

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITOS DO RESVERATROL EM DEFEITOS CRÍTICOS
DE CALVÁRIA DE RATOS DIABÉTICOS: ANÁLISE DE
EXPRESSÃO GÊNICA E HISTOMORFOMÉTRICA**

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

DANILO SIQUEIRA PINO

SÃO PAULO

2016

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**EFEITOS DO RESVERATROL EM DEFEITOS CRÍTICOS
DE CALVÁRIA DE RATOS DIABÉTICOS: ANÁLISE DE
EXPRESSÃO GÊNICA E HISTOMORFOMÉTRICA**

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.

DANILO SIQUEIRA PINO

SÃO PAULO

2016

Pino, Danilo Siqueira.

Efeitos do resveratrol em defeitos críticos de calvária de ratos diabéticos : análise de expressão gênica e histomorfométrica / Danilo Siqueira Pino. - 2016.

18 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais.

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

1. Diabetes Mellitus. 2. Resveratrol. 3. Reparo ósseo. 4. Ratos.
5. Expressão gênica. I. Ribeiro, Fernanda Vieira (orientadora).
II. Título.

DANILO SIQUEIRA PINO

**EFEITOS DO RESVERATROL EM DEFEITOS CRÍTICOS
DE CALVÁRIA DE RATOS DIABÉTICOS: ANÁLISE DE
EXPRESSÃO GÊNICA E HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP, obtenção do título de Mestre em Odontologia, sob orientação da Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro.

Aprovado em : ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA:

_____ - ___ / ___ / ___

Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro
Universidade Paulista - UNIP

_____ - ___ / ___ / ___

Prof. Dr. Renato Correa Viana Casarin
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

_____ - ___ / ___ / ___

Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati
Universidade Paulista - UNIP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha esposa lara e a toda a minha família pelo apoio e incentivo durante esta jornada e que de diferentes formas contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Iara C. Grippa Pino, sempre presente, pelo companheirismo, compreensão e incentivo durante todos os momentos.

Aos meus pais José Pino e Maria Isildinha Siqueira Pino, pelo amor, paciência e por terem se dedicado sempre à educação de seus filhos. Hoje, juntos, colhemos parte deste investimento.

À Mayra Pino Bonato e Armindo Bonato Júnior pelo apoio, incentivo e acolhida durante o período de desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista - UNIP, em especial à professora doutora Fernanda Viera Ribeiro e ao professor doutor Renato Correa Viana Casarin, pelo entusiasmo e ensinamentos durante o curso de pós-graduação.

A Francisco José de Nadai Dias, grande amigo, incentivador e exemplo em todos os aspectos.

A Felipe Calille Franck, parceiro em todos os momentos, sempre dividindo comigo angústias e alegrias, tornando mais leve esta jornada.

A todos os colaboradores do *Campus* Indianópolis da Universidade Paulista-UNIP, em especial à Michelle Sanchez Aguiar pela inestimável ajuda durante todos os procedimentos laboratoriais.

À FAPESP pelo auxílio pesquisa e à CAPES/PROSUP pela bolsa de estudos.

A todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste trabalho. Agradecimento especial para o Dr. João Carlos Tullio Fonseca, a Dra. Angela Bacchim Cangiani, a Dra. Cristiane Cachichi, o Dr. Vinicius Di Hipólio, a Dra. Heloisa Valdrighi, Silvia Helena Tumolim e Adriana Otoni.

“Para o espírito científico qualquer conhecimento é uma resposta a uma pergunta. Se não tem pergunta não se pode ter conhecimento científico. Nada se dá, tudo se constrói.”

