

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO USO SISTÊMICO DO
RESVERATROL NA REPARAÇÃO ÓSSEA AO REDOR
DE IMPLANTES DE TITÂNIO EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

RODRIGO SOLER ZAMAI

SÃO PAULO
2018

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO USO SISTÊMICO DO
RESVERATROL NA REPARAÇÃO ÓSSEA AO REDOR
DE IMPLANTES DE TITÂNIO EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro.

RODRIGO SOLER ZAMAI

SÃO PAULO
2018

Zamai, Rodrigo Soler.

Avaliação da influência do uso sistêmico do resveratrol na reparação óssea ao redor de implantes de titânio em ratas ovariectomizadas / Rodrigo Soler Zamai. - 2018.

35 f. : il. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Implantodontia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Vieira Ribeiro.

1. Resveratrol. 2. Zoledronato. 3. Implante dentário I. Ribeiro, Fernanda Vieira (orientadora). II. Título.

RODRIGO SOLER ZAMAI

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO USO SISTÊMICO DO
RESVERATROL NA REPARAÇÃO ÓSSEA AO REDOR
DE IMPLANTES DE TITÂNIO EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

_____ - ____/____/____

Profa. Dra Fernanda Vieira Ribeiro
Universidade Paulista – UNIP

_____ - ____/____/____

Profa. Dr. Mônica Grazieli Correa
Universidade Paulista – UNIP

_____ - ____/____/____

Prof. Dr. Adilson Sakuno
Faculdade de Odontologia da APCD - FAOA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha esposa Valéria e aos meus filhos Ana Beatriz e Pedro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e saúde.

À minha esposa Valéria Andreassa Zamai, pelo seu amor, companherismo e incentivo.

Aos meus filhos Ana Beatriz e Pedro, pelo amor e compreensão da minha ausência em vários momentos.

À minha mãe Rosicler Soler, por sempre ter acreditado em mim e nunca medir esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

À minha irmã Ana Jéssica Sandoval e sua família, pelo incentivo e pela torcida.

À minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro, por ter dividido o seu conhecimento e por estar sempre pronta para me auxiliar neste trabalho.

Ao meu amigo e eterno mestre Prof. Dr. Adilson Sakuno, pelo incentivo e pelo exemplo de profissional e pessoa.

À minha amiga Profa. Andréia Manetta Molez, sempre dividindo comigo alegrias e angústias nesta jornada.

Aos professores do Departamento de Periodontia da UNIP, Dra. Mônica Correa, Dra. Suzana Pimentel, Dr. Marcio Casatti e Dr. Fabiano Cirano, por toda colaboração e exemplo de trabalho em equipe.

Aos amigos e professores da equipe BIRD GROUP, pelo incentivo e pela troca de conhecimentos

Aos colaboradores da UNIP, que estiveram envolvidos nesse trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo 2015/24458-1).

À CAPES/PROSUP, pela bolsa de estudos.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do uso sistêmico do Resveratrol no reparo do tecido ósseo ao redor de implantes de titânio colocados em tíbias de ratas ovariectomizadas por meio de (a) microtomografia digital computadorizada (Micro-Ct), (b) análise de torque reverso para a remoção dos implantes (TR), (c) avaliação do reparo ósseo pela expressão gênica, determinada por meio de PCR quantitativo, (d) análise histomorfométrica dos implantes, (e) análise histoquímica dos implantes. As ratas foram distribuídas nos grupos: (1) OVT+RESV (n:10): animais ovariectomizados (OVT) receberam tratamento com solução de resveratrol, (2) OVT+PLA (n:10): controle negativo - animais ovariectomizados receberam tratamento com solução placebo (PLAC), (3) OVT+ZLD+PLA (n:10): controle positivo - animais ovariectomizados receberam tratamento com zoledronato (ZLD), (4) OVT+RESV+ZLD (n:10): animais ovariectomizados receberam tratamento com solução de resveratrol e zoledronato, (5) SHAM (n:10): animais não-ovariectomizados receberam tratamento com solução placebo. A ovariectomia/sham foi realizada no dia -112. No dia -111, iniciou-se administração de RESV e PLAC por gavagem diária. No dia -70, iniciou-se a administração do ZLD. No dia 0, foram instalados os implantes nas tíbias direita e esquerda e no dia 28 foi feita a eutanásia. As análises de MicroCT mostraram que a indução da OVT promoveu impacto negativo ao redor dos implantes, reduzindo os valores da área de contato osso-implante (BIC) e volume de osso mineralizado (BV) e aumentando a porosidade óssea (PO) nos animais do grupo OVT+PLAC, quando comparado ao grupo SHAM ($p<0.05$). Ainda de acordo com as análises de MicroCT, o RESV não foi capaz de otimizar o reparo ósseo peri-implantar em animais ovariectomizados, sendo que o grupo OVT+RESV apresentou menores valores de BIC, BV e de número de trabéculas ósseas (Tb.N), enquanto foram observados maiores valores de PO e separação entre as trabéculas ósseas (Tb.Sp), em comparação com o grupo SHAM+PLAC ($p<0,05$). Maiores valores de Tb.N e Densidade de Conectividade (Conn.Dn) e menores valores de Tb.Sp foram observados nos animais que receberam ZLD, independentemente da presença de RESV, quando comparados aos grupos OVT+PLAC e OVT+RESV ($p<0,05$), enquanto que o uso combinado de ZLD e RESV reduziu percentual de PO em comparação com animais OVT+PLAC e OVT+RESV ($p<0.05$). Na análise de torque reverso não houve diferenças

estatísticas entre os grupos ($p>0,05$). Na análise histoquímica, a quantidade de osteoclastos presentes na região adjacente ao implante foi menor no grupo OVT+ZLD+RESV quando comparado ao grupo OVT+PLAC ($p<0.05$). Em relação à expressão gênica, observou-se maiores níveis de mRNA de RANKL no grupo OVT+PLAC quando comparado do grupo SHAM+PLAC ($p<0,05$). Desta forma, concluímos que o resveratrol não influenciou na cicatrização óssea dos implantes de titânio instalados nas tíbias das ratas ovariectomizadas.

Palavras-chaves: Resveratrol; Zoledronato; Implante Dentário; Osteoporose.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of Resveratrol systemic use on repair of bone tissue around titanium implants placed in tibiae of ovariectomized rats by means of (a) computerized microtomography (Micro-Ct), (b) analysis of (d) histomorphometric analysis of the implants, (e) histochemical analysis of the implants, (c) evaluation of the bone repair by the gene expression, determined by means of quantitative PCR. Ovt + RESV (n: 10): ovariectomized animals (OVT) received treatment with resveratrol solution, (2) OVT + PLA (n: 10): negative control - ovariectomized animals received treatment (n = 10): positive control - ovariectomized animals received treatment with zoledronate (ZLD), (4) OVT + RESV + ZLD (n: 10): ovariectomized animals were treated with resveratrol and zoledronate solution, (5) SHAM (n: 10): non-ovariectomized animals received treatment with placebo solution. Ovariectomy / sham was performed on day -112. On day -111, administration of RESV and PLAC was initiated by daily gavage. On day -70, the administration of ZLD was started. On day 0, implants were installed on the right and left tibiae and on day 28 euthanasia was performed. MicroCT analyzes showed that the OVT induction had a negative impact around the implants, reducing the values of bone-implant contact area (BIC) and bone mineral volume (BV) and increasing bone porosity (PO) in the OVT + PLAC group, when compared to the SHAM group ($p < 0.05$). Still according to the MicroCT analysis, RESV was not able to optimize peri-implant bone repair in ovariectomized animals, and the OVT + RESV group presented lower values of BIC, BV and number of bone trabeculae (Tb.N), whereas higher values of PO and separation between bone trabeculae (Tb.Sp) were observed in comparison with the SHAM + PLAC group ($p < 0.05$). Higher values of Tb.N and Connectivity Density (Conn.Dn) and lower values of Tb.Sp were observed in animals receiving ZLD, regardless of the presence of RESV, when compared to OVT + PLAC and OVT + RESV ($p < 0.05$), whereas the combined use of ZLD and RESV reduced the percentage of PO compared to OVT + PLAC and OVT + RESV ($p < 0.05$). In the reverse torque analysis there were no statistical differences between the groups ($p > 0.05$). In the histochemical analysis, the amount of osteoclasts present in the region adjacent to the implant was lower in the OVT + ZLD + RESV group when compared to the OVT + PLAC group ($p < 0.05$). In relation to gene expression, we observed

higher levels of RANKL mRNA in the OVT + PLAC group when compared to the SHAM + PLAC group ($p < 0.05$). Thus, we conclude that resveratrol did not influence the bone healing of the titanium implants that were installed in the tibia of the ovariectomized rats.

Key-words: Resveratrol; Zoledronate; Dental implant; Osteoporosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 ARTIGO.....	20
3 CONCLUSÕES GERAIS.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXO.....	61

1 INTRODUÇÃO

Deficiência de estrógeno e complicações bucais

A osteoporose é caracterizada como uma doença generalizada do esqueleto, sendo ocasionada pela diminuição da massa óssea e degradação da microarquitetura do tecido ósseo (Friedlander 2002). Essa condição sistêmica é um importante problema de saúde pública, que gera um maior risco de fraturas espontâneas e traumáticas. Embora diversos fatores possam contribuir para o estabelecimento desta doença, como deficiência de vitamina D e cálcio, sedentarismo e fatores genéticos, a deficiência de estrógeno pós-menopausa é o principal aspecto relacionado à sua etiologia (Friedlander 2002). O declínio dos níveis de estrógeno após a menopausa pode interferir negativamente na perda óssea sistêmica, podendo acentuar também a perda dos tecidos ósseos orais e diminuir a altura da crista óssea alveolar (Geisler et al. 2002, Iwasaki et al. 2013, Chang et al. 2014, Singh et al. 2014). Evidências mostram que a deficiência deste hormônio é associada não apenas à rápida perda óssea relacionada ao início da menopausa, mas também apresenta relação com a perda óssea gradativa e mais lenta, atribuída ao avanço da idade (Khosla et al. 1997). Dentre as complicações bucais, alguns estudos apontam que a deficiência de estrógeno pode ter impacto sobre o osso alveolar (Payne et al. 1999, LaMonte et al. 2013), sendo que estudos epidemiológicos suportam a associação entre baixa densidade óssea mineral sistêmica e progressão da doença periodontal (Ronderos et al. 2000), incluindo perda de inserção clínica e redução da altura da crista óssea alveolar em mulheres pós-menopausa (Iwasaki et al. 2013, Chang et al. 2014, Singh et al. 2014). Adicionalmente, foi demonstrado aumento da porosidade cortical de mandíbulas em animais osteoporóticos (Dvorak et al. 2011).

Além disso, embora não haja informações suficientes e estudos clínicos controlados em longo prazo categorizando a osteoporose como importante fator sistêmico, que negativamente afeta o sucesso dos implantes dentais (Holahan et al. 2008, Giro et al. 2015), há evidências clínicas sugerindo que a redução de estrógeno pós-menopausa pode comprometer o reparo ósseo peri-implantar, especialmente na maxila (August et al. 2001). Ainda, foi observado que a terapia de reposição hormonal reduziu a taxa de falhas de implantes maxilares em 41% (August et al.

2001). Adicionalmente, estudos prévios em animais utilizando modelos de ovariectomia para indução de osteoporose revelaram que a deficiência de estrógeno diminui a taxa de *turn-over* ósseo, interferindo negativamente no reparo ósseo peri-implantar por meio da redução do contato osso-implante e da densidade óssea ao redor de implantes (Duarte et al. 2003, Giro et al. 2011, Tateishi et al. 2013, Hua et al. 2014).

Mecanismos moleculares implicados na resposta imunorregulatória do tecido ósseo frente à deficiência de estrógeno

A remodelação óssea inicia-se com o processo de reabsorção pelos osteoclastos e termina com a formação pelos osteoblastos. Portanto, para que ocorra a remodelação óssea, é fundamental a ocorrência da diferenciação dos osteoclastos a partir das células-tronco hematopoiéticas.

Qualquer fator que interfira no mecanismo de remodelação óssea alterando o equilíbrio entre a reabsorção e a formação, resultando em perda óssea, está implicado na etiologia e fisiopatologia da osteoporose. Dentre estes, a deficiência de estrógeno é o fator mais importante nas mulheres pós-menopausa.

Algumas evidências apontam o estrógeno como inibidor da reabsorção e estimulador da formação óssea. Receptores de estrógeno foram identificados nas células osteoclasto-progenitoras e osteoclasto-multinucleadas. Com a queda dos níveis de estrógeno, há aumento de M-CSF, de RANKL e da expressão em células T de citocinas, que estimulam a osteoclastogênese, tais como IL-1, IL6 e TNF-alfa.

O hormônio paratireoidiano (PTH) e a vitamina D são essenciais na regulação e manutenção do mecanismo de remodelação óssea. O primeiro é responsável pela manutenção da calcemia, logo, se houver diminuição da calcemia, irá desencadear uma série de atividades que resultarão na ativação do osteoclasto e liberação do cálcio para a corrente sanguínea. A vitamina D é fundamental para a mineralização da matriz óssea, sendo responsável pela disponibilidade do principal substrato para esta etapa, o cálcio, através de sua absorção em nível intestinal. A maior fonte de vitamina D para o organismo é a exposição solar, desencadeando sua síntese na pele. Contudo, sua ação ainda depende da metabolização de seus precursores a nível hepático e da ativação deste em nível renal.

Em idosos, baixos valores de vitamina D são frequentemente encontrados devido a alterações que acompanham o envelhecimento, como a redução da capacidade de síntese na pele, da absorção intestinal e da atividade da 1-alfa-hidroxilase renal, sendo uma importante causa de baixa massa óssea e fraturas.

Em nível celular e molecular, sabe-se que há receptores de estrógeno tanto em osteoblastos como em osteoclastos e que o estrógeno pode inibir a formação de osteoclastos, podendo também indiretamente afetar a produção de mediadores osteoclastogênicos - tais como fator de necrose tumoral (TNF)- α , ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL) e fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF) (Ralston 1994, Cenci et al. 2000, Bord et al. 2003, Eghbali-Fatourehchi et al. 2003, Grassi et al. 2007). Neste contexto, após a menopausa, a deficiência de estrógeno ocasiona uma regulação positiva de RANKL, importante determinante do aumento de reabsorção óssea (Eghbali-Fatourehchi et al. 2003), enquanto o próprio hormônio estimula a produção de osteoprotegerina (OPG), que é uma proteína expressa pelos osteoblastos, pelas células estromais da medula óssea e por outros tipos celulares. Esta proteína impede a ligação do RANK ao seu ligante (RANKL) e, conseqüentemente, inibe a formação e a atividade dos osteoclastos, na tentativa de exercer, em consequência, efeitos antirreabsorptivos no osso (Bord et al. 2003).

Além disso, a produção de diversos mediadores inflamatórios, tais como interleucinas IL-1 e IL-6, TNF- α , e prostaglandina E₂, está envolvida na patogênese da osteoporose. Estudos recentes sugeriram os efeitos da redução desse hormônio na função de células T. A deficiência de estrógeno resulta em aumento da produção de IL-17, levando à ativação de células T, acompanhada por aumento da produção de interferon (IFN)- γ e TNF- α por estas células (Robbie-Ryan et al. 2006, Pacifici 2007), acentuando a atividade osteoclastogênica. Sabe-se também que o tratamento com estrógeno aumenta a produção do fator de crescimento semelhante à insulina tipo (IGF-1) e fator de crescimento de transformação (TGF)- β pelos osteoblastos (Ernst et al. 1989, Oursler et al. 1991).

Pesquisas mais recente têm indicado que a via Wnt/ β -catenina está também relacionada à homeostasia do tecido ósseo, com sua inibição levando a um aumento reabsorção óssea, e tendo, portanto, papel na patofisiologia da doença periodontal e nos processos de reparação óssea (Napimoga et al. 2014). O aumento da sinalização da via Wnt pode reduzir a osteoclastogênese e a reabsorção óssea pelo

estímulo à expressão de OPG pelos osteoblastos (Glass & Karsenty 2006, Spencer et al. 2006). A via Wnt/ β -catenina é regulada por antagonistas fisiológicos, como a sclerostina (Sost) ou Dickkopf (Dkk), que bloqueiam os receptores da Wnt, que contribuem para processos de reabsorção óssea (Rossini et al. 2013) e esses mecanismos parecem ter influência importante sobre a perda óssea relacionada a desordens sistêmicas, como a osteoporose. A sinalização da via canônica Wnt envolve a formação de um complexo entre as proteínas Wnt, frizzled, e os receptores de lipoproteínas de baixa densidade (Lrp)-5 e -6. Esses complexos promovem a fosforilação e inativação das quinases Glicogênio Sintase Quinase-3 β (GSK-3 β), inibindo a degradação da β -catenina e induzindo a translocação desta para o núcleo. A β -catenina nuclear regula a expressão de fatores de transcrição como RUNX2, Osterix (Osx) e homeobox distal-less (Dlx)-5, estimulando a osteoblastogênese (Bennett et al. 2005), enquanto que as proteínas Sost ou Dkk inibem a formação dos complexos entre a Wnt, frizzled e Lrp-5 e -6 (Krishnan et al. 2006).

Adicionalmente, a disfunções nos níveis de estrógeno podem causar estresse oxidativo, reduzindo os mecanismos de defesa antioxidantes e elevando a formação de espécies de oxigênio reativas (ROS) (Lean et al. 2003, Lean et al. 2005, Grassi et al. 2015). A formação das ROS pode ocorrer como subproduto de reações celulares biológicas, bem como por sistemas enzimáticos que geram essas moléculas, como a família das NADPH oxidases (Bedard & Krause 2007). Já a remoção das ROS ocorre por um sistema complexo e organizado de defesa enzimática antioxidante composto, dentre outras, pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Bernard & Krause 2007). Deste modo, a associação entre o aumento do estresse oxidativo e diminuição da defesa antioxidante tem importante papel na resposta imunorregulatória do tecido ósseo em condições de osteopenia/osteoporose (Grassi et al. 2015). Estudos indicam ainda que a formação de ROS estimula a formação e atividade de osteoclastos, contribuindo para o aumento de TNF (Lean et al. 2005, Grassi et al. 2015).

Ainda, tem sido demonstrado que a molécula SIRT1 (Sirtuina 1), que exerce importante papel na regulação de diversos fatores de transcrição, pode controlar o estresse oxidativo por elevar a atividade transcricional das proteínas Forkhead Box (FOXO3), as quais regulam a expressão de genes antioxidantes, como os da catalase e SOD (Yao & Rahman 2012, Zhang et al. 2013). Adicionalmente, outro

mecanismo relacionado aos efeitos benéficos da SIRT1, já reconhecida previamente por seu papel na homeostasia de alguns tecidos e observada em níveis reduzidos em doenças relacionadas ao envelhecimento, deve-se ao seu papel na regulação da sinalização da Wnt. De acordo com estudos prévios, a SIRT1 apresenta potencial importante para a regulação da massa óssea e repressão da Sost (capaz de bloquear os receptores da via Wnt, contribuindo para processos de reabsorção óssea, como descrito acima), indicando o efeito positivo da SIRT1 para o metabolismo ósseo, especialmente para abordagens anabólicas como no tratamento da osteoporose (Cohen-Kfir et al. 2011, Gurt et al. 2015).

Protocolos terapêuticos para controle da osteoporose e efeitos adversos

A terapia clínica para o tratamento da osteoporose é baseada em uma intervenção de longo prazo. As principais substâncias atuais aprovadas para o tratamento da osteoporose incluem cálcio, vitamina D, paratormônio PTH (1-34), moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), ranelato de estrôncio, denosumabe, calcitonina, reposição hormonal e bisfosfonatos. Apesar da diversidade de substâncias terapêuticas para o tratamento da osteoporose, muitas delas apresentam problemas relacionados (1) a efeitos adversos, (2) à eficácia adequada e previsibilidade na resposta do tratamento e (3) a prejuízos relacionados à segurança da medicação em longo prazo.

Nesse contexto, embora o papel do estrogênio na manutenção da integridade óssea seja reconhecido, a terapia estrogênica apresenta efeitos adversos não esqueléticos, incluindo eventos vasculares e carcinoma de mama (Cauley et al. 2003). A terapia com PTH (1-34), embora reduza a reabsorção e estimule o reparo ósseo em condições osteopóticas (Vescini et al. 2012), apresenta limitações devido ao seu custo, à necessidade de injeções diárias e ao emprego prolongado frequentemente associado a dores de cabeça, náuseas e hipercalcemia (Neer et al. 2001, Canalis et al. 2007). Os SERMs têm muitos usos potenciais, mas foram associados ao aumento de eventos tromboembólicos venosos (Muchmore 2000). Assim, fica clara a limitação dos tratamentos disponíveis atualmente, considerando seus efeitos adversos ou contraindicações, que limitam o seu uso em longo prazo. Assim, há a necessidade de se desenvolver novos agentes que sejam úteis no tratamento da osteoporose.

Contudo, outro protocolo de tratamento para o controle da osteoporose e desordens ósseas tem chamado grande atenção clínica e científica nos últimos anos. Os agentes antirreabsortivos, como os bisfosfonatos, e dentre eles, o zoledronato, podem controlar a reabsorção óssea e aumentar a aposição deste tecido, embora seu uso seja associado a diversos efeitos adversos, sendo o principal a osteonecrose dos maxilares (ONM) (O'Ryan & Lo 2012). Desde 2003, ano de sua primeira descrição (Marx et al, 2003), o número de estudos sobre osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de bisfosfonato (BRONJ do termo em inglês *Bisphosphonate related osteonecrosis of jaws*), tem aumentado significativamente. A frequência de BRONJ é estimada em 0,07/10,000 pacientes que receberam bifosfonatos por via oral e 1-12% dos pacientes que receberam a administração intravenosa (AAOMS, 2007; Mavrokokki et al, 2007). Recentemente, uma revisão sistemática mostrou que a incidência dessa condição pode variar entre 0% e 27,5% (sendo taxas mais altas associados ao uso de bisfosfonatos para o tratamento de mieloma múltiplo e metástases) (Campisi et al. 2014).

Depois de ser depositado sobre a superfície do osso, os bisfosfonatos são internalizados pelos osteoclastos, induzindo sua apoptose. Isso resulta na interrupção da reabsorção/remodelação óssea (efeito positivo quando relacionado aos processos patológicos de reabsorção, como a osteoporose). Entretanto, ela também promove a alteração no processo de cicatrização das feridas, uma vez que osteoclastos são células participantes deste processo (Fleisch 1998, Magopoulos et al. 2007). Interessantemente, os bisfosfonatos ficam retidos no esqueleto durante mais de 10 anos, e a sua administração durante um longo período de tempo pode provocar o acúmulo de doses elevadas nos maxilares, uma vez que estes são ossos de alto *turn-over* celular – áreas de predileção para deposição dos bifosfonatos,

Resveratrol: possibilidade terapêutica para modulação da resposta do hospedeiro frente à osteoporose e osteonecrose dos maxilares e reparo peri-implantar

O composto resveratrol (3,5,4'-triidroxiestilbeno) (resv), um antioxidante natural, é um polifenol presente em diversas espécies de plantas utilizadas para consumo humano e que pode ser encontrado principalmente em uvas e no vinho tinto. Tem sido evidenciado pela comunidade científica que o RESV apresenta um

potente efeito antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório, tendo mostrado benefício na prevenção e tratamento de algumas doenças como câncer, distúrbios cardiovasculares, doenças degenerativas, autoimunes e metabólicas, incluindo o diabetes mellitus (Baur & Sinclair 2006, Schmatz et al. 2009, El-Mowafy et al. 2011, Lanzilli et al. 2012). Recentes estudos também têm demonstrado o efeito do RESV na prevenção e tratamento da osteoporose (Feng et al. 2014, Zhao et al. 2014, Guo et al. 2015, Hao et al. 2015, Tou 2015).

Nesse contexto, Tou (2015) mostrou em ratas ovariectomizadas que o uso crônico do RESV melhorou a massa óssea e a perda óssea trabecular, evitando a perda mineral ao longo do tempo. Corroborando com esses achados, Feng et al. (2014) observaram em ratas submetidas a OVT tratadas com RESV previniu significativamente a perda de densidade óssea mineral induzida pela osteoporose, restaurando também os níveis séricos de fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina. Ainda de acordo com esse estudo, foi evidenciado, por meio de micro tomografia computadorizada e análise histológica, que o RESV melhorou a estrutura óssea em animais ovariectomizados (Feng et al. 2014). Esse efeito pró-osteogênico e antirreabsortivo pode ser confirmado em estudos in vitro. Resultados em culturas de células mesenquimais derivadas da medula óssea revelaram que o RESV promoveu diferenciação de osteoblastos, tendo sido observado aumento significativo da expressão gênica de ALP e colágeno tipo I e ativação da via SIRT1 (Feng et al. 2014). Previamente, Tseng et al. (2011), em um estudo in vitro com cultura de células mesenquimais humanas, já haviam relatado que o papel do RESV no processo osteogênico poderia se dar por meio de mecanismos relacionados à ativação da via SIRT1, estimulando a expressão gênica de RUNX2, de acordo com os resultados observados por Shakibaei et al. (2012). Todas essas evidências sugerem que o resveratrol possa ser utilizado como terapêutico adjuvante no tratamento e prevenção da osteoporose.

Os mecanismos relacionados ao impacto benéfico do uso do RESV são decorrentes, principalmente, da sua capacidade anti-inflamatória e antioxidante. Alguns estudos prévios realizados em diferentes modelos de processos imunoinflamatórios mostraram que o resveratrol pode também modular a produção de interferon (IFN)- γ , óxido nítrico sintase (NOS)-2, TNF- α , IL-1 β e IL-10, importantes marcadores biológicos pró e anti-inflamatórios (Andreou et al. 2004, Zern et al. 2005, Rachon et al. 2006, Wendeburg et al. 2009). Recentemente, nosso

grupo, por meio de um modelo de periodontite experimental em ratos, mostrou que a administração contínua do resveratrol reduziu a perda óssea alveolar, apontando que a modulação dos níveis locais de IL-17 nos tecidos submetidos à periodontite poderia explicar, no mínimo em parte, um possível mecanismo biológico do resveratrol na doença periodontal (Casati et al. 2013), o que corrobora com o estudo de Lanzili et al, 2012, que mostrou uma redução dose-dependente de IL-17 quando da ingestão de resv.

Além de controlar a inflamação, o RESV mostrou-se capaz de induzir a produção de enzimas antioxidantes, como a catalase e a superóxido desmutase (Candelario-Jalil et al. 2007), processo importante tanto para o controle da osteoporose como também para a osteonecrose. Chen et al, (2015) mostrou que o RESV aumentou acentuadamente as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH) – essa última diminuída na ONM. Kumar et al, (2015), confirmou o efeito do RESV no controle do estresse oxidativo pela ação deste na expressão de TIGAR (uma proteína associada a indução da apoptose pelo incremento da atividade oxidativa, baseada na redução de GSH). Células tratadas com RESV mostraram menor liberação de TIGAR e, conseqüentemente, controlaram a apoptose ROS-dependente. Assim, os resultados sugeriram que o aumento da Sirt 1 pela ingestão de resv (também observado por Milne et al, 2007, Zangh et al, 2013) parece ser uma estratégia importante para inibir a apoptose induzida por estresse oxidativo. Vale lembrar que a diminuição da atividade de SIRT1 (um regulador intracelular com implicação positiva para regeneração óssea (Yuan et al, 2012)) pode contribuir para o desenvolvimento de condições relacionadas à osteoporose.

Com relação ao papel do resveratrol no metabolismo ósseo, tem sido demonstrado, em diferentes modelos experimentais, que esse agente natural é capaz de induzir a formação e inibir processos de perda óssea (Uysal et al. 2011, Tseng et al. 2012, Casarin et al. 2014). Breen et al. (2012) demonstraram que o resv aumenta a expressão de Runx2 e OCN, marcadores com importantes propriedades osteogênicas. Outra via que parece estar relacionada ao impacto positivo do resv no metabolismo ósseo é relacionada ao complexo SIRT-1/core binding factor (cbfa)-1 (Shakibaei et al. 2011), um marcador essencial de osteogênese (Yuan et al. 2012). Shakibaei et al. (2011) demonstraram que o uso do resv pode aumentar a formação de complexos SIRT-1/cbfa-1, regulando o balanço entre as atividades

osteoclásticas/blásticas e influenciando positivamente o reparo ósseo. Outro estudo do nosso grupo demonstrou que o uso do resv promoveu maior reparo ósseo de defeitos críticos de calvária em ratos, além de ter mostrado impacto positivo na retenção biomecânica de implantes inseridos nas tíbias de animais saudáveis (Casarin et al. 2014). Ainda de acordo com este estudo, foi observada maior expressão gênica de BMP-2, BMP-7 e OPN no tecido ósseo de animais submetidos ao tratamento com RESV (Casarin et al. 2014). Corroborando com esses resultados, investigações prévias apontaram que o resveratrol pode induzir a produção de BMP-2 (Su et al. 2007), aumentar a expressão de OCN e OPN (Boissy et al. 2005) e suprimir a produção de RANKL (Boissy et al. 2005, Shakibaei et al. 2011). Estudos mais recentes têm demonstrado também que os benefícios advindos do resveratrol no metabolismo ósseo podem ocorrer por meio de aumento na sinalização da via canônica Wnt (Abed et al. 2014). O tratamento com resveratrol em células mesenquimais estimula a estabilização nuclear da β -catenina de forma dose e tempo dependente, ativando a diferenciação osteoblástica, além de reduzir a GSK-3 β , que antagoniza a via Wnt (Zhou et al. 2009).

Tendo em vista o potencial do resv na inibição da perda e estímulo do reparo ósseo, e considerando os prejuízos causados pela osteoporose no tecido ósseo, o nosso objetivo é investigar os possíveis benefícios do resveratrol como preventivo/adjuvante nos processos de reabsorção e reparo ósseo na presença desta condição sistêmica. Embora existam alguns dados moleculares sobre os efeitos positivos do resveratrol na cascata imunoinflamatória e nos processos relacionados ao metabolismo ósseo, a influência deste composto na perda óssea alveolar no reparo de defeitos ósseos na presença da osteoporose ainda não é conhecida. O nosso objetivo com a realização deste estudo é analisar a real influência do resveratrol em processos de reabsorção/neoformação óssea, em portadores de osteoporose, além de estabelecer os mecanismos biológicos pelos quais isso ocorre, eliminando os efeitos colaterais de agentes antirreabsortivos, especialmente a longo prazo.

3 - CONCLUSÕES GERAIS

Nesse presente estudo, concluímos que o uso do resveratrol, tanto de forma isolado como associado ao antirreabsortivo zoledronato, não influenciou na cicatrização óssea dos implantes de titânio que foram instalados nas tíbias das ratas ovariectomizadas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Abed É, Couchourel D, Delalandre A, Duval N, Pelletier JP, Martel-Low sirtuin 1 levels in human osteoarthritis subchondral osteoblasts lead to abnormal sclerostin expression which decreases Wnt/ β catenin activity. *Bone*. 2014 Feb; 59:28-36. doi: 10.1016/j.bone.2013.10.020. Epub 2013 Oct 31. PubMed PMID: 24184155.

- 2 - Andreou V, D'Addario M, Zohar R, Sukhu B, Casper RF, Ellen RP, Tenenbaum HC. Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. *J Periodontol*. 2004 Jul;75(7):939-48. PubMed PMID: 15341351.

- 3 - Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jun;5(6):493-506. Epub 2006 May 26. Review. PubMed PMID: 16732220.

- 4 - Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245-313. Review. PubMed PMID: 17237347.

- 5 - Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaissé JM. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res*. 2005 Nov 1;65(21):9943-52. PubMed PMID: 16267019.

- 6 - Bonucci E, Ballanti P. Osteoporosis-bone remodeling and animal models. *Toxicol Pathol*. 2014 Aug;42(6):957-69. doi:10.1177/0192623313512428. Epub 2013 Nov 27. Review. PubMed PMID: 24285673.

- 7 - Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*. 2003 Feb;32(2):136-41. PubMed PMID: 12633785.

8 - Breen DM, Dolinsky VW, Zhang H, Ghanim H, Guo J, Mroziewicz M, Tsiani EL, MP, Dandona P, Dyck JR, Heximer SP, Giacca A. Resveratrol inhibits neointimal after arterial injury through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Atherosclerosis*. 2012 Jun; 222(2):375-81. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.021. Epub 2012 Mar 27. PubMed PMID: 22552115.

9 - Campisi G, Fedele S, Fusco V, Pizzo G, Di Fede O, Bedogni A. Epidemiology, clinical manifestations, risk reduction and treatment strategies of jaw osteonecrosis in cancer patients exposed to antiresorptive agents. *Future Oncol*. 2014 Feb; 10(2):257-75. doi: 10.2217/fon.13.211. Review. PubMed PMID: 24490612.

10 - Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *N Engl J Med*. 2007 Aug 30; 357(9):905-16. Review. PubMed PMID: 17761594.

11 – Candelario-Jalil E, de Oliveira AC, Gräf S, Bhatia HS, Hüll M, Muñoz E, Fiebich BL. Resveratrol potently reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation*. 2007 Oct 10; 4:25. PubMed PMID: 17927823; PubMed Central PMCID: PMC2100038.

12 - Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, Ghiraldin B, Duarte PM, Ribeiro FV. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Jul; 43(7): 900-6. Doi: 10.1016/j.ijom.2014.01.009. Epub 2014 Feb 13. PubMed PMID: 24530035.

13 - Casati MZ, Algayer C, Cardoso da Cruz G, Ribeiro FV, Casarin RC, Pimentel SP, Cirano FR. Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2013 Oct; 84(10):e58-64. doi: 10.1902/jop.2013.120746. Epub 2013 Mar 14. PubMed PMID: 23489233.

14 - Cauley JA, Robbins J, Chen Z, Cummings SR, Jackson RD, LaCroix AZ, LeBoff M, Lewis CE, McGowan J, Neuner J, Pettinger M, Stefanick ML, Wactawski-Wende J,

Watts NB; Women's Health Initiative Investigators. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA*. 2003 Oct 1;290(13):1729-38. PubMed PMID; 14519707.

15-Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest*. 2000 Nov;106(10):1229-37. PubMed PMID: 11086024; PubMed Central PMCID: PMC381439.

16 - Chang WP, Chang WC, Wu MS, Pai JT, Guo YC, Chen KC, Liu ME, Chiu WT, Hung KS. Population-based 5-year follow-up study in Taiwan of osteoporosis and risk of periodontitis. *J Periodontol*. 2014 Mar;85(3):e24-30. doi: 10.1902/jop.2013.130256. Epub 2013 Sep 3. PubMed PMID: 24001043.

17 - Chen B, Li Y, Yang X, Xu H, Xie D. Zoledronic acid enhances bone-implant osseointegration more than alendronate and strontium ranelate in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*. 2013 Jul;24(7):2115-21. doi: 10.1007/s00198-013-2288-7. Epub 2013 Feb 7. PubMed PMID:23389695.

18 - Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu E. Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Aug 5;8(8):e71955. doi: 10.1371/journal.pone.0071955. Print 2013. PubMed, PMID: 23940794; PubMed Central PMCID: PMC3733795.

19 - Cohen-Kfir E, Artsi H, Levin A, Abramowitz E, Bajayo A, Gurt I, Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Mostoslavsky R, Dresner-Pollak R. Sirt1 is a regulator of bone mass and a repressor of Sost encoding for sclerostin, a bone formation inhibitor. *Endocrinology*. 2011 Dec;152(12):4514-24. doi: 10.1210/en.2011-1128. Epub 2011 Sep 27. PubMed PMID: 21952235.

20 - Dvorak G, Reich KM, Tangl S, Goldhahn J, Haas R, Gruber R. Cortical porosity of the mandible in an osteoporotic sheep model. *Clin Oral Implants Res*. 2011 May;22(5):500-5. doi: 10.1111/j.16 0501.2010.02031.x. Epub 2010 Nov 19. PubMed PMID: 21087316.

21 - de Medeiros FCFL, Kudo GAH, Leme BG, Saraiva PP, Verri FR, Honório HM, Pellizzer EP, Santiago Junior JF. Dental implants in patients with osteoporosis: a systematic review with meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018 Apr; 47(4):480-491. doi: 10.1016/j.ijom.2017.05.021. Epub 2017 Jun 23. Review. PubMed PMID: 28651805.

22 - Dikicier E, Karaçaylı Ü, Dikicier S, Günaydın Y. Effect of systemic administered zoledronic acid on osseointegration of a titanium implant in ovariectomized rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014 Oct;42(7):1106-11. doi: 10.1016/j.jcms.2014.01.039. Epub 2014 Jan 22. PubMed PMID: 24530079.

23- Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1221-30. PubMed PMID: 12697741; PubMed Central PMCID: PMC152939.

24- Feng YL, Jiang XT, Ma FF, Han J, Tang XL. Resveratrol prevents osteoporosis by upregulating FoxO1 transcriptional activity. *Int J Mol Med.* 2018 Jan;41(1):202-212. doi:10.3892/ijmm.2017.3208. Epub 2017 Oct 23. PubMed PMID:29115382; PubMed Central PMCID: PMC5746307.

25 - Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev.* 1998 Feb;19(1):80-100. Review. PubMed PMID: 9494781.

26 - Franck FC, Benatti BB, Andia DC, Cirano FR, Casarin RC, Corrêa MG, Ribeiro FV. Impact of resveratrol on bone repair in rats exposed to cigarette smoke inhalation: histomorphometric and bone-related gene expression analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018 Apr;47(4):541-548. doi: 10.1016/j.ijom.2017.08.004. Epub 2017 Sep 15. PubMed PMID: 28927744.

27 - Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lønning PE. Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 1;20(3):751-7. PubMed PMID: 11821457.

28 - Giro G, Chambrone L, Goldstein A, Rodrigues JA, Zenóbio E, Feres M, Figueiredo LC, Cassoni A, Shibli JA. Impact of osteoporosis in dental implants: Asystematicreview.WorldJOrthop.2015Mar18;6(2):311. doi: 10.5312/wjo.v6.i2.311.eCollection 2015 Mar 18. PubMed PMID: 25793172; PubMed Central PMCID: PMC4363814.

29 - Giro G, Coelho PG, Pereira RM, Jorgetti V, Marcantonio E Jr, Orrico SR. The effect of oestrogen and alendronate therapies on postmenopausal bone loss around osseointegrated titanium implants. Clin Oral Implants Res. 2011 Mar;22(3):259-64. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01989.x. Epub 2010 Oct 13. PubMed PMID: 20946210.

30 - Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. Dev Cell. 2005 May;8(5):751-64. PubMed PMID: 15866165.

31 - Grassi F, Tyagi AM, Calvert JW, Gambari L, Walker LD, Yu M, Robinson J, Li JY, Lisignoli G, Vaccaro C, Adams J, Pacifici R. Hydrogen Sulfide Is a Novel Regulator of Bone Formation Implicated in the Bone Loss Induced by Estrogen Deficiency. J Bone Miner Res. 2016 May;31(5):949-63. doi: 10.1002/jbmr.2757. Epub 2015 Dec 23. PubMed PMID: 26614970; PubMed Central PMCID: PMC4862919.

32 - Grassi F, Tell G, Robbie-Ryan M, Gao Y, Terauchi M, Yang X, Romanello M, Jones DP, Weitzmann MN, Pacifici R. Oxidative stress causes bone loss in estrogen-deficient mice through enhanced bone marrow dendritic cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Sep 18;104(38):15087-92. Epub 2007 Sep 11. PubMed PMID: 17848519; PubMed Central PMCID: PMC1986617.

33 - Guo DW, Han YX, Cong L, Liang D, Tu GJ. Resveratrol prevents osteoporosis in ovariectomized rats by regulating microRNA-338-3p. Mol Med Rep.2015 Aug;12(2):2098-106. doi: 10.3892/mmr.2015.3581. Epub 2015 Apr 1. PubMed PMID: 25845653.

- 34 - Hao XD, Chang J, Qin BY, Zhong C, Chu ZB, Huang J, Zhou WJ, Sun X. Synthesis, estrogenic activity, and anti-osteoporosis effects in ovariectomized rats of resveratrol oligomer derivatives. *Eur J Med Chem*. 2015 Sep 18;102:26-38. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.07.042. Epub 2015 Jul 26. PubMed PMID: 26241875.
- 35 - Hao Y, Wang X, Wang L, Lu Y, Mao Z, Ge S, Dai K. Zoledronic acid suppresses callus remodeling but enhances callus strength in an osteoporotic rat model of fracture healing. *Bone*. 2015 Dec; 81:702-711. doi: 10.1016/j.bone.2015.09.018. Epub 2015 Oct 3. PubMed PMID: 26434668.
- 36 - Holahan CM, Koka S, Kennel KA, Weaver AL, Assad DA, Regennitter FJ, Kademani D. Effect of osteoporotic status on the survival of titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Sep-Oct;23(5):905-10. PubMed PMID: 19014161.
- 37 - Hsiao HB, Wu JB, Lin WC. (-)-Epicatechin 3-O- β -D-allopyranoside prevent ovariectomy-induced bone loss in mice by suppressing RANKL-induced NF- κ B and NFATc-1 signaling pathways. *BMC Complement Altern Med*. 2017 May 3;17(1):245. doi: 10.1186/s12906-017-1737-9. PubMed PMID: 28468652; PubMed Central PMCID: PMC5415808.
- 38 - Hua N, Xu Y, Tang X, Shang G, Shen Y, Wang R. Effect of estrogen deficiency on implant osseointegration in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Sep-Oct;29(5):1204-7. doi: 10.11607/jomi.3557. PubMed PMID: 25216149.
- 39 - Iwasaki M, Kimura Y, Yoshihara A, Ogawa H, Yamaga T, Sato M, Wada T, Sakamoto R, Ishimoto Y, Fukutomi E, Chen W, Imai H, Fujisawa M, Okumiya K, Taylor GW, Ansai T, Miyazaki H, Matsubayashi K. Oral health status in relation to cognitive function among older Japanese. *Clin Exp Dent Res*. 2015 Jun 7;1(1):3-9. doi: 10.1002/cre2.2. eCollection 2015 Oct. PubMed PMID: 29744134; PubMed Central PMCID: PMC5839238.
- 40 - Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991 Dec;15(3):175-91. Review. PubMed PMID: 1773131.

- 41 - Khazaei S, Firouzei MS, Afghari P, Khazaei M. Resveratrol may improve osseointegration of dental implants in type 2 diabetes mellitus patients. *J Res Med Sci*. 2014 Jan;19(1):81. PubMed PMID: 24672572; PubMed Central PMCID: PMC3963331.
- 42 - Kim JW, Tatad JCI, Landayan MEA, Kim SJ, Kim MR. Animal model for medication-related osteonecrosis of the jaw with precedent metabolic bone disease. *Bone*. 2015 Dec; 81:442-448. doi: 10.1016/j.bone.2015.08.012. Epub 2015 Aug 19. PubMed PMID: 26297440.
- 43 - Ko YJ, Wu JB, Ho HY, Lin WC. Antiosteoporotic activity of *Davallia formosana*. *J Ethnopharmacol*. 2012 Jan 31;139(2): 558-65. doi: 10.1016/j.jep.2011.11.050. Epub 2011 Dec 6. PubMed PMID: 22155390.
- 44 - Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1202-9. Review. PubMed PMID: 16670761; PubMed Central PMCID: PMC1451219.
- 45 - Kumar B, Iqbal MA, Singh RK, Bamezai RN. Resveratrol inhibits TIGAR to promote ROS induced apoptosis and autophagy. *Biochimie*. 2015 Nov; 118:26- 35. doi:10.1016/j.biochi.2015.07.016. Epub 2015 Jul 23. PubMed PMID: 26212201.
- 46 - Lameira AG Jr, Franoso BG, Absy S, Pecorari VG, Casati MZ, Ribeiro FV, Andia DC. Resveratrol Reverts Epigenetic and Transcription Changes Caused by Smoke Inhalation on Bone-Related Genes in Rats. *DNA Cell Biol*. 2018 Aug;37(8):670-679. doi: 10.1089/dna.2018.4237. Epub 2018 Jun 29. PubMed PMID: 29958005.
- 47 - LaMonte MJ, Hovey KM, Genco RJ, Millen AE, Trevisan M, Wactawski-Wende J. Five-year changes in periodontal disease measures among postmenopausal females: the Buffalo OsteoPerio study. *J Periodontol*. 2013 May;84(5):572-84. doi:10.1902/jop.2012.120137. Epub 2012 Jul 19. PubMed PMID: 22813344.

48- Lanzilli G, Cottarelli A, Nicotera G, Guida S, Ravagnan G, Fuggetta MP. Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation. *Inflammation*. 2012 Feb;35(1):240-8. doi: 10.1007/s10753-011-9310-z. PubMed PMID: 21369944.

49 - Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers TJ. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest*. 2003 Sep;112(6):915-23. PubMed PMID: 12975476; PubMed Central PMCID: PMC193670.

50 - Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, Fuller K, Chambers TJ. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology*. 2005 Feb;146(2):728-35. Epub 2004 Nov 4. PubMed PMID:15528306.

51 - Lin Q, Huang YM, Xiao BX, Ren GF. Effects of resveratrol on bone mineral density in ovariectomized rats. *Int J Biomed Sci*. 2005 Jun;1(1):76-81. PubMed PMID: 23674958; PubMed Central PMCID: PMC3614578.

52 - Magopoulos C, Karakinaris G, Telioudis Z, Vahtsevanos K, Dimitrakopoulos I, Antoniadis K, Delaroudis S. Osteonecrosis of the jaws due to bisphosphonate use. A review of 60 cases and treatment proposals. *Am J Otolaryngol*. 2007 May-Jun;28(3):158-63. PubMed PMID: 17499130

53 - Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 2007 Nov 2;450(7170):712-6. PubMed PMID: 18046409; PubMed Central PMCID: PMC2753457.

54 - Muchmore DB. Raloxifene: A selective estrogen receptor modulator (SERM) with multiple target system effects. *Oncologist*. 2000;5(5):388-92. Review. PubMed PMID: 11040275.

55 - Napimoga MH, Nametala C, da Silva FL, Miranda TS, Bossonaro JP, Demasi AP, Duarte PM. Involvement of the Wnt- β -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2014 Jun;41(6):550-7. doi: 10.1111/jcpe.12245. PubMed PMID:24576302.

56 - Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344:1434-1441. May 10;344(19):1434-41. PubMed PMID: 11346808.

57 - O'Ryan FS, Lo JC. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure: clinical course and outcomes. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Aug;70(8):1844-53. doi: 10.1016/j.joms.2011.08.033. Epub 16. PubMed PMID: 22595135.

58 - Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, Spelsberg TC. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology*. 1991 Dec;129(6):3313-20. PubMed PMID: 1954907.

59 - Pacifici R. T cells and post menopausal osteoporosis in murine models. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(2):102. PubMed PMID: 17349065; PubMed Central PMCID: PMC1906793.

60 - Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil KD. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporos Int*. 1999;10(1):34-40. PubMed PMID: 10501777.

61 - Pino DS, Casarin RC, Pimentel SP, Cirano FR, Corrêa MG, Ribeiro FV. Effect of Resveratrol on Critical-Sized Calvarial Defects of Diabetic Rats: Histometric and Gene Expression Analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Dec;75(12):2561.e1-2561.e10. doi: 10.1016/j.joms.2017.07.167. Epub 2017 Aug 3. PubMed PMID: 28859925.

62 - Qi M, Hu J, Li J, Li J, Dong W, Feng X, Yu J. Effect of zoledronate acid treatment on osseointegration and fixation of implants in autologous iliac bone grafts in ovariectomized rabbits. *Bone*. 2012 Jan;50(1): 119-27. doi: 10.1016/j.bone.2011.10.011. Epub 2011 Oct 17. PubMed PMID: 22023930.

63 - Ralston SH. Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1994 Jun;9(6):883-90. PubMed PMID: 8079663.

64 - Robbie-Ryan M, Pacifici R, Weitzmann MN. IL-7 drives T cell-mediated bone loss following ovariectomy. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Apr; 1068:348-51. PubMed PMID:16831936.

65 - Ronderos M, Jacobs DR, Himes JH, Pihlstrom BL. Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross-sectional evaluation of US adults from NHANES III. *J Clin Periodontol*. 2000 Oct;27(10):778-86. PubMed PMID: 11034127.

66 - Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 2013 Aug;93(2):121-32. doi:10.1007/s00223-013-9749-z. Epub 2013 Jun 11. Review. PubMed PMID: 23748710.

67 - Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R, Stefanello N, Gutierrez J, Corrêa M, da Rosa MM, Rubin MA, Chitolina Schetinger MR, Morsch VM. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2009 May 21;610(1-3):42-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.03.032. Epub 2009 Mar 19. PubMed PMID: 19303406.

68 - 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 -derived cells. *J*

Biol Chem. 2011 Apr 1;286(13):11492-505. doi: 10.1074/jbc.M110.198713. Epub 2011 Jan 14. PubMed PMID: 21239502; PubMed Central PMCID: PMC3064204.

69 - Shakibaei M, Shayan P, Busch F, Aldinger C, Buhrmann C, Lueders C, Mobasheri Resveratrol mediated modulation of Sirt-1/Runx2 promotes Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: potential role of Runx2 deacetylation. PLoS One. 2012;7(4):e35712. doi: 10.1371/journal.pone.0035712. Epub 2012 Apr 23. PubMed PMID: 22539994; PubMed Central PMCID: PMC3335081.

70 - Shuai B, Shen L, Yang Y, Ma C, Zhu R, Xu X. Assessment of the Impact of Zoledronic Acid on Ovariectomized Osteoporosis Model Using Micro-CT Scanning. PLoS One. 2015 Jul 6;10(7):e0132104. doi: 10.1371/journal.pone.0132104. eCollection 2015. PubMed PMID: 26148020; PubMed Central PMCID: PMC4492783.

71 - Singh A, Sharma RK, Siwach RC, Tewari S, Narula SC. Association of bone density with periodontal status in postmenopausal women. J Invest Clin Dent. 2014 Nov;5(4):275-82. doi: 10.1111/jicd.12047. Epub 2013 Jun 14. PubMed PMID: 23766246.

72 - Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NF-kappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. J Cell Sci. 2006 Apr 1;119(Pt 7):1283-96. Epub 2006 Mar 7. PubMed PMID: 16522681.

73 - Tateishi H, Okamoto Y, Kinoshita K, Hibi H, Ueda M. Effects of implant surface on bone healing around titanium screw implants in ovariectomized rats. Int J Oral Maxillofac Implants. 2013 Sep-Oct;28(5):e252-9. doi: 10.11607/jomi.te05. PubMed PMID: 24066342.

74 - Thorfve A, Lindahl C, Xia W, Igawa K, Lindahl A, Thomsen P, Palmquist A, Tengvall P. Hydroxyapatite coating affects the Wnt signaling pathway during peri implant healing in vivo. Acta Biomater. 2014 Mar;10(3):1451-62. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.012. Epub 2013 Dec 14. PubMed PMID: 24342040.

75 - Tou JC. Resveratrol supplementation affects bone acquisition and osteoporosis: Pre-clinical evidence toward translational diet therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1852(6):1186-94. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.10.003. Epub 2014 Oct 12. Review. PubMed PMID: 25315301.

76 - Uysal T, Gorgulu S, Yagci A, Karslioglu Y, Gunhan O, Sagdic D. Effect of resveratrol on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture: early bone changes. *Orthod Craniofac Res* 2011; 14: 80-87. 2011 May;14(2): 80-7. doi:10.1111/j.1601-6343.2011.01511.x. Epub 2011 Mar 16. PubMed PMID:21457457.

77 - Vescini F, Grimaldi F. PTH 1-84: bone rebuilding as a target for the therapy of severe osteoporosis. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2012 Jan;9(1):31-6. Epub 2012 May 29. PubMed PMID: 22783333; PubMed Central PMCID: PMC3392676.

78 - Wendeburg L, de Oliveira AC, Bhatia HS, Candelario-Jalil E, Fiebich BL. Resveratrol inhibits prostaglandin formation in IL-1 β -stimulated SK-N-SH neuronal cells. *J Neuroinflammation*. 2009 Sep 14; 6:26. doi: 10.1186/1742-2094-6-26. PubMed PMID: 19751497; PubMed Central PMCID: PMC2755468.

79 - Wang MY, Shen C, An MF, Xie CQ, Wu X, Zhu QQ, Sun B, Huang YP, Zhao YL, WangXJ, Sheng J. Combined treatment with *Dendrobium candidum* and black tea extract promotes osteoprotective activity in ovariectomized estrogen deficient rats and osteoclast formation. *Life Sci*. 2018 May 1; 200:31-41. doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.025. Epub 2018 Mar 12. PubMed PMID: 29544757.

80 - Wang X, Chen L, Peng W. Protective effects of resveratrol on osteoporosis via activation of the SIRT1-NF- κ B signaling pathway in rats. *Exp Ther Med*. 2017 Nov;14(5):5032-5038. doi: 10.3892/etm.2017.5147. Epub 2017 Sep 20. PubMed PMID:29201210; PubMed Central PMCID: PMC5704326.

81 - Yao H, Rahman I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of SIRT1 in inflammaging and senescence. *Biochem Pharmacol*. 2012 Nov

15;84(10):1332-9. doi: 10.1016/j.bcp.2012.06.031. Epub 2012 Jul 14. Review. PubMed PMID: 22796566; PubMed Central PMCID: PMC3482299.

82 - Yildiz A, Esen E, Kürkçü M, Damlar I, Dağlioğlu K, Akova T. Effect of zoledronic acid on osseointegration of titanium implants: an experimental study in an ovariectomized rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Mar;68(3):515-23. doi: 10.1016/j.joms.2009.07.066. PubMed PMID: 20171470.

83 - Ying G, Bo L, Yanjun J, Lina W, Binqun W. Effect of a local, one time, low-dose injection of zoledronic acid on titanium implant osseointegration in ovariectomized rats. *Arch Med Sci.* 2016 Oct 1;12(5):941-949. Epub 2016 Aug 24. PubMed PMID: 27695483; PubMed Central PMCID: PMC5016583.

84 - Yuan H, Wang Z, Li L, Zhang H, Modi H, Horne D, Bhatia R, Chen W. Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis. *Blood.* 2012 Feb 23;119(8):1904-14. doi: 10.1182/blood-2011-06-361691. Epub 2011 Dec 29. PubMed PMID: 22207735; PubMed Central PMCID: PMC3293644.

85 - Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, Shachter NS, Fernandez ML. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre-and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr.* 2005 Aug;135(8):1911-7. PubMed PMID:16046716.

86 - Zhang H, Zhai Z, Wang Y, Zhang J, Wu H, Wang Y, Li C, Li D, Lu L, Wang X, Chang J, Hou Q, Ju Z, Zhou D, Meng A. Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. *Free Radic Biol Med.* 2013 Jan; 54:40-50. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.530. Epub 2012 Nov 1. PubMed PMID: 23124026; PubMed Central PMCID: PMC4711372.

87 - Zhao H, Li X, Li N, Liu T, Liu J, Li Z, Xiao H, Li J. Long-term resveratrol treatment prevents ovariectomy-induced osteopenia in rats without hyperplastic effects on the uterus. *Br J Nutr.* 2014 Mar 14;111(5):836-46. doi: 10.1017/S0007114513003115. Epub 2013 Sep 30. PubMed PMID: 24073920.

88 - Zhou H, Shang L, Li X, Zhang X, Gao G, Guo C, Chen B, Liu Q, Gong Y, ShaoC. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. *Exp Cell Res.*2009 Oct 15;315(17):2953-62. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.07.030. Epub 2009Aug 6. PubMed PMID: 19665018.

ANEXO



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada " PAPEL DO RESVERATROL NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES ÓSSEAS ASSOCIADA À OSTEOPOROSE: ESTUDO EM RATAS OVARECTOMIZADAS ", registrada com o nº 094/16, sob responsabilidade de " SUZANA PERES PIMENTAL , ANDRÉIA MANETTA MOLEZ, MARCELO VITALE e RODRIGO SOLER ZAMAI " que envolve a: produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIP, em reunião de 17/11/2016.

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização		01/09/2016 A 31/08/2018
Espécie / linhagem/ raça		RATO ISOGENICO
Nº de animais		50
Peso / idade		
Sexo		
Origem		BIOTÉRIO -ANILAB

Juliana Guizi

Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Campus: INDIANÓPOLIS
Rua: Doutor Bacelar, 1212 – Vila Clementino – São Paulo – SP – CEP: 04026-000
Fone: (11) 5595-4091 – Fax: (11) 5595-4073
E-mail: ceua@unip.br – <http://www.unip.br>