



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL



EFEITO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA RICO EM PROANTOCIANIDINAS
NO TECIDO ÓSSEO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS.

Viviann Ruocco Vetucci

Ribeirão Preto

2023

Viviann Ruocco Vetucci

**EFEITO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA RICO EM PROANTOCIANIDINAS NO
TECIDO ÓSSEO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências pelo programa de Pós-Graduação
em Biologia Oral da FORP-USP.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

Ribeirão Preto

2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais **Valter** e **Sirley** que não mediram esforços para realizar mais uma etapa do meu sonho, além de serem meus maiores exemplos de seres humanos.

Dedico aos meus irmãos **Victor Huggo** e **Waltinho** por estarem sempre ao meu lado e ao meu irmão **Vinicius Augusto** (*In Memoriam*), por seu meu Anjo da Guarda e Protetor.

Dedico à **Profa. Dra. Ana Paula de Souza Faloni**, minha orientadora da graduação, “minha mãe científica”, por ser minha maior inspiração e referência nesta caminhada. Minha eterna gratidão, por sempre manter as portas do laboratório para mim, por toda dedicação, ensinamentos, incentivo, paciência, confiança e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Em primeiro lugar a **Deus**, por ter me conduzido e iluminado meu caminho durante esta fase da minha vida.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral** pela oportunidade de realizar meu mestrado e por todas as oportunidades a mim oferecidas.

À minha Orientadora **Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado** por todo o ensinamento, dedicação, atenção, compreensão e confiança.

Aos técnicos **Roger Rodrigo Fernandes, Dimitrius Leonardo Pitol** e em especial **Luis Gustavo de Sousa** pelo ensinamento e auxílio na parte laboratorial.

À **Profa. Dra. Selma Siéssere** por me permitir a utilizar o microscópio para a obtenção das fotomicrografias da pesquisa.

À **Imaculada Janaina Miguel** pela ajuda todas as vezes que necessitei, me atendendo prontamente e com toda eficiência.

À **Universidade de Araraquara- Uniara**, pela oportunidade em realizar o estágio em docência no curso de medicina na disciplina de histologia e por me permitir a utilizar o laboratório de histologia de pesquisa as análises do TRAP e Picro Sirius.

À **Profa. Dra. Bruna Galdorfini Chiari Andréo**, minha supervisora do estágio em docência, por todo o ensinamento, dedicação, paciência, atenção e confiança.

Aos meus **amigos** que estiveram presentes nesta etapa da minha vida.

LISTA DE FIGURAS/ QUADROS

Figura 1: Tricotomia a ser realizada.....	18
Figura 2: A: Incisão para remoção ou exposição do ovário; B: Exposição do ovário.....	18
Figura 3: A: Excisão do ovário; B: Sutura da região.....	19
Figura 4: A: Esfregaço vaginal de ratas (SHAM); B: Esfregaço vaginal de ratas (OVX)	20
Figura 5: Extrato de semente de uva utilizado e administração por gavagem.....	21
Figura 6: Gráficos dos resultados de marcadores séricos.....	29
Figura 7: Análise morfológica (H&E)	31
Figura 8: Gráficos da análise histomorfométrica.....	32
Figura 9: Histoquímica do método TRAP.....	33
Figura 10: Histoquímica do Picro Sirius.....	34
Figura 11: Análise qualitativa ordinal da distribuição do colágeno.....	35
Figura 12: Adesão celular.....	36
Figura 13: Proliferação celular.....	37
Figura 14: Detecção de fosfatase alcalina.....	38
Figura 15: Mineralização.....	39
Quadro 1: Birrefringência da distribuição de colágeno.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. METODOLOGIA.....	17
3.1. Experimentos in vivo.....	17
3.1.1. Animais utilizados.....	17
3.1.2. Indução da osteoporose.....	17
3.1.3. Grupo controle (SHAM)	20
3.1.4. Grupo extrato de semente de uva (GSE)	21
3.1.5. Eutanásia dos animais e coleta do material	21
3.1.6. Marcadores séricos.....	22
3.1.7. Processamento histológico.....	22
3.1.8. Análise morfológica e histomorfométrica do tecido ósseo femoral.....	22
3.1.9 Histoquímica do Picro Sirius – Microscopia de polarização.....	23
3.1.10. Análise qualitativa ordinal da distribuição do colágeno.....	24
3.1.11. Método do TRAP.....	24
3.2. Experimentos in vitro.....	25
3.2.1. Cultura celular.....	25
3.2.2. Adesão e Proliferação Celular.....	25
3.2.3. Detecção de fosfatase alcalina por fluorescência direta.....	26
3.2.4. Detecção e quantificação de nódulos mineralizados.....	27
3.3. Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Experimentos in vivo.....	29
4.1.1. Marcadores séricos.....	29

4.1.2. Análise qualitativa do tecido ósseo femoral.....	30
4.1.3. Análise Histomorfométrica.....	30
4.1.4. Método do TRAP.....	33
4.1.5. Histoquímica do Picro Sirius – Microscopia de Polarização.....	34
4.1.6. Análise qualitativa ordinal da distribuição do colágeno.....	35
4.2. Experimentos in vitro.....	35
4.2.1. Adesão Celular.....	35
4.2.2. Proliferação Celular.....	36
4.2.3. Detecção de fosfatase alcalina.....	37
4.2.4. Mineralização.....	38
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO.....	46
7.REFERÊNCIAS.....	48
8.ANEXOS.....	57

RESUMO

A osteoporose é uma patologia óssea altamente prevalente, caracterizada pela alteração na microarquitetura e densidade do tecido ósseo, tornando-o frágil e suscetível a fraturas. Para o tratamento desta patologia são prescritos antirreabsortivos que reduzem a reabsorção óssea, porém, estes fármacos são comumente associados a efeitos adversos. Uma terapia alternativa seria o uso de substâncias naturais, como o extrato de semente de uva (GSE) rico em proantocianidinas (PACs), que apresenta propriedades antioxidantes, com potencial de favorecer o metabolismo dos tecidos cartilaginoso e ósseo. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do GSE rico em PACs no metabolismo do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas e seu efeito em cultura de células osteoblásticas. Os experimentos in vivo foram realizados com ratas Wistar Hannover divididas em 3 grupos: SHAM, ovariectomizado (OVX) e ovariectomizado + GSE (OVX+GSE). imediatamente após a ovariectomia os animais do grupo OVX+GSE receberam 250 mg/Kg de peso corporal do GSE por meio de sonda gástrica, enquanto que os grupos SHAM e OVX receberam água. Noventa dias após a ovariectomia, as ratas foram submetidas à eutanásia e o sangue foi coletado para a análise de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. Os fêmures foram coletados para análise histológica qualitativa e quantitativa, histoquímica do TRAP (Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato) e análise da birrefringência de colágeno por coloração com Picro-Sirius. Os experimentos in vitro foram realizados com as células pré-osteoblásticas MCPC-23, cultivadas em meio osteogênico e divididas em grupos controle (C), 0.1 µg/mL GSE (GSE0.1), e 1.0 µg/mL GSE (GSE1.0) para avaliar a adesão celular, proliferação e mineralização. Os dados obtidos foram analisados por teste estatístico para $p < 0.05$. Os resultados in vivo mostraram que o grupo OVX apresentou redução significativa

da quantidade de matriz extracelular e da área de osso e aumento na quantidade de tecido conjuntivo em comparação aos grupos SHAM e OVX+GSE. Porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para o número de osteócitos. Também não foram observadas diferenças significativas para os marcadores séricos. Embora a análise qualitativa ordinal da distribuição e arranjo do colágeno não tenha mostrada diferenças estatisticamente significativas entre os grupos SHAM, OVX e OVX+GSE, no grupo OVX+GSE observou-se proporção semelhante das birrefringências verde e vermelho, com discreta predominância da birrefringência verde, sugerindo possíveis efeitos do extrato na remodelação da matriz óssea. Os experimentos in vitro mostraram que a adesão celular aumentou significativamente em todos os grupos. A proliferação celular aumentou significativamente aos 7 dias de cultura, sem diferença entre os grupos. A mineralização aumentou significativamente ao longo da cultura, sem diferença entre os grupos. Deste modo, os resultados obtidos sugerem que o GSE rico em PACs não afeta a atividade funcional de células osteoblásticas assim como pode impedir a perda de matriz óssea, sendo uma substância com potencial para ser utilizada em casos de osteoporose.

Palavras-chave: osteoporose, proantocianidinas, tecido ósseo

ABSTRACT

Osteoporosis is a highly prevalent, asymptomatic bone pathology characterized by changes in the microarchitecture and density of bone tissue, making it fragile and susceptible to fractures. For the treatment of this pathology, antiresorptive drugs that reduce bone resorption are prescribed, however, these drugs are commonly associated adverse effects. An alternative therapy would be the use of natural substances, such as grape seed extract (GSE) rich in proanthocyanidins (PACs), which has antioxidant properties, favoring the metabolism of cartilage and bone tissue. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of GSE rich in PACs on the bone tissue of ovariectomized rats and its effects on osteoblastic cell culture. Wistar Hannover rats were divided into 3 groups: SHAM, ovariectomized (OVX) and ovariectomized + GSE (OVX+GSE). The animals in the OVX+GSE group immediately received 250 mg/kg of body weight of the GSE by means of a gastric tube, three times a week, whereas the SHAM and OVX groups received water. Ninety days after ovariectomy, the rats were euthanized and blood was collected for analysis of calcium, phosphorus and alkaline phosphatase. Femurs were collected for qualitative and quantitative histological analysis, TRAP histochemistry (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) and collagen birefringence analysis using Picro-Sirius. In vitro experiments were also performed to evaluate the effects of two low concentrations of grape seed extract (GSE) rich in proanthocyanidins on MC3T3-E1 osteoblastic cells. The cells were cultured in osteogenic medium and divided into control (C), 0.1 µg/mL GSE (GSE0.1), and 1.0 µg/mL GSE (GSE1.0) groups to evaluate cell adhesion and proliferation, as well as mineralization. The data obtained were analyzed by statistical tests for significance of 5%. The OVX group showed a significant reduction in the amount of extracellular matrix and bone area and an increase in the amount of

connective tissue compared to the SHAM and OVX+GSE groups. However, no significant differences were found between the groups for the number of osteocytes. No significant differences were observed for serum markers either. Although the qualitative ordinal analysis of collagen distribution and arrangement did not show statistically significant differences between the SHAM, OVX and OVX+GSE groups, the OVX+GSE group observed a similar proportion of green and red birefringence, with a slight predominance of green birefringence, suggesting possible effects of the extract on bone matrix remodeling. In vitro experiments showed that cell adhesion significantly increased within three days in all groups. Cell proliferation increased significantly at seven days of culture, followed by a significant decrease in all experimental periods, with no statistical difference among them. Mineralization increased with time, but within each period, no statistical differences among groups were observed. Thus, the results obtained suggest that GSE rich in PACs do not affect osteoblast cell functional activity as well as avoid the loss of bone extracellular matrix and the bone area, being a substance with potential to be used in a situation of osteoporosis.