Gaston Bachelard

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença sistêmica que ocasiona, entre outros fatores negativos ao seu portador, efeitos deletérios sobre o metabolismo e reparo ósseo. Resveratrol (RESV) é um composto natural com efeitos biológicos, atuando, entre outras formas, na modulação de mediadores da inflamação e em eventos associados ao metabolismo ósseo. Todavia, há poucos estudos a respeito do impacto do RESV no reparo ósseo na presença do DM. O presente estudo buscou determinar a influência do RESV no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de animais induzidos ao DM. Para tanto, cem ratos foram distribuídos em cinco grupos: DM + RESV (n=20) – induzidos ao DM, tratados com resveratrol; DM + PLAC (n=20) – induzidos ao DM, tratados com solução placebo; DM + INS (n=20) – induzidos ao DM, tratados com insulina; DM + RESV + INS (n=20) - induzidos ao DM, tratados com resveratrol e insulina e NDM (n = 20) – não induzidos ao DM. O diabetes foi induzido por meio de injeção intraperitoneal, em dose única, de 50mg/Kg de estreptozitocina (STZ) (Dia 3). Dois defeitos de calvária de tamanho crítico foram criados em cada animal no início do estudo (Dia zero). Os diferentes tratamentos foram aplicados do Dia zero ao Dia 30 do experimento, no qual foi realizada a eutanásia dos animais. Um dos defeitos foi processado para análise histomorfométrica para mensuração do defeito remanescente. O tecido do outro defeito foi submetido à quantificação de mRNA de BMP-2, OPN, OPG, RANKL, Runx2, Osx, β -catenina, Lrp-5 e Dkk1-1, por meio de PCR quantitativo. Os resultados histomorfométricos mostraram que os grupos DM + RESV, DM + RESV + INS e NDM apresentaram maior fechamento dos defeitos ósseos quando comparados aos grupos tratados com placebo ou insulina de forma isolada ($p < 0,05$). Ainda, foi observado que animais diabéticos tratados pela associação RESV+INS revelaram maior expressão gênica de BMP-2 e Osx, tendo este também sido positivamente aumentado nos animais tratados com INS de forma isolada ($p < 0,05$). Concluindo, o uso do RESV, independentemente da presença de INS, foi capaz de influenciar de maneira positiva o reparo ósseo em animais induzidos ao DM, sendo a associação necessária para a modulação da expressão gênica de BMP-2 e Osx quando associado à INS.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Resveratrol; Reparo ósseo; Ratos; Expressão gênica.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a systemic disease that causes, among other negative consequences, deleterious effects on bone metabolism and regeneration. Resveratrol (RESV) is a natural occurring compound with biological activity, known to modulate inflammatory mediators and events associated with bone metabolism. However, there are few studies about the impact of RESV on bone repair in the presence of DM. The present study has sought to determine the influence of RESV on bone repair in critical size defects of the calvaria of rats with induced DM. For this purpose, 100 rats were distributed into five groups: DM + RESV (n = 20) – induced DM, treated with resveratrol; DM + PLAC (n = 20) – induced DM, treated with a placebo solution; DM + INS (n = 20) - induced DM, treated with insulin (INS); DM + RESV + INS (n = 20) - induced DM, treated with resveratrol and insulin and NDM (n = 20) – not induction of DM. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) as a single dose of 50 mg/kg (body weight). Two critical size calvarial defects were created in each animal at the start of the study (Day 0). The different treatments were applied from Day 0 to Day 30 of the experiment; on Day 30, the animals were euthanized. One of the defects was processed for subsequent histomorphometric analysis, including measurement of the remaining defect. The tissue of the other defect was submitted to the mRNA quantification of BMP-2, OPN, OPG, RANKL, Runx2, Osx, β -catenin, Lrp-5 and Dkk1-1, using quantitative PCR. The results showed increased gene expression of BMP-2 and Osx with a smaller remaining bone defect in the groups DM + RESV, DM + INS and DM + RESV + INS. In conclusion, RESV, regardless of the presence of INS was able to positively influence bone repair in animals induced DM, and its association with INS is required for modulation of gene expression of BMP-2 and Osx.

