

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 DO RESVERATROL SOBRE O
TECIDO ÓSSEO DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

VICTOR FABRÍCIO

SÃO CARLOS
2014

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 DO RESVERATROL SOBRE O
TECIDO ÓSSEO DE RATAS OVARIETOMIZADAS**

VICTOR FABRICIO

Dissertação 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 Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS
2014

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

F126ae Fabricio, Victor.
Avaliação dos efeitos do resveratrol sobre o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas / Victor Fabricio. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
76 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Tecido ósseo. 2. Resveratrol. 3. Osteopenia. 4. Ovariectomia. 5. Ratas. I. Título.


CDD: 619.93 (20ª)

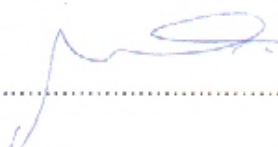
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

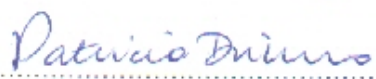
Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Victor Fabrício

Dia 06/05/2014

Prof^ª. Dr^ª. Keico Okino Nonaka.....

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

Prof^ª. Dr^ª. Patricia Driusso.....

Esse trabalho recebeu apoio financeiro à pesquisa da CAPES

*“A tarefa não é tanto ver aquilo
que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

Aos meus pais, José Geraldo e Maria Aparecida, pela criação, preciosa educação, amor, exemplo e todo o esforço e incentivo aplicado desde minha infância para que eu sempre trilhe o caminho do aprendizado.

À minha namorada Amanda, pela companhia em todos os caminhos que sigo, apoio incondicional e a toda a felicidade e amor que podemos compartilhar um com o outro.

Ao meu irmão, Murilo e todos que eu posso chamar de Família, seja consanguínea ou não, pelo apoio, acolhimento, alegria e a possibilidade de dividir minha vida com vocês.

A TODOS ESTES: MUITO OBRIGADO!

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 grande caráter e o exemplo de profissionalismo a ser seguido;

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

Ao meu irmão, Murilo Fabricio, pela amizade, companheirismo e todas as experiências que pudemos e poderemos compartilhar;

À minha namorada Amanda, pelo companheirismo, amizade, alegria, amor e incentivo para sempre seguir meu caminho com “A mente quieta, a espinha ereta e o coração tranquilo”;

Aos meus padrinhos Roseli e Rodolfo, pelo ótimo exemplo e incentivos para o ingresso no meio acadêmico;

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

A todos os amigos que encontrei na UFSCar: André, Alana, Letícia, Luísa, Aline, Talita, Elisa, Rafael e Mário, além de todos os amigos da pós-graduação, do Departamento de Ciências Fisiológicas e de outras universidades por fazerem parte de momentos tão importantes da minha vida;

Ao Fabio Alexandre Casarin Pastor, pelo grande incentivo e auxílio essenciais para o início e realização deste trabalho;

Aos (ex e atuais) pós-graduandos do Laboratório de Neuroendocrinologia, Charles Chenwei Wang, José Aparecido Ferreira, Fabio Henrique Bogni, Leandro Dias Gonçalves Ruffoni, Karina Ana Silva e Bruna Gabrielle Biffe pela experiência compartilhada e 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;

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

Ao Prof. Dr. Mário Jefferson Louzada, ao profissional Pedro Luís Florindo e à 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;

Aos professores: Dra. Patrícia Driusso / Departamento de Fisioterapia – UFSCar, Dr. Gilberto Eiji Shigemoto / Departamento de Ciências Fisiológicas (Laboratório de Fisiologia do Exercício) – UFSCar e Dr. Fábio Gonçalves Pinto / Departamento Morfologia e Patologia – UFSCar, pelas importantes contribuições no exame de qualificação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

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

À disponibilidade pessoal e profissional e todos os ensinamentos, passados ou que ainda virão, direta ou indiretamente, que me permitem sempre manter o caminho escolhido do modo mais correto possível.

Minha gratidão, respeito e admiração por uma educadora excepcional e tudo que me permitiu aprender, conviver e sentir no início de um caminho repleto de obstáculos, mas na certeza de que sairei dele uma pessoa e profissional o melhor que poderei ser.

RESUMO

Resveratrol (trans 3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol encontrado em algumas plantas e frutos. Há indícios de que ele possa ser associado à prevenção da osteoporose devido a sua ação similar a de um SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators), substância utilizada para tratamento da osteoporose (entre outras doenças) em mulheres cujo o uso da Terapia de Reposição Hormonal não é indicado. Entretanto, informações mais específicas sobre o seu efeito em diferentes contingentes do tecido ósseo ainda são escassas. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do resveratrol de proteger contra as alterações ósseas características da deficiência de estrógeno em ratas adultas jovens ovariectomizadas. Foram utilizados 30 animais (ratas Wistar) distribuídos em 3 grupos: grupo intacto (INT) com 10 animais intactos, grupo controle ovariectomizadas (OVX) com 10 animais ovariectomizados tratados com uma solução de salina e Dimetilsulfóxido (DMSO), grupo ovariectomizadas + resveratrol (OVX + RES) com 10 animais ovariectomizados tratados com uma solução de resveratrol, salina e DMSO intraperitonealmente [0,7 mg/kg MC (massa corpórea)], 7 vezes por semana, por 12 semanas. Foram analisados os parâmetros biométricos, biofísicos, biomecânicos ósseos, microtomográficos e de densidade radiográfica de ossos com maior contingente cortical (fêmures) e trabecular (vértebras). As propriedades biomecânicas dos fêmures foram obtidas pelo teste de flexão a três pontos e das vértebras lombares obtidas pelo teste de compressão óssea. Foram utilizadas vértebras lombares para a realização da análise microtomográfica e de densidade radiográfica. As ratas ovariectomizadas apresentaram maior ganho de massa corporal e diminuição da densidade óssea e densidade radiográfica, além de redução dos parâmetros microtomográficos quando comparadas ao grupo intacto. Os parâmetros biomecânicos dos fêmures não sofreram alteração em nenhum dos grupos. Os animais tratados com resveratrol não apresentaram a diminuição dos parâmetros microtomográficos e de densidade óssea das vertebrae como os não tratados. Portanto, os resultados apontam o resveratrol como potencial protetor do tecido ósseo com maior contingente trabecular da espoliação induzida pela ovariectomia.

Palavras-chaves: resveratrol, osteoporose, tecido ósseo, biomecânica óssea, microtomografia óssea, densidade radiográfica e ratas

ABSTRACT

Resveratrol (trans 3,5,4'-trihydroxystilbene) is a polyphenol found in some plants and fruits. There are indications that it may be associated with the prevention of osteoporosis due to its action similar to a SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators), a substance used to treat osteoporosis (among other diseases) in women whose use of hormone replacement therapy does not is indicated. However, more specific information about their effect in various quotas of bone tissue is still scarce. The aim of this study was to evaluate the ability of resveratrol to protect against bone changes characteristics of estrogen deficit in young adult ovariectomized rats. Were utilized 30 animals (Wistar rats) distributed into 3 groups: intact group (INT) with 10 intact animals, ovariectomized group (OVX) with 10 ovariectomized animals treated with a saline and dimethylsulfoxide (DMSO) solution, ovariectomized + resveratrol group (OVX + RES) with 10 ovariectomized animals treated with a resveratrol, saline and DMSO solution [0.7 mg/kg BW (body weight)], 7 times a week, for 12 weeks. Biometric, biophysical, biomechanical, microtomographical and radiographic density parameters were analyzed from bones with higher cortical (femur) and trabecular quota (vertebrae). The biomechanical properties of femurs were obtained by the three-point bending test and the lumbar vertebrae obtained by bone compression test. Lumbar vertebrae were used to perform the microtomographical analysis and radiographic density analysis. The ovariectomized rats gained more body weight and had lower bone density and radiographic density, and also showed reduction of microtomographical parameters when compared to the intact group. The biomechanical parameters of femurs did not change in neither group. The animals treated with resveratrol did not shown decrease in microtomographical parameters and bone density of the vertebrae as the untreated group. Therefore, the results suggest resveratrol as a potential protector of ovariectomy induced spoliation of bone tissues with greater trabecular quota.

Palavras-chaves: resveratrol, osteoporosis, bone tissue, bone biomechanics, bone microtomography, radiographic density e rats.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Método de medição do peso imerso dos ossos 32
- FIGURA 2. Máquina universal Instron (modelo 4444) utilizado para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato. 33
- FIGURA 3. Gráfico Carga x Deformação, obtido com o teste de flexão, utilizado para determinação das propriedades biomecânicas. 36
- FIGURA 4. Representação gráfica da massa corporal inicial (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 39
- FIGURA 5. Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 41
- FIGURA 6. Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 43
- FIGURA 7. Representação gráfica dos valores de parâmetros físicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 44
- FIGURA 8. Representação gráfica dos valores de parâmetros físicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 46

- FIGURA 9. Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 47
- FIGURA 10. Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 49
- FIGURA 11. Imagem Microtomográfica da Vértebra L4 do grupo Controle Intacto. 50
- FIGURA 12. Imagem Microtomográfica da Vértebra L4 do grupo OVX. 50
- FIGURA 13. Imagem Microtomográfica da Vértebra L4 do grupo OVX + RES. 50
- FIGURA 14. Representação gráfica dos valores de densidade radiográfica (mmAl) das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 52

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Massa corporal (MC) inicial e final e ganho de massa em 40 gramas (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).
- TABELA 2. Comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises em 42 milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das cinzas em gramas (g) dos fêmures direito dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).
- TABELA 3. Altura do corpo em milímetros (mm) e pesos úmido, imerso, 43 seco e das cinzas em gramas (g) das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).
- TABELA 4. Percentual de água, material mineral e material orgânico no 45 osso, volume ósseo (cm³), densidade mineral e óssea (g/cm³) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).
- TABELA 5. Percentual de água, material mineral e material orgânico no 46 osso, volume ósseo (cm³), densidade mineral e óssea (g/cm³) das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

- TABELA 6. Carga (Força) Máxima (N), deslocamento na carga máxima (mm), tenacidade (J), resiliência (J), rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$), deslocamento no ponto de fratura (mm) e carga (força) máxima no ponto de fratura (N) obtidos no teste biomecânico dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 48
- 49
- TABELA 7. Carga (força) máxima (N), deslocamento na carga máxima (mm), tenacidade (J), resiliência (J) e rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$) obtidos com o teste biomecânico das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).
- TABELA 8. Comparações entre os grupos para os parâmetros: volume tecidual (TV), volume ósseo (BV), relação entre volume ósseo e volume trabecular (BV/TV) e espessura trabecular (Tb.Th) dos achados microtomográficos das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 51
- TABELA 9. Valores de Densidade radiográfica (mmAl), das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas
AVE Acidente Vascular Encefálico
BMC Conteúdo Mineral Ósseo
BMD Densidade Mineral Óssea
BV Volume Ósseo
BV/TV Percentual de volume ósseo
C₁ Carga no Limite Elástico
C₂ Carga Máxima
C₃ Carga de Fratura
C57Bl/6 Cepa de camundongos de laboratório
Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ Hidroxiapatita
CEE Estrógenos Conjugados de Equinos
CEEA Comitê de Ética em Experimentação Animal
cm Centímetro
cm³ Centímetro Cúbico
D₁ Deformação no Limite Elástico
D₂ Deformação na Carga Máxima
D₃ Deformação no Ponto de Fratura
DEXA Densitômetro ósseo
DMSO Ácido Dimetilsulfóxido
DP Desvio Padrão
DR Densidade Radiográfica
ER Receptores de Estrógeno
ER α Receptor de Estrógeno α
ER β Receptor de Estrógeno β
EROs Espécies Reativas de Oxigênio
g Gramas
IL-1 Interleucina 1
IL-6 Interleucina 6
INT Grupo Intacto
J Joules
kg Quilogramas

kgf Quilograma Força
kN Quilo Newton
L4 Quartas Vértexbras Lombares
L5 Quintas Vértexbras Lombares
L6 Sextas Vértexbras Lombares
MC Massa Corporal
MC3T3-E1 Linhagem de Pré-osteoblastos de Ratos
MAPK Proteína Quinase ativada por mitógeno
M-CSF Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos
MEC Matriz Extra Celular
mg Miligramas
min Minuto
microCT Microtomografia Computadorizada
mm Milímetros
mmAl Milímetros de Alumínio
n Número de Animais
N Newton
NBR Denominação de norma da ABNT
NF- κ B fator nuclear kappa B
OPG Osteoprotegerina
OVX Grupo Ovariectomizado
OVX + RES Grupo Ovariectomizado tratado com Resveratrol
 ρ Rô
Pi Peso Imerso
Pm Peso do Material Mineral (cinzas)
Ps Peso Seco
PTH Hormônio da Paratireóide
Pu Peso úmido
RDI Região de Interesse
RANK Receptor de Membrana de Osteoclastos e Pré-Osteoclastos
RANKL Ligante de Superfície dos Osteoblastos e Pré-Osteoblastos
RAW 264.7 Linhagem de células progenitoras de osteoclastos
Runx2 Fator de transcrição específico do osso
S1 Primeira Vértexbra Sacral

SERM Modulador Específico de Receptores de Estrógeno

Sirt1 Sirtuína 1

T Inclinação da Reta

Tb.Th Espessura da Trabécula

TNF α Fator de Necrose Tumoral α

TRH Terapia de Reposição Hormonal

TV Volume Tecidual

TVP Trombose Venosa Profunda

UFSCar Universidade Federal de São Carlos

vs Versus

°C Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	ANIMAIS	29
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
3.3	TÉCNICA CIRÚRGICA.....	29
3.4	APLICAÇÃO DO RESVERATROL.....	30
3.5	COLETA DAS AMOSTRAS	30
3.6	PARÂMETROS ANALISADOS	30
3.6.1	Parâmetros Biométricos	30
3.6.2	Parâmetros Físicos.....	31
3.6.3	Parâmetros Biomecânicos	33
3.6.4	Parâmetros Microtomográficos Ósseos.....	36
3.6.5	Densidade Radiográfica	37
3.7	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
3.8	NORMAS TÉCNICAS REFERENTES À ELABORAÇÃO DO TRABALHO.....	38
4	RESULTADOS.....	39
4.1	MASSA CORPORAL.....	39
4.2	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	40
4.2.1	Parâmetros biométricos dos fêmures.....	40
4.2.2	Parâmetros biométricos das vértebras	42
4.3	PARÂMETROS FÍSICOS	44
4.3.1	Parâmetros físicos dos fêmures	44
4.3.2	Parâmetros físicos da vértebras	45
4.4	PARÂMETROS BIOMECÂNICOS.....	47
4.4.1	Parâmetros biomecânicos dos fêmures	47
4.4.2	Parâmetros biomecânicos das vértebras	48
4.5	MICROTOMOGRAFIA ÓSSEA	50
4.6	DENSIDADE RADIOGRÁFICA.....	51
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXO I – PROTOCOLO DO COMITÊ DE ÉTICA	76

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido rígido, composto de uma matriz extracelular altamente organizada, contendo componentes inorgânicos (60%) e orgânicos (40%)(BOSKEY,ROBEY, 2008), além de um distinto e complexo grupo celular. A fase inorgânica, ou mineral, é constituída basicamente por pequenos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO)_6(OH)_2]$ (formados por cálcio, fosfato e carbonato) e menores quantidades de magnésio, sódio, potássio, manganês e flúor. Já a fase orgânica (que dá origem à matriz óssea e é a fase determinante da estrutura e das propriedades biomecânicas ósseas) é composta principalmente por colágeno tipo I, fatores de crescimento, citocinas e proteínas da matriz celular, além das células do tecido ósseo (10% do total da matriz óssea) (HALL, 2005; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006b).

Através da associação do tecido ósseo com estruturas funcionais como articulações, ligamentos e tendões, há a formação do arcabouço que sustenta o nosso organismo: o esqueleto, ao qual se pode atribuir uma gama de funções como suporte e proteção aos órgãos vitais (como os contidos na caixa torácica e craniana); permitir o deslocamento do indivíduo através do sistema de alavancas formado em conjunto com a musculatura; sustentação e conformação estrutural do corpo; hematopoiese via medula óssea (MARTINI, 1998; BILEZIKIAN,RAISZ,MARTIN, 2008; CONFAVREUX, 2011).