Keywords: osteoporosis, proanthocyanidins, bone tissue

1. INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo fisiológico que mantém a integridade do esqueleto por meio da substituição do osso antigo por uma matriz óssea jovem. Este processo requer ações coordenadas entre os osteoclastos, que reabsorvem a matriz óssea e os osteoblastos que a irão substituir (MARIE; KASSEM, 2011).

Com a senilidade, existe um desequilíbrio entre a deposição e a reabsorção óssea. Estas disfunções podem ser explicadas quando os osteoclastos se tornam mais ativos, possivelmente pela diminuição nas taxas de apoptose ao final da fase de reabsorção, o que resulta em grandes lacunas que são parcialmente reparadas pela atividade dos osteoblastos (RUSSEL *et al.*, 2006; KHOSLA *et al.*, 2012). Além disso, a deficiência dos hormônios estrogênicos, principalmente após a menopausa, pode levar a uma ativação nos ciclos de remodelação, com predomínio nas fases de reabsorção em relação às de formação. Isto ocorre devido principalmente ao aumento do número de osteoclastos na superfície dos ossos trabeculares (NAVAS; LYLES, 2002). Este aumento parece estar associado a maior atividade, menores taxas de apoptose e também maiores taxas de formação dos osteoclastos (FALONI *et al.*, 2007).

Com este desequilíbrio, pode ocorrer uma desordem sistêmica progressiva denominada osteoporose, a qual é uma patologia óssea altamente prevalente, assintomática, caracterizada pela alteração na microarquitetura do tecido ósseo e na sua densidade, tornando-o frágil e com suscetibilidade à fratura (APPELMAN-DIJKSTRA; PAPAPOULOS, 2016). Estima-se que 200 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de osteoporose e que 8,9 milhões de fraturas sejam causadas por esta doença (HERNLUND *et al.*, 2013). Uma vez que a osteoporose afeta diversos mecanismos metabólicos relacionados a manutenção tecidual óssea, fraturas e

defeitos em pacientes com esta condição apresentam uma recuperação mais lenta e de prognóstico desfavorável.

Na matriz extracelular óssea, de um tecido com osteoporose, a birrefringência do colágeno da matriz extracelular óssea apresenta tons esverdeados, o que significa fibras imaturas e mais delgadas (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2013). Para o tratamento da osteoporose são prescritos antirreabsortivos que reduzem a reabsorção óssea por induzirem a morte dos osteoclastos, tais como os bisfosfonatos, ou por inibirem sua formação e atividade, tais como os denosumabes (BARON *et al.*, 2011). Porém, os antirreabsortivos são comumente associados a efeitos adversos gastrointestinais, à fratura femoral atípica e à osteonecrose dos ossos mandibular e maxilar (ISHTIAQ *et al.*, 2015).

Considerando os efeitos colaterais dos medicamentos para a osteoporose, pesquisas têm sido realizadas com substâncias naturais como os polifenóis, que não promovem o aparecimento de efeitos colaterais e são relativamente baratos e de fácil acesso à maior parte da população, reduzindo significativamente os custos do cuidado com a saúde. Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de metabólitos secundários nos vegetais. Eles exibem uma grande variedade de estruturas, são responsáveis por algumas características organolépticas dos alimentos de origem vegetal, além de contribuírem para a qualidade nutricional de frutas e legumes (TAPAS *et al.*, 2008). Além disso, desempenham um importante papel no crescimento e reprodução dos vegetais, fornecendo proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e predadores (BRAVO, 1998). Entre os compostos fenólicos, os mais importantes são os ácidos fenólicos, os flavonoides e os taninos condensados ou proantocianidinas (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

As proantocianidinas (PACs) podem ser encontradas no extrato da semente de uva e apresentam propriedades antivirais, antimicrobianas, antioxidantes e antitumorais (NANDAKUMAR *et al.*, 2008), além de propriedades cardioprotetoras (SATO *et al.*, 2001). Vários estudos experimentais e clínicos mostraram que as PACs têm efeito redutor do colesterol (PREUSS *et al.*, 2000), o que potencializa seus benefícios para a saúde pública (YANG; XIÃO, 2013). Além disto, apresentam propriedades angiogênicas na cicatrização de feridas dérmicas (KHANNA *et al.*, 2001) e favorecem o metabolismo dos tecidos cartilaginoso e ósseo (FRAGA; OTEIZA, 2011; LI *et al.*, 2008).

No tecido ósseo, as PACs estão associadas à redução da reabsorção óssea por inibirem a via de sinalização do NF- κ B (Factor Nuclear Kappa B), envolvida na osteoclastogênese mediada por RANKL (Ligante do Receptor Ativador de NF- κ B) (ZHU & YIN, 2019). Além disso, foi observado que o NF- κ B inibe a diferenciação osteoblástica e formação óssea *in vivo* (KRUM *et al.*, 2010).

Sendo assim, a hipótese deste trabalho foi a de que a administração *in vivo* e *in vitro* do extrato de semente de uva poderia: (1) impedir a perda óssea de ratas submetidas ao protocolo de ovariectomia; (2) manter a atividade funcional de células osteoblásticas cultivadas em contato com o extrato em um modelo de cultura celular.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato de semente de uva (GSE) rico em proantocianidinas (PACs) na remodelação do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas e na atividade funcional de células osteoblásticas MC3T3-E1.

2.2. Objetivos Específicos

Parâmetros in vivo:

- ✓ Avaliação do efeito do GSE em marcadores séricos (cálcio, fósforo e fosfatase alcalina);
- ✓ Avaliação do efeito do GSE em parâmetros qualitativos e quantitativos no tecido ósseo, tais como: percentual de matriz extracelular, tecido conjuntivo, número de osteócitos, área de osso e osteócitos/área de osso trabecular da epífise femoral;
- ✓ Avaliação do efeito do GSE na morfologia de osteoclastos utilizando-se o método do TRAP para detecção da enzima Fosfatase Ácida Resistente ao Tartararo (marcador de osteoclastos);
- ✓ Avaliação do efeito do GSE no arranjo e distribuição do colágeno do tecido ósseo trabecular das epífises de fêmures utilizando-se Picro-Sirius e microscopia de polarização.

Parâmetros in vitro:

- ✓ Avaliação da adesão celular;
- ✓ Avaliação da proliferação celular;
- ✓ Avaliação da detecção de fosfatase alcalina;
- ✓ Avaliação da mineralização.

3. METODOLOGIA

3.1. Experimentos in vivo

3.1.1. Animais utilizados

Foram utilizadas 15 ratas Wistar Hannover, pesando aproximadamente 200g. As ratas foram divididas em 3 grupos experimentais: SHAM (Controle), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado + GSE (OVX+GSE).

Os animais procedentes do Biotério Central do *Campus* da USP de Ribeirão Preto foram tratados com ração especial para roedores e água filtrada *ad libitum*. Foram separados em caixas de dimensões 41 x 34 x 16 cm, com cama de maravalha, permanecendo três animais por caixa. A temperatura do local de alojamento dos animais foi mantida à 23,5-24,5°C, controlada por condicionador de ar quente/ frio de janela, além de um sistema de exaustão de ar. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP. O projeto foi enviado para o Comitê de Ética desta unidade para autorização dos experimentos, sendo aprovado em 12/12/2018, com o número de protocolo 2018.1.827.58.3.

3.1.2. Indução da osteoporose

Para indução da osteoporose, os animais foram ovariectomizados bilateralmente. Os animais foram pesados e, então, anestesiados com de 75mg/Kg de Ketamina (Agener, Agibrands, Campinas) e 10mg/Kg de Xylazina (Dopaser, Agibrands, Campinas), injetadas por via intramuscular. Durante a cirurgia, uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% foi posicionada sobre os olhos dos animais, com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais. Foi feita a assepsia dos locais a serem incisionados com álcool iodado (PVPI). Foram

realizadas incisões cutâneas bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários e excisão dos mesmos (KALU, 1991). Foi realizada a sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil) e uma dose de 1,1mg/Kg de anti-inflamatório e analgésico flunixinina meglumina (Banamine Pet Injetável, Schering-Plough Coopers, SP, Brasil). Os animais operados ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca de maravalha, três vezes por semana.



Figura 1: Tricotomia da região a ser operada.

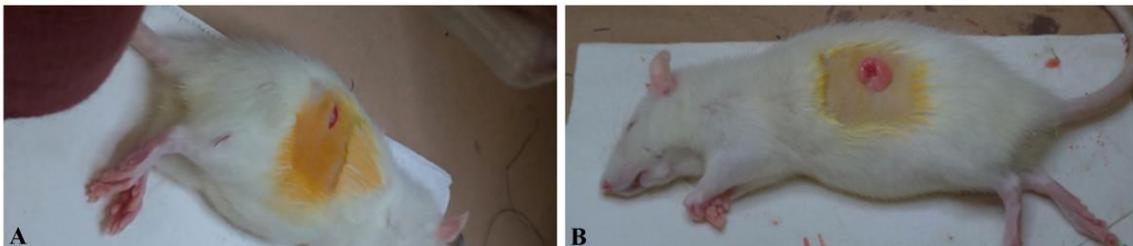


Figura 2: **A:** Incisão para remoção ou exposição do ovário; **B:** Exposição do ovário.

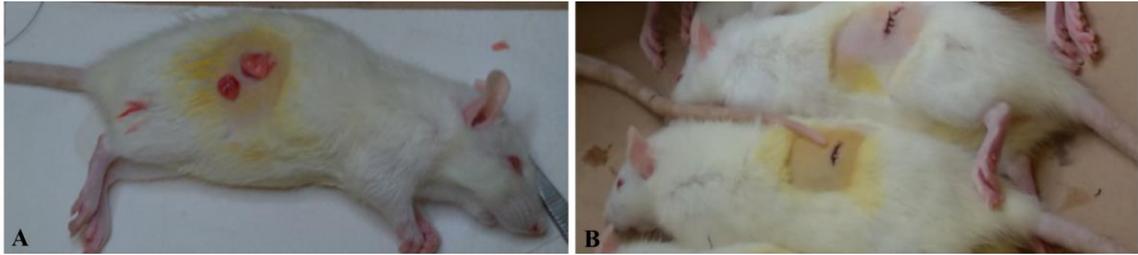


Figura 3: A: Excisão do ovário; B: Sutura da região.

A comprovação do sucesso do procedimento foi feita pelo exame do ciclo estral e exame macroscópico dos cornos uterinos. Assim, duas semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao exame do ciclo estral, por meio de coleta de líquido vaginal por um período de 5 dias consecutivos. Para o desenvolvimento desta técnica de observação foi introduzido, com o auxílio de uma borracha de conta-gotas acoplada a uma ponteira pequena, uma dose de solução salina (cerca de 1 ml) no interior da vagina da rata. Após a introdução, a solução foi rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina de vidro e imediatamente observada em microscopia óptica. Este procedimento foi realizado no início da manhã, por volta das 7 horas (MARCONDES *et al.*, 2002). Foi possível avaliar também o efeito da ovariectomia, por meio do exame macroscópico dos cornos uterinos. Para a realização desta análise foi necessário, antes da eutanásia dos animais, incisar a região abdominal para a localização das respectivas estruturas. Nos animais ovariectomizados (com deficiência de hormônio), os cornos uterinos apresentaram-se finos, atróficos e anêmicos.