Keywords: Diabetes mellitus; Resveratrol; Bone repair; Rats; gene expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 CONCLUSÃO.....	12
REFERÊNCIAS.....	13

1 INTRODUÇÃO

Um metabolismo ósseo competente é fator fundamental para a redução da reabsorção óssea ocasionada por diversas doenças inflamatórias ou metabólicas (RIBEIRO *et al.*, 2006; CASATI *et al.*, 2013), além de tornar mais previsível o reparo ósseo diante de diversos procedimentos odontológicos, cirúrgicos ou não, que o possam requerer, como o processo de ósseo-integração de implantes, nas alterações ósseas alveolares mediante fatores desencadeantes de eventos inflamatórios, como na doença periodontal, e quando do uso de enxertos ósseos. Algumas condições sistêmicas podem reduzir a efetividade do reparo ósseo em diferentes situações (ANTANOPOULOU *et al.*, 2013), e, entre elas, o diabetes *melittus* (DM) tem sido relatado como uma patologia capaz de proporcionar vários efeitos deletérios, aumentando o índice de fraturas (ANTANOPOULOU *et al.*, 2013) ou atrasando o reparo destas (LU *et al.*, 2003), bem como interferindo negativamente nas complicações relacionadas aos implantes dentais (TAWIL *et al.*, 2008; CONTI *et al.*, 2015; GHIRALDINI *et al.*, 2015).

Entre os mecanismos moleculares associados ao impacto do DM sobre a resposta imunorregulatória no reparo ósseo na presença do DM, estudos experimentais apontam que animais diabéticos apresentam reduzidos níveis de diversos marcadores ósseos, como fator de crescimento transformador (TGF)- β , osteocalcina (OCN), Runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2) e colágeno tipo I (COL-I) (LU *et al.*, 2003; FOWLKES *et al.*, 2008). De acordo com outros estudos, em uma investigação clínica desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, observou-se que o DM, especialmente associado a níveis glicêmicos inadequados, teve impacto negativo na imunorregulação de mediadores relacionados ao metabolismo ósseo, como OCN, TGF- β e Osteocalcina durante o processo de reparo peri-implantar (GHIRALDINI *et al.*, 2015). Adicionalmente, no DM, a hiperglicemia persistente pode causar estresse oxidativo, elevando a formação de espécies de oxigênio reativas (ROS) (OYAMA *et al.*, 2006).

Tendo em vista a osteopenia e a dificuldade de reparo ósseo diante da presença do DM, alternativas terapêuticas têm sido investigadas a fim de modular a resposta imunoinflamatória do tecido ósseo nesse perfil sistêmico. Recentemente, YEE *et al.* (2016) observaram, em camundongos induzidos ao DM, que a terapia com anticorpo para Sclerostina (Sost), que regula negativamente a formação óssea,

preveniu os danos à osteogênese causados pelo DM em um modelo de fratura, facilitando a diferenciação osteoblástica e a mineralização óssea. Em estudos experimentais com animais diabéticos que requeriam reparação óssea por meio de diferentes modelos experimentais, embora o uso local de fatores de crescimento como fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (ZOU *et al.*, 2012, BIZENJIMA *et al.*, 2015), de insulina (IGF) (FANG *et al.*, 2013) e da proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-2) (AZAD *et al.*, 2009, de Santana & Trackman 2015), tenha mostrado resultados favoráveis, a aplicação de proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD), por sua vez, não promoveu efeito benéfico previsível na formação óssea (SHIRAKATA *et al.*, 2014) ou de novo cimento (CORRÊA *et al.*, 2013), durante o tratamento de defeitos ósseos periodontais em animais com essa condição sistêmica. Com relação aos tratamentos orais, a administração de anti-inflamatórios, como pentosan-polisulfato, e agentes inibidores de AGE, como piridoxamina, mostraram-se eficientes para redução de processos degenerativos da espinha em camundongos diabéticos (LIEN-JUNGER *et al.* 2013). O uso sistêmico de doxiciclina em animais diabéticos, por sua vez, não favoreceu o reparo ósseo em defeitos de tíbia (ALKAN *et al.* 2002) e na osseointegração de implantes (KORMANO *et al.*, 2005). Embora haja algumas evidências de alternativas de tratamento para otimizar a resposta imunoinflamatória do tecido ósseo diante do DM, ainda não foi estabelecida uma estratégia terapêutica previsível e isenta de efeitos adversos para ser utilizada por portadores de DM. Desse modo, agentes antioxidantes e com capacidade de osteo-imunomodulação têm emergido como substâncias eficientes na prevenção dessas complicações ocasionadas pelo DM (KUMAR *et al*, 2013; SOTNIKOVA *et al*, 2013). Entre esses compostos, o Resveratrol (trans-3,5,4' triidroxiestilbeno) (RESV), substância encontrada principalmente em sementes e cascas de uvas escuras (SINGH *et al.*, 2000) tem demonstrado resultados promissores por seu efeito antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório, atuando na prevenção e no tratamento de algumas doenças, incluindo o DM (SCHMATZ *et al.*, 2009, EL-MOWAFY *et al.*, 2011). Relata-se que RESV tem importante atividade no controle glicêmico (SHARMA *et al.*, 2011) e seu papel terapêutico diante das complicações decorrentes do DM é abrangente (SCHMARTZ *et al.*, 2012). Nesse contexto, um estudo clínico mostrou que suplementação com RESV, além dos agentes hipoglicemiantes orais, foi eficaz na melhora do controle dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c), da pressão arterial e dos níveis de colesterol total de diabéticos (BHATT *et al.*, 2012), sugerindo que

o RESV possa ser adotado como terapêutico adjuvante no tratamento do diabetes e no controle das complicações sistêmicas oriundas do mesmo. Com relação ao papel do RESV no metabolismo ósseo, tem-se demonstrado, em diferentes modelos experimentais, que este é capaz de induzir a formação e inibir processos de perda óssea (UYSAL *et al.*, 2011, CASATI *et al.*, 2013, CASARIN *et al.*, 2014). Tem sido demonstrado que esse agente natural é capaz de induzir a formação e inibir processos de perda óssea (UYSAL *et al.*, 2011, CASATI *et al.*, 2013, CASARIN *et al.*, 2014). Nosso grupo, por meio de um modelo de periodontite experimental em ratos, mostrou que o RESV reduziu a perda óssea alveolar, apontando que a modulação dos níveis locais de IL-17 nos tecidos submetidos à periodontite poderiam explicar, no mínimo em parte, um possível mecanismo biológico do resveratrol na doença periodontal (CASATI *et al.*, 2013). BREEN *et al.* (2012) demonstraram que o RESV aumenta a expressão de Runx2 e OCN, marcadores com propriedades osteogênicas. Outro estudo do nosso grupo demonstrou que o uso do RESV promoveu benefícios no reparo ósseo de defeitos críticos de calvária em ratos, além de ter mostrado impacto positivo na retenção biomecânica de implantes inseridos nas tíbias dos animais (CASARIN *et al.*, 2014). Observou-se ainda maior expressão gênica de BMP-2, BMP-7 e OPN no tecido ósseo de animais submetidos ao tratamento com resveratrol quando comparado com o grupo placebo (CASARIN *et al.*, 2014).

Considerando-se os prejuízos promovidos pelo DM no metabolismo ósseo e tendo em vista os benefícios que o uso de RESV pode promover em procedimentos de reparo ósseo, seria interessante investigar os possíveis benefícios deste composto natural no estímulo ao reparo ósseo na presença desta condição sistêmica. Deste modo, este estudo objetivou esclarecer o efeito da administração diária de RESV em ratos diabéticos no reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico e sua possível modulação sobre a expressão gênica de importantes marcadores ósseos. Embora haja 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 do DM ainda não é conhecida. Espera-se que com este estudo possa ser verificada a influência do resveratrol em processos de neoformação óssea, em portadores de DM, além de estabelecer os mecanismos biológicos pelos quais isso ocorre.

2 CONCLUSÃO

O uso do RESV, associado ou não à insulina, demonstrou potencial para otimizar o reparo ósseo em defeitos críticos de calvária em animais diabéticos, sendo que a presença da insulina foi importante que que o RESV interferisse positivamente na modulação de BMP-2.

REFERÊNCIAS

1. Alkan A, Erdem E, Gunhan O, Karasu Ç. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2002; 60: 898-904
2. Antanopoulo M, Bahtiyar G, Bnerji MA, Sacerdote AS. Diabetes and bone health. *Maturitas* 2013; 76: 253-259.
3. Azad V, Breitbart E, Al-Zube L, Yeh S, O'Connor J. rhBMP-2 enhances bone healing response in diabetic rat segmental defect model. *Journal of Orthopedic Trauma* 2009; 23:267-276
4. Bhatt J, Thomas S, Nanjan M. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research* 2012; 32: 537-541
5. Bizenjima T, Seshima F, Ishizuka Y, Takeuchi T, Kinumatsu T, et al. Fibroblast growth factor-2 promotes healing of surgically created periodontal defects in rats with early, streptozotocin-induced diabetes via increasing cell proliferation and regulating angiogenesis. *Journal of Clinical Periodontology* 2014; 42:62-71
6. Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires R, Ghiraldini 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; 43:900-906.
7. 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 of Periodontology* 2013; Oct;84(10):e58-64.
8. Chen X, Tang J, Xie W, Wang J, Jin J et al. Protective effect of the polysaccharide from *Ophiopogon japonicus* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Carbohydrate Polymers* 2013; 94:378-385

9. Cooley J, Broderick T, Al-Nakkash L, Plochocki J. Effects of resveratrol treatment on bone and cartilage in obese diabetic mice. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 2015; 14:10
10. CorrERLIN, Gomes Campos ML, Marques MR, Casati MZ, Nociti FH Jr, Sallum EA. Histometric analysis of the effect of enamel matrix derivative on the healing of periodontal defects in rats with diabetes. *J Periodontol.* 2013 Sep;84(9):1309-18.
11. Delfino V, Figueiredo JF, Matsuo T, Favero ME, Matni AM, et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozitocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. *J Bras Nefrol* 2002; 24: 31-36
12. de Molon R, Morais-Camilo JAN, Verzola MHA, Faeda RS, Pepato MT, et al. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clinical Oral Implants Research* 2013; 24: 831-837
13. de Souza JG, Neto AR, Filho GS, Dalago HR, de Souza Júnior JM, Bianchini MA. Impact of local and systemic factors on additional peri-implant bone loss. *Quintessence Int.* 2013;44(5):415-24.
14. El-Mowafy AM, Salem HA, Al-Gayyar MM, El-Mesery ME, El-Azab MF. Evaluation of renal protective effects of the green-tea (EGCG) and red grape resveratrol: role of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Nat Prod Res.* 2011 Apr.;25(8):850-6.
15. Fang J, Landersdorfer C, Cirincione B, Jusko W. Study reanalysis using a mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic model of pramlintide subjects with type 1 diabetes. *The AAPS Journal* 2013; 15:15-29
16. Fowlkes JL, Bunn RC, Liu L, Wahl EC, Coleman HN *et al.* Runx2-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology.* 2008 Apr.;149(4):1697-704.

17. Fulzele K, Riddle R, DiGirolamo D, Cao X, Wan C, et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* 2010; 142:309-319
18. Gan L, Matsuura H, Ichiki T, Yin X, Miyazaki R. Improvement of neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells from diabetic mice by ex vivo pre-treatment with resveratrol. nature.com 2009
19. Gencoglu H, Tuzcu M, Hayirli A, Sahin K. Protective effects of resveratrol against streptozotocin-induced diabetes in rats by modulation of visfatin/sirtuin-1 pathway and glucose transporters. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2015; 66:314-320
20. Gennari L, Merlotti D, Valenti R, Ceccarelli E, Ruvio M. *et al.*, Capodrca C *et al.* Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:1737-1744.
21. Ghiraldini B, Conte A, Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, et al. Influence of glycemic control on peri-implant bone healing: 12-month outcomes of local release of bone-related factors and implant stabilization in type 2 diabetes. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015; 18:801-809
22. Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, Tsukamoto I. Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of Sost and Dkk1 and inhibition of Akt activation. *Int J Mol Med* 2011; 28:455-462
23. Iitsuka N, Hie M, Tsukamoto I. Zinc supplementation inhibits the increase in osteoclastogenesis and decrease in osteoblastogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 2013; 714:41-47
24. Kaback L, Soung D Y, Naik A, Smith N, Shwarz E, et al. Osterix/Sp7 regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. *Journal of Cellular Physiology* 2008; 214:173-182

25. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves D. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *The endocrinology society* 2003; 144(1):346-352.
26. Macey L. Defects of early fracture-healing in experimental diabetes. *J. Bone Joint Surg Am* 1989; 71:722-733.
27. Marie PJ, Debiais F, Hay E (2002). "Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling". *Histol. Histopathol.* 17 (3):877-85.
28. Minakawa M, Miura Y, Kazumi Y. Piceatannol, a resveratrol derivative, promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and suppresses blood glucose levels in type 2 diabetic model db/db mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 422:469-475
29. Oyama T, Miyasita Y, Watanabe H, Shirai K. The role of polyol pathway in high glucose-induced endothelial cell damages. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006; 73:227-234
30. Ribeiro FV, César Neto JB, Nociti Jr. FH, Sallum EA, Sallum AW, De Toledo S *et al.* Selective cyclooxygenase-2 inhibitor may impair bone healing around titanium implants in rats. *J Periodontal* 2006; 77:1731-5.
31. Schmatz R, Mazzanti CM, Spanevello R *et al.* 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.
32. Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, *et al.* Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie* 2012; 94: 374-383

33. Sharma S, Kulkarni SK, Chopra K. Effect of resveratrol, a polyphenol phytoalexin, on thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21:89-94.
34. Shirakata Y, Eliezer M, Nemcovsky CE, Weinreb M, Dard M, et al. Peridontal healing after application of enamel matrix derivate in surgical supra/infraboby periodontal defects in rats with streptozotocin - induced diabetes. *Journal of Periodontal Research* 2013; 49: 93-101
35. Singh S, Casper RF, Fritz PC, Sukhu B, Ganss B, et al. Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *Journal of endocrinology* 2000: 183-195
36. Sotnikova R, Okruhlicova L, Vikovicova J, Navarova J, Gajdacova B, et al. Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2013; 65: 713-723
37. Stein GS, Lian JB, Van Wijen AJ, Stein JL. Runx2 control organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. nature.com 2004
38. Tawil G, Younan R, Azar P, Sleilati G. Conventional and advanced implant treatment in the type 2 diabetic patient: surgical protocol and long-term clinical results. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008; 23:744-752
39. Thazhath S, Wu T, Bound M, Checklin H, Standfield S, et al. Administration of resveratrol for 5 wk has no effect on glucagon-like peptide 1 secretion, gastric emptying, or glycemic control in type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2016; 103:66-70
40. Topping R, Bolander M, Balian G. Type X collagen in fracture callus and the effects of experimental diabetes. *Clin Orthop* 1994; 308:220-228.

41. Tseng PC, Hou SM, Chen RJ, Peng HW, Hsieh CF, Kuo ML, Yen ML. Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the Sirt1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res* 2011; Oct; 26(10): 2552-63.
42. 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.
43. Yee C, Xie L, Hatsell S, Hum N, Muruges D, et al. Sclerostin antibody treatment improves fractures outcomes in type I diabetic mouse model. *Bone* 2016; 82:122-134
44. Zhang L, Pang S, Deng B, Qian L, Chen J, et al. High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NK-kB/NADPH oxidase/ROS pathway, which is inhibited by resveratrol. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2012; 44:629-638
45. Zhao L, Wang Y, Wang Z, Xu Z, Zhang Q, Yin M. Effects of dietary resveratrol on excess-iron-induced bone loss via antioxidative character. *J. Nutr Biochem* 2015 Nov; 26(11):1174-82.
46. Zhen L, Fan DS, Zhang Y, Cao X, Wang L. Resveratrol ameliorates experimental periodontitis in diabetic mice through negative regulation of TLR4 signaling. *Acta Pharmacologica Sinica* 2015; 36: 221-228
47. Zou G, Song Y, Zhou W, Yu M, Liang L, et al. Effects of local delivery of bFGF from PLGA microspheres on osseointegration around implants in diabetic rats. *Oral Surgery, Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology* 2012; 114:284-289