Macroscopicamente, o osso é dividido em dois principais tipos, cuja distinção é de grande importância mecânica:

- Osso Cortical: Constituinte de aproximadamente 80% do esqueleto, formado de camadas concêntricas de matriz óssea circundando vasos longitudinais na sua estrutura (Sistema Haversiano), além de apresentar poucas porosidades (proporção do volume total do osso que não é ocupado pelo tecido ósseo em si), demonstrando uma alta relação massa/volume e caracterizando-o como bastante sólido. Apresentam maior resistência a forças de torção e flexão. Normalmente, é encontrado no eixo de ossos longos e na superfície de ossos achatados (como mandíbula e escápula).

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

Suas proporções relativas na estrutura de cada osso podem variar consideravelmente dependendo do sítio ósseo. A relação de osso trabecular : osso cortical nas vértebras é de 75:25, enquanto na cabeça do fêmur ela é de 50:50. (LOVERIDGE, 1999; CURREY, 2002; DOWNEY,SIEGEL, 2006; BRANDI, 2009).

No tecido ósseo, encontram-se quatro grupos de células: as células osteoprogenitoras (células tronco mesenquimais cuja capacidade de proliferação e diferenciação as permite tornarem-se osteoblastos e sua atividade ou quiescência se dá devido a demanda metabólica), osteoblastos (responsáveis pela formação óssea através da síntese e liberação de componentes da matriz óssea orgânica), osteócitos (osteoblastos diferenciados aprisionados na matriz óssea mineralizada cuja principal função é a tradução da força mecânica imposta ao osso em sinais bioquímicos que regulam o remodelamento ósseo) e osteoclastos (células gigantes multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea através da osteólise) (MARCUS,FELDMAN,KELSEY, 1996; NOMURA,TAKANO-YAMAMOTO, 2000; PALUMBO et al., 2001; MACKIE, 2003; KNOTHE TATE et al., 2004; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006a; RUBIN,RUBIN,JACOBS, 2006).

Todos os grupos celulares (via liberação de diversas enzimas) e os fatores intrínsecos e extrínsecos atuam nas diversas vias metabólicas mantendo o tecido ósseo em constante modificação (estima-se que, a cada ano, 10% do esqueleto é renovado) (BRANDI, 2009). Este processo leva o nome de remodelamento ósseo e tem como principal função manter a homeostasia mineral (cálcio e fósforo) e a integridade estrutural do tecido, regulando o “turnover” da matriz extracelular (MEC), além de auxiliar na reparação de microdanos no osso antes que fiquem clinicamente aparentes. Ademais, o remodelamento ósseo demonstra um comportamento resposta-dependente de alguns tipos de sinalizadores químicos, mecânicos, elásticos e eletromagnéticos. (BURR et al., 1998; HILL,ORTH, 1998; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006a).

O processo de remodelamento acontece, basicamente, em quatro fases claramente identificadas de forma cíclica: quiescência/ativação, reabsorção, reversão e formação. Este evento dura aproximadamente seis meses para estar completo, sendo que maior parte deste tempo é tomada pela formação (BRANDI, 2009).

Na primeira fase, há a transformação do tecido quiescente em um tecido em remodelamento. Para tal, há o envolvimento de pré-osteoclastos mononucleados na superfície do tecido (e sua conseqüente fusão, formando pré-osteoclastos multinucleados) e penetração das células de revestimento ósseo. Estas células então são ativadas por citocinas locais e hormônios sistêmicos e iniciam o processo de liberação de íons hidrogênio no compartimento

em reabsorção (através de bombas de hidrogênio e íons) criando uma solução ácida que será responsável pela degradação do componente inorgânico do tecido, enquanto enzimas lisossomais degradam o componente orgânico. Desta forma, são criadas regiões de reabsorção no osso que recebem o nome de Lacuna de Howship no contingente trabecular e Cones de Reabsorção no contingente cortical.

Com o final da fase de reabsorção, há a apoptose dos osteoclastos e início da fase de reversão, caracterizada principalmente pela invasão da lacuna de reabsorção por células como monócitos, osteócitos liberados do osso por osteoclastos e pré-osteoblastos. Tal fase é de grande importância para o processo de remodelamento como um todo, pois é nela que os mecanismos de acoplamento (mecanismos que ligam a reabsorção à formação) devem acontecer de uma forma eficiente e equilibrada fazendo com que haja suficiente formação óssea após a reabsorção. Tal equilíbrio vai garantir a integridade das funções do esqueleto, mantendo a sua funcionalidade biomecânica e protegendo os componentes teciduais para que estes estejam sempre disponíveis para manter o equilíbrio mineral preservado e evitando uma possível alteração óssea negativa devido a qualquer desequilíbrio.

Seguindo a reversão, inicia-se a fase de formação óssea, na qual os osteoblastos ativados sintetizam a matriz orgânica colágena com alguns minerais como cálcio e fósforo (ou osteóide) e então controlam sua mineralização por nucleação secundária ao contato com minerais pré-existentes. Ao longo deste processo, alguns osteoblastos são envolvidos pela matriz tornando-se osteócitos, enquanto outros se tornam células de revestimento quiescentes na superfície. Ademais, outros osteoblastos retornam ao estado de células tronco mesenquimais (osteoprogenitoras). Por fim, as células osteoprogenitoras aguardam o estímulo adequado para que retornem a se diferenciarem em osteoblastos e iniciarem a deposição de matriz orgânica novamente (PARFITT,CHIR, 1987; MARCUS,FELDMAN,KELSEY, 1996; HILL,ORTH, 1998; ROODMAN, 1999; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2006a; BRANDI, 2009).

É importante também ressaltar a interação entre os grupos celulares ósseos no processo de remodelamento, sendo de grande importância a sua ciclicidade. Um exemplo direto é a ação osteoblástica atuando diretamente na fase inicial da osteoclastogênese. Por meio de da liberação de RANKL (ligante do receptor ativador do $\text{NF-}\kappa\text{B}$, de origem osteoblástica) e sua posterior ligação a receptores RANK (nas membranas de osteoclastos e células promotoras de osteoclastos), há um aumento da diferenciação de células promotoras de osteoclastos em osteoclastos e sua respectiva ativação da reabsorção. Do mesmo modo, os osteoblastos podem secretar osteoprotegerina (OPG), um receptor que compete com o RANK

pela ligação ao RANKL e, através da interação OPG-RANKL, há a inibição da osteoclastogênese (BOYLE,SIMONET,LACEY, 2003).

Ainda, os osteoblastos podem liberar fatores estimulantes de colônia de macrófagos (M-CSFs), moléculas de grande importância para a diferenciação de osteoclastos e início de sua atividade (sendo considerados fatores de crescimento obrigatórios para o início do processo de reabsorção óssea). Vale lembrar que, dada a sua importância, os M-CSFs são também estimulados por outros fatores como o hormônio da paratireoide (PTH), interleucina 1(IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF α), linfócitos T, entre outros, ligando-os indiretamente ao processo de reabsorção óssea (BILEZIKIAN,RAISZ,MARTIN, 2008).

Assim como o ciclo de vida humano sofre constantes modificações durante sua extensão, há constantes alterações da fisiologia do tecido ósseo do indivíduo. Tais modificações se resumem à relação entre formação e reabsorção do tecido (também chamada de balanço ósseo), cujo pico máximo de desenvolvimento na espécie humana encontra-se aos 30 anos de idade, onde há prevalência da formação tecidual (balanço ósseo positivo). Entre os 35 e 40 anos há a estabilização de tais mecanismos sendo que, após tal período, pode prevalecer a reabsorção (balanço ósseo negativo), acarretando uma progressiva diminuição de massa óssea (chegando a aproximadamente 0,3% ao ano), podendo ou não estar relacionada a outros processos patológicos (BERGLUND et al., 2000).

Ademais, todo o metabolismo do tecido ósseo pode ser influenciado por fatores endógenos (hormonais, genética, gênero, idade, doenças intercorrentes) e exógenos (alimentação, fatores ambientais). No sexo feminino, por exemplo, durante os dez primeiros anos após a menopausa, a perda óssea pode chegar a uma média de 1-2% ao ano, podendo ser agravada pelo acúmulo de fatores, sendo o hormonal (como a deficiência de estrógeno) um dos principais motivos da perda óssea aumentar em mulheres neste período, podendo chegar a ser caracterizada como osteoporose (MARCUS,FELDMAN,KELSEY, 1996; RIGGS,KHOSLA,MELTON, 2002; NGUYEN et al., 2003; AKHTER et al., 2004).

A osteoporose pode ser definida como uma doença sistêmica do esqueleto na quais múltiplos mecanismos patogênicos convergem para causar a deterioração e perda da microarquitetura estrutural dos ossos em conjunto com a perda de tecido ósseo por unidade de volume de osso (densidade mineral óssea). Esses fatores acarretam aumento da fragilidade óssea que, associada ao aumento do risco de quedas característicos do envelhecimento, contribui para um maior índice de fraturas em pacientes osteoporóticos (principalmente na senilidade) (Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis, 1993; RAISZ, 2005; ARMAS,RECKER, 2012; KANIS et al., 2013).

A osteoporose é considerada uma doença silenciosa, uma vez que se apresenta aparentemente assintomática até a primeira fratura por fragilidade, sendo esta que frequentemente leva ao diagnóstico da doença, normalmente realizado através da análise do desvio padrão da Densidade Óssea do indivíduo (medida pelo DEXA (*Dual Energy X-Ray Absorptiometry*)), quando comparado à média da população de mesma faixa de idade e sexo (valores acima de -2,5 Desvios Padrão já o caracteriza com osteoporose) (KANIS, ORGANIZATION, 2008; SILVERMAN, 2008; SUJIC et al., 2013). Esta doença afeta cerca de 30% das mulheres e 12% dos homens em algum momento da vida, sendo as fraturas osteoporóticas grandes causas de morbidade e mortalidade na população. Estima-se que sua prevalência é cerca de 9 milhões de fraturas no mundo anualmente (mais da metade dessas ocorrendo na Europa e nas Américas), gerando custos que ultrapassam €36 bilhões na Europa e, na falta de um tratamento significativo que atinja globalmente, estes custos podem duplicar até 2050 (AKHTER et al., 2007; COMPSTON, 2010; KANIS et al., 2013).

A osteoporose pode ser classificada em primária e secundária. A primária se refere a distúrbios do tecido ósseo sem associação a outras doenças crônicas como, por exemplo, a osteoporose pós-menopausa e senil. A secundária está associada a quadros clínicos crônicos específicos e/ou uso de fármacos que contribuem para perda óssea acelerada. (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; SOUTH-PAUL, 2001).

Podem-se resumir os mecanismos fisiopatogênicos básicos da osteoporose em três principais causas: falha ao produzir um esqueleto com força e massa otimizada durante o desenvolvimento ósseo; formação óssea deficitária durante o remodelamento ósseo e reabsorção óssea excessiva levando a um balanço ósseo negativo (RAISZ, 2005; DAS, 2013).

Apesar de poucas explicações biológicas para tal, o aumento excessivo de reabsorção óssea é capaz de alterar, além da massa óssea em si, as propriedades estruturais do osso independentemente da alteração da massa. Dentre os efeitos deste excesso, há o maior tempo que a matriz osteóide apresenta para se mineralizar; aumento de sítios enfraquecidos pelos osteoclastos nas trabéculas, levando a perda da conectividade entre elas e/ou diminuição em número e espessura além de uma degradação da sua superfície (impedindo a posterior formação óssea) e alteração de sua morfologia de formas mais espessas (placas) para formas menos espessas e frágeis (bastão); aumento da propensão a micro danos ósseos (danos microscópicos que ocorrem em resposta à cargas submáximas no osso, normalmente reparados) podendo ultrapassar a capacidade de reparação destes e sua acumulação resultar em falhas estruturais maiores; no contingente cortical, há a diminuição da espessura e aumento da porosidade. Tais afecções da microarquitetura óssea (principalmente a cortical)

são grandes responsáveis por levar ao aumento da fragilidade óssea e consequente maior propensão à fraturas (PARFITT et al., 1983; DEMPSTER, 2000; AKHTER et al., 2007; ARMAS, RECKER, 2012; BONUCCI, BALLANTI, 2013).

Dentre os mecanismos fisiopatogênicos mais específicos, pode-se citar:

- Desuso, bastante observado em astronautas e indivíduos com paralisia, que leva a uma maior reabsorção óssea, podendo levar a uma perda de até 10% de massa óssea;
- Excesso de micro-danos ósseos que ultrapassam a capacidade de reparo e podem levar a uma destruição da comunicação entre os osteócitos, levando-os à apoptose e o início de uma cascata de eventos que aumentam a reabsorção óssea;
- Deficiência de vitamina D, que dificulta a absorção de cálcio pelo organismo, reduzindo a densidade mineral óssea;
- Excesso de hormônio paratireoideano (PTH), também associado ao aumento da reabsorção óssea;
- Problemas genéticos, como polimorfismos genéticos relacionados às funções de osteoblastos, osteoclastos;
- Anormalidades de colágeno;
- Espécies reativas de oxigênio (EROs) principalmente durante o envelhecimento, influenciando negativamente a função tanto de osteoblastos, quanto de osteoclastos;
- Redução dos níveis de estrogênio (LEBLANC et al., 1990; RAISZ, 2005; OZGOCMEN et al., 2007; MOON et al., 2011; ARMAS, RECKER, 2012).

Ainda dos mecanismos específicos, a osteoporose causada por redução dos níveis de estrogênio têm sido foco de diversos estudos (PACIFICI, 1998; WEITZMANN, PACIFICI, 2006; POPAT et al., 2009). Foi uma das primeiras causas documentadas de osteoporose pós-menopausa por Albright em 1941, e é a explicação para o aumento da perda de massa óssea em mulheres após a menopausa uma vez que, neste período, a falência ovariana leva a uma queda da produção do hormônio. (RAMALHO, LAZARETTI-CASTRO, 1999; FAIENZA et al., 2013).

Pode-se inferir que a osteoporose pós-menopausa está relacionada com a própria função do estrogênio, uma vez que, apesar do mecanismo de ação dele ainda permanecer controverso, sabe-se dos efeitos que possui sobre as células do tecido ósseo através de inúmeras vias. O estrogênio é capaz de inibir a ativação do remodelamento ósseo agindo principalmente sobre os osteócitos. Além disto, é capaz de inibir a apoptose e estimular a diferenciação de osteoblastos, através da inativação do fator de necrose tumoral alfa (TNF α),

aumentando seus números e sua sobrevivência celular (GILBERT et al., 2000; KOUSTENI et al., 2001; FAIENZA et al., 2013).

Sobre osteoclastos, o hormônio apresenta controle sobre sua formação e apoptose. Os efeitos diretos incluem a diminuição de responsividade das células precursoras de osteoclastos à citocina RANKL, diminuindo sua formação; diminuição da produção desta citocina pelos osteoblastos e osteócitos; diminuição da diferenciação dependente de RANKL de monócitos a osteoclastos, através de diminuição da ativação de NFκB; aumento da produção de osteoprotegerina e impedindo o aumento da osteoclastogênese, entre outros. Já indiretamente, age através da inibição de citocinas como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α), causando a diminuição da diferenciação de células mielóides em osteoclastos e células do estroma medular (podendo, desta forma, controlar a quantidade de osteoclastos uma vez que a célula do estroma é pluripotente) (HOFBAUER et al., 1999; RAMALHO, LAZARETTI-CASTRO, 1999; SRIVASTAVA et al., 2001; EGHBALI-FATOURECHI et al., 2003; WEITZMANN, PACIFICI, 2006; ROBINSON et al., 2009).

Do mesmo modo, estudos mostram que os efeitos “pró-apoptóticos” do estrogênio acabam diminuindo a quantidade de osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção óssea (KAMEDA et al., 1997; KOUSTENI et al., 2002; KRUM, BROWN, 2008). Assim, uma redução dos níveis do hormônio leva a uma diminuição do número de osteoblastos e aumento tanto da quantidade de osteoclastos quanto do seu ciclo de vida, levando a uma maior reabsorção óssea sem ser contra-balanceada pela formação óssea (balanço ósseo negativo) e, conseqüentemente, alterações estruturais e de massa óssea condizentes com a osteoporose (ROODMAN, 1999; NAKAMURA et al., 2007).

Ademais, vem sendo proposto que a deficiência de estrogênio também afeta a sensibilidade do osso à carga mecânica, levando a um aumento da reabsorção óssea e características morfológicas do osso similares às observadas na osteoporose por desuso dos membros (ARMAS, RECKER, 2012; BRENNAN et al., 2012).

A osteoporose pós-menopausa é conhecida por não possuir tratamentos muito efetivos (DAS, 2013). Para prevenção ou tratamento desta, é bastante utilizada a terapia de reposição hormonal (TRH) com o intuito de regularização dos níveis de estradiol em mulheres menopausadas (MACEDO et al., 1998). Diversos estudos mostraram a prevenção da osteoporose com a reposição hormonal substitutiva levando à diminuição da reabsorção excessiva, preservação da massa óssea e menor propensão à fraturas (BILEZIKIAN, RAISZ, MARTIN, 2008). MACEDO et al. (1998). O'CONNELL et al. (1998) utilizaram doses de 2 mg de estradiol, 0,625 mg de CEE (*conjugated equine estrogens*) e

1,25 mg de estrona em seus estudos e apontaram estas doses como as mais efetivas para prevenção de osteoporose em mulheres menopausadas.

Apesar dos efeitos deste tratamento para a prevenção da osteoporose, algumas doses/regimes de administração podem apresentar efeitos colaterais quando utilizada a longo prazo ou em condições específicas (como o fato da mulher apresentar predisposição genética ao câncer de mama). Alguns dos mais prejudiciais seriam o aumento do risco de câncer de mama, do endométrio, a trombose venosa profunda (TVP), acidente vascular encefálico (AVEs) e algumas doenças coronárias, indicando que se deve ter cautela ao escolher a TRH mais adequada à mulher osteoporótica (HULLEY et al., 1998; PERSSON et al., 1999; SCHAIRER et al., 2000; SPENCER et al., 2012; GHAZAL,PAL, 2013).

Atualmente a literatura apresenta estudos que procuram alternativas aos tratamentos convencionais tanto para a prevenção, quanto para o tratamento da osteoporose, objetivando a redução de efeitos colaterais e prejudiciais que a TRH pode causar (ARJMANDI et al., 1996; FRENCH,MUIR,WEBBER, 2008; PALUMBO et al., 2009). Algumas destas alternativas atualmente utilizadas são os SERMs (selective estrogen receptor modulators), prescritos a mulheres com predisposição genética ao câncer de mama devido ao seu efeito seletivo sobre tecidos específicos, e fitoestrógenos, fito-hormônios com potencial estrogênico, como os isoflavonatos derivados da soja (genisteína) e outras substâncias de origem vegetal (DOREN,SAMSIOE, 2000; SEHMISCH et al., 2010).

Dentro desta última classe, o resveratrol (trans 3,5,4'-trihidroxiestilbeno), um composto polifenólico encontrado em algumas plantas e frutos (como a uva) apresenta importantes efeitos como anti-inflamatório (reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias), cardioprotetor, anti-neoplásico, além de possuir capacidade de auxiliar na eliminação de EROs (seja eliminando-as, seja modulando o sistema antioxidante endógeno) (FREMONT, 2000; BHAT,KOSMEDER,PEZZUTO, 2001; DO AMARAL et al., 2008; COTTART,NIVET-ANTOINE,BEAUDEUX, 2014). Ademais, sua similaridade estrutural com o dietilestilbestrol, um estrógeno sintético, o confirma como um fitoestrógeno, além do fato de agir como um SERM e ser bloqueado por tamoxifeno, um anti-estrogênico, indicando sua possível ação em receptores de estrógeno (BHAT,KOSMEDER,PEZZUTO, 2001; HARIKUMAR,AGGARWAL, 2008).

Correlacionando com o tecido cartilaginoso, o resveratrol é um potente mediador anabólico da homeostase da cartilagem do disco intervertebral bovino (*in vitro*), revelando um potencial efeito biológico na redução da progressão da degeneração intervertebral (LI et al., 2008). Além disso, foi constatada sua ação protetora e reparadora em cartilagens pós-lesão,

uma vez que ELMALI et al. (2005) demonstraram a eficiência do resveratrol na redução da perda de cartilagem em joelhos de coelhos artríticos.

Sobre o tecido ósseo, estudos *in vivo* e *in vitro* indicam o efeito do resveratrol como inibidor da osteoclastogênese (diminuindo o número de osteoclastos), assim como estimulador da diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, além de ser responsável por alterações estruturais em ossos osteoporóticos, melhorando a microarquitetura óssea (MIZUTANI et al., 1998; BHAT, KOSMEDER, PEZZUTO, 2001; BOISSY et al., 2005; RUCINSKI et al., 2006; KUPISIEWICZ et al., 2010; HABOLD et al., 2011). RUCINSKI et al. (2006) demonstraram que o resveratrol é capaz de prevenir a 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. MIZUTANI et al. (1998), analisando a ação do resveratrol sobre células MC3T3-E1 (linhagem de pré-osteoblastos de ratos, usada como modelo de osteoblasto na medula óssea em pesquisas *in vitro*), demonstraram um efeito de estimulação direta da proliferação e diferenciação de osteoblastos.

Além disso, ligando 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 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).

Independentemente 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 et al., 2000; LIU et al., 2005). LIU et al. (2005) observaram que o resveratrol pode inibir a redução da densidade mineral óssea, especialmente nas epífises de fêmures de ratas Wistar ovariectomizadas. Tais 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.

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

Entretanto, estudos envolvendo a farmacocinética in vivo do resveratrol administrado via oral indicam rápida metabolização pelo organismo, baixa biodisponibilidade e geração de metabólitos cujo estudo ainda necessita ser intensificado (BAUR,SINCLAIR, 2006; DELMAS et al., 2011; ROTCHES-RIBALTA et al., 2012). Não obstante, há uma escassez de estudos observando os efeitos do resveratrol em modelos de osteoporose pós-menopausal que envolvam diferentes tipos de tecido ósseo (trabecular e cortical), cujo conhecimento é de grande importância para entender as alterações mecânicas do osso e, conseqüentemente, a proteção que a substância provê a fraturas. Estes achados, não só caracterizariam o resveratrol como uma terapia potencial para a proteção da osteoporose, como também justificam que a realização de mais estudos neste tema seria de grande interesse científico, além de fundamentar a potencialidade deste estudo de observar se o resveratrol é capaz de proteger o tecido ósseo da osteoporose por deficiência de estrógeno.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito protetor do resveratrol sobre os ossos contra as alterações características da osteopenia por deficiência de estrógeno em ratas adultas jovens ovariectomizadas através das análises de propriedades biométricas, biofísicas, biomecânicas, microtomográficas e de densidade radiográfica de ossos com maior contingente cortical (fêmures) e trabecular (vértebras).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados neste experimento, 30 ratos intactos da linhagem “Wistar” (*Rattus norvegicus albinus*), do gênero feminino, com 90 dias 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. As ratas permaneceram em biotério próprio do laboratório, durante todo o desenvolvimento experimental, sob as seguintes condições: regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro), temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), alimentação com ração comercial e água “*ad libitum*”. Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal – C.E.E.A. – número 025/2010.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para análise dos efeitos do resveratrol sobre as variáveis ósseas, os animais foram distribuídos seguindo o delineamento experimental:

- Grupo Intacto (INT): 10 animais intactos.
- Grupo Controle Ovariectomizadas (OVX): 10 animais ovariectomizados e tratados com solução de dimetilsulfóxido (DMSO - AMRESCO®) em salina a 0,9%.
- Grupo Ovariectomizadas + Resveratrol (OVX + RES): ovariectomizadas e tratadas com uma solução de resveratrol (Sigma Aldrich®) (0,7 mg/kg MC) e DMSO em salina a 0,9%.

3.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

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

3.4 APLICAÇÃO DO RESVERATROL

O tratamento das ratas dos grupos OVX e OVX + RES iniciaram no dia após a realização da ovariectomia. A dose utilizada (0,7 mg/kg MC) e o veículo utilizado em conjunto com o resveratrol foi determinada pela literatura (LIU et al., 2005; KUPISIEWICZ et al., 2010). A administração do resveratrol foi realizada por meio de injeções intraperitoneais devido à melhor absorção orgânica evidenciada na literatura (DO AMARAL et al., 2008), diariamente por um período de 12 semanas.

A solução de salina e DMSO foi administrada via injeção intraperitoneal nas ratas do grupo OVX.

3.5 COLETA DAS AMOSTRAS

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

Após doze semanas de tratamento, foi realizada a decapitação dos animais, com subsequente dissecação femoral (direita e esquerda) e das quartas, quintas e sextas vértebras lombares (L4, L5 e L6 respectivamente) para retirada da musculatura e tecidos moles, isolando o material ósseo para coleta, os quais foram mantidos em solução de salina 0,9% a -20°C para as subseqüentes análises.

3.6 PARÂMETROS ANALISADOS

As medidas necessárias para os parâmetros físicos, biométricos e biomecânicos e a coleta dos dados foram realizados pelo mesmo indivíduo. Já os ensaios microtomográficos e de densidade radiográfica, foram realizados por outras instituições.

3.6.1 Parâmetros Biométricos

Medidas do comprimento do fêmur direito

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

Medidas das espessuras das diáfises femorais

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

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

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

3.6.2 Parâmetros Físicos

Após a verificação dos parâmetros biométricos dos fêmures e das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais, mantiveram-se os ossos (imersos em água destilada) em um dessecador por um período de 24 horas objetivando a retirada do ar presente nos poros ósseos. Em seguida obtiveram-se os pesos imerso (P_i) (Figura 1) e úmido (P_u). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, as amostras foram armazenadas em uma estufa na temperatura de 100° C durante 24 horas com o intuito de 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 a 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®).



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

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

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

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

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

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

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

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

Onde:

P_u = peso úmido ósseo

P_s = peso ósseo da amostra desidratada

P_i = peso imerso ósseo

P_m = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

3.6.3 Parâmetros Biomecânicos

Por meio do teste de flexão a três pontos, as propriedades biomecânicas dos fêmures direito foram mensuradas utilizando-se a máquina de ensaio universal INSTRON modelo 4444 (Figura 2), cuja célula de carga apresenta capacidade máxima de 100 kgf (aproximadamente 1 kN). As extremidades dos fêmures ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, 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).

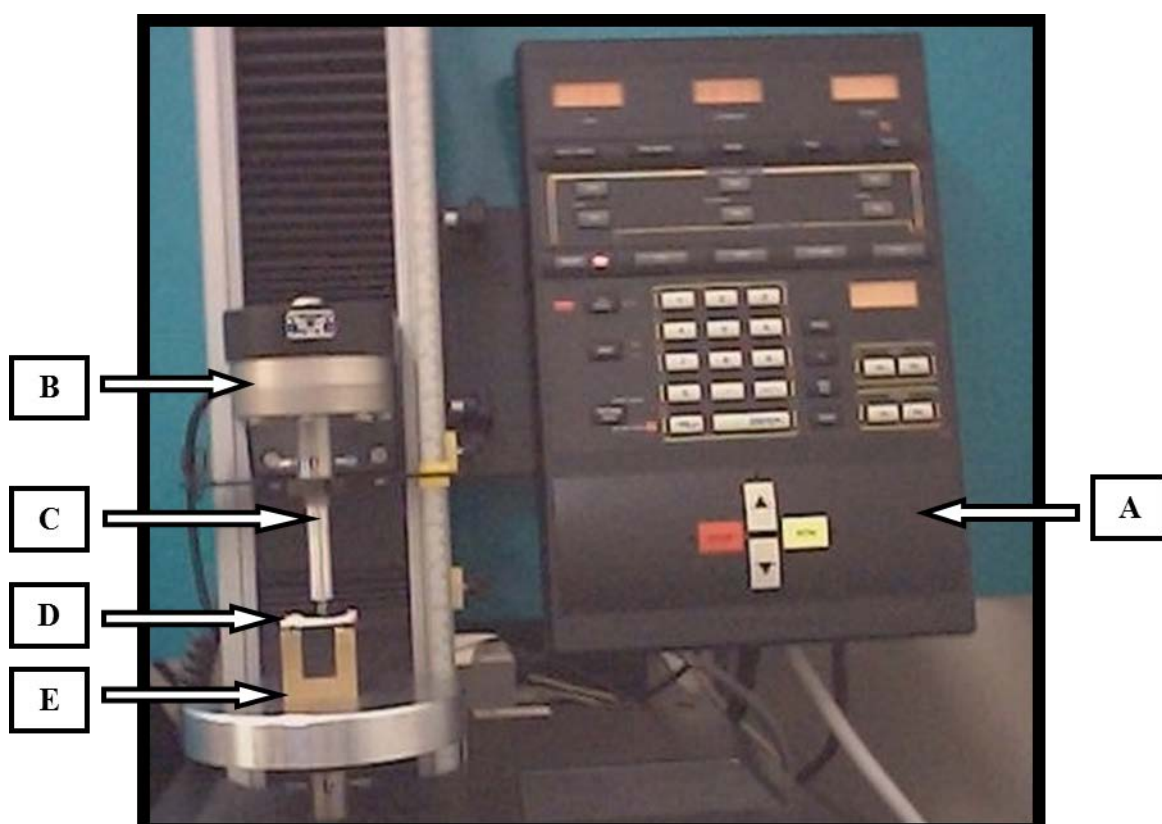


Figura 2: Máquina de Ensaio Universal Instron (modelo 4444) utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmures de ratos. **A:** painel de controle; **B:** célula de carga ligada à ponte de extensimetria (1 kN); **C:** haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); **D:** osso (fêmur de rato); **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, foi aplicada uma pré-carga de 5 N por meio de uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm em sua extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para acomodação da amostra (estabilização do fêmur). Padronizou-se o tempo de acomodação em 15 segundos para todas as amostras e após este período, aplicou-se

uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 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 3). Da análise das curvas foram obtidas 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 superfícies planas e paralelas para o ensaio.

No início do teste, aplicou-se uma pré-carga de 10 N para estabilização e fixação das quintas vértebras lombares (SAMNEGARD, 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 3). Da análise das curvas foram obtidas as seguintes propriedades biomecânicas: carga (força) máxima, resiliência, tenacidade e rigidez.

Deformação (mm)

Corresponde à 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 3).

Carga no Limite Elástico (N)

Corresponde a carga que separa a fase elástica da plástica (C_1 , na figura 3). 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 3).

Carga de Fratura (N)

Corresponde a carga aplicada no momento da fratura da amostra (fêmur) ao longo do ensaio (C_3 , na figura 3).

Resiliência (J)

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

Tenacidade (J)

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

Rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$)

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.

