGGAACAGGGAGG	NM006028
Osteopontina	<i>Foward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT <i>Reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA	NM0069766
Runx-2	<i>foward</i> : GCGTCAACACCATCATTCTG <i>reverse</i> : CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348

Análise Estatística

O delineamento foi realizado inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste t *student* utilizando o programa *GraphpadInstat* 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

As ratas de ambos os grupos experimentais apresentaram comportamento normal para a espécie. O grupo de ratas que recebeu etanol durante a gestação e a lactação apresentou consumo diário de ração significativamente menor quando comparado ao controle. Entretanto, não houve diferença significativa no ganho de peso dos animais. Além disso, o tempo de gestação e o tamanho da ninhada também não diferiu significativamente entre grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Média e desvio padrão do consumo diário de ração, ganho de peso final da mãe, tempo de gestação (dias), e tamanho da ninhada das ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação.

Variável	Grupo	
	Controle	Etanol
Consumo diário de ração (g)	32,5 ± 1,2 A	27,4 ± 2,5 B
Ganho de peso final da mãe (g)	58,6 ± 3,7 A	60,2 ± 10,5 A
Tempo de gestação (dias)	21,3 ± 0,5 A	22,0 ± 0,0 A
Tamanho da ninhada	10,0 ± 0,0 A	10,4 ± 2,0 A

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ($p > 0,05$).

Peso dos filhotes aos 21 dias de idade

Os filhotes aos 21 dias de idade das mães que receberam etanol durante a gestação e lactação, foram estatisticamente menos pesados quando comparados aos filhotes das mães controle (Figura 7).

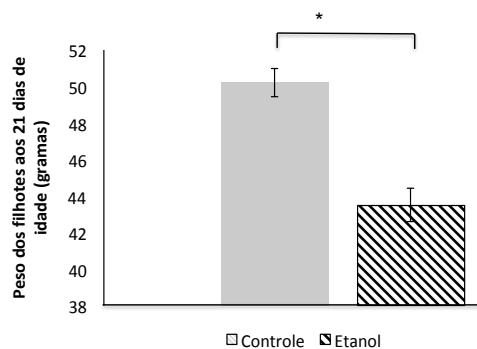


Figura 7. Média e desvio padrão do peso da ninhada ao desmame das ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação. * $p < 0,05$.

Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea indicou que 96,94% das células não apresentaram expressão para CD45. Entretanto houve expressão para CD73, CD54, e CD90 em 93,99%, 95,10%, e 86,77% das células, respectivamente.

A diferenciação osteogênica foi confirmada pela mensuração da atividade de fosfatase alcalina e síntese e mineralização da matriz extracelular.

Conversão do MTT em cristais de formazan e atividade da fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT

Houve uma menor conversão do MTT em cristais de formazan no grupo etanol quando comparado ao grupo controle somente aos 7 dias de diferenciação (Figura 8). As CTMs do grupo etanol apresentaram maior atividade da fosfatase alcalina aos 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

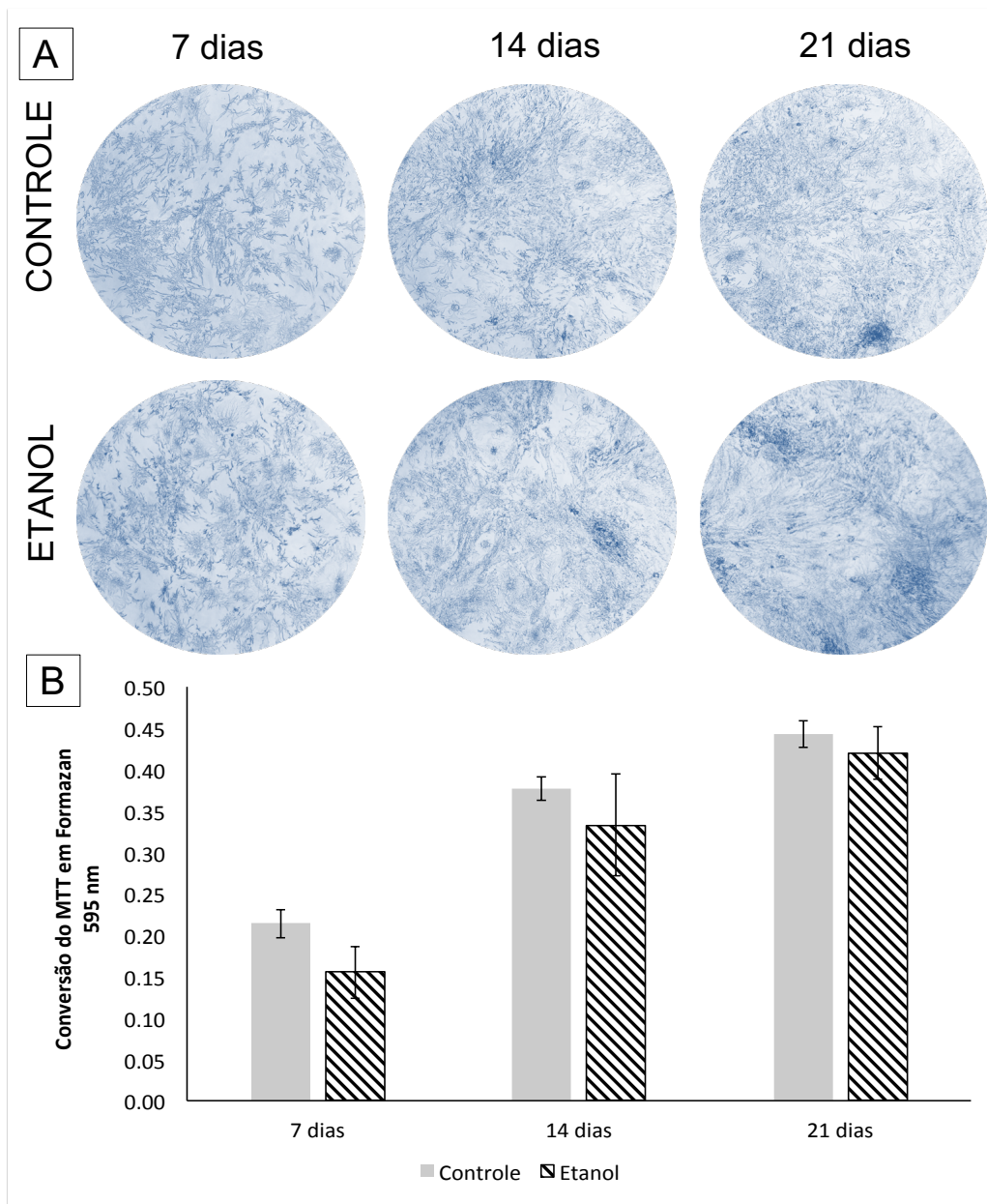


Figura 8. (A) Fotomicroscopia da redução do MTT em cristais de formazan. (B) Média \pm desvio padrão da redução do MTT em formazan em culturas de CTM-MO de filhos de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. * $p < 0,05$.

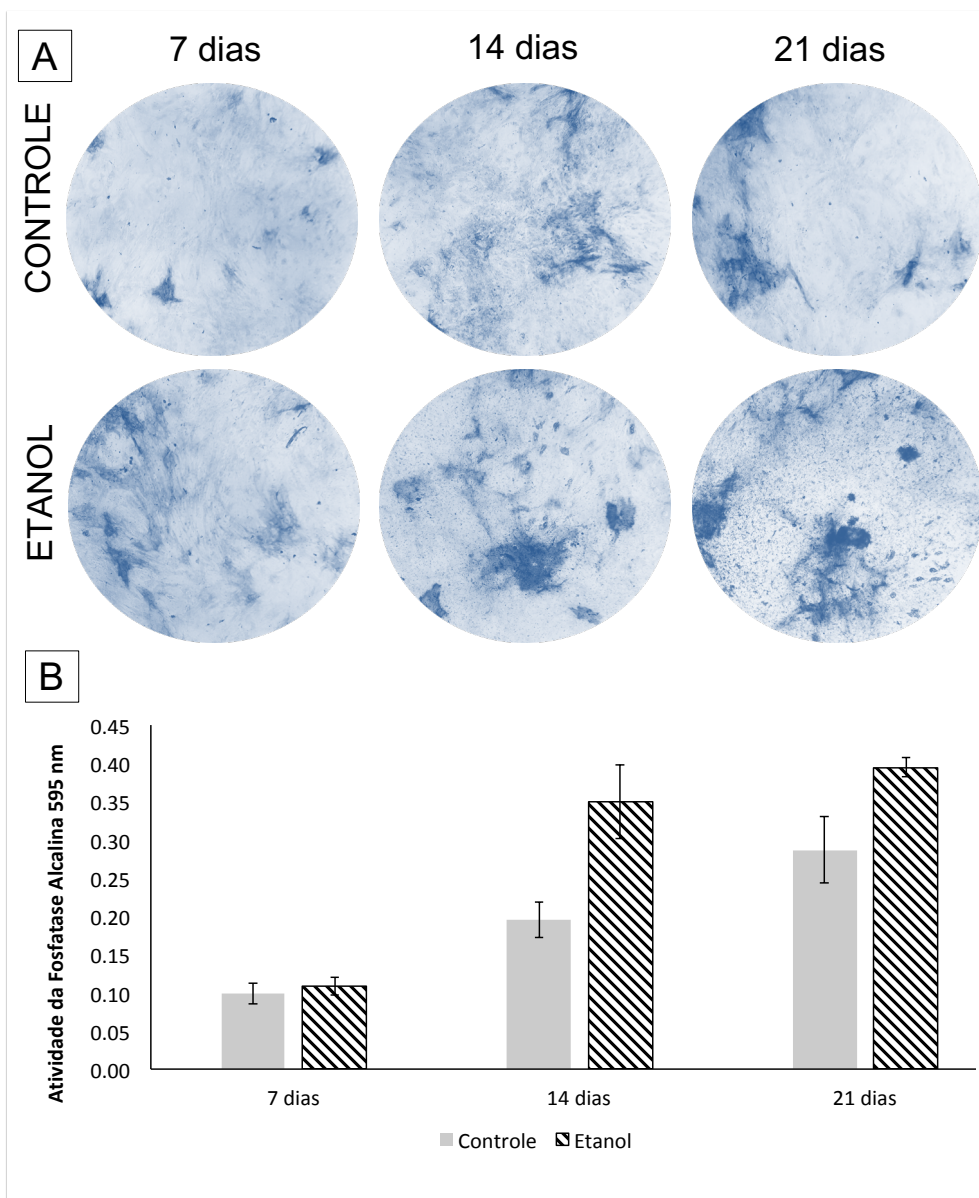


Figura 9. (A) Fotomicroscopia da atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT. (B) Média \pm desvio padrão da atividade de fosfatase alcalina em culturas de CTM-MO de filhotes de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. * $p < 0,05$.

Porcentagem de células por campo e síntese dos nódulos mineralizados

O grupo etanol apresentou maior porcentagem de células por campo quando comparado ao grupo controle aos 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica (Figura 10). Não houve diferença estatística entre o número de nódulos mineralizados do grupo etanol quando comparado ao grupo controle bem como da área mineralizada total por lamínula.

Entretanto, a área mineralizada média do nódulo foi significativamente maior no grupo tratado com etanol (Figura 11).

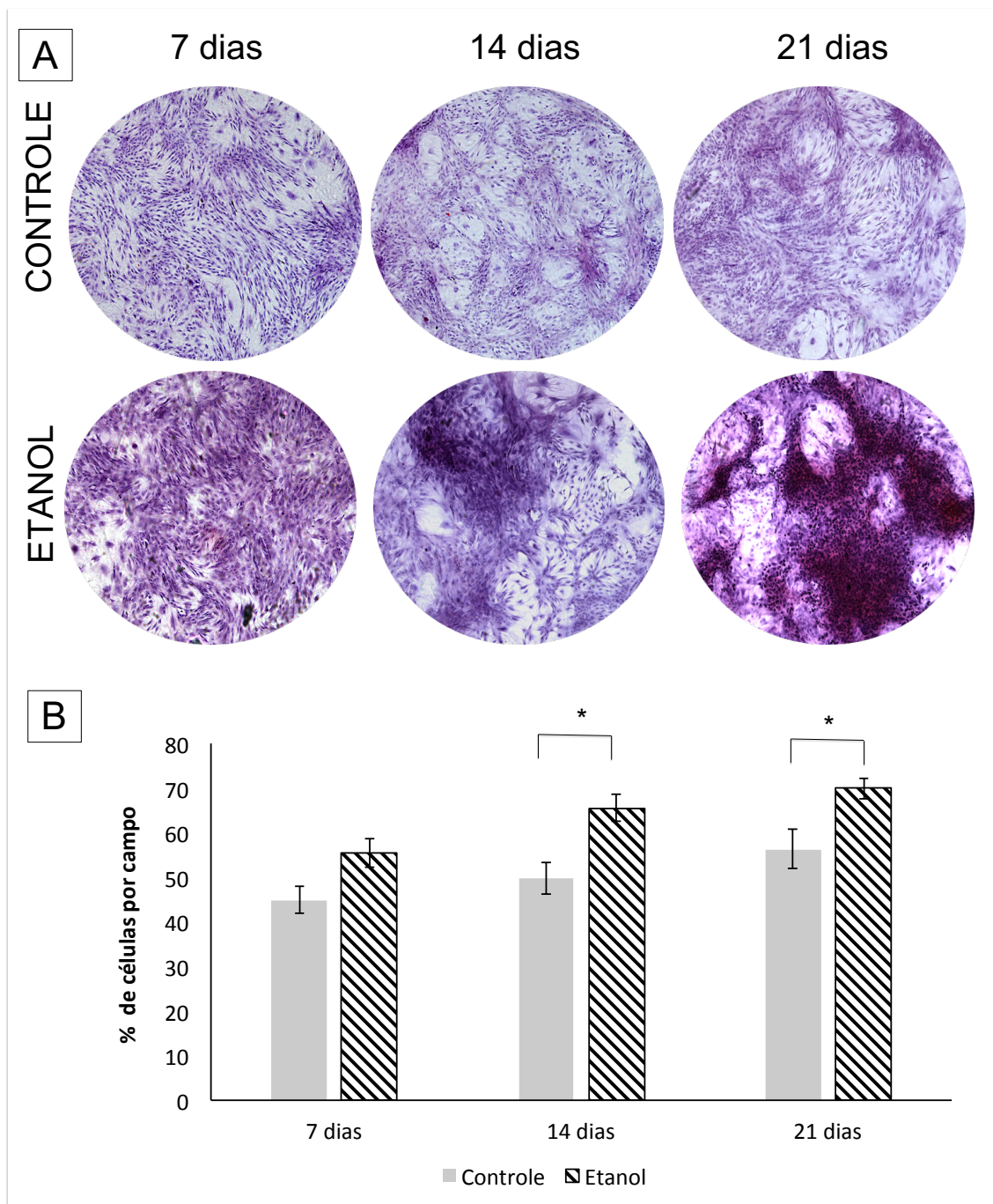


Figura 10. (A) Fotomicroscopia da porcentagem de células por lamínula, H&E. (B) Média \pm desvio padrão da porcentagem de células por campo em culturas de CTM-MO de filhas de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. * $p < 0,05$.

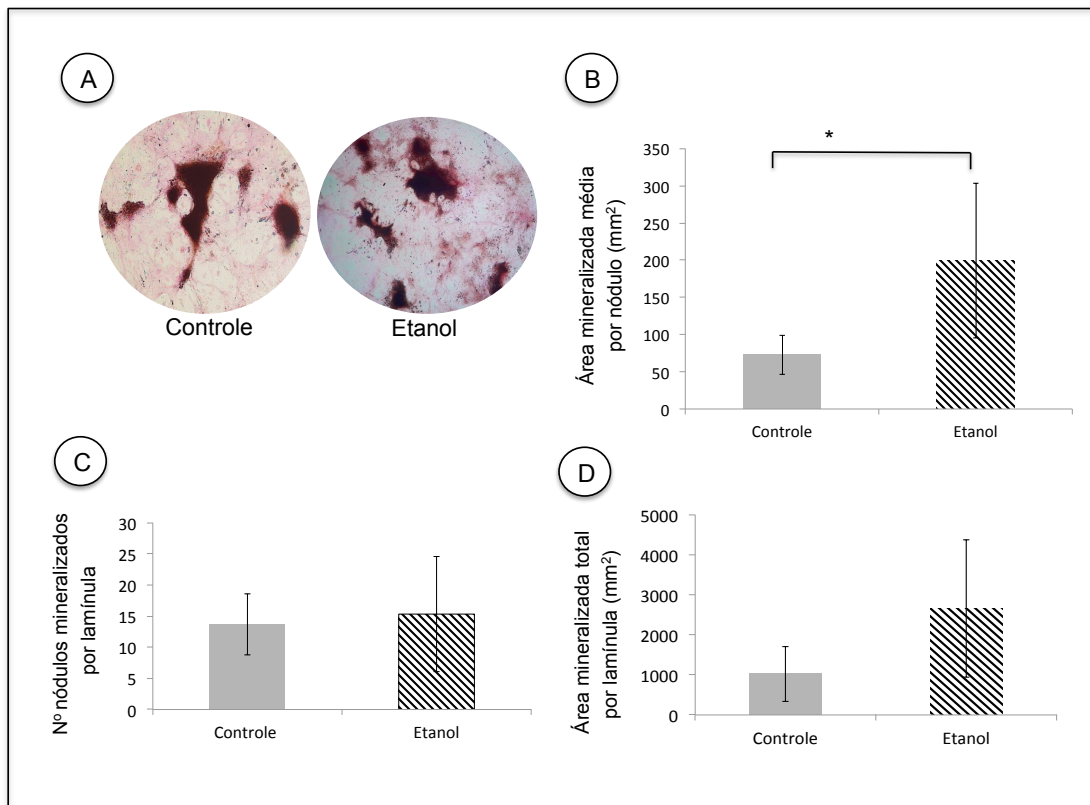


Figura 11. (A) Fotomicroscopia dos nódulos mineralizados, Von Kossa. (B) Média \pm desvio padrão da área mineralizada média por nódulo. (C) Número de nódulos mineralizados por lamínula. (D) Área mineralizada total por lamínula em culturas de CTM-MO de filhotes de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação aos 21 dias de diferenciação osteogênica. * $p < 0,05$.

Expressão dos transcritos gênicos BMP-2, osteocalcina, osteopontina, colágeno tipo I, Runx-2 pelo RT-PCR tempo real

O grupo etanol apresentou maior expressão dos transcritos gênicos para BMP-2, osteocalcina e osteopontina quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença estatística entre a expressão de Runx-2 e colágeno tipo I entre os grupos (Figura 12).

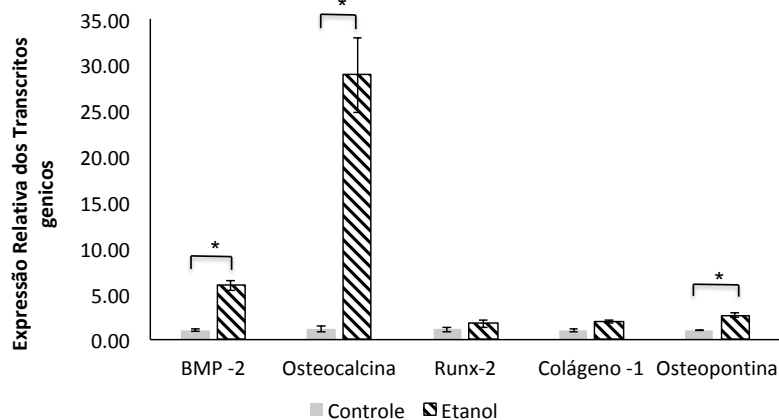


Figura 12 . Quantificação relativa da expressão gênica (média \pm desvio padrão) em CTM-MO em culturas de CTM-MO de filhotes de ratas não submetidas (grupo controle) e submetidas (grupo etanol) ao consumo de etanol durante a gestação e lactação 21 dias de diferenciação osteogênica. BMP-2, Osteocalcina, Runx-2, Colágeno tipo 1 e Osteopontina * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

In vivo, os efeitos do etanol são considerados dose-dependentes (Dyer et al., 1998), ou seja, podem variar de acordo com o volume consumido diariamente, sendo classificado como consumo discreto, moderado ou intenso (Ganry et al., 2000). No presente estudo, as ratas do grupo etanol receberam uma dose diária considerada intensa durante a gestação e lactação. Apesar do consumo materno ter sido intenso e ter provocado redução de peso dos filhotes ao desmame, as CTM-MO da prole quando submetidas a diferenciação osteogênica, *in vitro*, apresentaram maior potencial osteogênico quando comparadas as células do grupo controle.

A redução do peso da ninhada, ao desmame, promovida pelo consumo materno de etanol durante a gestação e lactação, foi observada também nos neonatos das ratas tratadas com etanol como demonstrado no capítulo 2. Isso demonstra que a exposição pré-natal ao etanol associada à pós-natal por meio de mães lactentes que ingeriram etanol durante a lactação induziu redução de peso ao nascimento que se manteve até o desmame dos filhotes, ou seja, até 30 dias de idade. Abel (1978) demonstrou que ratos filhotes de mães que receberam etanol durante a gestação nasceram com redução de peso entretanto, quando amamentados por mães que não ingeriram o etanol durante a

lactação, após 7 dias, os filhotes apresentaram peso semelhante aos filhos de ratas controle. Sabe-se que o etanol passa do sangue materno para o leite através de difusão passiva e suas concentrações se tornam equivalentes cerca de 30 a 60 minutos após a ingestão do etanol pela mãe (Mumenthaler et al., 1999; Giglia, 2010). Algumas hipóteses podem explicar o menor peso dos filhotes ao desmame das ratas tratadas com etanol observadas no presente estudo. A primeira delas é a menor ingestão de leite pela prole que pode estar associada à fatores como menor ejeção do leite devido redução dos níveis de ocitocina materna promovida pelo consumo de etanol e menor ingestão de leite pelo lactente devido a alteração do odor do leite decorrente da presença do etanol (Fuchs, 1969; Heil e Subramanian, 2000; Burgos e Medeiros, 2002; Giglia, 2010). Além disso, estudos demonstram que a presença do etanol no ambiente intestinal reduz a absorção de vários nutrientes entre eles vitaminas do complexo B, vitamina A, vitamina D, além de reduzir os níveis de cálcio, fósforo e magnésio (Burgos e Medeiros, 2002). Esses fatores, justificam o menor peso dos filhotes que foram amamentados por mães que receberam etanol durante a lactação. Outra hipótese é que associado a esses fatores, possa haver menor massa óssea nestes animais como consequência dos efeitos do etanol sobre o crescimento ósseo endocondral.

Entretanto, apesar do consumo materno de etanol ter promovido ninhada com redução de peso, a prole apresentou, *in vitro*, maior diferenciação osteogênica das CTMs da medula óssea caracterizada por maior atividade de fosfatase alcalina, maior expressão de transcritos gênicos para BMP-2, osteocalcina e osteopontina além de maior área média de matriz mineralizada dos nódulos de mineralização.

Para comprovação de que as células extraídas e cultivadas em meio osteogênico eram células tronco mensequimias da medula óssea, foram seguidos os critérios básicos essenciais para a caracterização das CTMs definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. Dentre essas características, estão a capacidade das mesmas de aderirem ao plástico das garrafas e placas, apresentarem aspecto fibroblástico quando indiferenciadas e por se diferenciarem em osteoblastos quando cultivadas em meio para diferenciação osteogênica. Além disso, pouco mais de 3% das células utilizadas neste estudo apresentaram expressão de CD45, que é uma proteína de membrana expressa em células hematopoiéticas e a maioria das células, ou seja, cerca de 86% a 95%

apresentaram expressão de CD54, CD73 e de CD90, que são marcadores expressos em CTMs. Esse conjunto de características permitiram comprovar seu *status* de CTMs.

Após a padronização do número de células cultivadas em ambos os grupos experimentais, o grupo tratado com etanol apresentou maior conversão de MTT em cristais de formazan aos 7 dias de cultivo e maior atividade fosfatase alcalina aos 14 e 21 dias quando comparado ao grupo controle. Ambos os testes, são dependentes de atividades enzimáticas de células viáveis e são influenciados pelo número de células na cultura (Berridge et al., 2005). Ambos os grupos experimentais tiveram o número inicial de células padronizado entretanto, aos 14 e 21 dias cultivo em meio osteogênico, o grupo etanol apresentou maior porcentagem de células quando comparado ao grupo controle. Esse resultado aponta para duas hipóteses. A primeira se baseia no aumento da atividade proliferativa, *in vitro*, das células dos animais que foram expostos ao etanol nas fases neonatal e pós-natal quando submetidos a diferenciação osteogênica. *In vitro*, os efeitos da adição de etanol sobre o número de células em culturas de células tronco e osteoblastos já foram descritos e se mostraram dose-dependentes (Farley et al., 1985). Em culturas de osteoblastos de calvaria de aves, a adição de baixas doses (0,03%) de etanol, *in vitro*, promoveu aumento de número de células enquanto doses mais elevadas (1%) ocasionou redução do número celular (Farley et al., 1985). Resultados semelhantes foram descritos por Chavassieux et al. (1993), com cultivo de osteoblastos humanos. Já Klein et al. (1996) demonstraram redução do número de osteoblastos humanos na cultura independente da dose de etanol utilizada, mas concentrações mais elevadas de etanol, causaram efeito inibitório sobre a proliferação celular ainda mais acentuado. A segunda hipótese que poderia explicar a maior porcentagem de células observadas no grupo etanol e que o mesmo pode ter promovido menor diferenciação das CTM-MO uma vez que células menos diferenciadas têm maior capacidade proliferativa quando comparadas às células diferenciadas (Datta et al., 2008; Alves et al., 2016). Entretanto, essa hipótese é refutada uma vez que as células do grupo etanol apresentaram parâmetros de comprovação de diferenciação osteogênica maiores como, atividade de fosfatase alcalina, expressão de BMP-2, osteopontina, osteocalcina além de maior área de matriz mineralizada na cultura quando comparado ao grupo controle. Assim, acredita-se que o aumento da atividade de fosfatase alcalina não esteja relacionado

apenas a maior porcentagem de células na cultura do grupo etanol mas também seja decorrente da maior diferenciação osteogênica dessas células comprovada pelo aumento dos outros parâmetros principalmente pela síntese de nódulos mineralizados.

A síntese de matriz mineralizada na cultura é evidenciada pela formação dos nódulos de mineralização (Jaiswal et al., 1997; Payushina et al., 2006) cuja presença é esperada principalmente a partir dos 14 dias de diferenciação. A formação dos nódulos mineralizados é dependente da síntese de proteínas colagênicas e não colagênicas que será associada aos minerais cálcio e fosfato (Eslaminejad e Taghiyar 2010; Spencer et al., 2012; Alves et al., 2016).

Apesar do número de nódulos mineralizados bem como a área total de matriz mineralizada por lamínula terem sido semelhantes entre os grupos, a área mineralizada média por nódulo foi superior no grupo etanol. Esse resultado pode ser explicado pela maior expressão gênica das proteínas não colagênicas da matriz como osteocalcina e osteopontina neste grupo. A osteopontina é uma fosfoproteína importante, que possui domínios ligantes de cálcio, estando diretamente relacionada à mineralização da matriz e a osteocalcina é considerada um marcador de osteoblastos bem diferenciados (Nefussi et al., 1997). Resultado diferente foi observado por Chen et al. (2017) que demonstraram redução da expressão da osteocalcina e redução dos nódulos de mineralização em culturas de CTM humanas tratadas com etanol, sendo o resultado diretamente proporcional a concentração de etanol adicionada à cultura. Por outro lado, estudo realizado por Chavassieux et al. (1993) em culturas de osteoblastos humanos, demonstrou aumento da proteína osteocalcina no sobrenadante do cultivo, sendo que a quantidade de proteína estimada aumentou à medida em que se aumentou a concentração de etanol no cultivo. Tal resultado, foi explicado pelos autores, como efeito nocivo direto sobre as membranas celulares, ocasionando aumento da permeabilidade celular que permitiu maior extravasamento da proteína, sem contudo precisar se houve aumento da produção proteica. Outro fator importante que pode estar envolvido nos resultados dos nódulo mineralizados é a maior expressão de BMP-2 pelas células do grupo tratado com etanol. Sabe-se que a BMP-2 exerce importante efeito osteoindutivo, sendo uma das proteínas reguladoras do processo de estímulo da

diferenciação de CTM em osteoblastos e mediadora da expressão de outras proteínas da matriz óssea (Hanada et al., 1997).

O resultado da síntese dos nódulos mineralizados entre grupos, não sofreu influência da expressão dos transcritos gênicos Runx-2 e colágeno tipo I cuja expressão foi semelhante entre grupos. O Runx-2 é um fator gênico importante no início da diferenciação osteogênica (Kim et al., 1999; Zheng et al., 2003). Estudos *in vitro* utilizando etanol em culturas de CTM que sofreram estímulo à diferenciação osteogênica, também demonstraram que a expressão do Runx-2 não foi inibida em relação ao grupo controle (Gong e Wezeman, 2004; Chen et al., 2017). Já o colágeno tipo I é o principal componente da matriz óssea e é secretado pelos osteoblastos no início do processo de diferenciação osteogênica (Nefussi et al., 1997). Diante disso, acredita-se que o efeito do etanol não seja tão significativo nas etapas iniciais do processo de diferenciação osteogênica e que talvez etapas mais tardias, sejam influenciadas.

Assim, as diferenças de resultados observados entre os estudos, reafirma que os efeitos do etanol além de serem dose dependentes, são variáveis de acordo com a célula estudada, ou seja célula indiferenciada ou osteoblastos além de ser dependente do fato do etanol ser adicionado *in vitro* ou administrado *in vivo*. Além disso, outros pontos importantes devem ser levados em consideração quando se visa avaliar, nas células da prole, os efeitos *in vivo* do etanol administrado para as mães são eles: metabolização do etanol pelo organismo materno, eliminações lácteas, metabolização pelo organismo da prole, que podem modificar toda a dinâmica da ação tóxica do etanol, diferentemente de quando o etanol é adicionado diretamente sobre o cultivo celular.

A maior capacidade de diferenciação osteogênica *in vitro* observada nas CTM-MO dos ratos filhos de mães que receberam etanol durante a gestação e lactação sugere que, o efeito negativo do etanol sobre o crescimento ósseo observado *in vitro* não é decorrente de menor diferenciação das CTM-MO em osteoblastos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o consumo materno de etanol durante a gestação e lactação aumenta, *in vitro*, o potencial de diferenciação osteogênica das CTM-MO da prole ao desmame através da maior mineralização média de nódulos de mineralização, associada a maior expressão dos transcritos gênicos osteocalcina, osteopontina e BMP-2.

REFERENCIAS

- Abad, Veronica, Meyers, Jodi L. ,Weise, Martina, Rachel I. Gafni, Kevin M. Barnes, Ola Nilsson, John D. Bacher, Jeffrey Baron. 2002. “The Role of the Resting Zone in Growth Plate Chondrogenesis.” *Endocrinology* 143 (5): 1851–57. <https://doi.org/10.1210/endo.143.5.8776>.
- Abel, E. L. 1978. “Effects of Ethanol on Pregnant Rats and Their Offspring.” *Psychopharmacology* 57 (1): 5–11. <https://doi.org/10.1007/BF00426950>.
- Addolorato, Giovanni, Gasbarini, Antonio , Marcoccia, Stefania ,Simincini, Mara , Paola Baccarini, Giovanni Vagni, Antonio Grieco. 1997. “Prenatal Exposure to Ethanol in Rats : Effects on Liver Energy Level and Antioxidant Status in Mothers , Fetuses , and Newborns” *Alcohol* 14 (6): 569–73.
- Agarwal, D. P.; Goedde, H.W. Pharmacogenetics of alcohol dehydrogenase (ADH). *Pharmacogenetics*, v.45, p.69–83, 1990.
- Akiyama, Haruhiko, Chaboissier ,Marie Christine, Martin, James F., Andreas Schedl, Crombrughe Benoit De. 2002. “The Transcription Factor Sox9 Has Essential Roles in Successive Steps of the Chondrocyte Differentiation Pathway and Is Required for Expression of Sox5 and Sox6.” *Genes and Development* 16 (21): 2813–28. <https://doi.org/10.1101/gad.1017802>.
- Alves, Endrigo G.L.,Serakides, Rogéria ,Boeloni, Jankerle N. , Rosado, Isabel R, Ocarino, Natalia M.,Oliveira, Humberto P., Goes, Alfredo M., Rezende, Cleuza M.F. 2016. “Comparative Study of the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue of Adult Dogs.” *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 36: 21–32. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X201600130004>.
- Asari, Toru, Furukawa Ken Ichi, Tanaka Sunao, Kudo Hitoshi, Mizukami, Hiroki , Atsushi, Takuya Numasawa. 2012. “Corrigendum to ‘ Mesenchymal Stem Cell Isolation and Characterization from Human Spinal Ligaments’ [Biochem. Biophys. Res. Commun. 417 (2012) 1193-1199].” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419 (4): 815. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.087>.
- Atasoy-Zeybek, A., A Ivkovic, T Beyzadeoglu, A Onal, C H Evans, G T Kose. 2019. “Paracrine Effects Of Living Human Bone Particles On The.” *European Cells and Materials* 38: 14–22. <https://doi.org/10.22203/eCM.v038a02>.

- Barbosa, Silva, Silva Narriman, Boery De Oliveira, Boery Nagib, Filho Gomes, Douglas Leonardo, Silva Sena. 2011. “A Resolução 196/96 e o Sistema Brasileiro de Revisão Ética de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.” *Revista Bioética* 19 (2): 523–42.
- Berridge, Michael V., Patries M. Herst, An S. Tan. 2005. “Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction.” *Biotechnology Annual Review* 11 (SUPPL.): 127–52. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7).
- Best, C.A.; Laposata M. Fatty acid ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of ethanol intake. *Frontiers in Bioscience*, v.8, p.202–e217, 2003.
- Bobis, Sylwia, Danuta Jarocha, Marcin Majka. 2006. “Mesenchymal Stem Cells. Characteristics and Clinical Applications.Pdf.” *Folia Histochemica et Cytobiologica* 44 (4): 215–30.
- Bosron, W.F.; Ehrig, T.; Li, T.K. Genetic factors in alcohol metabolism and alcoholism. *Seminars in Liver Disease*, v.13, p.126–135, 1993.
- Burd, L., J. Blair, and K. Dropps. 2012. “Prenatal Alcohol Exposure, Blood Alcohol Concentrations and Alcohol Elimination Rates for the Mother, Fetus and Newborn.” *Journal of Perinatology* 32 (9): 652–59. <https://doi.org/10.1038/jp.2012.57>.
- Burgos, MGPA, and Medeiros MC. 2002. “Efeitos de Bebidas Alcólicas Em Mães Lactantes e Suas Repercussões Na Prole; The Effect of Alcoholic Beverages in Nursing Mothers and Their Impact on Children.” *Rev. Bras. Saúde ...* 2 (2): 129–35.
- Camarero-Espinosa, Sandra, Barbara Rothen-Rutishauser, E. Johan Foster, and Christoph Weder. 2016. “Articular Cartilage: From Formation to Tissue Engineering.” *Biomaterials Science* 4 (5): 734–67. <https://doi.org/10.1039/c6bm00068a>.
- Caplan, Arnold I. 1987. “Bone Development and Repair.” *BioEssays* 6 (4): 171–75. <https://doi.org/10.1002/bies.950060406>.
- Caplan, Arnold I. 1991. “Mesenchymal Stem Cells.” *Journal of Orthopaedic Research* 9: 641–950. <https://doi.org/10.1201/b13978>.
- Caron, M. M.J., P. J. Emans, A. Cremers, D. A.M. Surtel, M. M.E. Coolen, L. W. van Rhijn, and T. J.M. Welting. 2013. “Hypertrophic Differentiation during Chondrogenic Differentiation of Progenitor Cells Is Stimulated by BMP-2 but Suppressed by BMP-7.” *Osteoarthritis and Cartilage* 21 (4): 604–13. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.01.009>.
- Castagnola, P., G. Moro, Descalzi-Cancedda, F. and R. Cancedda. 1986. “Type X Collagen Synthesis during in Vitro Development of Chick Embryo Tibial Chondrocytes.” *Journal of Cell Biology* 102 (6): 2310–17. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.6.2310>.
- Cederbaum, I Arthur. 2013. “Metabolism Alcohol.” *Clin Liver Dis* 16 (4): 667–85. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002>.
- Chavassieux, Pascale, Serre ,Claire Marie, Vergnaud Philippe, Delmas, Pierre D. and Meunie Pierre J. r. 1993. “In Vitro Evaluation of Dose-Effects of Ethanol on Human Osteoblastic Cells.” *Bone and Mineral* 22 (2): 95–103. <https://doi.org/10.1016/S0169->

6009(08)80221-8.

Chen, Li, and B. L. Grégoire Nyomba. 2004. "Whole Body Insulin Resistance in Rat Offspring of Mothers Consuming Alcohol during Pregnancy or Lactation: Comparing Prenatal and Postnatal Exposure." *Journal of Applied Physiology* 96 (1): 167–72. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00751.2003>.

Chen, Xi, Mao Li, Jinku Yan, Tao Liu, Guoqing Pan, Huilin Yang, Ming Pei, and Fan He. 2017. "Alcohol Induces Cellular Senescence and Impairs Osteogenic Potential in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Alcohol and Alcoholism* 52 (3): 289–97. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agx006>.

Crilly, Richard G., Colin Anderson, David Hogan, and Liliane Delaquerrière-Richardson. 1988. "Bone Histomorphometry, Bone Mass, and Related Parameters in Alcoholic Males." *Calcified Tissue International* 43 (5): 269–76. <https://doi.org/10.1007/BF02556634>.

Dai, Jinlu, Dinlii Lin, Jian Zhang, Paula Habib, Peter Smith, Jill Murtha, Zheng Fu, Zhi Yao, Yinghua Qi, and Evan T. Keller. 2000. "Chronic Alcohol Ingestion Induces Osteoclastogenesis and Bone Loss through IL-6 in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 106 (7): 887–95. <https://doi.org/10.1172/JCI10483>.

Dao, Debbie Y, Jennifer H Jonason, Yongchun Zhang, Wei Hsu, Di Chen, Matthew J Hilton, and Regis J O'Keefe. 2012. "Cartilage-Specific β -CATENIN Signaling Regulates Chondrocyte Maturation, Generation of Ossification Centers, and Perichondrial Bone Formation during Skeletal Development." *J Bone Miner Res* 27 (8): 1680–94. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1639>. Cartilage-specific.

Datta, H. K., W. F. Ng, J. A. Walker, S. P. Tuck, and S. S. Varanasi. 2008. "The Cell Biology of Bone Metabolism." *Journal of Clinical Pathology* 61 (5): 577–87. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.048868>.

Day, N L, S L Leech, G A Richardson, M D Cornelius, N Robles, and C Larkby. 2002. "In Offspring Size at 14 Years of Age." *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 26 (10): 1584–91. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000034036.75248.D9>.

Degnin, Catherine R., Melanie B. Laederich, and William A. Horton. 2010. "FGFs in Endochondral Skeletal Development." *Journal of Cellular Biochemistry* 110 (5): 1046–57. <https://doi.org/10.1002/jcb.22629>.

Deng, X.S.; Deitrich, R.A. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Current Drug Abuse Reviews*, v.1, p.3–8, 2008.

Detering, Nancy, Reed, W. Douglas, Pinar T. Ozand, and Karahasan, Alp. 1978. "The Effects of Maternal Ethanol Consumption in the Rat on the Development of Their Offspring." *The Journal of Nutrition* 109 (6): 999–1009. <https://doi.org/10.1093/jn/109.6.999>.

DiPadova, D.; Worner, T.M.; Julkunen, R.J.K.; Lieber, C.S. Effects of fasting and chronic alcohol consumption on the first-pass metabolism of ethanol. *Gastroenterology*, v.92, p.1169–1173, 1987.

- Dörrie, Nora, Föcker ,Manuel, Freunscht ,Inga, and Hebebrand ,Johannes. 2014. “Fetal Alcohol Spectrum Disorders.” *European Child & Adolescent Psychiatry* 23 (10): 863–75. <https://doi.org/10.1007/s00787-014-0571-6>.
- Dyer, A.S.; Buckendahl, P.; Sampson, H.W. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol*, v.16, p.337–341, 1998.
- Eslaminejad, M. B., Taghiyar , L.. 2010. “Study of the Structure of Canine Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Culture.” *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia* 39 (5): 446–55. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2010.01013.x>.
- Farley, J. R., Fitzsimmons, R., Taylor ,A. K., Jorch U. M., K. H.W. Lau. 1985. “Direct Effects of Ethanol on Bone Resorption and Formation in Vitro.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 238 (1): 305–14. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90169-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90169-9).
- Friday, Karen E, Howard ,Guy A. 1991. “Ethanol Inhibits Human Bone Cell Proliferation and Function in Vitro.” *Metabolism* 40 (6): 562–65.
- Fuchs, Anna-Riitta. 1969. “Ethanol And The Inhibition Of Oxytocin Release In Lactating Rats.” *Acta Endocrinologica* 62: 546–54.
- Ganry, O.; Baudoin, C.; Fardellone, P. Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: the EPIDOS Study. *American Journal of Epidemiology*, v.151, p.773– 780, 2000.
- Garimella, Rama, Xiahong Bi, Nancy Camacho, Joseph B. Sipe, H. Clarke Anderson. 2004. “Primary Culture of Rat Growth Plate Chondrocytes: An in Vitro Model of Growth Plate Histotype, Matrix Vesicle Biogenesis and Mineralization.” *Bone* 34 (6): 961–70. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.02.010>.
- Giglia, Roslyn and Binns ,Colin. 2006. “Alcohol and Lactation: A Systematic Review.” *Nutrition and Dietetics* 63 (2): 103–16. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0080.2006.00056.x>.
- Giglia, Roslyn C. 2010. “Alcohol and Lactation: An Updated Systematic Review.” *Nutrition and Dietetics* 67 (4): 237–43. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0080.2010.01469.x>.
- Gong, Zhaodi, and Wezeman ,Frederick H.. 2004. “Inhibitory Effect of Alcohol on Osteogenic Differentiation in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28 (3): 468–79. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000118315.58404.C1>.
- Hanada, Keigo, Dennis, James E., Caplan ,Arnold I. 1997. “Stimulatory Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein-2 on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow- Derived Mesenchymal Stem Cells.” *Journal of Bone and Mineral Research* 12 (10): 1606–14. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.10.1606>.

- Hanna, Hanna, Lluís M. Mir, Franck M. Andre. 2018. "In Vitro Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Generates Cell Layers with Distinct Properties." *Stem Cell Research and Therapy* 9 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>.
- Hattori, T., C. Muller, S. Gebhard, E. Bauer, F. Pausch, B. Schlund, M. R. Bosl, . 2010. "SOX9 Is a Major Negative Regulator of Cartilage Vascularization, Bone Marrow Formation and Endochondral Ossification." *Development* 137 (6): 901–11. <https://doi.org/10.1242/dev.045203>.
- Heil, Sarah H., and Marappa G. Subramanian. 2000. "Chronic Alcohol Exposure and Lactation: Extended Observations." *Alcohol* 21 (2): 127–32. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(00\)00081-1](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(00)00081-1).
- Heng, Boon Chin, Tong Cao, Eng Hin Lee. 2004. "Directing Stem Cell Differentiation into the Chondrogenic Lineage In Vitro." *Stem Cells* 22 (7): 1152–67. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0062>.
- Heras, Facundo Las, Harpal K. Gahunia, Kenneth P.H. Pritzker. 2012. "Articular Cartilage Development: A Molecular Perspective." *Orthopedic Clinics of North America* 43 (2): 155–71. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2012.01.003>.
- Hoffman, Lisa M., and Kulyk ,William M.. 1999. "Alcohol Promotes in Vitro Chondrogenesis in Embryonic Facial Mesenchyme." *International Journal of Developmental Biology* 43 (2): 167–74.
- Idänpään-Heikkilä, Juhana, Pentti Jouppila, Hans K. Åkerblom, Raimo Isoaho, Erkki Kauppila, Maila Koivisto. 1972. "Elimination and Metabolic Effects of Ethanol in Mother, Fetus, and Newborn Infant." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 112 (3): 387–93. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(72\)90483-8](https://doi.org/10.1016/0002-9378(72)90483-8).
- Ikeda, Yuhei, Ikuo Yonemitsu, Maki Takei, Schibata. Shunichi 2014. "Mechanical Loading Leads to Osteoarthritis-like Changes in the Hypofunctional Temporomandibular Joint in Rats." *Archives of Oral Biology* 59 (12): 1368–76. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.08.010>.
- Ikegami, Daisuke, Haruhiko Akiyama, Akira Suzuki, Takashi Nakamura, Toru Nakano. 2011. "Sox9 Sustains Chondrocyte Survival and Hypertrophy in Part through Pik3ca-Akt Pathways" 138: 1507–19. <https://doi.org/10.1242/dev.057802>.
- Jaiswal, Neelam, Stephen E. Haynesworth, Arnold I. Caplan, Scott P. Bruder. 1997. "Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro." *Journal of Cellular Biochemistry* 64 (2): 295–312. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(199702\)64:2<295::AID-JCB12>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(199702)64:2<295::AID-JCB12>3.0.CO;2-I).
- Jansson, Lauren M. 2018. "Maternal Alcohol Use during Lactation and Child Development." *Pediatrics* 142 (2): 2017–20. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-1377>.
- Jones, A W. 2011. "Pharmacokinetics of Ethanol - Issues of Forensic Importance." *Forensic Science Review* 23 (2): 91–136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231237>.
- Jones, Alan W. 2019. "Alcohol, Its Absorption, Distribution, Metabolism, and

- Excretion in the Body and Pharmacokinetic Calculations.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science* 1 (5): 1–26. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1340>.
- Kato, Y., and Iwamoto, M.. 1990. “Fibroblast Growth Factor Is an Inhibitor of Chondrocyte Terminal Differentiation.” *Journal of Biological Chemistry* 265 (10): 5903–9.
- Kaup, Zuleika de Oliveira Lima, Miriam Aparecida Barbosa Merighi, and Maria Alice Tsunehiro. 2001. “Avaliação Do Consumo de Bebida Alcoólica Durante a Gravidez Evaluation of Alcohol Consumption during Pregnancy.” *RBGO* 23 (9): 575–80. <http://www.scielo.br/pdf/0D/rbgo/v23n9/11280>.
- Keiver, Kathy, and Weinberg, Joanne. 2004. “Effect of Duration of Maternal Alcohol Consumption on Calcium Metabolism and Bone in the Fetal Rat.” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 28 (3): 456–67. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000118312.38204.C5>.
- Kim, I. S., F. Otto, B. Zabel, S. Mundlos. 1999. “Regulation of Chondrocyte Differentiation by Cbfa1.” *Mechanisms of Development* 80 (2): 159–70. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00210-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00210-X).
- Klein, Robert F., Kristina A. Fausti, and Amy S. Carlos. 1996. “Ethanol Inhibits Human Osteoblastic Cell Proliferation.” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 20 (3): 572–78. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1996.tb01095.x>.
- Kronenberg, Henry M. 2003. “Developmental Regulation of the Growth Plate.” *Nature* 423 (May): 332–36.
- Kulyk, William M., and Hoffman, Lisa M.. 1996. “Ethanol Exposure Stimulates Cartilage Differentiation by Embryonic Limb Mesenchyme Cells.” *Experimental Cell Research* 223 (2): 290–300. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0084>.
- Laitinen, Kalevi, and Matti Valimaki. 1991. “Alcohol and Bone.” *Calcified Tissue International* 49 (1–2): 70–73. <https://doi.org/10.1007/s10354-013-0258-5>.
- Laposata, M. Assessment of ethanol intake current tests and new assays on the horizon. *American Journal of Clinical Pathology*, v.112, p.443–450, 1999.
- Lee, S.L.; Chau, G.Y.; Yao, C.T.; Wu, C.W.; Yin, S.J. Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: significance of first-pass metabolism. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2006;30:1132–42.
- Li, T.; Bosron, W.F. Distribution and properties of human alcohol dehydrogenase isoenzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.492, p.1-10, 1987.
- Lin, Ching Shwun, Xin, Zhong Cheng, Dai, Jican, Lue, Tom F.. 2013. “Commonly Used Mesenchymal Stem Cell Markers and Tracking Labels: Limitations and Challenges.” *Histology and Histopathology* 28 (9): 1109–16. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1109>.
- Mackie, E. J., Tatarczuch, L., Mirams, M.. 2011. “The Skeleton: A Multi-Functional Complex Organ. The Growth Plate Chondrocyte and Endochondral Ossification.” *Journal of Endocrinology* 211 (2): 109–21. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0048>.

- Maes, C. Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcif. Tissue Int.*, v.92, p.307-323, 2013.
- Marcondes, f. K., Bianchi F. J., and Tanno A. P.. 2002. "Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations." *Brazilian Journal of Biology* 62 (4a): 609–14. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008>.
- Matsumoto, Hiroshi, and Fukui ,Yuko. 2002. "Pharmacokinetics of Ethanol: A Review of the Methodology." *Addiction Biology* 7 (1): 5–14. <https://doi.org/10.1080/135562101200100553>.
- Mennella, Julie A. and Pepino, Marta Yanina. 2008. "Biphasic Effects of Moderate Drinking on Prolactin during Lactation." *Alcohol Clinical and Experimental Research* 11 (32): 1899–1908. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00774.x>.
- Mesquita, Maria dos Anjos, Segre, Conceição Aparecida de Mattos . 2009. "Frequência dos efeitos do álcool no feto e padrão de consumo de bebidas alcoólicas pelas gestantes de maternidade pública da cidade de são paulo." *Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano* 19 (1): 63–77.
- Miralles-flores, Celia, and Delgado-baeza, Emilio 1992. "Histomorphometric Analysis of the Epiphyseal Growth Plate in Rats After Prenatal Alcohol Exposure." *Jornal of Orthopaedic Research* 10: 325–36.
- Mumenthaler, Martin s., Joy L. Taylor, Ruth O'Hara, Jerome A. Yesavage. 1999. "Gender Differences in Moderate Drinking Effects." *Alcohol Research & Health* 23 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1177/01461079040340040201>.
- Murphy, J.M.; Fink, D.J.; Hunziker, E.B. et al. Stem cell therapy a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, v.48, p.3464-74, 2003.
- Murillo-Fuentes, Luisa, Artillo ,Reyes, Carreras, Olimpia, Murillo, Luisa 2001. "Effects of Maternal Chronic Alcohol Administration in the Rat: Lactation Performance and Pup's Growth." *European Journal of Nutrition* 40 (4): 147–54. <https://doi.org/10.1007/s003940170002>.
- Nagao, Masashi, John L Hamilton, Ranjan Kc, Agnes D Berendsen, Xuchen Duan, Chan Wook Cheong, Xin Li, Hee-jeong Im, Bjorn R Olsen. 2017. "Vascular Endothelial Growth Factor in Cartilage Development and Osteoarthritis." *Nature* 7: 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13417>.
- Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G. et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, v.108, p.17-29, 2002.
- Nefussi, Jean R., Brami, Gabriel, Modrowsk,Dominique , Obœuf, Martine, Forest, Nadine. 1997. "Sequential Expression of Bone Matrix Proteins during Rat Calvaria Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation in Vitro." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45 (4): 493–503. <https://doi.org/10.1177/002215549704500402>.

Ni, Q, Lu, K, Li, J, Tan, Y, Qin, J, Magdalou, J et al. Role of TGF β signaling in maternal ethanol-induced fetal articular cartilage dysplasia and adult onset of osteoarthritis in male rats. *Toxicol Sci.* 2018;164(1):179-90. doi:10.1093/toxsci/kfy080

Nishimura, Riko, Makoto Wakabayashi, Kenji Hata, Takuma Matsubara, Shiho Honma, Satoshi Wakisaka, Hiroshi Kiyonari, et al. 2012. "Osterix Regulates Calcification and Degradation of Chondrogenic Matrices through Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) Expression in Association with Transcription Factor Runx2 during Endochondral Ossification." *Journal of Biological Chemistry* 287 (40): 33179–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337063>.

Ocarino, N. M., J. N. Boeloni, A. M. Goes, J. F. Silva, U. Marubayashi, Serakides, R. 2008. "Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Osteopenic Rats Subjected to Physical Activity with and without Nitric Oxide Synthase Inhibition." *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 19 (4): 320–25. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.08.004>.

Olmsted-Davis, Elizabeth A., Zbigniew Gugala, Fernando Camargo, Francis H. Gannon, Kathy Jo Jackson, Kirsten Anderson Kienstra, H. David Shine. 2003. "Primitive Adult Hematopoietic Stem Cells Can Function as Osteoblast Precursors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26): 15877–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.2632959100>.

Ortega, Nathalie, Danielle J. Behonick, Zena Werb. 2004. "Matrix Remodeling during Endochondral Ossification." *Trends in Cell Biology* 14 (2): 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.12.003>.

Pan, Zhengqi, Xianrong Zhang, Yangfan Shangguan, Hang Hu, Liaobin Chen, and Hui Wang. 2016. "Suppressed Osteoclast Differentiation at the Chondro-Osseous Junction Mediates Endochondral Ossification Retardation in Long Bones of Wistar Fetal Rats with Prenatal Ethanol Exposure." *Toxicology and Applied Pharmacology* 305: 234–41. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.06.021>.

Panetta, N. J., Gupta ,D. M, Quarto ,N., Longaker ,M.T.. 2009. "Mesenchymal Cells for Skeletal Tissue Engineering." *Panminerva Medica* 51 (1): 25–41.

Payushina, O.V., Domaratskaya ,E.I., Starostin V.I.. 2006. "Mesenchymal Stem Cells: Sources, Phenotype, and Differentiation Potential." *Biology Bulletin* 33 (1): 2–18. <https://doi.org/10.1134/S106235900601002X>.

Popova, Svetlana, Lange ,Shannon, Probst, Charlotte , Gerrit Gmel, Bürgen Rehm. 2017. "Estimation of National, Regional, and Global Prevalence of Alcohol Use during Pregnancy and Fetal Alcohol Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet Global Health* 5 (3): e290–99. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30021-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30021-9).

Prockop, D. J., Sekiya, I., Colter, D. C. 2001. "Isolation and Characterization of Rapidly Self-Renewing Stem Cells from Cultures of Human Marrow Stromal Cells." *Cytherapy* 3 (5): 393–96. <https://doi.org/10.1080/146532401753277229>.

Ramsay, Michèle. 2010. "Genetic and Epigenetic Insights into Fetal Alcohol Spectrum Disorders." *Genome Medicine* 2 (27): 1–8. <https://doi.org/10.1186/gm148>.

Reis, Amanda Maria Sena, Oliveira, Karina Pessoa, De Paula, Isabela Helena Fagundes, Silva, Alisson Paulo, Taragô, Júlia Fahrion, Ocarino, Natália De Melo, and Serakides, Rogéria. 2018. "Nonlinear Effects of caffeine on the Viability, Synthesis and Gene Expression of Chondrocytes from the offspring of Rats Treated during Pregnancy." *Acta Histochemica*, no. March: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.06.001>.

Roach, H. I. 1994. "Why Does Bone Matrix Contain Non-Collagenous Proteins? The Possible Roles of Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin and Bone Sialoprotein in Bone Mineralisation and Resorption." *Cell Biology International*. <https://doi.org/10.1006/cbir.1994.1088>.

Sahni, Malika, Ambrosetti, Davide-carlo, Mansukhani, Alka, Gertner, Rachel, Levy, David, Basilico, Claudio. 1999. "FGF Signaling Inhibits Chondrocyte Proliferation and Regulates Bone Development through the STAT-1 Pathway." *Genes and Development* 13 (212): 1361–66.

Seitz, H.K.; Oneta, C.M. Gastrointestinal alcohol dehydrogenase. *Nutrition Reviews*, v.56, p.52–60, 1998.

Seitz HK, Egerer G, Oneta C, Krämer, S.; Sieg, A.; Klee, F.; Simanowski, U. Alcohol dehydrogenase in the human colon and rectum. *Digestion*, v.57, p.105–108, 1996.

Serakides, R. Ossos e articulações. In: *Patologia Veterinária*, Santos & Alessi. Rio de Janeiro: Roca, p.619-662, 2016.

Shi, Shuiliang, Wang, Congrong, Anthony J. Acton, George J. Eckert, Stephen B. Trippel. 2015. "Role of Sox9 in Growth Factor Regulation of Articular Chondrocytes." *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (7): 1391–1400. <https://doi.org/10.1038/nm.2451.A>.

Shinomura, Tamayuki, Kazuo Ito, Magnus Höök, James H. Kimura. 2012. "A Newly Identified Enhancer Element Responsible for Type II Collagen Gene Expression." *Journal of Biochemistry* 152 (6): 565–75. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs110>.

Simpson, M. E., Duggal, S., Keiver, K. 2005. "Prenatal Ethanol Exposure Has Differential Effects on Fetal Growth and Skeletal Ossification." *Bone* 36 (3): 521–32. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.11.011>.

Snow, M. E., and Keiver, K. 2007. "Prenatal Ethanol Exposure Disrupts the Histological Stages of Fetal Bone Development." *Bone* 41 (2): 181–87. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.04.182>.

St-jacques, Benoit, Hammerschmidt, Matthias, McMahon, Andrew P. 1999. "Indian Hedgehog Signaling Regulates Proliferation and Differentiation of Chondrocytes and Is Essential for Bone Formation," 2072–86.

Staines, K. A., Pollard, A. S., McGonnell, I. M., Farquharson, C., Pitsillides, A. A. 2013. "Cartilage to Bone Transitions in Health and Disease." *Journal of Endocrinology* 219 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0276>.

Sun, Ning, Panetta, Nicholas J., Gupta Deepak M., Wilson, Kitchener D, Andrew Lee, Fangjun Jia, Shijun Hu. 2009. "Feeder-Free Derivation of Induced Pluripotent Stem

Cells from Adult Human Adipose Stem Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37): 15720–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908450106>.

Sun, Yongliang, and Kandel, Rita. 1999. “Deep Zone Articular Chondrocytes in Vitro Express Genes That Show Specific Changes with Mineralization.” *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (11): 1916–25. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.11.1916>.

Swift, R. Direct measurement of alcohol and its metabolites. Society for the Study of Addiction: SSA, v.98, p.73-80,2003.

Tamiasso, Natalia Viana, Silva, Carla Maria Osório, Reis, Amanda Maria Sena, Ocarinho, Natália Melo, Serakides, Rogéria. 2019. “Ethanol Alters Phenotype and Synthesis Activity of Rat Neonatal Articular Chondrocytes Grown in 2- and 3-Dimensional Culture.” *Cartilage* 0 (00): 194760351987086. <https://doi.org/10.1177/1947603519870862>.

Tran, Minh Nguyet, Alan H B Wu, Dennis W. Hill. 2007. “Alcohol Dehydrogenase and Catalase Content in Perinatal Infant and Adult Livers: Potential Influence on Neonatal Alcohol Metabolism.” *Toxicology Letters* 169 (3): 245–52. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.01.012>.

Ueta, Chisato, Iwamoto, Masahiro, Kanatani Naoko, Carolina Yoshida, Yang Liu, Motomi Enomoto-iwamoto, Tomoharu Ohmori, et al. 2001. “Skeletal Malformations Caused by Overexpression of Cbfa1 or Its Dominant Negative Form in Chondrocytes.” *The Journal of Cell Biology* 153 (1): 87–99.

Ungerer, Michelle, Knezovich, Jaysen, Ramsay, Michele. 2012. “In Utero Alcohol Exposure, Epigenetic Changes, and Their Consequences.” *Alcohol Research: Current Reviews* 35 (1): 37–46.

Vaglenova, J.; Martinez, S.E.; Porte, S.; Duester, G.; Farrés, J.; Parés, X. Expression, localization and potential physiological significance of alcohol dehydrogenase in the gastrointestinal tract. *European Journal of Biochemistry*, v.270, p.2652–2662, 2003.

Wilkinson, Paul K. 1980. “Pharmacokinetics of Ethanol: A Review.” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 4 (1): 6–21. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1980.tb04785.x>.

World Health Organization (WHO). 2018 *Global status report on alcohol and health 2018*. Geneva.

Wuthier, R. E., Chin, J. E., Hale, J. E. T. C. Register, Ishikawa, T. 1985. “Isolation and Characterization of Calcium-Accumulating Matrix Vesicles from Chondrocytes of Chicken Epiphyseal Growth Plate Cartilage in Primary Culture.” *Journal of Biological Chemistry* 260 (29): 15972–79.

Yano, Fumiko, Kugimiya, Fumitaka, Ohba, Shinsuke, Ikeda, Toshiyuki, Chikuda, Hirotaka, Toru Ogasawara, Naoshi Ogata. 2005. “The Canonical Wnt Signaling Pathway Promotes Chondrocyte Differentiation in a Sox9-Dependent Manner.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (4): 1300–1308. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.041>.

Yeomans, Martin R. 2010. "Alcohol, Appetite and Energy Balance: Is Alcohol Intake a Risk Factor for Obesity?" *Physiology and Behavior* 100 (1): 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.01.012>.

Yoshida, Carolina A, Yamamoto, Hiromitsu, Fujita, Takashi, Tatsuya I, Kosei Ito, Ken-ichi Inoue, Kei Yamana. 2004. "Runx2 and Runx3 Are Essential for Chondrocyte Maturation, and Runx2 Regulates Limb Growth through Induction of Indian Hedgehog," 952–63. <https://doi.org/10.1101/gad.1174704>

Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Research & Health*, v.29, p.245–254, 2006.

Zelner, I; Koren, G. Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, v.20, e259-e265, 2013.

Zelzer, E.; Mamluk, R.; Ferrara, N. et al. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development*, v.131, p.2161-2171, 2004.

Zheng, Qiping, Guang Zhou, Roy Morello, Yuqing Chen, Xavier Garcia-Rojas, Brendan Lee. 2003. "Type X Collagen Gene Regulation by Runx2 Contributes Directly to Its Hypertrophic Chondrocyte-Specific Expression in Vivo." *Journal of Cell Biology* 162 (5): 833–42. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211089>.

ANEXO



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Rogéria Serakides,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Efeitos in vivo e in vitro do etanol na viabilidade, atividade de síntese e na expressão de fatores de transcrição condrogênicos em condrobl, submetido a esta comissão pelo protocolo 119 / 2016, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 04/07/2016.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 05/07/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br