

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

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIDROXIAPATITA E DO
RESVERATROL SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATOS
CONTAMINADOS COM ACETATO DE CHUMBO**

FABIO ALEXANDRE CASARIN PASTOR

SÃO CARLOS
2013

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

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIDROXIAPATITA E DO
RESVERATROL SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATOS
CONTAMINADOS COM ACETATO DE CHUMBO

FABIO ALEXANDRE CASARIN PASTOR

Tese 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
2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P293ae

Pastor, Fabio Alexandre Casarin.

Avaliação dos efeitos da hidroxiapatita e do resveratrol sobre o tecido ósseo de ratos contaminados com acetato de chumbo / Fabio Alexandre Casarin Pastor. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

141 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Tecido ósseo. 2. Acetato de chumbo. 3. Hidroxiapatita. 4. Resveratrol. 5. Ratos. I. Título.

CDD: 619.93 (20ª)

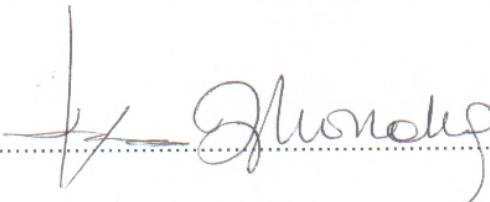
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

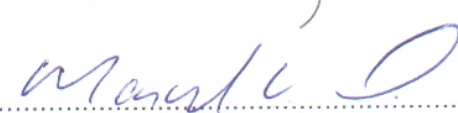
Tese de Doutorado de Fabio Alexandre Casarin Pastor

Dia 21/06/2013

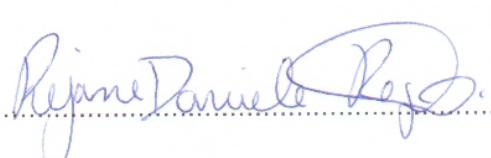
Profª. Drª. Keico Okino Nonaka.....



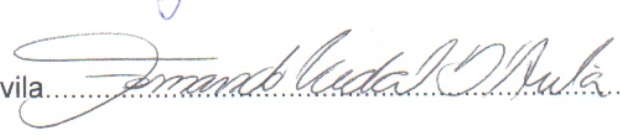
Prof. Dr. Marcelo Rodrigues da Cunha.....



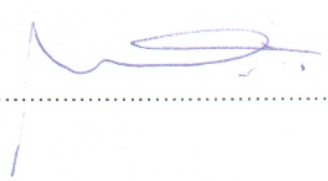
Profª. Drª. Rejane Daniele Reginato.....



Prof. Dr. Fernando Vidal D'Avila.....



Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada.....



Lisa Mowday

Orientadora

Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Esse trabalho recebeu apoio financeiro à pesquisa do CNPq, FAPESP e FINEP.

Opinião, Fé e Ciência

A crença, ou o valor subjetivo do juízo, com relação à convicção (que tem ao mesmo tempo um valor objetivo), apresenta os três graus seguintes: a *opinião*, a *fé* e a *ciência*. A *opinião* é uma crença que tem consciência de ser insuficiente tanto subjetiva quanto objetivamente. Se a crença é apenas subjetivamente suficiente e se é ao mesmo tempo considerada objetivamente insuficiente, chama-se *fé*. Enfim, a crença suficiente tanto subjetiva quanto objetivamente chama-se *ciência*.

Emmanuel Kant - 'Crítica da Razão Pura'

Aos meus pais, José Carlos e Marisa, pelo amor, carinho, educação, dedicação, incentivo, apoio incondicional e principalmente pelos valores que sigo em vida.

A minha esposa, Juliana, pela grande dedicação, cumplicidade, e por ser o amor da minha vida.

Ao meu irmão, Eduardo e todos os nossos amigos, por terem incentivado esta carreira e proporcionado muita alegria durante esta vida.

A TODOS ESTES: AMO VOCÊS!

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 almejados e realizados em vida;

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, pela ótima oportunidade de participação neste programa de pós-graduação, o exemplo de ética profissional e grande caráter;

Aos meus pais, José Carlos Pastor e Marisa Elizabeth Casarin Pastor, pela educação, amor, carinho, dedicação, incentivo, apoio incondicional e principalmente pelos valores que sigo em vida.

À minha esposa, Juliana Rodrigues Prada, pelo eterno companheirismo, apoio nos momentos difíceis e principalmente por compartilhar o "amor" pela vida.

Ao meu irmão, Eduardo Alexandre Casarin Pastor e todos os nossos amigos rio clarenses, Lucas Barsotti, Fabrício Amaral Gobbo, Rodrigo Augusto Dalia, Lucas Gaspar, Alexandre Barreto, João Eduardo Dietrich, Luciano Castelar das Neves por terem acreditado e proporcionado muita alegria!

Aos meus amigos são carlenses: Júlio Damálio, João Paulo Munhoz Martins, e todos os grandes amigos de encontrei em São Carlos (inclusive os vários do departamento), pelo companheirismo ao longo desse período e pelos momentos de descontração em momentos difíceis.

Aos (ex e atuais) pós-graduandos do Laboratório de Neuroendocrinologia, Daniel Mochiutti, Juciléia Barbosa Bezerra, Fernando Vidal D'Ávila, Charles Chenwei Wang, José Aparecido Ferreira, Valéria Gonçalves Albieri Mattos, Fabio Henrique Bogni, Victor Fabrício, Leandro Dias Gonçalves Ruffoni, Karina Ana Silva pelo companheirismo indispensável ao cumprimento deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, por toda a contribuição no desenvolvimento deste trabalho, especialmente Sr. Sérgio Dias, técnico do laboratório de Neuroendocrinologia;

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e a aluna Ana Carolina Baptista Moreno Martin por ter disponibilizado o laboratório (Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar) e ajudado nas análises de zimografia para determinação da atividade proteolítica de metaloproteinases em extrato ósseo e para a utilização de uma balança de precisão;

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pela utilização do leitor de micro placas (ELISA) do Laboratório de Histologia e Microscopia / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar.

Ao profissional Paulo Lasso pela utilização do microtomógrafo marca SkyScan[®], localizado na Embrapa – Instrumentação Agropecuária, São Carlos -SP.

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

Ao Centro de Assistência Toxicológica CEATOX, pela utilização da Espectrometria de Absorção com Chama, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Botucatu, pelo auxílio na realização e interpretação da análise.

Aos professores Dra. Ana Lúcia Kalinin / Departamento de Ciências Fisiológicas (Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa) – UFSCar, Dra. Patrícia Driusso / Departamento de Fisioterapia – UFSCar e Dr. Charles Chenwei Wang / Universidade de São Paulo (USP-São Carlos) pelas contribuições importantes no exame de qualificação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Profa. Dra. Keico pela confiança depositada, pelo exemplo, profissionalismo, caráter e generosidade.

A disponibilidade profissional e pessoal, da qual permitiu contribuir para meu crescimento profissional e pessoal, de forma exigente, carinhosa, crítica e descontraída.

Minha eterna gratidão, todo meu respeito, admiração e amor por uma educadora especial que permitiu que eu me torna-se um pesquisador!

RESUMO

Chumbo (Pb) é um poluente ubíquo no ecossistema cuja distribuição ambiental é principalmente antropogênica, oriunda da queima de combustíveis fósseis, mineração e fabricações industriais diversas. Há pouco conhecimento do envolvimento do Pb e seus compostos sobre o metabolismo ósseo bem como das potenciais terapias para quadros de contaminação relacionadas ao chumbo. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações ósseas causadas pelo acetato de chumbo correlacionado-as aos efeitos da hidroxiapatita e do resveratrol em ratos adultos contaminados com acetato de chumbo. Foram analisados os parâmetros biomecânicos, biométricos, biofísicos, microtomográficos ósseos, a densidade radiográfica, a concentração de Pb e a atividade de metaloproteinases no tecido ósseo. Os animais foram distribuídos em 6 grupos com 8 ratos cada: controle, tratados com salina 0,9% (0,1 ml/100g MC), hidroxiapatita, tratados com hidroxiapatita (100 mg/kg MC), contaminado, tratados com acetato de chumbo (250 mg/kg MC) e contaminado + hidroxiapatita, tratados com acetato de chumbo (250 mg/kg MC) e hidroxiapatita (100 mg/kg MC), 1 vez por semana, por 8 semanas pelo método de gavagem gástrica. Grupo contaminado + resveratrol, tratados com acetato de chumbo (250 mg/kg MC) e resveratrol (0,7 mg/kg MC) e DMSO, tratado com dimetilsulfóxido (0,1 ml/100g MC), 5 vezes por semana, por 8 semanas por meio de injeções intraperitoneais. A contaminação com acetato de chumbo promoveu incorporação de chumbo no tecido ósseo provocando redução da resistência óssea de fêmures e vértebras e do contingente trabecular das vértebras analisadas, promovendo aumento da atividade de metaloproteinases tipo 2. Tanto o tratamento com 100 mg/kg MC de hidroxiapatita quanto o de 0,7 mg/kg MC de resveratrol preveniram os efeitos deletérios da contaminação com chumbo na dose proposta, inclusive reduzindo os valores de atividade de metaloproteinases tipo 2 para níveis semelhantes ao do grupo controle. Portanto, os resultados apontam a hidroxiapatita e o resveratrol como potenciais agentes de tratamento preventivo na contaminação com chumbo, evitando os prejuízos à qualidade do tecido ósseo provocadas por este elemento.

Palavras-chaves: acetato de chumbo, concentração de chumbo, hidroxiapatita, resveratrol, biomecânica óssea, microtomografia óssea, densidade radiográfica, metaloproteinases, ratos e tecido ósseo.

ABSTRACT

Lead (Pb) is an ubiquitous pollutant in the environmental ecosystem. Its distribution is mainly anthropogenic, coming from the burning of fossil fuels, mining and production of various industrial products. There is little knowledge of the effect of the Pb and its compounds on bone metabolism as well as potential therapies for frames contamination related to the lead. The aim of this study was to determine possible changes in the bones of adult rats contaminated with lead acetate correlated them to the effects of hydroxyapatite and the resveratrol in adult rats contaminated with lead acetate. The biomechanical, biometric, biophysical, microtomographic bone parameters, the radiographic density, the concentration of Pb and metalloproteinase activity in bone tissue were analyzed. The animals were distributed into 6 groups of 8 rats each: control, treated with saline 0.9% (0.1 ml/100g BM), hydroxyapatite, treat with hydroxyapatite (100 mg/kg BM), contaminated, treated with lead acetate (250 mg/kg BM), contaminated + hydroxyapatite, treated with lead acetate (250mg/kg BM) and hydroxyapatite (100mg/kg BM); the treatments were carry out once per week for 8 weeks by gastric gavage. The groups contaminated + resveratrol, treated with lead acetate (250 mg/kg BM) and resveratrol (0.7 mg/kg BM) and DMSO, treated with dimethylsulfoxide (0.1 ml/100g BM), 5 times a week for 8 weeks by intraperitoneal injections. The contamination with lead acetate promoted incorporation of it in bone tissue leading to a reduction in bone strength of femurs and vertebrae, reduction of vertebral trabecular contingent, and increased activity of metalloproteins type 2. The treatment with hydroxyapatite (100 mg/kg MC) as well with resveratrol (0.7 mg/kg MC) prevented the deleterious effects of lead contamination at the proposed dose, including reducing the activity values of metalloproteins type 2 to levels similar to that of control group. Therefore, the results point to hydroxyapatite and resveratrol as potential treatment agents in lead contamination, preventing damage to the quality of bone tissue caused by this element.

Key words: lead acetate, lead concentration, hydroxyapatite, resveratrol, bone biomechanics, bone microtomography, radiographic density, metalloproteinases, rat, bone tissue.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Máquina universal Instron (modelo 4444) utilizado para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato. 47
- FIGURA 2. Gráfico Carga x Deformação, obtido com o teste de flexão, utilizado para determinação das propriedades biomecânicas. 50
- FIGURA 3. Representação gráfica da massa corporal (g) inicial, final e ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 56
- FIGURA 4. Representação gráfica da massa corporal (g) inicial, final e ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 56
- FIGURA 5. Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 59
- FIGURA 6. Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 60
- FIGURA 7. Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 63
- FIGURA 8. Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 65

- FIGURA 9. Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos 66
fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais:
Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- FIGURA 10. Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos 67
fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais:
Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.
- FIGURA 11. Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos das quintas 69
vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais:
Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- FIGURA 12. Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos das quintas 70
vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais:
Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.
- FIGURA 13. Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos dos fêmures 72
direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle,
Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- FIGURA 14. Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos dos fêmures 72
direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle,
Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.
- FIGURA 15. Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos das quintas 75
vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais:
Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- FIGURA 16. Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos das quintas 75
vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais:
Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

- FIGURA 17. Microtomografias das sextas vértebras lombares. As letras A, B, C e D 78 correspondem aos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita, respectivamente.
- FIGURA 18. Microtomografias das sextas vértebras lombares. As letras A, C, E e F 78 correspondem aos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Res e DMSO, respectivamente.
- FIGURA 19. Representação gráfica dos valores de densidade radiográfica (mmAl) das 80 quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita; Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO, respectivamente.
- FIGURA 20. Representação gráfica do conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) em fêmures 81 direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- FIGURA 21. Representação gráfica dos valores de conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) 82 nas quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.
- FIGURA 22. Representação gráfica dos valores de concentração chumbo em fêmures 83 esquerdos (µg/g) e em plasma (µg/dl) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- FIGURA 23. Representação gráfica dos valores de concentração chumbo em fêmures 84 esquerdos (µg/g) e no plasma (µg/dl) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

- FIGURA 24. Análise da atividade proteolítica do extrato de tecido ósseo (fêmures 85
esquerdos) por zimografia dos animais dos diferentes grupos
experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado +
Hidroxiapatita (n=8 por grupo).
- FIGURA 25. Análise da atividade proteolítica do extrato de tecido ósseo (fêmures 86
esquerdos) por zimografia dos animais dos diferentes grupos
experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e
DMSO (n=8 por grupo).
- FIGURA 26. Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia 88
(U.A.) dos fêmures esquerdos dos animais dos diferentes grupos
experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado +
Hidroxiapatita.
- FIGURA 27. Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia 88
(U.A.) dos fêmures esquerdos dos animais dos diferentes grupos
experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e
DMSO.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 57
- TABELA 2. Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 57
- TABELA 3. Valores de parâmetros biomecânicos: Carga Máxima (N), Rigidez (N/mm), Carga da fratura (N), Tenacidade (J), Resiliência (J), Deslocamento Máximo (mm) e Deslocamento no Ponto da Fratura (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 61
- TABELA 4. Valores de parâmetros biomecânicos: Deslocamento no Ponto da Fratura (mm), Força Máxima (N), Rigidez (N/mm), Tenacidade (J), Deslocamento Máximo (mm) Resiliência (J) e Carga da fratura (N) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 62
- TABELA 5. Valores de parâmetros biomecânicos: Deslocamento Máximo (mm), Carga Máxima (N), Rigidez (N/mm), Tenacidade (J) e Resiliência (J) das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 64

- TABELA 6. Valores de parâmetros biomecânicos: Deslocamento Máximo (mm), 65
Carga Máxima (N), Rigidez (N/mm), Tenacidade (J) e Resiliência (J)
das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos
experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e
DMSO.
- TABELA 7. Valores de Comprimento, Diâmetros Maior e Menor das diáfises 68
femorais em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das
Cinzas em gramas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes
grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e
Contaminado + Hidroxiapatita.
- TABELA 8. Valores de Comprimento, Diâmetros Maior e Menor das diáfises 68
femorais em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das
Cinzas em gramas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes
grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado +
Resveratrol e DMSO.
- TABELA 9. Valores de Altura em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e 71
das Cinzas em gramas (g), das quintas vértebras lombares dos animais
dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita,
Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- TABELA 10. Valores de Altura em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e 71
das Cinzas em gramas (g), das quintas vértebras lombares dos animais
dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado,
Contaminado + Resveratrol e DMSO.
- TABELA 11. Valores de Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, 73
Volume Ósseo (em cm^3), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em
 g/cm^3), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos
experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado
+ Hidroxiapatita.

- TABELA 12. Valores de Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, 73
Volume Ósseo (em cm^3), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm^3), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.
- TABELA 13. Valores de Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, 76
Volum Ósseo (em cm^3), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm^3), das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- TABELA 14. Valores de Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, 76
Volum Ósseo (em cm^3), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm^3), das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.
- TABELA 15. Comparação das médias (2 vértebras) em porcentagem (do segundo 79
grupo em relação ao primeiro grupo) dos parâmetros microtomográficos: número de trabéculas (1/mm), espessura trabecular (mm) e espaço entre trabéculas (mm) das sextas vértebras lombares dos animais entre os diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.
- TABELA 16. Comparação das médias (2 vértebras) em porcentagem (do segundo 79
grupo em relação ao primeiro grupo) dos parâmetros microtomográficos: número de trabéculas (1/mm), espessura trabecular (mm) e espaço entre trabéculas (mm) das sextas vértebras lombares dos animais entre os diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

- TABELA 17. Valores de Densidade radiográfica (mmAl), das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 80
- TABELA 18. Valores de Densidade radiográfica (mmAl), das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 81
- TABELA 19. Conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) em fêmures direitos e nas quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 82
- TABELA 20. Conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) em fêmures direitos e nas quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 82
- TABELA 21. Concentração chumbo em fêmures esquerdos (µg/g) e em plasma (µg/dl) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 84
- TABELA 22. Concentração chumbo em fêmures esquerdos (µg/g) e em plasma (µg/dl) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 84
- TABELA 23. Intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) dos fêmures esquerdos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. 88
- TABELA 24. Intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) dos fêmures esquerdos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

ACGIH Conferência Americana das Indústrias Governamentais Higienistas

AMPc Adenonisa Monofosfato Cíclico

ALP Enzima Fostase Alcalina

ATF6 Fator de Transcrição Ativado 6

BM Body Mass

C₁ Carga no Limite Elástico

C₂ Carga Máxima

C₃ Carga de Fratura

Ca Cálcio

Ca²⁺ Cálcio Divalente

CaCl₂ Cloreto de Cálcio

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ Hidroxiapatita

Cd Cádmio

CEEA Comitê de Ética em Experimentação Animal

CHO-K1 Linhagem celular de ovário de hamster

cm Centímetro

cm³ Centímetro Cúbico

CNP - Conselho Nacional de Petróleo

D₁ Deformação no Limite Elástico

D₂ Deformação na Carga Máxima

D₃ Deformação no Ponto de Fratura

D3 1,25-dihidroxitamina

DCF Departamento de Ciências Fisiológicas

DCT1 Transportador de Cátion Divalente 1

dl Decilítro

DMSO Ácido Dimetilsulfóxido

DMT1 Transportador de Metal Divalente 1

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DP Desvio Padrão

DR Densidade Radiográfica

EAAC Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

EDTA Ácido Etilenodiaminotetracético

Fe Ferro
FGF Fator de Crescimento Fibroblástico
FOXO Forkhead Box
g Gramas
GH Hormônio de Crescimento
GRP78 Proteína-78 Regulada pela Glicose
H⁺ Hidrogênio
HAS Hipertensão Arterial Sistêmica
Hg Mercúrio
HNO₃ Ácido Nítrico
H₂PO₄ Dihidrogenofosfato
H₂O Água
H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio
IGF Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGF-I Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I
IP3 Inositol-3-fosfato
IRE1 Proteína 1 Requerente de Inositol
J Joules
JNK c-Jun Amino-Terminal Quinase
kDa Quilo Dawton
kg Quilogramas
kgf Quilograma força
kN Quilo Newton
LH Hormônio Luteinizante
L4 Quartas Vértebras Lombares
L5 Quintas Vértebras Lombares
L6 Sextas Vértebras Lombares
MC Massa Corporal
MC3T3-E1 Linhagem de Pré-osteoblastos de Ratos
M-CSF Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos
MED Média
mg Miligramas
min Minuto
mm Milímetros

mM Micro Molar
mmAl Milímetros de Alumínio
MMP Metaloproteinases
MMP-2 Metaloproteinases Tipo 2
2 N Dois Normal
n Número de Animais
N Newton
NaNO₃ Nitrato de Sódio
NF-κβ fator nuclear kappa β
NRAMP2 Proteína de Macrófago Associada à Resistência Natural 2
O[•] Oxigênio Singleto
OAT1 Transportador de Ânion Orgânico 1
OAT3 Transportador de Ânion Orgânico 3
OH[•] Radical Hidroxil
OPG Osteoprotegerina
ρ Rô
Pb Chumbo
Pb²⁺ Chumbo Divalente
Pb(C₂H₃O₂)₂.3(H₂O) Acetato de Chumbo
Pb₁₀(PO₄)₆(OH)₂ Hidroxipiromorfita
PDGF Fator de Crescimento Derivados de Plaquetas
PGE2 Prostaglandina E2
pH Potencial de Hidrogênio
Pi Peso Imerso
Pm Peso do Material Mineral (cinzas)
Ppm Partes por Milhão
PO₄⁻ Fosfato
Ps Peso Seco
PTH Hormônio da Paratireóide
Pu Peso úmido
QI Coeficiente de Inteligência
RDI Região de Interesse
RE Retículo Endoplasmático
RANK Receptor de Membrana de Osteoclastos e Pré-Osteoclastos

RANKL Ligante de Superfície dos Osteoblastos e Pré-Osteoblastos

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

rpm Rotações por Minuto

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

SH Grupos sulfidrílicos

S1 Primeira Vértebra Sacral

T Inclinação da Reta

TfR1 Transferrina 1

TfR2 Transferrina 2

UA Unidades Arbitrárias

Wnt Proteína Sinalizadora que Regula o Turnover da β -catenina

v Volume

vs Versus

°C Graus Celsius

μ l Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	28
1.1 Tecido Ósseo.....	28
1.2 Chumbo.....	33
1.4 Hidroxiapatita.....	41
1.5 Resveratrol.....	42
2. OBJETIVOS.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Modelos de Estudo.....	45
3.2 Animais.....	45
3.3 Protocolo Experimental.....	45
3.4 Eutanásia.....	48
3.5 Parâmetros Analisados.....	48
3.5.1 Parâmetros Biomecânicos.....	48
3.5.2 Parâmetros Biométricos.....	50
3.5.3 Parâmetros Biofísicos.....	51
3.5.4 Parâmetros Microtomográficos Ósseos.....	52
3.5.5 Densidade Radiográfica.....	52
3.5.6 Propriedades Bioquímicas.....	53
3.5.7 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama.....	54
3.5.8 Zimografia de Gelatina.....	54
3.6 Análises Estatísticas.....	55
3.7 Normas Técnicas Referentes à Elaboração do Trabalho.....	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1 Massa Corporal.....	56
4.2 Parâmetros Biomecânicos.....	57
4.2.1 Parâmetros Biomecânicos dos Fêmures.....	58
4.2.2 Parâmetros Biomecânicos das Vértebras.....	62
4.3 Parâmetros Biométricos.....	65
4.3.1 Parâmetros Biométricos dos Fêmures.....	65
4.3.2 Parâmetros Biométricos das Vértebras.....	69
4.4 Parâmetros Biofísicos.....	71
4.4.1 Parâmetros Biofísicos dos Fêmures	71

4.4.2 Parâmetros Biofísicos das Vértèbras	74
4.5 Parâmetros Microtomográficos Ósseos.....	77
4.6 Densidade Radiográfica.....	80
4.7 Conteúdo de Cálcio Ósseo.....	81
4.8 Espectrometria.....	83
4.9 Zimografia.....	85
5. DISCUSSÃO.....	89
6. CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXO I.....	142

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é constituído por uma matriz extracelular altamente organizada, contendo componentes inorgânicos (60%) e orgânicos (40%) (HILL, ORTH, 1998; ROBEY, BOSKEY, 2008) e um distinto e complexo grupo celular. A fase 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 é a fase mineral, ou seja, inorgânica (FERNANDEZ et al., 2006a). Ressalta-se que a sustentação da conformação característica desta estrutura, é dada pela presença de cargas eletrostáticas mantedoras dos íons na superfície do cristal. Somente os cátions com propriedades químicas semelhantes às do elemento que compõe o cristal são capazes de penetrar e tornar-se parte do cristal. Como exemplo, o fluoreto ou cloreto podem substituir o ânion hidroxila (RABINOWITZ, 1991; TUREK, 1991) e metais pesados, como o estrôncio, podem substituir as posições do cálcio na hidroxiapatita (BRONNER, 2002);

Funcionalmente, a fase orgânica (que dá origem a matriz óssea) é determinante da estrutura e das propriedades mecânicas ósseas, sendo composta pelo osteóide (pré-osso) que é formado principalmente por colágeno tipo I e pelas células do tecido ósseo (10% do total da matriz óssea). Em relação ao grupo celular temos quatro tipos celulares principais no tecido ósseo: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, descritos detalhadamente abaixo:

- Células osteoprogenitoras: são células tronco mesenquimais cuja capacidade de proliferação e diferenciação as permite tornarem-se osteoblastos, podendo manter-se quiescentes ou ativas conforme a demanda metabólica imposta ao tecido;
- Células osteoblásticas: são células osteoprogenitoras diferenciadas (que estimuladas por diversos fatores diferenciam-se, especializam-se e tornam-se células características com intensa atividade metabólica). São células responsáveis pela osteogênese, sintetizando e exportando componentes da matriz óssea orgânica (colágeno, principalmente do tipo I e proteoglicanos sulfatados na matriz extracelular, ou seja, responsáveis pela formação da matriz óssea;
- Células osteocitárias: após a calcificação (deposição dos componentes inorgânicos) alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz óssea mineralizada, diferenciam-se e passam a ser denominados osteócitos. Estas células comunicam-se entre si, por meio de prolongamentos

adjacentes, localizados em canalículos presentes no interior do osso, mantendo dessa forma o equilíbrio e a manutenção da matriz óssea (conteúdo mineral e protéico). Ressalta-se das funções do osteócito, a sua participação como célula responsável pela tradução da força mecânica imposta ao osso em sinais bioquímicos que regulam o “turnover” ósseo (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; NOMURA, YAMAMOTO, 2000; PALUMBO et al., 2001; MACKIE, 2003; BONEWALD, 2004; TATE et al., 2004; FERNANDEZ et al., 2006b; RUBIN, RUBIN, JACOBS, 2006; DEL FATTORE et al., 2010, ERIKSEN, 2010).

- Células osteoclásticas: os osteoclastos são células gigantes multinucleadas promotoras da osteólise (reabsorvem tecido ósseo). São originadas a partir da diferenciação de células mononucleadas hematopoiéticas precursoras de macrófagos e monócitos “Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Units” (GM-CFU) e portanto, são o grupo celular ósseo que não apresentam a mesma linhagem celular dos demais grupos de células ósseas.

Além disso, é importante ressaltar a interação entre os grupos celulares ósseos. Um exemplo direto é a ação osteoblástica atuando diretamente na fase inicial da osteoclastogênese. Por meio de um processo que envolve a osteoprotegerina, RANKL (ligante de origem osteoblástica) e RANK (receptor de membrana osteoclástica) há produção do fator estimulante da colônia de macrófagos (M-CSF). Estes fatores levam a algumas reações que se inicia com a diferenciação osteoclástica (via interação receptor - RANKL) e finaliza-se com a inibição osteoclástica (via interação da OPG - RANK, que inativa este receptor). Ainda há uma interação de grupos celulares com fatores endógenos que participam diretamente da regulação funcional destes grupos celulares ósseos. O exemplo principal são as interações entre grupos celulares e mecanismos endócrinos, como a ação direta do paratormônio (PTH) sobre receptores osteoblásticos e a ação parácrina do mesmo sobre osteoclastos para manutenção do equilíbrio iônico do cálcio plasmático (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; RAISZ, 1999; PALUMBO et al., 2001; TROEN, 2003; FERNANDEZ et al., 2006b; BOYCE, XING, 2007; TAKAHASHI et al., 2011).

Das proteínas não colágenas (da matriz extracelular) ressalta-se a importância da osteocalcina como recrutadora de osteoclastos e de precursores destas células no processo de reabsorção óssea; da osteopontina como potencializadora da sobrevivência celular e migração em áreas de metabolismo ativo ósseo; e da osteonectina, regulando a formação e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita, servindo como núcleo para a mineralização óssea (EINHORN, 1996; HALL, 2005; FERNANDEZ et al., 2006a; ROBEY, BOSKEY, 2008).

Desta forma, o tecido ósseo em associação com outras estruturas como: cartilagem, medula óssea, gordura, vasos sanguíneos e nervos caracterizam o osso como estrutura física

orgânica. Biomecanicamente por sua vez, o osso em conjunto com diversas estruturas funcionais (articulações, ligamentos e tendões) faz parte do conjunto de estruturas que formam o arcabouço de sustentação do nosso organismo: o esqueleto. Ademais, diversas funções são atribuídas ao esqueleto: suporte e proteção a órgãos vitais como os contidos na caixa torácica e craniana; sistema de alavancas cujo conjunto com os músculos caracteriza o sistema músculo-esquelético, permitindo o deslocamento do indivíduo; sustentação e conformação estrutural ao corpo; reservatório iônico para o organismo (cálcio, fósforo, magnésio e outros); hematopoiese via medula óssea (BILEZIKIAN, RAIKZ, RODAN, 1996; MARTINI, 1998; CONFAVREUX, 2010; CONFAVREUX, 2011). Outro aspecto relevante do esqueleto é sua atuação como segunda linha de defesa contra acidose e devido à sua vasta área de superfície mineral há uma capacidade de absorção de toxinas e metais pesados (LOVERIDGE, 1999; RAIKZ, 1999; FERNANDEZ et al., 2006a).

Como observado, a formação do osso é dependente da síntese de uma matriz orgânica inicial (não mineralizada), rica em colágeno (osteóide) da qual se converte em osso mineralizado (calcificado). A deposição deste osso depende de uma base pré-existente, seja tecido conjuntivo rico em colágeno, seja matriz cartilaginosa (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996). Portanto há formação do esqueleto por dois processos distintos conhecidos como ossificação intramembranosa e ossificação endocronal.

A ossificação intramembranosa ocorre internamente em uma membrana de tecido conjuntivo (no desenvolvimento do embrião) pela especialização e diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras em osteoblastos, ocorrendo em ossos do crânio: frontal, parietal e partes do occipital, do temporal, dos maxilares superior e inferior e partes da clavícula. Contribui também para o crescimento de ossos curtos e em espessura para os ossos longos. Exemplificando, os ossos do crânio crescem em direção ao centro de ossificação primária (local da membrana conjuntiva onde se inicia a ossificação) e se encontram nas suturas. As suturas são domínios celulares fibroblásticos compostas de perióstio de ossos adjacentes que apresentam em seu centro, células em proliferação que se diferenciam em osteoblastos e direcionam-se à superfície óssea adjacente (WURTZ et al., 1998). A parte que não sofre ossificação passa a constituir o endóstio e perióstio.

Assim, endóstio e perióstio estão relacionados diretamente com a reabsorção interna (pelas células localizadas no endóstio) e formação externa óssea (pelas células localizadas no perióstio), respectivamente. E este processo está diretamente relacionado ao crescimento do diâmetro de ossos longos (BILEZIKIAN, RAIKZ, RODAN, 1996).

Já na ossificação endocondral o osso é formado em um processo de ossificação a partir de um molde cartilaginoso (hialina), onde células mesenquimais osteoprogenitoras se diferenciam em células cartilaginosas. Este é o principal meio de formação de ossos curtos e longos, onde o crescimento longitudinal surge da proliferação condrocitária na placa de crescimento. Esta placa pode ser subdividida em zonas (caracterizadas pela forma, tamanho e atividade metabólica celular): zona de repouso, onde condrócitos latentes são, a partir de estímulos específicos, recrutados para a zona de proliferação; zona de proliferação onde os condrócitos dividem-se e formam colunas paralelas, empilhadas no sentido longitudinal do osso. Após assumirem esta configuração estas células migram para a zona de hipertrofia; zona hipertrófica onde os condrócitos hipertrofiados produzem uma abundante matriz extracelular que mais tarde se tornará mineralizada. Prosseguindo, os condrócitos sofrem apoptose na zona de cartilagem calcificada onde ocorre mineralização da matriz cartilaginosa e termina a apoptose dos condrócitos e na zona de ossificação onde capilares sanguíneos e células osteogênicas originadas do periósteo invadem as cavidades deixadas pelos condrócitos mortos. Há diferenciação celular em osteoblastos, que formam uma camada contínua sobre os restos da matriz cartilaginosa calcificada. Sobre estes restos de matriz cartilaginosa, os osteoblastos depositam a matriz óssea, fazendo parte de todo o processo de crescimento longitudinal ósseo, fatores intrínsecos e extrínsecos (como fatores de crescimento, hormônios e vitaminas) (LOVERIDGE, 1999).

Desta forma, culminamos no processo de remodelamento ósseo. Após a formação óssea, todos os grupos celulares (via liberação de diversas enzimas) e os fatores intrínsecos e extrínsecos atuam nas diversas vias metabólicas que acabam por caracterizar o osso, como um tecido dinâmico constantemente em processo de modificação. Este processo de remodelamento tem como principal função manter a homeostasia mineral (cálcio e fósforo) e a integridade estrutural do tecido, regulando o “turnover” da matriz extracelular (MEC). Ademais, o remodelamento ósseo demonstra um comportamento resposta-dependente de alguns tipos de sinalizadores químicos, mecânicos, elásticos e eletromagnéticos. Em condições normais, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção visa garantir a integridade das funções do esqueleto, mantendo a sua funcionalidade biomecânica, prevenindo-o contra o acúmulo de fadigas e protegendo os componentes teciduais para que estes estejam sempre disponíveis para manter o equilíbrio mineral (HILL, ORTH, 1998; STERNLICHT, WERB, 2001; FERNANDEZ et al., 2006b).

Basicamente, em um modelo cíclico, temos cinco fases no remodelamento ósseo: ativação, reabsorção, formação, mineralização e quiescência. Este evento dura

aproximadamente quatro meses para estar completo, com variação de três a seis meses para o osso tornar-se plenamente maduro (PARFITT, CHIR, 1987; HILL, ORTH, 1998; FERNANDEZ et al., 2006b).

Iniciando com o estágio de ativação, temos migração de pré-osteoclastos (células mononucleares do sistema fagocitário) para a superfície do tecido que, estimulados e diferenciados sobre a influência de citocinas e fatores de crescimento, tornam-se osteoclastos ativos. Assim, caracterizamos a fase de reabsorção óssea onde osteoclastos ativos digerem a matriz mineral por meio da criação de uma superfície ácida que dissolve o conteúdo mineral ósseo, permitindo a liberação de diversos fatores de crescimento, fundamentais para as etapas posteriores do processo de remodelamento ósseo. Uma vez que o conteúdo mineral foi dissolvido os osteoclastos remanescentes removem o restante do colágeno da matriz óssea para completar o processo de reabsorção. A erosão formada no tecido é característica conforme o tipo ósseo reabsorvido e denomina-se lacuna de Howship no osso trabecular e cone de reabsorção (de desgaste) no osso cortical.

Seguindo a reabsorção, osteoblastos se tornam ativos (pois os fatores liberados durante a fase de reabsorção estimulam a diferenciação dos pré-osteoblastos) e migram para as áreas de reabsorção óssea, sendo responsáveis pela produção e deposição de matriz orgânica (denominado osteóide) e caracterizando a fase de formação óssea (síntese da matriz óssea). O osteóide é rico em colágeno, cálcio e fosfato que começam a sofrer cristalização (calcificação da matriz osteóide), caracterizando a fase de mineralização onde os osteoblastos são circundados pela matriz óssea mineralizada e tornam-se osteócitos.

Conseqüente ao evento descrito, outros osteoblastos sofrem apoptose ou retornam a fase de quiescência, retornando ao estado de células tronco mesenquimais (osteoprogenitoras) e a superfície óssea encontra-se inativa. Por fim, as células osteoprogenitoras aguardam o estímulo adequado para que retornem a diferenciarem-se em osteoblastos e iniciarem a deposição de matriz orgânica novamente (PARFITT, CHIR, 1987; HILL, ORTH, 1998; FERNANDEZ et al., 2006b).

Entretanto, não é conhecido em caráter definitivo a sinalização desencadeadora do processo de remodelamento ósseo. Conhecido é o fato que há interação entre os receptores dos grupos celulares ósseos com fatores diversos, locais e sistêmicos. Com a estimulação celular apropriada (via prostaglandina E_2 - PGE_2 e PTH) há síntese e liberação de proteases (por exemplo, metaloproteinases de matriz) cuja ação expõe áreas de matriz óssea mineralizada e culminam na função de manutenção da matriz extracelular (EINHORN, 1996; HILL, ORTH, 1998; VU, WERB, 2000).

Desta forma, assim como o ciclo de vida humano sofre constantes modificações durante a vida, há constantes alterações na fisiologia do tecido ósseo do indivíduo. Estas alterações fisiológicas dar-se-ão na relação entre formação e reabsorção do tecido ósseo, cujo ápice de desenvolvimento no humano encontra-se aos 30 anos de idade (com prevaência da formação tecidual). Já a estabilização entre a formação e reabsorção do tecido ósseo ocorre entre os 35 e 40 anos (BERGLUND et al., 2000). Após esse período de equilíbrio, a reabsorção passa a prevalecer, culminando na redução progressiva de massa óssea. Assim, a relação entre formação/reabsorção é de fundamental importância para a fisiologia óssea, pois preserva a integridade mecânica do tecido, o mantendo qualitativamente funcional (VAANANEN, 1991; YAMAMOTO, JEE, MA, 1995; MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; NORDIN, 1997; KANIS, 1998; TENENHOUSE et al., 2000).

Ademais, todo o metabolismo do tecido ósseo pode ser influenciado por fatores endógenos (hormonais, genética, sexo, idade, doenças intercorrentes) e exógenos (alimentação, fatores ambientais) (YONAGA et al., 1985; MARCUS, FIELDMAN, KELSEY, 1996; SCHIRRMACHER et al., 1998; JIN et al., 2002; AKHTER et al., 2004; NGUYEN et al., 2003; DOREA, DONANGELO, 2006; VAHTER et al., 2007). Dentre os fatores ambientais, há relatos na literatura da influência de metais pesados, como o chumbo, sobre o desenvolvimento e remodelamento ósseo (MAHAFFEY, 1974; POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; RABINOWITZ, 1991; ESCRIBANO et al., 1997; GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997; RONIS et al., 2001; BRONNER, 2002; BAGCHI, PREUSS, 2005).

1.2 Chumbo

O chumbo (Pb), com número atômico 82 e peso atômico 207,19, é um metal cinza azulado ou cinza prateado com um ponto de fusão de 327,5 °C e um ponto de ebulição de 1740 °C. Há ocorrência de quatro isótopos com pesos atômicos de 208, 206, 207 e 204 (em ordem decrescente de abundância) (IPCS, 1995; WHO, 2001; ATSDR, 2007). Este elemento ocorre naturalmente na crosta terrestre, sendo a maior fonte natural as erupções vulcânicas e o desgaste geoquímico (IPCS, 1995; COWI, 2003; WIWANITKIT, SUWANSAKSRI, 2006). Entretanto, é raramente encontrado naturalmente como metal e usualmente encontra-se combinado com dois ou mais elementos para formar compostos de Pb (ATSDR, 2007). Apesar do Pb apresentar 4 elétrons em sua camada de valência, seu típico estado de oxidação é +2. À exceção do nitrato, clorato e, numa escala menor o cloreto, a maioria dos sais inorgânicos de Pb possuem pouca solubilidade em água (WHO, 2001).

Chumbo é um poluente ubíquo no ecossistema (HAN et al., 1997; WHO, 2001; BAGCHI, PREUSS, 2005; DOREA, DONANGELO, 2006; EL-ASHMAWY et al., 2006; MUDIPALLI, 2007). Este elemento pode ser encontrado em todo o ambiente (QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003, BURBURE et al. 2006; ATSDR, 2007). Como não é um elemento degradável naturalmente, permanece no ambiente (COWI, 2003). Esta ampla distribuição ambiental é principalmente antropogênica, oriunda da queima de combustíveis fósseis, mineração e fabricações industriais diversas (ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005; ATSDR, 2007). Como o Pb metálico é resistente à corrosão, facilmente moldado e em combinação com outros metais formando ligas, comumente é encontrado em canos, baterias, munição de armamentos, revestimento de cabos e chapas usadas para blindagem contra radiação. O maior uso para o Pb é nas baterias de carros e outros veículos. Os componentes do Pb são usados como pigmentos em tintas, tinturas, esmaltes cerâmicos e na calafetagem (IPCS, 1995; VOGIATZIS, LOUMBOURDIS 2001; WHO 2001; WAKEFIELD, 2002; BARBOSA et al., 2005; WIWANITKIT, SUWANSAKSRI, 2006; ATSDR, 2007). Tetraetil e o tretametil de Pb foram usados no mundo inteiro como aditivos de combustíveis para aumentar o índice de octana (NRIAGU, 1990). A quantidade de Pb usado nestes produtos foi reduzida recentemente com o intuito de reduzir os efeitos nocivos em humanos e animais. Nos Estados Unidos (EUA) a utilização destas substâncias foi proibida na década de 80 e, a adição de Pb na gasolina foi banida em 1º de janeiro de 1996 (THOMAS et al., 1999; ATSDR, 2007). No Brasil, a partir de 1975 com o surgimento do Programa Nacional de Etanol Anídrico, o tetraetil de Pb foi gradualmente substituído pelo álcool anídrico na gasolina e em 1979, uma disposição regulatória (Resolução 14/79) editado pelo Conselho Nacional de Petróleo (CNP), determinou a proibição do uso do tetraetil de Pb na gasolina brasileira (PAOLIELLO, DE CAPITANI, 2007). Entretanto, o tetraetil de Pb continua sendo utilizado em alguns veículos “off-road”, aviões, veículos militares e ainda é utilizado em vários países em desenvolvimento, onde não há uma fiscalização adequada (ATSDR, 2007).

Munições com Pb em sua composição constituem a maior utilização deste elemento além das utilizações vinculadas às baterias. A maior parte do Pb usado industrialmente provém da escavação mineral (primário) ou da reciclagem de metais descartados e baterias ácido-Pb (secundário). Dados demonstram que um total de 97% das baterias são recicladas no EUA (ATSDR, 2007). Portanto, verificamos que a atividade industrial e automobilística são os principais causadores do aumento da concentração deste elemento no ambiente (ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005).

A literatura científica brasileira relacionada aos efeitos adversos do Pb em trabalhadores e na população geral, tem sido produzida irregularmente desde o fim do século 19 (PAOLIELLO, DE CAPITANI, 2007). No Brasil, efeitos adversos do Pb na população geral, especialmente em crianças, tornaram-se interesse da saúde pública somente a partir de 1980 (CARVALHO et al, 2003).

A produção brasileira de Pb (8.832 ton em 2000) representa 0,003% da produção mundial, e foi claramente reduzida nos últimos anos. Atualmente representa 8,1% da quantidade total de Pb que é consumido no país por ano. Toda a produção mineral é exportada, pois o refino local de Pb foi cessado em 1996. Atualmente 90% do consumo nacional total vêm das atividades de reciclagem. No entanto, é estimado que 2 milhões de baterias usadas sejam anualmente perdidas sem possibilidades de reciclagem (FRANCO-NETTO et al., 2003). Os maiores consumidores de Pb no país são os produtores de bateria (80%), representando 88.000 ton, seguidos por óxidos e pigmentos (12%), e os setores eletrônicos e elétricos com 8% (BRASIL, 2001). Não obstante, os dados epidemiológicos da exposição humana ao chumbo têm sido insuficientes, não permitindo um entendimento mais acurado do impacto sobre a saúde pública (FRANCO-NETTO et al, 2003). No Brasil, os limites propostos pela legislação para os níveis de Pb no sangue são de 60 µg/dl (para trabalhadores que tem contato com Pb), e é contrastante com os limites da Conferência Americana das Indústrias Governamentais Higienistas (ACGIH), que é de 30 µg/dl (PAOLIELLO, DE CAPITANI, 2007).

A ingestão humana de metais pesados provenientes do ambiente tem sido foco de contínuo interesse. Chumbo é encontrado em plantas (folhas de fumo), animais e humanos, por meio do consumo de água, comida e do ar que respiramos (ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Quando liberado no ar, o Pb percorre grandes distâncias antes de sedimentar-se ao solo e aderir-se a diversas partículas no solo. Conseqüentemente, este contaminante pode atingir lençóis freáticos e difundir-se por uma enorme área (ATSDR, 2007).

Os efeitos do Pb dar-se-ão por meio da inalação ou ingestão deste elemento. Este metal pode afetar praticamente todos os órgãos e sistemas do nosso organismo (ATSDR, 2007; MUDIPALLI, 2007; LIAO et al, 2008). No ambiente, o Pb é tóxico para plantas, animais e microorganismos, sendo bioacumulado no esqueleto e tecidos moles de mamíferos, algas aquáticas e invertebrados. Ademais, este elemento é altamente tóxico para humanos e não há efeitos benéficos para o organismo (COWI, 2003; BAGCHI, PREUSS, 2005), sendo que o grau da toxicidade pode ser influenciado por diversos fatores, como sexo, idade, estado

fisiológico, condição nutricional e genética (MAHAFFEY, 1974; IPCS, 1995). Além disso, a forma química do Pb como intoxicante do organismo pode influenciar a sua biodisponibilidade. Como exemplo, o acetato de chumbo - $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$, um sal com grande solubilidade em água, branco e inodoro, apresenta uma maior taxa de absorção via sistema gastrointestinal quando comparado a outros sais e compostos de Pb (IPCS, 1995; CETESB, 2001; SMITH, MIELKE, HENEGHAN, 2008). DIETER et al., 1993, mostraram que o acúmulo de chumbo em fêmures de ratos, é altamente dependente da forma química de Pb administrado, sendo que a biodisponibilidade do acetato de chumbo foi a maior, em comparação com outros compostos de chumbo.

Há aumento da quantidade de Pb corporal por meio da dieta e ingestão de água contaminada ou por meio da liberação deste elemento pelos ossos, uma vez que este elemento pode permanecer no osso por décadas (LIN et al., 2003). O Pb por si só não se decompõe quimicamente, porém a partir da formação de compostos de Pb há decomposição química e alteração por meio da luz solar, ar e água (COWI, 2003). Desta forma, a contaminação com Pb, pode provocar efeitos mutagênicos, carcinogênicos, citotóxicos e genotóxicos (IPCS, 1995; ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Em humanos, o Pb pode resultar em um amplo efeito biológico, dependente do nível e duração da exposição. Os efeitos podem variar desde a inibição de determinadas enzimas (mudanças bioquímicas súbitas), inibição da divisão celular, a produção de mudanças morfológicas e morte (IPCS, 1995, MESTEK et al., 1998; EL-ASHMAWY et al., 2006).

Iniciando a lista de efeitos deletérios do Pb, temos os neurológicos, como os mais estudados e revisados pela literatura científica. Vários autores relatam a toxicidade do Pb sobre o sistema nervoso central (SNC) (FERGUSON, et al., 1998; UNGVÁRY, MORVAI, SZAKMÁRY, 2002; QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003; CHEN et al., 2005; FAZAKAS, LENGYEL, NAGYMAJTÉNYI, 2005; DOREA, DONANGELO, 2006). Os danos a este sistema envolvem retardo do aprendizado com redução do coeficiente de inteligência (QI) em crianças expostas a este metal e deficiências do desenvolvimento neuropsicológico e das funções neurocomportamentais (IPCS, 1995; CANFIELD et al., 2003; BAGCHI, PREUSS, 2005; CHEN et al., 2005; BURBURE et al., 2006; DOREA, DONANGELO, 2006). Associa-se este elemento também à encefalopatias, redução da função nervosa periférica e da condução das fibras nervosas mielinizadas (BLEECKER et al., 2005, ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). GORELL et al. (1999) associaram a contaminação por chumbo ao aumento do risco de desenvolvimento da doença de Parkinson. WEISSKOPF et al., 2007, relacionaram a contaminação do chumbo com a redução dos níveis

cognitivos e com a doença de Alzheimer. KAMEL et al. (2008) sugerem que a exposição ao chumbo está relacionada a uma doença neurodegenerativa progressiva denominada esclerose lateral amiotrófica.

Recentemente, associou-se as complicações cardiovasculares e subseqüentemente, o surgimento de hipertensão arterial sistêmica (HAS) à contaminação com Pb, confirmando a ação prejudicial deste metal ao sistema cardiovascular (HU et al., 1996; UNGVÁRY, MORVAI, SZAKMÁRY, 2002; BAGCHI, PREUSS, 2005; CHEN et al, 2005; MARTIN et al., 2006; PARK et al., 2006). No sistema hematopoiético, o Pb afeta a formação de eritrócitos e prejudica a síntese heme e da globina, o que pode acarretar anemia ao organismo contaminado (FOX, 1987; IPCS, 1995; REISS, HALM, 2007).

No sistema renal, os efeitos prejudiciais estão associados à exposições crônicas e agudas ao Pb, induzindo nefropatias (LIN et al., 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004; BURBURE et al., 2006). A nefrotoxicidade aguda é caracterizada pelo decréscimo da reabsorção de compostos com baixo peso molecular pelo túbulo renal, particularmente, aminoácidos, glicose e fosfato. Mudanças morfológicas da exposição crônica ao Pb incluem citomegalia, desenvolvimento de corpos de inclusão nucleares e mudanças ultraestruturais nas mitocôndrias (IPCS,1995). LIN et al (2003) demonstraram que a exposição crônica ao Pb (níveis baixos) pode influenciar subitamente a progressão da insuficiência renal em pacientes sem diabetes com doença renal crônica acarretando danos glomerulares e tubulares renais.

No tecido hepático, igualmente demonstrou-se evidências da toxicidade do Pb (FAZAKAS LENGYEL, NAGYMAJTÉNYI, 2005). SMITH, MIELKE, HENEGHAN (2008) demonstraram um aumento da concentração de acetato de chumbo dose dependente, no tecido hepático. EL-ASHMAWY et al. (2006) associaram a disfunção hepática (redução do número de divisões celulares e aumento das aberrações celulares e de cromossomos) após a contaminação com chumbo com aumentos significativos da peroxidação lipídica, e um decréscimo dos níveis de antioxidantes endógenos neste tecido.

O Pb é um dos maiores intoxicantes do sistema reprodutivo (JARRELL et al., 2006). No sistema reprodutor masculino, provoca alterações morfológicas e da contagem dos espermatozóides e no sexo feminino, induz alterações da gestação e dos níveis hormonais do hormônio luteinizante e folículo estimulante, por meio de ações nos ovários (IPCS, 1995; COWI, 2003; KRIEG, 2007). Também interage com o sistema imunológico, provocando redução da resistência do organismo, aumentando a mortalidade em organismos expostos previamente a agentes virais e bacterianos. Chumbo prejudica a formação de anticorpos e a resposta imune (KOLLER, ROAN, 1980; QUEIROZ et al., 2003).

O Pb no osso é outro foco de interesse por diversas razões, sendo o esqueleto o maior sítio de armazenamento deste elemento no organismo (WHO, 2001; BRONNER, 2002) e a maior fonte endógena de chumbo (BERGLUND et al., 2000). Recentemente associou-se o envenenamento por Pb às desordens ósseas. O osso é o depósito para o Pb dos organismos previamente expostos a este contaminante, onde há incorporação na matriz óssea durante a calcificação (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997). Esse acúmulo inicia-se durante o desenvolvimento fetal e prolonga-se ao longo da vida, instalando-se em áreas de crescimento e mineralização óssea (BARRY, 1975; EISENSTEIN, KAWANOUE, 1975; POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; HAMILTON, O'FLAHERTY, 1995). Este elemento apresenta uma meia vida biológica longa (10 a 30 anos) e o conhecimento da cinética de armazenamento do chumbo é muito importante devido à possibilidade de liberação deste estoque sobre determinadas condições e contaminação de outros tecidos moles (sangue, fígado, rim, encéfalo) (RABINOWITZ, 1991; HU et al., 2007). Devido à variação do “turnover” no osso trabecular, cortical e nas diversas regiões do esqueleto, o acúmulo de um dado metal no esqueleto, como o chumbo, será maior naquelas regiões onde a taxa de “turnover” for menor (BRONNER, 2002). BARBOSA et al. 2005 afirmam que ossos trabeculares apresentam um período de “turnover” menor, o que torna o chumbo acumulado nesse tipo ósseo biologicamente mais ativo.

O desenvolvimento da técnica de fluorescência por raios-X e testes de mobilização de EDTA dissódio de cálcio para mensuração de Pb no osso *in vivo*, permitiu o início do entendimento de como o Pb pode interferir sobre o metabolismo ósseo e os fatores que influenciam sua retenção e sua liberação (GRAZIANO, 1994; LIN et al, 2003; BARBOSA et al., 2005; HU et al., 2007). O interesse nesta relação surgiu juntamente com evidências de que estados fisiológicos e patológicos, por exemplo, gestação, lactação (SILBERGELD, 1991; REISS, HALM, 2007), e osteopatias (CAMPBELL et al., 2004) como a osteoporose (SILBERGELD et al., 1988; SUN et al. 2008), poderiam mobilizar o Pb estocado nos ossos e promover efeitos adversos a outros tecidos, incluindo contaminação do feto (IPCS, 1995, DOREA, DONANGELO, 2006), aumento do risco de aborto e nascimento de crianças mortas (ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Há relatos sobre o Pb como prejudicial ao crescimento em crianças (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997). Além disso, a deposição de chumbo afeta a função celular do osso, tanto a atividade osteoblástica quanto a osteoclástica (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; BRONNER, 2002). A inibição da atividade osteoblástica está associada à redução da síntese de osteocalcina (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997).

Há evidências que o Pb pode afetar direta e indiretamente vários aspectos do metabolismo ósseo, sendo a manifestação desta contaminação resultado de uma complexa interação entre efeitos endócrinos sistêmicos, processos celulares nos ossos e processos químicos na matriz óssea (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991). O Pb inibe a enzima renal 1-alfa-hidroxilase, reduzindo os níveis plasmáticos do 1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D ativa). Chumbo prejudicou o remodelamento dos sistemas haversianos em cães expostos cronicamente a este elemento (ANDERSON, DANYLCHUK, 1977).

Muitos autores estudaram alterações do tecido ósseo em ratos durante seu desenvolvimento, demonstrando que o desenvolvimento ósseo nesses animais possui as mesmas características fisiológicas na formação e reabsorção que ocorre durante o desenvolvimento do tecido ósseo em humanos (BERG, HARMISSON, 1957; KALU et al., 1989; THOMPSON et al., 1995). O modelo experimental com ratos é excelente para verificarmos alterações ósseas causadas por contaminantes.

Existem relatos sobre a influência de metais pesados, como o Pb, sobre as alterações do desenvolvimento ósseo em ratos durante a fase de crescimento. HAMILTON, O'FLAHERTY (1995) demonstraram alterações morfológicas metafisárias e nas placas de crescimento em ossos de ratos expostos ao Pb. GONZÁLEZ-RIOLA et al. (1997) relataram inibição do desenvolvimento das epífises de crescimento em fêmures de ratos contaminados com dose de 17 mg de acetato de chumbo por kg de peso corporal por um período de 50 dias. Para ESCRIBANO et al. (1997), o crescimento longitudinal e periférico de ossos longos não é prejudicado pelo Pb, mas altera o desenvolvimento do esqueleto axial. Outros autores como BAGCHI, PREUSS (2005) observaram uma redução da densidade mineral óssea em ratos contaminados com acetato de chumbo a 1% na água consumida por estes animais durante 40 dias. Estudos *in vitro* também não descartam alterações em células ósseas expostas a Pb^{2+} (5 μ mol/l) por longos períodos, como a redução do acoplamento elétrico mediado por conexina-43 em cultura de células osteoblásticas, provavelmente esgotando os estoques de cálcio intracelular, já que a comunicação célula-a-célula via junções do tipo "gap" são sensíveis ao cálcio (SCHIRRMACHER et al., 1998). *In vivo*, RONIS et al. (2001), associaram a contaminação com acetato de chumbo à inibição da osteoblastogênese, e a exposição prolongada a este elemento reduziu a resistência óssea e o crescimento esquelético.

Vários trabalhos determinaram que animais não completamente desenvolvidos demonstraram sensibilidade quando expostos a metais pesados, praguicidas ou outros agentes tóxicos (MOSER, 2000; FERRI et al., 2003; SINGH, RISHI, 2005; DOREA, DONANGELO, 2006). A grande vulnerabilidade desses organismos quanto a agentes químicos está

relacionada à imaturidade dos órgãos e membranas e à incapacidade de processar adequadamente os mesmos (NIES, SPIELBERG, 1996; TYL, 1998). O dano ao organismo pode ser direto, pela deposição deste elemento nos tecidos, e indiretos, por meio dos distúrbios do metabolismo (MESTEK et al, 1998). Nas células eucarióticas, este metal tem um efeito genotóxico, com mecanismos não bem caracterizados e possivelmente envolvendo danos indiretos ao DNA, quer seja afetando a estabilização da cromatina, quer seja interagindo com processos de reparo e acredita-se que o chumbo é capaz de interagir covalentemente com íons fosfato terciários em ácidos nucléicos e proteínas (ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGU, 2005).

Todos os compostos de chumbo são tóxicos. Devido à alta afinidade entre chumbo e grupos sulfídricos (SH) (GRAZIANO, 1994), há modificação de grupos tióis nas proteínas de membrana, peptídeos e aminoácidos, indiretamente pela produção de produtos oxidativos e por meio da alteração do estado redox da célula. Este efeito dá-se por meio da peroxidação lipídica e/ou modulação da síntese de produtos imunorreguladores (QUEIROZ et al., 2003). BAGCHI, PREUSS (2005) também relatam como possíveis efeitos adversos do Pb o estresse oxidativo. Essa interação com SH de proteínas como as metalotioneínas, glutatona e cisteína está diretamente envolvida com a captação, acúmulo, transporte e conseqüentemente, toxicidade do Pb. A indução da expressão de metalotioneínas é o um dos efeitos intracelulares do Pb^{2+} , tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HAN et al., 1999, DOREA, DONANGELO, 2006). A interação dos metais pesados com estes SH resulta em alteração de atividades enzimáticas como, por exemplo, das metaloproteinases de matriz, fundamentais ao processo de remodelamento tecidual (SOUZA, GERLACH, LINE, 2000; VU, WERB, 2000); inibição de enzimas antioxidantes estimulando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido ($O^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}) e assim, induzindo aumento da peroxidação lipídica, o que induz danos ao DNA e alteração da homeostase do cálcio (STOHS, BAGCHI, 1995; LIN et al, 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004, EL-ASHMAWY et al., 2006). A contaminação de animais com Pb está intimamente associada ao metabolismo de cálcio (COWI, 2003), sendo que as proteínas ligantes de cálcio apresentam grande afinidade por chumbo, o que, por conseguinte, permite assumir a competição entre os sítios ativos de ligação de cálcio (MAHAFFEY, 1974; BÜSSELBERG et al., 1991; FULLMER, 1991; HAN et al., 1997; MESTEK et al., 1998; HAN et al., 2000). O chumbo ainda, pode competir com o cálcio em múltiplos sítios de ligação, reduzindo o estoque de cálcio intracelular, o que afetaria os canais de junção do tipo “gap” (SCHIRRMACHER et al., 1998). Recentemente associou-se os receptores de ferro, transferrina 1 e 2 (TfR1 e TfR2,

respectivamente), presentes em diversos tipos celulares, como passíveis de transporte para diversos cátions metálicos covalentes, inclusive o Pb (BALLATORI, 2002). GUNSHIN et al. (1997) descreveram o mecanismo de entrada do Fe^{2+} e outros cátions divalentes, com o Pb, por meio de um transportador denominado transportador de cátion divalente 1 (DCT1 ou DMT1 ou NRAMP2) dependente de potencial de membrana e acoplamento de prótons. Várias evidências apontam que alguns efeitos do Pb estão localizados no retículo endoplasmático (RE), sendo esta organela o maior sítio de armazenamento e regulação de cálcio intracelular. Por sua vez, o Pb intracelular se liga a uma proteína chaperona de peso molecular de 78 kD, conhecida como GRP78 promovendo uma falha no seu funcionamento, o que pode estimular respostas protéicas específicas via transdução por IRE1/ATF6 (proteína 1 requerente de inositol e fator de transcrição ativado 6, respectivamente) e/ou IRE1/JNK (c-Jun amino-terminal quinase) (QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003).

1.3 Hidroxiapatita

Estudos *in vitro* demonstram a capacidade de cristais de hidroxiapatita sintéticos de retirar o chumbo do ambiente (principalmente em solos e água), via reação do chumbo com o fosfato, formando um composto menos biodisponível e não tóxico ao ambiente, a hidroxipiromorfita ($\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (RYAN, et al., 2001; ELLIS et al., 2006; SINGH, HENDRY, 2006; SRINIVASAN, FERRARIS, WHITE, 2006; JANG et al., 2008; SMICIKLAS et al., 2008). ZHANG, RYAN (1998) observaram um decréscimo na biodisponibilidade do chumbo com formação de piromorfita, após simular certas condições gastrointestinais de mamíferos. GIAMMAR, XIE, PASTERIS (2008), utilizando nanocristais de hidroxiapatita de ossos de peixes, conseguiram observar a precipitação do chumbo e a formação de piromorfita. No entanto, 2 estudos revelam a interação entre chumbo e este cristal *in vivo*. PEARSON et al. (2000) analisaram minhocas em solo contaminado com chumbo e tratadas com fosfatos. O estudo revelou uma redução parcial (30%) do acúmulo de chumbo nestes organismos e formação de piromorfita. ARNICH et al (2003), realizando experimentos *in vitro*, demonstraram a capacidade da hidroxiapatita sintética de reter Pb, formando piromorfita. Os autores supõem que isto possa ocorrer pela troca do Ca^{2+} pelo Pb^{2+} na hidroxiapatita, conseqüentemente formando piromorfita. Os mesmo autores, realizando estudos *in vivo*, com ratos divididos em quatro grupos: controle, grupo que recebeu hidroxiapatita, grupo que recebeu chumbo e grupo que recebeu chumbo e hidroxiapatita, durante 31 dias via gavagem, verificaram que a hidroxiapatita foi efetiva na imobilização do

chumbo produzindo uma forma insolúvel (piromorfita). As concentrações de Pb em vários órgãos testados (sangue, intestino, fígado, rins, baço, encéfalo, ossos) foram reduzidas nos animais tratados com hidroxiapatita sintética.

Há duas teorias para explicar os mecanismos de conversão da hidroxiapatita em piromorfita. O primeiro segue a linha da dissolução/precipitação, onde a apatita pode prover fosfatos (MA, TRAIANA, LOGAN, 1993; MA et al., 1994a, MA, TRAIANA, LOGAN, 1994b, MA, LOGAN, TRAIANA, 1995; LAPERCHE et al., 1996; RUBY et al., 1996; LAPERCHE et al., 1997; CHEN et al., 1997; ZHANG, RYAN, YANG, 1998; ZHANG, RYAN, 1998; ZHANG, RYAN, 1999a, ZHANG, RYAN, 1999b). A reação principal segue a equação: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 14 \text{H}^+ \rightarrow 10\text{Ca}^{2+} + 6\text{H}_2\text{PO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O}$ (dissolução da hidroxiapatita) e $10\text{Pb}^{2+} + 6\text{H}_2\text{PO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 14\text{H}^+$ (precipitação da piromorfita). O segundo mecanismo segue a hipótese da troca de íons. O chumbo poderia ser absorvido primeiro na superfície da partícula de apatita e posteriormente, por difusão, haveria troca de cátions, o Ca^{2+} da apatita pelo Pb^{2+} (SUZUKI, ISHIGAKI, MIYAKE., 1984; MIYALKE, ISHIGAKI, SUZUKI, 1986; TAKEUCHI, ARAI, 1990; SHASHKOVA et al., 1999; SUGYIAMA et al., 1999). A reação seria: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + x\text{Pb}^{2+} \rightarrow (\text{Ca}_{10-x}\text{Pb}_x)(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + x\text{Ca}^{2+}$ (SHASHKOVA et al., 1999). SANDRINE et al. (2007) apresentaram resultados cinéticos, mostrando a entrada de chumbo na hidroxiapatita, formando o composto piromorfita, exemplificado por meio da fórmula $\text{Ca}_{10-x}\text{Pb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Entretanto, os mecanismos de ocorrência exatos deste processo permanecem incertos e constituem uma fonte potencial para novas pesquisas da área.

1.4 Resveratrol

Um potente agente antioxidante, antiinflamatório, cardioprotetor e anti-neoplásico é o resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), um composto polifenólico presente em uvas e no vinho tinto, que pode agir como um eliminador de espécies reativas de oxigênio (ROS) e quelador de ferro. O resveratrol pode inibir a ativação do sistema de fator nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) por meio da redução de espécies reativas de oxigênio. Em adição, o resveratrol apresenta um significativo efeito sobre o processo inflamatório, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias (FRÉMONT, 2000; BHAT, KOSMEDER, PEZZUTO, 2001; BAUR, SINCLAIR, 2006; DE JESUS SOARES et al., 2007). Ademais, esta substância pode aumentar a capacidade antioxidante do plasma por meio da modulação do sistema antioxidante endógeno (DO AMARAL et al., 2008).

Correlacionado ao tecido ósseo e cartilaginoso, o resveratrol é um potente mediador anabólico da homeostase da cartilagem do disco intervetebral bovino (*in vitro*), revelando um potencial efeito biológico na redução da progressão da degeneração intervertebral, podendo ser utilizado no tratamento de patologias ósseas, inibindo a regulação de alvos moleculares que respondem ao estresse oxidativo, proliferação e apoptose celular (LI et al., 2008). Além disso, foi provada sua ação protetora e reparadora em cartilagens pós-lesão. ELMALI et al. (2005) demonstraram a eficiência do resveratrol na redução da perda de cartilagem em joelhos de coelhos artríticos.

Foi atribuído ao resveratrol a prevenção da inibição induzida por dioxina da síntese do colágeno tipo 1, osteopontina, sialoproteínas ósseas e fosfatase alcalina. O resveratrol estimula a síntese de osteocalcina e a atividade proliferativa de células ósseas semelhantes a osteoblastos (RUCINSKI et al. 2006). MIZUTANI et al. (1998), analisando a ação do resveratrol sobre células MC3T3-E1 (linhagem de pré-osteoblastos de ratos, usada como modelo do osteoblasto na medula óssea em pesquisas *in vitro*), demonstraram um efeito de estimulação direto na proliferação e diferenciação de osteoblastos.

Ademais, independente do modo de ação do resveratrol sobre o metabolismo ósseo, há indicação na literatura que o uso de resveratrol é capaz de afetá-lo, impedindo o decréscimo da densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas. (MIZUTANI, IKEDA, KAWAI, 2000; LIU et al., 2005). LIU et al. (2005) observaram que o resveratrol pode aumentar a densidade mineral óssea, especialmente nas epífises, inibindo a redução de densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas. Os resultados indicam que o resveratrol pode prevenir a perda óssea causada pela ovariectomia, sugerindo um papel importante contra a osteoporose ou perda óssea pós-menopausal.

Além disso, ligando-se aos receptores de estrógeno, o resveratrol age como um superagonista, potencializando seus efeitos, diminuindo as concentrações de TNF- α , (fator cuja ação aumenta a osteoclastogênese e, conseqüentemente, a reabsorção óssea) (BHAT, KOSMEDER, PEZZUTO, 2001). Outra atuação para a redução da osteoclastogênese é sua ação sobre receptores RANKL (ligante do receptor ativador do NF- κ B) em células precursoras de osteoclastos, diminuindo a ativação de *Nuclear Factor κ B* (NF- κ B, ligante da família das células TNF), fator essencial para a diferenciação dos osteoclastos. (BOISSY et al., 2005).

Portanto, observamos que há evidências das quais o resveratrol atua como potente mediador do metabolismo ósseo, podendo promover benefícios ao tecido, o que torna sua aplicabilidade importante no estudo.

2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar os efeitos do tratamento com hidroxiapatita ou resveratrol em ratos adultos jovens contaminados com acetato de chumbo.

Específicos:

Avaliar em animais intactos, contaminados, contaminados tratados com hidroxiapatita e contaminados tratados com resveratrol:

- A eficácia da contaminação durante o período de tratamento proposto;
- Os parâmetros biomecânicos ósseos por meio do teste de flexão a três pontos para fêmures e de compressão vertebral para as quintas vértebras lombares;
- Os parâmetros biométricos ósseos (fêmures e vértebras);
- Os parâmetros biofísicos ósseos (fêmures e vértebras);
- Os parâmetros microtomográficos ósseos (vértebras);
- Os parâmetros de densidade radiográfica (vértebras);
- Os parâmetros bioquímicos por meio da verificação das concentrações ósseas de cálcio (fêmures e vértebras);
- As concentrações de Pb por meio da Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (fêmures e plasma sanguíneo);
- A atividade proteolítica do extrato de tecido ósseo para metaloproteinases (tíbias).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelos do Estudo

Neste estudo experimental o modelo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos: Protocolo CEEA n°. 054/2009 (anexo 1).

3.2 Animais

Foram utilizados neste experimento, 48 ratos intactos da linhagem “Wistar” (*Rattus norvegicus albinus*), do gênero masculino, com 4 meses de idade, 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. Os ratos 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 ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$), alimentação com ração comercial e água “*ad libitum*”.

3.3 Protocolo Experimental

Para análise dos efeitos do acetato de chumbo - $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$ - sobre variáveis ósseas, distribuí-se aleatoriamente os animais nos grupos experimentais:

- Grupo Controle: 8 animais intactos tratados com salina 0,9% (0,1ml/100g MC), com o intuito de simulação da contaminação.

- Grupo Hidroxiapatita: 8 animais intactos tratados com hidroxiapatita (Sigma Aldrich[®]) (100mg/kg MC, administrados na concentração de 0,1ml/100g MC).

- Grupo Contaminado: 8 animais intactos contaminados com Acetato de Chumbo (Sigma Aldrich[®]) (250mg/kg MC, administrados na concentração de 0,25ml/100g MC).

- Grupo Contaminado + Hidroxiapatita: 8 animais intactos contaminados com Acetato de Chumbo e tratados com hidroxiapatita (250mg/kg MC, administrados na concentração de 0,25ml/100g MC e 100mg/kg MC, administrados na concentração de 0,1ml/100g MC, respectivamente).

- Grupo Contamiando + Resveratrol: 8 animais intactos contaminados com Acetato de Chumbo e tratados com resveratrol Sigma (Aldrich[®]) (250mg/kg MC, administrados na concentração de 0,25ml/100g MC e 0,7mg/kg MC, administrados na concentração de 0,07ml/100g MC, respectivamente).

- Grupo DMSO: 8 animais intactos tratados com uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO - AMRESCO[®]) e Salina a 0,9% (0,1ml/100g MC, a partir de solução salina e DMSO 1:1).

A dose selecionada para contaminação dos animais (250 mg/kg MC) foram derivadas da dose máxima para ratos (500 mg/kg MC) determinada pela literatura (ÇELIK, OGENLER, ÇOMELEKOGLU, 2005), com o objetivo de simular os níveis de exposição ambientais diárias ao chumbo (ÇELIK, OGENLER, ÇOMELEKOGLU, 2005; ESCRIBANO et al, 1997). As doses utilizadas de hidroxiapatita e resveratrol foram baseadas na literatura (ARNICH et al., 2003; LIU et al., 2005). A administração da salina, do acetato de chumbo e da hidroxiapatita foi realizada pelo método da gavagem gástrica (ÇELIK, OGENLER, ÇOMELEKOGLU, 2005; FAZAKAS, LENGYEL, NAGYMAJTÉNYI, 2005), uma vez na semana por um período de 8 semanas. O resveratrol e o DMSO foram administrados com injeções intraperitoneais devido a melhor absorção orgânica evidenciada na literatura (DO AMARAL et al., 2008), 5 vezes por semana por um período de 8 semanas. O veículo (DMSO) utilizado em conjunto com o resveratrol foi determinado segundo o estudo de KUPISIEWICZ et. al. (2010).

3.4 Eutanásia

Após oito semanas da administração de salina, acetato de chumbo, hidroxiapatita, resveratrol e DMSO segundo o delineamento experimental, realizou-se decapitação dos animais, com subsequente coleta de sangue (diretamente do tronco do rato) e dissecações femorais e vertebrais, para coleta do material ósseo (fêmures, tíbias e vértebras), os quais foram mantidos em solução de salina 0,9% a -20°C ou -80°C para as subseqüentes análises.

3.5 Parâmetros Analisados

3.5.1 Parâmetros Biomecânicos

Por meio do teste de flexão a três pontos, as propriedades biomecânicas dos fêmures direito foram mensuradas utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444 (Figura 1), 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, distanciados em 21,70 mm e a região central (das diáfises) dos ossos foi selecionada para a aplicação da carga (ROBLING, TURNER, 2002; SHIMANO, SHIMANO, VOLPON, 2002; AKHTER et al., 2003; AKHTER et al, 2004).

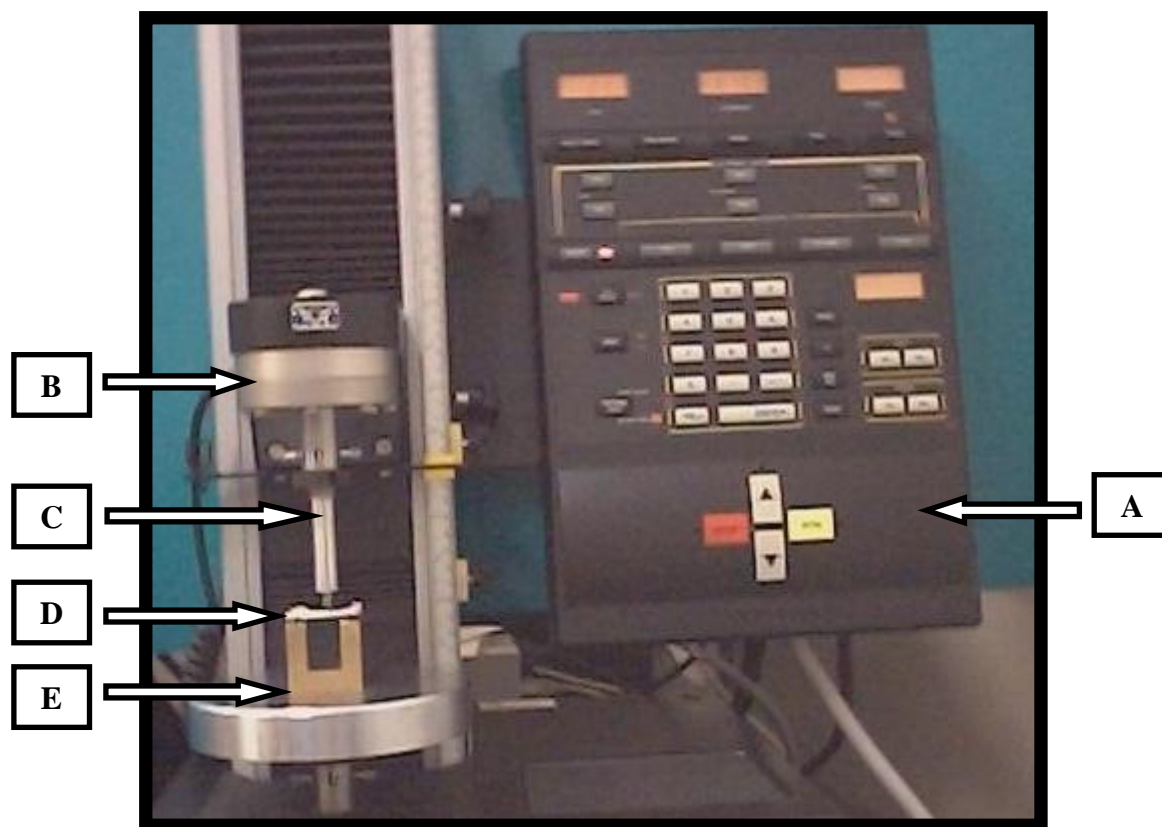


Figura 1: Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos. **A:** painel de controle; **B:** célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); **C:** haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); **D:** osso (fêmur de rato); **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, aplicou-se 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 0,5 cm/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 2). Da análise das curvas obtiveram-se as seguintes propriedades biomecânicas: deformação (deslocamento) máxima, deformação (deslocamento) no ponto da fratura, carga (força) máxima e carga (força) de fratura, 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 ela foi dissecada de suas partes moles e os processos transversos, espinhosos e arcos vertebrais foram retirados, obtendo ao final o corpo vertebral. As extremidades das vértebras foram aplainadas para obtenção de uma superfície plana e paralela para o ensaio.

No início do teste, aplicou-se uma pré-carga de 10 N para estabilização e fixação das quintas vértebras lombares (SAMNERGARD, AKHTER, RECKER, 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) (MOSEKILDE, DANIELSEN, KNUDSEN, 1993; KATSUMATA et al., 1995; IKEDA et al., 2001).

Os resultados dos ensaios foram registrados pelo software Instron Series IX na forma gráfica, gerando uma curva: carga x deformação (Figura 2). Da análise das curvas foram obtidas as seguintes propriedades biomecânicas: carga (força) máxima, resiliência, tenacidade e rigidez.

Deformações (mm)

Corresponde a distância movida pelo cilindro de carga registrada pelo equipamento: no limite elástico, no ponto de carga máxima e de fratura (D_1 , D_2 e D_3 respectivamente, na figura 2).

Carga no Limite Elástico (N)

Corresponde a carga que separa a fase elástica da plástica (C_1 , na figura 2). 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_2 , na figura 2).

Carga de Fratura (N)

Corresponde a carga aplicada no momento da fratura da amostra (fêmur) ao longo do ensaio (C_3 , na figura 2).

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.

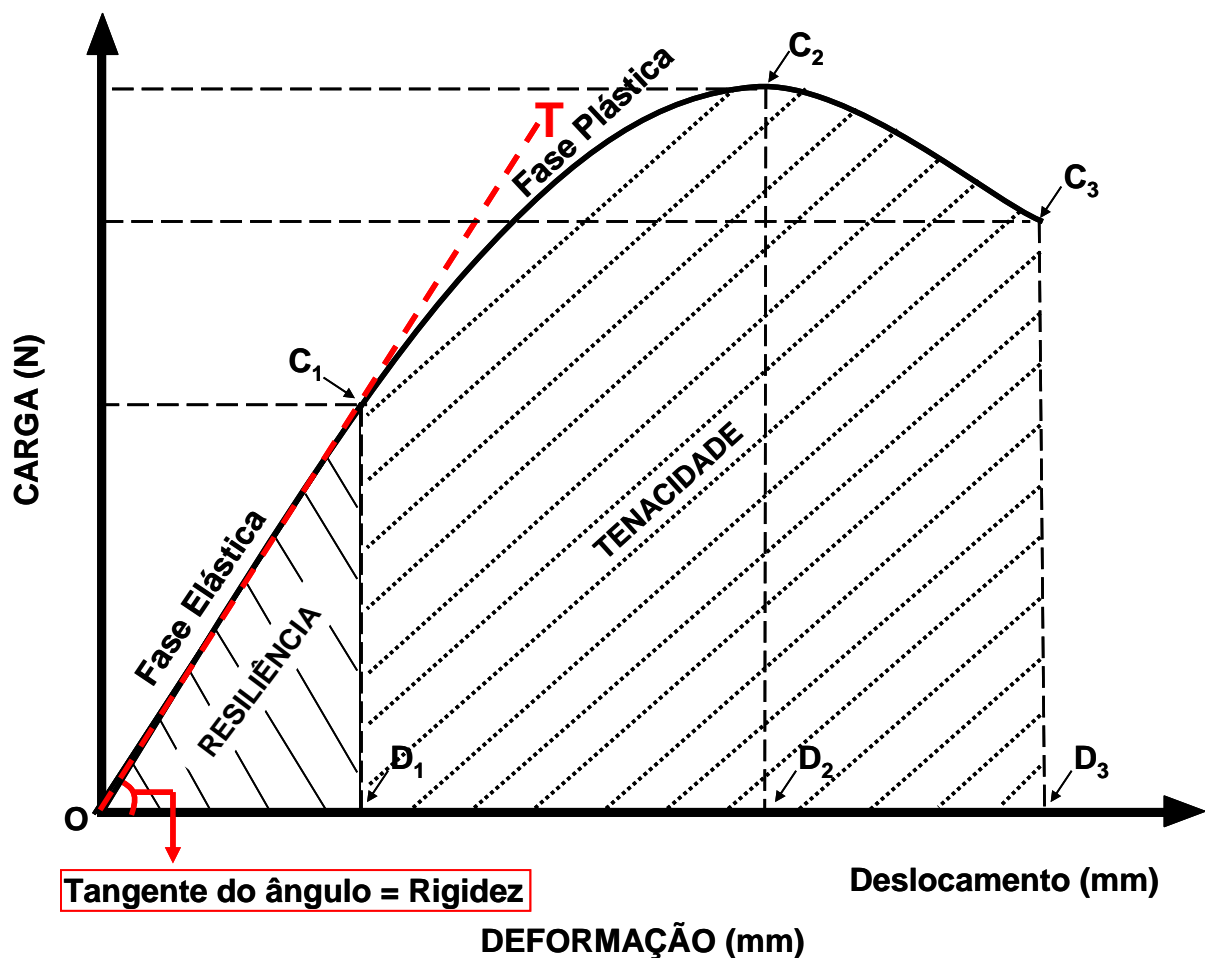


Figura 2: Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas: C₁: Carga no Limite Elástico; D₁: Deformação (deslocamento) no Limite Elástico; C₂: Carga Máxima; D₂: Deformação (deslocamento) na Carga Máxima; C₃: Carga de Fratura; D₃: Deformação (deslocamento) na Carga de Fratura (máxima); O/C₁/D₁: a área desta região corresponde a Resiliência (a energia absorvida na fase elástica); O/C₃/D₃: a área desta região corresponde à tenacidade (energia absorvida até o ponto de ruptura); T: tangente da região O/C₁ da curva, sendo o ângulo desta correspondente a Rigidez.

3.5.2 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).

3.5.3 Parâmetros Biofísicos

Após a verificação dos parâmetros biométricos dos fêmures 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) 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 desidratação 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 na temperatura de 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 (Chiyo[®]).

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

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

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

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

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100 \times (P_u - P_s)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100 \times (P_s - P_m)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100 \times P_m}{P_u}$$

Onde:

P_u = peso úmido ósseo

P_s = peso ósseo da amostra desidratada

P_i = peso imerso ósseo

P_m = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

3.5.4 Parâmetros Microtomográficos Ósseos

Os parâmetros microtomográficos foram obtidos por meio da análise das imagens de duas vértebras (sextas vértebras lombares - L6) escolhidas aleatoriamente para cada grupo experimental. Estas imagens foram geradas pelo microtomógrafo marca SkyScan[®] modelo 1172, localizado na Embrapa – Instrumentação Agropecuária, São Carlos -SP.

Após a obtenção, as imagens geradas foram analisadas pelos softwares CTAn[®] e CTVol[®]. Os parâmetros obtidos foram: número de trabéculas, espessura trabecular e espaço entre trabéculas.

3.5.5 Densidade Radiográfica

Para determinação da densidade radiográfica, foram realizadas tomadas radiográficas das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais, as quais foram digitalizadas acoplado a adaptador para transparências. Como referencial densitométrico nas tomadas radiográficas foi utilizada escada de alumínio (liga 6063, ABNT) de nove degraus, colocada próxima às vértebras, na direção do feixe principal dos Raios X (LOUZADA, et al., 1998a; LOUZADA, et al., 1998b).

O software Image J[®] foi utilizado para contornar toda a região de interesse, utilizando recurso de definição de área do programa, e, assim, determinar o nível de densidade média, em tons de cinza (até 256 níveis), das vértebras e dos degraus da escada de alumínio. Os valores das vértebras foram convertidos para valores relativos à espessura em milímetros de alumínio (LOUZADA, et al. 1998a; LOUZADA, et al. 1998b), obedecendo as etapas descritas por LOUZADA (2009). Desta maneira, a densidade óssea foi expressa em equivalente de alumínio (mmAl).

Os valores de densidade radiográfica foram convertidos para valores de espessura com o auxílio do computador e, assim, a densidade passou a ser expressa em equivalentes de milímetros de alumínio. Para tanto os dados foram levados à planilha Excel e passaram pelas seguintes etapas como descrito por LOUZADA (2009): 1) Determinou-se o valor da Densidade Radiográfica (DR) da Região de Interesse (RDI); 2) Utilizando-se como referência o valor de DR da etapa 1 definiram-se 3 degraus da escada de alumínio, que foram usados como referência densitométrica, cujos valores de DRs contemplavam o da etapa 1; 3) Com os valores de espessura e DR dos 3 degraus da etapa 2 construiu-se um gráfico com a planilha Excel; 4) Com ferramentas do Excel definiu-se a melhor curva que se ajustava aos pontos do gráfico (polinômio do 3º grau). O programa forneceu a equação de ajuste; 5) Utilizando-se a equação de ajuste da etapa 4 fez-se a substituição do valor de X pela DR da RDI (etapa 1) e determinou-se assim a espessura equivalente em mmAl para aquele objeto em estudo.

As análises foram realizadas na Universidade Estadual Paulista - UNESP, faculdade de medicina veterinária, no departamento do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Araçatuba - SP.

3.5.6 Propriedades Bioquímicas

Conteúdo de Cálcio do Fêmur Direito e da Quinta Vértebra Lombar

Com a obtenção do material mineral dos fêmures direitos e das quintas vértebras lombares, realizou-se solubilização em ácido clorídrico 2N. Posteriormente, por meio de ensaio colorimétrico o conteúdo de cálcio dos ossos foram determinados, com a utilização do kit comercial específico Labtest[®].

3.5.7 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

Para determinação das concentrações de chumbo foi realizado espectrometria de absorção atômica com chama (EAAC) nos fêmures esquerdos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Inicialmente os ossos foram liofilizados por 24 horas. Subseqüentemente, foram triturados por um triturador criogênico em dois ciclos de 9 minutos cada. Em seguida, retirou-se 0,2 gramas por amostra e adicionou-se aos tubos de ensaio, 3 ml da solução HNO_3 7,0 mol l^{-1} e 1 ml de H_2O_2 30 % v v⁻¹. Por conseguinte, foi realizada digestão desta solução no aparelho microondas e diluição em 10 ml de água deionizada, conseqüentemente deixando as amostras prontas para a leitura. As análises foram realizadas no Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Botucatu.

3.5.8 Zimografia de Gelatina

Os procedimentos para determinação da atividade de metaloproteinases das tíbias esquerdas foram realizados segundo protocolo estabelecido por MARQUETI et al. (2008) e adaptado para esse estudo. Com a limpeza da tíbia, foi realizada a remoção do tecido periférico (células musculares e demais membranas visíveis) e 100 mg do terço proximal da tíbia (abaixo da epífise de crescimento) foi macerado em nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em 1,5 ml de tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 M NaNO_3 e 0,01% de Triton X-100] a 4 °C por um período de 24 horas. Após este tempo o tampão de extração foi coletado por centrifugação (20 minutos, 4°C em 13.000 rpm). As amostras foram concentradas de maneira que cada poço do gel de zimografia tinha 10 µg de proteína e 10 µl de tampão de amostra sem β-mercapto (agente

reduzidor), totalizando 20 µl de solução por poço. As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de policriamida contendo SDS e gelatina na concentração final de 2mg/ml. Após a corrida, o gel foi lavado uma vez durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. O gel foi incubado no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl₂ mM e NaN₃ 0,02%), a 37°C, durante 20 horas. Após este tempo, os géis foram corados com Coomassie Blue Brilliant R-250 (Bio-Rad®) por 1 h e 30 minutos e descorados posteriormente com ácido acético: metanol: água (1:4:5, v: v: v) para visualização das áreas de atividade. A atividade gelatinolítica foi visualizada como faixas claras no gel corado. Os géis foram fotografados com uma câmera Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels (Virginia, USA). As médias de intensidade de banda foram mensuradas por meio do software Gene Tools® (Philmath, OR, USA). Foi utilizado o software “Kodak Digital Science 1D” para fotografar o gel e visualizar a atividade proteolítica das bandas. Os dados foram expressos como a concentração da MMP-2 (ou seja, a totalidade da densidade óptica integrada para a MMP-2 pró-enzima, intermediária e ativo). As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

3.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos em cada grupo (média ± desvio padrão - D.P.) foram comparados entre si por meio do teste paramétrico One Way Anova e o teste de comparações múltiplas Bonferroni. Toda análise foi realizada por meio do software GraphPad Prism® adotando-se um nível de significância menor que 5% (p<0,05).

3.7 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 agosto de 2002, 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

Nas figuras 3 e 4 estão expressos os valores de massa corporal (g) inicial, final e o ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: controle, hidroxiapatita, contaminado, contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO durante as 8 semanas de tratamento. Na figura 3 observa-se que não houve diferenças entre os grupos experimentais para nenhum dos parâmetros descritos. Entretanto na figura 4 observa-se que a massa corporal final do grupo contaminado foi menor em relação ao grupo DMSO e o ganho de massa corporal do grupo contaminado apresentou-se menor em relação ao grupo contaminado + resveratrol.

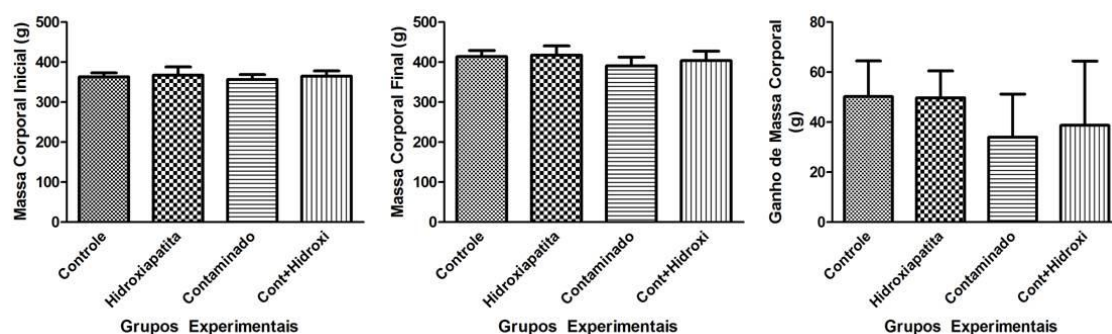


Figura 3: Representação gráfica dos valores de massa corporal (g) inicial, final e ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão; $p < 0,05$.

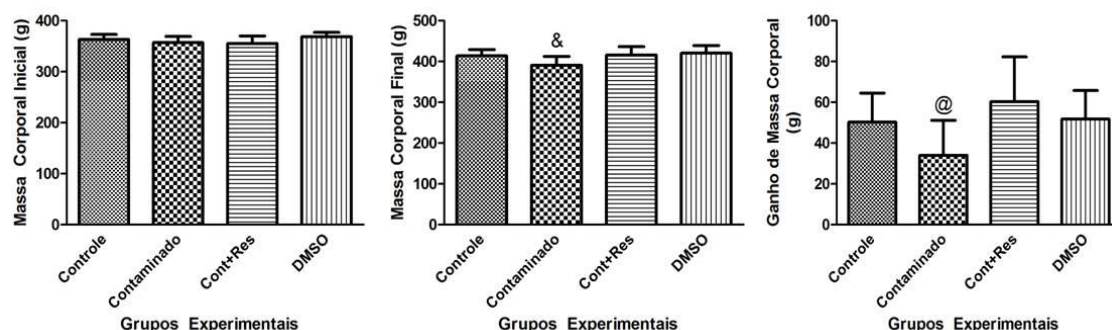


Figura 4: Representação gráfica dos valores de massa corporal (g) inicial, final e ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO, $p < 0,05$;

Nas tabelas 1 e 2 encontram-se apresentados os valores médios com seus respectivos desvios padrões da massa corporal (g) inicial, final e ganho de massa corporal dos diferentes grupos experimentais: controle, hidroxiapatita, contaminado, contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO.

Tabela 1: Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
M.C. Inicial (g)	364 ± 9,67	368 ± 20,49	357 ± 12,09	365 ± 12,87
M.C. Final (g)	414 ± 15,47	418 ± 23,27	391 ± 21,59	404 ± 23,81
Ganho M.C. (g)	50 ± 14,28	49 ± 10,77	34 ± 17,24	38 ± 25,66

Média ± DP; () = n°. animais.

Tabela 2: Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
M.C. Inicial (g)	364 ± 9,67	357 ± 12,09	355 ± 14,80	368,8 ± 8,48
M.C. Final (g)	414 ± 15,47	391 ± 21,59 ^{&}	416 ± 20,52	420,5 ± 18,97
Ganho M.C. (g)	50 ± 14,28	34 ± 17,24 [@]	60 ± 21,96	52 ± 14,08

Média ± DP; p<0,05: @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; () = n°. animais

4.2 Parâmetros Biomecânicos

4.2.1 Parâmetros Biomecânicos Fêmures

Nas figuras 5 e 6 estão expressos, respectivamente, os parâmetros biomecânicos: carga máxima (N), rigidez (N/mm), carga no momento da fratura (N), tenacidade (J), resiliência (J), deslocamento máximo (mm), e deslocamento no ponto da fratura (mm), mensurados por meio do ensaio biomecânico, dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais

(controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO).

Houve redução dos valores de carga máxima (N), figura 5, do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais (controle, hidroxiapatita e contaminado + hidroxiapatita). Ademais houve redução dos valores de rigidez (N/mm), figura 5, do grupo contaminado em relação aos grupos experimentais controle e contaminado + hidroxiapatita. Ainda, é importante ressaltar que os parâmetros carga máxima (N) e rigidez (N/mm), figura 5, não apresentaram diferenças entre os grupos contaminado + hidroxiapatita e controle. Para os parâmetros carga no momento da fratura (N), tenacidade (J), resiliência (J), deslocamento máximo (mm), e deslocamento no ponto da fratura (mm), figura 5, não houve diferenças entre os grupos.

Na figura 6, verifica-se redução da carga máxima (N) do grupo contaminado em relação aos grupos experimentais controle e contaminado + resveratrol. Ademais houve redução dos valores de rigidez (N/mm), figura 6, do grupo contaminado em relação aos grupos experimentais controle e DMSO. Ainda, os parâmetros carga máxima (N) e rigidez (N/mm), figura 6, não foram diferentes entre os grupos contaminado + resveratrol e controle. Para os parâmetros carga no momento da fratura (N), tenacidade (J), resiliência (J), deslocamento máximo (mm), e deslocamento no ponto da fratura (mm), figura 6, não houve diferenças entre os grupos.

Nas tabelas 3 e 4 encontram-se apresentados os valores médios com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

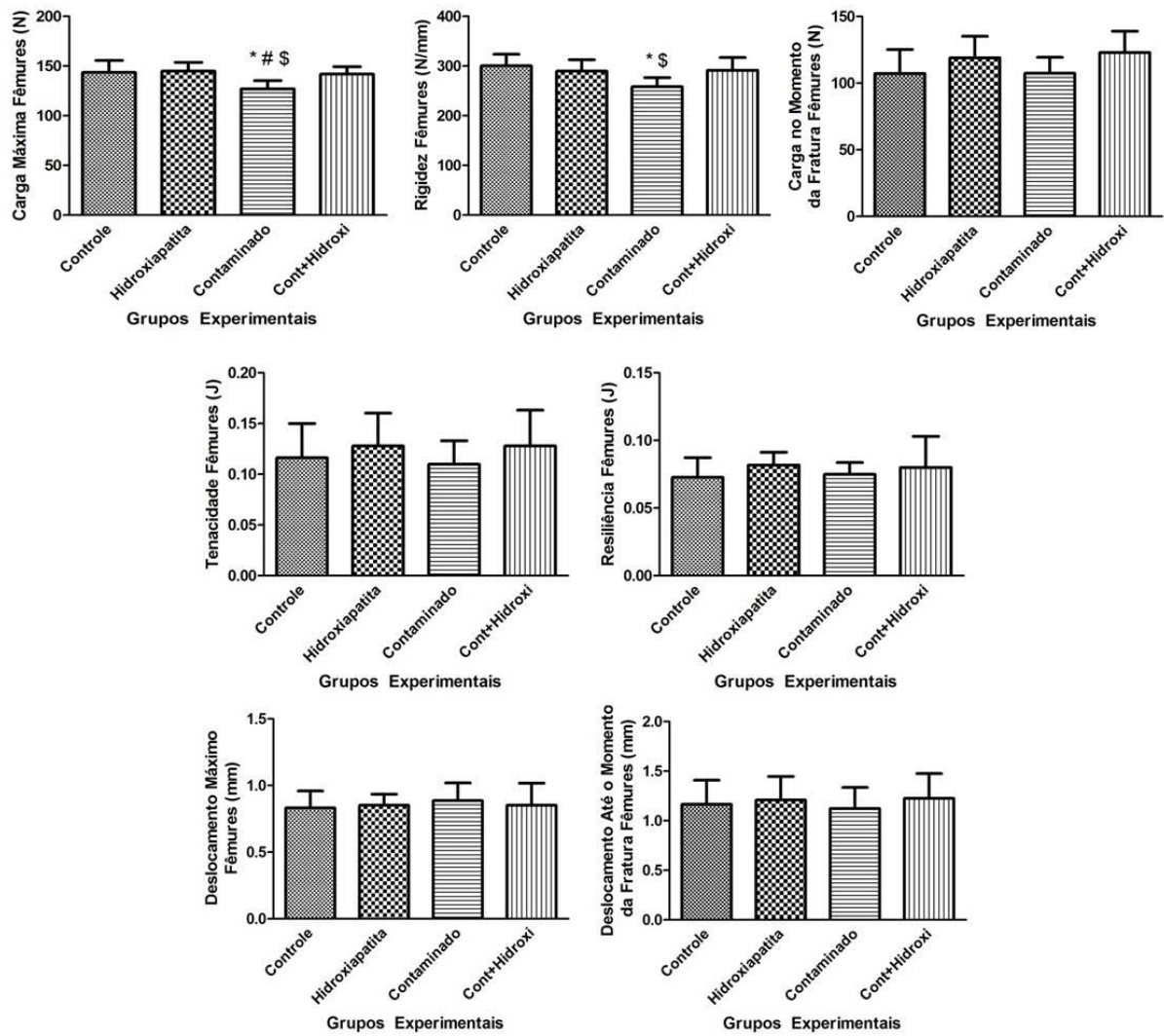


Figura 5: Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; $p < 0,05$.

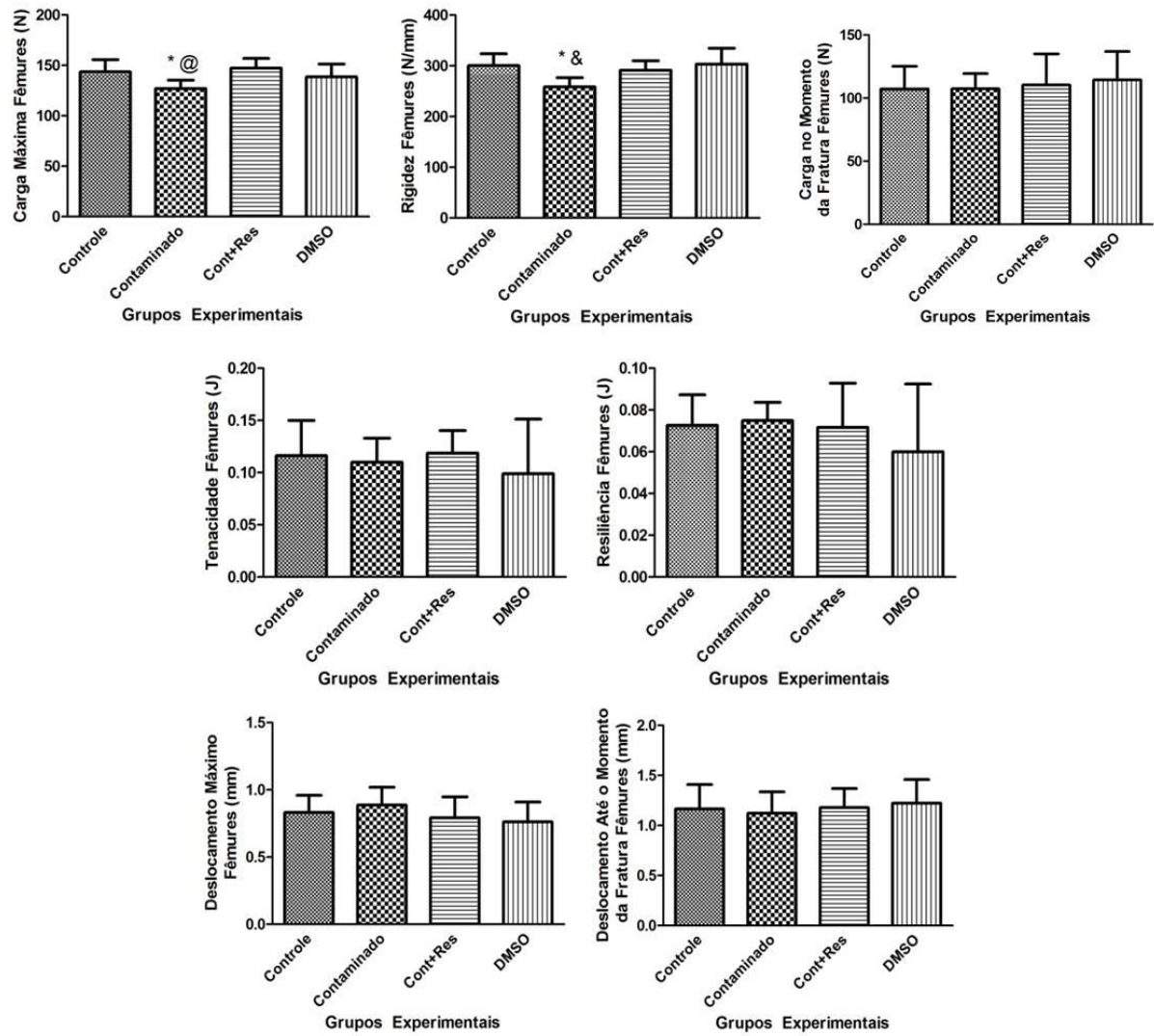


Figura 6: Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; $p < 0,05$.

Tabela 3: Valores de parâmetros biomecânicos: Carga Máxima (N), Rigidez (N/mm), Carga da fratura (N), Tenacidade (J), Resiliência (J), Deslocamento Máximo (mm) e Deslocamento no Ponto da Fratura (mm) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
C. Máxima (N)	143,6 ± 12,08	145,0 ± 8,72	127,1 ± 8,33 ^{*#}	141,9 ± 7,51
Rigidez (N/mm)	300,6 ± 23,37	289,9 ± 22,95	258,4 ± 18,52 ^{*\$}	291,14 ± 25,88
C. Fratura (N)	107,3 ± 18,01	119,1 ± 16,14	107,4 ± 12,10	123,0 ± 16,09
Tenacidade (J)	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,04
Resiliência (J)	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,02
D. Máximo (mm)	0,83 ± 0,13	0,85 ± 0,08	0,89 ± 0,13	0,85 ± 0,17
D. Fratura (mm)	1,17 ± 0,24	1,21 ± 0,24	1,12 ± 0,21	1,22 ± 0,25

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; () = n°. animais.

Tabela 4: Valores de parâmetros biomecânicos: Deslocamento no Ponto da Fratura (mm), Força Máxima (N), Rigidez (N/mm), Tenacidade (J), Deslocamento Máximo (mm) Resiliência (J) e Carga da fratura (N) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
C. Máxima (N)	143,6 ± 12,08	127,1 ± 8,33 ^{*@}	147,4 ± 9,55	138,5 ± 12,93
Rigidez (N/mm)	300,6 ± 23,37	258,4 ± 18,52 ^{*&}	291,6 ± 18,66	303,5 ± 31,49
C. Fratura (N)	107,3 ± 18,01	107,4 ± 12,10	110,4 ± 24,62	114,4 ± 22,52
Tenacidade (J)	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,05
Resiliência (J)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,03
D. Máximo (mm)	0,83 ± 0,13	0,89 ± 0,13	0,79 ± 0,15	0,76 ± 0,14
D. Fratura (mm)	1,17 ± 0,24	1,12 ± 0,21	1,18 ± 0,19	1,22 ± 0,23

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; () = n°. animais

4.2.2 Parâmetros Biomecânicos Vértébras

Nas figuras 7 e 8 estão expressos, respectivamente, os valores de parâmetros biomecânicos: carga máxima (N), rigidez (N/mm), deslocamento máximo (mm), tenacidade (J), resiliência (J), mensurados por meio do ensaio biomecânico, das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO).

Na figura 7, pode-se verificar redução da carga máxima (N) e tenacidade (J), do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais (controle, contaminado + resveratrol e DMSO). Para os parâmetros rigidez (N/mm), deslocamento máximo (mm) e resiliência (J), figura 7, não houve diferença.

Na figura 8, pode-se verificar redução da carga máxima (N), do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais (controle, contaminado + resveratrol e DMSO). Ademais, houve redução dos valores de rigidez (N/mm), figura 8, do grupo contaminado e do grupo contaminado + resveratrol em relação ao grupo DMSO; redução dos valores de

deslocamento máximo do grupo contaminado em relação ao grupo contaminado + resveratrol e do grupo contaminado + resveratrol em relação ao grupo DMSO e redução dos valores de tenacidade dos grupos contaminado e DMSO em relação ao grupo controle. Para o parâmetro resiliência (J), figura 8, não houve diferença entre os grupos. Ainda, é importante ressaltar que em todos os parâmetros biomecânicos, figura 8, não houve diferença entre os grupos contaminado + resveratrol e controle.

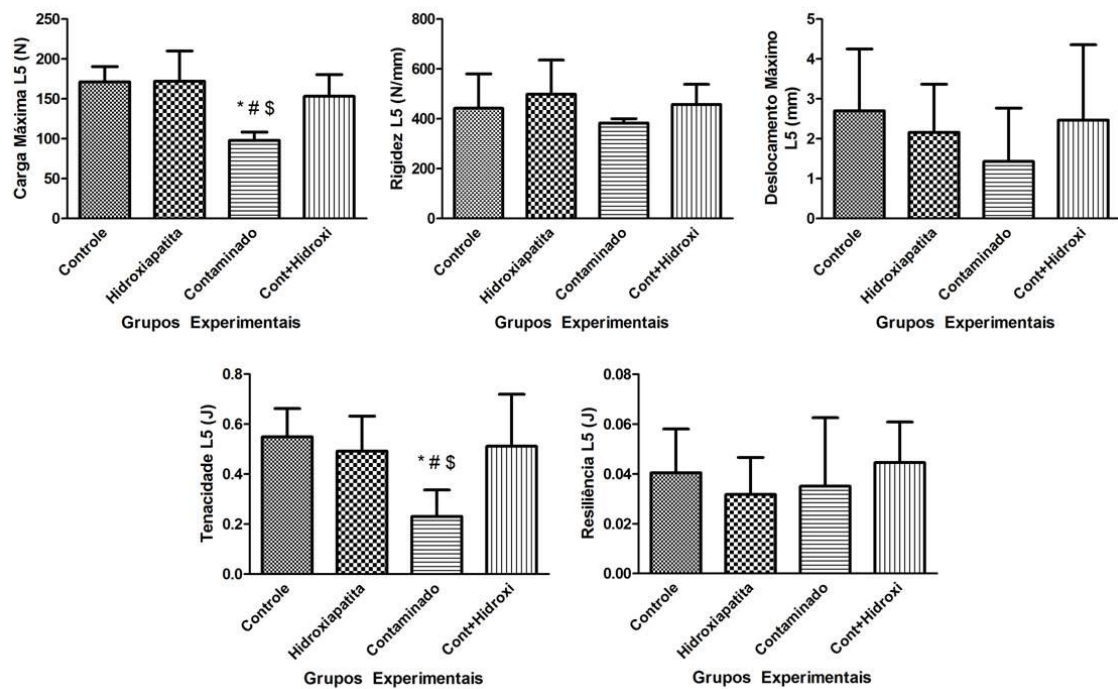


Figura 7: Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; $p < 0,05$.

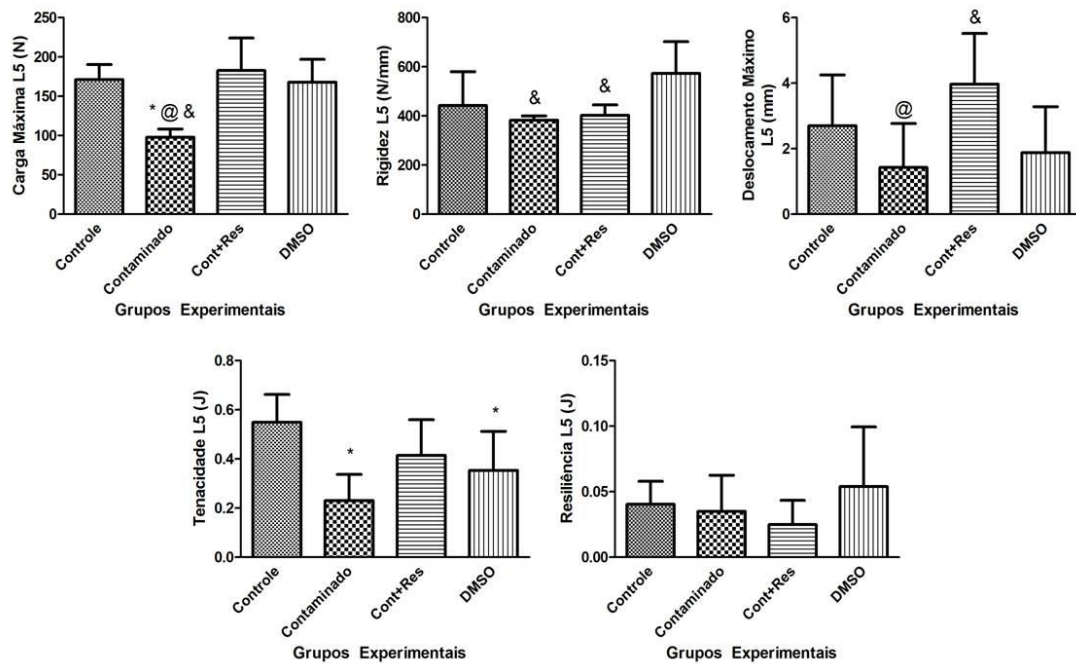


Figura 8: Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; $p < 0,05$.

Nas tabelas 5 e 6 encontram-se apresentadas os valores médios, com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 5: Valores de parâmetros biomecânicos: Deslocamento Máximo (mm), Carga Máxima (N), Rigidez (N/mm), Tenacidade (J) e Resiliência (J) das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
C. Máxima (N)	171,3 \pm 36,49	172,1 \pm 46,81	98,1 \pm 10,31 ^{*#}	153,3 \pm 27,23
Rigidez (N/mm)	442,1 \pm 70,78	498,9 \pm 110,38	382,7 \pm 17,63	458,0 \pm 80,38
D. Máximo (mm)	2,701 \pm 2,81	2,160 \pm 0,01	1,430 \pm 1,34	2,469 \pm 1,89
Tenacidade (J)	0,5498 \pm 0,08	0,4926 \pm 0,18	0,2312 \pm 0,11 ^{*#}	0,5115 \pm 0,21
Resiliência (J)	0,0405 \pm 0,02	0,0317 \pm 0,02	0,0351 \pm 0,03	0,0445 \pm 0,02

Média \pm DP; $p < 0,05$: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; () = n^o. animais.

Tabela 6: Valores de parâmetros biomecânicos: Deslocamento Máximo (mm), Carga Máxima (N), Rigidez (N/mm), Tenacidade (J) e Resiliência (J) das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
C. Máxima (N)	171,3 ± 36,49	98,1 ± 10,31 ^{*@&}	182,9 ± 41,18	168,0 ± 29,07
Rigidez (N/mm)	442,1 ± 70,78	382,7 ± 17,63 ^{&}	403,10 ± 41,7 ^{&}	573,8 ± 128,5
D. Máximo (mm)	2,701 ± 2,81	1,430 ± 1,34 [@]	3,970 ± 1,55 ^{&}	1,889 ± 1,40
Tenacidade (J)	0,5498 ± 0,08	0,2312 ± 0,11 [*]	0,4151 ± 0,14 [*]	0,3537 ± 0,16
Resiliência (J)	0,0405 ± 0,02	0,0351 ± 0,03	0,0250 ± 0,01	0,0539 ± 0,04

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; () = n°. animais.

4.3 Parâmetros Biométricos

4.3.1 Parâmetros Biométricos dos Fêmures

Nas figuras 9 e 10 estão expressos, respectivamente, os valores de parâmetros biométricos: comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises femorais em milímetros (mm) e pesos úmido, imerso, seco e das cinzas em gramas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO).

Houve redução dos valores comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises femorais (mm), figura 9, do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais (controle, hidroxiapatita e contaminado + hidroxiapatita). Ademais ocorreu redução dos valores dos pesos úmido, imerso, seco e das cinzas (g), figura 9, do grupo contaminado em relação aos grupo hidroxiapatita. Ainda, é importante ressaltar que em todos os parâmetros, figura 9, não houve diferença entre os grupos contaminado + hidroxiapatita e controle.

Na figura 10, verificamos redução do comprimento e diâmetro menor (mm), do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais controle, contaminado + resveratrol e DMSO, sendo que também houve redução do diâmetro menor dos grupos contaminado + resveratrol e DMSO em relação ao controle. Ademais houve redução dos valores do diâmetro

maior (mm), figura 10, do grupo contaminado em relação aos grupos experimentais controle e contaminado + resveratrol. Ainda para os parâmetros peso úmido, imerso e seco (g) houve redução dos valores do grupo contaminado em relação ao grupo contaminado + resveratrol, e DMSO, respectivamente. Para os parâmetros peso das cinzas (g), figura 10, não houve diferença entre os grupos.

Nas tabelas 7 e 8 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

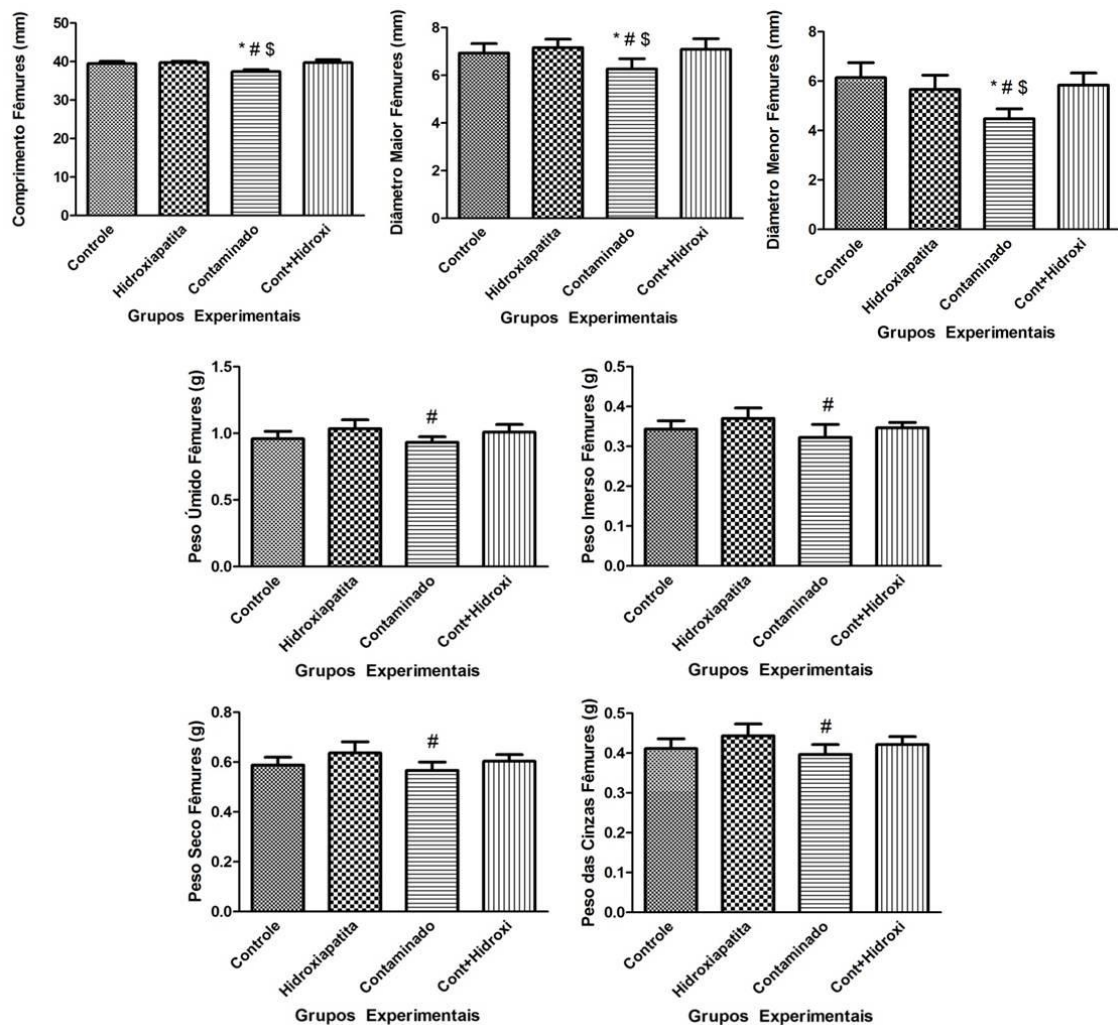


Figura 9: Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; $p < 0,05$.

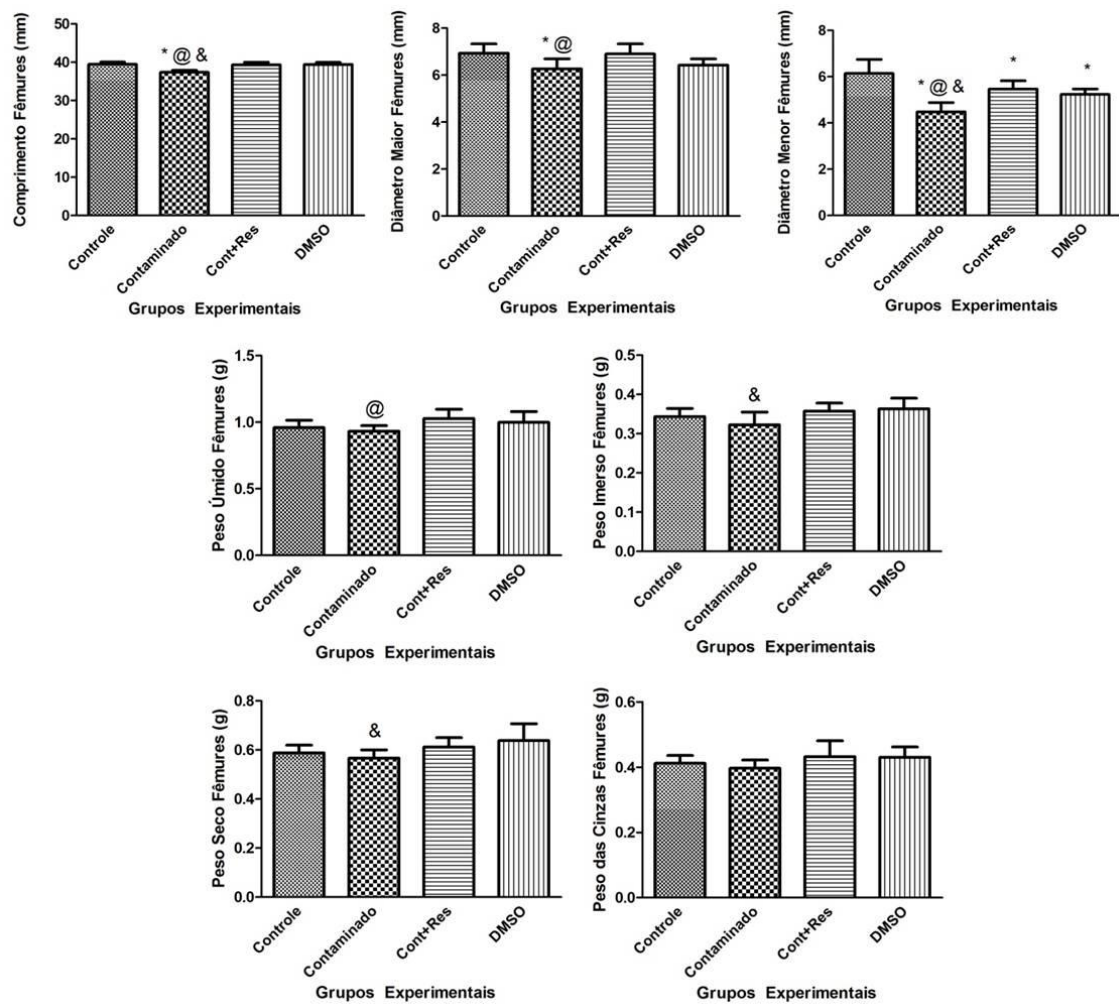


Figura 10: Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; $p < 0,05$.

Tabela 7: Valores de Comprimento, Diâmetros Maior e Menor das diáfises femorais em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das Cinzas em gramas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
Compr. (mm)	39,48 ± 0,58	39,74 ± 0,36	37,39 ± 0,54 ^{*#}	39,72 ± 0,76
D. Maior (mm)	6,94 ± 0,39	7,16 ± 0,35	6,27 ± 0,43 ^{*#}	7,09 ± 0,45
D. Menor (mm)	6,14 ± 0,61	5,66 ± 0,58	4,48 ± 0,40 ^{*#}	5,84 ± 0,49
P. Úmido (g)	0,9588 ± 0,06	1,0355 ± 0,07	0,9336 ± 0,04 [#]	1,0099 ± 0,06
P. Imerso (g)	0,3436 ± 0,02	0,3703 ± 0,03	0,3228 ± 0,03 [#]	0,3469 ± 0,01
P. Seco (g)	0,5883 ± 0,03	0,6370 ± 0,04	0,5671 ± 0,03 [#]	0,6034 ± 0,03
P. das Cinzas (g)	0,4116 ± 0,02	0,4435 ± 0,03	0,3968 ± 0,02 [#]	0,4216 ± 0,02

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; () = n°. animais.

Tabela 8: Valores de Comprimento, Diâmetros Maior e Menor das diáfises femorais em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das Cinzas em gramas (g), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
Compr. (mm)	39,48 ± 0,58	37,39 ± 0,54 ^{*@&}	39,34 0,66	39,45 0,54
D. Maior (mm)	6,94 ± 0,39	6,27 ± 0,43 ^{*@}	6,90 ± 0,43	6,43 ± 0,26
D. Menor (mm)	6,14 ± 0,61	4,48 ± 0,40 ^{*@&}	5,47 ± 0,35 [*]	5,24 ± 0,23 [*]
P. Úmido (g)	0,9588 ± 0,06	0,9336 ± 0,04 [@]	1,028 ± 0,07	0,9995 ± 0,08
P. Imerso (g)	0,3436 ± 0,02	0,3228 ± 0,03 ^{&}	0,3578 ± 0,02	0,3637 ± 0,03
P. Seco (g)	0,5883 ± 0,03	0,5671 ± 0,03 ^{&}	0,6123 ± 0,04	0,6384 ± 0,07
P. das Cinzas (g)	0,4116 ± 0,02	0,3968 ± 0,02	0,4325 ± 0,05	0,4304 ± 0,03

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; () = n°. animais.

4.3.2 Parâmetros Biométricos Vértébras

Nas figuras 11 e 12 estão expressos, respectivamente, os valores de parâmetros biométricos: altura, pesos úmido, imerso, seco e das cinzas em gramas (g), das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO). Para todos os parâmetros biométricos, figura 11, não houve diferença entre os grupos experimentais.

Na figura 12, verificamos uma altura (mm) menor das quintas vértebras lombares, do grupo contaminado em relação aos grupos experimentais contaminado + resveratrol e DMSO, e aumento dos valores do grupo contaminado + resveratrol em relação aos grupos controle e DMSO e redução dos valores do grupo DMSO em relação ao controle. Ademais houve redução dos valores de peso úmido do grupo contaminado em relação ao grupo contaminado + resveratrol. Para os parâmetros peso imerso, seco e das cinzas (g), figura 12, não houve diferença entre os grupos.

Nas tabelas 9 e 10 encontram-se apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

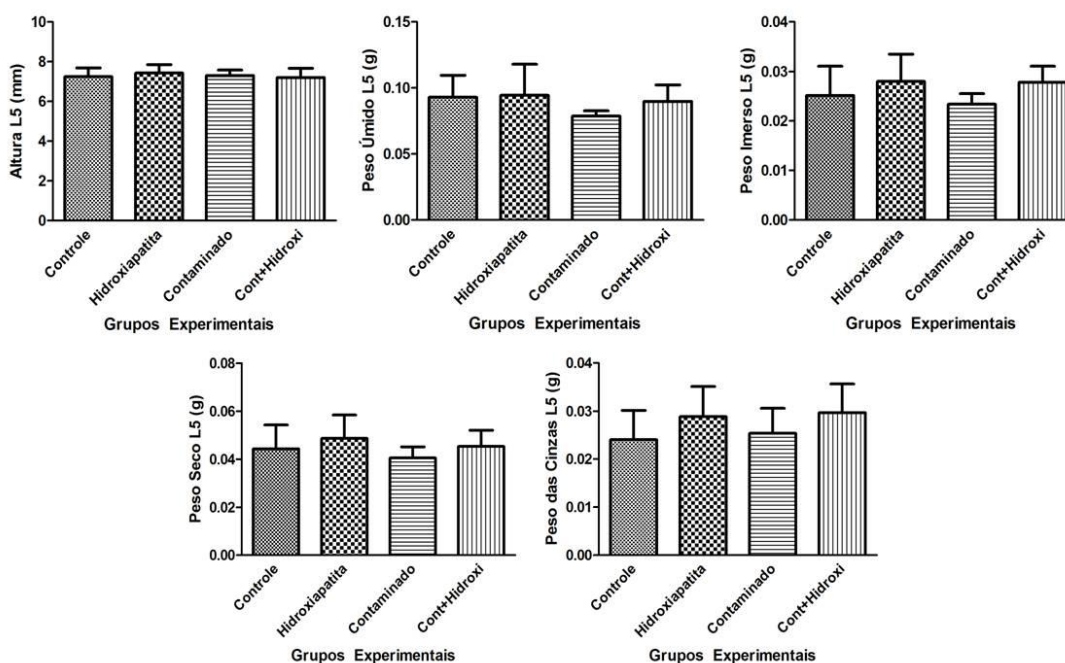


Figura 11: Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; $p < 0,05$.

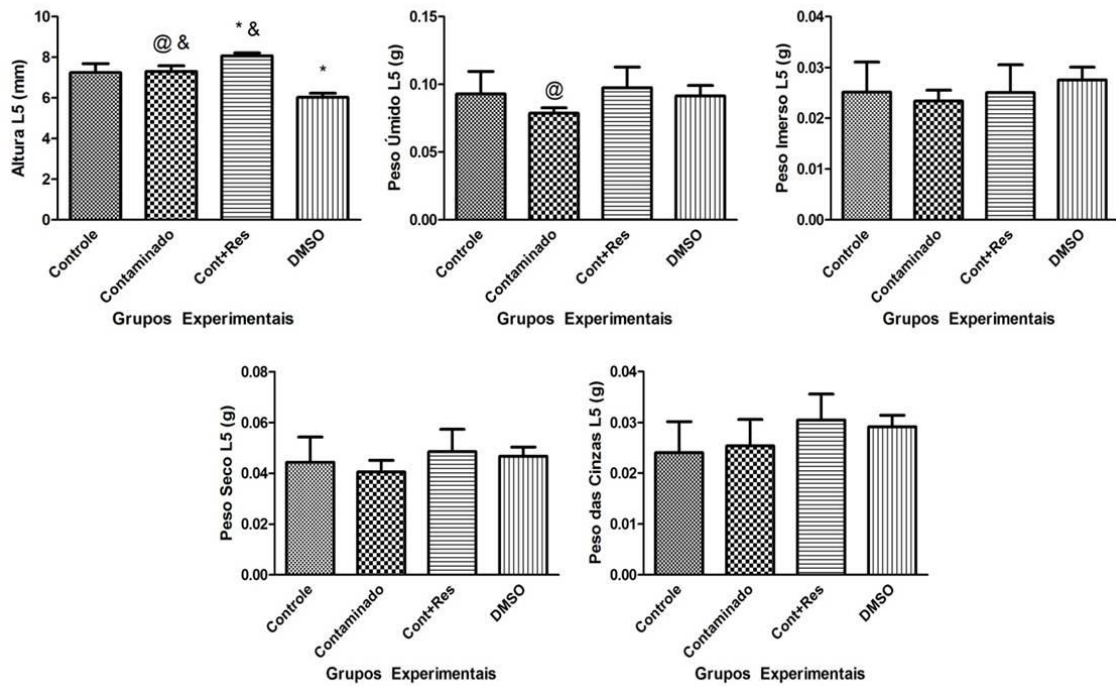


Figura 12: Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; $p < 0,05$.

Tabela 9: Valores de Altura em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das Cinzas em gramas (g), das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
Altura (mm)	7,24 \pm 0,35	7,43 \pm 0,57	7,30 \pm 0,28	7,21 \pm 0,47
P. Úmido (g)	0,0929 \pm 0,02	0,0945 \pm 0,02	0,0787 \pm 0,00	0,0898 \pm 0,01
P. Imerso (g)	0,0252 \pm 0,01	0,0280 \pm 0,01	0,0234 \pm 0,00	0,0278 \pm 0,00
P. Seco (g)	0,0443 \pm 0,01	0,0486 \pm 0,01	0,0405 \pm 0,58	0,0453 \pm 0,01
P. das Cinzas (g)	0,0240 \pm 0,01	0,0288 \pm 0,01	0,0254 \pm 0,01	0,0297 \pm 0,01

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

Tabela 10: Valores de Altura em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das Cinzas em gramas (g), das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
Altura (mm)	7,24 ± 0,35	7,30 ± 0,28 ^{@&}	8,07 ± 0,14 ^{*&}	6,03 ± 0,20 [*]
P. Úmido (g)	0,0929 ± 0,02	0,0787 ± 0,00 [@]	0,0976 ± 0,01	0,0914 ± 0,01
P. Imerso (g)	0,0252 ± 0,01	0,0234 ± 0,00	0,0251 ± 0,00	0,0275 ± 0,00
P. Seco (g)	0,0443 ± 0,01	0,0405 ± 0,58	0,0485 ± 0,01	0,0469 ± 0,00
P. das Cinzas (g)	0,0240 ± 0,01	0,0254 ± 0,01	0,030 ± 0,01	0,030 ± 0,00

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; () = n°. animais.

4.4 Parâmetros Biofísicos

4.4.1 Parâmetros Biofísicos dos Fêmures

Nas figuras 13 e 14 estão expressos, respectivamente, os valores de parâmetros biofísicos: porcentual de água, material orgânico e mineral no osso, volume ósseo (cm³), densidade mineral e densidade óssea (g/cm³), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO). Para todos os parâmetros das figuras 13 e 14, não houve diferença entre os grupos.

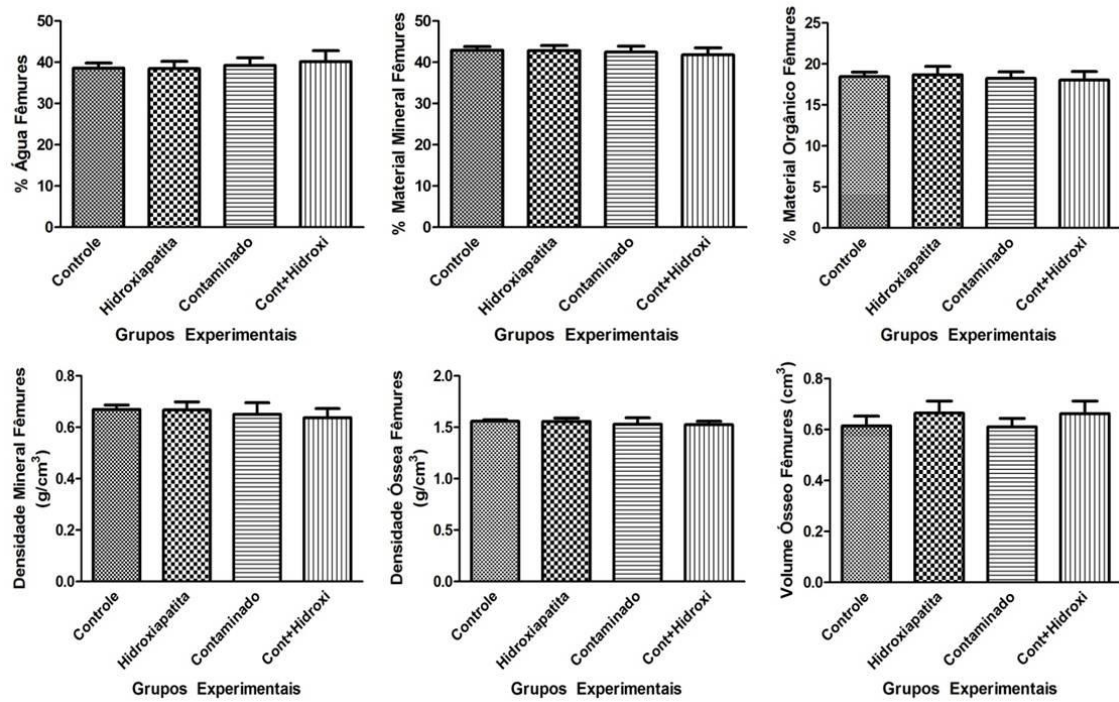


Figura 13: Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão.

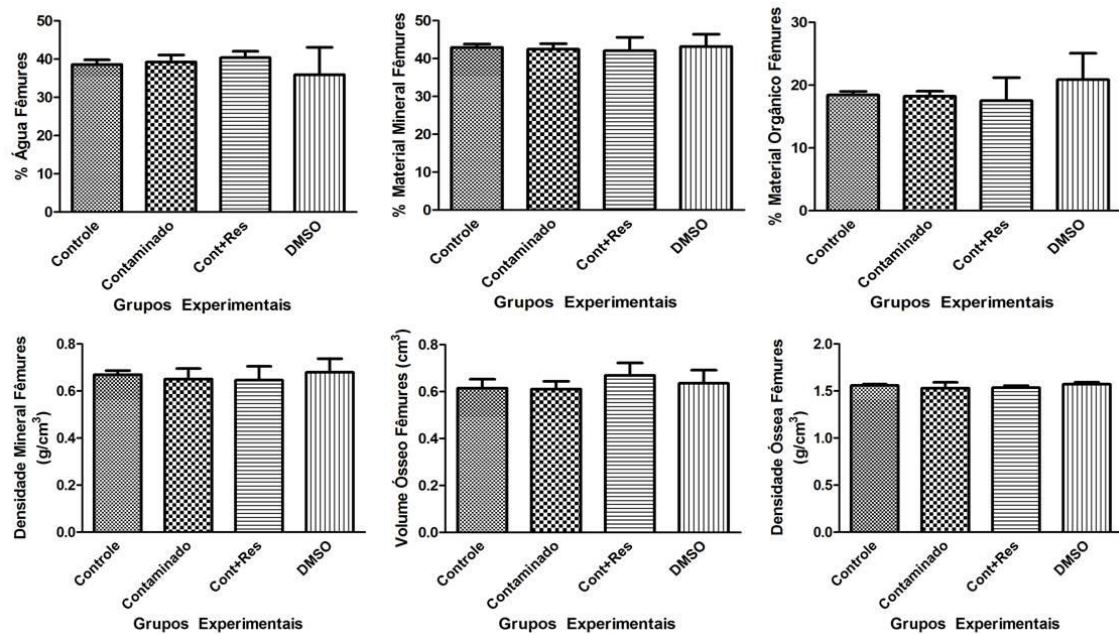


Figura 14: Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão.

Nas tabelas 11 e 12 encontram-se apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 11: Valores de Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, Volume Ósseo (em cm^3), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm^3), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
Água (%)	$38,62 \pm 1,19$	$38,49 \pm 1,75$	$39,27 \pm 1,82$	$40,17 \pm 2,66$
M. Orgânico (%)	$18,44 \pm 0,58$	$18,68 \pm 1,01$	$18,24 \pm 0,80$	$18,04 \pm 1,04$
M. Mineral (%)	$42,94 \pm 0,88$	$42,84 \pm 1,22$	$42,49 \pm 1,45$	$41,79 \pm 1,72$
Vol. Ósseo (cm^3)	$0,6152 \pm 0,04$	$0,6652 \pm 0,05$	$0,6108 \pm 0,03$	$0,6631 \pm 0,05$
D. Óssea (g/cm^3)	$1,5588 \pm 0,01$	$1,5576 \pm 0,03$	$1,5303 \pm 0,06$	$1,5250 \pm 0,03$
D. Mineral (g/cm^3)	$0,6694 \pm 0,02$	$0,6675 \pm 0,03$	$0,6508 \pm 0,05$	$0,6376 \pm 0,04$

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

Tabela 12: Valores de Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, Volume Ósseo (em cm^3), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm^3), dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
Água (%)	$38,62 \pm 1,19$	$39,27 \pm 1,82$	$40,38 \pm 1,68$	$35,92 \pm 7,17$
M. Orgânico (%)	$18,44 \pm 0,58$	$18,24 \pm 0,80$	$17,44 \pm 3,67$	$20,89 \pm 4,19$
M. Mineral (%)	$42,94 \pm 0,88$	$42,49 \pm 1,45$	$42,08 \pm 3,54$	$43,20 \pm 3,23$
Vol. Ósseo (cm^3)	$0,6152 \pm 0,04$	$0,6108 \pm 0,03$	$0,6699 \pm 0,05$	$0,6358 \pm 0,05$
D. Óssea (g/cm^3)	$1,5588 \pm 0,01$	$1,5303 \pm 0,06$	$1,535 \pm 0,02$	$1,573 \pm 0,02$
D. Mineral (g/cm^3)	$0,6694 \pm 0,02$	$0,6508 \pm 0,05$	$0,6462 \pm 0,06$	$0,6799 \pm 0,06$

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

4.4.2 Parâmetros Biofísicos Vértébras

Nas figuras 15 e 16 estão expressos, respectivamente, os valores de parâmetros biofísicos: porcentual de água, material orgânico e mineral no osso, volume ósseo (cm^3), densidade mineral e densidade óssea (g/cm^3), das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO). Houve aumento do parâmetro densidade mineral (g/cm^3), figura 15, do grupo contaminado + hidroxiapatita em relação ao grupo controle. Para os parâmetros biométricos, porcentual de água, material orgânico e mineral no osso, volume ósseo (cm^3) e densidade óssea (g/cm^3), figura 15, não houve diferença entre os grupos experimentais.

Na figura 16, pode-se observar que houve aumento do valor do porcentual de material mineral e densidade mineral (g/cm^3) dos grupos contaminado e DMSO em relação ao grupo controle. Ademais, houve redução dos valores de volume ósseo do grupo contaminado, comparado ao grupo contaminado + resveratrol. Para os parâmetros biométricos, porcentual de água, material orgânico (cm^3) e densidade óssea (g/cm^3), figura 16, não houve diferença entre os grupos experimentais.

Nas tabelas 13 e 14 encontram-se apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

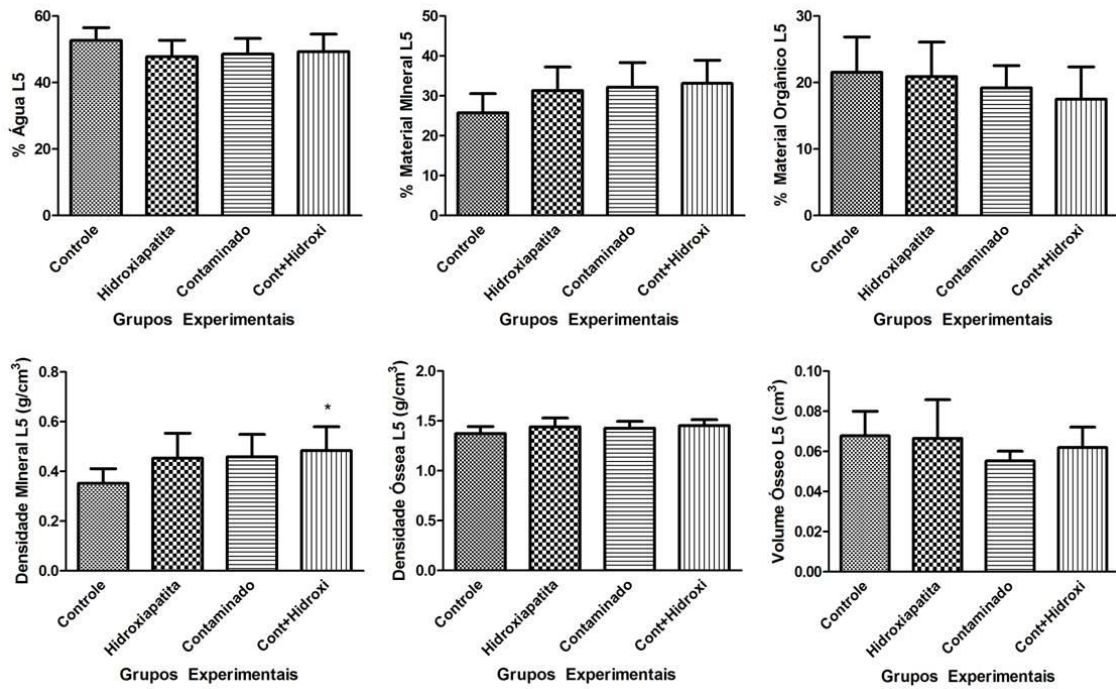


Figura 15: Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos das quinta vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão: * $p < 0,05$ vs. Controle.

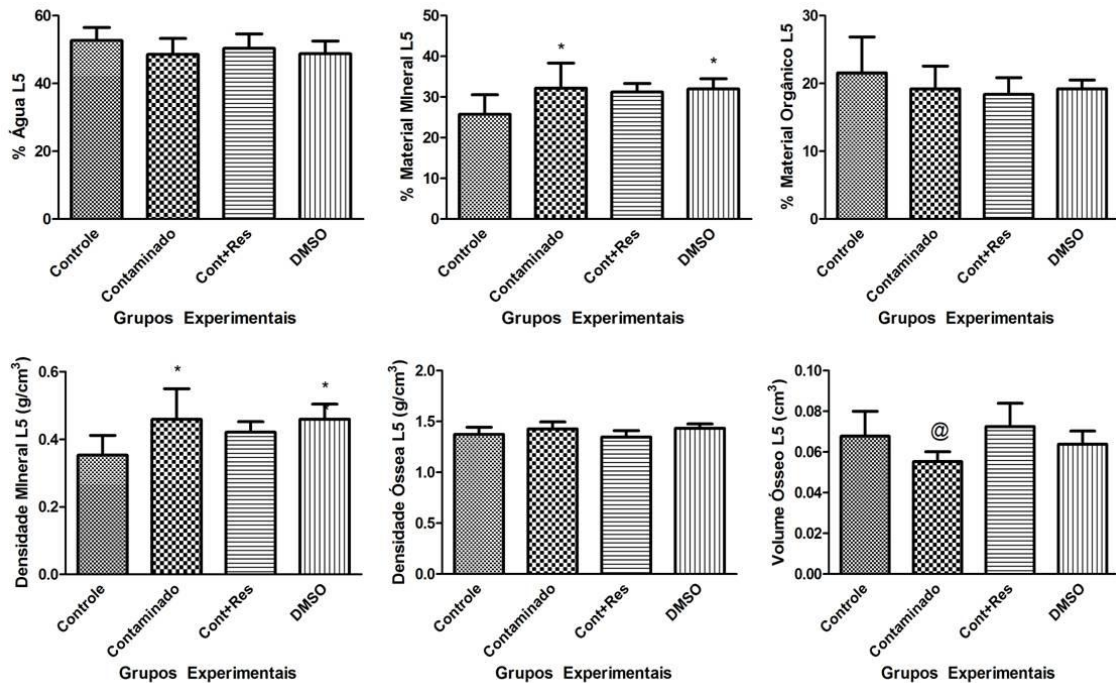


Figura 16: Representação gráfica dos valores de parâmetros biofísicos das quinta vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; $p < 0,05$.

Tabela 13: Valores de Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, Volum Ósseo (em cm³), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm³), das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
Água (%)	52,66 ± 3,86	47,76 ± 4,95	48,60 ± 4,69	49,33 ± 5,26
M. Orgânico (%)	21,56 ± 5,29	20,90 ± 5,19	19,21 ± 3,36	17,51 ± 4,85
M. Mineral (%)	25,78 ± 4,77	31,34 ± 5,88	32,19 ± 6,17	33,16 ± 5,76
D. Mineral (g/cm ³)	0,3526 ± 0,06	0,4532 ± 0,10	0,4590 ± 0,09	0,4837 ± 0,10*
D. Óssea (g/cm ³)	1,3741 ± 0,07	1,4402 ± 0,09	1,4275 ± 0,07	1,4550 ± 0,06
Vol. Ósseo (cm ³)	0,0678 ± 0,01	0,0665 ± 0,02	0,0553 ± 0,00	0,0620 ± 0,01

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

Tabela 14: Valores de Porcentual de Água, Material Orgânico e Mineral no Osso, Volum Ósseo (em cm³), Densidade Mineral e Densidade Óssea (em g/cm³), das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
Água (%)	52,66 ± 3,86	48,60 ± 4,69	50,39 ± 4,22	48,80 ± 3,70
M. Mineral (%)	25,78 ± 4,77	32,19 ± 6,17*	31,23 ± 2,13	32,00 ± 2,53*
M. Orgânico (%)	21,56 ± 5,29	19,21 ± 3,36	18,38 ± 2,48	19,21 ± 1,30
D. Mineral (g/cm ³)	0,3526 ± 0,06	0,4590 ± 0,09*	0,4206 ± 0,03	0,459 ± 0,04*
D. Óssea (g/cm ³)	1,3741 ± 0,07	1,4275 ± 0,07	1,348 ± 0,06	1,434 ± 0,04
Vol. Ósseo (cm ³)	0,0678 ± 0,01	0,0553 ± 0,00@	0,0725 ± 0,01	0,0639 ± 0,00

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res; () = n°. animais.

4.5 Parâmetros Microtomográficos Ósseos

Nas figuras 17 e 18 encontram-se amostras de microtomografias selecionadas das sextas vértebras lombares dos diferentes grupos experimentais controle, hidroxiapatita, contaminado, contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO.

Na tabela 15 pode-se observar a comparação das porcentagens das médias (entre duas vértebras sempre do segundo grupo em relação ao primeiro grupo) dos parâmetros microtomográficos: número de trabéculas, espessura trabecular e espaço entre trabéculas das sextas vértebras lombares dos animais entre os diferentes grupos experimentais: controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita. Houve redução do número de trabéculas quando se comparou o grupo contaminado aos grupos controle e hidroxiapatita (redução de 46,67% e 31,71% respectivamente) e o grupo contaminado+hidroxipatita aumentou o número de trabéculas quando comparado ao grupo contaminado (aumento de 66,96%). Também houve redução da espessura das trabéculas quando se comparou o grupo contaminado aos grupos controle e hidroxiapatita (redução de 20,47% e 10,36% respectivamente) e o grupo contaminado + hidroxipatita aumentou a espessura trabecular quando comparado ao grupo contaminado (aumento de 16,06%). Ademais, houve aumento do espaço entre trabéculas quando se comparou o grupo contaminado aos grupos controle e hidroxiapatita (aumento de 7,47% e 7,63% respectivamente) e o grupo contaminado + hidroxipatita reduziu o espaço entre as trabéculas quando comparado ao grupo contaminado (redução de 7,40%). Portanto, houve redução dos parâmetros microtomográficos do grupo contaminado em relação aos grupos controle e hidroxiapatita, sendo importante ressaltar que na comparação entre os grupos contaminado + hidroxiapatita e controle houve diferenças mínimas entre as porcentagens.

Na tabela 16 observa-se a comparação das porcentagens das médias (entre duas vértebras sempre do segundo grupo em relação ao primeiro grupo) dos parâmetros microtomográficos: número de trabéculas, espessura trabecular e espaço entre trabéculas das sextas vértebras lombares dos animais entre os diferentes grupos experimentais: controle, contaminado, contaminado + resveratrol e DMSO. Houve redução do número de trabéculas quando se comparou o grupo contaminado ao grupo controle (redução de 46,67%) e o grupo contaminado + resveratrol e DMSO aumentou o número de trabéculas quando comparado ao grupo contaminado (aumento de 64,28% e 57,14%). Também houve redução da espessura das trabéculas quando se comparou o grupo contaminado ao grupo controle (redução de 20,47%) e o grupo contaminado + resveratrol e DMSO aumentou a espessura trabecular quando

comparado ao grupo contaminado (aumento de 7,36% e 5,48%, respectivamente). Ademais, houve aumento do espaço entre trabéculas quando se comparou o grupo contaminado ao grupo controle (aumento de 7,47%) e os grupos contaminado + resveratrol e DMSO reduziram o espaço entre as trabéculas quando comparados ao grupo contaminado (redução de 6,50% e 8,90%, respectivamente). Portanto, houve redução dos parâmetros microtomográficos do grupo contaminado em relação aos grupos controle, contaminado + resveratrol e DMSO, sendo importante ressaltar que na comparação entre os grupos contaminado + resveratrol e controle houve diferenças mínimas entre as porcentagens.

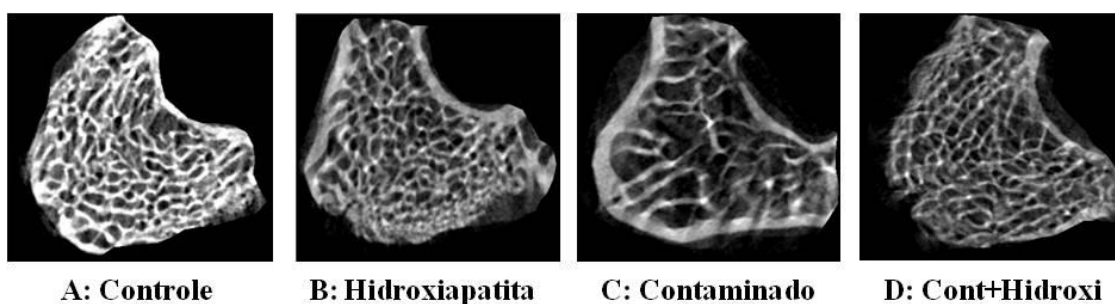


Figura 17: Microtomografias das sextas vértebras lombares. As letras A, B, C e D correspondem aos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita, respectivamente.

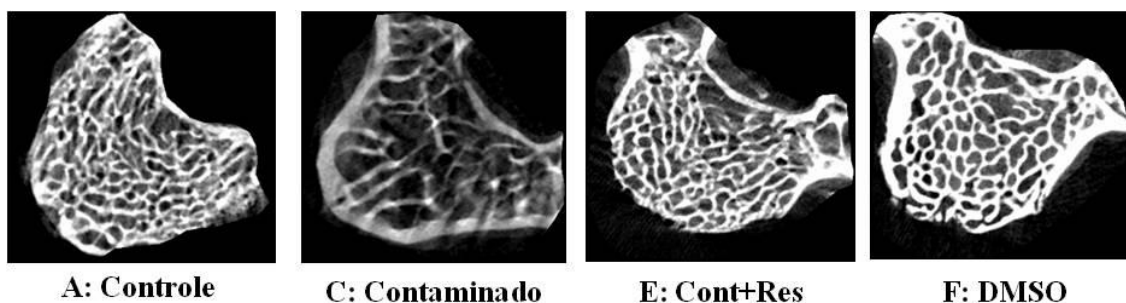


Figura 18: Microtomografias das sextas vértebras lombares. As letras A, C, E e F correspondem aos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Res e DMSO, respectivamente.

Tabela 15: Comparação das médias (2 vértebras) em porcentagem (do segundo grupo em relação ao primeiro grupo) dos parâmetros microtomográficos: número de trabéculas (1/mm), espessura trabecular (mm) e espaço entre trabéculas (mm) das sextas vértebras lombares dos animais entre os diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Grupos Experimentais	Parâmetros		
	Número de Trabéculas	Espessura Trabecular	Espaço entre Trabéculas
Controle x Hidroxiapatita (2)	↓ 21,9 %	↓ 11,28 %	↓ 0,15 %
Controle x Contaminado (2)	↓ 46,67%	↓ 20,47%	↑ 7,47%
Controle x Cont+Hidroxi (2)	↓ 10,95%	↓ 7,70%	↓ 0,49%
Hidroxiapatita x Contaminado (2)	↓ 31,71%	↓ 10,36%	↑ 7,63%
Hidroxiapatita x Cont+Hidroxi (2)	↑ 14,02%	↑ 4,03%	↓ 0,34%
Contaminado x Cont+Hidroxi (2)	↑ 66,96%	↑ 16,06%	↓ 7,40%

Porcentagem da média de 2 amostras de vértebras (L6) randomizadas; () = n°. animais; ↓ = menor e ↑ = maior.

Tabela 16: Comparação das médias (2 vértebras) em porcentagem (do segundo grupo em relação ao primeiro grupo) dos parâmetros microtomográficos: número de trabéculas (1/mm), espessura trabecular (mm) e espaço entre trabéculas (mm) das sextas vértebras lombares dos animais entre os diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Grupos Experimentais	Parâmetros		
	Número de Trabéculas	Espessura Trabecular	Espaço entre Trabéculas
Controle x Contaminado (2)	↓ 46,67%	↓ 20,47%	↑ 7,47%
Controle x Cont+Res (2)	↑ 12,38%	↓ 14,62%	↑ 0,48%
Controle x DMSO (2)	↓ 16,19%	↓ 16,12%	↓ 2,09%
Contaminado x Cont+Res (2)	↑ 64,28%	↑ 7,36%	↓ 6,50%
Contaminado x DMSO (2)	↑ 57,14%	↑ 5,48%	↓ 8,90%
Cont+Res x DMSO (2)	↓ 4,35%	↓ 1,76	↓ 2,57%

Porcentagem da média de 2 amostras de vértebras (L6) randomizadas; () = n°. animais; ↓ = menor e ↑ = maior..

4.6 Densidade Radiográfica

Na figura 19 estão expressos os valores de densidade radiográfica em milímetros de alumínio (mmAl) das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO). Observa-se na figura 19, redução da densidade radiográfica (mmAl) do grupo contaminado e contaminado + hidroxiapatita em relação ao grupo controle e hidroxiapatita. Ademais, observa-se redução da densidade radiográfica (mmAl) do grupo contaminado, contaminado + resveratrol e DMSO em relação ao grupo controle.

Nas tabelas 17 e 18 encontram-se apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrões, do parâmetro descritos acima.

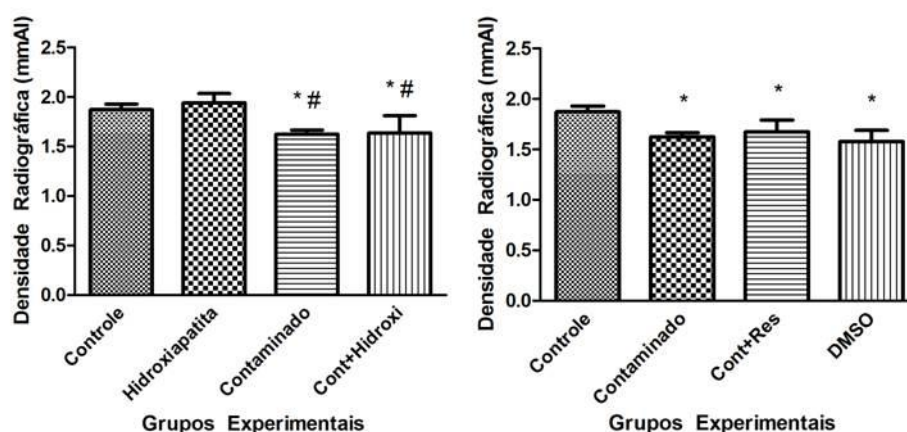


Figura 19: Representação gráfica dos valores de densidade radiográfica (mmAl) das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita; Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO, respectivamente. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; $p < 0,05$.

Tabela 17: Valores de Densidade radiográfica (mmAl), das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
D. Rad. (mmAl)	1,872 \pm 0,05	1,941 \pm 0,09	1,624 \pm 0,04 ^{*#}	1,63 \pm 0,17 ^{*#}

Média \pm Desvio Padrão (D.P.); () = n°. animais: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; () = n°. animais.

Tabela 18: Valores de Densidade radiográfica (mmAl), das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
D. Rad. (mmAl)	1,872 ± 0,05	1,624 ± 0,04*	1,674 ± 0,12*	1,579 ± 0,11*

Média ± DP; p<0,05; * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; () = n°. animais.

4.7 Conteúdo Ósseo de Cálcio

Nas figuras 20 e 21 estão expressos, respectivamente, os valores de conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso), dos fêmures e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO). Observa-se na figura 20 aumento do conteúdo de cálcio do grupo contaminado + resveratrol em relação ao grupo DMSO.

Pode ser observado na figura 21 diminuição do conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) do grupo contaminado em relação ao grupo controle e hidroxiapatita e do grupo contaminado + hidroxiapatita em relação ao grupo controle. Na mesma figura 21, observa-se diminuição da do conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) dos grupo contaminado e contaminado + resveratrol em relação ao grupo controle e DMSO.

Nas tabelas 19 e 20 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

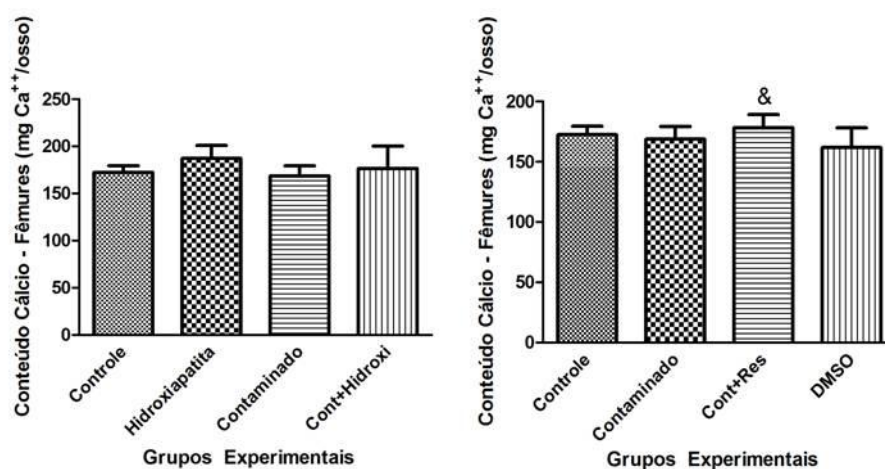


Figura 20: Representação gráfica dos valores de conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) em fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão; & vs. DMSO; p<0,05.

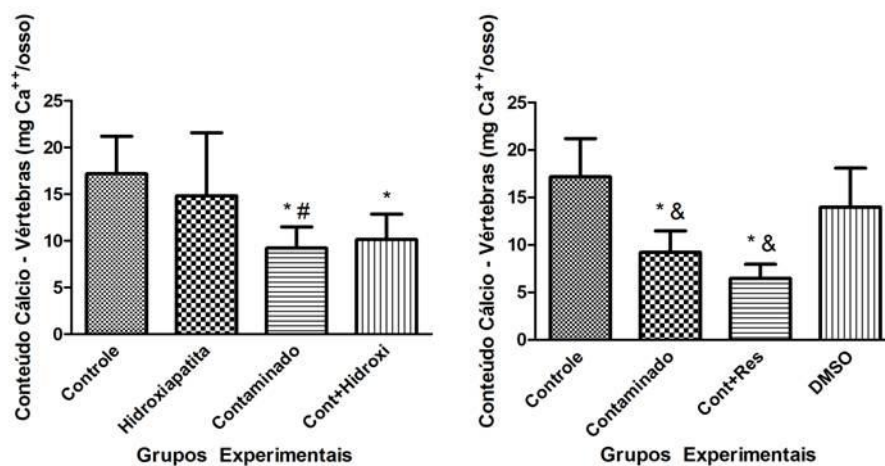


Figura 21: Representação gráfica dos valores de conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) nas quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, & vs. DMSO; $p < 0,05$.

Tabela 19: Conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) em fêmures direitos e nas quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
Ca ⁺⁺ Fêmures (mg/dl)	172,4 \pm 7,05	187,2 \pm 13,74	168,7 \pm 10,63	176,6 \pm 23,74
Ca ⁺⁺ Vértebras (mg/dl)	17,17 \pm 4,03	14,81 \pm 6,76	9,22 \pm 2,28 ^{*#}	10,13 \pm 2,73 [*]

Média \pm DP; $p < 0,05$: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, () = n^o. animais.

Tabela 20: Conteúdo de cálcio (mg Ca⁺⁺/osso) em fêmures direitos e nas quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
Ca ⁺⁺ Fêmures (mg Ca ⁺⁺ /osso)	172,4 \pm 7,05	168,7 \pm 10,63	178,3 \pm 10,77 ^{&}	161,8 \pm 16,23
Ca ⁺⁺ Vértebras (mg Ca ⁺⁺ /osso)	17,17 \pm 4,03	9,22 \pm 2,28 ^{*&}	6,46 \pm 1,508 ^{*&}	13,99 \pm 4,10

Média \pm DP; $p < 0,05$: * vs. Controle, & vs. DMSO; () = n^o. animais.

4.8 Espectrometria

Nas figuras 22 e 23 estão expressas, respectivamente, as concentrações de chumbo dos fêmures esquerdos (mg/g) e dos plasmas (mg/dl) dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO). Observa-se na figura 22 aumento da concentração de chumbo (mg/g) nos fêmures do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais: hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita. Além disso, houve aumento da concentração de chumbo (mg/g) nos fêmures do grupo contaminado + hidroxiapatita em relação ao grupo controle e hidroxiapatita. Ademais houve aumento da concentração de chumbo (mg/dl) no plasma sanguíneo do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais: hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita.

Nota-se na figura 23 aumento da concentração de chumbo (mg/g) nos fêmures do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais: contaminado, contaminado + resveratrol e DMSO. Além disso, houve aumento da concentração de chumbo (mg/g) nos fêmures do grupo contaminado + resveratrol em relação ao grupo controle e DMSO. Ademais, houve aumento da concentração de chumbo (mg/dl) no plasma do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais: contaminado, contaminado + resveratrol e DMSO.

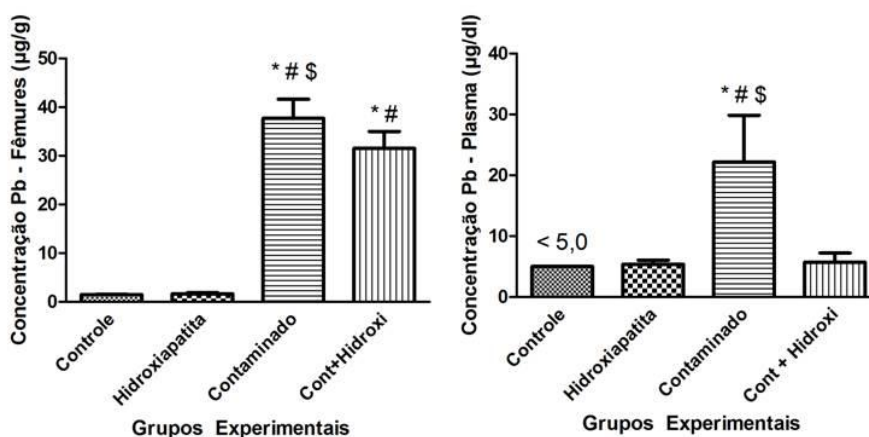


Figura 22: Representação gráfica dos valores de concentração chumbo em fêmures esquerdos ($\mu\text{g/g}$) e em plasma ($\mu\text{g/dl}$) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; $p < 0,05$. O símbolo < 5,0 representa valores menores que o limite de detecção do método.

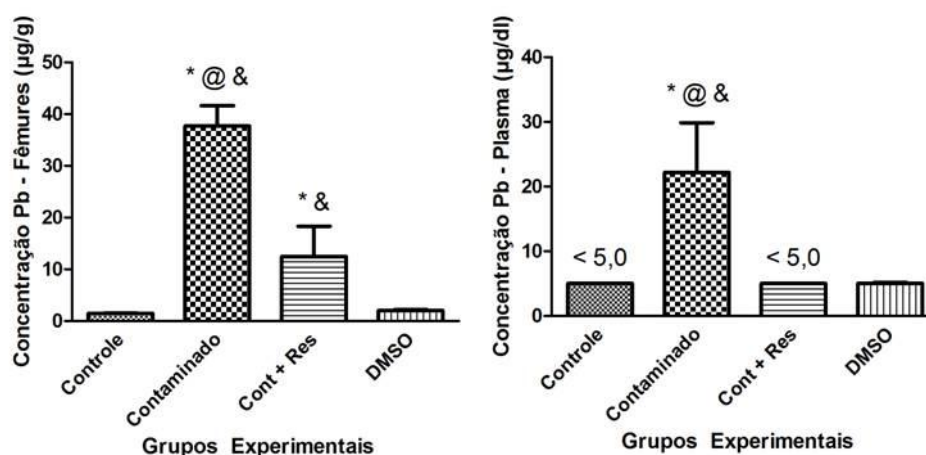


Figura 23: Representação gráfica dos valores de concentração chumbo em fêmures esquerdos ($\mu\text{g/g}$) e em plasma ($\mu\text{g/dl}$) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; $p < 0,05$. O símbolo < 5,0 representa valores menores que o limite de detecção do método.

Nas tabelas 21 e 22 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 21: Concentração de chumbo em fêmures esquerdos ($\mu\text{g/g}$) e em plasma ($\mu\text{g/dl}$) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont(8)	Cont+Hidroxi(8)
[Pb] Fêmures ($\mu\text{g/g}$)	1,49 \pm 0,08	1,66 \pm 0,23	37,70 \pm 3,90 ^{*#}	31,53 \pm 3,47 ^{*#}
[Pb] Plasma ($\mu\text{g/dl}$)	4,99 \pm 0,00	5,38 \pm 0,67	22,17 \pm 7,67 ^{*#}	5,73 \pm 1,49

Média \pm DP; $p < 0,05$: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; () = n°. animais.

Tabela 22: Concentração de chumbo em fêmures esquerdos ($\mu\text{g/g}$) e em plasma ($\mu\text{g/dl}$) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
[Pb] Fêmures ($\mu\text{g/g}$)	1,49 \pm 0,08	37,70 \pm 3,91 ^{*@&}	12,47 \pm 5,83 ^{*&}	2,01 \pm 0,20
[Pb] Plasma ($\mu\text{g/dl}$)	4,99 \pm 0,00	22,17 \pm 7,67 ^{*@&}	4,99 \pm 0,00	5,05 \pm 0,13

Média \pm DP; $p < 0,05$: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; () = n°. animais.

4.9 Zimografia

Nas figuras 24 e 25 encontram-se reproduzidas fotos dos géis de zimografia para análise da atividade proteolítica da metaloproteinase-2 do extrato de tecido ósseo (tíbias esquerdas) dos animais dos diferentes grupos experimentais: controle, hidroxiapatita, contaminado, contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO.

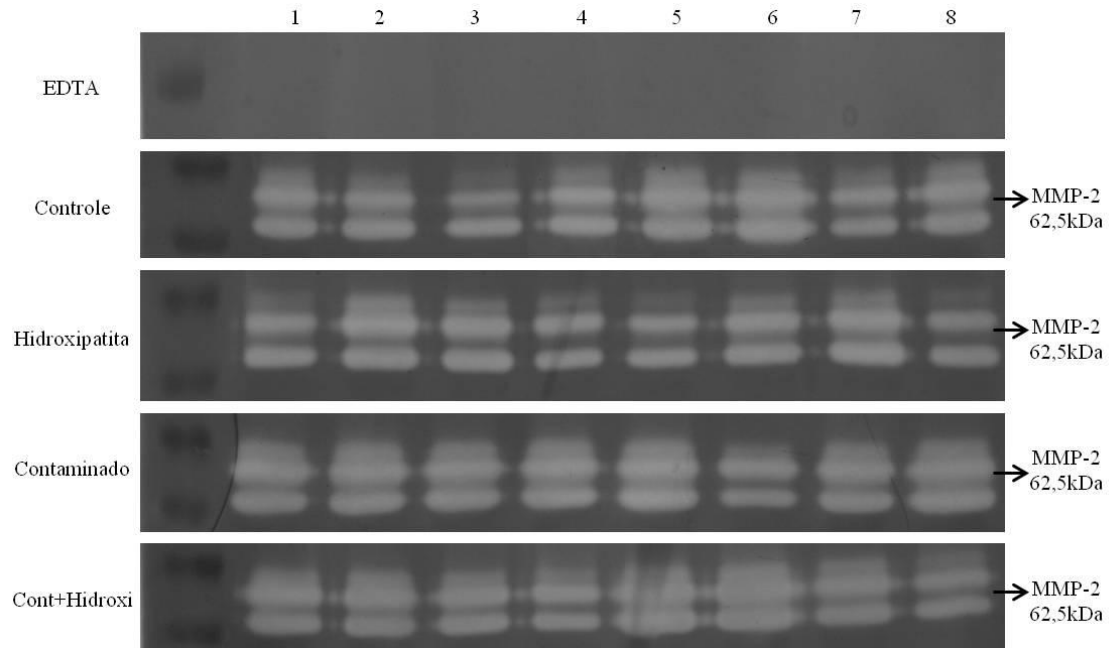


Figura 24: Análise da atividade proteolítica do extrato de tecido ósseo (tíbias esquerdas) por zimografia dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita (n=8 por grupo); bandas ativas PM = 62,5 kDa.

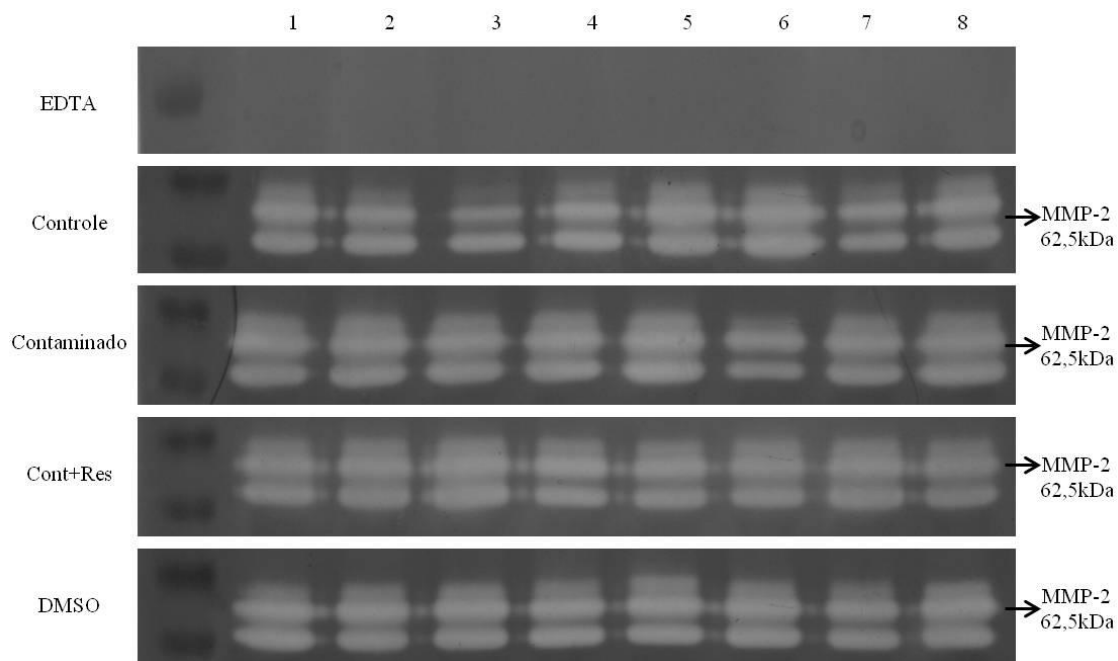


Figura 25: Análise da atividade proteolítica do extrato de tecido ósseo (tíbias esquerdas) por zimografia dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO (n=8 por grupo).); bandas ativas PM = 62,5 kDa.

Nas figuras 26 e 27 estão expressas as intensidades médias das bandas de zimografia em unidades arbitrárias (U.A.) das tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais (controle, hidroxiapatita, contaminado e contaminado + hidroxiapatita, contaminado + resveratrol e DMSO). Observa-se na figura 26 aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de metaloproteinases tipo II ativas do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais: controle, hidroxiapatita e contaminado + hidroxiapatita.

Além disso, houve aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de metaloproteinases tipo II intermediárias do grupo contaminado em relação ao grupo controle.

Ademais houve aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de pró-metaloproteinases tipo II do grupo contaminado em relação a todos os grupos experimentais: controle, hidroxiapatita e contaminado + hidroxiapatita.

Nota-se na figura 27 aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de metaloproteinases tipo II ativas do grupo contaminado em relação aos grupos experimentais: controle e contaminado + resveratrol. Também houve uma redução da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de metaloproteinases tipo II ativas do grupo contaminado + resveratrol em relação ao grupo DMSO. Ainda, houve um

aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de metaloproteinases tipo II ativas do grupo DMSO em relação ao grupo controle.

Além disso, houve aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de metaloproteinases tipo II intermediárias do grupo contaminado em relação ao grupo controle e contaminado + resveratrol. Também houve uma redução da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de metaloproteinases tipo II intermediárias do grupo contaminado + resveratrol em relação ao grupo DMSO. Ainda, houve um aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de metaloproteinases tipo II intermediárias do grupo DMSO em relação ao grupo controle.

Ademais houve aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de pró-metaloproteinases tipo II do grupo contaminado em relação aos grupos experimentais: controle e contaminado + resveratrol. Também houve um aumento da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) para a atividade de pró-metaloproteinases tipo II do grupo DMSO em relação ao grupo controle.

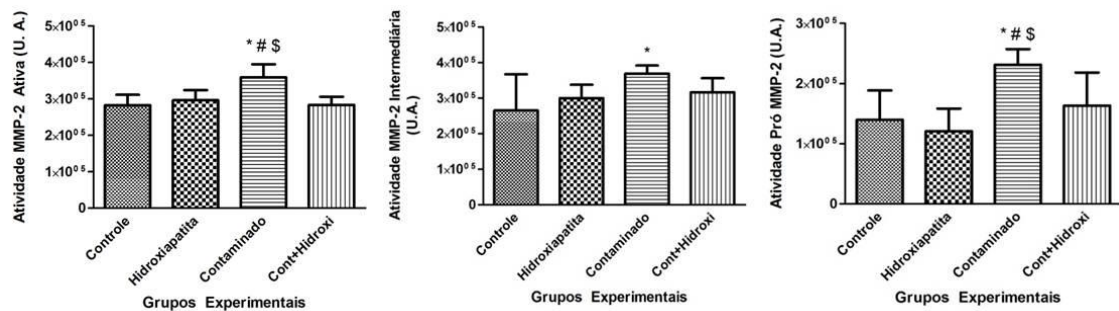


Figura 26: Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) das tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; $p < 0,05$.

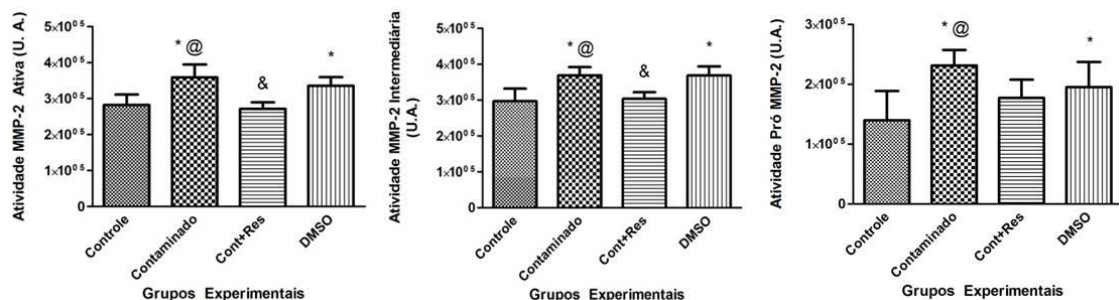


Figura 27: Representação gráfica da intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) das tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; $p < 0,05$.

Encontram-se apresentados nas tabelas 23 e 24 os valores médios, com os respectivos desvios padrões, dos parâmetros descritos acima.

Tabela 23: Intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) das tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Hidroxiapatita, Contaminado e Contaminado + Hidroxiapatita.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Hidroxi(8)	Cont (8)	Cont+Hidroxi (8)
MMP-2 Ativa (U.A.)	282410 ± 28656	295886 ± 27980	358889 ± 35833 ^{*#}	283327 ± 22313
MMP-2 Interm. (U.A.)	265268 ± 101835	299938 ± 37769	368763 ± 23319 [*]	316323 ± 39719
Pró MMP-2 (U.A.)	139983 ± 48687	120803 ± 37648	231337 ± 25932 ^{*#}	163319 ± 54957

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, # vs. Hidroxiapatita, \$ vs. Cont + Hidroxi; () = n°. animais.

Tabela 24: Intensidade média das bandas de zimografia (U.A.) das tíbias esquerdas dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle, Contaminado, Contaminado + Resveratrol e DMSO.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle(8)	Cont(8)	Cont+Res(8)	DMSO(8)
MMP-2 Ativa (U.A.)	282410 ± 28656	358889 ± 35833 ^{*@}	271373 ± 17867 ^{&}	335479 ± 23958 [*]
MMP-2 Interm. (U.A.)	296768 ± 34935	368763 ± 23319 ^{*@}	303501 ± 18297 ^{&}	368534 ± 25498 [*]
Pró MMP-2 (U.A.)	139983 ± 48687	231337 ± 25932 ^{*@}	177204 ± 30510	195133 ± 42062 [*]

Média ± DP; p<0,05: * vs. Controle, @ vs. Cont + Res, & vs. DMSO; () = n°. animais.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou os efeitos provocados pela contaminação com chumbo sobre o tecido ósseo de ratos adultos. Nossos achados claramente demonstraram que a contaminação com 250 mg/kg MC de acetato de chumbo promoveu a redução dos parâmetros biomecânicos de fêmures e vértebras que está diretamente relacionado ao comprometimento da densidade e microarquitetura óssea evidenciada por meio dos parâmetros microtomográficos e densidade radiográfica. Evidenciamos que os tratamentos com 100 mg/kg MC de hidroxiapatita ou com 0,7 mg/kg MC de resveratrol preveniram a redução destes parâmetros. Portanto, nosso objetivo é discutir os principais prováveis mecanismos pelos quais o Pb reduz a resistência óssea e a hidroxiapatita e o resveratrol protege o tecido ósseo dos malefícios causados pelo Pb.

Inicialmente, validando nosso modelo de contaminação por meio da gavagem gástrica, houve fácil adaptação dos animais ao sistema proposto, não proporcionando alterações significativas da massa corpórea (figuras 3 e 4, tabelas 1 e 2) e de aspectos comportamentais. Para o modelo de tratamento do resveratrol com injeções intraperitoneais, aplicam-se as mesmas observações da gavagem gástrica, sendo sua escolha priorizada pela melhor absorção orgânica da substância evidenciada na literatura (DO AMARAL et al., 2008). A literatura mostra que o rato é a mais freqüente espécie de roedor usado em estudos toxicológicos com repetição de doses e, utilizar este modelo experimental permite a extrapolação de resultados para humanos (MACGREGOR et al., 1995; ESCRIBANO et al., 1997; ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). TIMCHALK et al., (2006) sugerem que o acetato de chumbo administrado via gavagem oral é rapidamente absorvido, sendo o pico da concentração de chumbo no sangue de 30 minutos a 1 hora pós-dose e esta rápida absorção no rato é semelhante à absorção do acetato de chumbo em humanos.

A principal vantagem de estudos com animais é a possibilidade de se obter um sistema biológico completo do qual permite a avaliação do efeito geral de mudanças observadas em sistemas celulares. Estudos animais controlados cuidadosamente constituem um passo essencial para a extrapolação de efeitos biológicos para a segurança da saúde humana. A similaridade fundamental da estrutura celular e bioquímica entre animais e humanos proporciona uma base de validação geral para a predição de efeitos em populações humanas (ÇELIK, ÖGENLER, ÇÖMELEKOGLU, 2005). Assim, sendo o rato um bom modelo para o estudo da toxicidade de chumbo e aplicação de tratamentos em humanos é possível verificar a hipótese que ratos adultos expostos ao chumbo acumulam este elemento no esqueleto (HAN

et al, 1997), que este acúmulo é prejudicial ao tecido ósseo e que tratamentos com o objetivo de prevenir os efeitos do chumbo no tecido ósseo (como a hidroxiapatita e o resveratrol) possam ter sua efetividade comprovada.

Desta forma, padronização e homogeneidade de massa corporal é uma variável importante em estudos que envolvem o tecido ósseo, pois esta variável exerce estresse mecânico sobre os ossos e contribui para o ganho de massa óssea (BERG, HARMISON, 1957; BURR, ROBLING, TURNER, 2002). Dada a importância da homogeneidade da massa corporal inicial verificou-se a padronização adequada desta variável nos animais dos diferentes grupos experimentais (figuras 3 e 4, tabelas 1 e 2), processo este fundamental para o controle do ensaio proposto. Em relação a massa corporal final e ganho de massa corporal (figuras 3 e 4, tabelas 1 e 2) dos animais dos diferentes grupos experimentais, apesar da massa corporal final do grupo contaminado ser menor em relação ao grupo DMSO e o ganho de massa corporal do grupo contaminado apresentar-se menor em relação ao grupo contaminado + resveratrol, não foram evidenciadas mais diferenças entre os grupos analisados. Portanto, nossos resultados de forma geral demonstram que não houve alteração significativa das massas corporais dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Dependendo do período e da quantidade ingerida de metais pesados, como o chumbo, podem provocar redução do consumo de alimento, ocasionando diminuição do crescimento e ganho de massa (NTP, 1993). Na literatura, resultados conflitantes em relação à interferência do chumbo sobre a massa corporal de animais experimentais são encontrados, com variações do período, dose e via de administração deste elemento. Os dados de SMITH, MIELKE, HENEGHAN (2008) corroboram com os nossos, pois em testes utilizando ratos Sprague-Dawley machos com 21 dias de vida, contaminados durante 35 dias com diferentes doses de acetato de chumbo e nitrato de chumbo (6,75; 18,75; 37,5; 75 e 150 µg/g de dieta), os autores demonstraram que os animais testados não apresentam efeitos adversos significativos sobre o ganho de massa, consumo de comida e quantidade de fezes produzidas quando comparados aos animais controle. Dados da NTP (2003) demonstraram que camundongos contaminados com diferentes doses de acetato de chumbo (50, 200, 1,000 µg/ml) não tiveram seus ganhos de massa corporal alterados em relação aos animais controles do estudo. HAN et al. (1997) utilizaram ratas Sprague-Dawley em seu experimento com uma oferta de água contendo 250 mg/l de acetato de chumbo, com 3 grupos de animais que iniciaram a contaminação com 5, 10 e 15 semanas de vida respectivamente. Correlacionando as curvas de crescimento destes animais contaminados, os autores concluíram que a idade onde se inicia a exposição ao

chumbo não interfere no crescimento e no ganho de massa corpórea dos animais contaminados com chumbo.

No entanto, os dados obtidos por UNGVÁRY, MORVAI, SZAKMÁRY (2002) contrastam com nossos resultados. Utilizando ratos machos adultos, contaminados com 500 mg de acetato de chumbo por kg MC durante 12 semanas, os autores evidenciaram uma redução do ganho de massa corporal dos animais contaminados com acetato de chumbo. HAMILTON, O'FLAHERTY (1995), encontraram reduções de massa corporal de ratos previamente tratados com chumbo na água consumida quando comparado aos animais controle do estudo. Ainda, GONZÁLEZ-RIOLA et al. (1997) verificaram que a massa corporal final dos animais do grupo controle foi significativamente maior que o do grupo contaminado com 17 mg acetato de Pb/kg de alimento.

Estes dados conflitantes refletem variações na padronização dos protocolos experimentais e são resultados das diferentes condições experimentais. Além disso, a diferença apontada entre estudos pode ser resultado da variável biodisponibilidade. Biodisponibilidade do chumbo pode ser definida como a porção de Pb ingerida retida pelo corpo para interagir com vários processos metabólicos (SMITH, MIELKE, HENEGHAN, 2008). No entanto, existem vários fatores fisiológicos, físicos e químicos envolvidos (como a forma do composto, o tamanho da partícula, variações do período de contaminação, dose, via de administração deste elemento, idade do organismo utilizado) que auxiliam na determinação de qual fração de Pb ingerida foi retida no organismo e quais compostos podem interagir com os diversos sistemas orgânicos, prejudicando o desenvolvimento e o ganho de peso de animais utilizados em experimentos (MIELKE, HENEGHAN, 1991).

Desta forma, metais pesados, como o chumbo, apresentam não só a capacidade de promover alterações do crescimento somático de modelos animais experimentais, quanto em tecidos biológicos como o ósseo. Assim, o teste de flexão a três pontos (fêmures) e o de compressão vertebral possibilita a observação das principais propriedades biomecânicas do tecido ósseo e suas subseqüentes alterações (força e resistência do tecido) causadas por fatores externos. Ainda, é possível avaliar a resistência mecânica, e assim, a qualidade óssea dos animais estudados por meio destes parâmetros (PENG et al., 1994). Ademais, é importante ressaltar a analogia que o teste biomecânico representa no aspecto clínico representada por patologias clínicas como a osteoporose e risco de fraturas, pois a resistência mecânica do osso às fraturas está diretamente relacionada ao grau de mineralização deste tecido (MELTON et al., 1986; BOYDE et al., 1995; CURREY, BREA, ZIOUPS, 1995; LEOPOLA et al., 1996; BOYDE et al., 1998).

Assim, o comprometimento da microarquitetura óssea (figuras 17 e 18 e tabelas 15 e 16) e a redução da densidade radiográfica óssea (figura 19 e tabelas 17 e 18) do grupo contaminado estão diretamente relacionados com as alterações do comportamento biomecânico. Além disso, a diminuição da resistência óssea encontrada no estudo (evidenciada pela redução dos parâmetros biomecânicos de fêmures e vértebras do grupo contaminado nas figuras 5, 6, 7 e 8 e tabelas 3, 4, 5 e 6) corrobora com os achados de RONIS et al. (2001), que propuseram um modelo de contaminação com 0,15% e 0,45% de acetato de chumbo na água consumida por ratos, dos quais resultou em uma concentração sanguínea de chumbo na faixa de 67-192 µg/dl e 120-388 µg/dl, respectivamente, reduzindo a resistência óssea das tíbias avaliadas com o teste de flexão a três pontos. Aqui é importante ressaltar, que tanto hidroxiapatita quanto o resveratrol foram capazes de prevenir a redução da resistência óssea causada pela contaminação com chumbo, tanto em fêmures, quanto em vértebras. Os mecanismos pelos quais os tratamentos atuam serão discutidos posteriormente.

Diversos mecanismos (moleculares, celulares e sistêmicos) podem afetar esses parâmetros. Iniciando com os mecanismos intracelulares, temos vários autores com hipóteses de como o chumbo entra na célula, envolvendo a função de vários tipos de transportadores associados ao influxo de Pb: receptores de Fe, as transferrinas (TfR1 e TfR2), transportadores de cátions divalentes (DCT1) e transportadores de ânions orgânicos (OAT1 e OAT3). (GUNSHIN et al., 1997; HAN et al., 1999; BALLATORI, 2002; QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI, 2003). Nosso estudo pressupõe que os mecanismos de entrada do chumbo nas células ósseas possam utilizar estes tipos de transportadores. QIAN, TIFFANY-CASTIGLIONI (2003) afirmam que após a entrada em células nervosas (da astrogliia), por mecanismos com canais de Ca^{2+} ou DCT1, o Pb se localizaria no retículo endoplasmático (RE), sendo esta organela o maior sítio de armazenamento e regulação de cálcio intracelular. A concentração de Ca^{2+} no lúmen do RE é de 3 a 4 vezes maior que a do citosol, um gradiente mantido por cálcio-ATPases ou proteínas SERCA. O Pb pode inibir a Ca^{2+} -ATPase, estimulando a depleção do Ca^{2+} estocado, prejudicando a restauração dos estoques. Intracelularmente, este elemento é distribuído por vários carregadores desconhecidos para vários destinos celulares, incluindo proteínas, organelas, e DNA. Além disso, pela grande possibilidade de interações tóxicas com transportadores iônicos, o Pb pode interagir prejudicialmente com uma série de proteínas no citoplasma. Uma dessas proteínas é uma reguladora de glicose (chaperona) localizada no RE, de peso molecular de 78 kD, conhecida como GRP78, sendo que o chumbo pode promover uma falha no seu funcionamento, estimulando respostas protéicas específicas via transdução por IRE1/ATF6 (proteína 1

requerente de inositol e fator de transcrição ativado 6, respectivamente) e/ou IRE1/JNK (c-Jun amino-terminal quinase). Isto poderia interromper uma série de fosforilações e comprometer a síntese e o transporte protéico nestas células.

Ademais, outros mecanismos são relatados na literatura. BEATTIE et al. (2005), em estudo com linhagem celulares, evidenciaram que vários metais pesados, como o chumbo, é um potente inibidor de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ presente na membrana plasmática. Como resultado isto poderia afetar e conseqüentemente comprometer a função da célula. Mecanismos similares podem estar ocorrendo nas células ósseas e conseqüentemente interferindo na qualidade do tecido ósseo.

Este elemento pode estar afetando a função celular (osteoblastos e osteoclastos), diretamente e indiretamente (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991). O Pb afeta indiretamente a diferenciação óssea e sua função via redução dos níveis plasmáticos de Vitamina D e PTH (MAHAFFEY et al., 1982b). Os efeitos diretos estão relacionados aos distúrbios da habilidade das células ósseas em responder a regulação hormonal normal, e o Pb pode competir com o cálcio em sistemas mensageiros de ligação com cálcio (POUNDS, LONG, ROSEN, 1991). MIYAHARA et al. (1994) reportaram que o Pb pode induzir a formação de células semelhantes à osteoclastos pelo aumento das concentrações de Ca^{2+} e adenosina monofosfato cíclico (AMPC). O Pb altera os canais de Ca^{2+} de uma forma que aumenta o influxo de Ca^{2+} extracelular. Estes canais podem ser sensíveis ao Pb e promover influxo deste elemento para o interior de osteoblastos e osteoclastos. Todos estes fatores podem estar interferindo diretamente nos parâmetros biomecânicos do tecido ósseo.

Além disso, sabe-se que o turnover ósseo é influenciado por diversos hormônios e vitaminas como o 1,25-diidroxicolecalciferol, PTH, calcitonina, estrógenos, andrógenos e fatores de crescimento (BERGLUND et al. 2000), sendo todos estes fatores reguladores diretos da função celular óssea. Turnover do osso é o maior mecanismo para manutenção da homeostase de cálcio, sendo a vitamina D e o PTH os dois maiores reguladores do metabolismo do cálcio. A forma ativa da vitamina D é formada nos rins e aumenta a absorção gastrointestinal de cálcio e fosfato (PO_4^-). A mineralização normal do osso também é dependente da 1,25-diidroxicolecalciferol. Os osteoblastos apresentam receptores para a vitamina D e sintetizam osteocalcina. PTH aumenta os níveis de cálcio plasmático por meio da estimulação da reabsorção óssea. Osteoblastos, mas não osteoclastos, apresentam receptores para PTH. Algumas proteínas ósseas poderiam estar envolvidas com a alteração de certos parâmetros biomecânicos, sendo uma delas a osteocalcina. Associou-se o Pb à inibição da atividade osteoblástica pela redução da síntese da osteocalcina (GONZÁLEZ-

RIOLA,1997). SAUK et al. (1992) evidenciaram *in vitro* que, na presença do Pb, células semelhantes a osteoblastos inibem a liberação de osteocalcina. DOWD et al. (1994) reportaram que o Pb e o Ca competem para ligar-se a osteocalcina e conseqüentemente o Pb inibe a ligação da osteocalcina à hidroxiapatita, o que pode inativar a osteocalcina e afetar a dinâmica mineral óssea. Sustentando estas alterações, há relação na literatura da redução da quantidade de osteocalcina reduzindo a síntese de andrógenos o que acarreta em quadro característico de osteopenia (KARSENTY, 2011).

Convergindo com a dinâmica mineral óssea outros fatores, como a geometria óssea e as propriedades materiais também poderiam influenciar os resultados de resistência óssea (figuras 5, 6, 7 e 8 e tabelas 3, 4, 5 e 6) deste estudo (EINHORN, 1996). O chumbo incorporado aos cristais de hidroxiapatita, substituindo o cálcio e formando outro composto (a hidroxiplomorfita) pode alterar as propriedades materiais dos ossos, como demonstrado na redução da resistência óssea do grupo contaminado (figuras 5, 6, 7 e 8 e tabelas 3, 4, 5 e 6).

Nos mecanismos que concernem a função de órgãos envolvidos na metabolização de toxinas, HAN et al (1999) afirmam que o fígado é um órgão chave na metabolização de toxicantes endógenos. Este órgão contém inúmeras proteínas, como as metalotioneínas e metaloproteinases, que apresenta uma grande afinidade por chumbo *in vitro*, mas não *in vivo*, embora metais pesados como o chumbo possam induzir produção de metalotioneínas no fígado e outros órgãos como os rins (WAALKES, HARVEY, KLAASSEN, 1984; ZALUPS, 2000). Desta forma, o acúmulo de metais pesados pode sobrecarregar a metabolização de toxinas por órgãos como rins e fígado, que conseqüentemente aumentaria a concentração destas toxinas em outros tecidos como o ósseo, comprovadamente o maior sítio de armazenamento deste elemento no organismo (WHO, 2001; BRONNER, 2002) e a maior fonte endógena de chumbo (BERGLUND et al., 2000), pode ter sua resistência comprometida por estes fatores. Ainda, metais pesados como cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e Pb podem ligar-se a diversos tipos de proteínas ósseas (BRANDÃO et al., 2006; PEIXOTO et al., 2007) e outras substâncias, formando um complexo ligante entre um receptor orgânico e o íon metálico e alterar a função celular. Essa concepção poderia explicar o mecanismo pelo qual certos metais tóxicos têm a capacidade de entrar e alterar a função celular (BRIDGES, ZALUPS, 2004).

Correlacionando o comprometimento da densidade e microarquitetura óssea com reduções da resistência do tecido ósseo, nossos achados de diminuição da densidade radiográfica óssea dos fêmures (figura 19 e tabelas 17 e 18), da espessura e número de trabéculas com aumento do espaço trabecular das vértebras analisadas (figuras 17 e 18 e

tabelas 15 e 16) diante da contaminação com acetato de chumbo, podem ser fatores determinantes das reduções dos parâmetros biomecânicos e conseqüentemente, comprometimento da resistência óssea (figuras 5, 6, 7 e 8 e tabelas 3, 4, 5 e 6). Este fato pode estar relacionado com os mecanismos comuns à redução da densidade óssea e comprometimento da microarquitetura óssea, sendo eles a indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica nas células ósseas, assim como em outros tipos celulares (STOHS, BAGCHI, 1995; LIN et al, 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004, EL-ASHMAWY et al., 2006). Este tipo de contaminação provocada pelo chumbo pode alterar os parâmetros biomecânicos e conseqüentemente a qualidade deste tecido (figuras 5, 6, 7 e 8 e tabelas 3, 4, 5 e 6). Fatores estes, que serão discutidos posteriormente.

Para o grupo de parâmetros biométricos, observamos comprometimento do desenvolvimento ósseo de fêmures do grupo contaminado e que tanto a hidroxiapatita quanto o resveratrol foram capazes de prevenir este comprometimento (figuras 11 e 12 e tabela 9 e 10). Já nas quintas vértebras lombares não foi evidenciado este comprometimento (figuras 13 e 14 e tabela 11 e 12). Nossos dados contrastam com os de ESCRIBANO et al. (1997). Estes autores não encontraram diferenças significativas do comprimento de fêmures de ratos contaminados com 17 mg de acetato de chumbo por kg de alimentação durante 50 dias. Entretanto, os mesmos autores encontraram diferenças significativas das alturas das vértebras dos mesmos animais contaminados com acetato de chumbo, concluindo que o crescimento longitudinal e periférico de ossos longos não é prejudicado pelo chumbo, mas pode alterar o desenvolvimento do esqueleto axial. GONZÁLEZ-RIOLA et al. (1997) não encontraram alterações significativas do comprimento de fêmures de ratos contaminados com 17 mg de acetato de chumbo por kg de alimentação durante 50 dias quando comparado aos animais controle do estudo, no entanto, relataram inibição do desenvolvimento das epífises de crescimento nos fêmures dos ratos contaminados após análise histomorfométrica. Com estes resultados, os autores atribuem ao chumbo um efeito inibitório sobre o processo de ossificação endocondral, envolvendo danos não só a osteoblastos e osteoclastos, como aos condrócitos. Em suporte aos dados destes autores, HAMILTON e O'FLAHERTY (1995) demonstraram alterações morfológicas metafisárias e nas placas de crescimento em ossos de ratos contaminados com mil ppm de chumbo na água consumida quando comparado aos animais controles do estudo, comprovando a capacidade do chumbo de prejudicar o crescimento ósseo. HICKS et al. (1996) reportaram que doses subletais de Pb causam supressão da fosfatase alcalina em condrócitos isolados de aves e da expressão de colágeno tipo II e tipo X, com decréscimo da incorporação de timidina. Os dados sugerem uma inibição

da ossificação endocondral pelo Pb. Corroborando com nossos dados, RONIS et al. (2001) associaram a contaminação com acetato de chumbo com a inibição da osteoblastogênese e um efeito inibidor sobre o crescimento ósseo longitudinal.

A diferença entre resultados está relacionada ao tipo de osso analisado, a dose, o tempo de contaminação, a via de administração e a técnica usada para análise do crescimento. Entre estes fatores, o tipo de osso analisado é um fator importante, pois efeitos distintos, tanto do esqueleto axial como periférico, podem derivar da diferença de constituição entre ossos e a predominância relativa de osso cortical e osso trabecular (ESCRIBANO et al. 1997). BARBOSA et al. 2005 afirmam que ossos trabeculares apresentam um período de turnover rápido, o que torna o chumbo acumulado nesse tipo ósseo mais biologicamente disponível. Consequentemente, devido à variação do turnover do osso trabecular, cortical e em várias regiões do esqueleto, o acúmulo de um dado metal no esqueleto será maior naquelas regiões onde a taxa de turnover for mais lento. A parte trabecular do osso apresenta o turnover maior em relação à porção cortical do osso sendo, portanto, o acúmulo de chumbo maior no osso cortical (BRONNER, 2002). O'FLAHERTY (1993) estabeleceu que o Pb apresenta comportamento semelhante de entrada, no interior e de saída do osso quando comparado ao cálcio, sendo que dois terços do Pb acumulado no osso são retidos no componente cortical do mesmo, enquanto o terço restante permanece no componente trabecular. No entanto, o turnover da porção trabecular do osso é mais rápido que da cortical, portanto grande parte do Pb circulante no sangue é oriundo da porção trabecular do osso. Tíbia, fêmur e vértebra diferem em suas constituições predominantes, o que pode estar induzindo as diferenças de resultados entre esses estudos. A vértebra apresenta maior predominância de osso trabecular em relação a tíbia, que por sua vez apresenta maior quantidade de osso trabecular e menor de osso cortical quando comparada ao fêmur, cujo constituinte cortical é prevalente sobre o trabecular.

SHAINI et al. (2000) demonstraram que osteoblastos são mais afetados pelos efeitos tóxicos de metais pesados do que células periosteais. Esta diferença de toxicidade celular está relacionada à grande quantidade de células não-diferenciadas na população de células periosteais, e estas células não-diferenciadas ajudariam a compensar o número de células mortas. Portanto, há uma explicação plausível para os diferentes efeitos do chumbo, nos diferentes tipos e regiões ósseas. A diferença do acúmulo deste elemento pode explicar a quantidade de resultados conflitantes e a capacidade do chumbo em afetar predominantemente algumas regiões ósseas mais específicas dependentes do tipo ósseo. O fato de fêmures apresentarem maior comprometimento estrutural e funcional (celular) em relação aos demais

tipos ósseos (conforme evidenciado na literatura), pode explicar os resultados encontrados em nosso estudo, onde ossos predominantemente corticais (fêmures) foram mais prejudicados na variável crescimento ósseo do que ossos com predominância trabecular (vértebras).

O tecido ósseo é basicamente composto pela combinação de água, material orgânico e mineral. Assim, alterações da densidade deste tecido podem estar associadas a mudanças das propriedades físicas ósseas. Desta forma, os parâmetros físicos dos fêmures e vértebras dos animais do estudo foram analisadas a partir da determinação do volume ósseo, de forma indireta por meio do princípio de Arquimedes, um método de alta confiabilidade (MARTIN, 1990; RENNO et al., 2007). Neste estudo não houve nenhuma alteração das propriedades biofísicas de fêmures e vértebras (figuras 13, 14, 15 e 16 e tabelas 11, 12, 13 e 14). Não obstante aos resultados descritos acima, este estudo evidenciou comprometimento de densidade e microarquitetura óssea, visualizado pelos parâmetros de densidade radiográfica óssea das vértebras (figura 19 e tabelas 17 e 18) e dos parâmetros microtomográficos (espessura e número de trabéculas com aumento do espaço trabecular) das vértebras analisadas (figuras 17 e 18 e tabelas 15 e 16). E novamente, tanto o tratamento com hidroxiapatita quanto com resveratrol foram capazes de prevenir todo o processo de osteopenia (redução da densidade óssea e deterioração da microarquitetura óssea) causado pela contaminação com chumbo (figuras 17, 18 e 19 e tabelas 15, 16, 17 e 18).

Corroborando com nossos achados, ESCRIBANO et al. (1997) verificaram com estudos histomorfométricos aumento da reabsorção óssea, ou seja, uma redução da densidade óssea mineral em animais previamente expostos a 17 mg de acetato de chumbo por kg de alimentação. BAGCHI, PREUSS (2005) observaram redução da densidade mineral óssea em ratos contaminados com acetato de chumbo a 1% na água consumida por estes animais durante 40 dias. MIYAHARA et al. (1995) observaram que o chumbo aumenta a reabsorção óssea em cultura de células ósseas, exceto com o tratamento prévio com calcitonina, um hormônio que apresenta forte efeito inibidor sobre a atividade osteoclástica, a principal célula envolvida com o processo de reabsorção. O estudo encontrou, por histomorfometria, aumento da reabsorção óssea. Isto significa que o chumbo afeta tanto a atividade osteoblástica como a osteoclástica, induzindo osteopatias. Os 3 mecanismos para o chumbo induzir osteoporose são decréscimo da massa óssea, aumento da reabsorção óssea e mudanças da estrutura do esqueleto (BERGLUND, et al., 2000).

Ainda em relação à diminuição da densidade óssea e o comprometimento da microarquitetura óssea observados neste estudo (figuras 17, 18 e 19 e tabelas 15, 16, 17 e 18), vários mecanismos que influenciam a atividade de osteoblastos e osteoclastos e interferem no

processo de remodelamento ósseo podem explicar este achado. Um dos mecanismos está relacionado a dano renal e gastrointestinal, interferindo sobre o metabolismo dos minerais como cálcio e fósforo. Outro mecanismo envolve a estimulação da reabsorção e inibição da formação óssea via uma influência direta sobre a diferenciação e ativação de osteoclastos e osteoblastos (BRZÓSKA, JAKONIUK, 2005). De acordo com o primeiro mecanismo, danos às células epiteliais do túbulo proximal do néfron causam decréscimo da reabsorção de compostos com baixo peso molecular pelo túbulo renal, particularmente, aminoácidos, glicose, fosfato e cálcio (MAHAFFEY, 1974; IPCS, 1995; LIN et al., 2003; YU, LIN, LINTAN, 2004; BURBURE et al., 2006). LIN et al (2003) demonstraram que a exposição crônica ao Pb pode influenciar subitamente a progressão da insuficiência renal em pacientes sem diabetes com doença renal crônica acarretando danos glomerulares e tubulares renais. Esse fato poderia contribuir para a causa da deficiência renal e alteração do equilíbrio ácido-básico. Esse desequilíbrio poderia induzir aumento da excreção urinária de cálcio, induzindo um hiperparatireoidismo secundário ou devido ao efeito direto do ácido sobre o tecido ósseo. BUSHINSKY (2001) relatou, em trabalho de revisão, alterações em culturas de células ósseas de camundongo promovidas pela diminuição do pH durante 3 horas, modelo de acidose aguda, causando dissolução mineral óssea. Esses estudos indicam que o mecanismo pelo o qual íons hidrogênio causam liberação do cálcio ósseo durante curto período é devido a alterações de fatores físico-químicos que governam a deposição e dissolução de minerais do tecido ósseo. BURCK et al. (2005), em estudo com cultura de células ósseas, observaram que a acidose pode contribuir para redução da mineralização óssea via aumento da solubilidade da hidroxiapatita e diminuição da atividade da fosfatase alcalina (ALP).

Outro mecanismo que poderia explicar estas alterações, seria o chumbo agir diretamente sobre as células ósseas (osteoblastos) inibindo a atividade da fosfatase alcalina (ALP), uma enzima essencial para o processo de mineralização óssea (ROBINSON, 1923; REGISTER, WURTHIER, 1984; BRADBEER et al., 1992, BRADBEER, LINDSAY, REEVE, 1994). HAMILTON, O'FLAHERTY (1995) observaram que após contaminação com chumbo, ratos tem alteração da morfologia das epífises de crescimento e redução da atividade da enzima ALP. Isto poderia indicar inibição da atividade osteoblástica e de condrócitos (GONZÁLEZ-RIOLA et al., 1997). Desta forma, como apresentaram os autores citados, o chumbo poderia alterar a atividade dos osteoblastos por meio da inibição da ALP, e como consequência, reduziria a densidade óssea, comprometendo a microarquitetura óssea das vértebras dos animais contaminados encontrado neste estudo.

O chumbo poderia estar ainda causando toxicidade às células ósseas por meio do mecanismo de indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica, e o resveratrol atuando exatamente na prevenção destes mecanismos (evitando o comprometimento ósseo). Devido à alta afinidade entre chumbo e grupos sulfídricos (GRAZIANO, 1994), há modificação de grupos tióis nas proteínas de membranas, peptídeos e aminoácidos, indiretamente pela produção de produtos oxidativos e por meio da alteração do estado redox da célula. Este efeito dá-se por meio da peroxidação lipídica e/ou modulação da síntese de produtos imunorreguladores, como os leucotrienos (QUEIROZ et al., 2003). BAGCHI, PREUSS (2005) também relatam o estresse oxidativo como efeito adverso do Pb. A interação entre grupos sulfídricos e proteínas como as metalotioneínas, glutathiona e cisteína está diretamente envolvida com a captação, acúmulo, transporte e conseqüentemente, toxicidade do chumbo. A indução da expressão de metalotioneínas é um dos efeitos intracelulares do chumbo divalente, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HAN et al., 1999, DOREA, DONANGELO, 2006). A interação dos metais pesados com estes grupos sulfídricos resulta em alteração de atividades enzimáticas como, por exemplo, das metaloproteinases de matriz, fundamentais ao processo de remodelamento tecidual (SOUZA, GERLACH, LINE, 2000; VU, WERB, 2000); inibição de enzimas antioxidantes estimulando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o oxigênio singlete (O^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}) e assim, induzindo aumento da peroxidação lipídica, o que induz danos ao DNA e alteração da homeostase do cálcio (STOHS, BAGCHI, 1995; LIN et al, 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004, EL-ASHMAWY et al., 2006). STOHS, BAGCHI (1995) afirmam que o Pb depleta glutathiona e proteínas que se ligam a grupos sulfídricos, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio como íons superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil. EL-ASHMAWY et al. (2006) demonstraram que a contaminação por acetato de Pb elevou significativamente os peróxidos lipídicos hepáticos. Este aumento pode ser relacionado ao metabolismo do ácido araquidônico via elevação de eicosanóides, ciclooxigenases e lipooxigenases cuja atividade envolve a peroxidação lipídica e a promoção de tumores (BOND et al., 1993). VALKO, MORRIS, CRONIN (2005) sumarizaram estudos mostrando que um fator comum na intoxicação com metais pesados é a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estes processos poderiam inibir até a divisão celular (EL-ASHMAWY et al 2006).

Recentes estudos demonstram que a produção de radicais livres e o estresse oxidativo, hábito de fumar, hipertensão e diabetes mellitus estão classificados como fatores de risco para osteoporose (SÁNCHEZ-RODRIGUEZ et al., 2007; SHEWEITA, KHOSHHAL, 2007). Outros estudos que mostram que altos níveis de H_2O_2 favorecem a diferenciação de

osteoclastos e inibem a diferenciação de osteoblastos e liberação do estoque de cálcio intracelular por um mecanismo sensível ao IP3 (inositol-3-fosfato) (NAM et al., 2002), propiciando dessa forma uma acentuada diminuição da densidade mineral óssea corroborando com alguns de nossos resultados que indicam reduções da resistência óssea (figuras 5, 6, 7 e 8 e tabelas 3, 4, 5 e 6), de densidade do osso e comprometimento da microarquitetura óssea (figuras 17, 18 e 19 e tabelas 15, 16, 17 e 18), dos quais nos permite sugerir que ocorra aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos e/ou diminuição da formação óssea pelos osteoblastos (MODY et al., 2001; SONTAKE, TARE, 2002; BAI et al., 2004). O chumbo pode alterar a expressão da via de sinalização da Wnt, induzindo o fator de transcrição FOXO (Forkhead Box) por ROS (espécies reativas de oxigênio) e, assim antagonizando a via de sinalização Wnt/ β -catenina que é um estímulo essencial para a osteoblastogênese e responsável por suprimir a apoptose osteoblástica, adipogênese e osteoclastogênese (ALMEIDA et al., 2007). Portanto, pressupomos que o processo de indução do estresse oxidativo e peroxidação lipídica por meio da contaminação com chumbo, cuja capacidade de afetar e prejudicar a atividade de diversos grupos celulares está comprovada na literatura, possa atuar similarmente nas células ósseas e provocar diversos efeitos no tecido ósseo como as reduções de densidade óssea, comprometimento da microarquitetura óssea (figuras 17, 18 e 19 e tabelas 15, 16, 17 e 18) e da resistência do tecido (figuras 5, 6, 7 e 8 e tabelas 3, 4, 5 e 6). Reforçando a citação de tal estudo, este pode ser o principal mecanismo pelo qual o resveratrol atua para prevenção deste comprometimento ósseo, embasados pelos nossos achados (figuras 18 e 19 e tabelas 16 e 18).

A ação antioxidante do resveratrol é amplamente fundamentada na literatura (FRÉMONT, 2000; BHAT, KOSMEDER, PEZZUTO, 2001; BAUR, SINCLAIR, 2006; DE JESUS SOARES et al., 2007; SAUVE, 2010). Ademais, têm-se demonstrado a ação de modulação do resveratrol sobre uma família de enzimas específicas, conhecidas como sirtuínas (SIRTs), que medeiam a função anti-inflamatória e anti-proliferativa devido a alteração da expressão gênica de inúmeras vias metabólicas (MIZUTANI et al., 1998; BÄCKESJO et al., 2006; DAI et al., 2007; MOHAR, MALIK, 2012).

Desta forma, o resveratrol age como regulador secundário de uma sistema de resposta biológica, muito mais complexo e amplo. Estudos recentes, focados no sistema de enzimas sirtuina, evidenciaram um complicado processo de respostas biológicas regulatórias conhecidas pela ativação via resveratrol. As sirtuínas constituem uma família de proteínas regulatórias (em mamíferos) que vão da SIRT1 a SIRT7 e são amplamente expressas em uma grande variedade de tecidos (SAUVE, 2010; MOHAR, MALIK, 2012). Em experimentos

com diferentes linhagens de células humanas, o resveratrol modulou uma grande variedade de processos por meio da interação da SIRT1, incluindo neuroproteção, supressão de tumor, diferenciação e inflamação (MICHAN, SINCLAIR, 2007). Foi evidenciado correlação entre a sirtuína tipo I (SIRT1) e a regulação de metaloproteinases cuja função está associada ao combate inflamatório em órgãos e tecidos (CARDELLINI et al., 2009). Além disso, o aumento da atividade da SIRT1 pelo resveratrol foi associada ao aumento da produção da enzima superóxido dismutase, uma enzima antioxidante que suprime a morte celular de cardiomiócitos e outras células (MUKHERJEE et al., 2009). Outros estudos reforçam os efeitos protetores das sirtuínas em cardiomiócitos, via ativação de genes codificados para antioxidantes, que auxiliam na redução da carga celular de espécies reativas de oxigênio (SUNDARESAN et al., 2009). Além disso, esta substância pode aumentar a capacidade antioxidante do plasma por meio da modulação do sistema antioxidante endógeno (DO AMARAL et al., 2008).

Ademais, MIZUTANI et al. (1998) demonstraram que o resveratrol estimula *in vitro* a proliferação e diferenciação de células mesenquimais osteoprogenitoras em osteoblastos. Em estudo de BÄCKESJO et al. (2006), evidenciou-se a ativação da sirtuína nas células estromais da medula óssea de ratos com maior intensidade de expressão dos marcadores de osteoblastos e também do processo de mineralização. DAI et al. (2007) descreveram, em cultura celular, que pequenas concentrações de resveratrol induziram uma rápida estimulação da proliferação celular, diferenciação osteoblástica e a expressão dos genes osteogênicos, por meio de mecanismos que envolvem o receptor de estrogênio e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKs). A ativação dessas vias poderia, portanto, mediar o efeito do resveratrol sobre células ósseas. Outras evidências correlacionam o tecido ósseo ao cartilaginoso, onde o resveratrol é um potente mediador anabólico da homeostase da cartilagem do disco intervertebral bovino (*in vitro*) e reparador de cartilagens de coelhos pós-lesão, revelando um potencial efeito biológico na redução da progressão da degeneração intervertebral, podendo ser utilizado no tratamento de patologias ósseas, inibindo a regulação de alvos moleculares que respondem ao estresse oxidativo, proliferação e apoptose celular (ELMALI et al. 2005; LI et al., 2008).

Foi atribuído ao resveratrol a prevenção da inibição induzida por dioxina da síntese do colágeno tipo 1, osteopontina, sialoproteínas ósseas e fosfatase alcalina. O resveratrol estimula a síntese de osteocalcina e a atividade proliferativa de células ósseas semelhantes a osteoblastos (RUCINSKI et al. 2006). MIZUTANI et al. (1998), analisando a ação do resveratrol sobre células MC3T3-E1 (linhagem de pré-osteoblastos de ratos, usada como

modelo do osteoblasto na medula óssea em pesquisas *in vitro*), demonstraram um efeito de estimulação direto na proliferação e diferenciação de osteoblastos.

Ademais, independente do modo de ação do resveratrol sobre o metabolismo ósseo, há indicação na literatura que o uso de resveratrol é capaz de afetá-lo, impedindo o decréscimo da densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas. (MIZUTANI, IKEDA, KAWAI, 2000; LIU et al., 2005). Este fato corrobora com nossos resultados de prevenção do resveratrol no tecido ósso. LIU et al. (2005) observaram que o resveratrol pode aumentar a densidade mineral óssea, especialmente nas epífises, inibindo a redução de densidade mineral óssea em ratas ovariectomizadas. Os resultados indicam que o resveratrol pode prevenir a perda óssea causada pela ovariectomia, sugerindo um papel importante contra a osteoporose.

Outras evidências da ação do resveratrol envolvem vias de ativação do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$). Este fator NF- $\kappa\beta$ está inativamente presente em todos os tipos celulares (citoplasma celular) e é considerado um mediador da resposta inflamatória e resposta imune (SHISHODIA, AGGARWAL, 2005). Desta forma, o resveratrol sendo descrito como potente agente anti-inflamatório e antioxidante (AHMAD, CLEMENT, PERVAIZ, 2003), poderia atuar suprimindo a ativação do NF- $\kappa\beta$ por meio da redução de espécies reativas de oxigênio (fator cuja ação aumenta a osteoclastogênese e, conseqüentemente, a reabsorção óssea) (BHAT, KOSMEDER, PEZZUTO, 2001). Outra atuação para a redução da osteoclastogênese é sua ação sobre receptores RANKL (ligante do receptor ativador do NF- $\kappa\beta$) em células precursoras de osteoclastos, diminuindo a ativação do NF- $\kappa\beta$, fator essencial para a diferenciação dos osteoclastos. (BOISSY et al., 2005). MENG et al. (2005) estudaram o efeito do resveratrol sobre a ativação do fator NF- $\kappa\beta$ e fatores inflamatórios. Os resultados obtidos demonstraram que a ativação do fator NF- $\kappa\beta$ está presente na resposta inflamatória e que o resveratrol pode efetivamente inibir a expressão e ativação do fator NF- $\kappa\beta$, atenuando a gravidade da pancreatite aguda através dos seus efeitos anti-inflamatórios. LEI, LIU, LIU (2008) investigaram os efeitos do resveratrol sobre interleucinas (em células mesenquimais da medula óssea derivadas de condrócitos) e evidenciaram que o resveratrol atua como um inibidor do fator NF- $\kappa\beta$, indicando um efeito protetor neste tipo celular via inibição de interleucinas, mediado por integrinas. Em adição, o resveratrol apresenta um significativo efeito sobre o processo inflamatório, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias (FRÉMONT, 2000; BHAT, KOSMEDER, PEZZUTO, 2001; BAUR, SINCLAIR, 2006; DE JESUS SOARES et al., 2007).

Portanto, esses seriam os principais mecanismos pelos quais o resveratrol poderia atuar no tecido ósseo e prevenir os efeitos prejudiciais do Pb sobre a resistência, densidade e

microarquitetura, resultados encontrados em nosso estudo (figuras 5, 6, 7, 8, 17, 18 e 19 e tabelas 3, 4, 5, 6, 15, 16, 17 e 18).

Em relação ao conteúdo de cálcio dos fêmures e vértebras dos grupos experimentais (figuras 20 e 21 e tabelas 19 e 20), encontramos redução do conteúdo de cálcio vertebral do grupo contaminado em relação ao grupo controle e hidroxiapatita. Nesta análise, não foi evidenciada ação preventiva da hidroxiapatita e do resveratrol.

A interação entre Pb e cálcio pode ocorrer em vários sítios do organismo, incluindo mecanismos celulares que regulam o transporte iônico pela membrana (MAHAFFEY, 1974; LIAO et al 2007). Após a ingestão, o chumbo segue as mesmas rotas do cálcio. O chumbo se liga a calbidina no duodeno, sendo que a absorção do Pb é aumentada pela vitamina D e também é absorvido por rotas paracelulares, principalmente no íleo (BRONNER, 2002). MAHAFFEY (1974) afirma que, via sistema gastrointestinal, o chumbo compete com o cálcio para sua absorção (passiva e ativa). Essa competição está presente nos ossos e nas paratireóides, o que pode induzir efeitos sobre o PTH. A idéia é que o chumbo modifica os níveis séricos de cálcio por meio da alteração da secreção do PTH. Metabólitos da vitamina D atuam sobre o sistema gastrointestinal, renal e ósseo regulando metabolismo do cálcio. O chumbo ainda, poderia afetar a conversão de 25-hidroxicolecalciferol em 1,25-dihidroxicolecalciferol. Juntamente com os danos provocados pelos rins nos túbulos renais e subsequente redução da reabsorção de cálcio pelos rins, como já discutido, há contribuição para as reduções dos níveis plasmáticos de cálcio (MAHAFFEY, 1974; IPCS, 1995; LIN et al., 2003; YU, LIN, LIN-TAN, 2004; BURBURE et al., 2006). Especificamente relacionado ao osso, os metais pesados, como o chumbo, interagem com as células ósseas, podendo afetar o metabolismo ósseo, afetando as funções osteoblásticas e osteoclásticas (BRONNER, 2002). O Pb que entrou nos fluidos corporais deixa o mesmo via urina, intestino e incorporação ao tecido ósseo. SCHANNE, GUPTA, ROSEN (1992) evidenciaram *in vitro*, com células osteoclásticas, a interferência do chumbo sobre o 1,25-diidroxicolecalciferol, induzindo aumento da concentração de cálcio intracelular. HSU et al (1973) observaram corpos de inclusão intranucleares contendo chumbo em osteoclastos de porcos contaminados com chumbo. Os autores sugerem que os osteócitos estão metabolicamente ativos durante a osteólise e respondem à contaminação por Pb. Durante uma exposição contínua, os osteócitos morrem, a área óssea correspondente torna-se necrótica e este tecido é reabsorvido por osteoclastos. O Pb por sua vez contido na área é absorvido pelos osteoclastos e corpos de inclusão desenvolvem-se nestas células. Portanto esta possível interação do chumbo com o PTH e reduções da reabsorção de cálcio via sistema renal (por danos do chumbo aos túbulos

renais) pode explicar as alterações dos conteúdos de cálcio. Além disso, o tipo de osso (cortical e trabecular) correlacionado com a taxa de turnover óssea (como já discutido) parece ter papel determinante e influente sobre o controle do conteúdo de cálcio ósseo correlacionado com a contaminação com chumbo.

Ainda envolvendo alterações hormonais, há sugestão na literatura que a exposição ao chumbo pode afetar a regulação e suprimir diversos hormônios no organismo afetado, como o hormônio de crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e esteróides sexuais (RONIS et al., 2001). PILLAI, PRIYA, GUPTA (2002) sugerem que a exposição ao chumbo provoca acúmulo deste elemento na hipófise e diminui a fluidez da membrana desta estrutura, afetando sua função e provocando alterações da ligação de receptores e dos mecanismos secretores dos hormônios da hipófise. RONIS et al. (1996) sugerem que os efeitos do crescimento relacionados ao Pb estão relacionados a um atraso do desenvolvimento dos padrões de secreção do hormônio de crescimento hipofisário específico do sexo, e não de um defeito do desenvolvimento que persiste ao longo da vida do indivíduo. Portanto, os efeitos reprodutivos e sobre o crescimento do chumbo são complexos e sexo-dependente, e parecem estar relacionados a múltiplos sítios no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

Em modelos experimentais utilizando ratos, os efeitos da toxicidade do chumbo envolvem alteração dos níveis circulantes de testosterona, variações das concentrações plasmáticas e hipofisárias de hormônio luteinizante (LH), redução dos sítios de ligação para LH nos testículos (SOKOL, BERMAN, 1991; KEMPINAS et al., 1994). O eixo hipotálamico-hipofisário-gonadal funciona em uma faixa restrita de concentrações hormonais para promover as concentrações circulantes de hormônios sexuais e fatores de crescimento necessários para o crescimento normal, desenvolvimento da fisiologia sexual e manutenção do comportamento sexual (RONIS et al., 1996). Mudanças da fluidez da membrana resultantes da peroxidação lipídica podem afetar proteínas de membrana. A correlação entre peroxidação lipídica, fluidez e função da membrana foi documentada em alguns estudos (DINIS, ALMEIDA, MADEIRA, 1993; KAPLAN et al., 1995). Diversos estudos demonstraram que esta correlação reduz significativamente a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ pós exposição ao chumbo devido ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica (THEVENOD, FRIEDMMANN, 1999; JARRAR, MAHAMOUD, 2000; PILLAI, PRIYA, GUPTA, 2002). Tem sido sugerido que o chumbo atua em dois níveis: hipotalâmico-hipofisário e diretamente nos sítios gonadais para desorganizar a fisiologia reprodutiva e comportamental (SOKOL, MADDING, SWERDLOFF, 1985; WINDER, 1989; KLEIN et al.,

1994). Esses sítios de ação possivelmente envolvem interações com sistemas de segundo mensageiros dependentes de cálcio, relacionados com o controle de secreção hormonal e biossíntese de esteróides (RONIS et al., 1996).

Nossos resultados gerais podem estar relacionados a uma possível alteração provocada pela contaminação com chumbo em sistemas endócrinos, provavelmente com este elemento interagindo com mecanismos hipotalâmicos-hipofisários-gonadais e prejudicando a produção/secreção de hormônios esteróides sexuais. De maneira semelhante, mecanismos similares envolvendo estresse oxidativo, peroxidação lipídica e interações com sistemas de segundo mensageiro dependentes de cálcio podem afetar o funcionamento celular do tecido ósseo. POUNDS, LONG, ROSEN (1991) sugerem que o chumbo tem efeitos diretos sobre a regulação local da função celular óssea via interferência com a homeostase de cálcio e sistemas mensageiros secundários regulados por cálcio ou via desorganização de sinais AMPc. Além disso, é possível hipotetizar que além da interação do sistema endócrino, provocando efeitos diretos sobre o tecido ósseo, os mecanismos que provocam estes efeitos endócrinos possam ser semelhantes aos que provocam efeitos sobre o tecido ósseo (via estresse oxidativo e peroxidação lipídica).

Metais pesados, como o chumbo, têm a capacidade de se incorporar e aderir aos tecidos biológicos. No presente estudo, observou-se o aumento da concentração de chumbo (óssea e plasmática) no grupo contaminado, sendo imprescindível a ação da hidroxiapatita e do resveratrol para prevenir esse aumento de concentração de chumbo no grupo contaminado (figuras 22 e 23 e tabelas 21 e 22). O aumento da concentração evidentemente é associado à incorporação do metal pesado no tecido ósseo. Em relação a este análise, ressalta-se a importância da espectrometria de absorção atômica como o método de mensuração mais utilizado atualmente para detectar diagnósticos de envenenamento por Pb (GRAZIANO, 1994). Vários estudos confirmam a capacidade do chumbo de se incorporar ao tecido ósseo, tornando este tecido o maior reservatório deste elemento no organismo (RABINOWITZ, 1991; BERGLUND et al., 2000; WHO, 2001; BRONNER, 2002; LIN et al., 2003; HU et al. 2007). Além disso, 90% do Pb acumulado no organismo está contido nos ossos (AUFDERHEIDE, WITTMERS, 1992). Há várias possibilidades de como o chumbo se fixa ao osso. HAN et al. (1997) afirmam que cálcio e chumbo competem pelos mesmos sítios de ligação no osso. Em outro estudo, HAN et al. (1999) sugerem que os mecanismos de conservação orgânica do Pb podem ser similares aos de conservação orgânica do elemento ferro (Fe). BALLATORI (2002) associou os receptores de ferro, transferrina 1 e 2 (TfR1 e TfR2, respectivamente), presentes em diversos tipos celulares, como passíveis de transporte

para diversos cátions metálicos covalentes, inclusive o chumbo. Em tecidos excitáveis, o Pb^{2+} pode entrar nas células via canais sensíveis a voltagem. GUNSHIN et al. (1997) descreveram o mecanismo de entrada do Fe^{2+} e outros cátions divalentes por meio de um transportador denominado transportador de cátion divalente (DCT1 ou DMT1 ou NRAMP2) dependente de potencial de membrana e acoplamento de prótons. Ademais, o chumbo incorporado às células ósseas pode ter atingido o meio intracelular, por meio do Transportador de Ânion Orgânico 1 (OAT1) e 3 (OAT3), transportadores cuja função envolve transporte absorvivo de vários metais nas células epiteliais renais, endoteliais e gliais (BALLATORI, 2002; ZALUPS, AHMAD, 2004). Além disso, esse metal fixa-se em áreas de crescimento e mineralização óssea (BARRY, 1975; EISENSTEIN, KAWANOUE, 1975; POUNDS, LONG, ROSEN, 1991; HAMILTON, O'FLAHERTY, 1995; GONZÁLEZ-RIOLA, 1997). É possível que os mecanismos de entrada do chumbo nas células ósseas assemelham-se aos discutidos acima.

Discutindo especificamente o aumento da concentração de Pb (óssea e plasmática) encontrado em nosso estudo (figuras 22 e 23 e tabelas 21 e 22), corroborando com nossos achados, FERGUSON et al. (1998) verificaram aumento da concentração de Pb nos fêmures de ratas após ingestão de solução de acetato de Pb preparada para prover 350 ppm de acetato de Pb ($32,1 \pm 5,0 \mu\text{g}$ de Pb/g MC). Os resultados indicaram um acúmulo deste elemento no tecido ósseo dos animais contaminados. LIAO et al. (2008) verificaram, por espectrometria de absorção atômica, aumento da concentração de chumbo em fêmures de camundongos tratados com dose de 0,1% de acetato de chumbo na água de consumo dos animais por 4 semanas, em relação à dos animais controles.

O acúmulo de chumbo no tecido ósseo envolve a toxicocinética deste elemento. Toxicocinética pode ser definida como a mensuração do movimento de substâncias tóxicas, como o chumbo, no interior do organismo (RABINOWITZ, 1991). O Pb absorvido pode estar presente em três compartimentos separados: sangue, tecidos moles e ossos que, no entanto, interagem entre si. Cada um destes compartimentos apresenta capacidade de ligação, de absorção e taxa de turnover próprios (SMITH, MIELKE, HENEGHAN, 2008). FOX (1987), após análise de alguns trabalhos, observou que os mesmos traziam variações das concentrações de Pb em diversos tecidos do organismo exposto ao chumbo, porém o único que mantinha grandes concentrações deste elemento pós contaminação era o tecido ósseo. Portanto, o aumento da concentração de chumbo ósseo e plasmático com acetato de chumbo deste estudo confirma claramente o potencial do tecido ósseo de acumular este elemento e sua substancial capacidade para ser uma grande fonte endógena de chumbo para os demais tecidos e compartimentos do organismo. Ademais, demonstrou-se claramente a capacidade quelante

dos dois tratamentos selecionados, autenticando-os como potenciais agentes no tratamento de quadros de contaminação com metais pesados.

Desta forma, o Pb pode aderir ao tecido ósseo, provavelmente por meio da substituição do cálcio por este elemento no cristal de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), formando um novo cristal denominado hidroxiapiromorfita [$\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. É este mesmo mecanismo (formação de hidroxiapiromorfita via reação do chumbo com o fosfato) que pode evitar que o chumbo se acumule no tecido ósseo, formando um composto menos biodisponível e não tóxico para o organismo. E este é o principal suporte à teoria de como a hidroxiapatita exerce seu mecanismo protetor sobre o tecido ósseo.

Estudos *in vitro* demonstram a capacidade de cristais de hidroxiapatita sintéticos de retirar o chumbo do ambiente (principalmente em solos e água), via reação do chumbo com o fosfato, formando um composto menos biodisponível e não tóxico ao ambiente, a hidroxiapiromorfita ($\text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (RYAN, et al., 2001; ELLIS et al., 2006; SINGH, HENDRY, 2006; SRINIVASAN, FERRARIS, WHITE, 2006; JANG et al., 2008; SMICIKLAS et al., 2008). ZHANG, RYAN, YANG (1998) observaram um decréscimo da biodisponibilidade do chumbo com formação de piromorfita, após simular certas condições gastrointestinais de mamíferos. GIAMMAR, XIE, PASTERIS (2008), utilizando nanocristais de hidroxiapatita de ossos de peixes, conseguiram observar a precipitação do chumbo e a formação de piromorfita. No entanto, 2 estudos revelam a interação entre chumbo e este cristal *in vivo*. PEARSON et al. (2000) analisaram minhocas em solo contaminado com chumbo e tratadas com fosfatos. O estudo revelou uma redução parcial (30%) do acúmulo de chumbo nestes organismos e formação de piromorfita. ARNICH et al (2003), realizando experimentos *in vitro*, demonstraram a capacidade da hidroxiapatita sintética de reter Pb, formando piromorfita. Os autores supõem que isto possa ocorrer pela troca do Ca^{2+} pelo Pb^{2+} na hidroxiapatita, formando piromorfita. Os mesmo autores, realizando estudos *in vivo*, com ratos distribuídos em quatro grupos: controle, grupo que recebeu hidroxiapatita, grupo que recebeu chumbo e grupo que recebeu chumbo e hidroxiapatita, durante 31 dias via gavagem, verificaram que a hidroxiapatita foi efetiva na imobilização do chumbo produzindo uma forma insolúvel (piromorfita). As concentrações de Pb em vários órgãos testados (sangue, intestino, fígado, rins, baço, encéfalo, ossos) foram reduzidas nos animais tratados com hidroxiapatita sintética.

Há duas teorias para explicar os mecanismos de conversão da hidroxiapatita em piromorfita. O primeiro segue a linha da dissolução/precipitação, onde a apatita pode prover fosfatos (MA, TRAIANA, LOGAN, 1993; MA et al., 1994a, MA, TRAIANA, LOGAN,

1994b, MA, LOGAN, TRAIANA, 1995; RUBY et al., 1994; LAPERCHE et al., 1996; LAPERCHE et al., 1997; CHEN et al., 1997; ZHANG, RYAN, YANG, 1998; ZHANG, RYAN, 1998; ZHANG, RYAN 1999a, ZHANG, RYAN 1999b). A reação principal segue a equação: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 14 \text{H}^+ \rightarrow 10\text{Ca}^{2+} + 6\text{H}_2\text{PO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O}$ (dissolução da hidroxiapatita) e $10\text{Pb}^{2+} + 6\text{H}_2\text{PO}_4^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pb}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 14\text{H}^+$ (precipitação da piromorfita). O segundo mecanismo segue a hipótese da troca de íons. O chumbo poderia ser absorvido primeiro na superfície da partícula de apatita e posteriormente por difusão, haveria troca de cátions, do Ca^{2+} da apatita pelo Pb^{2+} (SUZUKI, ISHIGAKI, MIYAKE., 1984; MIYALKE, ISHIGAKI, SUZUKI, 1986; TAKEUCHI, ARAI, 1990; SHASHKOVA et al., 1999; SUGYIAMA et al., 1999). A reação seria: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + x\text{Pb}^{2+} \rightarrow (\text{Ca}_{10-x}\text{Pb}_x)(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + x\text{Ca}^{2+}$ (SHASHKOVA et al., 1999). SANDRINE et al. (2007) apresentaram resultados cinéticos mostrando a entrada de chumbo na hidroxiapatita, formando o composto piromorfita, exemplificado por meio da fórmula $\text{Ca}_{10-x}\text{Pb}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Estas duas hipóteses explicariam o porquê da efetividade da hidroxiapatita em prevenir os malefícios do Pb sobre a resistência, densidade e microarquitetura óssea (figuras 5, 6, 7, 8, 17, 18 e 19 e tabelas 3, 4, 5, 6, 15, 16, 17 e 18), encontrado em nosso estudo.

Em outra vertente, a interação dos metais pesados com grupos sulfídricos, resulta em alteração de atividades enzimáticas como, por exemplo, das metaloproteinases de matriz (MMPs), fundamentais ao processo de remodelamento tecidual (SOUZA, GERLACH, LINE, 2000; VU, WERB, 2000). Estas MMPs são uma classe de endopeptidases (enzimas proteolíticas) dependentes de cálcio e/ou zinco responsável pela manutenção da matriz (GEORGE, DWIVEDI, 2004; ORTEGA et al., 2004; COLLINS et al., 2005). A expressão dessa classe enzimática é regulada por fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias produzidas durante o remodelamento tecidual (KOSKINEN et al., 2001; STERNLICHT, WERB, 2001; BERNAL, HARTUNG, KIESSEIER, 2005; PAGE-MCCAW, EWALD, WERB, 2007; VERNA, HANSCH, 2007). Fisiologicamente, há baixos níveis circulantes de MMPs e estas proteínas encontram-se na forma latente. Além disso, no processo de ativação, apresentam função de manutenção do remodelamento fisiológico do tecido (MOTT, WERB, 2004; JONES et al., 2006). Ademais, destacamos o tipo 2 de MMP (MMP-2) que apresenta um papel fundamental na manutenção da homeostase do tecido conjuntivo em órgãos que contém esse tipo de tecido em sua predominância (CARMELI et al., 2004), inclusive o tecido ósseo (RUNDHAUG, 2005). Portanto, sabendo que o tecido conjuntivo tem papel fundamental na manutenção da força dos tecidos, este fato permite pressupor que MMPs (principalmente a tipo 2) podem desempenhar papel fundamental no tecido ósseo, um tecido

com predominância conjuntiva em sua fisiologia, visto que há descrição fundamentada na literatura da presença da atividade de proteases no desenvolvimento ósseo (ORTEGA, BEHONICK, WERB, 2004).

Entretanto, pouco se sabe sobre o papel da MMPs no tecido ósseo. Baseado em estudos que envolvem MMPs em diversos tecidos com predominância conjuntiva (como o músculo esquelético, tendíneo e ósseo) (KERIF et al., 1999; KJAER, 2004; MARQUETI et al., 2008; TANG et al. 2012), a hipótese, apesar de não estabelecida, é que após a contaminação com metais pesados, como o chumbo, as células osteoprogenitoras são ativadas e expressam as MMPs. Isso permite o desencadeamento de uma série de eventos relacionados à regeneração tecidual, provavelmente devido a degradação de colágeno do tecido ósseo (NAGASE, WOESSNER, 1999). Isso explicaria o aumento da atividade de MMP-2 (que em sua isoforma ativa, regula a atividade da MEC, promovendo papel fundamental na manutenção do tecido conjuntivo) no grupo contaminado com chumbo e o efeito protetor da hidroxiapatita e do resveratrol (figuras 24, 25 26 e 27 e tabelas 23 e 24), que são capazes de inibir o aumento da atividade de MMP-2 como evidenciados nos grupos que receberam estes tipos de tratamentos. Não obstante, o aumento da atividade de MMP-2 pode representar positividade (em caráter biológico), pois está associado à regeneração do tecido ósseo, tornando-se um importante mecanismo de adaptação fisiológica e explicando os resultados encontrados neste estudo.

Algumas evidências apontam a interação entre este grupo enzimático de metaloproteinases e o tecido ósseo. HE et al. (2013) afirmam que osteoclastos produzem MMP-9, sendo esta enzima degradadora de colágeno. Os mesmos autores sugerem que a MMP-9 desempenha um papel importante na degradação da matriz extracelular e está associada ao processo de remodelamento do tecido. Uma vez que a MMP-9 é altamente expressa em osteoclastos, esta enzima torna-se uma candidata viável para regular parte das funções de remodelamento do tecido. Outros autores corroboram com o fato que as MMPs (tipo 2 e 9) participam efetivamente da reabsorção óssea (HILL et al., 1994; BRECKON et al., 1995). COLLINS et al., 2005, evidenciaram participação de metaloproteinases (inclusive tipo 2) na degradação de matriz de tecido conjuntivo em suturas cranianas de ratos. MOSIG, MARTIGNETTI (2013) confirmam em seu estudo que a desregulação da atividade proteolítica de MMPs-2 medeiam defeitos no tecido ósseo e da atividade celular (inibição da proliferação osteoblástica). Ademais, este estudo confirmou a regulação direta de proteínas ósseas (osteopontina e sialoproteínas) pelas MMPs-2, proteínas fundamentais para o processo de mineralização óssea (via regulação da atividade celular óssea de osteoclastos e

osteoclastos). Esta hipótese de comprometimento da regulação protéica, interferindo diretamente na função celular, explicaria nossos achados de reduções da resistência óssea (figuras 5, 6, 7 e 8 e tabelas 3, 4, 5 e 6), de densidade do osso e comprometimento da microarquitetura óssea (figuras 17, 18 e 19 e tabelas 15, 16, 17 e 18).

Reforçando esta teoria, TANG et al. (2012) discutiram a importância da manutenção da qualidade da matriz cortical óssea efetuada pela MMP-13. Os resultados do estudo mostram que a perda da MMP-13 reduz a resistência à fratura de ossos longos, independente de mudanças do metabolismo ósseo mediadas pela formação (osteoblastos) e reabsorção óssea (osteoclastos). Isso demonstra o papel fundamental das MMPs na manutenção da qualidade do tecido ósseo, corroborando com todos os nossos resultados relacionados à qualidade do tecido ósseo.

Ainda é possível, em alguns estudos, evidenciar a interação do Pb com metaloproteinases e a função celular. BARBOSA, GERLACH, TANUS-SANTOS (2006) mostraram correlação positiva entre contaminação com Pb e aumento da atividade de MMPs-9 no plasma de ratos contaminados. LAHAT et al. (2002) evidenciaram a interação do Pb com citocinas pró-inflamatórias e fatores de necrose tumorais. Esta interação mediada pela atividade de MMPs-9 levaram a alterações celulares com o aumento da apoptose celular.

ORTEGA et al. (2003) e ORTEGA, BEHONICK, WERB (2004), em estudos de revisão, mostram evidências da função de remodelamento de MMPs no processo de ossificação endocondral (como mediar o recrutamento, comunicação e comportamento de diferentes tipos celulares ao longo deste processo). O desenvolvimento ósseo prejudicado de camundongos com deficiência em um ou vários tipos de MMPs (ossos longos), como argumentado neste estudo, permite uma melhor compreensão da função molecular da protease durante a formação do osso e demonstra uma explicação plausível para nosso achados ósseos que evidenciaram uma redução de desenvolvimento de ossos longos (figuras 11 e 12 e tabela 9 e 10). O efeito protetor da hidroxiapatita e do resveratrol poderia atuar diretamente na atividade proteolítica desta classe enzimática de metaloproteinases.

Em suma, nós revisamos os intrínsecos e complexos mecanismos que podem envolver a contaminação com chumbo, nos mais variados sistemas orgânicos. O principal foco do estudo foi discutir os principais meios de interação entre o chumbo, o tecido ósseo e os efeitos de duas propostas de tratamento (hidroxiapatita e resveratrol). Desta forma, os mecanismos apontados na discussão deste estudo, demonstram fortes evidências da potencialidade do chumbo em prejudicar a qualidade do tecido ósseo, via interação com células ósseas e outros sistemas. Sugerimos que diversos mecanismos moleculares, celulares e estruturais podem ser

direta e indiretamente comprometidos pelo efeito da contaminação com a chumbo, afetando a qualidade do tecido ósseo. E, verificamos a capacidade dos dois tratamentos em prevenir os efeitos adversos no tecido ósseo à contaminação com chumbo, seja por inibição de processos relacionados ao estresse oxidativo que estão associados ao resveratrol, seja pelos mecanismos de substituição iônica do cálcio da hidroxiapatita pelo íon chumbo, provando a potencial eficácia do resveratrol e da hidroxiapatita, como fontes potenciais de tratamento para quadros de contaminações com chumbo.

6 CONCLUSÕES

As análises da contaminação com 250 mg/kg MC de acetato de chumbo e o tratamento com 100 mg/kg MC de hidroxiapatita e 0,7 mg/kg MC de resveratrol respectivamente, permitiram observar que:

- O tratamento com 250 mg/kg MC de acetato de chumbo foi efetivo em promover a incorporação e aumento da concentração desse metal no tecido ósseo para as duas doses propostas.
- Não houve alteração da massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais;
- Redução dos parâmetros biomecânicos ósseos (carga máxima, rigidez) de fêmures e das quintas vértebras lombares do grupo experimental contaminado que foi prevenido pelos tratamentos com hidroxiapatita ou resveratrol nas doses propostas;
- Redução dos parâmetros biométricos ósseos (comprimento, diâmetro maior e menor) de fêmures (sem reduções em vértebras) que foi prevenido pelos tratamentos com hidroxiapatita ou resveratrol nas doses propostas;
- Não houve alterações dos parâmetros biofísicos ósseos (fêmures e vértebras);
- Redução do número e espessura trabecular com aumento de espaço entre trabéculas (parâmetros microtomográficos ósseos) das quintas vértebras lombares do grupo contaminado em relação aos outros grupos experimentais. Houve prevenção da resposta dos parâmetros microtomográficos pelos tratamentos com hidroxiapatita ou resveratrol nas doses propostas;
- Redução da densidade radiográfica das quartas vértebras lombares do grupo animal contaminado com 250 mg de acetato de chumbo/kg MC.
- Redução do conteúdo de cálcio das quintas vértebras lombares do grupo animal contaminado com 250 mg de acetato de chumbo/kg MC;
- Aumento das concentrações de Pb (fêmures e plasma sanguíneo) do grupo animal contaminado com 250 mg de acetato de chumbo/kg MC, que foram reduzidas pelos tratamentos com hidroxiapatita ou resveratrol nas doses propostas;
- Aumento da atividade proteolítica de metaloproteinases tipo 2 do extrato de tecido ósseo do grupo animal contaminado com 250 mg de acetato de chumbo/kg MC, que foi reduzida pelos tratamentos com hidroxiapatita ou resveratrol nas doses propostas.

Em suma, a contaminação com acetato de chumbo na dose proposta (250 mg/kg MC) durante 8 semanas, provocou incorporação e aumento da concentração de chumbo nos ossos dos animais tratados, não provocando alteração da massa corporal dos ratos, pois não houve alteração da massa dos animais contaminados. Entretanto houve uma redução do desenvolvimento ósseo de fêmures dos animais contaminados, pois houve alteração dos parâmetros biométricos (comprimento, diâmetro maior e menor da diáfise femoral). Houve ainda, redução da densidade radiográfica óssea de vértebras, que pode ter contribuído para a alteração dos parâmetros biomecânicos (fêmures e vértebras): carga máxima e rigidez (por meio de mecanismos endócrinos e estruturais) e que estão diretamente relacionados ao comprometimento da microarquitetura óssea evidenciada por meio dos parâmetros microtomográficos. Isto demonstra claramente que esta redução da resistência óssea, da densidade óssea e do contingente trabecular, caracteriza um quadro osteopênico para os animais contaminados. Ademais, as alterações de cálcio ósseo reforçam a hipótese de mecanismos endócrinos envolvidos com a contaminação com chumbo e alterações do tecido ósseo. Ainda, o aumento da atividade proteolítica de metaloproteinases tipo 2 do extrato de tecido ósseo do grupo animal contaminado indica o envolvimento de alterações moleculares nas alterações ósseas causadas por chumbo.

As alterações ósseas provocadas pela contaminação com 250 mg de acetato de chumbo/kg MC foram prevenidas pelos tratamentos com 100 mg/kg MC de hidroxiapatita ou 0,7 mg/kg MC de resveratrol, evitando portanto, os efeitos deletérios da contaminação com chumbo na dose proposta. Desta forma, os resultados apontam a hidroxiapatita e o resveratrol como potenciais agentes no tratamento da contaminação com chumbo, evitando os prejuízos à qualidade do tecido ósseo provocadas por este elemento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, K. A.; CLEMENT, M. V.; PERVAIZ, S. Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1010, p. 365-73, 2003.

ANDERSON, C.; DANYLCHUK, K. D. The effects of chronic low level lead intoxication on the haversian remodeling system in dogs. **Laboratory Investigation: a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 37, p. 466-469, 1977.

ALMEIDA, M. et al. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 41342-41351, 2007.

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

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

ARNICH, N. et al. In vitro and in vivo studies of lead immobilization by synthetic hydroxyapatite. **Environmental Pollution**, v. 124, p. 139-149, 2003.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for lead. **U.S. Department of Health and Human Services**, august 2007.

AUFDERHEIDE A. C. WITTMERS L. E. Selected aspects of the spatial distribution of lead in bone. **Neurotoxicology**, v. 13, p. 809-819, 1992.

BÄCKESJÖ, C. M.; LI, Y., LINDGREN, U.; HALDOSÉN, L. A. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21 p. 993-1002, 2006.

BAGCHI, D.; PREUSS, H. G. Effects of acute and chronic oral exposure of lead on blood pressure and bone mineral density in rats. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, p. 1155-1164, march 2005.

BAI, X. C. et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells ERK and NF-Kappa B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p. 197-207, 2004.

BALLATORI, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 689-694, 2002.

BARBOSA Jr. F. et al. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead : advantages, limitations and future needs. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p. 1669-1674, december 2005.

BARBOSA, F. Jr.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Matrix metalloproteinase-9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98(6), p. 559-564, 2006.

BARRY, P.S.I., A comparison of concentration of lead in human tissues. **British Journal of Industrial Medicine**, v.32, p.119-139, 1975.

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

HE, B.; HU, M.; LI, S. D.; YANG, X. T.; LU, Y. Q.; LIU, J. X.; CHEN, P.; SHEN, Z. Q. Effects of geraniin on osteoclastic bone resorption and matrix metalloproteinase-9 expression. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23(3), p. 630-634, 2013.

BEATTIE, J. H. et al. Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. **Toxicology Letters**, v. 157, p. 69-78, 2005.

BERNAL, F.; HARTUNG, H. P.; KIESSEIER, B. C. Tissue mRNA expression in rat of newly described matrix metalloproteinases. **Journal of Biological Research**, v. 38, p. 267-271, 2005.

BERG, B. N.; HARMISSON, C. R. Growth, disease, and aging in the rat. **Journals of Gerontology**, v. 12, n. 4, p. 370-377, oct. 1957.

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

BHAT, K. P. L.; KOSMEDER, J. W.; PEZZUTO, J. M. Biological effects of resveratrol **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 3, n. 6, p. 1041-1064, 2001.

BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**. Academic Press. San Diego, Califórnia, capítulo 1, p. 11-13, 1996.

BLEECKER, M. L. et al. Effect of lead exposure and ergonomic stressors on peripheral nerve function. **Environmental Health Perspective**, v. 113, p. 1730-1734, december 2005.

BOND, L. et al. Reactive oxygen production by cultured rat glomerular mesangial cells during phagocytosis associated with stimulation of lipoxygenase activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 158, p. 1836-1852, 1993.

BONEWALD, L. F. Osteocyte biology: its implications for osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 4, n. 1, p. 101-104, 2004.

BOYCE, B. F.; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Res Ther.**, 9 Suppl 1:S1, 2007.

BOYDE, A. et al. Mineral density quantitation of the human cortical iliac crest by back-scattered electron image analysis – Variations with age, sex and degree of osteoarthritis. **Bone**, v. 16, p. 619-627, 1995.

BOYDE, A. et al. The effects of estrogen suppression on the mineralization density of iliac crest biopsies in young women as assessed by backscattered electron imaging. **Bone**, v. 22, p. 241–250, 1998.

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.

BRADBEER, J.N. et al. Relationship between the location of osteoblastic alkaline phosphatase activity and bone formation in human iliac crest bone. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 7, p. 905–912, 1992.

BRADBEER, J. N.; LINDSAY, P. C.; REEVE, J. Fluctuation of mineral apposition rate at individual bone-remodeling sites in human iliac cancellous bone: independent correlations with osteoid width and osteoblastic alkaline phosphatase activity. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 9, p. 1679–1686, 1994.

BRANDÃO, R. et al. Antioxidants and metallothionein levels in mercury-treated mice. **Cell Biology Toxicology**, v. 22, p. 429-438, 2006.

BRASIL. **Balanco mineral brasileiro: chumbo**. 2001. Acesso disponível em <<http://www.dnpm.gov.br/>>- acessado em novembro de 2008.

BRECKON, J. J.; HEMBRY, R. M.; REYNOLDS, J. J.; MEIKLE, M. C. Matrix metalloproteinases andTIMP-1 localization at sites of osteogenesis in the craniofacial region of the rabbit embryo. **Anatomical Record**, v. 242, p. 177–187, 1995.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. Homocysteine, system b^{0,+} and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. **The American Journal of Pathology**, v. 4, p. 1385-1394, 2004.

BRONNER, F. Metals in Bone: Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lead, Silicon and Strontium. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**. Academic Press. San Diego, Califórnia, cap. 22, p. 359-369, 2002.

BRZÓSKA, M. M.; JAKONIUK, J. M. Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, p. 195– 211, 2005.

BURBURE, C. et al. Renal and neurologic effects of cadmium, lead, mercury, and arsenic in children: evidence of early effects and multiple interactions at environmental exposure levels. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 584-590, april 2006.

BURCK, A. B. et al. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. **Calcified Tissue International**, v. 77, p. 167-174, 2005.

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

BUSHINSKY, D. A. Acid-base imbalance and the skeleton. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, p. 238-244, 2001.

BÜSSELBERG, D. et al. Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of Aplysia neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 65, p. 786-795, 1991.

CANFIELD, R. L. et al. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. **New England Journal of Medicine**, v.348, p. 1517-1526, 2003.

CAMPBELL, J. R. et al. The association between environmental lead exposure and bone density in children. **Environmental Health Perspective**, v. 112, n. 11, p. 1200-1203, 2004.

CARDELLINI, M. et al. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1. **Diabetes**, v. 58, 0. 2396-2401, 2009.

CARMELI, E.; MOAS, M.; REZNICK, A. Z.; COLEMAN, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. **Muscle Nerve**, v. 29, p. 191-197, 2004.

CARVALHO, F. M. et al. Blood lead levels in children and environmental legacy of a lead foundry in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 13 p. 19-23, 2003.

ÇELIK, A.; ÖGENLER, O.; ÇÖMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, v.20, p. 411-415, august 2005.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). **Ficha de informação sobre produto químico: acetato de chumbo**. janeiro 2001.

CHEN, A. et al. IQ and Blood Lead from 2 to 7 Years of Age: Are the Effects in Older Children the Residual of High Blood Lead Concentrations in 2-Year-Olds? **Environmental Health Perspectives**, v.113, p. 597-601, 2005.

CHEN, X. et al. Effects of pH on heavy metal sorption on mineral apatite. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 624–631, 1997.

CONFAVREUX, C. B. Interactions between bone tissue and energy metabolism. **Joint Bone Spine.** ; 77(4):287-9, 2010.

CONFAVREUX, C. B. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. **Kidney Int Suppl.** v. 121, p. 14-9, 2011.

COLLINS, J. M.; RAMAMOORTHY, K.; SILVEIRA, A.; PATSTON, P. MAO J. J. Expression of matrix metalloproteinase genes in the rat intramembranous bone during postnatal growth and upon mechanical stresses. **Journal of Biomechanics**, v. 38, p. 483-490, 2005.

COWI (Consultancy within Engineering, Environmental Science and Economics). Lead Review. **Nordic Council of Ministers**, january 2003.

CURREY, J. D.; BREAR, K.; ZIOUPS, P. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. **Journal of Biomechanics**, v. 29, p. 257-260, 1995.

DAI, Z. et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. **Phytomedicine**, v. 14, p. 806-814, 2007.

DE JESUS SOARES, T. et al. Effects of resveratrol on glycerol-induced renal injury. **Life Sciences**, v.81, p. 647-656, 2007.

DEL FATTORE A, CAPANNOLO M, RUCCI N. Bone and bone marrow: the same organ. **Arch Biochem Biophys**. Nov 1, 503(1):28-34, 2010.

DIETER et al. Comparison of lead bioavailability in F344 rats fed lead acetate, lead oxide, lead sulfide or lead ore concentrate from Skagway, Alaska. **Journal of Toxicological and Environmental Health**, v. 39, p. 79-93, 1993.

DINIS, T. C. P.; ALMEIDA, L. M., MADEIRA, V. M. C. Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effect on functional and biophysical properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 301, p. 256–264, 1993.

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

DOREA, J. G.; DONANGELO, C. M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 369-376, junho 2006.

DOWD, T. L. et al. The displacement of calcium from osteocalcin at submicromolar concentrations of free lead. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1226, p. 131-137, may 1994.

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

EISENSTEIN, R.; KAWANOUE S. The lead line in bone – a lesion apparently due to chondroclastic indigestion. **American Journal of Pathology**, v. 80, p. 309-16, 1975.

EL-ASHMAWY I. M. et al. Protection by turmeric and myrrh against liver oxidative damage and genotoxicity Induced by lead acetate in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.98, p. 32-27, 2006.

ELLIS, D. E. et al. A theoretical and experimental study of lead substitution in calcium hydroxyapatite. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.8, p. 967-976 , 2006.

ELMALI, N. et al. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. **Inflammatory Research**, v.54, p.158-162, 2005.

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

ERIKSEN, E.F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev Endocr Metab Disord**. Dec, 11(4):219-27, 2010.

ESCRIBANO, A. et al. Effect of lead on bone development and bone mass: a morphometric, densitometric, and histomorphometry study in growing rats. **Calcified Tissue International**, v. 60, p. 200-203, 1997.

FAZAKAS, Z.; LENGYEL, Z.; NAGYMAJTÉNYI, L., Combined effects of subchronic exposure to lead, mercury and alcohol on the spontaneous and evoked cortical activity in rats. **Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju**, v. 56, n.3, p.249-256, September 2005.

FERGUSON, S. A. et al. Minimal behavioral effects from moderate posnatal lead treatment in rats. **Neurotoxicology Teratology**, v. 20, p. 637-643, 1998.

FERNANDEZ, I. et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v. 11, p. E47-E51, 2006a.

FERNANDEZ, I. et al. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v. 11, p. E151-E157, 2006b.

FERRI, A. et al. Iron, zinc and copper levels in brain, serum and liver of neonates exposed to 2,2-dichlorophenoxyacetic acid. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 607-613, 2003.

FOX, M. R. S. Assessment of cadmium, lead and vanadium status of large animals as related to the human food chain. **Journal of Animal Science**, v. 65, p. 1744-1752, 1987.

FRANCO-NETTO et al. Human health risk reduction due to lead exposure in Brazil. **Salud Pública de Mexico**, v. 45, p. S255-S258, 2003.

FRÉMONT, L. Biological effects of Resveratrol. **Life Sciences**, v. 14, n. 66, p. 663-673, 2000.

FULLMER, C. S. Intestinal calcium and lead absorption: effects of dietary lead and calcium. **Environmental Research**, v. 54, p. 159-168, april 1991.

GEORGE, S. J.; DWIVEDI, A. MMPs, cadherins, and cell proliferation. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.14, p.100-105, 2004.

GIAMMAR, D. E.; XIE, L.; PASTERIS, J. D. Immobilization of Lead with Nanocrystalline Carbonated Apatite Present in Fish Bone. **Environmental Engineering Science**, v. 25, p. 725-736, 2008.

GONZÁLEZ-RIOLA, J. et al. Effect of lead on bone and cartilage in sexually mature rats: a morphometric and histomorphometry study. **Environmental Research**, v.74, p. 91-93, 1997.

GORELL, J. M. et al. Occupational metal exposures and the risk of Parkinson's disease. **Neuroepidemiology**, v.18, p. 303-308, 1999.

GRAZIANO, J. H. Validity of lead exposure markers in diagnosis and surveillance. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 1387-1390, 1994.

GUNSHIN, H. et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v. 31, p. 482-488, 1997.

HALL, B. K. **Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology**. Elsevier, 800 p., 2005.

HAMILTON, J. D.; O'FLAHERTY, E. J. Influence of lead on mineralization during bone growth. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.26, p. 265-271, july 1995.

HAN, S. et al. Effects of lead exposure before pregnancy and dietary calcium during pregnancy on fetal development and lead accumulation. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 527-531, june 2000.

HAN, S. et al. Effects of weight loss and exercise on the distribution of lead and essential trace elements in rats with prior lead exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 657-662, august 1999.

HAN, S. et al. Lead exposure at an early age substantially increases lead retention in the rat. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 412-417, april 1997.

HICKS et al. Effects of lead on growth plate chondrocyte phenotype. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 140, p.164-172, 1996.

HILL, P. A.; MRUPHY, G.; DOCHERTY, A.; HEMBRY, R. M.; MILLICAN, T. A.; REYNOLDS, J. J.; MEIKLE, M. C. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 3055–3064, 1994.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone Remodeling. **British Journal of Orthodontics**, v. 25, p. 101-107, 1998.

HSU, F. S. et al. Lead inclusion bodies in osteoclasts. **Science**, v. 181, p. 447-448, 1973.

HU, H. et al. The epidemiology of lead toxicity in adults: measuring dose and consideration of other methodologic issues. **Environmental Health Perspective**, v. 115, p. 455-462 march 2007.

HU, H. et al. The relationship of bone and blood lead to hypertension: the normative aging study. **Jama**, v.275, p. 1171-1176, 1996.

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.

IPCS (International Programme on Chemical Safety). Environmental Health Criteria 165 – Inorganic Lead. **World Health Organization**, Geneva, Suíça, 1995.

JANG, S. H. et al. Preparation and lead ion removal property of hydroxyapatite/polyacrylamide composite hydrogels. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, p. 294-299, november, 2008.

JARRAR, B. M.; MAHAMOUD, Z. N. Histochemical demonstration of changes in the activity of hepatic phosphatases induced by experimental lead poisoning in male white rats (*Rattus norvegicus*). **Toxicology and Industrial Health**, v. 16, p. 7–15, 2000.

JARREL, J. F. et al. Maternal lead exposure and the secondary sex ratio. **Human Reproduction**. v. 21, p. 1901-1906, july 2006.

JIN, G. B. et al. Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 185, p. 98-110, 2002.

KALU, D. N. et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, v. 124, n. 1, p. 7-16, 1989.

KAMEL, F. et al. Association of lead exposure with survival in amyotrophic lateral sclerosis. **Environmental Health Perspective**, v. 116, p. 943-947, july 2008.

KANIS, J.A. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. **Bone**, 19(5): 185S-190S, 1998.

KAPLAN, P. et al. Change in fluidity of brain endoplasmic reticulum membranes by oxygen free radicals: a protective effect of stobadine, α -tocopherol acetate, and butylated hydroxytoluene. **Neurochemical Research**, v. 20, p. 15–820, 1995.

KARSENTY G. Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 10, p. 720-724, 2011.

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.

KEMPINAS, W. G. et al. Time-dependent effects of lead on rat reproductive functions. **Journal of Applied Toxicology**, v. 14, p. 427-433, 1994.

KERIF, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. **Developmental Biology**, v. 205, p. 158-170, 1999.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 84-89, 2004.

KLEIN, D. Et al. Effects of toxic levels of lead on gene regulation in the male axis: increase in messenger ribonucleic acids and intracellular stores of gonadotrophs within the central nervous system. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 802-811, 1994.

KOLLER, L. D.; ROAN, J. G. Effect of lead, cadmium and methylmercury on immunologic memory. **Journal Environmental Pathology and Toxicology**, v. 4, p. 47-52, 1980.

KOSKINEN, S. O.; HÖYHTYÄ, M.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T.; MARTIKKALA, V.; MÄKINEN, T. T.; OKSA, J.; RINTAMÄKI, H.; LÖFBERG, M.; SOMER, H.; TAKALA, T. E. Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 11(1) p. 9-15, 2001.

KUPISIEWICZ, K. et.al. Potential of resveratrol analogues as antagonists of osteoclasts and promoters of osteoblasts. **Calcified Tissue International**, v.87, n.5, p.437-49, 2010.

KRIEG Jr., E. F. The relationships between blood lead levels and serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in the third National Health and Nutrition Examination Survey. **Environmental Research**, v. 104, p. 374-382, July 2007.

LAHAT, N.; SHAPIRO, S.; FROOM, P.; KRISTAL-BONEH, E.; INSPECTOR, M.; MILLER, A. Inorganic lead enhances cytokine-induced elevation of matrix metalloproteinase MMP-9 expression in glial cells. **Journal of Neuroimmunology**, v.132(1-2), p. 123-128, 2002.

LAPERCHE, V. et al. 1996. Chemical and mineralogical characterizations of Pb in a contaminated soil: reactions with synthetic apatite. **Environmental Science and Technology** v. 30, p. 3321–3326, 1996.

LAPERCHE, V. et al. Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 2745–2753, 1997.

LEI, M.; LIU, S. Q.; LIU, Y. L. Resveratrol protects bone marrow mesenchymal stem cell derived chondrocytes cultured on chitosan-gelatin scaffolds from the inhibitory effect of interleukin-1beta. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29 (11), p. 1350-1356, 2008.

LEOPOLA, V. T. et al. Long-term effects of clodronate on growing rat bone. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 191-196, 1996.

LI X., et al. The action of resveratrol, a phytoestrogen found in grapes, on the intervertebral disc. **Spine**, v. 33, n. 24, p. 2586-2595, 2008.

LIAO, Y. et al. Therapeutic potentials of combined use of DMSA with calcium and ascorbic acid in the treatment of mild to moderately lead intoxicated mice. **Biomaterials**, v.21, p. 1-8, February 2008.

LIN, J. L. et al., Environmental lead exposure and progression of chronic renal diseases in patients without diabetes. **New England Journal Medicine**, v. 348, n. 4, p. 277-286, 2003.

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

LOUZADA, M. J. Q. **Densitometria Radiográfica**. 2009. 65f. Tese Livre Docência. Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.

LOUZADA, M. J. Q. et al. Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. **Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Biomédica**, v.14, n.2, p. 37-47, 1998.

LOUZADA, M. J. Q. et al. Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. **Revista Brasileira de Engenharia - Caderno de Engenharia Biomédica**, v.14, n.1, p.47-64, 1998.

LOVERIDGE, N. Bone: More Than Stick. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 190-196, 1999.

MA, Q. Y. et al. Effects of NO_3^- , Cl^- , F^- , SO_4^{2-} , and CO_3^{2-} on Pb^{2+} immobilization by hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 408– 418, 1994a.

MA, Q. Y.; LOGAN, T. J. TRAIANA, S. J. Lead immobilization from aqueous solutions and contaminated soils using phosphates rocks. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 1118–1126, 1995.

MA, Q. Y.; TRAIANA, S. J.; LOGAN, T. J. Effects of aqueous Al, Cd, Cu, Fe (II), Ni and Zn on Pb immobilization by hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 1219–1228, 1994b.

MA, Q. Y.; TRAIANA, S. J.; LOGAN, T. J. In situ lead immobilization by apatite. **Environmental Science and Technology**, v. 27, p. 1803–1810, 1993.

MACGREGOR, J. T. et al. Integration of cytogenetic assays with toxicology studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, p. 328 – 337, may 1996.

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1301-1305, 2003.

MAHAFFEY, K. R. et al. Association between age, blood lead concentrations, and serum 1,25-dihydroxycholecalciferol levels in children. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 35, p. 1327-1331, 1982b.

MAHAFFEY, K. R. Nutritional factors and susceptibility to lead toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 7, p. 107-112, may 1974.

MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis. The Bone Organ System**, p. 3-22. Academic Press. San Diego USA. Einhorn, 1996.

MARQUETI, R. C.; PRESTES, J.; STOTZER, U. S.; PASCHOAL, M.; LEITE, R. D.; PEREZ, S. E.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **Int J Sports Med.**, vol. 29 (7), p. 559-63, 2008.

MARTIN, D. et al. Association of blood lead and tibia lead with blood pressure and hypertension in a community sample of older adults. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, p. 467-478, march 2006.

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

MARTINI, F. H. **Fundamentals of anatomy and physiology**. 4^a edition. New Jersey, Prentice Hall, 1123 p., 1998

MELTON III, L. J. et al. Osteoporosis and the risk of hip fracture. **American Journal of Epidemiology**, v. 124, p. 254-261, 1986.

MENG Y, MA QY, KOU XP, XU J. Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28;11(4) p. 525-528, 2005.

MESTEK, O. et al. Accumulation of lead in tissues after its administration in drinking water to laboratory rats. 1998. **Physiological Research**, v. 47, p. 197-202, 1998.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochemical Journal**, v. 15, p. 1-13, 2007.

MIELKE, H. W.; HENEGHAN, J. B. Selected chemical and physical properties of soils and gut physiological processes that influence lead bioavailability. **Chemical Speciation Bioavailability**, v. 3, p. 129-134, 1991.

MIZUTANI, K.; IKEDA, K.; KAWAI, Y.; YAMORI, Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical Biophysical Research Communications** v. 253, p. 859-863, 1998.

MIZUTANI, K.; IKEDA, K.; KAWAI, Y. Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology** v. 46, p. 78-83, 2000.

MIYAHARA, T. et al. Effects of lead on osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cell cultures. **Calcified Tissue International**, v. 54, p.165-169, 1994.

MIYAHARA, T. et al. Stimulation effects of lead on bone resorption in organ culture. **Toxicology**, v. 97, p. 191-197, 1995.

MIYALKE, M.; ISHIGAKI, K.; SUZUKI, T. Structure refinement of Pb²⁺ ion-exchanged apatites by X-ray powder pattern-fitting. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 61, p. 230–235, 1986.

MODY, N. et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. **Free Radical Biology Medicine**, v. 31, p. 509-519, 2001.

- MOHAR, D. S.; MALIK, S. The Sirtuin System: The Holy Grail of Resveratrol? **Clinical & Experimental Cardiology**, v. 3, p. 1-4, 2012.
- 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, p. 1-6, 1993.
- MOSER, V. C. Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 713-723, 2000.
- MOSIG, R.A.; MARTIGNETTI, J. A. Loss of MMP-2 in murine osteoblasts upregulates osteopontin and bone sialoprotein expression in a circuit regulating bone homeostasis. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6(2), p. 397-403, 2013.
- MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 558-564, 2004.
- MUDIPALLI, A. Lead hepatotoxicity and potential health effects. **Indian Journal Medical Research**, v. 126, p 518-527, december 2007.
- MUKHERJEE, S.; LEKLI, I.; GURUSAMY, N.; BERTELLI, A. A.; DAS, D. K. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. **Free Radical Biological Medicine**, v. 46, p. 573-578, 2009.
- NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 21491–2194, 1999.
- NAM, S. H. et al. H₂O₂ enhances Ca⁺⁺ release from osteoblast internal stores. **Yonsei Medical Journal**, v. 43, n. 2, p. 229-235, 2002.

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

NIES, A. S.; SPILLBERG, S. P. Principles of therapeutics. *In*: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. G.; LIMBIRD, L. E. (Eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, Chapter 3, p. 43-62, 1996.

NOMURA, S.; YAMAMOTO, T. T. Molecular event caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biology**, v. 19, p. 91-6, 2000.

NORDIN, B.E.C. Calcium and Osteoporosis. **Nutrition**, v.13, n.7/8, p.664-686, 1997.

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, p. 436-442, 1994.

NTP. Report on carcinogens background document for lead and lead compounds. **Technology Planning and Management Corporation**, p. 1-228, 2003.

NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS no. 7487-94-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **Research Triangle Park, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP TR 408; NIH Publication No. 91-3139)**, v. 408, p. 1-260, february 1993.

NRIAGU J. O. The rise and fall of leaded gasoline. **Science Total Environmental**, v. 92 p.13-28, 1990.

ODA, N. et al. Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. **Toxicology Letters**, v. 123, p. 143-150, 2001.

O'FLAHERTY, E. J. Physiologically based models for bone-seeking elements. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 118, p.16-29, 1993.

ORTEGA, N.; BEHONICK, D.; STICKENS, D.; WERB, Z. How proteases regulate bone morphogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 995, p. 109-116, 2003.

ORTEGA, N.; BEHONICK, D. J.; WERB Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. **Trends in Cell Biology**, v. 14, p. 86-94, 2004.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8(3), p. 221-33, 2007.

PALUMBO, C. et al. Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 1, n. 4, p. 327-332, 2001.

PAOLIELLO, M. M. B.; DE CAPITANI E. M. Ocupacional and environmental human lead exposure in Brazil. **Environmenral Research**, v.103, p. 288-297, 2007.

PARFITT, A. M.; CHIR, M. B. B. Bone remodeling and bone loss: understanding the pathophysiology of osteoporosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 30, n. 4, p. 789-811, 1987.

PARK, S. K. et al. Low-level lead exposure, metabolic syndrome, and heart rate variability: the VA Normative Aging Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 11, p. 1718-1724, november 2006.

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.

PEARSON, M. S. et al. Bioremediation and biodegradation, effects of soil amendments on the bioavailability of lead, zinc, and cadmium to earthworms. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, p. 1611–1617, 2000.

PEIXOTO, N. C. et al. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. **Lifes Sciences**, v. 81, p. 1264-1271, 2007.

PILLAI, A.; PRIYA. P. N. L.; GUPTA, S. Effects of combined exposure to lead and cadmium on pituitary membrane of female rats. **Archives of Toxicology**, v.76, p. 671-675, december 2002.

POUNDS, J. G.; LONG, G. J.; ROSEN, J. F. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. **Environmental Health Perspectives**, v. 91, p. 17-32, february 1991.

QIAN, Y.; TIFFANY-CASTIGLIONI, E. Lead-induced endoplasmic reticulum (ER) stress responses in the nervous system. **Neurochemical Research**, v. 28, p. 153-162, january 2003.

QUEIROZ, M. L. S. et al. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 889-900, 2003.

RABINOWITZ, M. B. Toxicokinetics of bone lead. **Environmental Health Perspectives**, v. 91, p. 33-77, 1991.

RAISZ, L. G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1353-1358, 1999.

REGISTER, T. C.; WUTHIER, R. E. Effect of L- and D-tetramisole on ^{32}P i and ^{45}Ca uptake and mineralization by matrix enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 922-928, 1984.

REISS, M. L.; HALM, J. K. Lead poisoning in an adult: lead mobilization by pregnancy? **Journal of General Internal Medicine**, v. 22, p. 1212-1215, august 2007.

RENNO, A. C. et al. The effects of a progressive loading exercise program on femoral physical properties and strength of osteopenic rats. **Acta Ortopedica Brasileira**, v. 15, n. 5, p. 276-279, 2007.

ROBLING, A. G.; TURNER, C. H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 562 – 69, 2002.

ROBINSON, R. The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. **Biochemical Journal**, v. 17, p. 286-293, 1923.

RONIS, M. J. J., et al. Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 136, p. 361-71, february 1996.

RONIS, M. J. J., et al. Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. **Toxicology Sciences**, Arkansas, v. 62, p.321-329, may 2001.

ROBEY, P. G.; BOSKEY A. L. The composition of bone. In Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. ed. CJ Rosen, pp. 32–38. Washington, DC: Am. Soc. **Bone Miner. Res.**, 2008.

RUBIN, J.; RUBIN, C.; JACOBS, C. R. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. **Gene**, v. 367, p. 1-16, 2006.

RUBY, M. V. et al. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physically based extraction test. **Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 422–430, 1996.

RUCINSKI, M., et al. Estradiol and resveratrol stimulating effect on osteocalcin, but not osteonectin and collagen-1 α gene expression in primary culture of rat calvarial osteoblast-like cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 18, p. 565-570, 2006.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, p.267–285, 2005.

RYAN, J. A. et al. Formation of Chloropyromorphite in a Lead-Contaminated Soil Amended with Hydroxyapatite, **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3798-3803, 2001.

SAMNERGARD, E.; AKHTER, M. P.; RECKER, R. R. 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.

SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, M. A. S. et al. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, p. 124, 2007.

SANDRINE, B. et al. Removal of aqueous lead ions by hydroxyapatites: equilibria and kinetic processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. A139, p. 443-446, 2007.

SAUK, J. J. et al. Lead inhibits secretion of osteonectin/SPARC without significantly altering collagen or Hsp47 production in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 116, p. 240-247, october, 1992.

SCHANNE F. A.; GUPTA, R. K.; ROSEN, J. F. Lead inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D-3 regulation of calcium metabolism in osteoblastic osteosarcoma cells (ROS 17/28). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1180, p. 187-194, 1992.

SAUVE, A. A. Sirtuin chemical mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804 p. 1591-1603, 2010.

SCHIRRMACHER, K. et al. Effects of Lead, Mercury, and Methyl Mercury on Gap Junctions and Ca^{+2} in Bone Cells. **Calcified Tissue International**, v. 63, p. 134-139, october 1998.

SHAINI, F. J. et al. In vitro evaluation of the effect of freshly mixed amalgam and gallium-based alloy on the viability of primary periosteal and osteoblast cell cultures. **Biomaterials**, v. 21, p. 113-119, 2000.

SHASHKOVA, I. L et al. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions by alkaline-earth metal phosphates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 160, p. 207-215, 1999.

SHEWEITA, S. A.; KHOSHHAL, K. I. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. **Current Drug Metabolism**, v. 8, p. 519-525, 2007.

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

SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31 p. 28-40, 2002.

SILBERGELD, E. K. et al. Lead and osteoporosis: mobilization of lead from bone in postmenopausal women. **Environmental Research**, v. 47, p. 79-94, 1988.

SILBERGELD, E. K. Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation. **Environmental Health Perspective**, v. 91, p. 63-70, 1991.

SINGH, M.; RISHI, S. Plasma acetylcholinesterase as a biomarker of triazophos neurotoxicity in young and adult rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v. 19, p. 417-476, 2005.

SINGH, S. P.; HENDRY, M. J. Characterization of aqueous lead removal by phosphatic clay: equilibrium and kinetic studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 654-662, 2006.

SMICIKLAS, A. et al. Factors influencing the removal of divalent cations by hidroxyapatite. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 876-884, 2008.

SMITH Jr. D. M., MIELKE H. W., HENEGHAN, J. B. Subchronic lead feeding study in male rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 518-528, october 2008.

SOGAARD, C. H., MOSEKILDE, L. I., THOMSEN, J. S., RICHARDS, A., McOSKER, J. E. A comparison of the effects of two anabolic agents (Fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, p. 439-449, 1997.

SOKOL, R. Z; BERMAN, N. The effect of age of exposure on lead induced testicular toxicity. **Toxicology**, v. 69, p. 269-278, 1991.

SOKOL, R. Z.; MADDING, C. E.; SWERDLOFF, R. S. Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 722-728, 1985.

SONTAKE, A. N.; TARE, R. S. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 145-148, 2002.

SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. P. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dental Materials**, v. 16, p. 103-108, 2000.

SRINIVASAN, M.; FERRARIS, C.; WHITE, T. Cadmium and Lead ion capture with three dimensionally ordered macroporous hydroxyapatite. **Environmental Science & Technology**, v. 40, p. 7054-7059, 2006.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Reviews Cell Development Biology**, v. 17, p. 463-516, 2001.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 321-336, 1995.

SUGYIAMA, S. et al. Interdependence of anion and cation exchanges in calcium hydroxyapatite: Pb^{2+} and Cl^- . **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 220, p. 324-328, 1999.

SUN, Y. et al. Osteoporosis in a Chinese population due to occupational exposure to lead. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 51, p. 436-442, march 2008.

SUNDARESAN, N. R. et al. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119 p. 2758-2771, 2009.

SUZUKI, T.; ISHIGAKI, K.; MIYAKE, M. Synthetic hydroxyapatites as inorganic cation exchangers, part 3: exchange characteristics of lead ions (Pb^{2+}). **Journal of Chemical Society**, v. 80, p. 3157-3165, 1984.

TAKAHASHI, N.; MAEDA, K.; ISHIHARA, A.; UEHARA S, KOBAYASHI Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. **Front Biosci**, 16:21-30, 2011.

TAKEUCHI, Y., ARAI, H. Removal of coexisting Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} ions from water by addition of hydroxyapatite powder. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 23, p. 75–80, 1990.

TANG, S. Y.; HERBER, R. P.; HO, S. P.; ALLISTON, T. Matrix metalloproteinase-13 is required for osteocytic perilacunar remodeling and maintains bone fracture resistance. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27(9), p. 1936-1950, 2012.

TATE, M. L. K. et al. The osteocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1-8, 2004.

TENENHOUSE, A.; JOSEPH, L.; KREIGER, N.; POLIQUIN, S.; MURRAY, T.M.; BLONDEAU, L.; BERGER, C.; HANLEY, D.A.; PRIOR, J.C. Estimation of the prevalence of low bone density in Canadian women and men using a population-specific DXA reference standard: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). **Osteoporosis International**, 11:897–904, 2000.

THEVENOD, F.; FRIEDMAN, J. M. Cadmium mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na^+K^+ ATPase through proteasomal and endo/lysosomal proteolytic pathways. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1751–1761, 1999.

THOMAS, V. M. et al. Effects of reducing lead in gasoline: an analysis of the intentional experience. **Environmental Science Technology**, v. 33, p. 3942-3948, 1999.

THOMPSON, D. D. et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4, p. 125s-133s, 1995.

TIMCHALK, C. et al. Disposition of lead (Pb) in saliva and blood of Sprague Dawley rats following a single or repeated oral exposure to Pb-acetate. **Toxicology**, v. 222, p. 86-94, 2006.

TROEN, B. R. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 605-614, 2003.

TUREK, S. L. **Ortopedia. Princípios e sua aplicação.** Traduzido por Alfredo Jorge Cherem, et al. 4 ed, v. 1, São Paulo, Manole, 1991.

TYL, R. W. Toxicity Testing, Developmental. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic Press, v. 3, p. 305-319, 1998.

UNGVÁRY, G.; MORVAI, V.; SZAKMÁRY, E. Haemodynamic effects of lead(II) acetate, ethanol, and their combination in rats. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 75, p. S45-S53, October, 2002.

VAANANEN, H. K. Pathogenesis of Osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v. 49, p. S11-S14, 1991.

VAHTER, M. et al. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. **Environmental Research**, v. 104, n. 1, p. 85-89, 2007.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161-1208, 2005.

VERNA, R. P.; HANSCH, C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical biological functions and (Q)SARs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 2223-2268, 2007.

VOGIATZIS, A. K.; LOUMBOURDIS, N. S. Exposure of rana ridibunda to lead II. Impact of lead on various parameters of liver metabolism of the frog rana ridibunda. **Journal of Applied Toxicological**, v. 21, p. 269-274, 2001.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & Development**, v. 14, p. 2123-133, 2000.

WAALKES, M. P.; HARVEY, M. J.; KLAASSEN, C. D. Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. **Toxicology Letters**, v. 20, p. 33-39, 1984.

WAKEFIELD, J. The lead effect? **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. A-574-A-580, october 2002.

WEISSKOPF, M. G. et al. Cumulative lead exposure and cognitive performance among elderly men. **Epidemiology**, v.18, p. 59-66, 2007.

WHO (World Health Organization). Lead. **World Health Organization**, Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2001.

WINDER, C. Reproductive and chromosomal effects of occupational exposure to lead. **Reproductive Toxicology**, v. 3, p. 221-226, 1989.

WIWANITKIT, V.; SUWANSAKSRI, J. Lead intoxication: a summary of the clinical presentation among thai patients. **BioMetals**, v.19, p. 345-348, 2006.

WURTZ, T. et al. Collagen mRNA expression during tissue development: the temporospatial order coordinates bone morphogenesis with collagen fiber formation. **Matrix Biology**, v. 17, p. 349-360, 1998.

YAMAMOTO, N.; JEE, W. S. S.; MA, Y. F. Bone Histomorphometric Changes in the Femoral Neck of Aging and Ovariectomized Rats. **The Anatomical Record**, n. 243, p. 175-185, 1995.

YONAGA, T. et al. Effect of organic and inorganic mercury compounds on the growth of incisor and tibia in rats. **Anatomischer Anzeiger**, v. 159, p. 373-383, 1985.

YU, C. C.; LIN, J. L.; LIN-TAN, D. T. Environmental exposure to lead and progression of chronic renal diseases: a four-year prospective longitudinal study. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 15, p. 1016-1022, april 2004.

ZALUPS, R. K.; AHMAD, S. Homcysteine and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury: role of basolateral transporter organic anion transporter OAT-1. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, p. 2023-31, 2004.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 113-43, 2000.

ZHANG, P.; RYAN, J. A. Formation of chloropyromorphite from galena (PbS) in the presence of hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 618–624, 1999a.

ZHANG, P.; RYAN, J. A. Formation of pyromorphite in anglesitehydroxyapatite suspension under varying pH conditions. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 3318–3324, 1998.

ZHANG, P.; RYAN, J. A. Transformation of Pb(II) from cerusite to chloropyromorphite in the presence of hydroxyapatite under varying conditions of pH. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 625–630, 1999b.

ZHANG, P.; RYAN, J. A.; YANG, J. In vitro Pb solubility in the presence of hydroxyapatite. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 2763–2768, 1998.

ANEXO I - PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 Comissão de Ética em Experimentação Animal
 Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
 Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
 Fax: (016) 3361.3176
 CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propp@power.ufscar.br - www.propp.ufscar.br

Protocolo CEEA nº 054/2009

Aprovo *ad referendum* da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar, o projeto pesquisa “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA HIDROXIAPATITA E DO RESVERATROL SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATOS CONTAMINADOS COM ACETATO DE CHUMBO**”, elaborado por Keico Okino Nonaka e Fabio Alexandre Casarin Pastor.

São Carlos, 16 de dezembro de 2009.


 Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

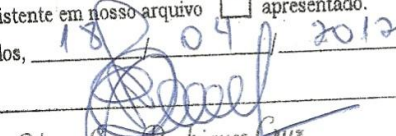
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Universidade Federal de São Carlos
 Pró-Reitoria de Pesquisa

Certifico que esta cópia confere com o documento original.
 existente em nosso arquivo apresentado.

São Carlos, 18 de 09 de 2012


 Edson Luiz Rodrigues Cruz
 Assistente em Administração