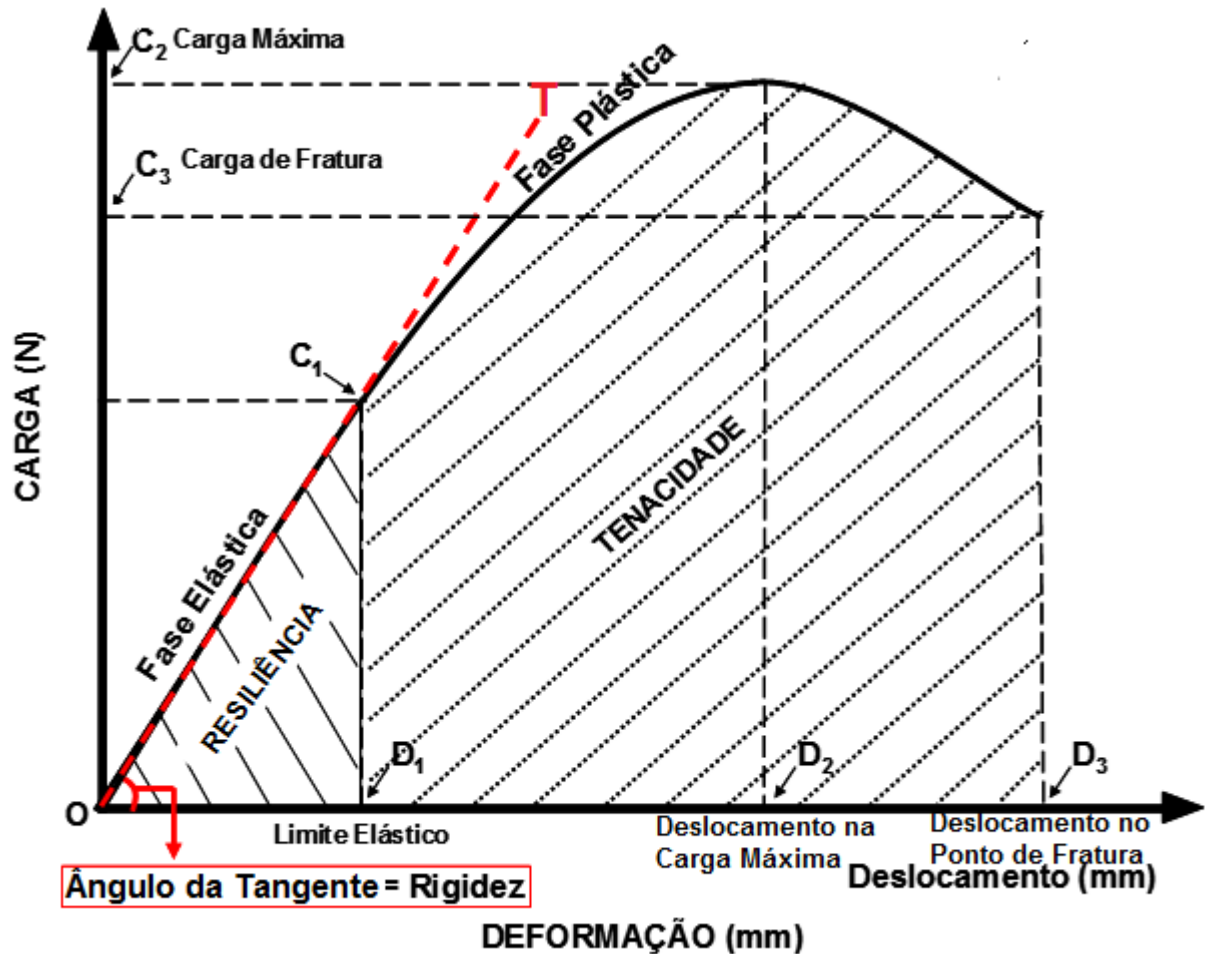


Figura 3: Gráfico Carga x Deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas: C₁: Carga no Limite Elástico; D₁: Deformação (deslocamento) no Limite Elástico; C₂: Carga Máxima; D₂: Deformação (deslocamento) na Carga Máxima; C₃: Carga de Fratura; D₃: Deformação (deslocamento) na Carga 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.

3.6.4 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, da Embrapa – Instrumentação Agropecuária, São Carlos -SP.

Após a obtenção, as imagens geradas foram analisadas pelos softwares CTAn® e CTVol®. Os parâmetros obtidos foram: volume tecidual (TV), volume ósseo (BV), percentual de volume ósseo (BV/TV) e espessura trabecular (Tb.Th).

3.6.5 Densidade Radiográfica

Para determinação da densidade radiográfica, foram realizadas tomadas radiográficas das quartas vértebras lombares de cada um dos animais dos diferentes grupos experimentais, as quais foram digitalizadas com um Scanner Fotográfico HP Scanjet G4050 (SCNHP4050) com um 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; b).

O software Image J[®] foi utilizado para contornar toda a região de interesse (RDI), 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; b), 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, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Araçatuba - SP.

3.7 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos em cada grupo foram comparados por meio de uma variância paramétrica (ANOVA one way) por meio do software GraphPad Prism®. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e as diferenças entre os grupos foi analisada pelo teste “post-hoc” de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3.8 NORMAS TÉCNICAS REFERENTES À ELABORAÇÃO DO TRABALHO

As referências e citações, bem como a estrutura geral deste trabalho seguem a NBR 6023 e 10520 de 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

Na figura 4 estão apresentados os valores da massa corporal (g) inicial (do início do tratamento), final (finalizadas as 12 semanas de tratamento) e o ganho de massa corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais durante as 12 semanas de tratamento: Controle Intacto, Ovariectomizado Controle (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Para a massa inicial, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Entretanto foi observado um aumento das massas finais dos grupos Controle Ovariectomizado e Ovariectomizado + Resveratrol, alterações estas condizentes com os dados de ganho de massa corporal.

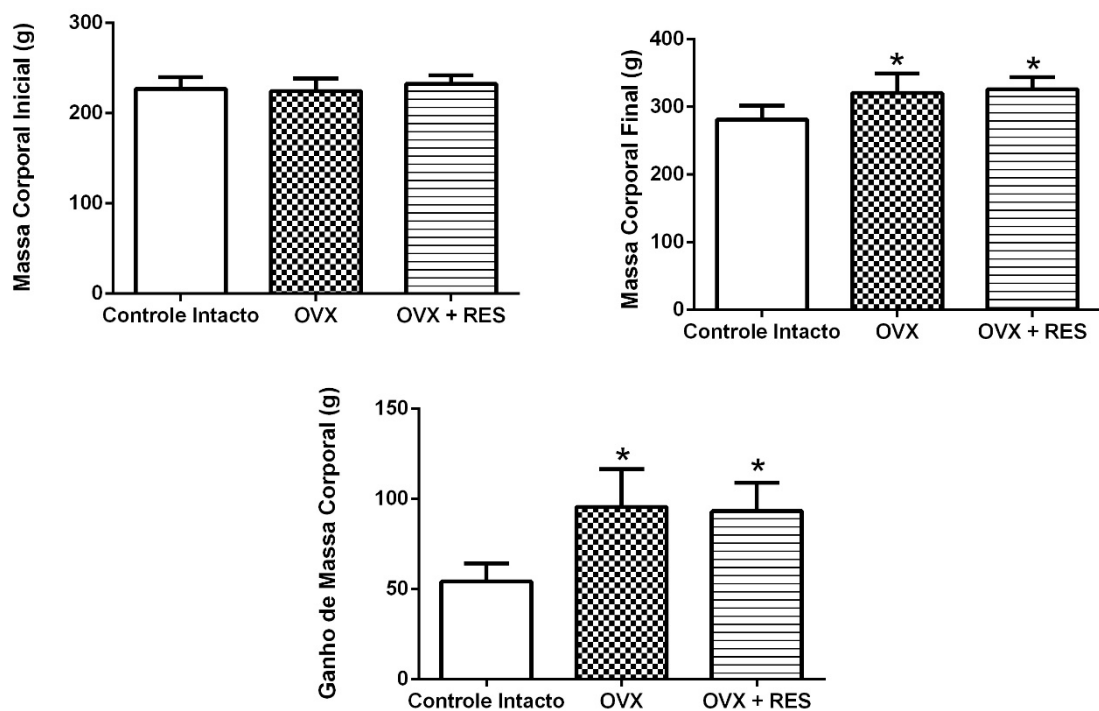


Figura 4: Representação gráfica da massa corporal inicial (g) dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES), respectivamente. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * $p < 0,05$ vs. Controle Intacto.

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

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

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT (10)	OVX (10)	OVX + RES (10)
MC Inicial (g)	227,0 ± 13,21	224,6 ± 14,05	232,6 ± 9,24
MC Final (g)	281,2 ± 20,51	320,2 ± 28,70*	325,8 ± 17,62*
Ganho da MC (g)	54,2 ± 10,04	95,6 ± 20,89*	93,2 ± 15,89*

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = nº. animais. * p < 0,05 vs. INT.

4.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

4.2.1 Parâmetros biométricos dos fêmures

Na figura 5 estão apresentados os valores do comprimento, diâmetro maior e menor (mm), peso úmido, peso imerso, peso seco e peso das cinzas (g) dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Não foram observadas diferenças entre os grupos para todos este parâmetros.

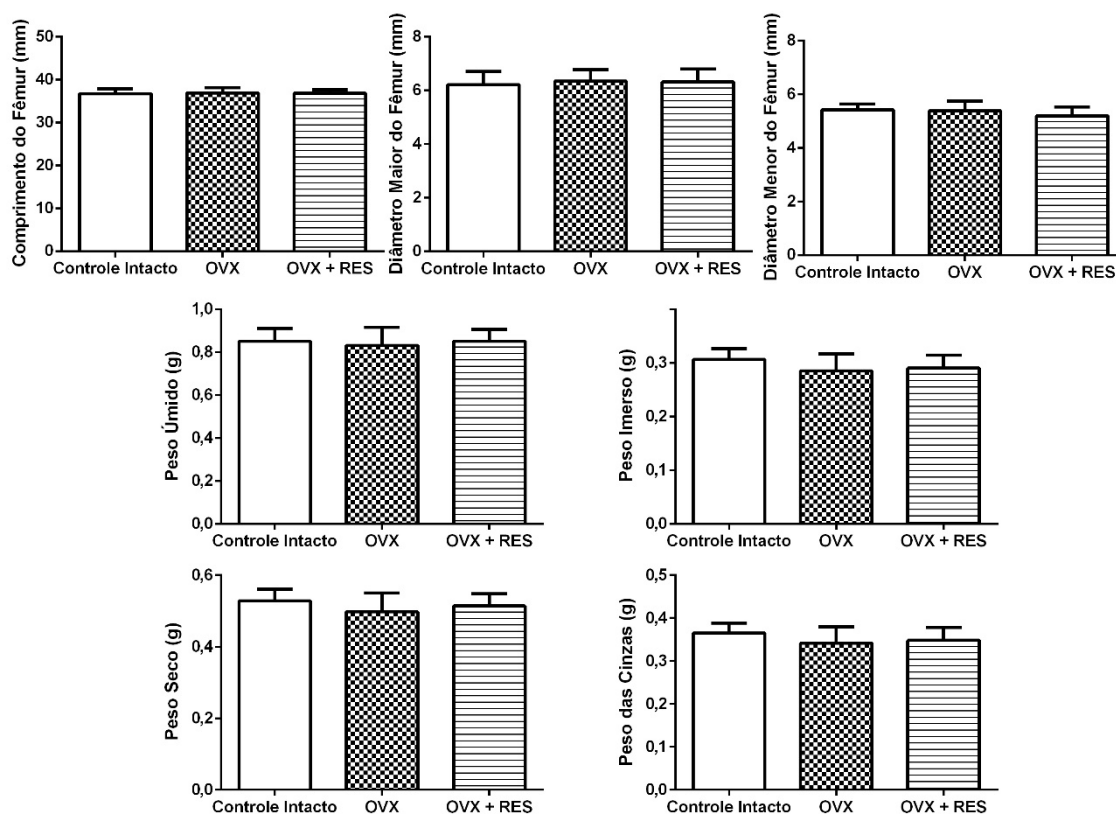


Figura 5: Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES), respectivamente. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, para $p < 0,05$.

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

Tabela 2: Comprimento, Diâmetros Maior e Menor das diáfises em milímetros (mm) e Pesos Úmido, Imerso, Seco e das cinzas em gramas (g) dos fêmures direito dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT (10)	OVX (10)	OVX + RES (10)
Comprimento (mm)	36,710 ± 1,132	36,900 ± 1,212	36,810 ± 0,826
Diâmetro maior (mm)	6,220 ± 0,484	6,350 ± 0,428	6,315 ± 0,482
Diâmetro menor (mm)	5,420 ± 0,219	5,385 ± 0,357	5,195 ± 0,333
Peso úmido (g)	0,849 ± 0,060	0,831 ± 0,083	0,850 ± 0,055
Peso imerso (g)	0,306 ± 0,019	0,285 ± 0,033	0,290 ± 0,0247
Peso seco (g)	0,527 ± 0,032	0,498 ± 0,053	0,513 ± 0,035
Peso das cinzas (g)	0,365 ± 0,023	0,342 ± 0,038	0,348 ± 0,030

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

4.2.2 Parâmetros biométricos das vértebras

Na figura 6 estão apresentados os valores da altura (mm), peso úmido, peso imerso, peso seco e peso das cinzas (g) das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Ovariectomizado Controle (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Não foram observadas diferenças entre os grupos para todos os parâmetros acima.

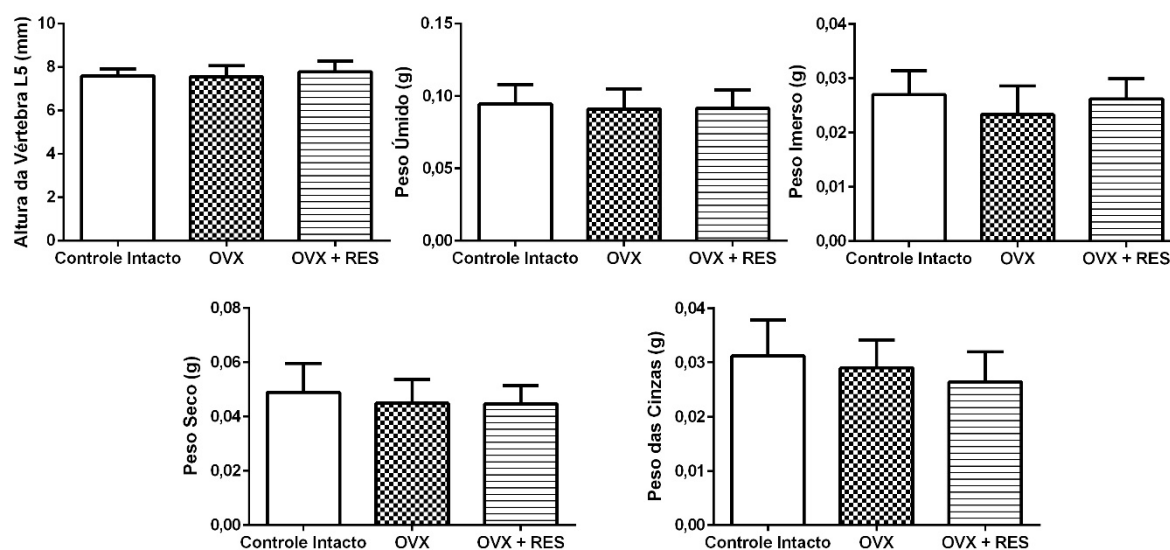


Figura 6: Representação gráfica dos valores de parâmetros biométricos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES), respectivamente. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, para $p < 0,05$.

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

Tabela 3: Altura do corpo 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 Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT (10)	OVX (10)	OVX + RES (10)
Altura	7,600 \pm 0,310	7,555 \pm 0,516	7,780 \pm 0,497
Peso úmido (g)	0,094 \pm 0,013	0,091 \pm 0,014	0,092 \pm 0,013
Peso imerso (g)	0,027 \pm 0,004	0,023 \pm 0,005	0,026 \pm 0,004
Peso seco (g)	0,049 \pm 0,011	0,045 \pm 0,009	0,045 \pm 0,007
Peso das cinzas (g)	0,031 \pm 0,007	0,029 \pm 0,005	0,026 \pm 0,006

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

4.3 PARÂMETROS FÍSICOS

4.3.1 Parâmetros físicos dos fêmures

Na figura 7 estão apresentados os valores das propriedades físicas: percentual ósseo de água, de material mineral e de material orgânico, volume ósseo (cm^3), densidade mineral e óssea (g/cm^3) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Ovariectomizado Controle (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Não foram detectadas diferenças entre os grupos para os parâmetros: porcentagem de material orgânico e volume ósseo.

Foi observada uma diminuição dos parâmetros densidade mineral, densidade óssea e porcentagem de material mineral em ambos os grupos ovariectomizados (OVX e OVX + RES) em relação ao grupo Controle Intacto (representado na tabela 4 e na figura 7 por *). Na comparação entre os grupos OVX vs. OVX+RES, não foram observada diferenças.

Em relação ao parâmetro porcentagem de água no osso, foi observada uma diminuição deste apenas no Grupo OVX em relação ao Grupo Controle Intacto, não havendo diferenças entre os grupos: Controle Intacto vs. OVX + RES e OVX vs. OVX + RES.

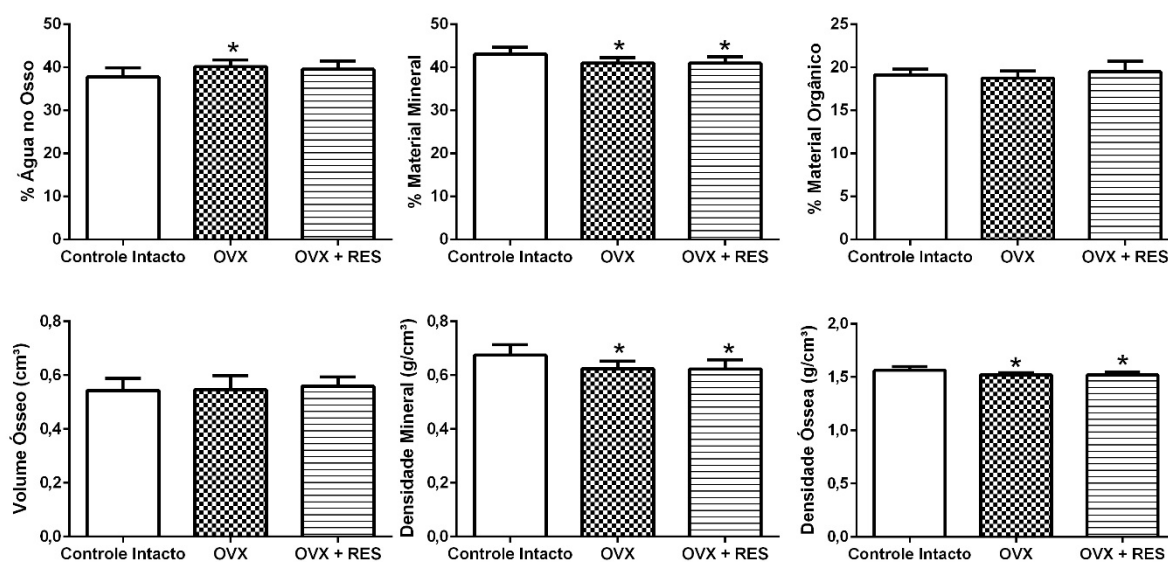


Figura 7: Representação gráfica dos valores de parâmetros físicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES), respectivamente. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * $p < 0,05$ vs. Controle Intacto.

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

Tabela 4: Percentual de água, material mineral e material orgânico no osso, volume ósseo (cm³), densidade mineral e óssea (g/cm³) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT (10)	OVX (10)	OVX + RES (10)
Água no osso (%)	37,811 ± 2,095	40,197 ± 1,555*	39,558 ± 1,902
Material mineral (%)	43,084 ± 1,573	41,040 ± 1,200*	40,960 ± 1,512*
Material orgânico (%)	19,105 ± 0,703	18,763 ± 0,816	19,482 ± 1,208
Volume ósseo (cm ³)	0,543 ± 0,046	0,547 ± 0,052	0,559 ± 0,034
Densidade mineral (g/cm ³)	0,675 ± 0,040	0,624 ± 0,027*	0,623 ± 0,034*
Densidade óssea (g/cm ³)	1,565 ± 0,034	1,521 ± 0,023*	1,519 ± 0,028*

Média ± Desvio Padrão (D.P.). () = nº. animais. *p<0,05 vs. INT.

4.3.2 Parâmetros físicos da vértebras

Na figura 8 estão apresentados os valores dos parâmetros físicos das vértebras: percentual ósseo de água, de material mineral e de material orgânico, volume ósseo (cm³), densidade mineral e óssea (g/cm³) das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Ovariectomizado Controle (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Não foram detectadas diferenças entre os grupos para os parâmetros: porcentagem óssea de água e de material orgânico e volume ósseo.

Houve uma diminuição da porcentagem de material mineral e densidade mineral entre os grupos Controle Intacto vs. OVX + RES, não havendo diferenças entre os grupos: Controle Intacto vs. OVX e OVX vs. OVX+RES.

Já no parâmetro densidade óssea foi observado uma diminuição deste no grupo OVX vs. Controle Intacto e aumento no grupo OVX + RES vs. OVX, não havendo diferenças entre os grupos: Controle Intacto vs. OVX + RES.

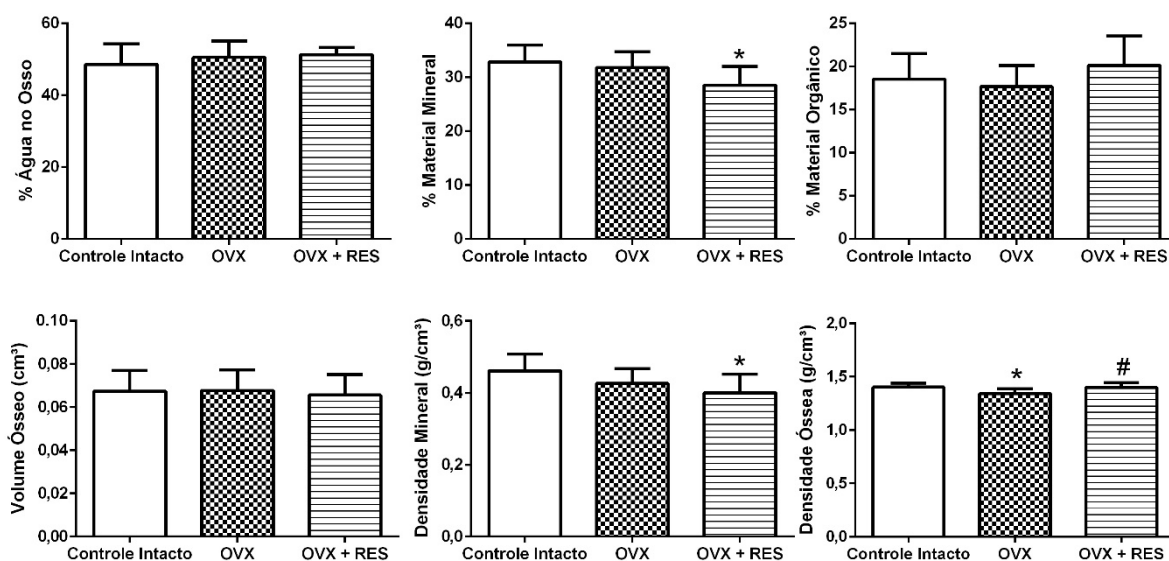


Figura 8: Representação gráfica dos valores de parâmetros físicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES), respectivamente. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * $p < 0,05$ vs. Controle Intacto, # $p < 0,05$ vs. OVX.

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

Tabela 5: Percentual de água, material mineral e material orgânico no osso, volume ósseo (cm^3), densidade mineral e óssea (g/cm^3) das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT (10)	OVX (10)	OVX + RES (10)
Água no osso (%)	48,580 \pm 5,770	50,564 \pm 4,539	51,306 \pm 1,969
Material mineral (%)	32,870 \pm 3,145	31,774 \pm 2,960	28,554 \pm 3,432*
Material orgânico (%)	18,551 \pm 2,933	17,662 \pm 2,474	20,139 \pm 3,403
Volume ósseo (cm^3)	0,067 \pm 0,009	0,068 \pm 0,010	0,065 \pm 0,010
Densidade mineral (g/cm^3)	0,461 \pm 0,046	0,426 \pm 0,041	0,400 \pm 0,052*
Densidade óssea (g/cm^3)	1,403 \pm 0,037	1,341 \pm 0,047*	1,400 \pm 0,042#

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

4.4 PARÂMETROS BIOMECÂNICOS

4.4.1 Parâmetros biomecânicos dos fêmures

Na figura 9 estão expressos os valores das propriedades biomecânicas dos fêmures: carga (força) máxima (N), deslocamento na carga máxima (mm), tenacidade (J), resiliência (J), rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$), deslocamento no ponto de fratura (mm) e carga (força) máxima do ponto de fratura (N) dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Ovariectomizado Controle (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros acima.

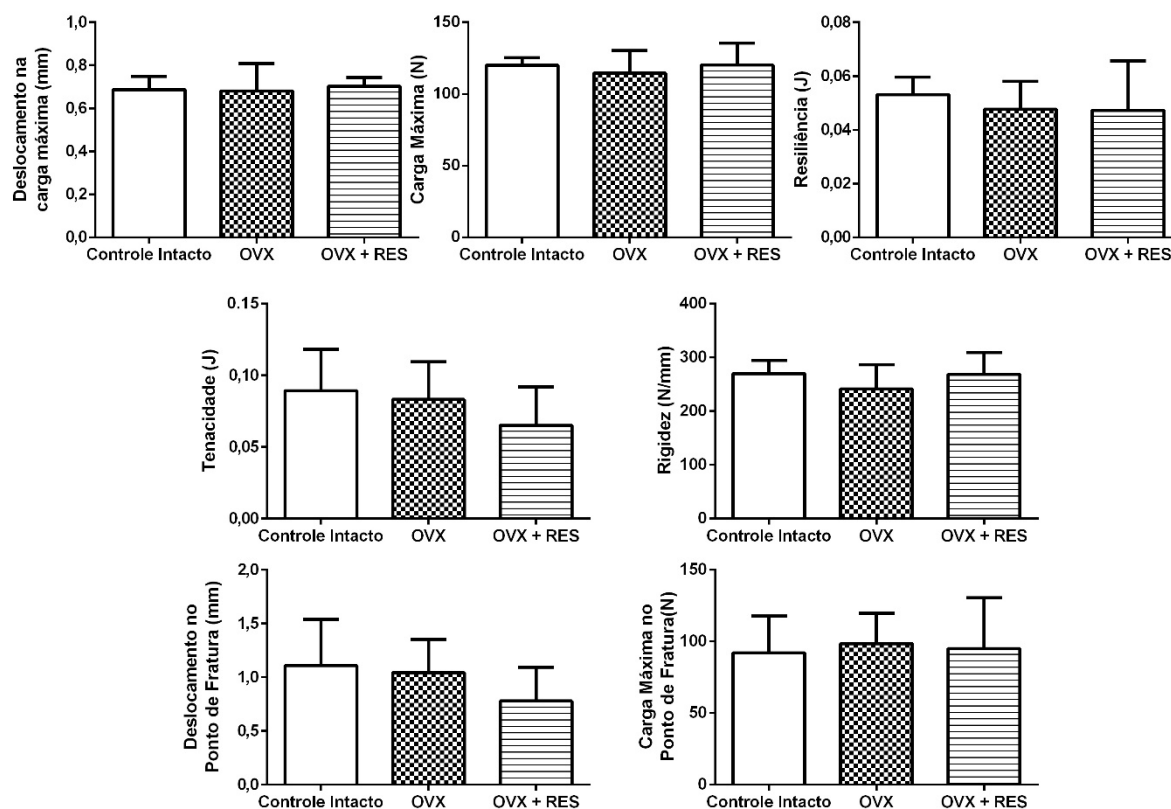


Figura 9: Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos dos fêmures direitos dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, para $p < 0,05$.

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

Tabela 6: Carga (Força) Máxima (N), deslocamento na carga máxima (mm), tenacidade (J), resiliência (J), rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$), deslocamento no ponto de fratura (mm) e carga (força) máxima no ponto de fratura (N) obtidos no teste biomecânico dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT (10)	OVX (10)	OVX + RES (10)
Carga máxima (N)	120,100 ± 5,112	114,600 ± 15,668	120,160 ± 15,338
Deslocamento na carga máxima (mm)	0,688 ± 0,062	0,682 ± 0,127	0,643 ± 0,206
Tenacidade (J)	0,089 ± 0,029	0,083 ± 0,026	0,065 ± 0,027
Resiliência (J)	0,053 ± 0,007	0,048 ± 0,010	0,047 ± 0,018
Rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$)	269,720 ± 25,032	241,620 ± 45,193	268,680 ± 40,385
Deslocamento no ponto de fratura (mm)	1,109 ± 0,430	1,042 ± 0,310	0,779 ± 0,315
Carga máxima no ponto de fratura (N)	92,070 ± 25,701	98,500 ± 21,233	95,040 ± 35,541

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

4.4.2 Parâmetros biomecânicos das vértebras

Na figura 10 estão apresentados os valores das propriedades biomecânicas: Carga (Força) Máxima (N), deslocamento na carga máxima (mm), tenacidade (J), resiliência (J) e rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$), obtidos com o teste biomecânico das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Ovariectomizado Controle (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Não foram detectadas diferenças entre os grupos para os todos os parâmetros acima. Porém, para o parâmetro carga máxima, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas entre os grupos, seus valores estão visivelmente reduzidos no Grupo OVX e OVX+RES em relação ao grupo Controle Intacto e aumentados no grupo OVX+RES em relação ao grupo OVX.

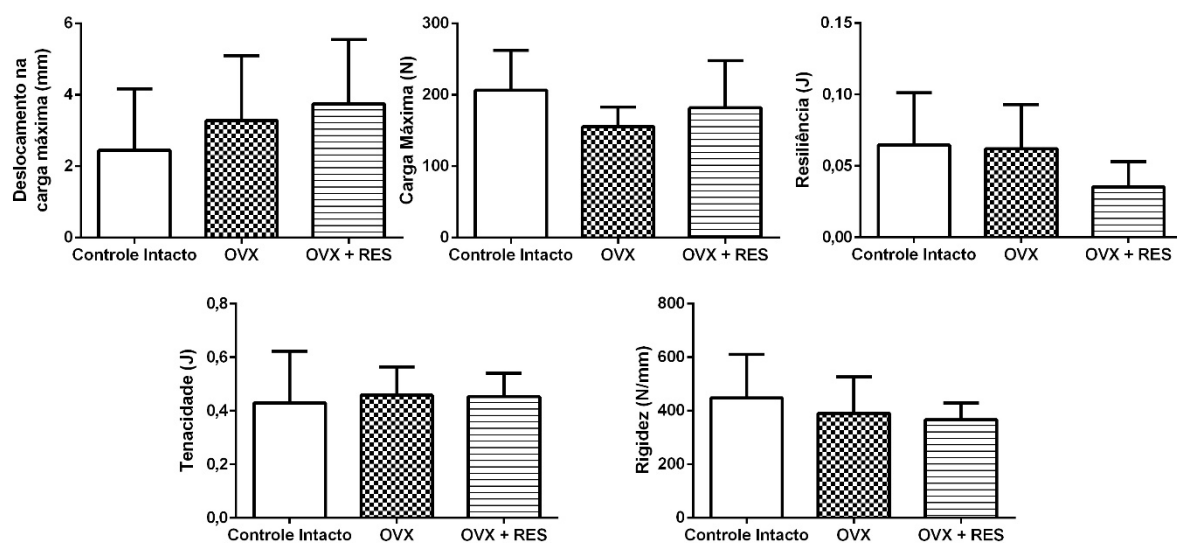


Figura 10: Representação gráfica dos valores de parâmetros biomecânicos das quintas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES), respectivamente. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, para $p < 0,05$.

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

Tabela 7: Carga (força) máxima (N), deslocamento na carga máxima (mm), tenacidade (J), resiliência (J) e rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$) obtidos com o teste biomecânico das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT (10)	OVX (10)	OVX + RES (10)
Carga máxima (N)	206,100 ± 56,068	155,130 ± 27,407	181,710 ± 66,198
Deslocamento na carga máxima (mm)	2,444 ± 1,720	3,272 ± 1,818	3,740 ± 1,807
Tenacidade (J)	0,430 ± 0,193	0,458 ± 0,106	0,453 ± 0,087
Resiliência (J)	0,065 ± 0,037	0,062 ± 0,031	0,035 ± 0,018
Rigidez ($10^3 \cdot \text{N/m}$)	448,050 ± 162,070	391,120 ± 135,840	366,730 ± 62,909

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

4.5 MICROTOMOGRÁFIA ÓSSEA

As figuras 11, 12 e 13 representam, respectivamente, imagens microtomográficas das vértebras L4 dos animais dos grupos: Controle Intacto, OVX e OVX + RES.

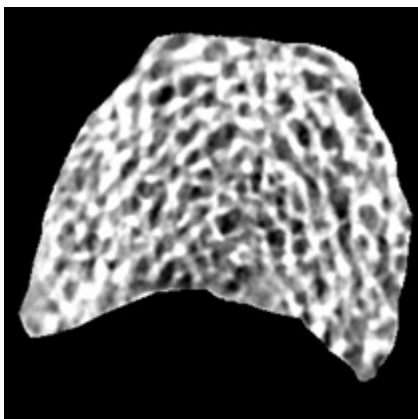


Figura 11: Imagem Microtomográfica da Vértebra L4 do grupo Controle Intacto.

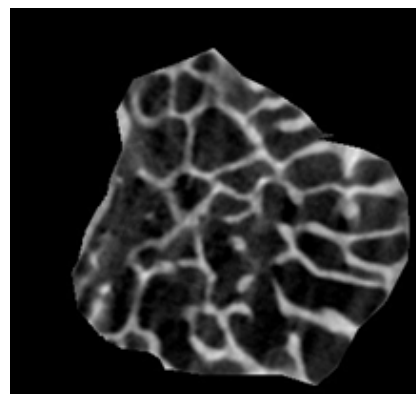


Figura 12: Imagem Microtomográfica da Vértebra L4 do grupo OVX.

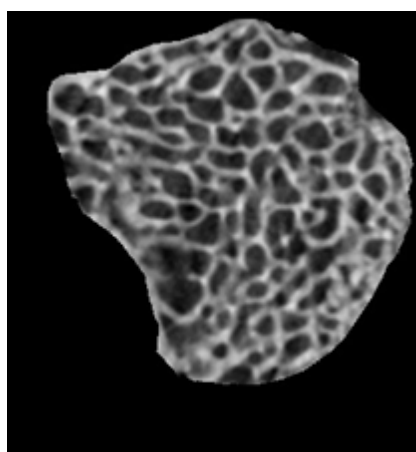


Figura 13: Imagem Microtomográfica da Vértebra L4 do grupo OVX + RES.

Na tabela 8 pode-se observar a comparação das porcentagens das médias (entre duas vértebras sempre do segundo grupo em relação ao primeiro grupo) dos parâmetros microtomográficos: volume tecidual (TV), volume ósseo (BV), percentual de volume ósseo (BV/TV) e espessura trabecular (Tb.Th) das sextas vértebras lombares dos animais entre os diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). O grupo Ovariectomizado + Resveratrol apresentou aumento do volume tecidual, volume ósseo, percentual de volume ósseo e espessura trabecular (0,89%, 3,45%, 2,42% e 40,32%, respectivamente) em relação ao grupo Controle Ovariectomizado. Já em comparação com o grupo Controle Intacto, apresentou diminuição do volume tecidual e volume ósseo (10,89%, 9,32%) enquanto seu percentual de

volume ósseo e espessura trabecular aumentaram (1,70% e 0,94%, respectivamente). Ademais, houve redução do volume tecidual, volume ósseo, percentual de volume ósseo e espessura trabecular (11,73%, 12,34%, 0,71% e 28,07%, respectivamente) do grupo Controle Ovariectomizado em relação ao grupo Controle Intacto.

Tabela 8: Comparações entre os grupos para os parâmetros: volume tecidual (TV), volume ósseo (BV), percentual de volume ósseo (BV/TV) e espessura trabecular (Tb.Th) dos achados microtomográficos das vértebras dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

Parâmetros Microtomográficos	TV	BV	BV/TV	Tb.Th
Grupos				
INT x OVX	↓ 11,73%	↓ 12,34%	↓ 0,71%	↓ 28,07%
INT x OVX + RES	↓ 10,89%	↓ 9,32%	↑ 1,70%	↑ 0,94%
OVX x OVX + RES	↑ 0,89%	↑ 3,45%	↑ 2,42%	↑ 40,33%

Porcentagem da média de 2 amostras de vértebras (L4). Porcentagem da diferença do segundo grupo em relação ao primeiro na comparação.

4.6 DENSIDADE RADIOGRÁFICA

Na figura 14 estão apresentados os valores das densidades radiográficas (mmAl) das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto, Ovariectomizado Controle (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES). Houve diminuição deste parâmetro nos grupos OVX e OVX + RES em relação ao grupo Controle Intacto. Entretanto, também foi observado aumento da densidade radiográfica do grupo OVX + RES quando comparado ao grupo OVX.

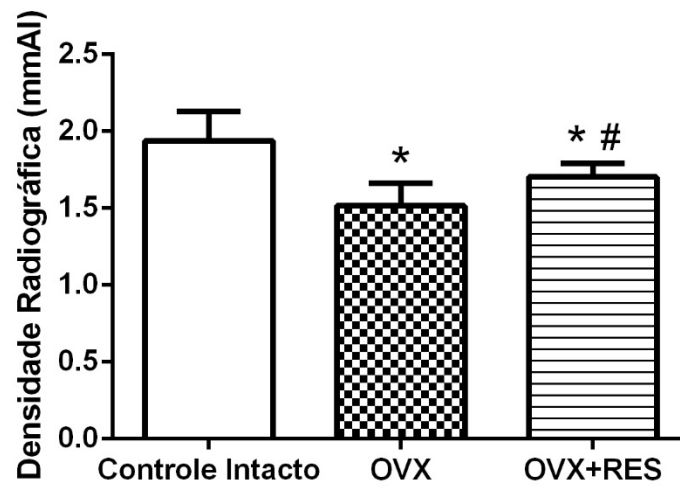


Figura 14: Representação gráfica dos valores de densidade radiográfica (mmAl) das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES), respectivamente. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão: * $p < 0,05$ vs. Controle Intacto, # $P < 0,05$ vs. OVX.

Na tabela 9 estão apresentados os valores médios, com os respectivos desvios padrão, do parâmetro descrito acima

Tabela 9: Valores de Densidade radiográfica (mmAl), das quartas vértebras lombares dos animais dos diferentes grupos experimentais: Controle Intacto (INT), Controle Ovariectomizado (OVX) e Ovariectomizado + Resveratrol (OVX + RES).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	INT (10)	OVX (10)	OVX + RES (10)
Densidade Radiográfica(mmAl)	1,938 \pm 0,190	1,516 \pm 0,148*	1,703 \pm 0,090*#

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

5 DISCUSSÃO

O estudo analisou os efeitos do resveratrol sobre o tecido ósseo de ratas adultas jovens ovariectomizadas osteopênicas. O modelo de ovariectomia foi válido e eficiente para induzir a osteopenia nas ratas estudadas, uma vez que, na eutanásia, foi observada atrofia uterina em todas que sofreram a cirurgia e foi observado ganho de massa corporal, diminuição da densidade óssea tanto em fêmures quanto nas vértebras e diminuição da densidade radiográfica e alterações da microarquitetura das vértebras condizentes com as observadas na osteopenia por deficiência de estrógeno. Foi também evidenciado que o tratamento com resveratrol foi capaz de prevenir esta diminuição da densidade óssea, radiográfica e as alterações da microarquitetura das vértebras. Portanto, nosso objetivo é discutir os principais prováveis mecanismos pelos quais resveratrol foi capaz de prevenir a osteopenia, principalmente em vértebras.

É comprovado que, ao realizar a ovariectomia em ratas, é possível mimetizar os efeitos da deficiência de estrógeno em humanos, além desta deficiência induzida ser responsiva a tratamentos e prevenções também aplicáveis aos humanos, com eficácia comprovada. Outrossim, a realização da cirurgia em ratas de três meses de idade permite considerar os efeitos da cirurgia significativos, conforme indicado por KALU (1991) e PATLAS et al. (2000).

A vantagem de estudos em animais é a capacidade de se obter um sistema biológico completo e uniforme que permite a avaliação dos efeitos gerais de mudanças antes observadas em sistemas celulares. Um estudo com animais controlado cuidadosamente constitui um passo essencial para a extrapolação de efeitos biológicos para a segurança da saúde humana. A similaridade da estrutura celular e bioquímica entre animais e humanos proporciona uma base de validação geral para a predição de efeitos semelhantes aos químicos em populações humanas (TURNER, 2001; CELIK, OGENLER, COMELEKOGU, 2005). Deste modo, sendo o rato um bom modelo para o estudo de efeitos da osteoporose por deficiência de estrógeno, assim como há a possibilidade de extrapolar tratamentos ou sua prevenção em humanos, é possível verificar a hipótese de que o resveratrol pode atuar como preventivo de osteopenia no período pós-menopausa.

No nosso modelo de tratamento preventivo, houve fácil adaptação dos animais ao sistema proposto, não acarretando em qualquer alteração comportamental ou reação adversa no animal. A dose e ciclo de administração do resveratrol escolhida e o início do tratamento segue de acordo com o estudo de LIU et al. (2005), uma vez que estes comprovaram os

efeitos dele como protetor da osteopenia. Porém, o modo de administração divergiu do proposto por eles uma vez que WALLE et al. (2004), através do estudo do resveratrol em humanos, indicaram que a administração via oral diminui a biodisponibilidade do resveratrol enquanto DO AMARAL et al. (2008) indicam que a administração por meio de injeção intraperitoneal aumenta a absorção e biodisponibilidade do mesmo.

Sabe-se da importância da massa corporal para estudos do tecido ósseo uma vez que esta variável exerce estresse mecânico sobre os ossos e contribui para o ganho de massa óssea, tornando essencial a padronização e homogeneidade de massa corporal no início do trabalho (BERG,HARMISON, 1957; BURR,ROBLING,TURNER, 2002). Dada tal importância da homogeneidade da massa corporal inicial, verificou-se a padronização adequada desta variável nos animais dos diferentes grupos experimentais (figura 4, tabela 1), processo este fundamental para o controle do ensaio proposto.

O maior ganho de massa corporal de ambos os grupos ovariectomizados frente ao grupo intacto e, conseqüentemente, suas maiores massas corporais finais (figura 4, tabela 1) é uma característica frequentemente encontrada em casos de deficiência de estrogênio. Apesar dos mecanismos que permeiam tal aumento ainda não estarem claros, há confirmação bem consolidada na literatura desta resposta, mostrando uma maior deposição hídrica e lipídica nos indivíduos (tanto em modelo animal quanto em humanos) com a diminuição hormonal (REBUFFÉ-SCRIVE et al., 1986; KALU, 1991; DANIELSEN,MOSEKILDE,SVENSTRUP, 1993; JIANG,SACCO,WARD, 2008).

Um dos prováveis mecanismos deste ganho de massa corporal baseia-se na sua relação com receptores de estrogênio (ERs), ampla família de receptores hormonais presentes em vários tecidos, considerado um dos meios pelo qual o estrogênio afeta sua fisiologia. HEINE et al. (2000) observaram o ganho de massa corporal em ratas *knockout* para o receptor de estrogênio α (ER α), enquanto OHLSSON et al. (2000) não observaram esta alteração em animais *knockout* para o receptor de estrogênio β (ER β). Uma vez que o hormônio ativa ambos os receptores, sua diminuição levaria a uma menor ativação de ER α , aumentando o ganho de massa corporal. Ademais, foi observado também em ratas ovariectomizadas, uma diminuição do gasto energético (levando a uma maior deposição de gordura) e uma maior ingestão de alimento relacionada com uma diminuição dos receptores de leptina (hormônio relacionado à saciedade) no cérebro (RICHARD et al., 1987; KIMURA et al., 2002). Ainda, é evidenciado na literatura que, em mulheres menopausadas, quase a totalidade de hormônios provem da síntese extragonadal e, sendo o tecido adiposo um dos tecidos mais relacionados com esta síntese (por ação da aromatase sobre andrôgenos), uma maior deposição lipídica pode ser

considerada uma tentativa de suprir a deficiência ovariana de produção dos hormônios (LABRIE et al., 1997; RIGGS,KHOSLA,MELTON, 2002).

Independentemente do ganho de massa corporal característico e a importância desta para o metabolismo ósseo, JIANG,SACCO;WARD (2008) comprovaram que este não é o suficiente para proteção dos efeitos da osteopenia em ratas.

O tratamento com resveratrol não foi capaz de prevenir o aumento de massa corporal no nosso estudo (figura 4, tabela 1). HENRY;WITT (2002) indicam que o resveratrol age de forma antagônica em tecidos com maiores concentrações de ER α . Uma vez que já foi observada a relação entre baixa expressão do ER α e o ganho de massa, tal ação antagônica pode estar relacionada com a não manutenção desta com o tratamento frente ao grupo controle. Independente do mecanismo, este resultado corrobora com os apresentados por TURNER et al. (1999), SEHMISCH et al. (2008) e ZHAO et al. (2012) enquanto, nesses mesmos estudos, o tratamento com estrógeno foi capaz de reverter tal ganho. Tal fato demonstra que, independente dos efeitos relacionados ao estrógeno que o resveratrol possa ter, ele não age de forma homogênea em todos os tecidos responsáveis ao hormônio, reforçando sua classificação como um SERM.

A osteoporose apresenta como sintoma clínico mais importante a fratura óssea (uma vez que ela é responsável por maior parte das comorbidades e mortalidade), relacionada a uma diminuição da densidade mineral óssea e degradação da microarquitetura trabecular, levando à fragilidade do osso. Ademais, sabe-se que ela ocasiona efeitos diferentes nos contingentes cortical e trabecular do osso e a distinção de ambos possui grande importância mecânica (PARFITT et al., 1983; DEMPSTER, 2000; CURREY, 2002; AKHTER et al., 2007; COMPSTON, 2010; ARMAS,RECKER, 2012; BONUCCI,BALLANTI, 2013; KANIS et al., 2013). Portanto é de grande valia, ao avaliar os efeitos de uma substância para prevenção da osteoporose, observar a densidade óssea, alterações biofísicas (como sua composição e outros parâmetros relacionados à densidade) e alterações biomecânicas (para avaliar a resistência do osso à fraturas) de ossos com maior contingente cortical e trabecular, além da microarquitetura trabecular do osso (DEMPSTER, 2000; SEHMISCH et al., 2008).

Não obstante, os ossos mais comuns para estudo dos efeitos da osteoporose no tecido ósseo são: fêmur, tíbia e vértebras, sendo os dois primeiros com predominância de contingente cortical em sua estrutura e as vértebras com predominância de contingente trabecular (PATLAS et al., 2000). Desta forma, utilizando fêmures e vértebras neste trabalho, pode-se ampliar o estudo dos efeitos, não só da osteoporose em si, como do resveratrol sobre ossos com predominância de ambos os contingentes.

Nas medidas biométricas e biofísicas (figuras 5, 6, 7 e 8 tabelas 2, 3, 4 e 5), não foram observadas diferenças entre os grupos para os parâmetros de desenvolvimento ósseo tanto dos fêmures (comprimento, diâmetro maior, diâmetro menor e volume ósseo), quanto das vértebras (altura e volume ósseo). Tais resultados demonstram que a ovariectomia não foi capaz de alterar o crescimento ósseo. PATLAS et al. (2000), ao compararem o efeito da ovariectomia em ratas nas quais a cirurgia foi realizada em grupos com 1, 3, 6 e 10 meses de idade, supuseram que, aos 3 meses de idade ainda há o processo de formação óssea acentuado, podendo mascarar possíveis efeitos sobre o crescimento ósseo. FRANCISCO et al. (2011), após avaliarem os efeitos da ovariectomia realizada em ratas com diversas faixas etárias, através da análise de diferentes sítios ósseos (coluna, fêmur proximal, fêmur distal, tíbia proximal e tíbia distal), observaram que as ratas operadas aos 3 meses de idade (mesma idade utilizada neste trabalho) apresentavam uma resposta diminuída à osteopenia. Estes estudos permitem supor que na rata, aos 3 meses de idade (adulta jovem), a formação óssea não está diminuída o suficiente para que a maior reabsorção óssea característica da ovariectomia seja o suficiente para alterar o desenvolvimento dos ossos.

Os testes de flexão a três pontos (fêmures) e o de compressão vertebral possibilitam a observação das principais propriedades biomecânicas do tecido ósseo e suas subsequentes 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). Assim, é possível testar a capacidade do osso resistir à carga e, conseqüentemente, resistir à fraturas.

Nos ensaios biomecânicos deste estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos (figuras 9 e 10, tabelas 6 e 7) tanto em fêmures, quanto em vértebras mostrando que a ovariectomia e o tratamento com o resveratrol não foram capazes de alterar a resistência mecânica do osso. RIGGS, KHOSLA; MELTON (2002) relatam que as mulheres apresentam a perda óssea (e conseqüente osteoporose) dividida em duas fases: a fase rápida, na qual ela se dá devido à deficiência de estrógeno após a menopausa; e a fase lenta, na qual ela está relacionada ao envelhecimento. Na fase rápida, a perda óssea se concentra mais no contingente trabecular (contingente mais metabolicamente ativo), chegando a 20-30%, já no contingente cortical a perda é muito menor, sendo de 5-10%. Em nosso estudo, as ratas utilizadas possuíam três meses de vida, sendo consideradas adultas-jovens e, conforme SEHMISCH et al. (2008), utilizando ratas *Sprague-Dawley* na mesma idade, relataram que o efeito da osteoporose é maior no contingente trabecular e há um aumento do diâmetro da

diáfise associado ao aumento da espessura cortical em ossos longos visando aprimorar a força biomecânica do osso.

Embasando tais resultados, ITO et al. (2002) relataram que a deterioração microarquitetural trabecular devido à ovariectomia diminui a contribuição mecânica da porção trabecular em todo o osso, fazendo a força ser distribuída majoritariamente na porção cortical do mesmo. Logo, acrescentando tal informação ao fato de haver o aumento da espessura cortical do osso neste caso, é possível propor que houve uma atenuação dos efeitos da ovariectomia sobre os parâmetros biomecânicos apresentados.

Contudo, apesar da não apresentação de diferenças significativas, a diminuição da carga máxima com a ovariectomia e o aumento desta com o tratamento com resveratrol nas vértebras é visível e não se pode indicar que esses ossos estão tão propensos à fraturas quanto os osteoporóticos, principalmente ao relacioná-los com os dados apresentados da microarquitetura trabecular das vértebras. Esta apresenta degradação com a ovariectomia e o tratamento com resveratrol evita parcialmente tal degradação (figuras 11, 12 e 13, tabela 8). Estas alterações estão relacionadas às maiores incidências de fraturas pós-menopáusicas, sendo sua reparação benéfica para diminuição da incidência de fraturas (DEMPSTER, 2000).

Ainda sobre a análise da microarquitetura trabecular dos ossos, dentre os meios de se estudá-la, assim como as patologias ósseas, vem sendo usada a microtomografia computadorizada (microCT) e a análise de reconstruções em 3D apropriada para avaliar mudanças da estrutura (LAIB et al., 2001; YANG, PHAM, CRABBE, 2003). Assim sendo, ao focar apenas no contingente trabecular das vértebras estudadas, foi possível obter dados importantes sobre apenas a microarquitetura trabecular dos ossos, considerada tão importante. Nestes resultados (tabela 8), foi observada uma diminuição dos parâmetros volume tecidual (TV), volume ósseo (BV), percentual de volume ósseo (BV/TV, parâmetro este que representa a quantidade de tecido ósseo relacionado ao volume trabecular, ou seja, se houver mais tecido ósseo do que espaço trabecular, sua estrutura está mais íntegra) e da espessura da trabécula (Tb.Th, denota a possível resistência da trabécula) no grupo OVX vs. Controle Intacto. Tais resultados não só comprovam os efeitos da ovariectomia sobre a microarquitetura já relatados pela literatura, como também corroboram outros ensaios com ovariectomia de ratas (YANG, PHAM, CRABBE, 2003; CANO et al., 2008; PERILLI et al., 2010; FRANCISCO et al., 2011; ARMAS, RECKER, 2012; BONUCCI, BALLANTI, 2013).

Além disso, o tratamento com resveratrol foi capaz de aumentar os parâmetros alterados pela ovariectomia (TV, BV, BT/TV e TB.Th), quando comparados ao grupo OVX (tabela 8), sendo observados valores até maiores do que do grupo Controle Intacto (no caso do

BV/TV e Tb.Th). Nossos resultados corroboram os encontrados por ZHAO et al. (2013) que observaram o resveratrol protegendo contra o decréscimo da espessura trabecular (Tb.Th) em análises histomorfométricas da porção distal de fêmures direitos de ratas Wistar (3-4 meses de idade) ovariectomizadas. HABOLD et al. (2011) também observaram efeito protetor do resveratrol sobre a estrutura trabecular de metáfises de fêmures e tíbias, impedindo o decréscimo da BV/TV em ratos Wistar de 5 meses suspensos pela cauda (modelo experimental da osteoporose por desuso, cujos mecanismos vêm sendo considerados similares aos da osteoporose por deficiência de estrogênio, na literatura). Entretanto, a espessura trabecular apresentou resultados discrepantes, uma vez que não foram observados efeitos nas tíbias tanto da suspensão quanto do tratamento e, nos fêmures, a suspensão levou a uma diminuição e o tratamento não surtiu efeito. Neste caso, o tratamento com o resveratrol foi iniciado antes da suspensão pela cauda, podendo haver alguma relação com o efeito, além de que os próprios autores do artigo supuseram que o modelo de suspensão pela cauda em ratos pode apresentar algumas falhas ao mimetizar a osteoporose por desuso em humanos, pois o padrão de descarga de peso nos ratos é diferente do dos humanos (4 apoios vs. 2 apoios).

Ainda, ZHAO et al. (2013) também encontraram proteção contra a diminuição da Tb.Th com o tratamento com 17- β -Estradiol, hormônio comumente indicado para a reposição hormonal. CANO et al. (2008) obtiveram aumento da BV/TV e Tb.Th em imagens microtomográficas das regiões distais de fêmures de camundongos do sexo feminino C57BL/6 com 3 meses de idade, tratadas com raloxifeno, um SERM (assim como o resveratrol é considerado). SIMS et al. (1996) observaram proteção do estradiol contra a diminuição da BV/TV e Tb.Th em imagens histomorfométricas de diáfises de fêmures de ratas *Sprague-Dawley* com 6 meses de idade ovariectomizadas. Isto posto, com os resultados apresentados neste estudo e sua comparação com outros estudos envolvendo tanto o tratamento com resveratrol, como com outras substâncias de eficácia comprovada, é possível inferir não só que o resveratrol é capaz de proteger contra a degradação microarquitetural trabecular (também comprovada de forma qualitativa pelas figuras 11,12 e 13) ocasionada pela deficiência de estrogênio, como também seu efeito é similar ao apresentando por outros tratamentos utilizados atualmente.

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 analisados a partir da determinação do volume ósseo, de forma indireta por meio do princípio de Arquimedes, um método de alta confiabilidade (MARTIN,

1990; KEENAN et al., 1997; RENNO et al., 2007; MUHAMMAD et al., 2013). Neste estudo foram observadas diferenças entre os grupos para alguns parâmetros físicos (figuras 7 e 8, tabelas 4 e 5). Nos fêmures, foi observada diminuição da porcentagem de material mineral, densidade mineral e densidade óssea entre ambos os grupos ovariectomizados (OVX e OVX + RES) e o grupo Controle Intacto (INT) enquanto a porcentagem de água aumentou no grupo OVX vs. Controle Intacto. Nas vértebras, foi observada diminuição do material mineral e porcentagem de material mineral no grupo tratado com resveratrol (OVX+RES) vs. Controle Intacto, diminuição da densidade óssea no grupo controle ovariectomizado (OVX) vs. Controle Intacto e aumento desta densidade no grupo tratado com resveratrol (OVX+RES) vs. Controle Intacto, não havendo diferenças entre o grupo OVX+RES e o Controle Intacto.

Segundo MARTIN (1990), há uma relação direta entre a densidade mineral e o conteúdo mineral (porcentagem de material mineral) e uma relação inversa da primeira com o volume ósseo. Posto que o volume ósseo não foi alterado em nenhum dos grupos, a diminuição da densidade mineral seria devido à diminuição do conteúdo mineral, resultado este que foi observado (figuras 7 e 8, tabelas 4 e 5), comprovando a fórmula utilizada. Tal diminuição nos fêmures dos grupos ovariectomizados condiz com os resultados encontrados na literatura observando o Conteúdo Mineral Ósseo (BMC, *Bone Mineral Content*) de ratas ovariectomizadas através de outros métodos de análise como o DEXA (*Dual Energy X-Ray Absorptiometry*), padrão-ouro para análise da densidade óssea, e a microtomografia computadorizada (RAHNAMA, 2004; LAI et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

O resveratrol não foi capaz de prevenir esta diminuição do conteúdo mineral dos fêmures e, nas vértebras, tornou o grupo tratado o único com diminuição deste parâmetro em questão. Apesar de LIU et al. (2005) também terem observado a não proteção do resveratrol contra a diminuição do conteúdo mineral em sítios ósseos com maior contingente cortical (ponto central de fêmures) e trabecular (epífises de fêmures), não foram encontrados na literatura resultados semelhantes aos nossos. Entretanto, KUPISIEWICZ et al. (2010) supuseram que o DMSO (veículo utilizado com o resveratrol, assim como o utilizado no nosso estudo) ocasiona um quadro inflamatório no indivíduo, podendo afetar o osso. Adicionando isto ao fato de que é observada diminuição do conteúdo mineral ósseo em estudos de inflamação crônica além de desmineralização em doenças altamente inflamatórias (como o lúpus eritematoso sistêmico) (WALSH et al., 2005; SHEN et al., 2010). Sendo o contingente trabecular (presente em maior quantidade nas vértebras) metabolicamente mais ativo (CURREY, 2002), é possível supor que o responsável pela diminuição do material

mineral das vértebras é a inflamação causada pelo DMSO e este ser o motivo dos resultados discrepantes.

Quanto à densidade óssea, o grupo Controle Ovariectomizado (OVX) apresentou diminuição deste parâmetro frente ao grupo Controle Intacto em ambos os ossos, comprovando os relatos da literatura. Entretanto, os efeitos protetores do resveratrol (aumento no grupo OVX + RES vs. OVX) foram apenas observados nas vértebras no parâmetro obtido pelo método de Arquimedes (figura 8, tabela 5) confirmado pelo método da Densidade Radiográfica (figura 14, tabela 9). Nossos resultados corroboram os apresentados por LIU et al. (2005) que, ao tratarem com resveratrol via gavagem gástrica na mesma concentração utilizadas pelo nosso estudo (0,7 mg/kg MC) e pelo mesmo período de tempo (três meses) ratas Wistar ovariectomizadas, observaram aumento da densidade mineral óssea (BMD, *Bone Mineral Density*) apenas nas epífises de fêmures (com predominância do contingente trabecular). Contudo, LIN et al. (2005) ao tratarem com diferentes doses de resveratrol (5, 15 e 45 mg/kg MC) através da alimentação, ratas *Sprague-Dawley* ovariectomizadas de três meses de idade, observaram proteção contra diminuição da BMD com as três doses em todas as vértebras analisadas (L4, L5 e L6); nas regiões de interesse de tíbias e fêmures com maior contingente cortical, apenas as duas doses maiores (15 e 45 mg/kg MC) foram capazes de proteger. Portanto, ao comparar com estes estudos, também é possível comprovar o efeito protetor do resveratrol contra a diminuição da densidade óssea em tecidos com predominância de contingente trabecular na dose utilizada (0,7 mg/kg MC) e, para que este efeito se estenda para ossos com maior predominância cortical, seria necessário o teste de doses maiores da substância.

O resveratrol é uma substância com uma grande gama de efeitos benéficos ao organismo, desde efeitos antioxidantes até potencial efeito anti-carcinogênico (FREMONT, 2000; BHAT,KOSMEDER,PEZZUTO, 2001; DO AMARAL et al., 2008; COTTART,NIVET-ANTOINE,BEAUDEUX, 2014). Entre essas características, há a que o permite ser considerado um fitoestrógeno, uma vez que, além de possuir similaridade com o dietilestilbestrol (um estrógeno sintético), sua ação é bloqueada por tamoxifeno, um anti-estrogênico, indicando sua possível ação em receptores de estrógeno. Esta possível ação sobre receptores de estrógeno é tecido-específica, permitindo classifica-lo também como um SERM (EVANS,TURNER, 1995; TURNER et al., 1999; BHAT,KOSMEDER,PEZZUTO, 2001; HARIKUMAR,AGGARWAL, 2008). Exemplo para esta função tecido-específica do resveratrol pode ser retirada deste nosso trabalho, dado que a substância foi capaz de proteger o tecido ósseo (principalmente com predominância de contingente trabecular) contra os

efeitos da ovariectomia, enquanto não foi capaz de prevenir o ganho de massa característico da deficiência de estrogênio.

Dentre as ações do resveratrol em tecidos responsivos ao estrogênio, seus efeitos sobre o tecido ósseo vem sendo bastante estudados com o objetivo de utilizá-lo como possível tratamento para a osteoporose, principalmente a pós-menopáusia. Apesar dos mecanismos pelos quais ele age sobre o osso ainda permanecerem incertos, diversos estudos observaram aumento de substâncias relacionadas à maior formação óssea (como a fosfatase alcalina) e diminuição de substâncias relacionadas à reabsorção óssea (como as IL1, IL6 e TNF α), demonstrando que o resveratrol pode possuir potencial de evitar a perda óssea tanto pela maior formação (e maior número de osteoblastos), quanto pela menor reabsorção óssea (e menor número de osteoclastos) (LIU et al., 2005; SHEN et al., 2012; ZHAO et al., 2013). Corroborando com tais informações, MIZUTANI et al. (1998), observaram que o resveratrol estimula células MC3T3-E1 (linhagem de pré-osteoblastos de ratos, usada como modelo de osteoblasto na medula óssea em pesquisas *in vitro*), aumentando sua proliferação e diferenciação em osteoblastos. Por outro lado, HE et al. (2010) observaram o resveratrol inibindo a atividade, proliferação e diferenciação de células murinas progenitoras de osteoclasto RAW 264.7.

Para explicar tais ações sobre a formação e reabsorção óssea, diversos mecanismos são propostos na literatura em experimentos *in vitro*. DAI et al. (2007) descreveram, em cultura de células, que pequenas concentrações de resveratrol são capazes de induzir uma rápida estimulação da proliferação celular, diferenciação osteoblástica e a expressão dos genes osteogênicos, por meio de mecanismos que envolvem o ERs e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKs). Já HE et al. (2010), em cultura de células progenitoras de osteoclastos, observaram que a inibição da proliferação e diferenciação delas em osteoclastos não é dependente de receptores de estrogênio (como esperado) e sim através da inibição de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) liberadas após a estimulação das células por RANKL, sendo as EROs consideradas bastante importantes na osteoclastogênese.

Estudos recentes relacionam os efeitos do resveratrol à ativação da Sirt1 (Sirtuína 1), substância de uma família de proteínas regulatórias (em mamíferos) que apresenta uma série de efeitos, incluindo neuroproteção, supressão de tumor, diferenciação e inflamação, além de estar associada a aumento da produção da enzima superóxido dismutase, uma enzima antioxidante que suprime a morte celular de cardiomiócitos e outras células (MICHAN, SINCLAIR, 2007; CARDELLINI et al., 2009; MUKHERJEE et al., 2009). No tecido ósseo, a Sirt1 pode exercer efeito sobre o sistema RANK/RANKL/OPG, inibindo a

translocação nuclear de NF- κ B (fator que está inativamente presente em todos os tipos celulares e é considerado um mediador da resposta inflamatória e resposta imune, sendo um fator essencial da osteoclastogênese) através da sua associação com a substância p300 (uma acetiltransferase, responsável pela acetilação e translocação nuclear de NF- κ B), inutilizando-a (SHAKIBAEI, BUHRMANN, MOBASHERI, 2011). Também, a ativação de Sirt1 pelo resveratrol é capaz de aumentar a osteoblastogênese através do aumento da expressão de *Runx2*, um fator de transcrição específico do osso relacionado à diferenciação de células tronco mesenquimais (SHISHODIA, AGGARWAL, 2002; SHAKIBAEI et al., 2012).

Outras evidências da ação do resveratrol também envolvem vias de ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B). Além das já citadas neste texto, o resveratrol é capaz de agir diretamente sobre receptores RANKL (ligante do receptor ativador do NF- κ B) em células precursoras de osteoclastos, diminuindo a ativação do NF- κ B, e diminuindo a osteoclastogênese (BOISSY et al., 2005). MENG et al. (2005) estudaram o efeito do resveratrol sobre a ativação do fator NF- κ B e fatores inflamatórios e observaram que a ativação do fator está presente na resposta inflamatória e que o resveratrol pode efetivamente inibir sua expressão e ativação, atenuando a gravidade da pancreatite aguda. LEI, LIU; LIU (2008) investigaram os efeitos do resveratrol sobre interleucinas em cultura de células mesenquimais da medula óssea derivadas de condrócitos e evidenciaram que o resveratrol atua como um inibidor do fator NF- κ B, indicando um efeito protetor neste tipo celular via inibição de interleucinas, mediado por integrinas. Em adição, o significativo efeito do resveratrol sobre o processo inflamatório, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias, pode possuir relação com a proteção à perda óssea, visto que o processo inflamatório está à ela ligado (a exemplo das várias citocinas inflamatórias relacionadas com a maior reabsorção e menor formação óssea) (WALSH et al., 2005).

Em suma, nós revisamos os mecanismos que podem envolver não só o efeito da ovariectomia no tecido ósseo, como também o efeito do resveratrol neste. O principal foco do estudo foi discutir o efeito do tratamento com resveratrol em ossos com diferentes predominâncias de contingentes ósseos, de essencial importância para o estudo da osteoporose, além de tentar consolidá-lo como um SERM que apresenta efeito protetor sobre o osso na osteoporose pós-menopausa. Desta forma, os mecanismos apontados na discussão deste estudo, demonstram fortes evidências da potencialidade do resveratrol como protetor do dano ósseo característico na osteoporose, com efeitos comparáveis aos de substâncias bastante utilizadas para o mesmo fim. Sugerimos que diversos mecanismos moleculares, diretos ou indiretos, podem estar relacionados com esta proteção. Entretanto, ainda não há uma dose e

meio de uso da substância considerados melhores para um efeito mais homogêneo sobre todo o tecido ósseo, sendo ainda necessária a realização de mais estudos para melhor consolidá-lo como protetor altamente efetivo na doença em questão.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o resveratrol apresentou, na dose e meio de aplicação utilizados, efeito protetor do tecido ósseo com predominância do contingente trabecular contra as principais alterações características da osteopenia por deficiência de estrógeno, como a deterioração microarquitetural trabecular e diminuição da densidade óssea. Ainda, a substância apresentou efeito tecido-específico em tecidos responsáveis ao estrógeno, podendo confirmar a sua classificação como SERM. Entretanto, foi utilizado apenas um meio de aplicação e um regime de tratamento com o resveratrol, o que pode limitar o escopo de efeitos observados.

Desta forma, apesar dos resultados apontarem o resveratrol como potencial preventor da osteopenia por deficiência de estrógeno, ainda são necessários estudos com doses e veículos diferentes, visando obter um efeito mais expressivo em todo o tecido ósseo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTER, M. P., et al. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 1, p. 14-19, 2003.
- AKHTER, M. P., et al. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162-169, 2004.
- AKHTER, M. P., et al. Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. **Bone**, v. 41, n. 1, p. 111-116, 2007.
- ARJMANDI, B. H., et al. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 1, p. 161-167, 1996.
- ARMAS, L. A., RECKER, R. R. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 475-486, 2012.
- BAUR, J. A., SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Natural Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006.
- BERG, B. N., HARMISON, C. R. Growth, disease, and aging in the rat. **Journal of Gerontology**, v. 12, n. 4, p. 370-377, 1957.
- BERGLUND, M., et al. Metal-bone interactions. **Toxicology Letters**, v. 112-113, n., p. 219-225, 2000.
- BHAT, K. P. L., KOSMEDER, J. W., 2ND, PEZZUTO, J. M. Biological effects of resveratrol. **Antioxidant & Redox Signaling**, v. 3, n. 6, p. 1041-1064, 2001.
- BILEZIKIAN, J. P., RAISZ, L. G., MARTIN, T. J. **Principles of Bone Biology, Two-Volume Set**. 3ª Ed. San Diego: Academic Press, 2008
- 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.
- BONUCCI, E., BALLANTI, P. Osteoporosis--Bone Remodeling and Animal Models. **Toxicologic pathology**, 2013.
- BOSKEY, A. L., ROBEY, P. G. The composition of bone. In: ROSEN, C. J. (Ed.). **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism**. Washington, D.C.: American Society for Bone and Mineral Research, 2008, p.32-38.
- BOYLE, W. J., SIMONET, W. S., LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.
- BRANDI, M. L. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatology**, v. 48 Suppl 4, p. iv3-8, 2009.

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

BURR, D. B., et al. Does microdamage accumulation affect the mechanical properties of bone? **Journal of biomechanics**, v. 31, n. 4, p. 337-345, 1998.

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

CANO, A., et al. Comparative effects of 17beta-estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice. **Osteoporosis Internacional**, v. 19, n. 6, p. 793-800, 2008.

CARDELLINI, M., et al. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1. **Diabetes**, v. 58, n. 10, p. 2396-2401, 2009.

CELIK, A.,OGENLER, O.,COMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, v. 20, n. 6, p. 411-415, 2005.

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

CONFAVREUX, C. B. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. **Kidney International Supplement**, n. 121, p. S14-19, 2011.

Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. **The American Journal Of Medicine**, v. 94, n. 6, p. 646-650, 1993.

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

CURREY, J. D. **Bones: structure and mechanics**. Princeton University Press, 2002

DAI, Z., et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 14, n. 12, p. 806-814, 2007.

DANIELSEN, C. C.,MOSEKILDE, L.,SVENSTRUP, B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. **Calcified Tissue Internacional**, v. 52, n. 1, p. 26-33, 1993.

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

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

DEMPSTER, D. W. The contribution of trabecular architecture to cancellous bone quality. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 1, p. 20-23, 2000.

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

DOREN, M.,SAMSIOE, G. Prevention of postmenopausal osteoporosis with oestrogen replacement therapy and associated compounds: update on clinical trials since 1995. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 5, p. 419-426, 2000.

DOWNEY, P. A.,SIEGEL, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. **Physical Therapy**, v. 86, n. 1, p. 77-91, 2006.

EGHBALI-FATOURECHI, G., et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 8, p. 1221-1230, 2003.

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

ELMALI, N., et al. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. **Inflammation Research**, v. 54, n. 4, p. 158-162, 2005.

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

EVANS, G. L.,TURNER, R. T. Tissue-selective actions of estrogen analogs. **Bone**, v. 17, n. 4 Suppl, p. 181S-190S, 1995.

FAIENZA, M. F., et al. Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. **Clinical & developmental immunology**, v. 2013, p. 575936, 2013.

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

FREMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life sciences**, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

FRENCH, D. L.,MUIR, J. M.,WEBBER, C. E. The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: An assessment of the bone sparing effects of curcumin. **Phytomedicine**, v. 15, n. 12, p. 1069-1078, 2008.

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

GILBERT, L., et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 3956-3964, 2000.

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

HALL, B. K. **Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology**. Access Online via Elsevier, 2005

HARIKUMAR, K. B.,AGGARWAL, B. B. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. **Cell Cycle**, v. 7, n. 8, p. 1020-1035, 2008.

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

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

HENRY, L. A.,WITT, D. M. Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. **Hormones and behavior**, v. 41, n. 2, p. 220-228, 2002.

HERNÁNDEZ-GIL, I. F.-T., et al. Physiological bases of bone regeneration II, The remodeling process. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, p. E151-215, 2006a.

HERNÁNDEZ-GIL, I. F.-T., et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 11, p. E47-51, 2006b.

HILL, P. A.,ORTH, M. Bone remodelling. **Journal of Orthodontics**, v. 25, n. 2, p. 101-107, 1998.

HOFBAUER, L. C., et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. **Endocrinology**, v. 140, n. 9, p. 4367-4370, 1999.

HULLEY, S., et al. Randomized Trial of Estrogen Plus Progestin for Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 280, n. 7, p. 605-613, 1998.

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

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

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

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

KAMEDA, T., et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 4, p. 489-495, 1997.

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

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

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

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

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

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

KOUSTENI, S., et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. **Cell**, v. 104, n. 5, p. 719-730, 2001.

KOUSTENI, S., et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 843-846, 2002.

KRUM, S. A., BROWN, M. Unraveling estrogen action in osteoporosis. **Cell Cycle**, v. 7, n. 10, p. 1348-1352, 2008.

KUPISIEWICZ, K., et al. Potential of resveratrol analogues as antagonists of osteoclasts and promoters of osteoblasts. **Calcified Tissue International**, v. 87, n. 5, p. 437-449, 2010.

LABRIE, F., et al. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 8, p. 2396-2402, 1997.

LAI, C. Y., et al. Preventing bone loss and weight gain with combinations of vitamin D and phytochemicals. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 11, p. 1352-1362, 2011.

- LAIB, A., et al. The temporal changes of trabecular architecture in ovariectomized rats assessed by MicroCT. **Osteoporosis International**, v. 12, n. 11, p. 936-941, 2001.
- LEBLANC, A. D., et al. Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 5, n. 8, p. 843-850, 1990.
- 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, n. 11, p. 1350-1356, 2008.
- 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.
- LIN, Q., et al. Effects of resveratrol on bone mineral density in ovariectomized rats. **International Journal of Biomedical Science**, v. 1, n. 1, p. 76-81, 2005.
- LIU, Z. P., et al. Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 1, p. 14-19, 2005.
- LOUZADA, M. J. Q., et al. Metodologia para avaliação de densidade em imagem radiográfica. **Revista Brasileira de Engenharia/Caderno de Engenharia Biomecânica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998a.
- LOUZADA, M. J. Q., et al. Avaliação da densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. **Revista Brasileira de Engenharia/Caderno de Engenharia Biomecânica**, v. 14, n., p. 47-64, 1998b.
- LOUZADA, M. J. Q. **Densidade Radiográfica**. (Livre Docência). Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, 2009. 65 p.
- LOVERIDGE, N. Bone: more than a stick. **Journal of Animal Science**, v. 77, suppl 2, p. 190-196, 1999.
- MACEDO, J. M. S., et al. Meta-analysis about efficacy of anti-resorptive drugs in post-menopausal osteoporosis. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 23, n. 5, p. 345-352, 1998.
- MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, n. 9, p. 1301-1305, 2003.
- MARCUS, R.,FELDMAN, D.,KELSEY, J. **Osteoporosis**. Ed. San Diego: Academic Press, 1996
- 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. **Fundamental Anatomy and Physiology**. 4 Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 1123 p.

MENG, Y., et al. Effect of resveratrol on activation of nuclear factor kappa-B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 4, p. 525-528, 2005.

MICHAN, S.,SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **The Biochemical journal**, v. 404, n. 1, p. 1-13, 2007.

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

MIZUTANI, K., et al. Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 46, n. 2, p. 78-83, 2000.

MOON, H. J., et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 43, n. 11, p. 605-612, 2011.

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

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

MUKHERJEE, S., et al. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, n. 5, p. 573-578, 2009.

NAKAMURA, T., et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 811-823, 2007.

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, 2003.

NOMURA, S.,TAKANO-YAMAMOTO, T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biology**, v. 19, n. 2, p. 91-96, 2000.

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

O'CONNELL, D., et al. A systematic review of the skeletal effects of estrogen therapy in postmenopausal women. II. An assessment of treatment effects. **Climacteric: The Journal of the International Menopause Society**, v. 1, n. 2, p. 112-123, 1998.

OHLSSON, C., et al. Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 278, n. 3, p. 640-645, 2000.

OZGOCMEN, S., et al. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. **Molecular & Cellular Biochemistry**, v. 295, n. 1-2, p. 45-52, 2007.

PACIFICI, R. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis--the second decade. **Endocrinology**, v. 139, n. 6, p. 2659-2661, 1998.

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

PALUMBO, C., et al. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. I: role in preventing osteoporosis. **The Journal of Bone Mineral Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 538-545, 2009.

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

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.

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

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

PERILLI, E., et al. Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 8, p. 1371-1382, 2010.

PERSSON, I., et al. Risks of breast and endometrial cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. **Cancer Causes & Control**, v. 10, n. 4, p. 253-260, 1999.

POPAT, V. B., et al. Bone Mineral Density in Estrogen-Deficient Young Women. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 7, p. 2277-2283, 2009.

RAHNAMA, M. Bone mineral content of the mandible and spine in ovariectomized rats with estrogen deficiency. **Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina**, v. 59, n. 2, p. 543-546, 2004.

RAISZ, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3318-3325, 2005.

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

REBUFFÉ-SCRIVE, M., et al. Metabolism of mammary, abdominal, and femoral adipocytes in women before and after menopause. **Metabolism**, v. 35, n. 9, p. 792-797, 1986.

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

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

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

ROBINSON, L. J., et al. Estrogen inhibits RANKL-stimulated osteoclastic differentiation of human monocytes through estrogen and RANKL-regulated interaction of estrogen receptor-alpha with BCAR1 and Traf6. **Experimental cell research**, v. 315, n. 7, p. 1287-1301, 2009.

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

ROODMAN, G. D. Cell biology of the osteoclast. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 8, p. 1229-1241, 1999.

ROTCHES-RIBALTA, M., et al. Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 66, n. 5, p. 375-382, 2012.

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

RUCINSKI, M., et al. Estradiol and resveratrol stimulating effect on osteocalcin, but not osteonectin and collagen-1alpha gene expression in primary culture of rat calvarial osteoblast-like cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 18, n. 4, p. 565-570, 2006.

SAMNEGARD, 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.

SCHAIRES, C., et al. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 4, p. 485-491, 2000.

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

SEHMISCH, S., et al. Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. S2, p. S168-S174, 2010.

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

SHAKIBAEI, M., et al. Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35712, 2012.

SHEN, C. L., et al. Green tea polyphenols mitigate bone loss of female rats in a chronic inflammation-induced bone loss model. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, n. 10, p. 968-974, 2010.

SHEN, C. L., et al. Fruits and dietary phytochemicals in bone protection. **Nutrition research**, v. 32, n. 12, p. 897-910, 2012.

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

SHISHODIA, S.,AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 28-40, 2002.

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

SIMS, N. A., et al. Estradiol treatment transiently increases trabecular bone volume in ovariectomized rats. **Bone**, v. 19, n. 5, p. 455-461, 1996.

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

SOUTH-PAUL, J. E. Osteoporosis: part I. Evaluation and assessment. **American Family Physician**, v. 63, n. 5, p. 897-904, 908, 2001.

SPENCER, W. A., et al. Oxidative DNA damage following microsome/Cu(II)-mediated activation of the estrogens, 17beta-estradiol, equilenin, and equilin: role of reactive oxygen species. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 305-314, 2012.

SRIVASTAVA, S., et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 12, p. 8836-8840, 2001.

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

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

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

WALLE, T., et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WALSH, N. C., et al. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. **Immunological Reviews**, v. 208, p. 228-251, 2005.

WEITZMANN, M. N., PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1186-1194, 2006.

YANG, J., PHAM, S. M., CRABBE, D. L. High-resolution Micro-CT evaluation of mid- to long-term effects of estrogen deficiency on rat trabecular bone. **Academic radiology**, v. 10, n. 10, p. 1153-1158, 2003.

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

ZHANG, L. Z., et al. The anti-osteoporotic effect of velvet antler polypeptides from *Cervus elaphus* Linnaeus in ovariectomized rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 181-186, 2013.

ZHAO, H., et al. Long-term resveratrol consumption protects ovariectomized rats chronically treated with D-galactose from developing memory decline without effects on the uterus. **Brain research**, v. 1467, n., p. 67-80, 2012.

ZHAO, H., et al. Long-term resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus. **The British journal of nutrition**, v., n., p. 1-11, 2013.

ANEXO I – PROTOCOLO DO 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
propg@power.ufscar.br - www.propg.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal
nº 041/2010

Protocolo nº. 025/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar em sua 44ª. Reunião **APROVOU** o projeto "Os efeitos do resveratrol em tecido ósseo de ratas ovariectomizadas" apresentado pelos pesquisadores Keico Okino Nonaka, Victoe Fabrício e Fabio Alexandre Cesarin Pastor.

São Carlos, 17 de agosto de 2010.


Profª. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal