

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar - UNESP**

**AVALIAÇÃO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM
RESVERATROL SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

VICTOR FABRICIO

**SÃO CARLOS-SP
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar - UNESP

**AVALIAÇÃO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM
RESVERATROL SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

VICTOR FABRICIO

Tese de doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS-SP
2018

Fabricio, Victor

Avaliação do tempo de tratamento com resveratrol sobre o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas / Victor Fabricio. -- 2018.

92 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Keico Okino Nonaka

Banca examinadora: Keico Okino Nonaka, Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte, Gerson Jhonatan Rodrigues, Fabio Alexandre Casarin Pastor, Ana Paula de Souza Faloni

Bibliografia

1. tecido ósseo. 2. osteopenia. 3. resveratrol. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

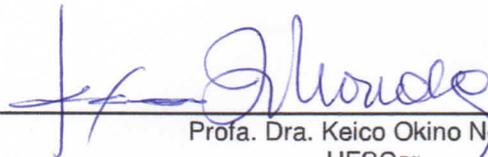


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

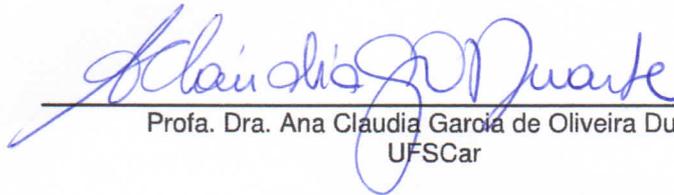
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

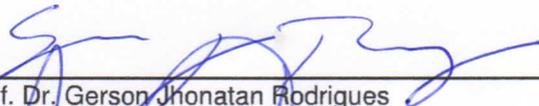
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Victor Fabricio, realizada em 15/06/2018:



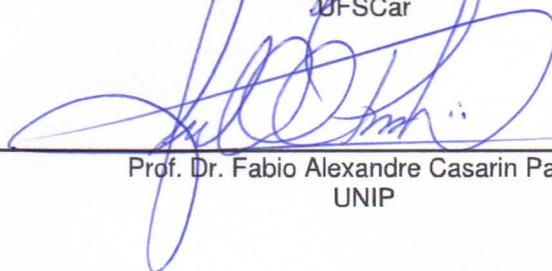
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka
UFSCar



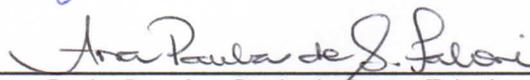
Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte
UFSCar



Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues
UFSCar



Prof. Dr. Fabio Alexandre Casarin Pastor
UNIP



Profa. Dra. Ana Paula de Souza Faloni
UNIARA

Esse trabalho recebeu apoio financeiro à pesquisa da CAPES

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

À minha esposa Amanda, pelo zelo, amor e apoio, seja na alegria, seja na tristeza, e por compartilhar e dividir cada momento de minha vida acadêmica, sempre disposta a crescer e superar os obstáculos ao meu lado.

Aos meus pais, José Geraldo e Maria Aparecida, pela criação, educação, amor, exemplo, incentivo e todo o apoio e compreensão de cada escolha realizada e caminho trilhado ao longo desses anos.

A todos que encontrei ao longo desta jornada que me auxiliaram de alguma forma, seja com um sorriso, uma dúvida sanada ou inúmeras horas de conversa e aconselhamento.

A TODOS VOCÊS, SEREI ETERNAMENTE GRATO!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

A Deus, por sua onipresença e guia de todos os objetivos almeçados e realizados em vida;

À Prof.^a. Dra. Keico Okino Nonaka, pela oportunidade de participação neste programa de pós-graduação, orientação e ensinamentos passados durante este período, além do grande caráter e o exemplo de profissionalismo a ser seguido;

Aos meus pais, José Geraldo Fabrico e Maria Aparecida Fabiano Fabricio pela criação, educação, amor, exemplo diário e todo esforço e incentivo aplicado para que eu trilhe o caminho do aprendizado, permitindo chegar até aonde cheguei;

Ao meu irmão, Murilo pela amizade, companheirismo e confiança desde o início de nossas vidas;

À minha esposa Amanda, pelo modo de enxergar a vida e de lidar com o mundo que me cativou desde o princípio e me ensina diariamente que “A vida não necessariamente é tão complicada como enxergamos”;

Aos meus sogros Luiz e Bernadete e aos meus cunhados Felipe, Fabiane e Fábio pelo acolhimento, amor, compreensão, confiança, exemplo, amizade e alegrias desde a primeira vista;

Ao José Euzébio Aragão e aos meus padrinhos Roseli e Rodolfo pelo exemplo profissional, incentivo e divagações que sempre me incitam o prazer que é fazer, propagar e discutir a ciência e educação;

Ao Instituto de Educação Atheneu e todos os docentes do Curso Técnico em Massoterapia, pelo primeiro passo dado em direção ao meio acadêmico e por me permitir encontrar minha verdadeira paixão;

A todos que eu me orgulho de chamar de família, sendo consanguínea ou não, pelas alegrias, acolhimento, incentivo e exemplo de como a amizade pode ser duradoura e gerar ótimos frutos, além de surgir nas situações mais inesperadas;

À Karina Ana da Silva, Bruna Gabriele Biffe e Jorge Camargo Oishi pela grande amizade, companheirismo, apoio, exemplo e, principalmente, horas a fio de divagações durante este doutorado, auxiliando diretamente no meu crescimento, além de tornarem essa jornada muito mais leve, agradável e repleta de bons momentos.

Aos grandes colegas que encontrei na pós-graduação: Cynthia, Júlio, Gustavo, Graziéle, Leandro, Carol e Luis e meus eternos amigos de graduação: André, Alana, Letícia, Luísa, Talita, Elisa e Rafael, por fazerem parte de momentos tão importantes da minha vida e por comprovarem que “O que a Federal constrói, nada destrói”;

Aos meus grandes amigos de colégio Maurício e Fernando por provarem que a distância e o tempo não apagam e muito menos diminuem o que é verdadeiro, sincero e leve.

Ao Fabio Alexandre Casarin Pastor, pelo grande incentivo e auxílio essenciais para o início da minha trajetória acadêmica;

Aos antigos pós-graduandos do Laboratório de Neuroendocrinologia, Charles Chenwei Wang, José Aparecido Ferreira e Fabio Henrique Bogni, pela experiência compartilhada, auxílio, companheirismo e amizade;

Ao Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck e à aluna Tainá Fernandes pela oportunidade de co-orientar um trabalho de Iniciação Científica, permitindo que eu ponha em prática o aprendi até o momento e tenha um contato com esta atividade tão essencial.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, por toda a contribuição no desenvolvimento deste trabalho especialmente Sr. Sérgio Dias, técnico do laboratório de Neuroendocrinologia e Alexandre Prata Vieira Chiva, secretário do PIPGCF;

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas pelo auxílio no aprendizado e desenvolvimento de técnicas de grande utilidade no presente e futuro, em especial à Dr.^a Diana Amaral Monteiro, Dr.^a Graziéle Deriggi Pisani e Ms. Driele Tavares pelos ensinamentos e dúvidas sanadas e à Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Kalinin e Prof.^a Dr.^a Marisa Narciso Fernandes pelos equipamentos necessários para padronização de tais técnicas;

Ao Prof. Dr. Mário Jefferson Louzada e à aluna Bruna Gabrielle Biffe pela realização da análise de densitometria óssea areal via DEXA na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia, no departamento do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Araçatuba – SP;

Ao Prof. Gérson Jhonatan Rodrigues e Jorge Camargo Oishi pelas análises de Pressão Arterial e Reatividade Vascular e todo auxílio despendido na confecção do artigo científico derivado desta Tese: “Resveratrol Treatment Normalizes the Endothelial Function and Blood Pressure in Ovariectomized Rats” aceito e publicado pela revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Prof^a. Dra. Keico pela confiança depositada, profissionalismo, caráter, generosidade e pelo modelo de profissional a ser seguido.

À disponibilidade pessoal e profissional e todos os ensinamentos que me permitiram sempre manter o caminho escolhido do modo mais correto possível.

Pelo incentivo, orientação e oportunidades facultados durante este caminho percorrido que, não só me permitiram crescer como acadêmico, profissional e, acima de tudo, como pessoa, como também me guiarão durante toda minha trajetória futura.

Minha imensa gratidão, respeito e admiração por uma educadora excepcional e tudo que me permitiu aprender, conviver e sentir ao longo de um caminho repleto de obstáculos e novas experiências, transferindo a certeza de que sairei dele uma pessoa e profissional o melhor que poderei ser.

RESUMO

Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol encontrado em algumas plantas e frutos que tem sido sugerido como agente preventivo do dano ósseo característico da osteoporose. Estudos indicam efeitos apenas sobre alguns poucos parâmetros ósseos, além de divergirem quanto à duração mínima do protocolo necessária para se observar tais efeitos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com resveratrol sobre fêmures e vértebras de ratas adultas jovens ovariectomizadas, durante 60 e 90 dias. Foram utilizadas 59 ratas Wistar com 3 meses de idade no início do experimento, que foram distribuídas em 6 grupos: grupos mantidos Intactos por 60 e 90 dias (INT 60 e INT 90) com, respectivamente, 11 e 9 animais cada; grupos Controle Ovariectomizadas tratados por 60 e 90 dias (OVX 60 e OVX 90) com, respectivamente, 10 e 9 animais cada, ovariectomizados e tratados via gavagem gástrica com salina 0,9% [0,1ml/100g Massa Corporal (MC)]; grupos Ovariectomizadas + Resveratrol tratados por 60 e 90 dias (OVX + RES 60 e OVX + RES 90) com, respectivamente, 11 e 9 animais cada, ovariectomizados e tratados via gavagem gástrica com uma solução de resveratrol em etanol 95% diluída em água destilada (10 mg/kg MC). Foram analisados parâmetros biométricos, físicos e biomecânicos de ossos com maior contingente cortical (fêmures) e trabecular (vértebras) dos animais, além da densidade óssea areal via DEXA das vértebras e a massa corporal dos animais. As propriedades biomecânicas dos fêmures foram obtidas pelo teste de flexão a três pontos e das vértebras lombares obtidas pelo teste de compressão óssea. O protocolo experimental de 60 dias foi capaz de constatar o aumento da massa corporal das ratas após a castração, assim como a diminuição das densidades óssea e mineral apenas das vértebras estudadas com a cirurgia e o efeito protetor do resveratrol sobre estes parâmetros destes mesmos ossos. Já no protocolo de 90 dias, tais efeitos sobre os parâmetros físicos se estenderam também aos fêmures e o tratamento, neste caso, foi também capaz de prevenir a maior massa corporal decorrente da castração. Quanto aos parâmetros biomecânicos, foi possível observar apenas uma tendência de diminuição da carga máxima com a cirurgia e proteção desta resposta com o tratamento nas vértebras do protocolo experimental de maior duração. Portanto, os resultados apontam o resveratrol, com a dose e meio de administração utilizados, como potencial protetor do tecido ósseo, tanto com maior contingente cortical, quanto com maior contingente trabecular, além do protocolo experimental de 90 dias ser capaz de apresentar mais nitidamente os efeitos da castração e do tratamento com resveratrol sobre os parâmetros ósseos e de massa corporal.

Palavras-chaves: resveratrol, osteoporose, tecido ósseo, massa corporal, biomecânica óssea, densidade óssea e ratas.

ABSTRACT

Resveratrol (3,5,4 'trihydroxystilbene) is a polyphenol found in some plants and fruits that has been suggested as a preventive agent for the bone damage characteristic of osteoporosis. Studies indicate the effects on only a few bone parameters, besides diverging regarding the minimum protocol duration required to observe such effects. The objective of this study was to evaluate the effects of the treatment with resveratrol on femurs and vertebrae of ovariectomized young adult female rats during 60 and 90 days. Fifty-nine Wistar female rats at 3 months of age at the beginning of the experiment have been utilized, which were divided into 6 groups: groups maintained Intact for 60 and 90 days (INT 60 and INT 90) with 11 and 9 animals each, respectively; Ovariectomized control groups treated with 60 and 90 days (OVX 60 and OVX 90) with 10 and 9 animals each, respectively, ovariectomized and treated via gastric gavage with saline 0.9% [0.1ml / 100g Body Weight (BW)]; Ovariectomized groups + Resveratrol treated for 60 and 90 days (OVX + RES 60 and OVX + RES 90) with 11 and 9 animals each, respectively, ovariectomized and treated via gastric gavage with a solution of resveratrol in 95% ethanol diluted in distilled water (10 mg / kg BW). Biometric, physical, and biomechanical parameters of bones from the animals with greater quantities cortical (femur) and cancellous (vertebrae) contingent were analyzed, as well as the areal bone density of the vertebrae via DEXA, and the body weight of the animals. The biomechanical properties of the femurs were obtained by the three point bending test, and the lumbar vertebrae's by the bone compression test. The experimental protocol of 60 days was able to remark the increase of the corporal weight of the rats after the castration, as well as the decrease of the vertebrae bone and mineral densities with the surgery and the protective effect of the resveratrol on these parameters of these same bones. In the 90-day protocol, these effects on the physical parameters were also extended to the femurs and the treatment, in this case, also able to prevent the greater corporal weight due to the castration as well. In the biomechanical parameters, it was possible to observe only a tendency of reduction of the maximum load with the surgery and protection with the treatment in the vertebrae of the longer experimental protocol. Therefore, the results indicate resveratrol, in the dose and route of administration used, as a potential protector of the bone tissue, both with greater cortical contingent and with greater cancellous contingent. In addition, the experimental protocol of 90 days showed be able to present more clearly the effects of castration and treatment with resveratrol on bone and body weight parameters.

Keywords: resveratrol, osteoporosis, bone tissue, body weight, bone biomechanics, bone density and rats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Método de medição do peso imerso dos ossos.32
- Figura 2** - Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para os ensaios biomecânicos. A: painel de controle; B: célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); C: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); D: osso (fêmur de rato); E: suporte.34
- Figura 3** - Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas. C1: Carga (Força) Máxima.35
- Figura 4** - Densitômetro DPX-ALPHA (A) e Software especial para pequenos animais usado para a análise de dados densitométricos (B).37
- Figura 5**- Representação gráfica dos valores de massa corporal inicial (g) dos animais dos diferentes dos diferentes grupos experimentais com tratamento 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média ± desvio padrão: *p<0,05 vs. INT 60.39
- Figura 6**- Massa Corporal e Área Sob a Curva (ASC) dos diferentes grupos experimentais tratados por 60 dias ao longo das 9 semanas de experimento. Dados expressos em Média e Intervalo de Confiança para a massa corporal e Média e Desvio padrão para a Área Sob a Curva.40
- Figura 7** - Representação gráfica dos valores de massa corporal inicial (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média ± desvio padrão: \$p<0,05 vs. INT 90.41
- Figura 8** - Massa Corporal e Área Sob a Curva (ASC) dos diferentes grupos experimentais tratados por 90 dias ao longo das 12 semanas de experimento. Dados expressos em Média e Intervalo de Confiança para a massa corporal e Média e Desvio padrão para a Área Sob a Curva.42
- Figura 9** - Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures direitos e quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes dos diferentes grupos experimentais com tratamento 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média ± desvio padrão.43
- Figura 10** - Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures direitos e quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média ± desvio padrão: \$p<0,05 vs. INT 90. &p<0,05 vs. OVX + RES 90. @p<0,05 vs. OVX 90.45

Figura 11 - Representação gráfica dos valores dos parâmetros físicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média ± desvio padrão. *p<0,05 vs. INT 60.	46
Figura 12 - Representação gráfica dos valores dos parâmetros físicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média ± desvio padrão: \$p<0,05 vs. INT 90. @p<0,05 vs. OVX 90.	48
Figura 13 - Representação gráfica dos valores dos parâmetros físicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média ± desvio padrão: *p<0,05 vs. INT 60. +p<0,05 vs. OVX 60.	49
Figura 14 - Representação gráfica dos valores dos parâmetros físicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média ± desvio padrão: \$p<0,05 vs. INT 90. @p<0,05 vs. OVX 90.	51
Figura 15 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média ± desvio padrão.	52
Figura 16 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média ± desvio padrão.	54
Figura 17 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média ± desvio padrão.	55
Figura 18 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média ± desvio padrão.	57
Figura 19 - Representação Gráfica dos valores dos Conteúdos de Cálcio e Fósforo das cinzas dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média ± desvio padrão.	58

Figura 20 - Representação Gráfica dos valores dos Conteúdos de Cálcio e Fósforo das cinzas dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão..... 60

Figura 21 - Representação Gráfica dos valores de Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão..... 61

Figura 22 - Representação Gráfica dos valores de Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa corporal em gramas (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).	40
Tabela 2 - Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa corporal em gramas (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).	42
Tabela 3 - Comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises em milímetros (mm) dos fêmures direitos e altura das quintas vértebras lombares (mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).	44
Tabela 4 - Comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises em milímetros (mm) dos fêmures direitos e altura das quintas vértebras lombares (mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).	45
Tabela 5 - Densidade óssea e mineral (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).	47
Tabela 6 - Densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).	48
Tabela 7 - Densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).	50
Tabela 8 - Densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).	51
Tabela 9 - Carga (Força) Máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J), e rigidez (N/mm), obtidos no teste biomecânico dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).	53

Tabela 10 - Carga (Força) Máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J), e rigidez (N/mm), obtidos no teste biomecânico dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).....	54
Tabela 11 - Carga (Força) Máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J), e rigidez (10 N/mm), obtidos no teste biomecânico das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).....	56
Tabela 12 - Carga (Força) Máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J), e rigidez (10 N/mm), obtidos no teste biomecânico das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).....	57
Tabela 13 - Conteúdo de Cálcio e Fósforo das cinzas dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).....	59
Tabela 14 - Conteúdo de Cálcio e Fósforo das cinzas dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).....	60
Tabela 15 - Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm ²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm ²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).	62
Tabela 16 - Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm ²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm ²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2N 2 Normal

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

ASC Área Sob a Curva

AVE Acidente Vascular Encefálico

C₁ Carga (Força) Máxima

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ Hidroxiapatita

C.E.E.A Comitê de Ética em Experimentação Animal

cm Centímetro

cm² Centímetro quadrado

cm³ Centímetro Cúbico

DEXA Densitômetro ósseo

DP Desvio Padrão

ER Receptores de Estrógeno

ER α Receptor de Estrógeno α

ER β Receptor de Estrógeno β

EROs Espécies Reativas de Oxigênio

FDA *Food and Drugs Administration*

FoxO Fator de Transcrição *Forkhead box O*

FRAX *Fracture Risk Assessment Tool*

g Gramas

IL-1 Interleucina 1

IL-6 Interleucina 6

INT 60 Grupo Intacto do protocolo experimental de 60 dias

INT 90 Grupo Intacto do protocolo experimental de 90 dias

J Joules

kg Quilogramas

kgf Quilograma Força

kN Quilo Newton

L5 Quintas Vértexas Lombares

MC Massa Corporal

M-CSF Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos

mg Miligramas

min Minuto
mm Milímetros
n Número de Animais
N Newton
NAD⁺ Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADPH Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NBR Denominação de norma da ABNT
NF-κB Fator nuclear kappa B
NF-κB/p65 Subunidade do fator nuclear kappa B
NOX NADPH oxidase
NOX 4 NADPH oxidase 40
OMS Organização Mundial de Saúde
OPG Osteoprotegerina
OVX 60 Grupo Ovariectomizadas do protocolo experimental de 60 dias
OVX 90 Grupo Ovariectomizadas do protocolo experimental de 90 dias
OVX + RES 60 Grupo Ovariectomizadas + Resveratrol do protocolo experimental de 60 dias
OVX + RES 90 Grupo Ovariectomizadas + Resveratrol do protocolo experimental de 90 dias
ρ Rô
Pi Peso Imerso
Pm Peso do Material Mineral (cinzas)
Ps Peso Seco
PTH Hormônio da Paratireóide
Pu Peso úmido
RANK Ativador do receptor de fator nuclear κB
RANKL Ligante ativador do receptor de fator nuclear κB
S1 Primeira Vértebra Sacral
Sirt1 Sirtuína 1
TNFα Fator de Necrose Tumoral α
TRH Terapia de Reposição Hormonal
TVP Trombose Venosa Profunda
UFSCar Universidade Federal de São Carlos
μg Micrograma
vs Versus
°C Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	20
2	OBJETIVOS.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	ANIMAIS	29
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.3	CIRURGIA	30
3.4	TRATAMENTOS.....	30
3.5	COLETA DAS AMOSTRAS	31
3.6	PARÂMETROS ANALISADOS	31
3.6.1	Parâmetros Biométricos	31
3.6.2	Parâmetros Físicos.....	32
3.6.3	Parâmetros Biomecânicos	33
3.6.4	Parâmetros Bioquímicos	36
3.6.5	Densitometria Óssea.....	37
3.7	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	37
3.8	NORMAS TÉCNICAS REFERENTES À ELABORAÇÃO DO TRABALHO .	37
4	RESULTADOS.....	39
4.1	MASSA CORPORAL	39
4.1.1	Experimento de 60 Dias	39
4.1.2	Experimento de 90 Dias	41
4.2	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	43
4.2.1	Experimento de 60 Dias	43
4.2.2	Experimento de 90 Dias	44
4.3	PARÂMETROS FÍSICOS	46
4.3.1	Parâmetros Físicos dos Fêmures	46
4.3.1.1	Experimento de 60 Dias	46
4.3.1.2	Experimento de 90 Dias	47
4.3.2	Parâmetros Físicos das Vértabras.....	49
4.3.2.1	Experimento de 60 Dias	49
4.3.2.2	Experimento de 90 Dias	50
4.4	PARÂMETROS BIOMECÂNICOS	52
4.4.1	Parâmetros Biomecânicos dos Fêmures	52

4.4.1.1	Experimento de 60 Dias	52
4.4.1.2	Experimento de 90 Dias	53
4.4.2	Parâmetros Biomecânicos das Vértèbras	55
4.4.2.1	Experimento de 60 Dias	55
4.4.2.2	Experimento de 90 Dias	56
4.5	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	58
4.5.1	Experimento de 60 Dias	58
4.5.2	Experimento de 90 Dias	59
4.6	DENSITOMERIA ÓSSEA	61
4.6.1	Experimento de 60 Dias	61
4.6.2	Experimento de 90 Dias	62
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXO I – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA	92

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol/fitoalexino não-flavonóide, membro da família viniferina de polímeros, existente na natureza tanto na forma de *trans*-resveratrol, quanto *cis*-resveratrol. Foi isolado pela primeira vez em 1939 a partir das raízes de *Veratrum grandiflorum* e, em 1976 foi classificado como fitoalexino, uma substância cuja síntese é induzida pela infecção fúngica (NIKOLOVA, 2007). Durante a análise de diferentes tipos de vinhos tintos quanto à sua concentração de resveratrol, SIEMANN; CREASY (1992) indicaram o *trans*-resveratrol como o composto biologicamente ativo no vinho, sendo a ele relacionado, no momento, à redução de lipídios séricos explicando, assim, um dos meios pelo qual a bebida possui efeito cardioprotetor.