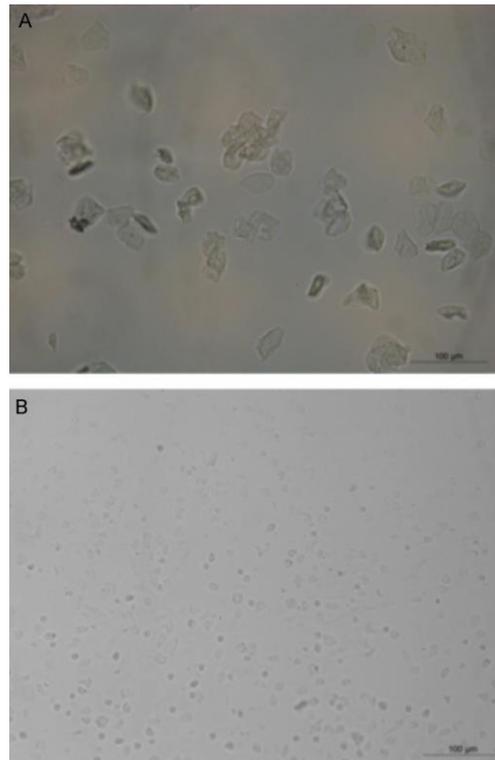


Figura 4: **A:** Esfregaço vaginal de ratas SHAM, com grande quantidade de células nucleadas e raros leucócitos (fase proestro). **B:** Esfregaço vaginal de ratas ovariectomizadas, com predominância de leucócitos (fase diestro). Arquivo do laboratório de pesquisa em tecido ósseo, FORP-USP.

3.1.3. Grupo controle (SHAM)

Os animais SHAM foram anestesiados, incisionados, seus ovários foram expostos e recolocados em posição, com posterior sutura dos tecidos submetidos à incisão. Estes animais também receberam, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte- Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil).

3.1.4. Grupo extrato de semente de uva (GSE)

Foi utilizado o extrato de semente de uva (GSE) da marca Healthy Origins, Extrato de semente Meganatural-BP (Pittsburgh, USA), que apresenta um mínimo de 90% de polifenóis. O extrato foi diluído em água destilada na concentração de 250mg/Kg de peso corporal, de acordo com o protocolo de PINENT et al. (2004). Os animais receberam o extrato três vezes por semana imediatamente após a ovariectomia até o dia da eutanásia. Tanto os animais do grupo SHAM, quanto do OVX, receberam água destilada, veículo utilizado para diluição do extrato (Figura 4).



Figura 5: Extrato de semente de uva utilizado e administração por gavagem.

3.1.5. Eutanásia dos Animais e Coleta do Material

As ratas foram eutanasiadas após noventa dias da ovariectomia por meio de anestesia convencional seguida por decapitação. Os anestésicos utilizados foram cloridrato de cetamina (40-80 mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg), por via intramuscular. Em seguida, foi realizada a coleta dos fêmures para o processamento histológico.

3.1.6. Marcadores séricos

O sangue foi coletado no momento da eutanásia e enviado para análise dos marcadores de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina em laboratório especializado (Endovet, Ribeirão Preto, SP).

3.1.7. Processamento histológico

Os fêmures coletados foram imersos em formaldeído a 4% tamponado por 48 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M e as soluções foram trocadas a cada dois dias. Após o período de 45 dias de descalcificação, os espécimes foram desidratados em graduações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100°GL), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina contendo os fragmentos ósseos foram cortados com auxílio de um micrótomo. Cortes com 5 µm de espessura foram posicionados em lâminas de vidro. Foram obtidos cortes semi-seriados, com intervalos de 50 µm entre uma lâmina e outra, sendo um corte por lâmina. Os cortes foram corados com hematoxilina de Carazzai e eosina de Lison (H&E).

3.1.8. Análise morfológica e histomorfométrica do tecido ósseo femoral

A análise morfológica da região das epífises femorais foi realizada utilizando-se microscópio de luz Leica DM 4000B do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP- USP. Para a análise quantitativa foram obtidas 35 imagens por grupos, sendo utilizadas 7 imagens de cada animal, provenientes de diferentes regiões do osso trabecular da epífise de cada animal. As imagens foram obtidas utilizando-se a

objetiva de 40x. O intervalo entre os cortes utilizados foi de 50 micrômetros. A análise quantitativa foi realizada por meio da utilização do software Image J, com um sistema teste de 80 intersecções, para quantificação de matriz óssea e tecido conjuntivo. Ainda por meio do Image J, foi também realizada a medição da área óssea em cada uma das imagens histológicas, com posterior quantificação do número de osteócitos presentes nas regiões de tecido ósseo. Após quantificados os osteócitos e área do osso, foi obtido o índice de osteócitos (O_i). Este índice foi calculado usando a equação $O_i = N.Ot/B.Ar$, onde $N.Ot$ é o número de osteócitos observados utilizando-se a objetiva de 20x, e $B.Ar$ é a área óssea total da região analisada, de acordo com metodologia previamente descrita (BARROS *et al.*, 2009).

3.1.9. Histoquímica do Picro-Sirius – Microscopia de polarização

Para a histoquímica do Picro-Sirius, cortes foram desparafinizados em xilol, hidratados em gradientes decrescentes de etanol e incubados com o ácido fosfomolibdico a 0,2% por 10 minutos para neutralizar a birrefringência da elastina. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e imersos por 90 minutos em solução de Sirius Red a 0,1% dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Posteriormente, os cortes foram lavados em HCl 0,01N durante 2 minutos, em seguida, em água destilada e desidratados em graduações crescentes de álcool, sendo então realizada a montagem das lâminas. Os cortes foram analisados em microscópio de luz com filtro de polarização (Leica DM 4000B, Alemanha).

3.1.10. Análise qualitativa ordinal da distribuição do colágeno

A análise qualitativa ordinal da birrefringência do colágeno do osso trabecular das epífises foi realizada a partir de imagens de cortes provenientes de todos os animais de cada um dos grupos. Foram utilizadas duas lâminas por animal, cada uma contendo um corte histológico. A partir de cada corte foram obtidas 3 imagens de cada animal, utilizando-se objetiva de 40x, com intervalo entre os cortes de 50 micrômetros. Foram obtidos escores para cada uma das imagens, considerando-se os percentuais de birrefringência avermelhada e esverdeada, conforme ilustra o quadro abaixo.

Quadro 1: Birrefringência da distribuição de colágeno (PACHECO-COSTA *et al.*, 2016).

Escore	Birrefringência
1	100% avermelhada
2	75% avermelhada 25% esverdeada
3	50% avermelhada 50 % esverdeada
4	75% esverdeada 25 avermelhada
5	100% esverdeada

3.1.11. Método do TRAP

Os cortes foram submetidos ao método TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), utilizado como marcador de osteoclastos. Lâminas contendo cortes desparafinizados foram incubadas em uma solução contendo naftol AS-BI (Sigma Chemical St. Louis, MO, EUA), N-N-dimetilformamida, tampão acetato de sódio (pH 5,0), Fast Red (Sigma Chemical Co.) e tartarato de sódio dihidratado e contracorado

com hematoxilina de Carazzi. As lâminas foram montadas em meio aquoso (DE SOUZA FALONI *et al.*, 2012).

3.2. Experimentos in vitro

3.2.1. Cultura celular

Células MC3T3-E1 (sub-clone 14, ATCC, Manassas, VA, USA) foram cultivadas em garrafas de 75 cm³ com 10 ml de meio de cultura α -MEM, 10% soro fetal bovino, 2.75 mL de penicillin-estreptomicina, 50 μ g de ácido ascórbico e 2mM de beta-glicerolfosfato. As células foram mantidas a 37°C durante todo o experimento em um ambiente úmido com 95% de ar atmosférico e 5% de CO₂, com trocas de meio a cada 2 dias. Após a confluência, as células foram transferidas das garrafas para placas de 24 poços após remoção com 1 mM EDTA (Gibco, USA) e 0.25% trypsin (Gibco, USA). Os seguintes grupos foram criados: controle, adição de 0.1g/mL GSE e 1.0 g/mL GSE (PARKS *et al.*, 2012). Para cada experimento, foram cultivados 5 poços para cada período experimental. O extrato de semente de uva foi dissolvido em meio de cultura a partir de uma solução mãe, permanecendo em contato com as células durante todo o período de cultura e substituído a cada troca de meio.

3.2.2. Adesão e Proliferação Celular

Após 24 horas e 3 dias de cultura, a adesão celular foi avaliada pela contagem nuclear através de marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Molecular Probes, USA) e observação em microscopia de fluorescência (Leica DM4000B, Alemanha). Foram realizadas 20 imagens de cada um dos 5 poços de cada grupo experimental e feita a contagem nas células marcadas e aderidas à lamínula de poliestireno previamente colocada na base da placa. Os dados foram tabulados para

realizar a média de adesão celular. Aos 3, 7 e 10 dias de cultura, a proliferação foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT {[3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium]} (Sigma). Após a remoção do meio de cultura, uma solução de MTT + MTS foi incubada por 4 horas a 37°C, em uma atmosfera umidificadora contendo 5% CO₂ e 95% de ar. Após este período, o meio foi removido dos poços e 1 mL de isopropanol ácido (Merck, Germany) foi adicionado a cada poço sob agitação por 5 minutos para completa solubilização do precipitado. Em seguida, alíquotas de 150 µL foram removidas dos poços e transferidas para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro (µQuant Biotek Instruments Inc., USA) no comprimento de onda de 570 nm.

3.2.3. Detecção de fosfatase alcalina por fluorescência direta

A detecção da enzima fosfatase alcalina foi realizada após 24 horas e 3 dias de cultura das células osteoblásticas em lamínulas de poliestireno na base da placa. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS (Phosphate buffered saline) aquecida a 37 °C. Em seguida, 300 mg de Triz (Sigma) foram dissolvidos em 20 mL de água deionizada e adicionados 7 mg de reagente Fast red (Sigma). Dois mililitros desta solução foram descartados e 8 mg de naphtol (Sigma) diluídos em 2 ml de dimetilformamida (Merck) foram adicionados a cada poço. A placa foi levada à incubadora em uma atmosfera úmida a 37 °C com 5% de CO₂ por 30 minutos. Em seguida, a solução foi removida dos poços e seca à temperatura ambiente para coloração com DAPI com o objetivo de visualização do núcleo. Após finalização com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes), a fosfatase alcalina foi observada por epiluminação com microscopia de fluorescência (Leica, Alemanha).

3.2.4. Detecção e Quantificação de nódulos mineralizados

A detecção de matriz mineralizada foi avaliada no final de 14 e 17 dias do experimento. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados 3 vezes com PBS (Gibco™, USA), aquecidos a 37 °C, fixados com 2 mL de formalina a 10% e mantidos a 4 °C por 24 horas. Em seguida, a formalina foi removida e os poços foram desidratados a temperatura ambiente in séries crescente de álcoois (30%, 50%, 70%, and 100%) por um período de 1 hora a cada graduação alcoólica. Após a secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina a 2% com pH 4.2 (Sigma) por 10 minutos, e as áreas mineralizadas ricas em cálcio evidenciadas pela cor avermelhada. A quantificação foi realizada de acordo com GREGORY et al. (2004), onde 280 µL de 10% acetic acid (Labsynth, Brazil) foram adicionados a cada poço e as placas agitadas por 30 minutos. As camadas celulares foram raspadas com o auxílio de uma ponteira e a solução transferida para tubos de 1,5 mL, aquecidas a 85 °C por 10 minutos e transferidas para o gol por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos. Um volume de 150 µL do sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços com 40 µL de hidróxido de amônia a 10% (Quimibrás, Brazil). A leitura foi realizada com um espectrofotômetro (Bio-tek) com comprimento de onda de 405nm.

3.3. Análise Estatística

Os dados numéricos obtidos nas diferentes análises foram tabulados e submetidos à análise estatística, utilizando-se o software Graph Pad Prisma 7.0. Primeiramente, foi realizado o teste de Normalidade D` Agostino & Pearson. Para os dados não paramétricos foi utilizado Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas, quando necessário. Para os dados que mostraram

distribuição normal foi o utilizado o teste paramétrico One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, quando aplicável.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos in vivo

4.1.1. Marcadores séricos

Pode ser observado na Figura 6 que não houve diferença significativa para os marcadores séricos de cálcio total e fósforo entre os grupos SHAM E OVX, exceto para a fosfatase alcalina, que apresentou aumento significativo no grupo OVX. A administração de GSE não influenciou significativamente o nível dos marcadores quando comparado aos outros grupos experimentais.

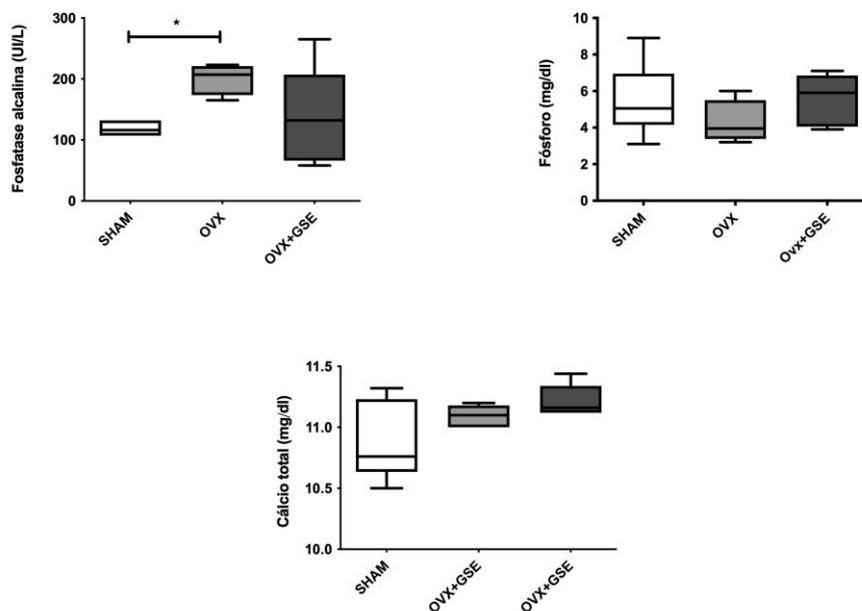


Figura 6. Gráficos ilustrando os resultados dos marcadores séricos de fosfatase alcalina, fósforo e cálcio. Dados expressos em mediana e percentis. Teste de Kruskal- Wallis ($p > 0,05$).

4.1.2. Análise qualitativa do tecido ósseo femoral

A análise quantitativa do tecido ósseo localizado nas epífises femorais morfológica sugere uma predominância de matriz extracelular, ou seja, maior quantidade de osso trabecular nos grupos SHAM e OVX+GSE (figuras 7A e 7C). Já no grupo OVX (figura 7B) observou-se predominância de tecido conjuntivo, com menor quantidade de matriz extracelular. No interior da matriz extracelular, foi observado a presença similar de osteócitos nos três grupos avaliados.

4.1.3. Análise Histomorfométrica

Os achados morfométricos apresentados na figura 8 confirmaram as observações morfológicas mostrando que no grupo OVX houve redução significativa da quantidade de matriz extracelular e também da área óssea em comparação aos grupos SHAM e OVX+GSE. Não houve diferença estaticamente significativa no número de osteócitos. Houve diminuição significativa na quantidade de tecido conjuntivo/medula óssea presente entre a matriz extracelular nos grupos SHAM e OVX+GSE comparados ao OVX. Não houve diferença significativa do número de osteócitos/área de osso.

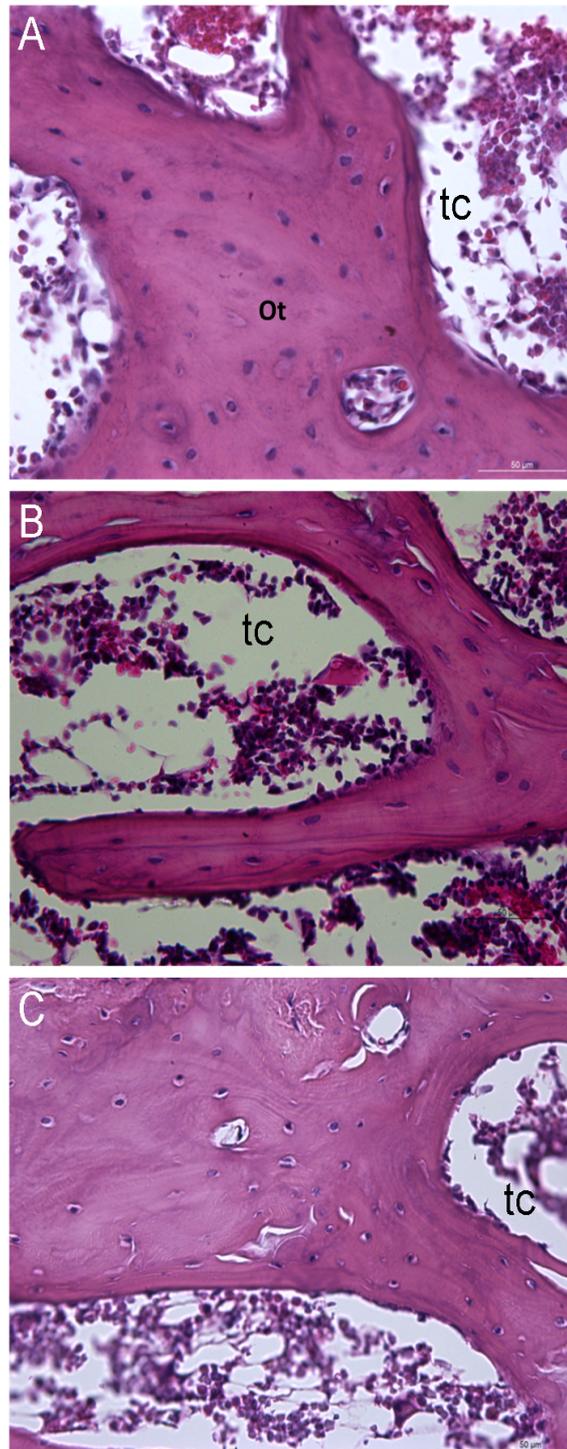


Figura 7: Fotomicrografias do osso trabecular da epífise de fêmures de animais dos grupos SHAM **(A)**, OVX **(B)** e OVX+GSE **(C)**. Hematoxilina e Eosina (H&E). Barra: 50 µm. São observados osso trabecular exibindo vários osteócitos (Ot). Tecido conjuntivo/medula óssea (Ct)

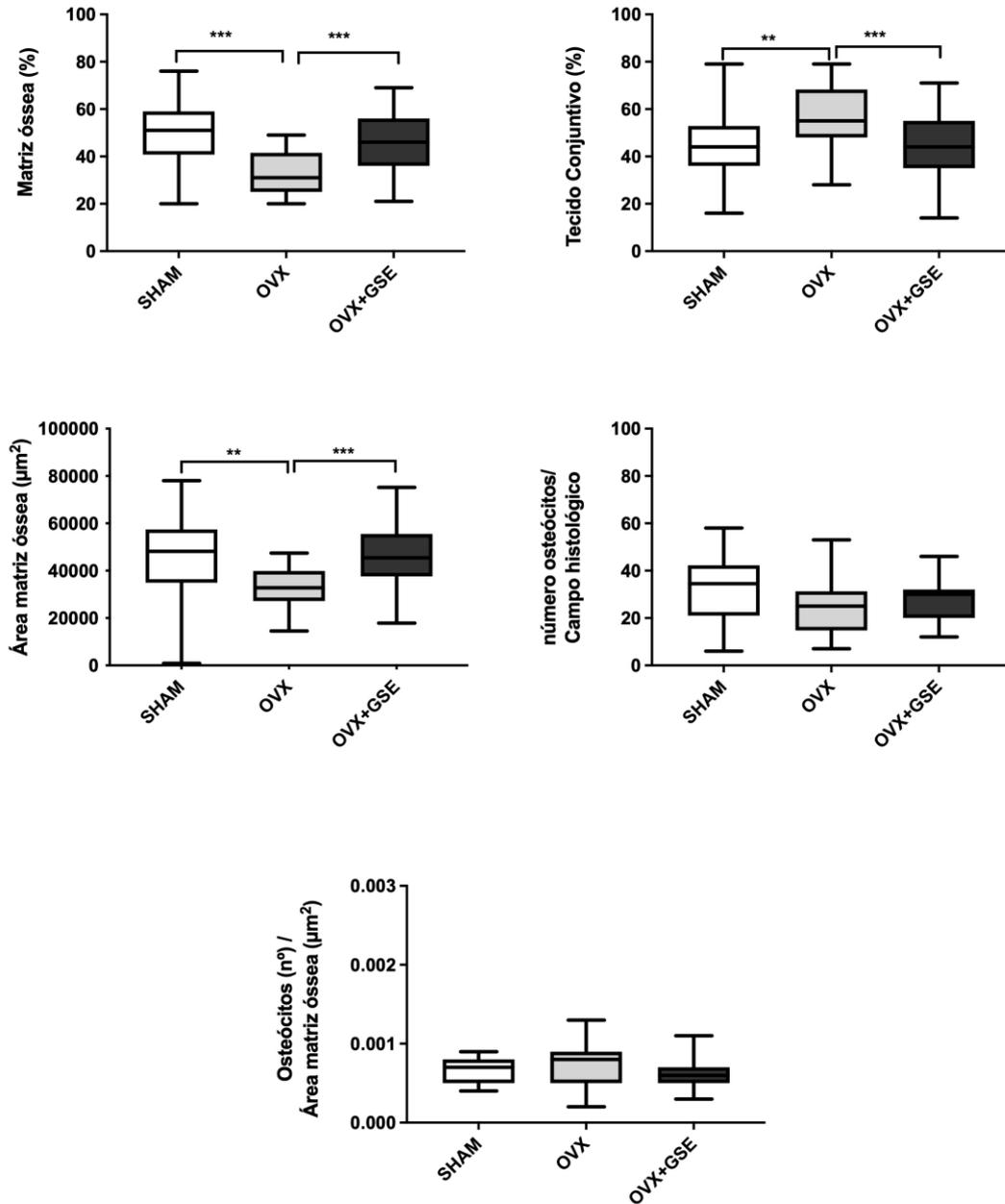


Figura 8: Histomorfometria da matriz extracelular, tecido conjuntivo, área matriz óssea, osteócitos e razão osteócitos/área matriz óssea em fêmeas dos grupos SHAM, OVX E OVX+GSE. Dados expressos em mediana e percentis. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Teste One-Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey (A, B, C e D) ou Kruskal-Wallis (E).

4.1.4. Método do TRAP

Nos cortes submetidos ao método TRAP, para evidência de osteoclastos, células TRAP-positivas (citoplasma avermelhado) mostraram-se multinucleadas, o que confirmou tratar-se de osteoclastos (figuras 9A-F). Nos grupos SHAM (figuras 9A e 9B), OVX (figuras 9C e 9D) e OVX+GSE (figura 9E e 9D) foi observada a presença de osteoclastos de maneira similar em contato com a matriz extracelular.

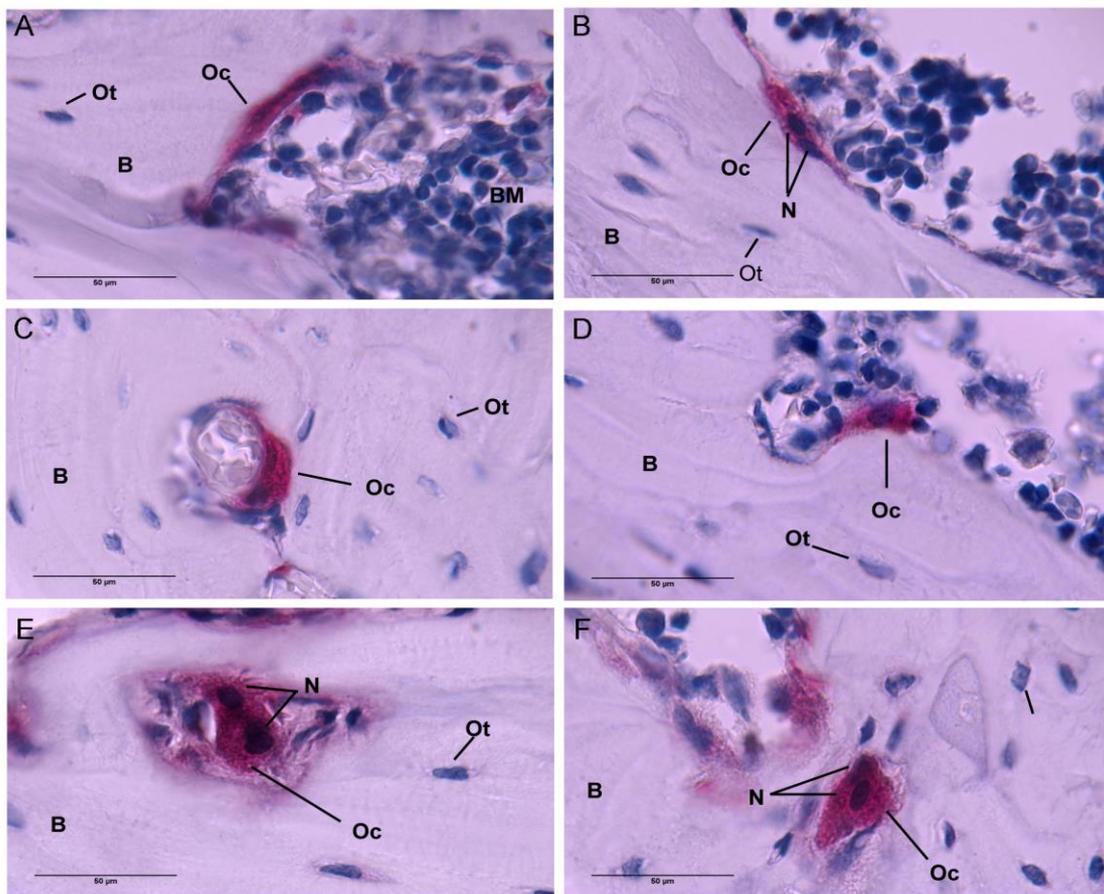


Figura 9: Fotomicrografias de porções de osso trabecular da epífise de fêmures dos grupos SHAM (A e B), OVX (C e D) e OVX+ GSE (E e F). Método do TRAP contra corado com Hematoxilina de Carazzi. Barras: 50 µm. São observadas regiões de osso trabecular da epífise do fêmur (B) com vários osteócitos (Ot) e osteoclastos (Oc) TRAP- positivos (cor vermelha) que exibem diversos núcleos (N)

4.1.5. Histoquímica do Picro-Sirius – Microscopia de Polarização

Nos cortes corados com Picro-Sirius e visualizados em microscópio de luz com filtro de polarização, foi observada a organização e distribuição das fibras colágenas no osso trabecular da epífise dos fêmures. Nos grupos SHAM (figuras 10A e 9B) e OVX (figuras 10C e 10D), o arranjo do colágeno levou a predominância da birrefringência verde, o que sugere menor maturidade óssea. No grupo OVX+ GSE (10E e 10F) observou-se proporção semelhante das birrefringências verde e vermelho, com discreta predominância da birrefringência verde, indicando que a dinâmica da remodelação óssea pudesse estar sendo modificada pelo GSE.

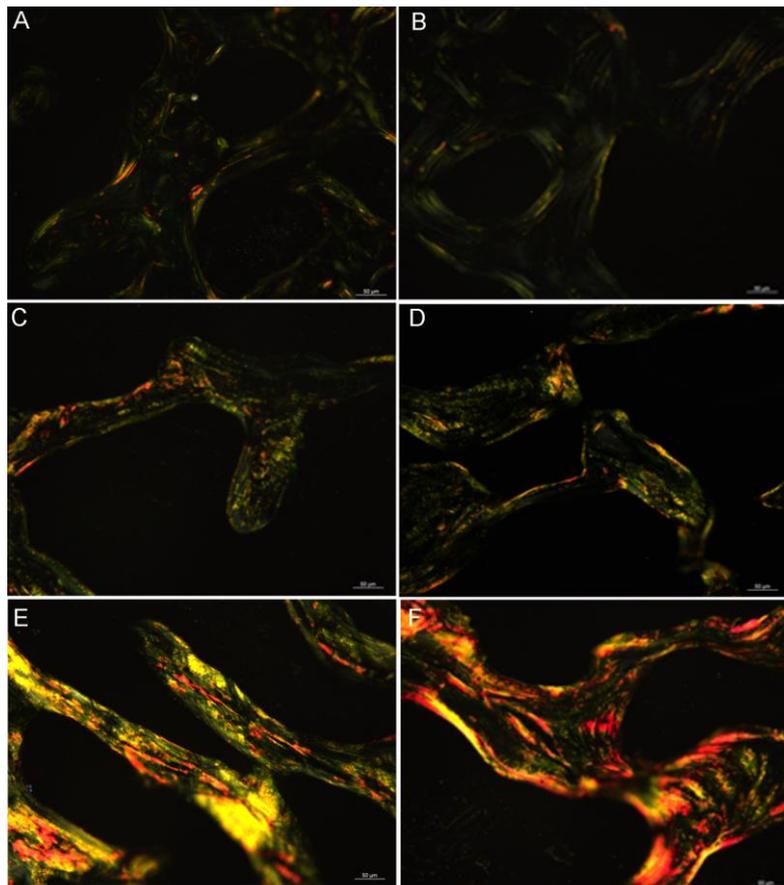


Figura 10: Fotomicrografias de porções de ossos trabeculares da epífise dos fêmures dos grupos SHAM (A e B), OVX (C e D) e OVX+GSE (E e F). Cortes evidenciados pelo picro-sirius e visualizados em microscópios de luz com filtro de polarização. Barras: 50 μ m.

4.1.6. Análise qualitativa ordinal da distribuição do colágeno

Na comparação dos grupos, a análise qualitativa ordinal das birrefringências relacionados à distribuição e ao arranjo do colágeno não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos SHAM, OVX e OVX+ GSE. Embora os escores de birrefringência do colágeno em percentuais evidenciem maiores valores para os tons esverdeados nos grupos SHAM, OVX e OVX+GSE, houve tendência a maior percentual de birrefringência avermelhada no OVX+GSE (Figura 11).

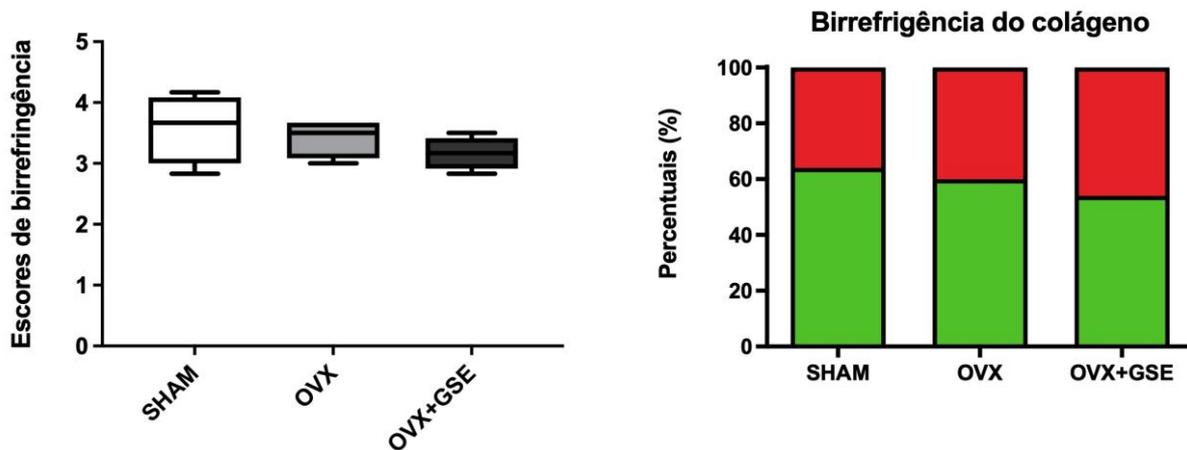


Figura 11: Escores e os percentuais de birrefringência de verde e vermelho relacionada à distribuição e ao arranjo do colágeno em fêmures dos grupos SHAM, OVX e OVX+GSE. Dados expressos em mediana e percentis. Teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

4.2. Experimentos in vitro

4.2.1. Adesão celular

Após 24 horas e 3 dias de cultura, os ensaios de imunofluorescência foram realizados para marcação com DAPI e contagem nuclear. Os resultados mostraram que a adesão celular aumentou significativamente em 3 dias ($p < 0.001$), sem diferença

estatística entre o controle e as células que receberam as duas concentrações de GSE no meio de cultura (Figura 12).

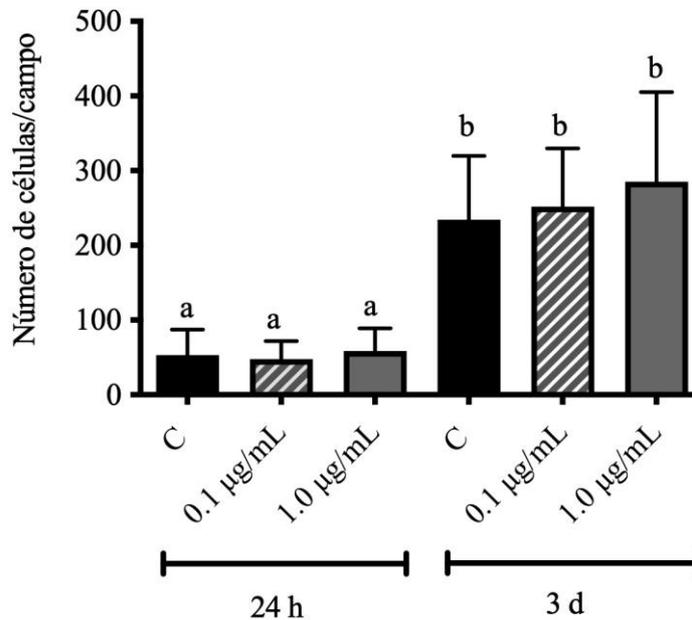


Figura 12: Adesão das células osteoblásticas MC3T3-E1 após 24 horas e 3 dias de cultura, divididas nos grupos controle (C), 0.1 ug/ml e 1.0 ug/mL de GSE. Letras diferentes significam diferença estatística para $p < 0.05$. Teste estatístico ANOVA.

4.2.2. Proliferação celular

A figura 13 mostra que a proliferação celular aumentou significativamente com um pico nos 7 dias de cultura, seguido de uma diminuição significativa em todos os períodos experimentais ($p < 0.01$), sem diferença estatística entre os grupos.

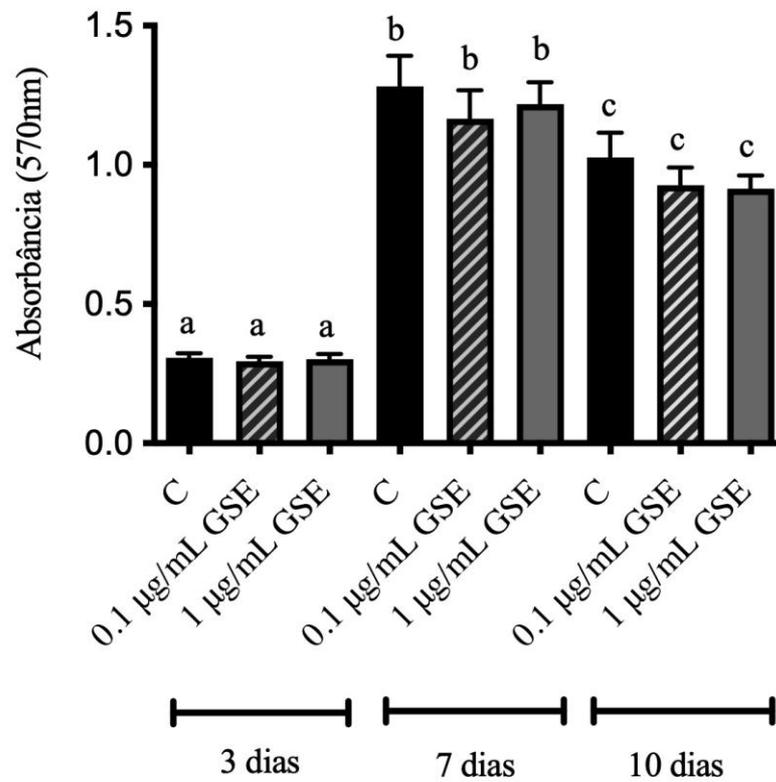


Figura 13. Proliferação das células osteoblásticas MC3T3-E1, divididas nos grupos controle (C), 0.1 ug/ml e 1.0 ug/mL de GSE. Letras diferentes significam diferença estatística para $p < 0.05$. Teste estatístico ANOVA.

4.2.3. Detecção de fosfatase alcalina

Pode ser observado na figura 14 que a fosfatase alcalina foi detectada em todos os grupos, nos dois períodos experimentais. É importante salientar a maior intensidade de marcação de ALP nos grupos que receberam o GSE, principalmente da concentração de 1.0 ug/mL.

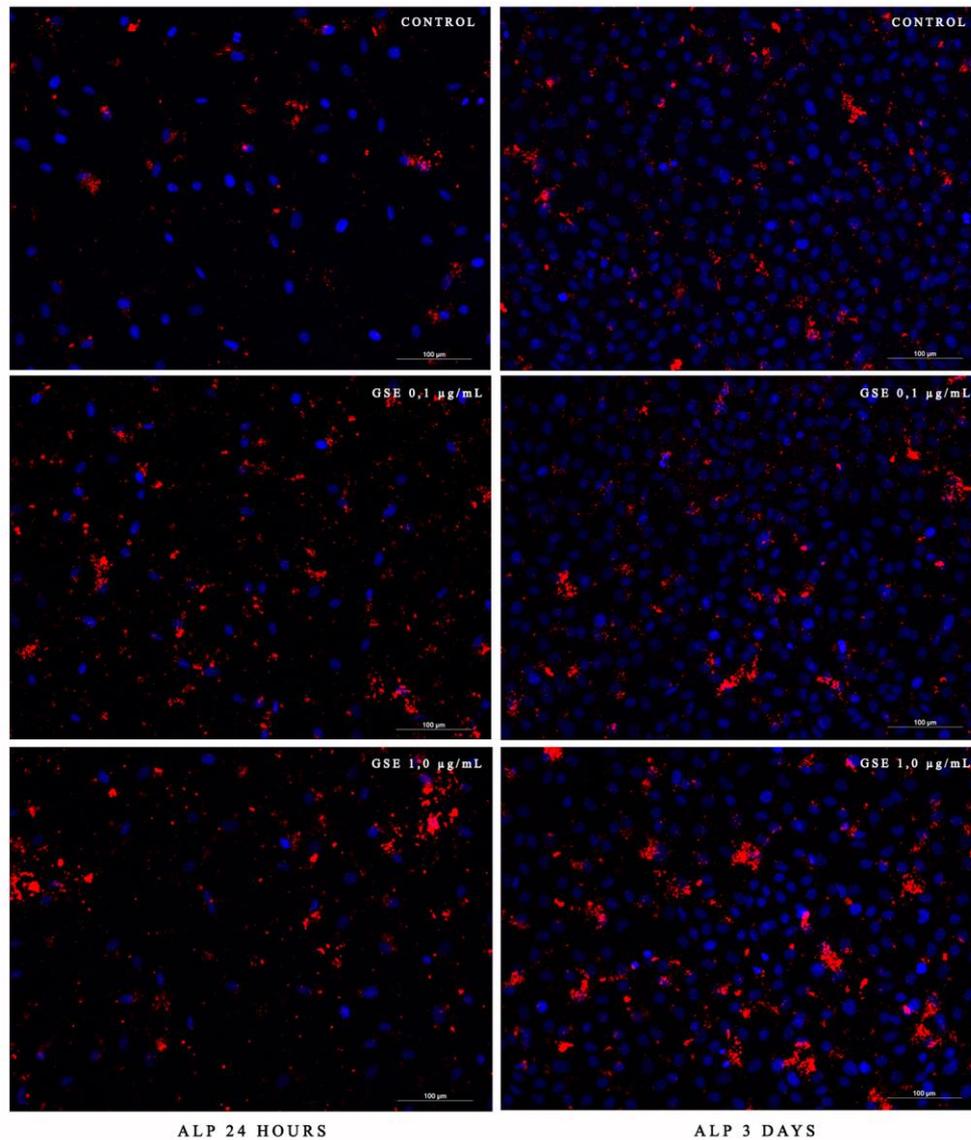


Figura 14. Detecção de fosfatase alcalina em cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1 após 24 horas e 3 dias nos grupos controle, GSE0.1 and GSE1.0. Barra = 50 µm. (vermelho = fosfatase alcalina; azul = núcleo celular).

4.2.4. Mineralização

A figura 15 mostra uma quantidade significativa de nódulos mineralizados após 17 dias de cultura em todo os períodos experimentais, sem diferença estatística entre o controle e os grupos que receberam as duas concentrações. Entretanto, o grupo

que recebeu 1.0 ug/mL apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo 0.1 ug/mL.

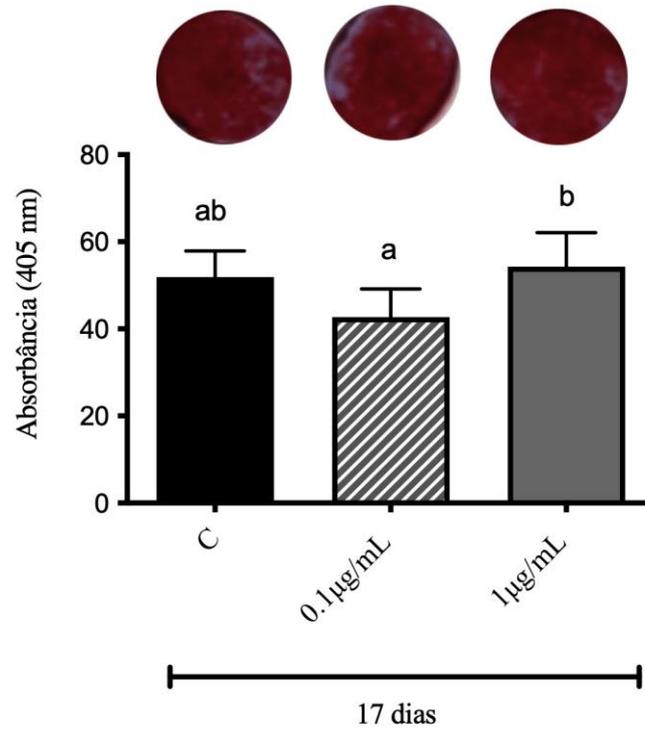


Figura 15. Mineralização após 17 dias em cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1, divididas nos grupos controle (C), 0.1 ug/ml e 1.0 ug/mL de GSE. Letras diferentes significam diferença estatística para $p < 0.05$. Teste estatístico ANOVA.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato de semente de uva rico em proantocianidinas na remodelação do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas e nas células osteoblásticas em um modelo *in vitro*.

O modelo de ovariectomia foi utilizado a fim de tentar mimetizar condições pós-menopausa (DEVLIN; FERGUSON, 1990; GIRO *et al.*, 2008; KALU, 1991). Esse modelo se beneficia da rápida reação às alterações hormonais induzidas pela ovariectomia e refletidas no metabolismo ósseo (DUDECK *et al.*, 2014). No presente estudo, foi estabelecido um período de insuficiência de estrógeno de 90 dias pós-ovariectomia, a fim de garantir que alterações ósseas relacionadas à osteoporose pudessem ser observadas. Sabe-se que histologicamente, o período de 90 dias pós-ovariectomia é suficiente para obtenção de osteoporose animal (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014).

Nesta pesquisa, o êxito do modelo experimental proposto e a primeira parte de nossa hipótese foram confirmados por achados histomorfométricos que demonstraram redução significativa do percentual de matriz extracelular da porção trabecular da epífise do fêmur de animais do grupo OVX em comparação aos grupos SHAM e OVX+GSE. Além disto, a área de osso também se apresentou menor no grupo OVX. No espaço previamente ocupado por tecido ósseo foi observado tecido conjuntivo, ou seja, a redução dos percentuais de matriz extracelular foi inversamente proporcional aos de tecido conjuntivo. Estes resultados histomorfométricos corroboram com estudo realizado em camundongos ovariectomizados, nos quais as proantocianidinas preveniram a perda óssea em fêmures, além de vértebras lombares, por meio de análise de micro-CT. A ovariectomia afetou o osso trabecular, porém, não o osso cortical. A administração do GSE diminuiu a perda óssea trabecular

causada pela OVX (TENKUMO *et al.*, 2020; NAGAOKA *et al.*, 2019) também observaram, por meio de micro-CT, aumento significativo de volume ósseo/volume de tecido, espessura trabecular e número trabecular em camundongos osteopênicos que receberam extrato rico em delphinidina, uma das antocianinas mais abundantes encontradas em vegetais e frutas silvestres.

Em relação ao percentual dos osteócitos, células essenciais para a manutenção da matriz óssea (PLOTKIN; BELLIDO, 2014), nesta investigação não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Este dado difere do observado em outros estudos como o de SEMEGHINI *et al.* (2022), onde foi observado que, após administração do carotenoide licopeno, houve um aumento no número de osteócitos e osteoblastos quando comparados aos grupos SHAM e OVX no osso trabecular da epífise distal do fêmur após análise realizada com o método estereológico.

Para evidenciar as células responsáveis pela reabsorção óssea, ou seja, os osteoclastos, foi realizada a histoquímica do TRAP, para detecção da enzima Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato, considerada um marcador osteoclástico (DE SOUZA FALONI *et al.*, 2007). Apesar da administração do GSE, não foram observadas diferenças morfológicas destas células no tecido ósseo da epífise femoral dos grupos estudados. Segundo, DE SOUZA FALONI *et al.* (2012), menor quantidades de núcleos, além de características indicativas de morte celular programada por apoptose, tais como: volume celular reduzido, núcleos picnóticos e cromatina periférica condensada poderia indicar que o extrato de semente de uva reduz a atividade dos osteoclastos, como foi observado por outros pesquisadores (JIN-SIL *et al.*, 2012; KWAK *et al.*, 2020; TENKUMO *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2019).

Além dos achados relativos à quantidade de matriz óssea, o GSE parece exercer efeito na qualidade óssea. Em ratos em crescimento, utilizando-se tomografia

computadorizada quantitativa periférica tridimensional (pQCT), foi observado um aumento significativo do material mineral ósseo quando uma dieta rica em cálcio foi associada ao uso do GSE. Isoladamente, a dieta rica em cálcio não levou aos mesmos resultados (GUNJIMA *et al.*, 2014).

Os níveis de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, avaliados para verificar possíveis alterações nos biomarcadores do tecido ósseo, não mostraram diferenças significativas entre os grupos do presente estudo. Este resultado corrobora com SOARES *et al.* (2021), que estudaram o efeito da restrição calórica na perda óssea alveolar em ratos Wistar com periodontite, os quais também não observaram diferenças significativas nos biomarcadores cálcio e fosfatase. A restrição calórica está relacionada à diminuição do estresse oxidativo, ou seja, redução da espécie reativa de oxigênio (GENARO *et al.*, 2009), que aumenta com o envelhecimento ou com o início do estado inflamatório, podendo afetar negativamente a homeostase óssea. O GSE pode atuar como antioxidante, melhorando a homeostase óssea. (NANDAKUMAR *et al.*, 2008).

A fim de aprofundar a análise de possíveis efeitos do GSE na qualidade da matriz, também foi realizada a análise da birrefringência do colágeno da matriz extracelular óssea (PACHECO-COSTA *et al.*, 2016). Embora, a avaliação qualitativa ordinal da birrefringência resultante da maturidade, distribuição e arranjo do colágeno não tenha mostrado diferenças estatisticamente significativas, houve tendência de maiores valores de escores de birrefringência esverdeada nos grupos SHAM e OVX. No OVX+GSE observou-se proporção semelhante da birrefringência de tons esverdeados e avermelhados, com discreta predominância da birrefringência de tons avermelhados. Neste tipo de análise as fibras imaturas são mais delgadas e apresentam birrefringência em tons esverdeados, enquanto as fibras maduras, que

são mais espessas apresentam tons avermelhados (HIRSHBERG *et al.*, 2007; PACHECO-COSTA *et al.*, 2016; RETAMOSO *et al.*, 2009;). Já em outro estudo, foi observada a prevalência de fibras colágenas maduras em grupos de ratas ovariectomizadas no osso cortical e esponjoso de fêmur, e uma birrefringência esverdeada aumentada em todos os grupos tratados com hormônio da paratireoide (PACHECO-COSTA *et al.*, 2015). SANTOS *et al.* (2014) utilizaram diferentes doses de isoflavona de soja no tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, e avaliaram por análise semiquantitativa as fibras colágenas nos ossos corticais e trabéculas dos fêmures distais. Estes pesquisadores observaram maior intensidade de birrefringência vermelha no grupo tratado com a menor dose de isoflavona e a menor intensidade no grupo controle. Já a maior intensidade de birrefringência esverdeada foi observada no grupo controle (SANTOS *et al.*, 2014). Em outro estudo que utilizou isoflavona de soja associada à vibração na cortical óssea dos fêmures de ratas ovariectomizadas, as fibras mostraram maior birrefringência vermelha (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2013).

A segunda parte da nossa hipótese foi confirmada pelos resultados comprovando ausência de toxicidade e manutenção da atividade funcional das células osteoblásticas selecionadas para este estudo (MC3T3-E1), principalmente observado na manutenção da adesão e proliferação celular dos grupos experimentais, com as duas concentrações de GSE. Segundo KWAK *et al.*, (2020) também observaram que o extrato de semente de uva não apresentou citotoxicidade em células da medula óssea. Nossos resultados também demonstraram que a administração de GSE intensificou a detecção de fosfatase alcalina após 24 horas e 3 dias de cultura. De acordo com VIMALRAJ (2020), a fosfatase alcalina é expressa em abundância nos tecidos mineralizados, com um papel essencial na formação da matriz óssea. Em

nosso estudo, o GSE não interferiu na produção e liberação de ALP, contribuindo para a mineralização observada após 17 dias de cultura.

Alguns outros estudos foram realizados envolvendo os efeitos do extrato de semente de uva na atividade funcional osteoblástica por modelos *in vitro*. Um artigo publicado por TORRE *et al.* (2020) mostrou que o extrato total da uva (casca, polpa e sementes) induz o aumento da expressão de genes associados à diferenciação osteoblástica em células mesenquimais da medula óssea. DAI *et al.* (2007) também demonstraram que o resveratrol (um composto fenólico encontrado nas uvas) estimula a proliferação e diferenciação de células mesenquimais da medula óssea por meio da ativação da sinalização ERK1/2. Estudos realizados com as células MC3T3-E1 cells e publicados por ZHANG *et al.* (2014), induziram o estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio e observaram que o extrato de semente de uva inibiu a apoptose celular mediada pelo p53.

Algumas limitações do estudo devem ser destacadas em relação aos parâmetros utilizados. A análise quantitativa morfométrica realizada trouxe informações importantes, mas poderia ser complementada com parâmetros de tecnologia 3D, como microtomografia computadorizada e estereologia. Além disso, o modelo de cultura *in vitro* trouxe informações sobre o comportamento de células em um ambiente ideal, o que nos traz a ideia de posteriormente aplicar o estresse oxidativo na cultura para simular a condição de injúria que as células sofrem em uma condição de osteoporose.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo demonstram o efeito do extrato de semente de uva (GSE) no osso trabecular da epífise femoral de ratas ovariectomizadas, principalmente associado à manutenção da matriz óssea da região. Além disso, foi demonstrado que o GSE promove a manutenção da atividade funcional

de adesão proliferação e mineralização de células osteoblásticas. Mais estudos devem ser realizados para que o extrato de semente de uva se torne uma alternativa promissora para o tratamento e prevenção da osteoporose.

6. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos é possível concluir que:

Parâmetros in vivo:

- ✓ A administração do GSE não influenciou os marcadores séricos (cálcio, fósforo e fosfatase alcalina);
- ✓ A administração do GSE, por meio de avaliação de parâmetros qualitativos e quantitativos no tecido ósseo, impediu a perda de matriz óssea nas epífises femorais de ratas ovariectomizadas, não influenciando o número de osteócitos.
- ✓ A administração do GSE não modificou a morfologia e quantidade de osteoclastos;
- ✓ A administração do GSE influenciou no padrão de fibras colágenas, com predominância de fibras avermelhadas no grupo de animais que recebeu o GSE.

Parâmetros in vitro:

- ✓ A administração das duas concentrações de GSE não interferiu na adesão celular ao longo da cultura;
- ✓ A administração das duas concentrações não interferiu na proliferação celular ao longo da cultura;
- ✓ A administração das duas concentrações intensificou a detecção de fosfatase alcalina ao longo da cultura;

- ✓ A administração das duas concentrações não interferiu na mineralização após 17 dias de cultura.

7. REFERÊNCIAS

APPELMAN-DIJKSTRAN, N. M.; PAPAPOULOS, S. E. From disease to treatment: from rare skeletal disorders to treatments for osteoporosis. **Endocrine**, v.52, n.3, p.414-26, 2016.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri- industrial by products: Antioxidant activity occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.

BARON, R.; FERRARI, S.; GRAHAM, R.; RUSSELL, G. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. **Bone**, v.48, n.4, p.677-92, 2011.

BARROS, R. R.; DEGIDI, M. NOVAES, A. B.; PIATTELLI, A.; SHIBLI, J. A.; IEZZI, G. Osteocyte density in the peri- implant bone of immediately loaded and submerged dental implants. **Journal Periodontol**, v.80, n.3, 499-504, 2009.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, p.317-33, 1998.

DAI, Z.; LI, Y., QUARLES, L.D.; SONG, T.; PAN, W.; ZHOU, H.; XIAO, Z. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. **Phytomedicine**, v.14, p. 806–814, 2007.

DE SOUZA FALONI, A. P.; SASSO-CERRI, E.; KATCHBURIAN, E.; CERRI, P. S. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclast in estrogen- treated rats. **Journal of Periodontal Research**, v.42, n.3, p.193-201, 2007.

DE SOUZA FALONI, A. P.; SCHOENMAKER, T.; AZARI, A.; KATCHBURIAN, E.; CERRI, P. S. Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. **Calcified Tissue International**, v.88, n.1, p.63-74, 2011.

DE SOUZA FALONI, A. P.; SASSO-CERRI, E.; ROCHA, F. R.; KATCHBURIAN, E.; CERRI, P. S. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen- treated rats. **Journal of Anatomy**, v.220, n.1, p.77-85, 2012.

DEVLIN, H.; FERGUSON, M. J. The rate of incisor dentine calcification and mandibular growth in the molar region of the ovariectomized rat. **Archives of Oral Biology**, v.35, p.29-32, 1990.

DUDECK, J.; REHBERG, S.; BERNHARDT, R.; SCHNEIDERS, W.; ZIERAU, O.; INDERCHAND, M.; GOEBBELS, J.; VOLLMER, G.; FRATZI, P.; SCHARNWEBER, D.; RAMMELT, S. Increased bone remodelling around titanium implants coated with chondroitin sulfate in ovariectomized rats. **Acta Biomaterialia**, v.10, p.2855-65, 2014.

FALONI, A. P. S.; SASSO-CERRI, E.; KATCHBURIAN, E.; CERRI, P. S. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclast in estrogen- treated rats. **Journal of Periodontal Research**, v.42, p.193-201, 2007.

FLORENCIO-SILVA, R.; SANTOS, M. A.; MEDEIROS, V. P.; NADER, H. B.; NONAKA, K. O. Effects of soy isoflavones and mechanical vibration on rat bone tissue. **Climacteric**, v.16, p.709-17, 2013.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Dietary flavonoids: role of epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v.51, p.813-23, 2011.

GENARO, P.; SARKIS, K. S.; MARTINI, L. A. Effect of caloric restriction on longevity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, p.667-72, 2009.

GIRO, G.; GONÇALVES, D.; SAKAKURA, C. E.; PEREIRA, R. M.; MARCANTONIO, E.; ORRICO, S. R. Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study in female rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.105, n.2, p.162-7, 2008.

GREGORY, C.A.; GUNN, W.G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical biochemistry's**, v. 329, p. 77–84, 2004.

GUNJIMA, M.; TOFANI, I.; KOJIMA, Y.; MAKI, K.; KIMURA, M. Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. **Dental Materials Journal**, v.23, n.2, p.67-74, 2004.

HERNLUND, E.; SVEDBOM, A.; IVERGARD, M.; COMPSTON, J.; COOPER, C.; STENMARK, J.; MCCLOSKEY, E. V.; JÖNSSON, B.; KANIS, J. A. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). **Archives of Osteoporosis**, v.8, n.1, p.136, 2013.

HIRSHBERG, A.; LIB, M.; KOZLOVSKY, A.; KAPLAN, I. The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. **Oral Oncology**, v.43, n.3, p.278-82, 2007.

ISHTIAQ, S.; FOGELMAN, I.; HAMPSON, G. Treatment of post-menopausal osteoporosis: beyond bisphosphonates. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.38, p.13-29, 2015.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner**, v.5, p.175-92, 1991.

KHANNA, S.; ROY, S.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEM, C. K. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression. In cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p.38-42, 2001.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.23, n.11, p.576-81, 2012.

KRUM, S. A.; CHANG, J.; MIRANDA-CARBONI, G.; WANG, C. Y. Novel functions for NF κ B: inhibition of bone formation. **Nature Reviews Rheumatology**, v.10, n.6, p.607-11, 2010.

KWAK, S. C.; CHEON, Y. H.; LEE, C. H.; JUN, H. Y.; YOON, K. H.; LEE, M. S.; KIM, J. J. Grape seed proanthocyanidin extract prevents bone loss via regulation of osteoclast differentiation, apoptosis and proliferation. **Nutrients**, v.12, p.1- 14, 2020.

LI, X.; XU, L.; GAO, H.; LI, B.; CHENG, M. Effects of grape seed proanthocyanidins extracts on AGEs and expression of bone morphogenetic protein- 7 in diabetic rats. **Journal of Nephrology**, v.21, p.722-33, 2008.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of tge estrouscycle phases of rats: some helpful consideration. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, n.4, p.609-14, 2002

MARIE, P. J.;KASSEM, M. Osteoblasts in osteoporosis: past emerging and future anabolic targets. **European Journal of Endocrinology**, v.165, n.1, p1-10, 2011.

NAGAOKA, M.; MAEDA, T.; CHATANI, M.; HANDA, K.; YAMAKAWA, T.; KIYOHARA, S.; NEGISHI-KOGA, T.; KATO, Y.; TAKAMI, M.; NIIDA, S.; LANG, S. C.; KRUGER, M. C.; SUZUKI, K. A delphinid – enriched maqui berry extract improves bone

metabolismo and protects against bone loss in osteopenic mouse models.

Antioxidants, v.8, n.9, p.386, 2019.

NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S. K. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Letters**, v.269, p.378-87, 2008.

NAVAS, L. R.; LYLES, K. W. Osteoporose. In:Duthie, Katz. Geriatria Prática, Rio de Janeiro, **Revinter**, v.3, p.211-20, 2002.

PACHECO-COSTA, R.; CAMPOS, J. F.; KATCHBURIAN, E.; MEDEIROS, V. P.; NADER, H. B.; NONAKA, K. O.; PLOTKIN, L. I.; REGINATO, R. D. Modifications in bone matrix of estrogen-deficient rats treated with intermittent PTH. **Biomed Research International**, v.2015, 2015.

PACHECO-COSTA, R.; DAVIS, H. M.; KATCHBURIAN, E.; PLOTKIN, L. I.; REGINATO, R. D. Osteocytis connexin 43 is not required for the increase in bone mass induced by intermittent PTH administration in male mice. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v.16, n.1, p.45-57, 2016.

PARK, J. S.; PARK, M. K.; OH, H. J.; WOO, Y. J.; LIM, M. A.; LEE, J. H.; JU, J. H.; JUN, Y. O.; LEE, Z. H.; PARK, S. H.; KIM, H. Y.; CHO, M. L.; MIN, J. K. Grape seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis. **Plos One**, v.7, n.12, p.1-10, 2012.

PINENT, M.; BLAY, M.; BLADÉ, M.C.; SALVADÓ, M.J.; AROLA, L.; ARDEVOL, A. Grape seed- derived procyanidins have an antihyperglycemic effect on streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin- sensitive cell lines. **Endocrinology**, v.145, p.4985-90, 2004.

PLOTKIN, L.; BELLIDO, T. Comment on osteocytes: masters orchestrators of bone. **Calcified Tissue International**, v.95, n.4, p.382-3, 2014.

PREUSS, H. G.; WALLERSTEDT, D.; TALPUR, N.; TUTUNCUOGLU, S. O.; ECHARD, B.; MYERS, A.; BUI, M.; BAGCHI. Effects of niacina- bound chromium and grape seed proanthocyanidin extract on the lipid profile of hypercholesterolemic subjects: a pilot study. **The New England Journal of Medicine**, v.31, n.5, p.227-46, 2000.

RETAMOSO, L. B.; CUNHA, T. M.; KNOP, L. A.; SHINTCOVSK, R. L.; TANAKA, O. M. Organization and quantification of the collagen fibers in bone formation during orthodontic tooth movement. **Micron**, v.40, n.8, p.827-30, 2009.

RUSSELL, R. G.; ESPINA, B.; HULLEY, P. Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis. **Current Opinion in Rheumatology**, v.1, p.3-10, 2006.

SANTOS, M. A.; FLORENCIO-SILVA, R.; MEDEIROS, V. P.; NADER, H. B.; NONAKA, K. O.; SASSO, G. R.; SIMÕES, M. J. Effects of different doses of soy isoflavones on bone tissue of ovariectomized rats. **Climacteric**, v.2014, p.393-401, 2014.

SATO, M.; BAGCHI, D.; TOSAKI, A.; DAS, D. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/ reperfusion induced activation of JNK-1 and C-JUN. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.729-37, 2001.

SEMEGHINI, M. S.; SCALIZE, P. H.; COELHO, M. C.; FERNANDES, R. R.; PITOL, D. L.; TAVARES, M. S.; SOUSA, L. G.; COPPI, A. A.; SIESSERE, S. Lycopene prevents bone loss in ovariectomized rats and increases the number of osteocytes and osteoblast. **Journal of Anatomy**, v.1, n.3, p.729-40, 2022.

SOARES, E. L.; SANTOS, F. A.; MROCZEK, T.; DE LIMA, D. C.; JOSEFINO, H. V.; DA SILVA, A.; MECCA, L. E.; FRANCO, G. C. Effect of caloric restriction on alveolar bone loss in rats. **Life Sciences**, v.269, 2021.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KARDE, R. B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.7, n.3, p.1089-99, 2008.

TENKUMO, T.; AOBULIKASIMU, A.; ASOU, Y.; SHIRATO, M.; SHISHIDO, S.; KANNO, T.; NIWANO, Y.; SASAKI, K.; NAKAMURA, K. Proanthocyanidin- rich grape seed extract improves bone loss, bone healing and implant osseointegration in ovariectomized animals. **Scientific Reports- Nature**, v.10, n.1, p.8812, 2020.

TORRE, E.; IVIGLIA, G.; CASSINELLI, C.; MORRA, M., RUSSO, N. Polyphenols from grape pomace induce osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **Int Journal Mol Med**, v.45, p.1721–1734, 2020.

VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. **Gene**, v.754, p. 144855, 2020.

YANG, J.; XIAO, X. Y. Grape phytochemicals and associated health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.53, n.11, p.1002-25, 2013.

ZHANG, Z.; ZHENG, L.; ZHAO, Z.; SHI, J.; WANG, X.; HUANG, J. Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction. **Journal of Toxicological Sciences**, v.39, p.803-13, 2014.

ZHU, W.; YIN, Z.; ZHANG, Q.; GUO, S.; SHEN, Y.; LIU, T.; LIU, B.; WAN, L.; LI, SHUAI, CHEN, X.; OUYANG, Z.; PENG, D. Proanthocyanidins inhibit osteoclast formation and function by inhibiting the NF- κ B and JNK signaling pathways during osteoporosis treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.509, p.294-300, 2019.

8. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA - FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito in vivo e in vitro do extrato de semente de uva no metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas ovariectomizadas", Protocolo n° 2018.1.827.58.3, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado — que envolve a produção, manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) — encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de

Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 12/12/2018.

Vigência do Projeto	01/02/2019 a 01/02/2020
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Hannover
N° de animais	42
Peso/Idade	300g
Sexo	
Origem	Biotério Central - PUSP-RP

Ribeirão Preto, 12 de dezembro de 2018.



Prof. Dr. Michele Mesquita