Ele é encontrado em mais de 70 espécies de plantas das quais as fontes mais frequentes são: rizoma de *Polygonum cuspidatum*, uvas vermelhas (incluindo folhas, sementes, talos e raízes) como as espécies *Vitis vinifera* (utilizadas para fabricação de vinho na Europa), *Vitis lambrusca* (de origem norte-americanas) e *Vitis rotundifolia* (uvas muscadineas, cultivadas no sudeste dos Estados Unidos para produção de vinhos, sucos e geléias), além de algumas bagas (como o mirtilo e oxicoco), alguns pinheiros, flores (como a *Veratrum grandiflorum*) e até mesmo no chocolate escuro e cacau (BAUR; SINCLAIR, 2006; COUNET; CALLEMIEN; COLLIN, 2006).

Recentemente, o resveratrol vem mostrando efeitos promissores em uma grande gama de doenças, tendo maior número de estudos pré-clínicos sobre o câncer, distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares (COTTART; NIVET-ANTOINE; BEAUDEUX, 2014). Outros efeitos elucidados pela literatura incluem: anti-inflamatórios; neuroprotetores; sobre o metabolismo de algumas drogas; como coadjuvante em tratamentos hipoglicêmicos em pacientes com Diabetes Tipo 2; e antioxidantes [seja eliminando Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), seja modulando o sistema antioxidante endógeno] (COTTART; NIVET-ANTOINE; BEAUDEUX, 2014; HAUSENBLAS; SCHOULDA; SMOLIGA, 2014; NIKOLOVA, 2007). Ademais, sua similaridade estrutural com o dietilestilbestrol, um estrógeno sintético, o caracteriza como um fitoestrógeno (FRÉMONT et al., 2001).

Estudos indicam, também, que ele é capaz de afetar o metabolismo ósseo *in vitro*, apresentando efeito osteogênico sobre as células ósseas, não só aumentando a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, como também inibindo a formação de osteoclastos (BOISSY et al., 2005; KUTLEŠA; BUDIMIR MRŠIĆ, 2016; SHAKIBAEI; BUHRMANN; MOBASHERI, 2011; TSENG et al., 2011).

O osso é um tecido rígido que mantém-se em constante modificação, composto de uma matriz extracelular altamente organizada, contendo componentes inorgânicos (60%) e orgânicos (40%) (BOSKEY,ROBEY, 2008), além de um distinto e complexo grupo celular. A fase inorgânica, ou mineral, é responsável pela resistência mecânica do tecido e é constituída basicamente por pequenos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO)_6(OH)_2]$ (formados por cálcio, fosfato e carbonato) e menores quantidades de magnésio, sódio, potássio, manganês e flúor. Já a fase orgânica (que dá origem à matriz óssea e é a fase determinante da estrutura e das propriedades biomecânicas ósseas) é composta principalmente por colágeno tipo I, fatores de crescimento, citocinas e proteínas da matriz celular, além das células do tecido ósseo (10% do total da matriz óssea) (WALSH, 2018).

Macroscopicamente, o osso é dividido em dois principais tipos, cuja distinção é de grande importância mecânica (BRANDI, 2009; LANGDAHL; FERRARI; DEMPSTER, 2016; LOVERIDGE, 1999):

- Osso Cortical: Constituinte de aproximadamente 80% do esqueleto, formado de camadas concêntricas de matriz óssea ao redor de vasos longitudinais na sua estrutura (Sistema Haversiano), além de apresentar poucas porosidades, demonstrando uma alta relação massa/volume. Apresenta maior resistência às forças de torção e flexão e, normalmente, é encontrado no eixo de ossos longos e na superfície de ossos achatados.

- Osso Trabecular: Consiste de uma armação de estruturas ósseas cilíndricas aleatoriamente organizadas as quais, apesar de mais fracas, proveem um suporte leve e metabolicamente ativo no osso. Apresenta muitas porosidades (possuindo uma baixa relação massa/volume) e, devido à sua estrutura, possui uma maior resiliência e capacidade de absorção de choque, além de sua maior área de contato permitir uma taxa metabólica maior e consequente adaptação mais rápida à carga. É encontrado normalmente na região central de ossos chatos e na epífise de ossos longos.

As proporções relativas destes contingentes na estrutura de cada osso podem variar consideravelmente dependendo do sítio ósseo. A relação entre osso trabecular e osso cortical nas vértebras é de 75% para 25%, enquanto na cabeça do fêmur ela é de 50%:50% (BRANDI, 2009; LANGDAHL; FERRARI; DEMPSTER, 2016; LOVERIDGE, 1999) .

Microscopicamente, são encontrados quatro grupos de células: as células osteoprogenitoras (células tronco mesenquimais que podem se tornar osteoblastos e seu grau de atividade é dado devido a demanda metabólica), osteoblastos (responsáveis pela formação óssea por meio da síntese e liberação de componentes da matriz óssea orgânica), osteócitos (osteoblastos diferenciados aprisionados na matriz óssea mineralizada cuja principal função é

a tradução da força mecânica imposta ao osso em sinais bioquímicos que regulam o remodelamento ósseo) e osteoclastos (células gigantes multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea) (FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006).

Todos os grupos celulares (via liberação de diversas enzimas) e os fatores intrínsecos e extrínsecos atuam nas diversas vias metabólicas mantendo o tecido ósseo em constante modificação (estima-se que, a cada ano, 10% do esqueleto é renovado) (BRANDI, 2009). Este processo leva o nome de remodelamento ósseo e acontece, basicamente, em quatro fases, claramente identificadas, de forma cíclica: quiescência/ativação, aonde há o recrutamento dos osteoclastos; reabsorção, na qual os osteoclastos secretam uma solução ácida responsável pela degradação do componente inorgânico, enquanto enzimas lisossomais degradam o componente orgânico; reversão, na qual há a apoptose dos osteoclastos e recrutamento dos osteoblastos; e formação, na qual os osteoblastos depositam matriz extracelular na lacuna criada durante a reabsorção (Lacuna de Howship no contingente trabecular e Cones de Reabsorção no contingente cortical), matriz esta que será posteriormente mineralizada (BRANDI, 2009; LANGDAHL; FERRARI; DEMPSTER, 2016).

Este processo apresenta a duração de aproximadamente 200 dias, sendo que maior parte deste tempo é tomada pela formação, e seu principal objetivo é manter a homeostasia de cálcio e fósforo, regular o “turnover” da matriz extracelular e auxiliar na reparação de microdanos do tecido (BRANDI, 2009; WALSH, 2018). Ainda, este evento é mais proeminente nas superfícies do componente trabecular, aonde é estimado que ocorre cerca de 80% do remodelamento ósseo, com a importância relativa no osso cortical crescendo com o decorrer da idade, aonde já houve uma perda significativa do componente trabecular e a atividade de remodelamento em ambos os contingentes aumenta (SEEMAN, 2013).

Para que o remodelamento ósseo mantenha sua ciclicidade e o tecido se conserve saudável, a interação entre seus grupos celulares faz-se necessária. Os osteoblastos, por exemplo, influem diretamente na osteoclastogênese por meio da liberação do ligante ativador do receptor de fator nuclear κ B (do inglês *receptor activator of nuclear factor κ B ligand*, ou RANKL), fatores estimulantes de colônia de macrófagos (M-CSFs) e Osteoprotegerina (OPG) sendo, então, essenciais para o controle da reabsorção óssea (FENG; MCDONALD, 2011; LERNER, 2006).

O RANKL, após liberado, liga-se a receptores RANK (*receptor activator of nuclear factor κ B*, ou receptor ativador de NF- κ B) nas membranas das células promotoras de osteoclastos, levando à fosforilação do Fator Nuclear κ B (*Nuclear Factor κ B*, ou NF- κ B) que atua na expressão gênica e, conseqüentemente, na diferenciação destas células em osteoclastos

de fato. Similarmente, os M-CSFs, ao se ligarem aos seus receptores cognatos nas células progenitoras de osteoclastos, aumentando sua proliferação e sobrevivência (BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008; LERNER, 2006). Ou seja, além de realizarem a formação óssea, os osteoblastos, por meio da liberação dessas substâncias, são responsáveis pelo início da fase de ativação do remodelamento ósseo.

Em contrapartida, os osteoblastos podem secretar OPG, um receptor que compete com o RANK pela ligação do RANKL e, agindo como um chamariz, inibe a via dependente de RANK, coibindo a osteoclastogênese (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). Assim, por meio da relação RANKL/OPG no soro sanguíneo, é possível determinar o cenário do remodelamento no osso sendo que, se tiver muito elevada, há um indicativo de que a reabsorção óssea está intensificada e, quando estiver diminuída, a reabsorção está mais tênue (BOYCE; XING, 2008).

Assim como o ser humano sofre constantes modificações ao longo do seu ciclo de vida, a fisiologia do tecido ósseo está sujeita a constantes variações, se resumindo na relação entre a formação e reabsorção do tecido, também chamado de balanço ósseo. O pico máximo do balanço ósseo no desenvolvimento humano encontra-se aos 30 anos de idade, aonde há predominância da formação tecidual (balanço ósseo positivo). Entre os 35 e 40 anos há a estabilização entre os dois mecanismos e, após esse período, a reabsorção óssea pode prevalecer (balanço ósseo negativo). Neste último cenário, pode haver uma progressiva diminuição de massa óssea alcançando até, aproximadamente, 0,3% ao ano, podendo estar relacionado ou não a outros processos patológicos (BERGLUND et al., 2000).

Ademais, todo o metabolismo ósseo está sujeito à influência de diversos fatores endógenos (hormonais, genética, gênero, idade e doenças) e exógenos (alimentação e fatores ambientais). No sexo feminino, por exemplo, a perda óssea pode alcançar uma média de 1-2% ao ano durante os dez primeiros anos após a menopausa e pode ser agravada pelo acúmulo de fatores. A deficiência de estrógeno é um dos principais motivos para tal aumento nas mulheres pós-menopausadas, podendo levá-las a episódios mais severos, como a osteoporose (AKHTER et al., 2004; MARCUS; FELDMAN; KELSEY, 1996; NGUYEN et al., 2003; RIGGS; KHOSLA; MELTON 3RD, 2002).

A osteoporose é uma desordem multifatorial primária do esqueleto relacionada a alterações profundas do metabolismo não só do osso, como também de todo o corpo. Múltiplos mecanismos fisiopatogênicos confluem para causar a deterioração e perda da microarquitetura estrutural dos ossos, além da diminuição da densidade óssea. Tais fatores acarretam aumento da fragilidade do tecido que, associada ao aumento do risco de quedas

característico do envelhecimento, contribui para um maior índice de fraturas em pacientes osteoporóticos, principalmente na senilidade (ARMAS; RECKER, 2012; BLACK; ROSEN, 2016; KANIS et al., 2013). Ela é considerada uma doença silenciosa, uma vez que se apresenta aparentemente assintomática até a primeira fratura com trauma mínimo ou sequer sem trauma nenhum, indicando o grau avançado de fragilidade óssea (COSMAN et al., 2014).

O meio mais comum de se diagnosticar a doença é por meio da análise da densidade óssea do indivíduo (medida pelo *Dual Energy X-Ray Absorptiometry* [DEXA]) e comparando-a à média da população de mesma faixa de idade e sexo. Quando o valor está 2,5 Desvios Padrão abaixo da média, o indivíduo já é caracterizado com baixa densidade óssea e com, possivelmente, osteoporose (KANIS; ORGANIZATION, 2008; SILVERMAN, 2008; SUJIC et al., 2013). (KANIS; ORGANIZATION, 2008; SILVERMAN, 2008; SUJIC et al., 2013). Entretanto, apenas a baixa densidade mineral óssea não é um fator preditivo claro para o risco de fraturas, sendo necessária a associação deste resultado com vários fatores de risco estabelecidos por meio da *Fracture Risk Assessment Tool* (FRAX), uma ferramenta criada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para predizer o risco de desenvolvimento das principais fraturas osteoporóticas (como a de quadril, colo de fêmur e vértebras) em um período de dez anos após a avaliação (BLACK; ROSEN, 2016).

Estima-se que na população caucasiana, aproximadamente uma a cada duas mulheres e um a cada cinco homens experienciarão fraturas osteoporóticas em algum momento da sua vida, sendo essas grandes causas de morbidade e mortalidade na população (COSMAN et al., 2014; WRIGHT et al., 2014). Sua prevalência é cerca de 9 milhões de fraturas no mundo anualmente (resultando em uma fratura osteoporótica a cada 3 segundos) com custos que ultrapassam € 36 bilhões na Europa e, na falta de um tratamento significativo que atinja globalmente, estes custos podem duplicar até 2050 (JOHNELL; KANIS, 2006; KANIS et al., 2013). No Brasil, pressupõe-se que a prevalência da osteoporose na população varie de 21,3 a 33% na faixa acima de 50 anos, com custos diretos relacionados à internações pelo Sistema Único de Saúde devido a fraturas osteoporóticas próximo aos US\$ 27 milhões (MARINHO et al., 2014).

Dentro das diversas causas da osteoporose, a redução dos níveis de estrógeno têm sido foco de diversos estudos, sendo esta a explicação para o aumento da perda de massa óssea em mulheres após a menopausa uma vez que, neste período, a falência ovariana leva a uma queda da produção do hormônio (FAIENZA et al., 2013; RAMALHO; LAZARETTI-CASTRO, 1999; WEITZMANN; PACIFICI, 2006).

Esta relação entre a queda dos níveis de estrógeno e a osteoporose após a menopausa se apoia na própria função do hormônio, uma vez que ele possui efeito sobre fatores sistêmicos que envolvem a massa óssea como: diminuição da sensibilidade do osso ao hormônio paratireoideano (PTH), que é responsável por estimular a reabsorção óssea; aumento da produção de calcitonina, reduzindo a reabsorção óssea; aceleração da reabsorção de cálcio no intestino e redução da excreção da substância pelos rins, auxiliando no balanço do mineral no corpo (JI; YU, 2015). Já sobre o componente celular, o estrógeno pode agir nos osteoblastos e linfócitos T, diminuindo a liberação de substâncias com potencial osteoclastogênico como as EROs, NF- κ B e citocinas inflamatórias como as Interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL6) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), limitando, assim, a diferenciação e ativação dos osteoclastos, mantendo a reabsorção óssea sob controle (NOVACK, 2007).

Desta forma, a redução inicial dos níveis do hormônio logo após a menopausa leva a um aumento da quantidade de osteoclastos e do seu ciclo de vida, gerando uma maior reabsorção óssea (responsável pela fase rápida da osteoporose), principalmente no osso trabecular, sendo responsável pela degradação estrutural do mesmo. Além disso, com o envelhecimento, após 4 a 8 anos de menopausa, a função dos osteoblastos diminui junto com a formação óssea, potencializando assim a perda de massa óssea no osso cortical (fase lenta da osteoporose), caracterizando o tecido como osteoporótico de fato (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012; RIGGS; KHOSLA; MELTON 3RD, 2002).

A osteoporose pós-menopausa é conhecida por não possuir tratamentos muito efetivos (DAS, 2013). A Terapia de Reposição Hormonal (TRH), bastante indicada para o tratamento ou prevenção da doença, pode apresentar efeitos colaterais quando utilizada a longo prazo ou em condições específicas (como predisposição genética ao câncer de mama). Alguns dos mais prejudiciais seriam o aumento do risco de câncer de mama e do endométrio, a trombose venosa profunda (TVP), o acidente vascular encefálico (AVE) e algumas doenças coronárias, demandando cautela ao utilizá-la (GHAZAL; PAL, 2013; MACEDO et al., 1998).

Na busca de alternativas com menor quantidade de efeitos colaterais e prejudiciais no tratamento e prevenção da osteoporose em mulheres, o resveratrol apresenta-se como uma substância promissora devido à sua similaridade com o dietilestilbestrol (um estrógeno sintético), ao fato de sua ação sobre receptores de estrógeno ser confirmada e apresentar efeitos benéficos sobre linhagens de células osteoprogenitoras em modelo animal de osteopenia, além de prevenir a progressão de células do câncer de mama por vias independentes de receptores de estrógeno (FRÉMONT et al., 2001; GEHM et al., 1997; SITES et al., 2007).

Estudos *in vivo* envolvendo a substância na prevenção de dano ósseo em modelos de osteoporose experimental apresentaram efeitos sobre alguns parâmetros ósseos. HABOLD et al., (2011) em um protocolo de perda óssea por desuso em ratos Wistar, observaram que o tratamento via oral com resveratrol (400mg/ Kg MC) realizado previamente à suspensão pela cauda promoveu proteção contra a diminuição da densidade mineral óssea volumétrica de fêmures e tíbias (com resposta mais expressiva nas tíbias), da densidade mineral óssea cortical na metáfise de tíbias, além da proteção contra a deterioração microarquitetural em ambos os ossos analisados.

Já segundo os estudos de ZHAO et al. (2014), o tratamento de doze semanas por meio de um tubo estomacal com diferentes doses de resveratrol (entre 20 e 80 mg/Kg MC) foi capaz de, em ratas ovariectomizadas: proteger contra a redução da densidade mineral óssea areal no colo e na porção distal do fêmur (nas doses de 40 e 80 mg/KG MC); impedir parcialmente a deterioração microarquitetural dos fêmures na dose de 80 mg/Kg MC; e diminuir a excreção de cálcio e fósforo, podendo indicar diminuição da reabsorção óssea.

Entretanto, apesar destes efeitos citados, há uma escassez na literatura de estudos que analisem uma maior gama de parâmetros ósseos associando-os entre si para melhor esclarecimento da ação da substância sobre todo o tecido, limitando, assim, a visão geral do efeito do resveratrol sobre o osso. Ademais, poucos incluem ensaios como o de biomecânica óssea, importante para se obter informações mais detalhadas da integridade mecânica do osso e sua consequente resistência a fraturas (TURNER; BURR, 1993); e análise de conteúdo de cálcio e fósforo ósseo, necessários para melhor analisar a composição mineral do osso frente ao protocolo em questão.

Em um estudo anterior nesta linha de pesquisa deste laboratório, o tratamento de doze semanas com resveratrol (0,7 mg/kg MC) via injeções intraperitoniais em ratas Wistar ovariectomizadas apresentou efeito protetor contra as alterações microarquiteturais e a diminuição da densidade óssea das vértebras. Entretanto, não foram encontradas tais respostas sobre os fêmures dos grupos analisados e sobre a biomecânica de ambos os ossos estudados. Dentre as principais limitações apontadas para tais resultados estavam a baixa dose, o meio de administração e o veículo utilizado (DMSO) (FABRICIO, 2014).

A literatura indica que o resveratrol apresenta boa absorção e distribuição tecidual quando administrado via oral e, apesar de sua baixa biodisponibilidade e rápida metabolização quando administrado por esta via, há indícios de que os metabólitos gerados pelos metabolismos gastrointestinal e hepático podem auxiliar nas funções benéficas da

substância, além de servir de substrato para conjugação de resveratrol e consequente liberação nos tecidos (DELMAS et al., 2011; EL-MOHSEN et al., 2006; WALLE, 2011).

Ainda, CASATI et al. (2013) e CASARIN et al. (2014) demonstraram que o tratamento de 30 dias com resveratrol (10 mg/kg MC) via gavagem gástrica exerce efeitos benéficos sobre o osso em modelos de implante dental e periodontite, e que apesar da perda óssea nesses modelos envolver alguns mediadores similares aos da osteoporose pós-menopausa, os mecanismos gerais ainda são diferentes.

Para estudos envolvendo osteoporose experimental por meio da ovariectomia em ratas, o tempo mínimo após o procedimento para que hajam alterações significativas em vértebras e ossos longos é de 60 dias (LELOVAS et al., 2008) porém, protocolos envolvendo o resveratrol e perda óssea utilizam períodos maiores de tratamento, chegando a 90 dias (LIU et al., 2005; ZHAO et al., 2014). Com isso, não se sabe ao certo se o período de 60 dias já seria o suficiente para que a ovariectomia e o tratamento provoquem efeito no osso e, utilizando este período mínimo citado, poder-se-ia diminuir o tempo expandido em cada protocolo e, consequentemente, os gastos com a pesquisa.

Desta forma, os achados encontrados não só caracterizam o resveratrol como uma terapia potencial para a prevenção da osteoporose (principalmente por deficiência de estrogênio), como também indicam que, tanto a administração via oral da substância, quanto o teste de diferentes durações de tratamento, além da análise mais extensa do tecido ósseo, seriam de grande interesse científico para melhor elucidação dos efeitos do resveratrol sobre todo o tecido, com a possibilidade de diminuir o tempo expandido para a realização deste tipo de protocolo de tratamento.

2 OBJETIVOS

Objetivamos neste estudo, por meio do uso de duas durações de protocolo de tratamento com resveratrol via gavagem gástrica em ratas adultas jovens ovariectomizadas, avaliar, não só os efeitos da substância para a prevenção da osteopenia, como também o tempo mínimo necessário para se observar os mesmos. Para tal, foram realizadas análises de propriedades biométricas, físicas, biomecânicas, bioquímicas e de densidade óssea via DEXA de ossos com maior contingente cortical (fêmures) e trabecular (vértebras).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados neste experimento, 59 ratas intactas da linhagem “Wistar” (*Rattus norvegicus albinus*), com 90 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

O experimento foi realizado no laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. As ratas permaneceram em biotério próprio do laboratório, durante todo o desenvolvimento experimental, sob as seguintes condições: regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro), temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), alimentação com ração comercial e água “*ad libitum*”. Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal – C.E.E.A. – número 2-043/2014 (ANEXO I).

3.2 Delineamento experimental

Para análise dos efeitos dos diferentes tempos de tratamento com resveratrol sobre variáveis ósseas, os animais foram distribuídos aleatoriamente seguindo o delineamento experimental:

Tratamento com duração de sessenta (60) dias:

- Grupo Intacto (INT 60): 11 animais mantidos intactos por 60 dias.
- Grupo Controle Ovariectomizadas (OVX 60): 10 animais ovariectomizados e tratados durante 60 dias via gavagem gástrica com salina 0,9% (0,1ml/100g MC).
- Grupo Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60): 11 animais ovariectomizados tratados durante 60 dias via gavagem gástrica com uma solução de resveratrol (10mg de Resveratrol/kg MC) solubilizada em etanol e diluída com água destilada.

Tratamento com duração de noventa (90) dias:

- Grupo Intacto (INT 90): 9 animais mantidos intactos por 90 dias.
- Grupo Controle Ovariectomizadas (OVX 90): 9 animais ovariectomizados e tratados durante 90 dias via gavagem gástrica com salina 0,9%.

-Grupo Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90): 9 animais ovariectomizados tratados por 90 dias via gavagem gástrica com uma solução de resveratrol (10mg de Resveratrol/kg MC) solubilizada em etanol e diluída com água destilada.

3.3 Cirurgia

As ratas dos grupos OVX 60, OVX 90, OVX + RES 60 e OVX + RES 90 foram ovariectomizadas aos 3 meses de idade devido à boa resposta à cirurgia evidenciada pela literatura (KALU, 1991). A técnica utilizada foi a descrita por ZARROW (1964) e anestesia utilizada foi a de cloridrato de cetamina (50mg/kg massa corpórea) e cloridrato de xilazina (10mg/kg de massa corpórea).

O sucesso da cirurgia foi verificado pela atrofia uterina observada em ambos os grupos ovariectomizados nos dois períodos experimentais quando comparados aos seus respectivos grupos intactos. No período experimental de 60 dias, as médias com os desvios padrão dos grupos OVX 60 e OVX + RES 60 foram, respectivamente, de $0,14 \pm 0,02$ e $0,18 \pm 0,04$, enquanto a do grupo INT 60 foi de $0,48 \pm 0,11$. Já no período experimental de 90 dias, as médias com os desvios padrão dos grupos OVX 90 e OVX + RES 90 foram, respectivamente, de $0,13 \pm 0,04$ e $0,12 \pm 0,01$, enquanto a do grupo INT 90 foi de $0,58 \pm 0,21$.

3.4 Tratamentos

O tratamento das ratas dos grupos OVX 60, OVX+RES 60, OVX 90 e OVX + RES 90 iniciou-se no dia seguinte à realização da ovariectomia. A dose de resveratrol (10 mg/kg MC), o veículo e a via de administração utilizados e a duração dos regimes de tratamento foi determinada por meio da revisão da literatura (CASARIN et al., 2014; CASATI et al., 2013; LELOVAS et al., 2008; LIU et al., 2005; ZHAO et al., 2014). A concentração final de etanol na solução administrada às ratas foi de 5% e o volume administrado dela aos animais foi de 0,1ml/100g MC.

Já nos grupos OVX 60 e OVX 90 foi utilizada apenas uma solução de salina 0,9%.

3.5 Coleta das amostras

Durante o período experimental, as massas corporais das ratas foram medidas e anotadas semanalmente visando-se observar a evolução ponderal da massa corpórea dos animais e para adequação das doses de tratamento.

Após o final de cada regime de tratamento (60 e 90 dias), foi realizada a eutanásia por decapitação dos animais dos grupos correspondentes, com subsequente dissecação femoral (direita) e das quintas vértebras lombares (L5) para retirada da musculatura e tecidos moles, isolando o material ósseo para coleta, os quais foram mantidos em solução de salina 0,9% a -20°C para as subseqüentes análises.

3.6 Parâmetros analisados

As medidas necessárias para os parâmetros físicos, biométricos e biomecânicos e a coleta dos dados foram realizados pelo autor deste trabalho. Os ensaios bioquímicos foram realizados pela orientadora com o auxílio do autor. Já o ensaio de densitometria óssea, foi realizado por outra instituição.

3.6.1 Parâmetros Biométricos

Medidas do comprimento do fêmur direito

Esta mensuração foi realizada com um paquímetro (precisão de 0,05 mm) seguindo a padronização referencial: região distal dos côndilos femorais (face articular com a tíbia) e saliência óssea mais proximal do trocânter maior.

Medidas das espessuras das diáfises femorais

Foram mensurados com o paquímetro, os diâmetros maiores (realizado na posição látero-lateral) e menores (realizado na posição ântero-posterior) da diáfise femoral, seguindo a padronização referencial: base do terceiro trocânter.

Medidas das alturas do corpo das quintas vértebras lombares (L5)

Esta mensuração foi realizada com um paquímetro (precisão de 0,05 mm).

3.6.2 Parâmetros Físicos

Após a verificação dos parâmetros biométricos dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais, mantiveram-se os ossos (imersos em água destilada) em um dessecador por um período de 24 horas objetivando a retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida obtiveram-se os pesos imerso (P_i) (Figura 1) e úmido (P_u). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, as amostras foram armazenadas em uma estufa na temperatura de 100° C durante 24 horas com o intuito de desidratar as amostras e, posteriormente, obteve-se o peso seco (P_s). Para obtenção do peso das cinzas (material mineral - P_m), os ossos foram colocados em uma mufla a 800° C por um período de 24 horas (NORDSLETTEN et al., 1994). Todas as medidas citadas foram obtidas por meio de uma balança eletrônica de precisão (Modelo AUY220 - Shimadzu®).



Figura 1 - Método de medição do peso imerso dos ossos.

Baseando-se no Princípio de Arquimedes, calcularam-se o volume ósseo e subsequentemente a densidade óssea e mineral, percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, por meio das fórmulas citadas abaixo (MARTIN, 1990):

$$\text{Volume ósseo} = \frac{P_u - P_i}{\rho} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P_u}{\text{volume ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_m}{\text{volume ósseo}} \text{ (cm}^3\text{)}$$

$$\text{Percentual ósseo de água} = \frac{[100 \times (P_u - P_s)]}{P_u}$$

$$\text{Percentual material orgânico} = \frac{[100 \times (P_s - P_m)]}{P_u}$$

$$\text{Percentual material mineral} = \frac{100 \times P_m}{P_u}$$

Onde:

P_u = peso úmido ósseo

P_i = peso imerso ósseo

P_s = peso ósseo da amostra desidratada

P_m = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

3.6.3 Parâmetros Biomecânicos

Por meio do teste de flexão a três pontos, as propriedades biomecânicas dos fêmures direitos foram mensuradas utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444 (Figura 2), cuja célula de carga apresenta capacidade máxima de 100 kgf (aproximadamente 1 kN). As extremidades dos fêmures ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, com distância móvel entre si (para que ela sempre seja adaptada a 1/3 do comprimento do fêmur analisado) e a região central (das diáfises) dos ossos foi selecionada para a aplicação da carga (AKHTER et al., 2003, 2004; ROBLING; TURNER, 2002; SHIMANO; SHIMANO; VOLPON, 2002).

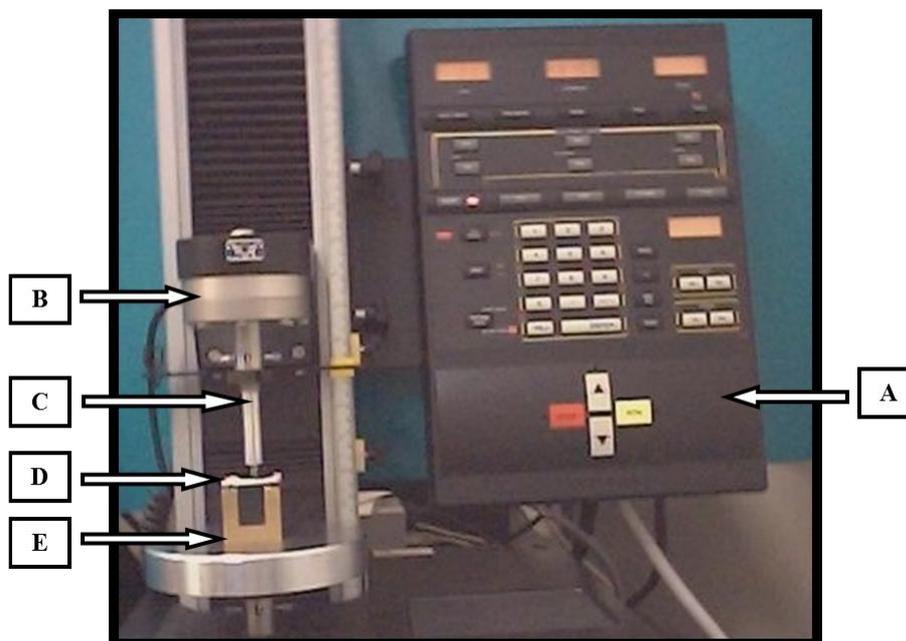


Figura 2 - Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para os ensaios biomecânicos. A: painel de controle; B: célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); C: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); D: osso (fêmur de rato); E: suporte.

Doze horas antes do início do ensaio, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento antecedente ao teste (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978; PENG et al., 1994).

No início do teste, foi aplicada uma pré-carga de 5 N por meio de uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm em sua extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para acomodação da amostra (estabilização do fêmur). Padronizou-se o tempo de acomodação em 15 segundos para todas as amostras e, após este período, aplicou-se uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 5mm/min, até o momento da fratura do osso.

Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica, gerando uma curva carga x deformação (Figura 3). Da análise das curvas foram obtidas as seguintes propriedades biomecânicas: carga (força) máxima, resiliência, tenacidade e rigidez.

Um procedimento semelhante foi adotado para determinação dos parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares. Foi utilizado o teste de compressão vertebral utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444, cuja célula de carga apresenta capacidade máxima de 100 kgf (aproximadamente 1 kN). As quintas vértebras lombares (L5) foram identificadas e isoladas tendo como referência a articulação da primeira vértebra sacral (S1). Após este processo, elas foram dissecadas de suas partes moles e os processos transversos, espinhosos e arcos vertebrais foram retirados, obtendo ao final o corpo

vertebral de cada amostra. As extremidades das vértebras foram aplainadas para obtenção de superfícies planas e paralelas para o ensaio.

No início do teste, aplicou-se uma pré-carga de 10 N para estabilização e fixação das quintas vértebras lombares (SAMNEGÅRD et al., 2001). Houve padronização do tempo de acomodação em um minuto para todas as amostras e, após este período, aplicou-se uma força no sentido do eixo crânio-caudal, com velocidade constante de 2 mm/min, até o esmagamento parcial da vértebra (dois terços de sua altura) (IKEDA et al., 2001; KATSUMATA et al., 1995; MOSEKILDE; DANIELSEN; KNUDSEN, 1993).

Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica, gerando uma curva carga x deformação (Figura 3). Da análise das curvas foram obtidas as seguintes propriedades biomecânicas: carga (força) máxima, resiliência, tenacidade e rigidez.

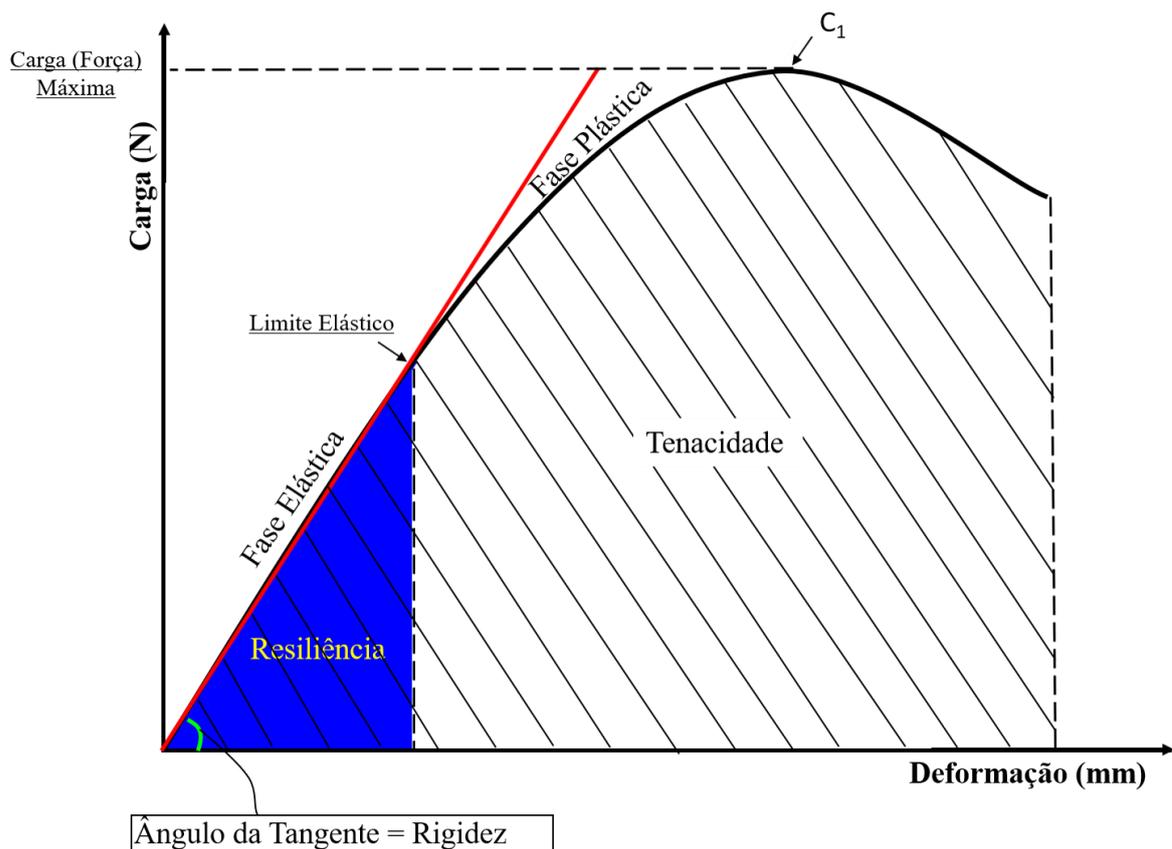


Figura 3 - Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas. C1: Carga (Força) Máxima.

Deformação (mm)

Corresponde à distância movida pelo cilindro de carga registrada pelo equipamento.

Limite Elástico

Para o tecido ósseo, a fase elástica corresponde à porção linear da curva e a fase plástica, a parte não linear da mesma (EINHORN, 1996). O ponto de união das duas corresponde ao limite elástico.

Carga Máxima (N)

Corresponde a maior carga suportada pela amostra (fêmur) durante o ensaio (C_1 , na figura 3).

Resiliência (J)

Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o limite elástico. Representa a energia absorvida pelo tecido ósseo durante a fase elástica, ou seja, a energia que a amostra suporta sem deformar-se permanentemente.

Tenacidade (J)

Corresponde à área sob a curva carga x deformação até o ponto de ruptura. Representa a energia necessária para provocar a ruptura do material, ou seja, a capacidade de uma estrutura resistir a uma energia depende da tenacidade do material.

Rigidez (N/mm)

Determinada por meio da inclinação da reta (T) ajustada aos pontos da curva carga x deformação na fase elástica (SOGAARD et al., 1997). Representa a capacidade de resistir a deformações.

3.6.4 Parâmetros Bioquímicos

Com a obtenção do material mineral dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares, foi realizada a solubilização destes em ácido clorídrico 2N. Posteriormente, por meio de ensaios colorimétricos, o conteúdo de cálcio e de fósforo dos ossos foram determinados, com a utilização do kit comercial específico Labtest®.

3.6.5 Densitometria Óssea

As quintas vértebras lombares (L5) coletadas foram submetidas (antes da realização dos testes físicos e biomecânicos) à análise densitométrica por absorptometria de raios X de dupla energia (DEXA) por meio de densitômetro modelo DPX-ALPHA LUNAR (Figura 4A), com software especial para pequenos animais com alta resolução (Figura 4B), pertencente ao Laboratório de Biofísica – UNESP/Araçatuba. Para a avaliação densitométrica, os ossos foram submersos em recipiente plástico contendo água a 2 cm de profundidade (para simular tecido mole), alinhados corretamente e em seguida escaneados como um todo, capturando sua imagem (Figura 4B). Posteriormente, as imagens foram manualmente contornadas para obtenção dos valores de conteúdo mineral ósseo (g), área óssea (cm²) e densidade mineral óssea areal – aDMO (g/cm²) (Figura 4B). Obteve-se a densidade vertebral como um todo.

O coeficiente de variabilidade do teste densitométrico é de 2%.

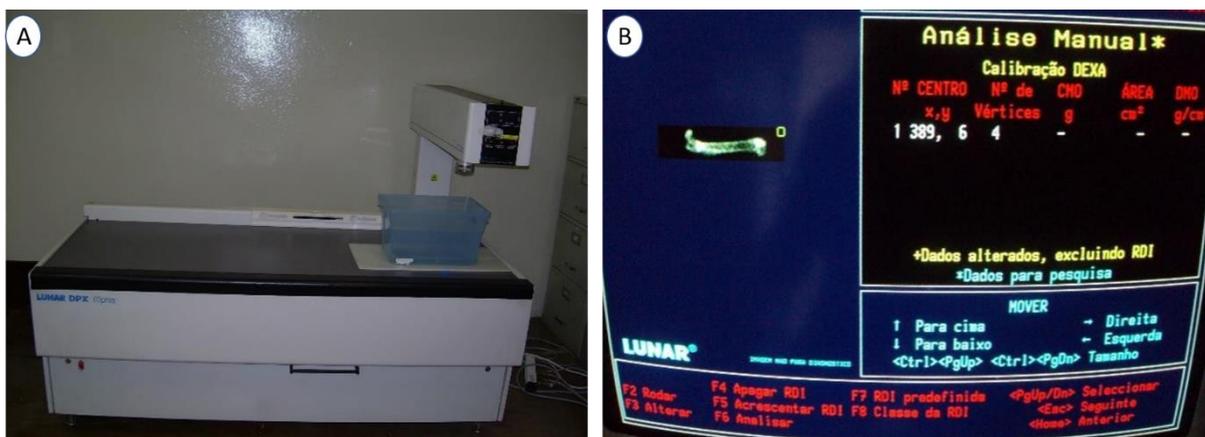


Figura 4 - Densitômetro DPX-ALPHA (A) e Software especial para pequenos animais usado para a análise de dados densitométricos (B).

3.7 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados numéricos obtidos das variáveis analisadas de cada grupo (média ± desvio padrão - D.P.) foram comparados por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA one-way) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Toda análise foi realizada por meio do software STATISTICA 12.0© (Statsoft) adotando-se um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Já os gráficos foram confeccionados por meio do software GraphPad Prism® (Graphpad).

3.8 Normas Técnicas Referentes à Elaboração do Trabalho

As referências e citações, bem como a estrutura geral deste trabalho seguem a NBR 6023 e 10520 de 2002, NBR 6027 de 2012, NBR 6028 de 2003, NBR 6034 de 2004 e NBR 14724 de dezembro de 2005, de autoria da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, adotadas pela Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

4 RESULTADOS

4.1 Massa Corporal

4.1.1 Experimento de 60 Dias

Na figura 5 estão representados os valores da massa corporal (g) inicial (do início do tratamento), final (finalizado o período de tratamento) e o ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES 60). Para a massa inicial, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Entretanto, foi observado um aumento das massas finais dos grupos OVX 60 e OVX + RES 60 quando comparados ao grupo INT 60, alterações estas condizentes com os dados de ganho de massa corporal.

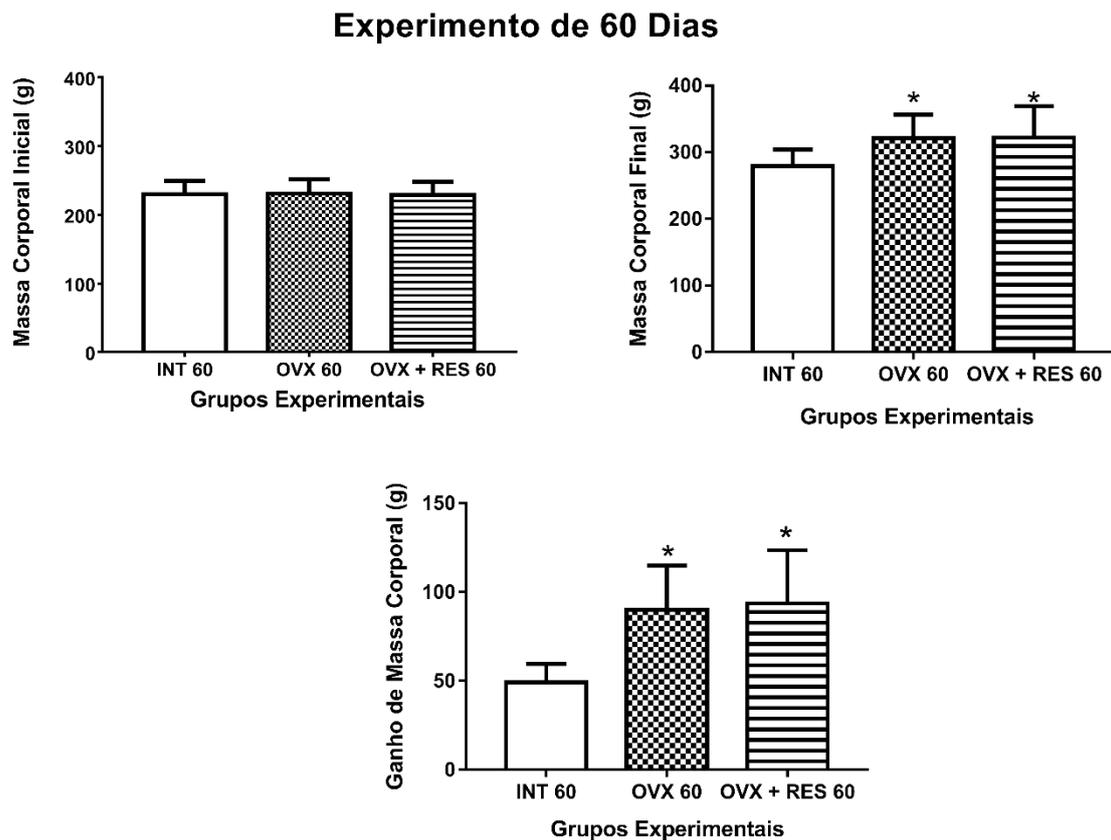


Figura 5- Representação gráfica dos valores de massa corporal inicial (g) dos animais dos diferentes dos diferentes grupos experimentais com tratamento 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão: * $p < 0,05$ vs. INT 60.

Na tabela 1 estão apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 1 - Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa corporal em gramas (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 60 (11)	OVX 60 (10)	OVX + RES 60 (11)
MC Inicial (g)	229,87 ± 19,16	231,04 ± 20,51	228,47 ± 19,73
MC Final (g)	279,05 ± 25,08	321,07 ± 35,57*	322,22 ± 46,86*
Ganho de MC (g)	49,18 ± 10,50	90,04 ± 24,94*	93,75 ± 29,82*

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais. * p< 0,05 vs. INT 60.

Na Figura 6, é possível observar a evolução ponderal com a área sob a curva (ASC) dos diferentes grupos experimentais tratados com 60 dias.

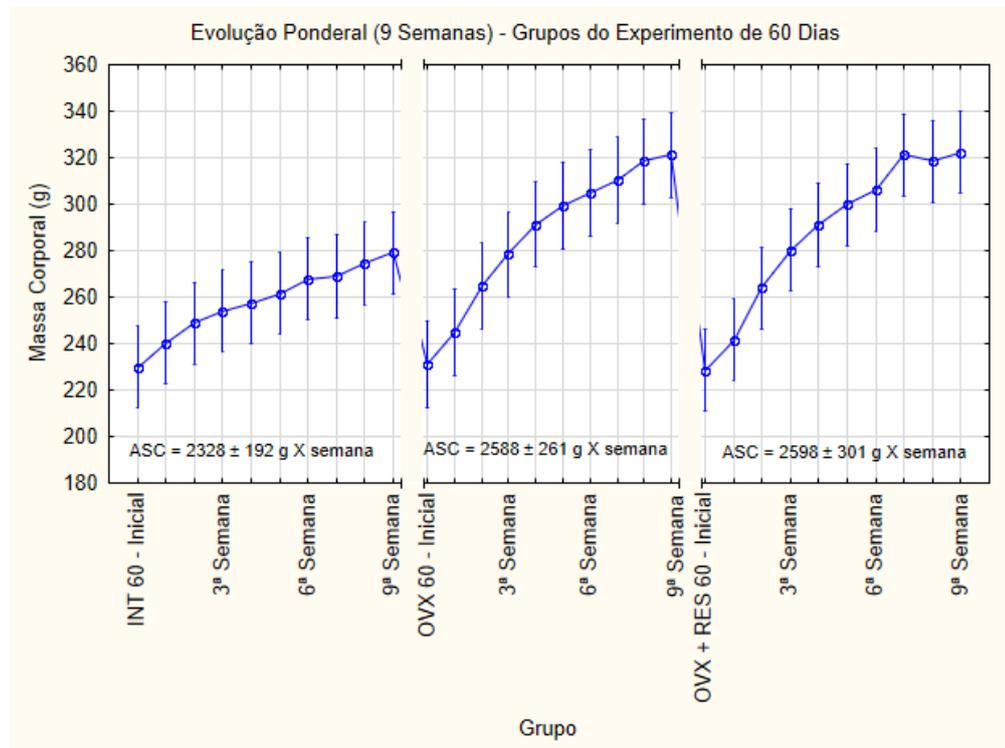


Figura 6- Massa Corporal e Área Sob a Curva (ASC) dos diferentes grupos experimentais tratados por 60 dias ao longo das 9 semanas de experimento. Dados expressos em Média e Intervalo de Confiança para a massa corporal e Média e Desvio padrão para a Área Sob a Curva.

4.1.2 Experimento de 90 Dias

Na figura 7 estão representados os valores da massa corporal (g) inicial (do início do tratamento), final (finalizado o período de tratamento) e o ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES 90). Para a massa inicial, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Entretanto, apesar do ganho de massa dos grupos OVX 90 e OVX + RES 90 ter sido maior do que o grupo INT 90, foi observado um aumento da massa corporal final apenas do grupo OVX 90 quando comparado ao grupo INT 90.

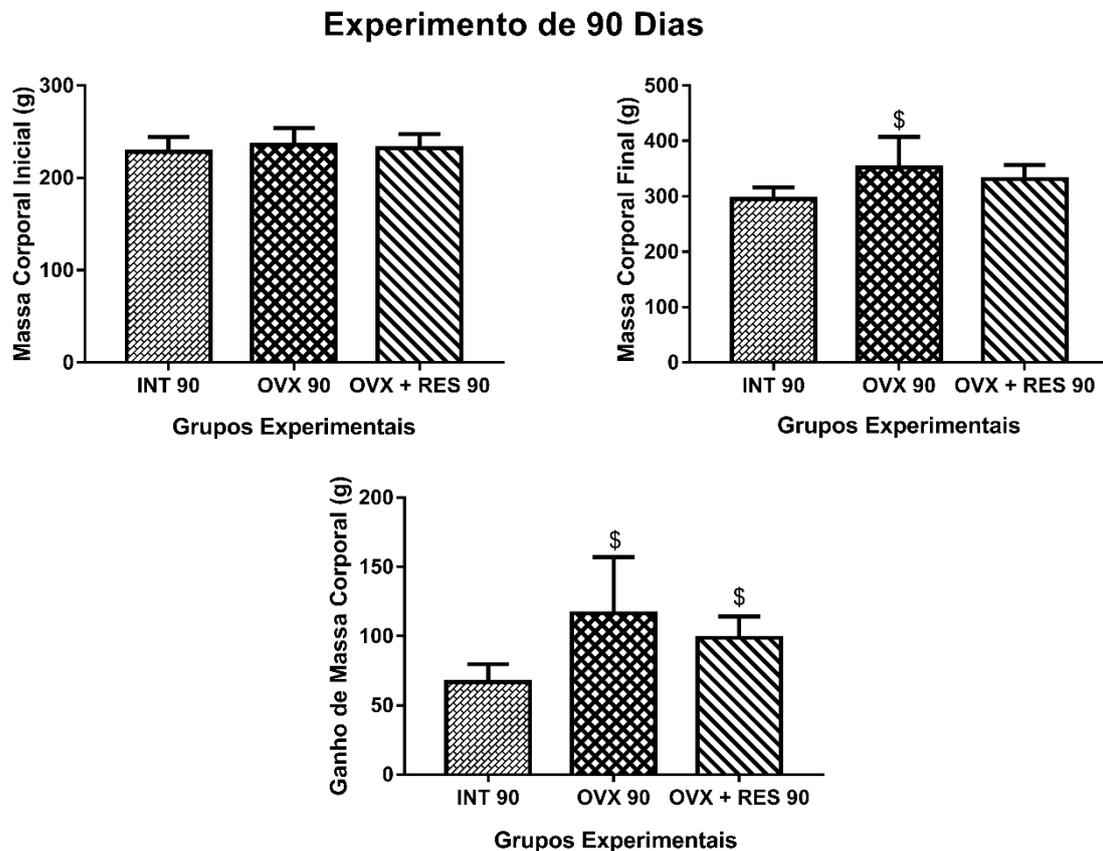


Figura 7 - Representação gráfica dos valores de massa corporal inicial (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão: ^{\$} $p < 0,05$ vs. INT 90.

Na tabela 2 estão apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 2 - Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa corporal em gramas (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES (09)
MC Inicial (g)	228,23 ± 15,88	235,66 ± 18,53	232,34 ± 15,22
MC Final (g)	295,13 ± 21,42	352,13 ± 55,60 ^{\$}	331,16 ± 25,30
Ganho de MC (g)	66,90 ± 12,87	116,47 ± 40,42 ^{\$}	98,81 ± 15,31 ^{\$}

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais. ^{\$} p < 0,05 vs. INT 90.

Na Figura 8, é possível observar a evolução ponderal com a área sob a curva (ASC) dos diferentes grupos experimentais tratados por 90 dias.

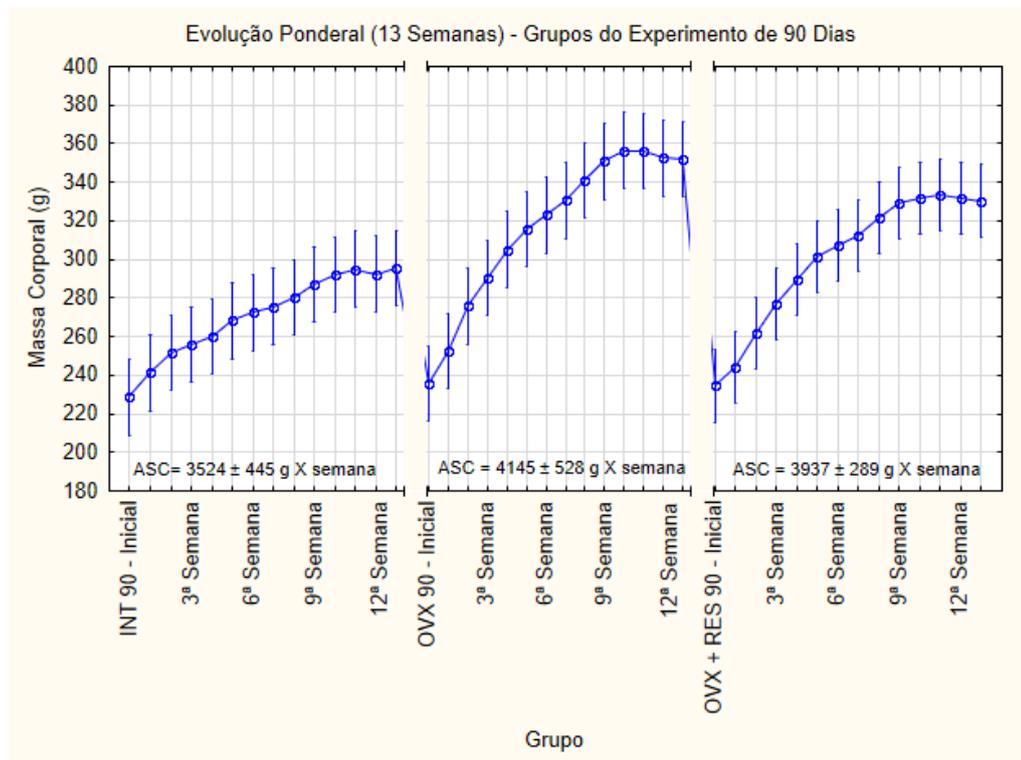


Figura 8 - Massa Corporal e Área Sob a Curva (ASC) dos diferentes grupos experimentais tratados por 90 dias ao longo das 12 semanas de experimento. Dados expressos em Média e Intervalo de Confiança para a massa corporal e Média e Desvio padrão para a Área Sob a Curva.

4.2 Parâmetros Biométricos

4.2.1 Experimento de 60 Dias

Na figura 9 estão representados os valores do comprimento, diâmetro maior e menor (mm) dos fêmures direitos e altura das quintas vértebras lombares (L5) (mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES 60). Não foram observadas diferenças entre os grupos para todos estes parâmetros.

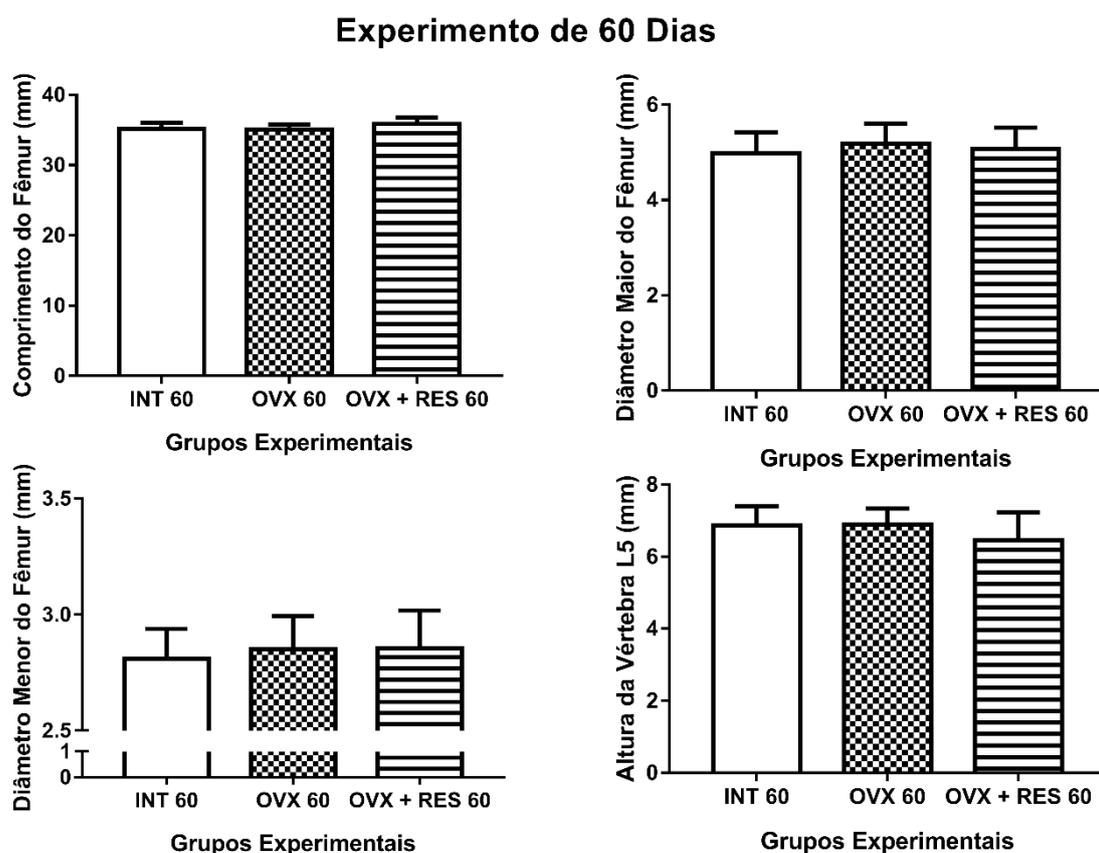


Figura 9 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures direitos e quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes dos diferentes grupos experimentais com tratamento 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Na tabela 3 estão apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 3 - Comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises em milímetros (mm) dos fêmures direitos e altura das quintas vértebras lombares (mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 60 (11)	OVX 60 (10)	OVX + RES 60 (11)
Comprimento do Fêmur D (mm)	35,18 ± 0,85	35,08 ± 0,67	35,84 ± 0,96
Diâmetro maior do Fêmur D (mm)	4,98 ± 0,44	5,18 ± 0,42	5,07 ± 0,45
Diâmetro menor do Fêmur D (mm)	2,81 ± 0,13	2,85 ± 0,14	2,85 ± 0,16
Altura da Vértebra L5 (mm)	6,85 ± 0,55	6,88 ± 0,46	6,45 ± 0,77

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais.

4.2.2 Experimento de 90 Dias

Na figura 10 estão representados os valores do comprimento, diâmetro maior e menor (mm) dos fêmures direitos e altura das quintas vértebras lombares (L5) (mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES 90). Não foram observadas diferenças entre os grupos para os parâmetros comprimento e diâmetro maior do fêmur.

Entretanto, foi possível observar um aumento do diâmetro menor do fêmur no grupo OVX 90 em relação aos grupos INT 90 e OVX + RES 90. Ainda, a altura da vértebra do grupo OVX + RES 90 foi menor do que a dos grupos INT 90 e OVX 90.

Na tabela 4 estão apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

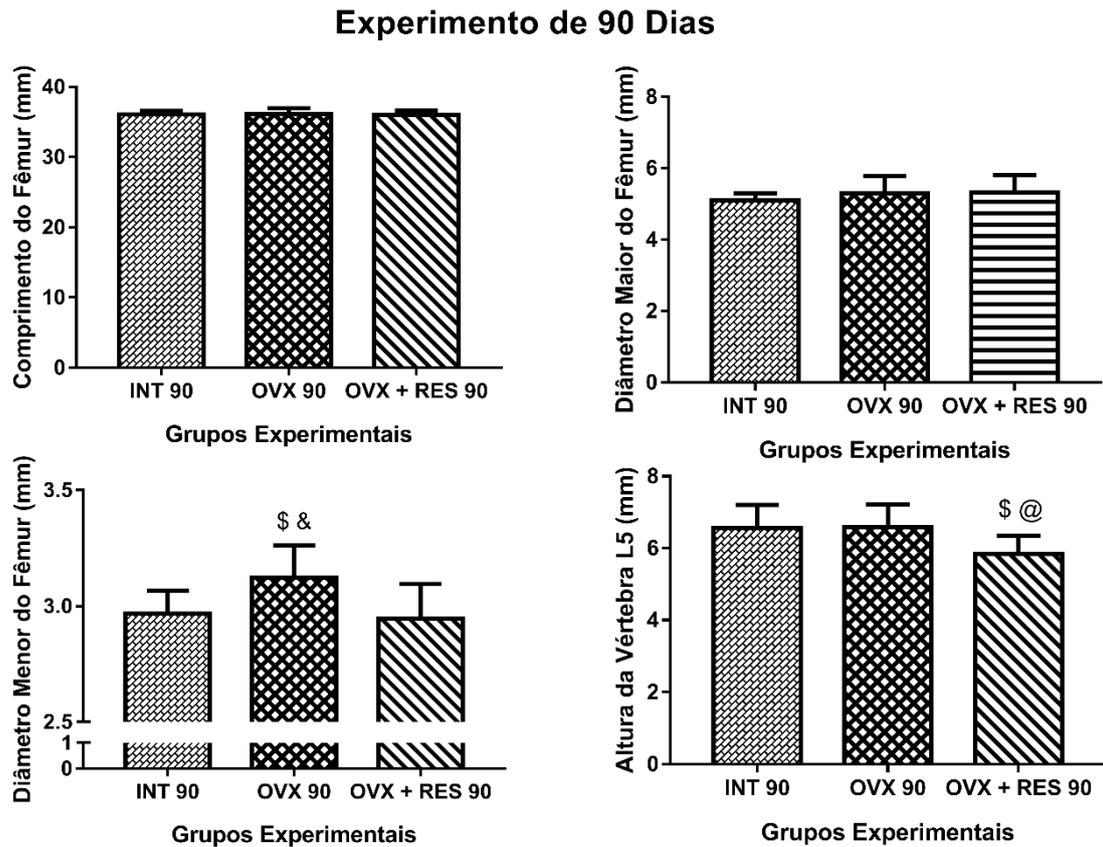


Figura 10 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures direitos e quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão: $^{\$}$ p<0,05 vs. INT 90. $^{\&}$ p<0,05 vs. OVX + RES 90. $^{@}$ p<0,05 vs. OVX 90.

Tabela 4 - Comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises em milímetros (mm) dos fêmures direitos e altura das quintas vértebras lombares (mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES 90 (09)
Comprimento do Fêmur D (mm)	36,09 \pm 0,50	36,13 \pm 0,83	35,99 \pm 0,64
Diâmetro maior do Fêmur D (mm)	5,10 \pm 0,21	5,30 \pm 0,47	5,32 \pm 0,48
Diâmetro menor do Fêmur D (mm)	2,97 \pm 0,10	3,12 \pm 0,14 $^{\$ \&}$	2,85 \pm 0,16
Altura da Vértebra L5 (mm)	6,56 \pm 0,65	6,58 \pm 0,64	5,84 \pm 0,51 $^{\$ @}$

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais. $^{\$}$ p<0,05 vs. INT 90. $^{\&}$ p<0,05 vs. OVX + RES 90. $^{@}$ p<0,05 vs. OVX 90.

4.3 Parâmetros Físicos

4.3.1 Parâmetros Físicos dos Fêmures

4.3.1.1 Experimento de 60 Dias

Na figura 11 estão representados os valores das propriedades físicas: densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Não foram detectadas diferenças entre os grupos para os parâmetros: densidade óssea, densidade mineral, percentual de água e de material mineral do osso.

Entretanto, o percentual de material orgânico foi maior nos grupos OVX 60 e OVX + RES 60 quando comparado com o grupo INT.

Fêmures - Experimento de 60 Dias

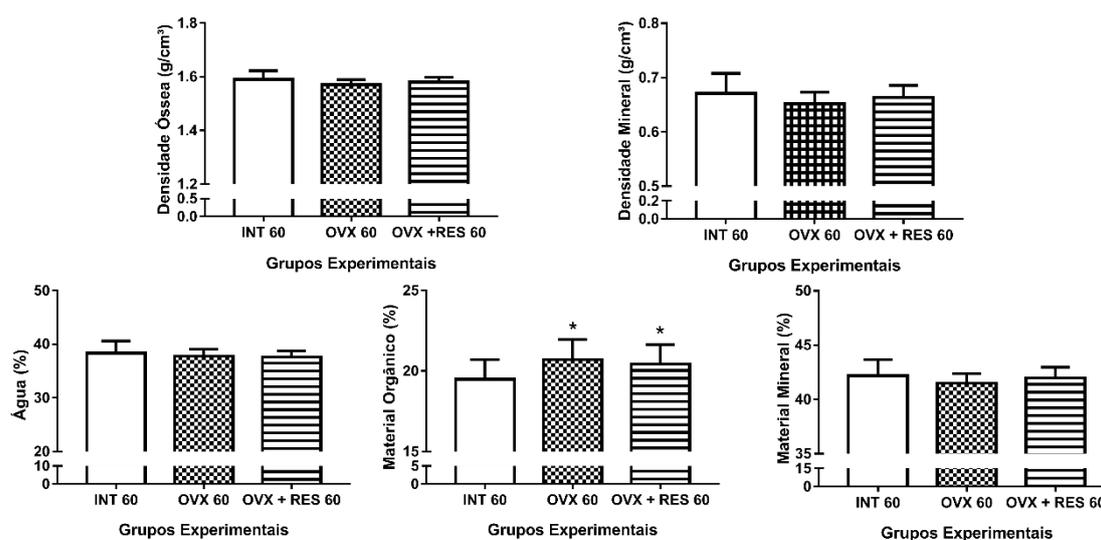


Figura 11 - Representação gráfica dos valores dos parâmetros físicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. INT 60.

Na tabela 5 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 5 - Densidade óssea e mineral (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 60 (11)	OVX 60 (10)	OVX + RES 60 (11)
Densidade óssea (g/cm^3)	1,589 \pm 0,033	1,570 \pm 0,019	1,579 \pm 0,019
Densidade mineral (g/cm^3)	0,671 \pm 0,037	0,652 \pm 0,021	0,663 \pm 0,022
Água (%)	38,327 \pm 2,261	37,772 \pm 1,249	37,605 \pm 1,154
Material orgânico (%)	19,489 \pm 1,213	20,723 \pm 1,240*	20,416 \pm 1,229*
Material mineral (%)	42,184 \pm 1,474	41,505 \pm 0,860	41,980 \pm 0,986

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais. * $p < 0,05$ vs. INT 60.

4.3.1.2 Experimento de 90 Dias

Na figura 12 estão representados os valores das propriedades físicas: densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Não foram detectadas diferenças entre os grupos apenas no parâmetro percentual de água.

Para o parâmetro densidade óssea, foi possível observar uma diminuição no grupo OVX 90 quando comparado ao grupo INT 90. No grupo OVX + RES 90, não foram observadas diferenças significativas quanto comparado ao grupo INT 90 e OVX 90.

Já para os parâmetros densidade mineral e percentual de material mineral, foi observada uma diminuição dos valores destes no grupo OVX 90 quando comparado ao grupo INT 90 enquanto, no grupo OVX + RES 90, foi possível observar maiores valores quando comparado ao grupo OVX 90. Não foi observada diferença significativa nestes parâmetros ao comparar os grupos INT 90 e OVX + RES 90.

Ainda, para o parâmetro percentual de material orgânico do osso, os grupos OVX 90 e OVX + RES 90 foram menores quando comparados ao grupo INT 90.

Fêmeures - Experimento de 90 Dias

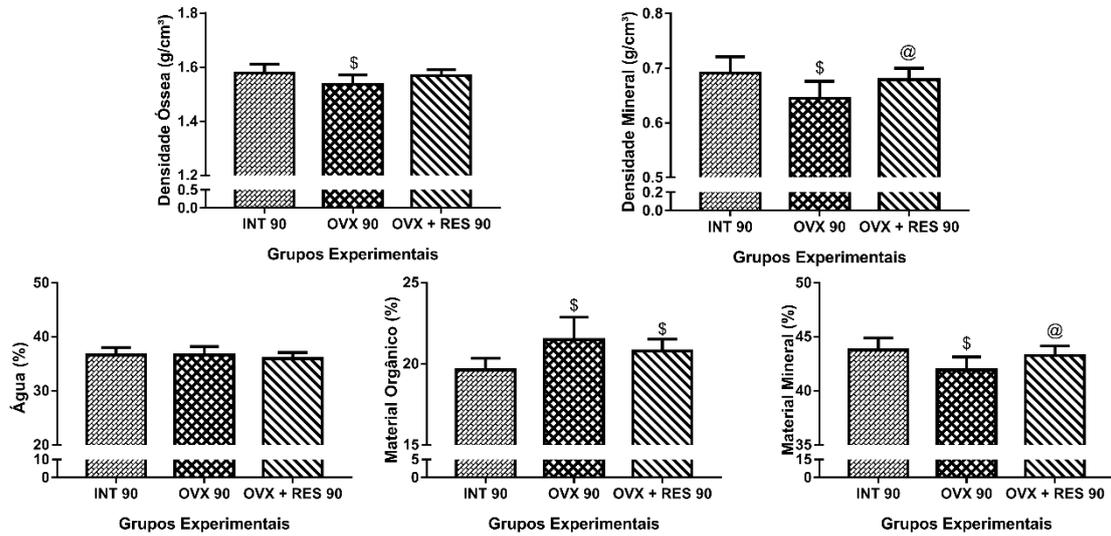


Figura 12 - Representação gráfica dos valores dos parâmetros físicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão: ^{\$}p<0,05 vs. INT 90. [@]p<0,05 vs. OVX 90.

Na tabela 6 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 6 - Densidade mineral e óssea (g/cm³), percentual de água, material orgânico e material mineral dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES 90 (09)
Densidade óssea (g/cm ³)	1,579 \pm 0,033	1,536 \pm 0,035 ^{\$}	1,569 \pm 0,022
Densidade mineral (g/cm ³)	0,691 \pm 0,030	0,644 \pm 0,032 ^{\$}	0,679 \pm 0,021 [@]
Água (%)	36,624 \pm 1,379	36,594 \pm 1,596	35,951 \pm 1,113
Material orgânico (%)	19,618 \pm 0,713	21,481 \pm 1,386 ^{\$}	20,787 \pm 0,721 ^{\$}
Material mineral (%)	43,758 \pm 1,135	41,925 \pm 1,216 ^{\$}	43,263 \pm 0,895 [@]

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais. ^{\$} p<0,05 vs. INT 90. [@] p<0,05 vs. OVX 90.

4.3.2 Parâmetros Físicos das Vértexas

4.3.2.1 Experimento de 60 Dias

Na figura 13 estão representados os valores das propriedades físicas: densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Não foram detectadas diferenças entre os grupos nos parâmetros: percentual de água do osso e percentual de material orgânico do osso.

Foi possível observar uma diminuição dos parâmetros densidade óssea e densidade mineral no grupo OVX 60 quando comparado ao grupo INT 60. Já no grupo OVX + RES 60, houve um aumento dos valores destes parâmetros quando comparados aos do grupo OVX 60. Não foi observada diferença significativa nestes parâmetros ao comparar os grupos INT 60 e OVX + RES 60.

Não obstante, para o parâmetro percentual de material mineral do osso, o grupo OVX + RES 60 foi maior quando comparado ao grupo OVX 60, não tendo sido observada diferença entre os grupos OVX + RES 60 e INT 60; e OVX 60 vs. INT 60.

Vértexas - Experimento de 60 Dias

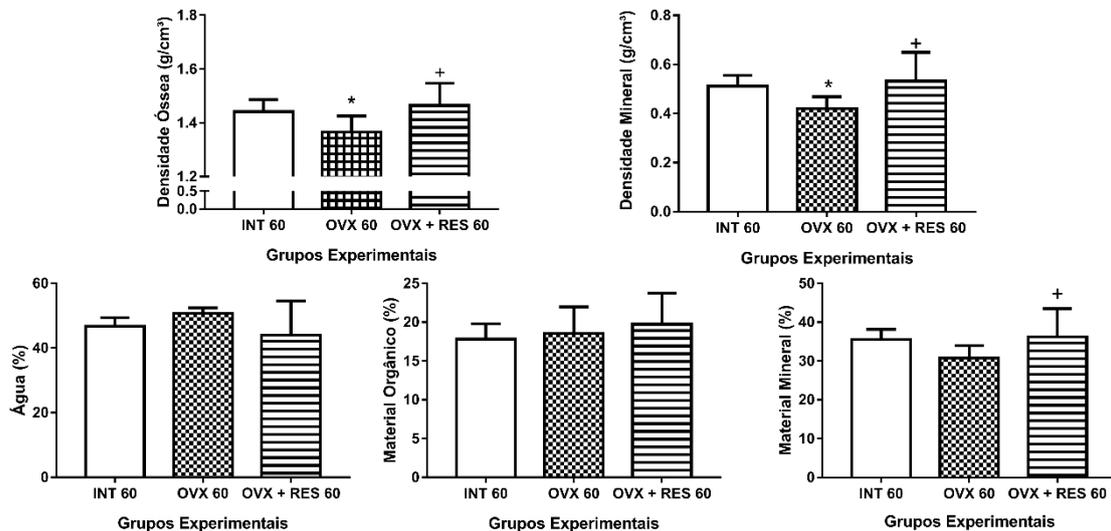


Figura 13 - Representação gráfica dos valores dos parâmetros físicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão: * $p < 0,05$ vs. INT 60. + $p < 0,05$ vs. OVX 60.

Na tabela 7 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 7 - Densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 60 (11)	OVX 60 (10)	OVX + RES 60 (11)
Densidade óssea (g/cm^3)	1,441 \pm 0,046	1,366 \pm 0,060*	1,464 \pm 0,082 ⁺
Densidade mineral (g/cm^3)	0,512 \pm 0,044	0,420 \pm 0,049*	0,532 \pm 0,117 ⁺
Água (%)	46,703 \pm 2,670	50,761 \pm 1,668	44,029 \pm 10,569
Material orgânico (%)	17,806 \pm 1,975	18,529 \pm 3,440	19,738 \pm 4,001
Material mineral (%)	35,941 \pm 2,263	30,710 \pm 3,219	36,234 \pm 7,238 ⁺

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais. * $p < 0,05$ vs. INT 60. ⁺ $p < 0,05$ vs. OVX 60

4.3.2.2 Experimento de 90 Dias

Na figura 14 estão representados os valores das propriedades físicas: densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Não foram detectadas diferenças entre os grupos apenas no parâmetro percentual de material orgânico do osso.

Para o parâmetro densidade óssea, foi possível observar um aumento no grupo OVX + RES 90 quando comparado aos grupos INT 90 e OVX + RES 90.

Também, houve uma diminuição da densidade mineral e percentual de material mineral do osso no grupo OVX 90 quando comparado ao grupo INT 90. Já no grupo OVX + RES 90, foi possível observar maiores valores nestes parâmetros quando comparados aos do grupo OVX 90. Não foi observada diferença significativa neste parâmetro ao comparar os grupos INT 90 e OVX + RES 90. Ainda, no parâmetro percentual de água do osso, o valor do grupo OVX 90 foi maior quando comparado aos dos grupos INT 90 e OVX + RES 90.

Vértebras - Experimento de 90 Dias

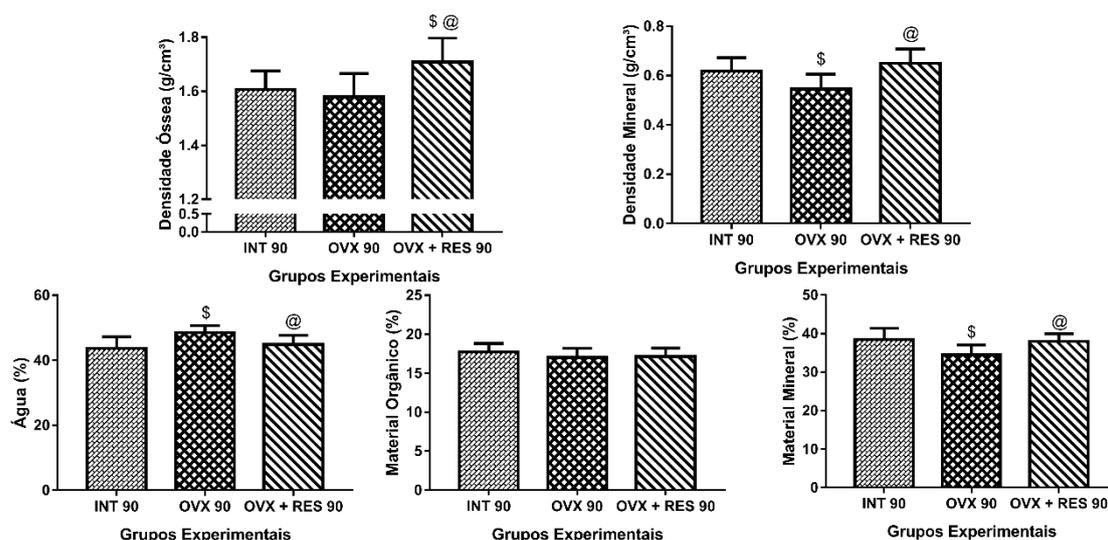


Figura 14 - Representação gráfica dos valores dos parâmetros físicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão: \$ $p < 0,05$ vs. INT 90. @ $p < 0,05$ vs. OVX 90.

Na tabela 8 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 8 - Densidade mineral e óssea (g/cm^3), percentual de água, material orgânico e material mineral das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES 90 (09)
Densidade óssea (g/cm^3)	1,607 \pm 0,068	1,579 \pm 0,087	1,708 \pm 0,090 ^{\$@}
Densidade mineral (g/cm^3)	0,619 \pm 0,053	0,545 \pm 0,060 ^{\$}	0,649 \pm 0,059 [@]
Água (%)	43,735 \pm 3,553	48,506 \pm 2,202 ^{\$}	44,861 \pm 2,835 [@]
Material orgânico (%)	17,749 \pm 1,701	17,029 \pm 1,194	17,157 \pm 1,077
Material mineral (%)	38,516 \pm 2,897	34,466 \pm 2,542 ^{\$}	37,983 \pm 1,971 [@]

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais. \$ $p < 0,05$ vs. INT 90. @ $p < 0,05$ vs. OVX 90.

4.4 Parâmetros Biomecânicos

4.4.1 Parâmetros Biomecânicos dos Fêmures

4.4.1.1 Experimento de 60 Dias

Na figura 15 estão expressos os valores das propriedades biomecânicas dos fêmures direitos: carga (força) máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J) e rigidez (N/mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima.

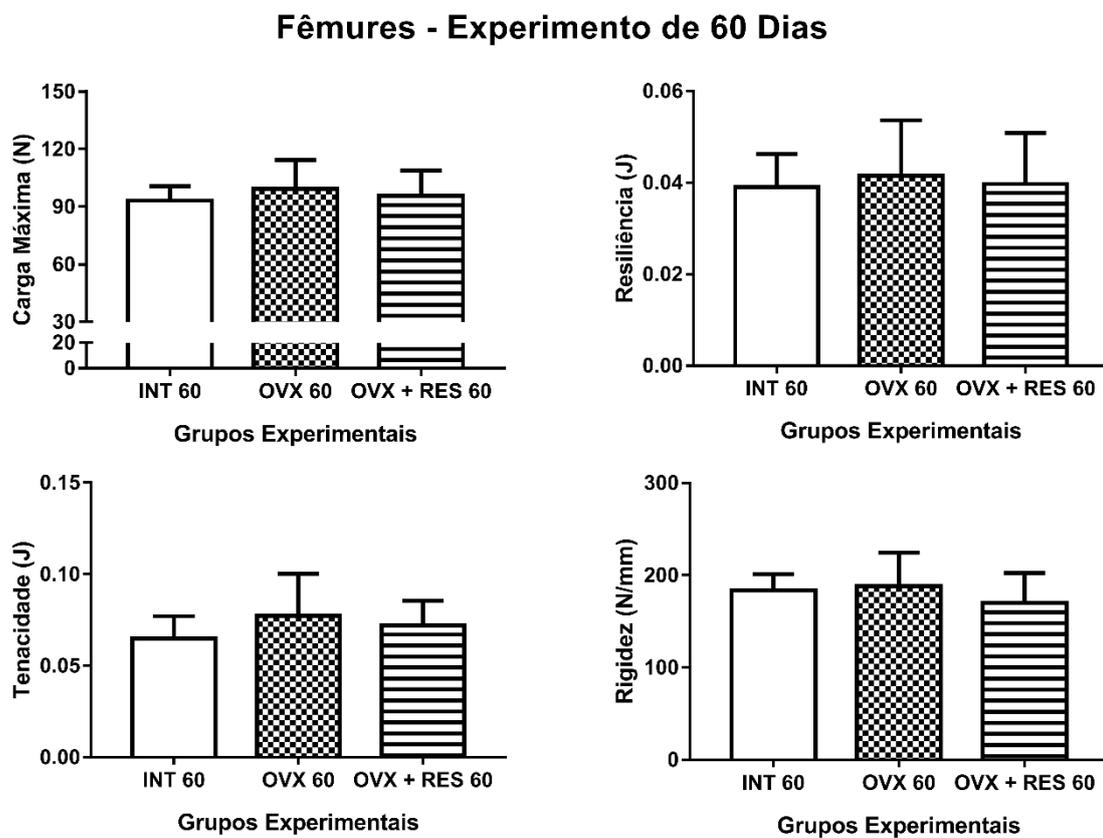


Figura 15 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Na tabela 9 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 9 - Carga (Força) Máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J), e rigidez (N/mm), obtidos no teste biomecânico dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 60 (11)	OVX 60 (11)	OVX + RES 60 (11)
Carga máxima (N)	93,136 ± 7,569	99,410 ± 14,896	95,536 ± 13,256
Resiliência (J)	0,039 ± 0,007	0,042 ± 0,012	0,040 ± 0,011
Tenacidade (J)	0,065 ± 0,012	0,077 ± 0,023	0,072 ± 0,014
Rigidez (N/mm)	183,973 ± 17,218	188,140 ± 36,423	169,791 ± 32,485

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = nº. animais.

4.4.1.2 Experimento de 90 Dias

Na figura 16 estão expressos os valores das propriedades biomecânicas dos fêmures direitos: carga (força) máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J) e rigidez (N/mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima.

Na tabela 10 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Fêmures - Experimento de 90 Dias

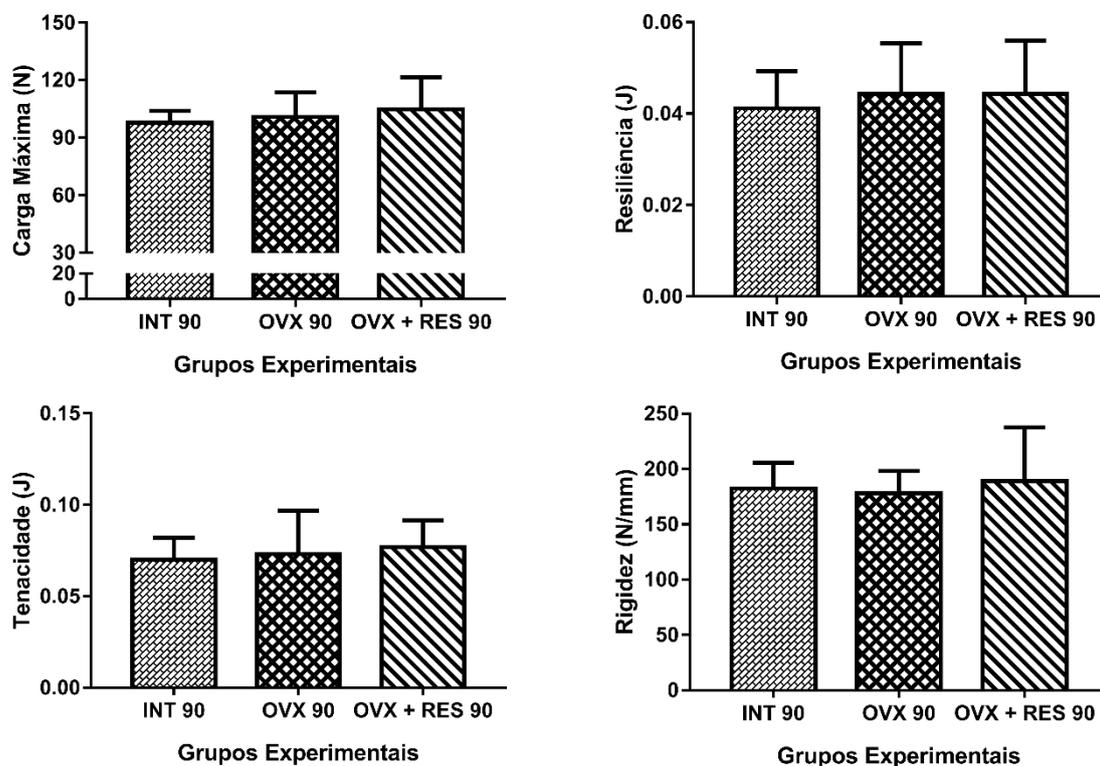


Figura 16 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Tabela 10 - Carga (Força) Máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J), e rigidez (N/mm), obtidos no teste biomecânico dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES 90 (09)
Carga máxima (N)	97,789 \pm 6,108	100,756 \pm 12,817	104,778 \pm 16,734
Resiliência (J)	0,041 \pm 0,008	0,044 \pm 0,011	0,044 \pm 0,017
Tenacidade (J)	0,070 \pm 0,012	0,073 \pm 0,024	0,077 \pm 0,015
Rigidez (N/mm)	182,422 \pm 23,019	178,311 \pm 19,861	189,000 \pm 48,663

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais.

4.4.2 Parâmetros Biomecânicos das Vértabras

4.4.2.1 Experimento de 60 Dias

Na figura 17 estão expressos os valores das propriedades biomecânicas das quintas vértebras lombares: carga (força) máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J) e rigidez (N/mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima.

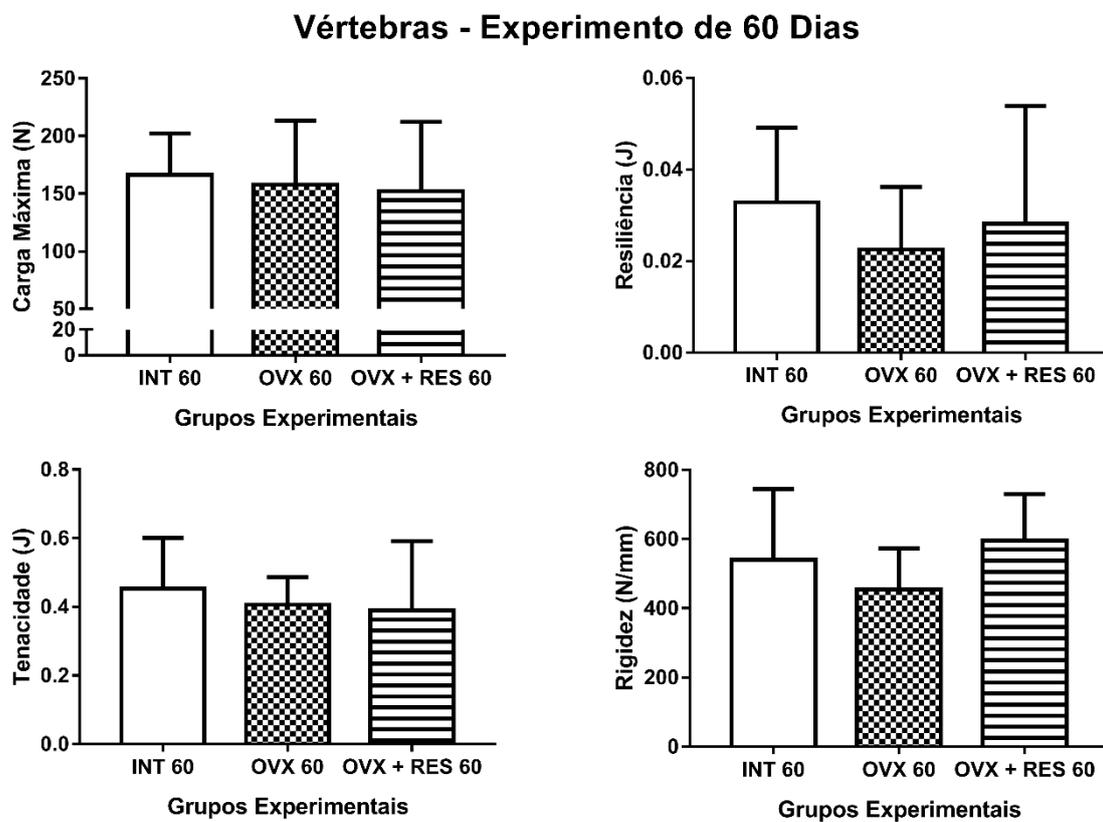


Figura 17 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Na tabela 11 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 11 - Carga (Força) Máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J), e rigidez (10 N/mm), obtidos no teste biomecânico das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 60 (11)	OVX 60 (11)	OVX + RES 60 (11)
Carga máxima (N)	166,134 ± 36,035	157,670 ± 55,564	152,193 ± 60,094
Resiliência (J)	0,033 ± 0,016	0,023 ± 0,014	0,028 ± 0,026
Tenacidade (J)	0,453 ± 0,148	0,406 ± 0,081	0,389 ± 0,202
Rigidez (N/mm)	539,446 ± 205,180	454,900 ± 119,099	595,446 ± 135,101

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = nº. animais.

4.4.2.2 Experimento de 90 Dias

Na figura 18 estão expressos os valores das propriedades biomecânicas das quintas vértebras lombares: carga (força) máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J) e rigidez (N/mm) dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima. Apesar disso, os valores de carga máxima estão visivelmente reduzidos no Grupo OVX 90 em relação ao grupo INT 90 e aumentados no grupo OVX+RES 90 em relação ao grupo OVX 90. Utilizando o teste t de Student, é possível observar diferenças estatísticas ($p=0,0234$) entre os grupos OVX 90 e OVX + RES 90.

Na tabela 12 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Vértebras - Experimento de 90 Dias

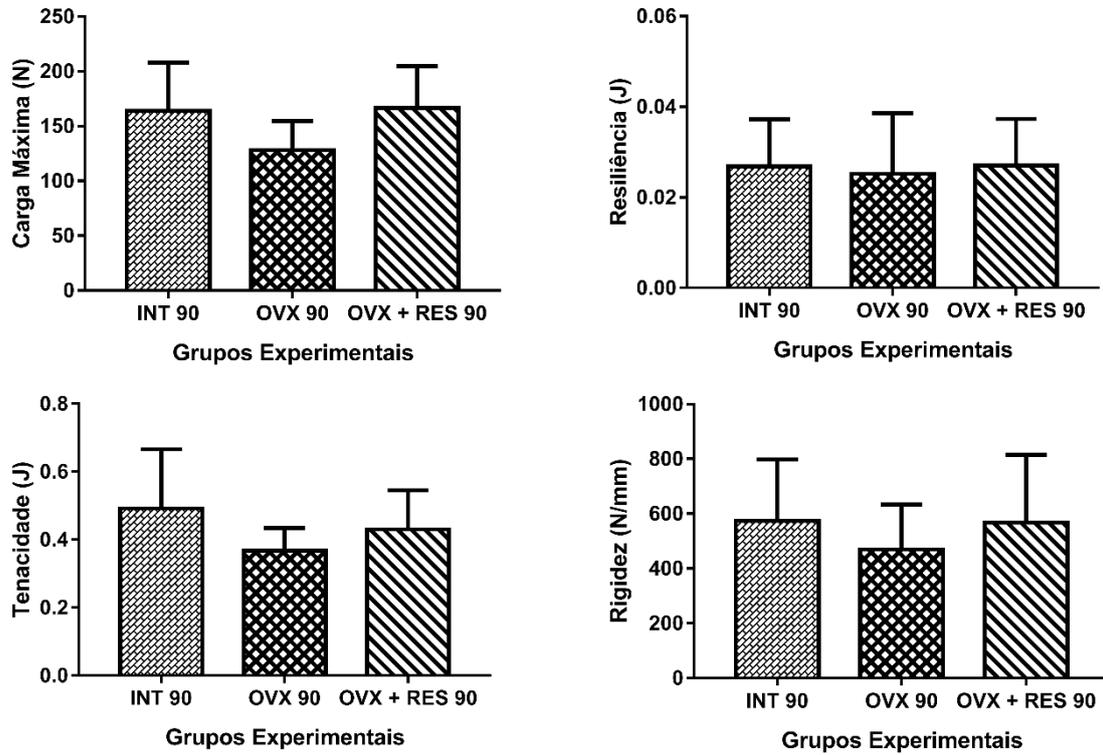


Figura 18 - Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Tabela 12 - Carga (Força) Máxima (N), resiliência (J), tenacidade (J), e rigidez (10 N/mm), obtidos no teste biomecânico das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES 90 (09)
Carga máxima (N)	163,945 \pm 43,998	128,001 \pm 26,745	166,811 \pm 37,970
Resiliência (J)	0,027 \pm 0,010	0,025 \pm 0,013	0,027 \pm 0,010
Tenacidade (J)	0,492 \pm 0,175	0,367 \pm 0,068	0,430 \pm 0,115
Rigidez (N/mm)	574,700 \pm 222,850	469,178 \pm 163,629	568,033 \pm 247,128

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais.

4.5 Parâmetros Bioquímicos

4.5.1 Experimento de 60 Dias

Na figura 19 estão expressos os valores dos Conteúdos de Cálcio (mg) e Fósforo (mg) ósseo, representando os parâmetros bioquímicos dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima.

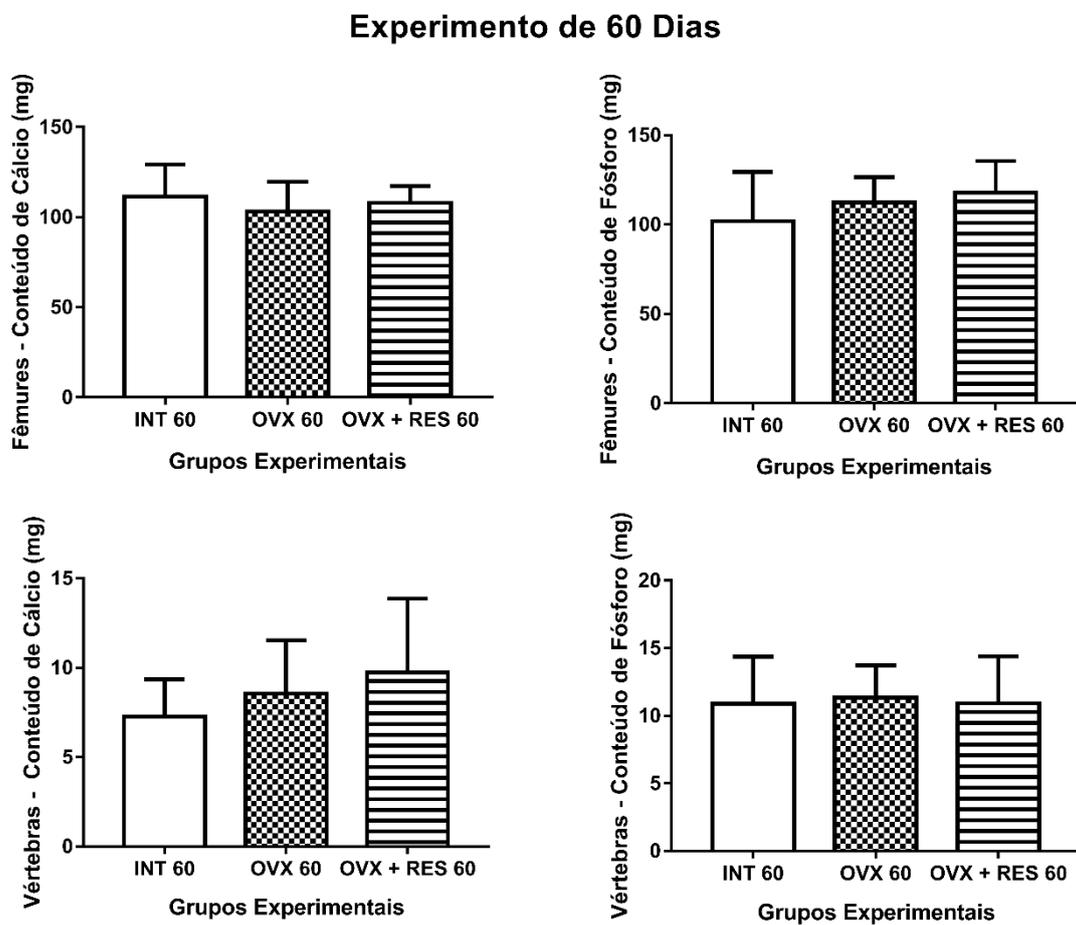


Figura 19 - Representação Gráfica dos valores dos Conteúdos de Cálcio e Fósforo das cinzas dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Na tabela 13 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 13 - Conteúdo de Cálcio e Fósforo das cinzas dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 60 (11)	OVX 60 (11)	OVX + RES 60 (11)
Conteúdo de Cálcio - Fêmures (mg)	120,27 ± 10,31	112,63 ± 10,87	118,28 ± 19,58
Conteúdo de Fósforo - Fêmures (mg)	101,99 ± 27,24	112,27 ± 14,33	117,75 ± 17,87
Conteúdo de Cálcio - Vértebras (mg)	7,27 ± 2,082	8,56 ± 2,98	9,73 ± 4,14
Conteúdo de Fósforo - Vértebras (mg)	10,90 ± 3,47	11,35 ± 2,39	10,93 ± 3,45

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais.

4.5.2 Experimento de 90 Dias

Na figura 20 estão expressos os valores dos Conteúdos de Cálcio (mg) e Fósforo (mg) ósseo, representando os parâmetros bioquímicos dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Não foram detectaram diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima.

Na tabela 14 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Experimento de 90 Dias

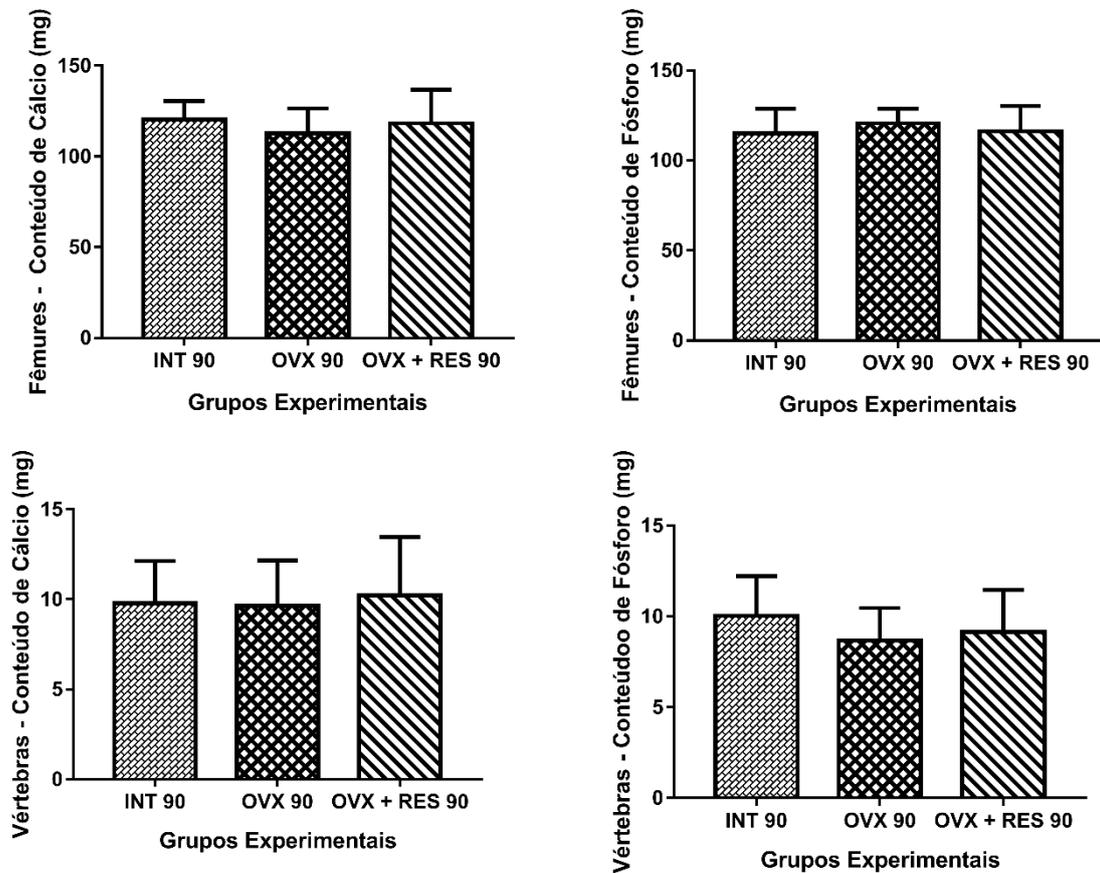


Figura 20 - Representação Gráfica dos valores dos Conteúdos de Cálcio e Fósforo das cinzas dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Tabela 14 - Conteúdo de Cálcio e Fósforo das cinzas dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES 90 (09)
Conteúdo de Cálcio - Fêmures (mg)	120,27 \pm 10,31	112,63 \pm 13,87	118,28 \pm 18,58
Conteúdo de Fósforo - Fêmures (mg)	115,11 \pm 13,75	120,67 \pm 8,09	116,18 \pm 14,09
Conteúdo de Cálcio - Vértebras (mg)	9,78 \pm 2,35	9,65 \pm 2,52	10,20 \pm 3,25
Conteúdo de Fósforo - Vértebras (mg)	10,04 \pm 2,19	8,69 \pm 1,79	9,16 \pm 2,30

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais.

4.6 Densitometria Óssea

4.6.1 Experimento de 60 Dias

Na figura 21 estão expressos os valores de Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima.

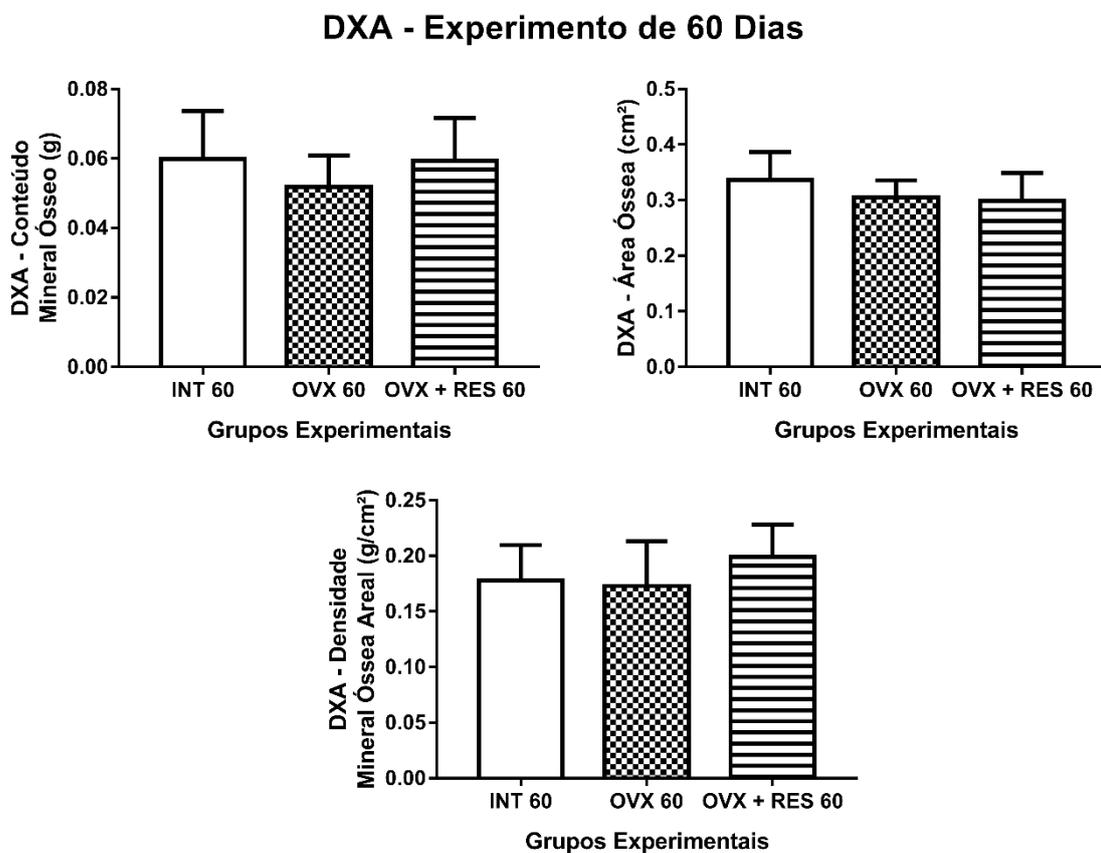


Figura 21 - Representação Gráfica dos valores de Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Na tabela 15 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 15 - Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 60 dias: Controle Intacto (INT 60), Controle Ovariectomizado (OVX 60) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 60).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES 90 (09)
DEXA – Conteúdo Mineral Ósseo (g)	0,060 ± 0,014	0,052 ± 0,009	0,060 ± 0,012
DEXA – Área Óssea (cm ²)	0,336 ± 0,051	0,305 ± 0,031	0,299 ± 0,050
DEXA – Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm ²)	0,178 ± 0,032	0,173 ± 0,040	0,199 ± 0,029

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais.

4.6.2 Experimento de 90 Dias

Na figura 22 estão expressos os valores de Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima.

Na tabela 16 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, dos parâmetros descritos acima.

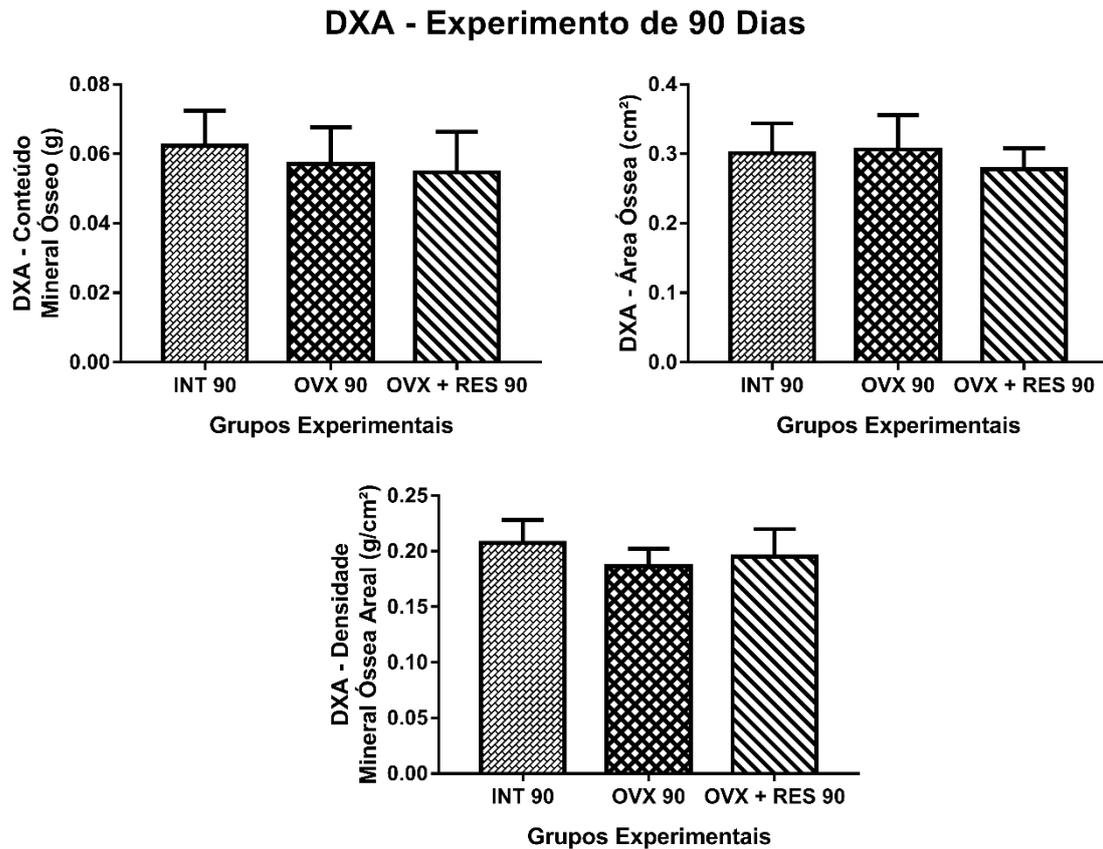


Figura 22 - Representação Gráfica dos valores de Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90). Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Tabela 16 - Conteúdo Mineral Ósseo (g), Área Óssea (cm²) e Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²) obtidos pela Densitometria Óssea das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais com tratamento de 90 dias: Controle Intacto (INT 90), Controle Ovariectomizado (OVX 90) e Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES 90).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT 90 (09)	OVX 90 (09)	OVX + RES 90 (09)
DEXA – Conteúdo Mineral Ósseo (g)	0,062 \pm 0,010	0,057 \pm 0,011	0,055 \pm 0,012
DEXA – Área Óssea (cm ²)	0,301 \pm 0,043	0,306 \pm 0,050	0,278 \pm 0,030
DEXA – Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm ²)	0,207 \pm 0,021	0,187 \pm 0,016	0,195 \pm 0,025

Média \pm Desvio Padrão (D.P.). () = n°. animais.

5 DISCUSSÃO

O estudo analisou os efeitos de diferentes durações de tratamento com resveratrol (60 e 90 dias) sobre o tecido ósseo de ratas adultas jovens ovariectomizadas. O modelo de ovariectomia foi válido e eficiente para induzir a osteopenia nas ratas estudadas uma vez que, na eutanásia, foi observada atrofia uterina em todas que sofreram a cirurgia e constatou-se ganho de massa corporal (em ambos os períodos experimentais), diminuição da densidade óssea e mineral e percentual de material mineral tanto em fêmures (apenas no período experimental de 90 dias), quanto nas vértebras (em ambos os períodos experimentais).

Evidenciou-se também que o tratamento com resveratrol foi capaz de prevenir esta diminuição das densidades óssea e mineral e o percentual de material mineral nos mesmos períodos experimentais nos quais foram observados os efeitos da ovariectomia em cada osso, além de parcialmente prevenir o aumento de ganho de massa corporal no período experimental de 90 dias. Portanto, nosso objetivo é discutir os prováveis mecanismos pelos quais o resveratrol foi capaz de prevenir os efeitos da ovariectomia nas ratas, além de determinar em qual o período experimental foi possível observar tais respostas em cada parâmetro analisado.

Com a realização da ovariectomia em ratas, tem-se a possibilidade de mimetizar os efeitos da deficiência de estrógeno em humanos (principalmente sobre ossos com maior contingente trabecular) e em menor tempo quando comparado a animais maiores, além desta insuficiência induzida ser responsiva a tratamentos também aplicáveis a humanos, com eficácia comprovada (ZHANG et al., 2016) e este modelo ser aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para estudos de osteoporose (LIU et al., 2015). Ainda, os modelos animais de osteoporose pós-menopausa já ajudaram muito na descoberta de mecanismos fisiopatológicos e futuros tratamentos para este acometimento (FANG et al., 2015; KALU, 1991). Igualmente, a realização da cirurgia em ratas adultas jovens com três meses de idade permite considerar os efeitos da cirurgia como significativos, conforme indicado por KALU (1991) e PATLAS et al. (2000).

O estudo em animais apresenta a vantagem de se obter um sistema biológico completo e uniforme permitindo, assim, a avaliação dos efeitos gerais de mudanças antes observadas apenas em sistemas celulares. Quando controlado cuidadosamente, um estudo em modelo animal constitui um passo essencial para se extrapolar os efeitos biológicos para a segurança da saúde humana. Devido à similaridade celular e bioquímica entre animais e humanos, o modelo animal proporciona uma base de validação geral para a predição de efeitos semelhantes aos químicos em populações humanas (ÇELIK; ÖĞENLER; ÇÖMELEKOĞLU, 2005; TURNER, 2001).

Deste modo, sendo o rato um bom modelo para o estudo de efeitos da osteopenia por déficit de estrógeno, assim como há a possibilidade de extrapolar tratamentos ou sua prevenção em humanos, é plausível utilizá-lo para verificar a hipótese de que o resveratrol pode atuar como preventivo da osteopenia em ossos com diferentes contingentes de osso trabecular no período pós-menopausa, assim como a duração de protocolo necessária para se observar os efeitos tanto da ovariectomia quanto do tratamento com resveratrol nesses mesmos ossos.

No nosso modelo de tratamento preventivo, houve fácil adaptação dos animais ao sistema proposto, não acarretando em qualquer alteração comportamental ou reação adversa no animal. A dose, os ciclos de administração e o início do tratamento seguem de acordo com a revisão da literatura realizada (CASARIN et al., 2014; CASATI et al., 2013; LELOVAS et al., 2008; LIU et al., 2005; ZHAO et al., 2014), além de dar continuidade a um projeto anterior do grupo de pesquisa (FABRICIO, 2014).

É conhecida a importância da observação da massa corporal em estudos de tecido ósseo uma vez que esta variável exerce estresse mecânico sobre os ossos e pode contribuir para o ganho de massa óssea, tornando essencial a padronização e homogeneidade de massa corporal no início do trabalho (BERG; HARMISON, 1957; BURR; ROBLING; TURNER, 2002; REID, 2002). Considerando tal importância, verificou-se a padronização adequada desta variável nos diferentes grupos e protocolos experimentais (Figuras 5 e 7, tabelas 1 e 2), parâmetro fundamental para o controle do ensaio proposto.

O maior ganho de massa corporal em ambos os grupos ovariectomizados frente ao grupo intacto e, conseqüentemente, suas maiores massas corporais finais em ambos os protocolos experimentais (com exceção do grupo tratado com resveratrol no protocolo experimental de 90 dias) (figuras 5 e 7, tabelas 1 e 2) é característico de casos de insuficiência estrogênica, uma vez que é frequentemente observado na literatura um maior ganho de massa corporal associado a uma maior deposição de gordura visceral, tanto em modelos animais, quanto em estudos com humanos, com a diminuição do hormônio (JIANG; SACCO; WARD, 2008; KALU, 1991; RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014).

Um dos possíveis mecanismos envolvidos nesse ganho de massa corporal e adiposidade baseia-se na presença no tecido adiposo de receptores de estrógeno (ERs), ampla família de receptores hormonais presentes em vários tecidos, podendo ser considerado um dos meios pelo qual o estrógeno afeta sua fisiologia. Os dois distintos receptores encontrados no tecido apresentam diferentes funções nele, com o ER α regulando a homeostase adiposa via proliferação e diferenciação de adipócitos, enquanto o ER β é capaz de regular a distribuição de

tecido adiposo relacionada ao sexo (PALLOTTINI et al., 2008; RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014).

Apesar de estudos em animais como o de HEINE et al. (2000) observarem o ganho de massa corporal e uma severa obesidade intra-abdominal em ratas *knockout* para o receptor de estrógeno α ($ER\alpha$), reforçando a sua função como regulador da quantidade de adipócitos, os mecanismos pelos quais a diminuição de estrógeno leva a maior ganho de massa corporal ainda permanecem incertos.

Todavia, estudos indicam outros possíveis mecanismos relacionados com o aumento da massa corporal no déficit de estrógeno. Foi observado em ratas ovariectomizadas uma diminuição do gasto energético (levando uma maior deposição de gordura) e uma maior ingesta de alimento relacionada com uma diminuição dos receptores de leptina (hormônio relacionado à saciedade) no cérebro (KIMURA et al., 2002; RICHARD et al., 1987). Outrossim, é sugerido que o estrógeno seja um regulador dos níveis plasmáticos de grelina (hormônio responsável pelo estímulo do apetite), uma vez que, além de já ter sido observada a colocalização de células de grelina e $ER\alpha$ na mucosa estomacal (MATSUBARA et al., 2004), foi demonstrado que a ovariectomia de ratas jovens foi capaz de aumentar as concentrações, o número de células e a expressão gênica do hormônio no estômago, e que o tratamento com 17- β -Estradiol foi capaz de reverter este quadro (MATSUBARA et al., 2004; RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014; SAKATA et al., 2006).

Desta forma, além da possibilidade da deficiência de estrógeno agir diretamente sobre a quantidade de tecido adiposo, esta diminuição hormonal pode estar relacionada com a maior ingesta de alimento e conseqüentemente, com o maior ganho de massa corporal. Apesar do ganho de massa corporal característico na insuficiência estrogênica e a importância desta variável para o metabolismo ósseo, estudos mostram que este não é o suficiente para a proteção total dos efeitos da osteopenia em ratas (FRANCISCO et al., 2011; JIANG; SACCO; WARD, 2008; TAGLIAFERRI et al., 2015).

Ainda sobre a massa corporal, o tratamento com resveratrol não foi capaz de impedir o aumento deste parâmetro (figuras 5 e 7, tabelas 1 e 2). Entretanto, no grupo com protocolo experimental de 90 dias, apesar do ganho de massa corporal ter sido maior do que o grupo intacto (mesmo apresentando uma curva de evolução ponderal menos inclinada do que a do grupo controle ovariectomizado), não foi observada diferença significativa da massa corporal final entre o grupo intacto e o grupo ovariectomizado e tratado com resveratrol (figura 7, tabela 2), podendo indicar um início de proteção da substância nesta variável. Este resultado difere dos apresentados por ZHAO et al. (2014), nos quais o resveratrol em doses maiores (20,

40 e 80mg/kg de massa corporal) do que a que utilizamos não foi capaz de prevenir o ganho de massa corporal causado pela ovariectomia em ratas Wistar com 3 a 4 meses de idade.

No entanto, TURNER et al. (1999), apesar de terem utilizado ratas mais jovens e doses menores de resveratrol, já foram capazes de observar uma pequena diminuição do ganho de massa corporal nos animais tratados com 100µg da substância por dia. Ademais, SHARMA; SHARMA; THUNGAPATHRA, (2017), ao administrarem resveratrol na dose de 5mg/kg de massa corporal, por um mês, em ratas Wistar ovariectomizadas (iniciando o tratamento 45 dias após a cirurgia, caracterizando como tratamento de fato e não prevenção), foram capazes de observar diminuição do ganho de massa corporal característico da deficiência de estrógeno.

Salvo as diferenças metodológicas, os estudos acima contribuem com os resultados apontados pelo nosso estudo, mostrando que o Resveratrol apresenta potencial de prevenir ou tratar o aumento de massa corporal presente na insuficiência de estrógeno. Uma vez que o resultado em questão foi observado apenas no protocolo experimental com maior tempo de tratamento, é importante que haja a realização de mais estudos com diferentes durações de tratamento para melhor consolidar tal efeito.

A fratura óssea é considerada o sintoma clínico mais importante da osteoporose (uma vez que ela é a responsável por maior parte das comorbidades e mortalidade da doença) e está relacionada com uma diminuição da densidade mineral óssea e deterioração da microarquitetura trabecular do tecido, que contribuem para a fragilidade do osso. Ainda, sabe-se que ela ocasiona efeitos diferentes nos contingentes cortical e trabecular do osso em momentos distintos da sua evolução (AKHTER et al., 2007; COMPSTON, 2010; LERNER, 2006) e a distinção de ambos possui grande importância mecânica (ITO et al., 2002; PARFITT et al., 1983; RHO; KUHN-SPEARING; ZIOUPOS, 1998). Portanto, é de grande valia, em um modelo experimental de osteoporose, observar a densidade óssea, alterações físicas (como sua composição e outros parâmetros relacionados à densidade), composição mineral e alterações biomecânicas (para avaliar a resistência do osso a fraturas) de ossos com maior contingente cortical e trabecular.

Os ossos mais comuns para estudo dos efeitos da osteoporose no tecido ósseo são: fêmur, tíbia e vértebra, sendo o primeiro e o último os ossos com maior predominância de, respectivamente, contingente cortical e trabecular (PATLAS et al., 2000), além de serem alvos comuns de fraturas osteoporóticas e serem considerados bons locais para observação na previsão de fraturas (CENTER, 2017; PISANI et al., 2016). Não obstante, diferentes sítios ósseos apresentam os efeitos do déficit hormonal em períodos diferentes pós-ovariectomia (FRANCISCO et al., 2011; LIU et al., 2015). Logo, utilizando fêmures e vértebras neste

trabalho, pode-se ampliar o estudo dos efeitos não só da osteoporose em si, como também do resveratrol sobre ossos com predominância de ambos os contingentes, além de poder observar como cada sítio ósseo responde aos diferentes períodos experimentais propostos.

Nas medidas biométricas dos grupos do protocolo experimental de 60 dias (figura 9 e tabela 3), não foram observadas diferenças entre os grupos para os parâmetros de desenvolvimento ósseo tanto dos fêmures (comprimento e diâmetros maior e menor), quanto das vértebras (altura), demonstrando que a ovariectomia não foi o suficiente para alterar o crescimento ósseo dos animais. FRANCISCO et al. (2011) e PATLAS et al. (2000) supuseram que, nas ratas aos 3 meses de idade, ainda há o processo de formação óssea acentuado, podendo mascarar os efeitos da ovariectomia sobre o crescimento do tecido, o que elucida os resultados observados no nosso trabalho.

Entretanto, nas medidas biométricas dos grupos do protocolo experimental de 90 dias (figura 10 e tabelas 4), apesar de também não terem sido observadas diferenças entre os grupos para os parâmetros comprimento e diâmetro maior do fêmur, a altura das vértebras do grupo OVX + RES 90 foi menor do que a dos outros grupos, mas não o suficiente para afetar negativamente os parâmetros físicos e biomecânicos do grupo frente aos outros (figuras 14 e 18; tabelas 8 e 12).

Outrossim, foi observado aumento do diâmetro menor dos fêmures no grupo OVX 90 quando comparado aos grupos INT 90 e OVX + RES 90, mas não entre os dois últimos. Levando em consideração que os diâmetros maior e menor do fêmur são dois componentes do cálculo da área de secção transversa da diáfise do osso (ENGESAETER; EKELAND; LANGELAND, 1978) e, no caso descrito acima, o diâmetro maior do fêmur manteve-se sem alteração, pode se considerar que o grupo OVX 90 apresentou aumento da área de secção transversa, enquanto o tratamento com o resveratrol evitou que esta alteração acontecesse de forma visível macroscopicamente.

Os resultados acima são amparados pelos dados apresentados por TURNER et al. (1989) que, ao avaliarem o efeito da castração sobre a histomorfometria de tíbias de ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas com 7 semanas de idade no início do experimento, observaram que a cirurgia levava à degradação da microarquitetura trabecular da metáfise do osso e expansão da área medular acompanhada de aumento da área de secção transversa da diáfise do mesmo. Tais alterações foram relacionadas a uma maior reabsorção endosteal acompanhada de aumento da formação periosteal no tecido, fatos também observados pelos autores neste mesmo trabalho por meio de marcações das regiões em questão com tetracilina ao longo do experimento.

Conjuntamente, SEEMAN e DELMAS (2006), em uma revisão bibliográfica, denotam que a maior reabsorção endosteal associada a uma maior aposição periosteal são responsáveis pelo aumento da espessura cortical do osso, auxiliando na proteção mecânica do mesmo contra fraturas, uma vez que na perda óssea há uma deterioração da microarquitetura trabecular do tecido, deixando-o mais frágil.

Os testes de flexão a três pontos nos fêmures e o de compressão vertebral possibilitam a observação das principais propriedades biomecânicas do tecido ósseo e suas subsequentes alterações causadas por fatores externos. Também, é possível avaliar a resistência mecânica, e assim, a qualidade óssea dos animais estudados por meio destes parâmetros (PENG et al., 1994), sendo possível testar a capacidade do osso resistir à carga e, conseqüentemente, resistir a fraturas.

Nos ensaios biomecânicos deste estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em ambos os protocolos de tratamento, principalmente dos fêmures (figuras 15 e 16; tabelas 9 e 10), mostrando que tanto a ovariectomia, quanto o tratamento com o resveratrol em ambos os períodos de tratamento podem não ter sido capazes de alterar substancialmente a resistência mecânica desses ossos.

Sabe-se que a perda óssea na osteoporose pós-menopausa ocorre em duas etapas: rápida, relacionada apenas à deficiência de estrógeno; e lenta, relacionada ao déficit de estrógeno e envelhecimento. Na fase rápida, a perda óssea se concentra mais no contingente trabecular, chegando a 20-30%, enquanto no contingente cortical a perda é muito menor, sendo de 5-10% (LERNER, 2006; RIGGS; KHOSLA; MELTON 3RD, 2002; RIGGS; MELTON, 1983). Considerando as ratas utilizadas neste estudo como adultas jovens (PATLAS et al., 2000), que os fêmures são ossos com maior contingente cortical (LANGDAHL; FERRARI; DEMPSTER, 2016) e que estudos com ratas mais velhas são capazes de observar alterações biomecânicas nos fêmures (TAKEDA et al., 2017), é de se esperar que na idade dos animais e com os protocolos de tratamento utilizados em nosso trabalho, o efeito da ovariectomia tenha sido menos expressivo neste tipo ósseo a ponto de não afetar a resistência mecânica dos mesmos.

Entretanto, AMMANN e RIZZOLI (2003) relatam que a espessura cortical e o diâmetro externo de um osso apresentam grande contribuição para sua resistência mecânica, e que é possível observar aumento do diâmetro externo da diáfise de ossos longos em animais ovariectomizados, sendo este fato considerado uma reação compensatória aos danos da castração. Uma vez que observamos alterações do diâmetro menor dos fêmures no protocolo experimental de 90 dias e, provavelmente, do diâmetro externo e porção cortical do osso

conforme o que foi discutido nos parâmetros biométricos, podemos cogitar que essa alteração foi capaz de mascarar os efeitos da ovariectomia na biomecânica do grupo controle ovariectomizado, subestimando os efeitos do tratamento com resveratrol neste parâmetro.

Além disso, SEHMISCH et al. (2008), utilizando ratas Sprague-Dawley e FRANCISCO et al. (2011), utilizando ratas Wistar, todas com a mesma idade das utilizadas no presente estudo, afirmaram que o efeito da osteoporose é maior no contingente trabecular. Ademais, é relatado na literatura que, em casos de perda óssea, pode ocorrer aumento do diâmetro da diáfise óssea associado ao aumento da espessura cortical do osso visando aprimorar a resistência biomecânica do mesmo (SEEMAN; DELMAS, 2006; SEHMISCH et al., 2008), complementando nossos os resultados e corroborando com o que foi relatado por AMMANN e RIZZOLI (2003).

Já nos parâmetros biomecânicos das vértebras, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos em ambos os períodos de tratamento (figuras 17 e 18; tabelas 11 e 12), no protocolo experimental de 90 dias foi observada uma clara diminuição da Carga Máxima do grupo OVX 90 em comparação aos grupos INT 90 e OVX + RES 90. Quando comparadas as Cargas Máximas apenas dos grupos OVX 90 e OVX + RES 90 utilizando o teste t de Student, é observada uma diferença significativa ($p= 0,0234$), mostrando que o tratamento com resveratrol foi capaz de evitar a diminuição da carga suportada pelo osso causada pela ovariectomia uma vez que, usando o mesmo teste, não observou-se diferença significativa entre os grupos INT 90 e OVX + RES 90 para este parâmetro.

TAKEDA et al. (2017), utilizando ratas Wistar-Imamichi ovariectomizadas às 25 semanas de idade, foram capazes de observar alterações negativas da força máxima e rigidez das quintas vértebras lombares (L5) 8 semanas após a ovariectomia, além de efeitos positivos nestes mesmos parâmetros e ossos com tratamentos anti-osteoporóticos neste mesmo período, demonstrando a capacidade da ovariectomia afetar a resistência mecânica do osso e esta ser responsiva a tratamentos conhecidos, fato não observado claramente por nós.

SEHMISCH et al. (2010), utilizando ratas ovariectomizadas aos três meses de idade e tratamento de 5 semanas com diversas substâncias anti-osteoporóticas (17- β -Estradiol) e com potencial anti-osteoporótico (como a genisteína ou equol), iniciados 2 meses após a castração (fazendo com que o tempo final do protocolo seja bastante superior ao nosso de 90 dias), também foram capazes de observar a melhora da Carga Máxima de vértebras lombares com os tratamentos utilizados em comparação ao grupo apenas ovariectomizado.

Tendo em vista o que foi discutido sobre a idade do animal e a contribuição mecânica do componente cortical no osso; além do fato de a vértebra apresentar uma maior

quantidade de contingente trabecular do que cortical, sendo mais metabolicamente ativa (LANGDAHL; FERRARI; DEMPSTER, 2016), e que a ovariectomia afeta os diversos sítios ósseos em períodos diferentes pós-cirurgia (FRANCISCO et al., 2011; LIU et al., 2015), pode-se pressupor que, mesmo nossas ratas sendo consideradas jovens e o tempo pós-ovariectomia ter sido possivelmente pequeno para a alteração dos parâmetros em questão, a quantidade dos contingentes cortical e trabecular na vértebra permitiu observar antecipadamente os efeitos da ovariectomia e do tratamento na biomecânica do osso, possivelmente devido a uma menor atenuação dos resultados biomecânicos pelo reduzido contingente cortical e maior atividade metabólica do tecido trabecular.

Sabendo que o tecido ósseo é basicamente composto pela combinação de água, material orgânico e mineral, as alterações da densidade deste tecido podem estar associadas a mudanças das propriedades físicas ósseas. Desta forma, os parâmetros físicos (densidade óssea, densidade mineral e percentual de água, material orgânico e material mineral no osso) dos fêmures e vértebras dos animais do estudo foram analisados a partir da determinação do volume ósseo, de forma indireta por meio do princípio de Arquimedes, um método de alta confiabilidade (KEENAN et al., 1997; MARTIN, 1990; MUHAMMAD et al., 2013; RENNO et al., 2007).

Nos resultados físicos dos grupos tratados por 60 dias, foram encontradas diferenças entre os grupos principalmente nas vértebras (figura 13 e tabela 7), aonde houve diminuição das densidades óssea e mineral no grupo OVX 60 quando comparado ao grupo INT 60 e proteção desta diminuição com o tratamento com resveratrol. Já nos fêmures, foi observado apenas aumento do percentual de material orgânico dos grupos OVX 60 e OVX + RES 60 quando comparado ao grupo INT 60.

Todavia, no protocolo experimental de 90 dias (figuras 12 e 14; tabelas 6 e 8), foi possível observar diferenças entre os grupos tanto em fêmures, quanto nas vértebras, principalmente para os parâmetros densidade mineral e percentual de material mineral. Estes resultados estão de acordo com outros apresentados na literatura (OCCHIUTO et al., 2007; ZHANG et al., 2006) envolvendo a ovariectomia, tempos de tratamento similares e o mesmo tipo de densidade óssea que leva em consideração o volume e não a área do osso. OCCHIUTO et al. (2007), ao analisarem o efeito do tratamento durante 12 semanas com isoflavonas com atividade fitoestrogênica em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas com três meses de idade, observaram o efeito protetor destas isoflavonas sobre a densidade mineral óssea volumétrica da porção cortical e trabecular de fêmures quando comparado ao grupo apenas ovariectomizado.

ZHANG et al. (2006), compararam o efeito de duas dietas em ratas Wistar com 12 meses de idade, uma rica em flavonóides (também com potencial fitoestrogênico como o resveratrol) e outra suplementada de Cálcio, durante 12 semanas, e observaram que ambas as dietas foram eficientes em prevenir a diminuição da densidade mineral óssea volumétrica nos tecidos ósseos cortical e trabecular (analisados via Microtomografia Computadorizada) ocasionados pela ovariectomia.

Já em estudos envolvendo o Resveratrol como potencial protetor da osteoporose, HABOLD et al. (2011), utilizando um modelo de osteoporose envolvendo desuso e não deficiência de estrógeno e doses maiores que as nossas, foi capaz de observar que o tratamento com Resveratrol também foi capaz de proteger contra a diminuição da densidade mineral óssea volumétrica característica da osteoporose. Estudos indicam que a osteoporose por déficit de estrógeno e por desuso apresentam alguns mecanismos e características morfológicas ósseas similares (ARMAS; RECKER, 2012; BRENNAN et al., 2012), permitindo, assim, que o efeito do resveratrol apresentado por HABOLD et al. (2011) possa ser comparado ao efeito da substância em modelos que utilize a ovariectomia.

Além disso, os resultados encontrados em nosso trabalho foram similares aos apresentados em vértebras em um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, onde utilizou-se o mesmo protocolo experimental com 90 dias, porém com Resveratrol aplicado por meio de injeções intraperitoneais na dose de 0,7 mg/kg de massa corporal (FABRICIO, 2014). No entanto, ao contrário do trabalho anterior, a dose e o meio de administração utilizados no presente estudo também apresentaram efeitos sobre os fêmures destes animais.

Uma vez que a idade dos nossos animais está mais relacionada com a fase rápida da osteoporose (PATLAS et al., 2000), podemos supor que as vértebras sofreram os efeitos da ovariectomia mais precocemente do que nos fêmures, justificando o fato de que em 60 dias de protocolo experimental foi possível observar os efeitos negativos da castração e os efeitos positivos do tratamento apenas nas vértebras, enquanto o efeito nos fêmures só pôde ter sido observado no protocolo com maior duração.

Ainda sobre a densidade óssea dos animais, a análise de densitometria óssea areal via DEXA das quintas vértebras lombares (figuras 21 e 22; tabelas 15 e 16) não demonstrou diferenças entre os grupos em ambos os protocolos experimentais, oposto ao que foi observado na densidade mineral obtida por meio do princípio de Arquimedes. FRANCISCO et al. (2011), ao analisarem os efeitos nos ossos em diversos períodos pós-cirurgia da ovariectomia em ratas de diferentes idades, observaram diminuição da densidade mineral óssea via densitometria nas ratas que foram ovariectomizadas aos três meses de idade apenas na

décima quinta semana após a castração, período este superior à maior duração de protocolo experimental utilizado neste estudo.

Isto posto, podemos pressupor que o princípio de Arquimedes (oferecendo a densidade óssea volumétrica) foi capaz de detectar precocemente as alterações da densidade mineral óssea decorrente da ovariectomia e do tratamento com resveratrol, enquanto a densitometria óssea por DEXA tende a detectar este parâmetro mais tardiamente. Esta diferença entre a sensibilidade de métodos de aferição da densidade óssea por área e por volume ósseo também foi observada por SATO et al. (1995).

Cálcio e Fósforo são minerais de grande importância para o tecido ósseo, pois são os constituintes dos cristais de hidroxiapatita do tecido, sendo responsáveis pela mineralização e, conseqüentemente, pela rigidez e resistência física do osso (RITCHIE; BUEHLER; HANSMA, 2009). Nos resultados dos conteúdos de cálcio e fósforo em fêmures e vértebras, não foi possível encontrar diferenças entre os grupos em ambos os protocolos experimentais (figuras 19 e 20; tabelas 13 e 14), a despeito do que foi encontrado nos percentuais de material mineral nos ensaios físicos (figuras 12, 13 e 14; tabelas 6,7 e 8). Esta discrepância também foi observada por ARJMANDI et al. (1998) utilizando ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas aos 90 dias de idade, permitindo-os sugerir que o percentual de material mineral obtido pelo princípio de Arquimedes está mais relacionado à densidade óssea do que ao conteúdo de Cálcio e Fósforo no osso de fato, relação essa também indicada por MARTIN (1990).

Neste sentido, SCHOLZ-AHRENS et al. (2016), utilizando ratas Fischer-344 com 19 semanas de idade, ovariectomizadas e tratadas com probióticos, prebióticos e simbióticos durante 16 semanas, atingindo ao final do protocolo experimental idade final dos animais maior de que dos nossos animais, foram capazes de observar os efeitos da castração e dos tratamentos sobre o percentual mineral (por meio das cinzas de fêmures e vértebras, cujo peso foi utilizado em nosso trabalho para calcular o percentual mineral). Por outro lado, quando verificaram os conteúdos de cálcio e fósforo ósseo, encontraram alterações somente nas vértebras (mais metabolicamente ativas), enquanto que nos fêmures não houve alteração (menos metabolicamente ativo). Com isso, podemos considerar que a idade do animal e o tempo pós-ovariectomia sejam fatores a ser considerados ao observar os conteúdos de cálcio e fósforo dos ossos de um animal ovariectomizado.

O resveratrol é uma substância com uma grande gama de efeitos benéficos ao organismo, desde antioxidantes até potencial anti-carcinogênico (COTTART; NIVET-ANTOINE; BEAUDEUX, 2014; DO AMARAL et al., 2008; FRÉMONT et al., 2001). Entre

essas características, além do impacto sobre o tecido ósseo estudado neste trabalho, em um artigo derivado dele demonstramos que o protocolo de tratamento de 90 com resveratrol foi capaz de proteger contra o aumento de pressão arterial e a disfunção endotelial característicos da deficiência de estrógeno, possivelmente por meio de um mecanismo independente de óxido nítrico, consolidando ainda mais o efeito protetor desta substância no sistema cardiovascular (FABRICIO et al., 2017).

Entretanto, os mecanismos pelos quais o resveratrol age (principalmente no tecido ósseo) ainda permanecem incertos. Estudos *in vitro* já indicaram que a substância apresenta capacidade de aumentar a formação óssea e diminuir a reabsorção óssea, auxiliando na proteção contra a degradação do tecido na osteoporose pós-menopausa por meio do aumento de osteoblastos (MIZUTANI et al., 1998), ou inibição da formação e diferenciação de osteoclastos (HE et al., 2010).

Estudos mais recentes relacionam essa substância como potente ativador da Sirtuina 1 (Sirt1), uma desacetilase dependente de NAD⁺ envolvida com uma série funções biológicas (CAIROLI et al., 2015; WANG; CHEN; PENG, 2017). IYER et al. (2014), em um estudo envolvendo a deleção de Sirt1 em células progenitoras de osteoblastos de camundongos, observaram que esta deleção levou a uma diminuição do contingente cortical na superfície endocortical dos ossos, resultantes de uma menor formação óssea. Estudando mais profundamente, os autores sugeriram que esta proteína seja capaz de desacetilar a β -Catenina e o fator de transcrição *Forkhead box O* (FoxO), impedindo a ligação entre eles e auxiliando a formação óssea.

A β -Catenina interage com glicoproteínas da família Wnt, formando a via Wnt/ β -Catenina, envolvida com a condrogênese, diferenciação de osteoclastos e, principalmente, com a proliferação de osteoblastos e síntese de matriz extracelular por eles, estimulando a formação óssea (DUAN; BONEWALD, 2016). Uma vez que FoxO está relacionado ao sequestro de β -Catenina e inativação da via Wnt/ β -Catenina (IYER et al., 2013, 2014), o bloqueio desta ligação pela Sirt1 seria capaz de estimular a formação óssea e, o resveratrol estimulando tal proteína, pode também intensificar essa atividade.

A Sirt1 também pode exercer efeito sobre o fator NF- κ B (que está inativamente presente em todos os tipos celulares e é considerado um mediador da resposta inflamatória e resposta imune, sendo essencial para a osteoclastogênese) por meio da sua associação com a substância p300 (uma acetiltransferase, responsável pela acetilação e translocação nuclear de NF- κ B), inutilizando-a (SHAKIBAEI; BUHRMANN; MOBASHERI, 2011). WANG, CHEN e PENG (2017), ao analisarem o efeito do resveratrol em doses de 5, 25 e 45 mg/kg de massa

corporal, em um modelo de osteoporose com osteotomia dos fêmures de ratos Wistar machos com três meses de idade, observaram que as duas maiores doses da substância foram capazes de aumentar a expressão de Sirt1 e diminuir a expressão de NF- κ B/p65 nos animais em comparação ao grupo controle ovariectomizado. Uma vez que a ativação de NF- κ B depende da fosforilação de NF- κ B/p65 (WU et al., 2013), a diminuição da expressão desta última é capaz de mitigar os efeitos da osteoporose sobre o osso mediados por essa proteína.

Como já discutido, a maior reabsorção óssea exercida pelos osteoclastos é um dos fatores responsáveis pela osteoporose pós-menopausa. Outrossim, é sabido que as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), resultados do próprio metabolismo oxidativo, são capazes de aumentar a reabsorção óssea por meio da diferenciação e proliferação de osteoclastos, seja diretamente, envolvendo peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e a família de enzimas da NADPH oxidase (NOX); seja indiretamente, por meio de mecanismos envolvendo NF- κ B (CALLAWAY; JIANG, 2015). Uma vez que o estrógeno possui a capacidade de estimular a produção de enzimas antioxidantes e até mesmo coletar (e, posteriormente, auxiliar eliminando) as EROs (DAS et al., 2009; MUTHUSAMI et al., 2005; PFEILSCHIFTER et al., 2002), podemos supor que o excesso de EROs possua envolvimento com a osteoporose por deficiência de estrógeno.

GOETTSCHE et al. (2013) relataram que a enzima NADPH Oxidase 4 (NOX4) está envolvida com o metabolismo ósseo, com a diferenciação e proliferação de osteoclastos e a perda óssea, uma vez que em modelo de osteoporose por déficit de estrógeno, a inibição *in vivo* ou *knockdown* desta enzima foi capaz de prevenir a perda óssea característica deste protocolo. Tais resultados consolidaram ainda mais o papel das Espécies Reativas de Oxigênio na osteoporose pós-menopausa.

Sendo o resveratrol também considerado um potente antioxidante (CATALGOL et al., 2012; COTTART; NIVET-ANTOINE; BEAUDEUX, 2014), procuramos investigar se o dano ósseo pela ovariectomia implicava no aumento do dano oxidativo no osso e se a proteção observada com o tratamento com resveratrol envolvia este mecanismo, por meio da análise da peroxidação lipídica nas tíbias coletadas dos animais. Conquanto, apesar da técnica ter sido devidamente padronizada, os resultados foram inconclusivos, denotando que talvez ainda seja necessária um maior aprimoramento da técnica utilizada e adequação de outras formas para que seja possível constatar não só o dano, como também quantificar as enzimas envolvidas neste processo no próprio tecido ósseo.

Em suma, nós revisamos não só os efeitos do resveratrol sobre o tecido ósseo em insuficiência de estrógeno, como também os possíveis mecanismos envolvidos nesta

proteção. O principal foco do estudo foi discutir o efeito do tratamento com resveratrol em ossos com diferentes predominâncias de contingentes ósseos, além de averiguar a possibilidade de diminuir o protocolo experimental de 90 para 60 dias, diminuindo os custos de futuras pesquisas. Sobretudo, verificamos que a dose e meio de aplicação do resveratrol foram capazes de proteger fêmures e vértebras contra a deterioração óssea característica da osteoporose por deficiência de estrógeno, mostrando a substância com potencial anti-osteoporótico.

O protocolo experimental de 60 dias pode ser considerado válido caso o foco do estudo seja a avaliação da densidade óssea de ossos com grande proporção de contingente trabecular como as vértebras, visto que são ossos metabolicamente mais ativos capazes de apresentar os danos da osteoporose por déficit de estrógeno e o efeito de tratamentos anti-osteoporóticos. No entanto, caso o objetivo do estudo seja observar os efeitos da insuficiência estrogênica e do tratamento desta em ossos com diversas proporções do contingente cortical e trabecular por meio de uma gama maior de parâmetros ósseos, além de avaliar o ganho de massa corporal e os resultados em parâmetros cardiovasculares (como pode ser observado no artigo do anexo II), o protocolo experimental mais indicado é o de 90 dias.

Além do mais, pôde-se salientar que o uso do animal em apenas uma idade e dois períodos pós-ovariectomia, a falta de técnicas mais apuradas para analisar a resistência mecânica dos contingentes cortical e trabecular do osso separadamente e ausência da avaliação da microarquitetura de ambos os ossos estudados e dos possíveis mecanismos de ação do resveratrol no tecido limitaram o escopo e a profundidade do estudo dos efeitos do resveratrol no tecido ósseo, podendo ser levados em consideração em estudos futuros.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o resveratrol apresentou, na dose e meio de aplicação utilizados, efeito protetor sobre o tecido ósseo tanto com maior predominância de contingente cortical, quanto no com maior predominância de contingente trabecular, apesar do mecanismo de ação ainda não estar completamente esclarecidos. Ainda, a melhor duração de protocolo experimental para a análise de vários parâmetros ósseos e sistêmicos da deficiência de estrógeno é 90 dias, apesar do protocolo de 60 dias ser capaz de avaliar os efeitos da ovariectomia sobre a densidade óssea de tecidos com maior predominância de contingente trabecular.

Dessa forma, damos mais um passo para a consolidação do resveratrol como potencial tratamento não só para a osteoporose, como também para demais efeitos da insuficiência estrogênica no corpo; e que a realização de estudos com diferentes idades dos animais, tempos pós-ovariectomia e uma gama maior de análises físicas, biomecânicas, bioquímicas e de arquitetura óssea possam alicerçar ainda mais o efeito da substância sobre o osso em déficit de estrógeno e os potenciais mecanismos envolvidos nisto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTER, M. P. et al. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 1, p. 14–19, 2003.

AKHTER, M. P. et al. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162–169, 2004.

AKHTER, M. P. et al. Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. **Bone**, v. 41, n. 1, p. 111–116, 2007.

AMMANN, P.; RIZZOLI, R. Bone strength and its determinants. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 14 Suppl 3, p. S13–S18, 2003.

ARJMANDI, B. H. et al. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 6 SUPPL., p. 1358–1363, 1998.

ARMAS, L. A.; RECKER, R. R. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 475–486, 2012.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493–506, 2006.

BERG, B. N.; HARMISON, C. R. Growth, disease, and aging in the rat. **Journal of Gerontology**, v. 12, n. 4, p. 370–377, 1957.

BERGLUND, M. et al. Metal-bone interactions. **Toxicology Letters**, v. 112–113, p. 219–225, 2000.

BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; MARTIN, T. J. **Principles of Bone Biology, Two-Volume Set**. 3^a ed. San Diego: Academic Press, 2008.

BLACK, D. M.; ROSEN, C. J. Postmenopausal Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 3, p. 254–262, 2016.

BOISSY, P. et al. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. **Cancer Research**, v. 65, n. 21, p. 9943–9952, 2005.

BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139–146, 2008.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337–342, 2003.

BRANDI, M. L. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatology**, v. 48, n. suppl 4, p. iv3-iv8, 2009.

BRENNAN, O. et al. Temporal changes in bone composition, architecture, and strength following estrogen deficiency in osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 91, n. 6, p. 440–449, 2012.

BURR, D. B.; ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, v. 30, n. 5, p. 781–786, 2002.

CAIROLI, E. et al. Perspectives on osteoporosis therapies. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 38, n. 3, p. 303–311, 2015.

CALLAWAY, D. A.; JIANG, J. X. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 33, n. 4, p. 359–370, 2015.

CASARIN, R. C. et al. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, 2014.

CASATI, M. Z. et al. Resveratrol Decreases Periodontal Breakdown and Modulates Local Levels of Cytokines During Periodontitis in Rats. **Journal of periodontology**, v. 84, n. 10, p. e58–e64, 2013.

CATALGOL, B. et al. Resveratrol: French paradox revisited. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 JUL, n. July, p. 1–18, 2012.

ÇELİK, A.; ÖĞENLER, O.; ÇÖMELEKOĞLU, Ü. . The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, v. 20, n. 6, p. 411–415, 2005.

CENTER, J. R. Fracture Burden: What Two and a Half Decades of Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study Data Reveal About Clinical Outcomes of Osteoporosis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 15, n. 2, p. 88–95, 2017.

COMPSTON, J. Osteoporosis: Social and Economic Impact. **Radiologic clinics of North America**, v. 48, n. 3, p. 477–482, 2010.

COSMAN, F. et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359–2381, 2014.

COTTART, C. H.; NIVET-ANTOINE, V.; BEAUDEUX, J. L. Review of recent data on the metabolism, biological effects, and toxicity of resveratrol in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 1, p. 7–21, 2014.

COUNET, C.; CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 649–657, 2006.

DAS, A. S. et al. Protective action of aqueous black tea (*Camellia sinensis*) extract (BTE) against ovariectomy-induced oxidative stress of mononuclear cells and its associated progression of bone loss. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 9, p. 1287–1294, 2009.

DAS, U. N. Catechins and osteoporosis. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 697–699, 2013.

DELMAS, D. et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, n. 4, p. 48–59, 2011.

DO AMARAL, C. L. et al. Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 6, p. 363–370, 2008.

DUAN, P.; BONEWALD, L. F. The Role of the Wnt- β -catenin Signaling Pathway in Formation. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 77, n. Pt A, p. 23–29, 2016.

EINHORN, T. A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. (Eds.). . **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 3–22.

EL-MOHSEN, M. A. et al. Distribution of [3H] trans-resveratrol in rat tissues following oral administration. **British journal of nutrition**, v. 96, n. 1, p. 62–70, 2006.

ENGESAETER, L. B.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 49, n. 6, p. 512–518, 1978.

FABRICIO, V. **Avaliação dos efeitos do resveratrol sobre o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2014.

FABRICIO, V. et al. Resveratrol Treatment Normalizes the Endothelial Function and Blood Pressure in Ovariectomized Rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 116–121, 2017.

FAIENZA, M. F. et al. Review Article Postmenopausal Osteoporosis : The Role of Immune System Cells. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.

FANG, J. et al. Are there differences between Sprague-Dawley and Wistar rats in long-term effects of ovariectomy as a model for postmenopausal osteoporosis? **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 2, p. 1491–1502, 2015.

FENG, X.; MCDONALD, J. M. Disorders of Bone Remodeling. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 121–145, 2011.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I. et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 11, p. E47-51, 2006.

FRANCISCO, J. I. et al. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 2, p. 189–196, 2011.

FRÉMONT, L. et al. Biological effects of resveratrol. **Antioxidants & redox signaling**, v. 3, n. 6, p. 1041–1064, 2001.

GEHM, B. D. et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 14138–43, 1997.

GHAZAL, S.; PAL, L. Perspective on hormone therapy 10 years after the WHI. **Maturitas**, v. 76, n. 3, p. 208–212, 2013.

GOETTSCHE, C. et al. NADPH oxidase 4 limits bone mass by promoting osteoclastogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 11, p. 4731–4738, 2013.

HABOLD, C. et al. Effect of prior treatment with resveratrol on density and structure of rat long bones under tail-suspension. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 15–22, 2011.

HAUSENBLAS, H. A.; SCHOULDA, J. A.; SMOLIGA, J. M. Resveratrol treatment as an adjunct to pharmacological management in Type 2 diabetes mellitus—systematic review and meta-analysis. **Molecular nutrition & food research**, 2014.

HE, X. et al. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 401, n. 3, p. 356–362, 2010.

HEINE, P. A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, p. 12729–12734, 2000.

IKEDA, S. et al. Effect of trabecular bone contour on ultimate strength of lumbar vertebra after bilateral ovariectomy in rats. **Bone**, v. 28, n. 6, p. 625–633, 2001.

ITO, M. et al. Contribution of trabecular and cortical components to the mechanical properties of bone and their regulating parameters. **Bone**, v. 31, n. 3, p. 351–358, 2002.

IYER, S. et al. FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 8, p. 3409–3419, 2013.

IYER, S. et al. Sirtuin1 (Sirt1) promotes cortical bone formation by preventing β -catenin sequestration by FoxO transcription factors in osteoblast progenitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24069–24078, 2014.

Jl, M.-X.; YU, Q. Primary osteoporosis in postmenopausal women. **Chronic Diseases and Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 9–13, 2015.

JIANG, J. M.; SACCO, S. M.; WARD, W. E. Ovariectomy-induced hyperphagia does not modulate bone mineral density or bone strength in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 11, p. 2106–2110, 2008.

JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 12, p. 1726–1733, 2006.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175–191, 1991.

KANIS, J. A. et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 1, p. 23–57, 2013.

KANIS, J. A.; ORGANIZATION, W. H. **Assessment of osteoporosis at the primary health care level**. [s.l.] WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield Medical School, 2008.

KATSUMATA, T. et al. Intermittent cyclical etidronate treatment maintains the mass, structure and the mechanical property of bone in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 6, p. 921–931, 1995.

KEENAN, M. J. et al. Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' principle. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 11, p. 1903–1907, 1997.

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

KIMURA, M. et al. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 4, p. 1349–1353, 2002.

KUTLEŠA, Z.; BUDIMIR MRŠIĆ, D. Wine and bone health: a review. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 34, n. 1, p. 11–22, 2016.

LANGDAHL, B.; FERRARI, S.; DEMPSTER, D. W. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 8, n. 6, p. 225–235, 2016.

LELOVAS, P. P. et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 5, p. 424, 2008.

LERNER, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 7, p. 584–595, 2006.

LIU, X. L. et al. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: Change in bone density and microarchitecture. **Clinical Oral Implants Research**, v. 26, n. 4, p. 392–398, 2015.

LIU, Z. P. et al. Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 1, p. 14–19, 2005.

LOVERIDGE, N. Bone: more than a stick. **Journal of animal science**, v. 77 Suppl 2, n. suppl 2, p. 190–196, 1999.

MACEDO, J. M. S. et al. Meta-analysis about efficacy of anti-resorptive drugs in post-menopausal osteoporosis. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 23, n. 5, p. 345–352, 1998.

MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996.

MARINHO, B. C. G. et al. The burden of osteoporosis in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 434–443, 2014.

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

MATSUBARA, M. et al. Estrogen modulates ghrelin expression in the female rat stomach. **Peptides**, v. 25, n. 2, p. 289–297, 2004.

MIZUTANI, K. et al. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 3, p. 859–863, 1998.

MOSEKILDE, L.; DANIELSEN, C. C.; KNUDSEN, U. B. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. **Bone**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 1993.

MUHAMMAD, S. I. et al. Bone mass density estimation: Archimede's principle versus automatic X-ray histogram and edge detection technique in ovariectomized rats treated with germinated brown rice bioactives. **Clinical interventions in aging**, v. 8, p. 1421–1431, 2013.

MUTHUSAMI, S. et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. **Clinica Chimica Acta**, v. 360, n. 1–2, p. 81–86, 2005.

NGUYEN, T. V et al. Genetic determination of bone mineral density: evidence for a major gene. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3614–3620, 2003.

NIKOLOVA, V. Resveratrol: A Crossread of Enology and Biomedicine. **Biomedical Reviews**, v. 18, n. December, p. 89–101, 2007.

NORDSLETTEN, L. et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. **Calcified Tissue International**, v. 55, n. 6, p. 436–442, 1994.

NOVACK, D. V. Estrogen and Bone: Osteoclasts Take Center Stage. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 4, p. 254–256, 2007.

OCCHIUTO, F. et al. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (*Trifolium pratense* L.) on experimental osteoporosis. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 2, p. 130–134, 2007.

PALLOTTINI, V. et al. Estrogen Regulation of Adipose Tissue Functions: Involvement of Estrogen Receptor Isoforms. **Infectious Disorders -Drug Targets**, v. 8, p. 52–60, 2008.

PARFITT, A. M. et al. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. **Journal of Clinical Investigation**, v. 72, n. 4, p. 1396–1409, 1983.

PATLAS, N. et al. Oophorectomy-induced osteopenia in rats in relation to age and time postoophorectomy. **Cells Tissues Organs**, v. 166, n. 3, p. 267–274, 2000.

PENG, Z. et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523–532, 1994.

PFEILSCHIFTER, J. et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 1, p. 90–119, 2002.

PISANI, P. et al. Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact. **World Journal of Orthopedics**, v. 7, n. 3, p. 171, 2016.

RAMALHO, A. C.; LAZARETTI-CASTRO, M. Fisiopatologia da osteoporose involutiva. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, n. 6, p. 409–414, 1999.

REID, I. R. Relationships among body mass, its components, and bone. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 547–555, 2002.

RENNO, A. C. et al. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. **Experimental Gerontology**, v. 42, n. 6, p. 517–522, 2007.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 8–30, 2014.

RHO, J. Y.; KUHN-SPEARING, L.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Medical Engineering and Physics**, v. 20, n. 2, p. 92–102, 1998.

RICHARD, D. et al. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 253, n. 5, p. R740–R745, 1987.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON 3RD, L. J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 3, p. 279–302, 2002.

RIGGS, B. L.; MELTON, L. J. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. **The American Journal of Medicine**, v. 75, n. 6, p. 899–901, 1983.

RITCHIE, R. O.; BUEHLER, M. J.; HANSMA, P. Plasticity and toughness in bone. **Physics Today**, v. 62, n. 6, p. 41–47, 2009.

ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 562–569, 2002.

SAKATA, I. et al. Gastric estrogen directly induces ghrelin expression and production in the rat stomach. **Journal of Endocrinology**, v. 190, n. 3, p. 749–757, 2006.

SAMNEGÅRD, E. et al. Maintenance of vertebral body bone mass and strength created by human parathyroid hormone treatment in ovariectomized rats. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 414–422, 2001.

SATO, M. et al. Longitudinal and cross-sectional analysis of raloxifene effects on tibiae from ovariectomized aged rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 272, n. 3, p. 1252–1259, 1995.

SCHOLZ-AHRENS, K. E. et al. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats - impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. **NFS Journal**, v. 3, p. 41–50, 2016.

SEEMAN, E. Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 68, n. 10, p. 1218–1225, 2013.

SEEMAN, E.; DELMAS, P. D. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 21, p. 2250–2261, 2006.

SEHMISCH, S. et al. Comparison of the phytohormones genistein, resveratrol and 8-prenylnaringenin as agents for preventing osteoporosis. **Planta Medica**, v. 74, n. 8, p. 794–801, 2008.

SEHMISCH, S. et al. Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. SUPPL. 2, p. 168–174, 2010.

SHAKIBAEI, M.; BUHRMANN, C.; MOBASHERI, A. Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activation of NF-kappaB signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 11492–11505, 2011.

SHARMA, R.; SHARMA, N. K.; THUNGAPATHRA, M. Resveratrol regulates body weight in healthy and ovariectomized rats. **Nutrition and Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 4–9, 2017.

SHIMANO, M. M.; SHIMANO, A. C.; VOLPON, J. B. Histerese de fêmures de ratas submetidos a ensaio de flexão, em diferentes faixas etárias. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 18, n. 2, p. 89–97, 2002.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 43, n. 1, p. 49–52, 1992.

SILVERMAN, S. L. Evaluation of Risk for Osteoporotic Fracture. In: BILEZIKIAN RAISZ, L.G. E MARTIN, T. J., J. P. (Ed.). . **Principles Of Bone Biology**. 2008: Academic Press, 2008. v. 1.

SITES, J. B. C. A. et al. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 27, p. 19385–19398, 2007.

SOGAARD, C. H. et al. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, n. 5, p. 439–449, 1997.

SUJIC, R. et al. Factors predictive of the perceived osteoporosis-fracture link in fragility fracture patients. **Maturitas**, v. 76, n. 2, p. 179–184, 2013.

TAGLIAFERRI, C. et al. Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. **European Journal of Nutrition**, v. 54, n. 7, p. 1139–1149, 2015.

TAKEDA, S. et al. Intermittent Ibandronate Maintains Bone Mass, Bone Structure, and Biomechanical Strength of Trabecular and Cortical Bone After Discontinuation of Parathyroid Hormone Treatment in Ovariectomized Rats. **Calcified Tissue International**, v. 101, n. 1, p. 65–74, 2017.

TSENG, P. et al. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 10, p. 2552–2563, 2011.

TURNER, A. S. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. **European Cells and Materials**, v. 1, p. 66–81, 2001.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v. 14, n. 4, p. 595–608, 1993.

TURNER, R. T. et al. Differential effects of gonadal function on bone histomorphometry in male and female rats. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 4, n. 4, p. 557–63, 1989.

TURNER, R. T. et al. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 50–54, 1999.

WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 9–15, 2011.

WALSH, J. S. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. **Surgery (United Kingdom)**, v. 36, n. 1, p. 1–6, 2018.

WANG, X.; CHEN, L.; PENG, W. Protective effects of resveratrol on osteoporosis via activation of the SIRT1-NF- κ B signaling pathway in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 5, p. 5032–5038, 2017.

WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Review series Estrogen deficiency and bone loss : an inflammatory tale. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 5, 2006.

WRIGHT, N. C. et al. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 11, p. 2520–2526, 2014.

WU, C. M. et al. Si-Wu-tang extract stimulates bone formation through PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathways in osteoblasts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, 2013.

ZARROW, X. **Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques**. [s.l.] Academic Press, 1964.

ZHANG, G. et al. Flavonoids derived from herbal Epimedium Brevicornum Maxim prevent OVX-induced osteoporosis in rats independent of its enhancement in intestinal calcium absorption. **Bone**, v. 38, n. 6, p. 818–825, 2006.

ZHANG, Z. et al. Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: An updated review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 438–446, 2016.

ZHAO, H. et al. Long-term resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 5, p. 836–846, 2014.

ANEXO I – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão de Ética no Uso de Animais

Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676

Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679

Fax: (016) 3351.8025

CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil

ceua@ufscar.br - www.prona.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

nº 2-043/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES DURAÇÕES DO TRATAMENTO COM RESVERATROL SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS, submetido pelo pesquisador **VICTOR FABRÍCIO**.

São Carlos, 11 de NOVEMBRO de 2014

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais