

EFEITO DO RESVERATROL NOS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DE RATAS
WISTAR OBESAS

FRANCIELLE ALVES CALDATO

EFEITO DO RESVERATROL NOS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DE RATAS
WISTAR OBESAS

FRANCIELLE ALVES CALDATO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.- Mestrado em Ciência Animal- Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Caliê Castilho

636.089 26 Caldato, Francielle Alves.
C145e Efeito do resveratrol nos órgãos reprodutivos em
ratas wistar obesas / Francielle Alves Caldato. --
Presidente Prudente, 2013.
39 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) --
Universidade do Oeste Paulista -- Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2013.
Bibliografia.
Orientadora: Caliê Castilho.

1. Ovário. 2. Folículo. 3. Útero. 4. Proliferação
celular. I. Título.

Francielle Alves Caldato

**EFEITO DO RESVERATROL NOS ÓRGÃOS REPRODUTIVOS DE RATAS
WISTAR OBESAS**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre- Mestrado em Ciência Animal- Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 31 de outubro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Calié Castilho
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

Prof^o Dr^o. Osimar de Carvalho Sanches
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE
Presidente Prudente-SP

Dr^a. Raquel Zanetti Puelker
Progest
Botucatu-SP

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar, portanto, devemos fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro”.

(Fernando Sabino, “O encontro marcado”).

RESUMO

Efeito do resveratrol nos órgãos reprodutivos de ratas Wistar obesas

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação com resveratrol sobre os órgãos reprodutivos (útero e ovários) de ratas Wistar com obesidade induzida por dieta palatável hiperlipídica (DPH). Foram estudadas 64 ratas Wistar, divididas em 4 grupos: Grupo Controle (G-CM n=16): animais alimentados com ração comercial LABINA[®] mais suplementação de placebo (0,5 mL de água deionizada, por meio de gavagem); Grupo Controle+Res (G-RM n=16): animais alimentados com ração comercial LABINA[®] mais suplementação com 30mg de resveratrol/Kg/dia diluídos em 0,5 mL de água deionizada, por meio de gavagem; Grupo Obeso (G-CO n=16): animais alimentados com dieta palatável hiperlipídica (DPH) mais suplementação de placebo; Grupo Obeso+Res (G-RO n=16): animais alimentados com DPH mais suplementação com 30mg de resveratrol/Kg/dia. Os animais receberam as dietas e suplementos durante 12 semanas (84 dias) e após o período experimental as ratas foram eutanasiadas e os órgãos (útero e ovários) retirados, pesados e processados para histologia. Pelos resultados obtidos concluímos que a suplementação com resveratrol aumenta a atividade ovariana evidenciada pelo aumento de CLs, bem como nos folículos ovarianos. No útero dos animais que receberam o resveratrol houve maior capacidade proliferativa demonstrada pela característica das NORs (regiões organizadoras de nucléolos) pequenas e em maior quantidade.

Palavras-chave : Obesidade, AgNOR, Corpo Lúteo, Folículo.

ABSTRACT

Effect of resveratrol on the reproductive organs in obesity Wistar rats

The present study aimed to evaluate the effects of supplementation with resveratrol on the reproductive organs (uterus and ovaries) of female rats With diet-induced obesity palatable diet (DPH). We studied 64 Wistar rats were divided into 4 groups: control group (G-CM n = 16): animals fed with commercial feed supplementation Labina ® over placebo (0.5 mL of deionized water, by gavage); Control Group Res + (G-MR n = 16) animals fed commercial feed supplemented with more Labina ® 30 mg resveratrol / kg / day diluted in 0.5 ml deionized water by gavage; group O(G-CO n = 16): animals fed palatable diet (DPH) over placebo supplementation; group O + Res (G- RO n = 16): animals fed with DPH or supplemented with resveratrol 30mg / kg / day. The animals received the diets and supplements for 12 weeks (84 days) and after the experimental period, the rats were euthanized and organs (uterus and ovaries) were removed, weighed and processed for histology. From the results obtained we conclude that supplementation with resveratrol increases ovarian activity evidenced by increase of LCs, as well as in ovarian follicles. In the uterus, the animals that receiving resveratrol was demonstrated by the proliferative capacity characteristic of NORs smaller and in greater quantity.

Keywords: Obesity, AgNor, Corpus Luteum Follicle.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Obesidade	9
2.2 Alimentos Funcionais e antioxidantes	10
2.3 Resveratrol	11
2.4 Efeitos biológicos do resveratrol no aparelho reprodutor	12
REFERÊNCIAS	14
3 ARTIGO CIENTÍFICO	17
ANEXO - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO.....	33

1 INTRODUÇÃO

Sobrepeso e obesidade são importantes problemas de saúde pública, presentes em todo o mundo, em todas as faixas etárias, não atingindo somente adultos, mas também muitas crianças e adolescentes. Além disso, a obesidade está associada a diversas doenças crônicas, como diabetes, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial (JAMES et al., 2004).

Os alimentos denominados como funcionais, nutracêuticos, alimentos planejados e outros sinônimos correlatos, são aqueles que, além de fornecer energia e nutrientes essenciais, apresentam constituintes não-nutrientes, identificados pela promoção de efeitos fisiológicos benéficos, podendo prevenir ou retardar doenças tais como as cardiovasculares, câncer, infecções intestinais, obesidade, dentre outras (BORGES, 2000).

Ao longo da última década, o resveratrol tem emergido como um promissor composto natural com um imenso potencial terapêutico. O resveratrol (trans-3, 5,4'- trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina, composto de polifenóis que ocorrem naturalmente em várias plantas, incluindo as uvas, frutos e amendoim. Nas plantas, o resveratrol é sintetizado em resposta a um stress ambiental, tal como mecanismo de defesa contra fungos, infecções virais ou bacterianas, radiações UV, variações de temperatura e exposição ao ozônio (WU et al., 2001).

O resveratrol tem sido proposto como composto com potencial anti-obesidade, parece ter efeitos na restrição de energia, levando à redução da gordura corporal e aumentando a sensibilidade à insulina (LAGOUGE et al 2006; BAILE et al. 2011). Além disso, o resveratrol é um fitoestrógeno que atua como agonista de estrógeno em receptores α e β (BOWERS et al, 2000), e estruturalmente é semelhante aos estrogênios sintéticos, tais como DES (dietilestilbestrol) e 17 β -estradiol benzoato (GEHM et al., 1997). No entanto, os estudos para avaliar os efeitos do resveratrol sobre a reprodução são limitados e apresentam dados que indicam que o resveratrol exerce efeitos predominantemente estrogênicos (HENRY; WITT, 2002; 2006).

Sendo assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação com resveratrol sobre os órgãos reprodutivos (útero e ovários) de ratas Wistar com obesidade induzida por dieta palatável hiperlipídica (DPH).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade

A obesidade se caracteriza pelo excesso de gordura corpórea, podendo ser desencadeada por alterações no metabolismo e na utilização dos nutrientes ou por balanço energético positivo, promovendo aumento dos estoques de energia e peso corporal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; PEREIRA et al., 1999). Esta patologia é considerada uma epidemia mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998) e está associada a diversas doenças crônicas não transmissíveis como hiperlipidemia, hipertensão arterial, e outras doenças cardiovasculares (GUEDES, 2005).

Os estoques de energia no organismo são regulados pela ingestão de alimentos e pelo gasto energético. Quando há equilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, o peso corporal é mantido (OLIVEIRA; COSTA; RIBEIRO, 2008). Desta forma, um pequeno balanço positivo acarreta baixo incremento de peso, mas o desequilíbrio crônico entre a ingestão e o gasto levará à obesidade ao longo do tempo (ESCRIVÃO et al., 2000).

Existem dois diferentes tipos de obesidade já descritos: obesidade andróide, abdominal ou centralizada, na qual o tecido adiposo localiza-se predominantemente no tronco; e a obesidade ginecóide, na qual a gordura localiza-se primariamente nos quadris, nádegas e cintura (OLIVEIRA; COSTA; RIBEIRO, 2008). O acúmulo de gordura visceral está associado há maior prevalência de desarranjos metabólicos, hormonais, inflamatórios e hemodinâmicos, que no conjunto implicarão em acometimento da microvasculatura e impacto negativo sobre os órgãos-alvo, particularmente sobre o eixo cárdio-renal, levando a alto consumo de oxigênio, alta incidência de doenças cardiovasculares, complicações metabólicas, insulinoresistência, hiperuricemia e dislipoproteinemia (ROSA et al., 2005).

O acúmulo excessivo de gordura corporal deriva de um aporte calórico excessivo e crônico de substratos combustíveis, presentes nos alimentos e bebidas (carboidratos, proteínas, lipídios e álcool), em relação ao gasto energético (metabolismo basal, efeito termogênico e atividade física) (CARDOSO et al, 2010). A obesidade está fortemente associada às dislipidemias, e o controle do peso corporal

parece ser uma medida eficaz no controle da dislipidemia, o qual relacionando-se à diminuição do colesterol LDL e ao aumento HDL (GIULIANO et al., 2005).

Como a causa definitiva da obesidade é um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, um balanço energético negativo é necessário para produzir a perda de peso e pode ser conseguido pela diminuição da ingestão alimentar, ou pelo estímulo ao aumento do gasto calórico ou a prevenção do seu declínio durante a dieta que pode ser alcançado pela utilização de recursos naturais com ingredientes à base de plantas (HURSEL; WESTERTERP-PLANTENGA, 2010).

2.2 Alimentos Funcionais e antioxidantes

Os alimentos denominados como funcionais, nutracêuticos, alimentos planejados e outros sinônimos correlatos, são aqueles que, além de fornecer energia e nutrientes essenciais, apresentam constituintes não-nutrientes, identificados pela promoção de efeitos fisiológicos benéficos, podendo prevenir ou retardar doenças tais como as cardiovasculares, câncer, infecções intestinais, obesidade, dentre outras (BORGES, 2000).

Os alimentos funcionais são definidos pelo *International Food Information Council* (IFIC) como alimentos que provêm benefícios adicionais à saúde, atribuídos aos nutrientes que contêm (LAMARÃO, FIALHO, 2009). São alimentos que, além de fornecerem os nutrientes básicos (carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, minerais, fibras e água) e cumprirem suas funções nutricionais, promovem a saúde por possuírem determinadas substâncias capazes, através de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, de promover a saúde e não a cura de doenças (BASHO; BIN, 2010).

As substâncias dos alimentos funcionais modulam e ativam os processos metabólicos, melhorando e mantendo as condições de saúde, modulando a fisiologia do organismo. São capazes de promover efeito hipocolesterolemiantes, hipotensivo, redução dos riscos de aterosclerose, anticancerígenos, hipoglicêmico, entre outros, pelo aumento e estimulação da efetividade do sistema imune, promovendo o bem-estar das pessoas e prevenindo o aparecimento precoce de alterações patológicas e de doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade (THAMER; PENNA, 2006).

A procura por esses alimentos tem estimulado a descoberta, e a fabricação de novos produtos (BURITI, 2005; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). A utilização dos alimentos para promover a saúde e a qualidade de vida, reduzindo os riscos de certas doenças, tem levado ao aumento das pesquisas e a descoberta de novos compostos naturais, possibilitando o aparecimento de produtos alimentícios que renovam as opções de mercado (THAMER; PENNA, 2006).

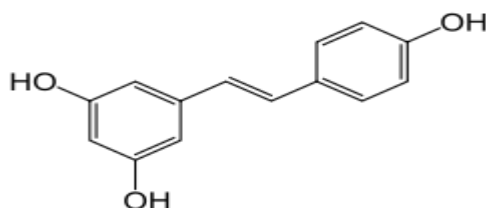
Os compostos responsáveis pela funcionalidade desses produtos são liderados pelas fibras dietéticas, óleos de peixe, esteróis de plantas, minerais, vitaminas, prebióticos e probióticos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Ao resveratrol, que está presente principalmente no vinho tinto, têm sido atribuídas uma série de benefícios, incluindo a proteção contra o diabetes tipo 2, câncer, doenças cardíacas, inflamação e doenças neurodegenerativas. Essas doenças têm em comum a sua associação com o envelhecimento, deste modo, o resveratrol que atua como antioxidante, é classificado como alimento funcional por vários estudiosos (HOWITZ et al., 2003).

Entre as substâncias antioxidantes destacam-se as vitaminas E (azeite virgem, frutas secas, germe de trigo, cereais de grão) e C (cítrico, kiwi, pimenta, tomate, repolhos), os carotenóides (licopeno - pigmento do tomate; betacaroteno - pigmento presente em cenouras, abóboras, manga, etc.), zinco (carnes, peixes e ovos), selênio (carnes, peixe, ovos e molusco), polifenóis (uvas, legumes em geral) e compostos de enxofre (legumes da família do repolho, cebolas, alhos). No mercado, podemos encontrar alimentos enriquecidos por antioxidantes, tais como margarinas, certos lácteos, bebidas e sucos (ARABBI, 2001).

2.3 Resveratrol

Nas plantas, o resveratrol (Fig. 1) é uma fitoalexina, sintetizado em resposta a um stress ambiental, como infecções microbianas, radiações UV, variações de temperatura e exposição ao ozônio (Wu et al., 2001).

Figura 1 – Estrutura química do *trans*- resveratrol



Por existir na casca da uva, o resveratrol é extraído para o vinho durante a maceração necessária à sua produção. Assim sendo, ele tem sido detectados em diversos tipos de vinhos oriundos de várias regiões (LIMA et al., 1999). A concentração nos vinhos varia consideravelmente (1,5 – 14 mg/L, valores de referência) de acordo com a espécie da uva, local geográfico, tipo de vinho, grau de infecção pelo fungo *Botrytis cinerea*, das práticas enológicas e das condições climáticas (BAVARESCO, 2003).

2.4 Efeitos Biológicos do Resveratrol no Aparelho Reprodutor

O resveratrol é um fitoestrógeno que atua como agonista de estrógeno e atua em receptores α e β (BOWERS et al, 2000). Estruturalmente é semelhante aos estrogénios sintéticos, tais como DES (dietilestilbestrol) e 17 β -estradiol benzoato (GEHM et al., 1997).

O resveratrol também possui efeitos citotóxicos in vitro em diversas células tumorais humanas, incluindo células linfóides e mielóides de cancro, bem como pele, células de carcinoma da mama, ovário, colo uterino, próstata, do estômago, do cólon, do pâncreas, do fígado e da tiróide (AGGARWAL; BHARDWAJ; AGGARWAL, 2004 ; KUNDU; SURH , 2008).

A ativação de SIRT1 é tida como evento chave para elucidar a fisiopatologia do resveratrol (HOWITZ et al., 2003; BAUR et al., 2006). O SIRT1 é um dos sete homólogos de mamífero de Sir2 que catalisa o NAD⁺ dependente da desacetilação proteica, nicotinamida rendimento e O-acetil-ADP-ribose (BLANDER; GUARENTE, 2004). Originalmente descrito como um fator regulador da longevidade, da apoptose e de reparo do DNA (BLANDER; GUARENTE, 2004; SINCLAIR, 2005).

A SIRT1 regula processos como a produção de glicose e de insulina, metabolismo da gordura, e a sobrevivência celular, levando à especulação de que as sirtuínas podem mediar os efeitos de restrição calórica em mamíferos (GUARENTE; PICARD, 2005).

O resveratrol está ganhando grande importância, uma vez que possui ação preventiva de neoplasia, bem como atividades anticâncer em diversos sistemas biológicos (BISHAYEE, 2009). Stakleff et al. (2012) estudou o efeito do resveratrol em neoplasias de ovário em ratas, e observou efeito positivo desse fitoterápico *in vitro*, porém sem efeito *in vivo*.

Em outro estudo, devido ao seu efeito anti-proliferativo, o resveratrol foi usado em ratas com endometriose e apresentou resultados promissores para o tratamento dessa patologia que atinge grande número de mulheres no mundo todo (BRUNER-TRAN et al., 2011). Recentemente foi demonstrado que o resveratrol atua modulando a proliferação de células da teca (WONG et al., 2010), e seus análogos metilados possuem atividade biológica em células da granulosa de suínos (BASINI et al., 2010).

Em machos as ações inibitórias de análogos de resveratrol sobre a esteroidogênese em células de Leydig indicam novos mecanismos de ação destes compostos, que podem ser de interesse terapêutico potencial suprimindo a ação androgênica quando necessária (SVECHNIKOV et al., 2009).

KYSELOVA et al. (2003) observaram que o resveratrol não altera o peso corporal, porém diminui o peso dos ovários no grupo tratado, sem apresentar qualquer efeito sobre a fertilidade *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, R. S. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies (review). **Anticancer Res.**, v. 24, p. 2783–840, 2004.
- ARABBI, R. P. Alimentos funcionais: aspectos gerais. **Nutrire: J. Soc. Brasileira Comida Nutr.**, São Paulo, v. 2, p. 87-102, jun., 2001.
- BAILE, C. A. et al. Effect of resveratrol on fat mobilization. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1215, p. 40-47, 2011.
- BASHO, S. M.; BIN, M. C. Propriedades dos alimentos funcionais e seu papel na prevenção e controle da hipertensão e diabetes. **Interbio**, v. 4, n. 1, p. 48-58, 2010.
- BASINI, G. et al. Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 54, p. 236-243, 2010.
- BAVARESCO, L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. **Drugs Exp.Clin.Res.** v. 29, p. 181-187, 2003.
- BORGES, V. C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: Waitzberg DL. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.495-509.
- BOWERS, J. L.. et al. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 141, p. 3657-3667, 2000.
- BURITI, F. C. A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP.
- CARDOSO, J. et al. **Uso de alimentos termogênicos no tratamento da obesidade**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro-Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.
- ESCRIVÃO, M. A. M. S. et al. Obesidade exógena na infância e na adolescência. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v. 76, Supl. 3, p. 305-310, 2000.
- GEHM, B. D. et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 14138-14143, 1997.
- GIULIANO, I. C. B. et al. Lípides séricos em crianças e adolescentes de Florianópolis. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 2, 2005.
- GUEDES, E. P. et al. Obesidade: etiologia. **Soc. Bras. Endoc. Met.**, v. 1, p. 10-18, 2005.

HENRY, L. A.; WITT, D. M. Effects of neonatal resveratrol exposure on adult male and female reproductive physiology and behavior. **Dev. Neurosci.**, v. 28, p. 186-95, 2006.

HENRY, L. A.; WITT, D. M. Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. **Horm. Behav.** v. 41, p. 220–228, 2002.

HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, p. 191-196, 2003.

HURSEL, R.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Thermogenic ingredients and body weight regulation. **International Journal of Obesity**, v. 34, p. 659-669, fev. 2010.

JAMES, P. et al. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. **Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil**, v. 11, p. 3-8, 2004.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, jul./set. 2008.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 243–261, 2008.

KYSELOVA, V. et al. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 30-39, 2003.

LAGOUGE, M. et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v. 27, p. 1109-1122, 2006.

LAMARÃO, R. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas de chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 257-269, mar./abr. 2009.

LIMA, M. T. R. et al. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis-and trans-piceid and cis-and trans-resveratrol) in Portuguese wines. **Journal of Agri-cultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 2666–2670, 1999.

OLIVEIRA, C. N.; COSTA, R. G.; RIBEIRO, R. L. Obesidade abdominal associada à fatores de risco à saúde em adultos. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 34-43, jan./jun. 2008.

PEREIRA, L. O. et al. Obesidade e suas implicações: ação da atividade física e controle nutricional. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Posto Alegre, v. 14, p. 9-17, 1999.

ROSA, E. C. et al. Obesidade visceral, hipertensão arterial e risco cárdio-renal: uma revisão. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 49, n.2, p. 196-204, abr. 2005.

STAKLEFF, K. S. et al. Resveratrol exerts differential effects *in vitro* and *in vivo* against ovarian cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.13, n. 4, p.1333, 2012.

SVECHNIKOV, K. et al. Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells *in vitro*. **J. Appl. Toxicol.**, v. 29, p. 673-80, 2009.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 26, n. 3, p. 589-595, jul./set. 2006.

WONG, D. H. et al. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 16, p. 251-259, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity. Geneva, 1998.

WU, J. M; et al. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). **Int. J. Mol. Med**, v. 8, p. 3-17, 2001.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito da suplementação com resveratrol sobre os órgãos reprodutivos em ratas Wistar obesas

Francielle Alves Caldato¹, Osimar Carvalho Sanches², Alessandra Melchert³, Caliê Castilho¹

¹Mestrado em Ciência Animal – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste) – Presidente

Prudente – SP - Brasil

²Medicina Veterinária – Universidade do Oeste Paulista (Unoeste) – Presidente Prudente – SP

- Brasil

³Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia (FMVZ)

– UNESP- Botucatu – SP - Brasil

Autor para correspondência calie@unoeste.br

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação com resveratrol sobre os órgãos reprodutivos (útero e ovários) de ratas Wistar com obesidade induzida por dieta palatável hiperlipídica (DPH). Foram estudadas 64 ratas Wistar, divididas em 4 grupos: Grupo Controle (G-CM n=16): animais alimentados com ração comercial LABINA[®] mais suplementação de placebo (0,5 mL de água deionizada, por meio de gavagem); Grupo Controle+Res (G-RM n=16): animais alimentados com ração comercial LABINA[®] mais suplementação com 30mg de resveratrol/Kg/dia diluídos em 0,5 mL de água deionizada, por meio de gavagem; Grupo Obeso (G-CO n=16): animais alimentados com dieta palatável hiperlipídica (DPH) mais suplementação de placebo; Grupo Obeso+Res (G-RO n=16): animais alimentados com DPH mais suplementação com 30mg de resveratrol/Kg/dia. Os animais receberam as dietas e suplementos durante 12 semanas (84 dias) e após o período experimental as ratas foram eutanasiadas e os órgãos (útero e ovários) retirados, pesados e processados para histologia. Pelos resultados obtidos concluímos que a suplementação com resveratrol aumenta a atividade ovariana evidenciada pelo aumento de CLs, bem como nos folículos ovarianos. No útero dos animais que receberam o resveratrol houve maior capacidade proliferativa demonstrada pela característica das NORs (regiões organizadoras de nucléolos) pequenas e em maior quantidade.

Palavras-chave : Obesidade, AgNOR, Corpo Lúteo, Folículo.

ABSTRACT

The present study assessed the effects of supplementation with resveratrol on the reproductive organs (uterus and ovaries) of female rats With diet-induced obesity palatable diet (DPH). We studied 64 Wistar rats were divided into 4 groups: control group (G-CM n = 16): animals fed with commercial feed supplementation Labina ® with placebo supplementation (0.5 mL of deionized water, through gavage); Control Group Res + (G-MR n = 16) animals fed commercial feed supplemented with more Labina ® 30 mg resveratrol / kg / day diluted in 0.5 ml deionized water by gavage; group O(G-CO n = 16): animals fed palatable diet (DPH) over placebo supplementation; group O + Res (G- RO n = 16): animals fed with DPH or supplemented with resveratrol 30mg / kg / day. The animals received the diets and supplements for 12 weeks (84 days) and after the experimental period, the rats were euthanized and organs (uterus and ovaries) were removed, weighed and processed for histology. From the results obtained we conclude that supplementation with resveratrol increases ovarian activity evidenced by increase of LCs, as well as in ovarian follicles. In the uterus, the animals that receiving resveratrol was demonstrated by the proliferative capacity characteristic of NORs smaller and in greater quantity.

Keywords: Obesity, AgNor, Corpus Luteum Follicle.

I. Introdução

Sobrepeso e obesidade são importantes problemas de saúde pública, presentes em todo o mundo e em todas as faixas etárias, e está associada a diversas doenças crônicas, como diabetes, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial (JAMES et al., 2004).

O resveratrol (trans-3, 5,4' -trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina, composto de polifenóis que ocorrem naturalmente em várias plantas, incluindo as uvas, frutos e amendoim.

Nas plantas, o resveratrol é sintetizado em resposta a um stress ambiental, tal como mecanismo de defesa contra fungos, infecções virais ou bacterianas, radiações UV, variações de temperatura e exposição ao ozônio (WU et al., 2001). O resveratrol tem sido proposto como composto de ação anti-obesidade e parece ter efeitos na restrição de energia, levando à redução da gordura corporal e aumentando a sensibilidade à insulina (LAGOUGE et al., 2006; BAILE et al., 2011). Atua, também, como agente quimioprotetor, anti-inflamatório e antioxidante (FRÉMONT, 2000).

Além disso, o resveratrol é um fitoestrógeno que atua como agonista de estrógenos pela ligação aos receptores α e β (BOWERS et al., 2000), e estruturalmente é semelhante aos estrogénios sintéticos, tais como DES (dietilestilbestrol) e 17 β -estradiol benzoato (GEHM et al., 1997). Recentemente foi demonstrado que o resveratrol atua modulando a proliferação de células da teca (WONG et al., 2010).

Sendo assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos da suplementação com resveratrol sobre os órgãos reprodutivos (útero e ovários) de ratas Wistar com obesidade induzida por dieta palatável hiperlipídica (DPH).

II. Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) protocolo nº1223 da Universidade do Oeste Paulista na cidade de Presidente Prudente, Oeste do estado de São Paulo (Latitude 22° 07' S e Longitude 51° 23') no período de Agosto a Novembro de 2012. Foram utilizadas 64 ratas Wistar adultas, com 60 dias de idade e peso corporal entre 200 e 250 g, no início do experimento. As ratas foram alojadas em caixas plásticas, com dimensões de 41x 34x 17,5 numa densidade de quatro ratas por caixa e mantidas no Biotério de Experimentação do Campus II da Unoeste, com livre acesso a água e

alimento, sob fotoperíodo de 12 horas com ciclos claro/escuro, temperatura média de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 12 semanas, sendo realizada a eutanásia ao final do experimento.

Delineamento experimental. Os animais receberam dietas específicas durante 12 semanas. Nas 6 primeiras semanas do experimento as ratas foram divididas em 2 grupos de 32 animais cada e receberam dois tipos de dieta (Magro – ração comercial; Obeso – ração hiperlipídica) e nas últimas 6 semanas foram divididos em quatro grupos de 16 animais cada com os seguintes grupos:

- **Grupo Controle Magro (G-CM):** animais alimentados com ração comercial Labina[®] (Purina) “*ad libitum*”, mais suplementação diária de placebo (0,5 mL de água filtrada) em dose única por gavagem, sempre no mesmo horário, às 11 horas.

- **Grupo Resveratrol Magro (G-RM):** animais alimentados com ração comercial Labina[®] (Purina) “*ad libitum*”, mais suplementação diária de resveratrol na dose de 30 mg/kg/dia diluídos em 0,5 mL de água filtrada naturais (GOLDBERG et al., 1996; ZAMORA et al., 2008; ALBERDI et al., 2011). O resveratrol (em pó) foi obtido de fonte comercial de produtos em dose única, por gavagem sempre no mesmo período do dia, às 11 horas da manhã.

- **Grupo Controle Obeso (G-CO):** animais alimentados com dieta hiperlipídica, previamente descrita e utilizada por Estadella et al., (2004) que consiste em uma mistura hipercalórica, normoproteica e hiperlipídica contendo ração comercial LABINA[®], amendoim torrado, chocolate ao leite e bolacha maisena na proporção 3: 2: 2: 1, administrada *ad libitum*. Esta dieta apresenta a seguinte composição: 15% de proteínas, 47% de lipídios e 38% de carboidratos (Menezes, 2010), mais suplementação diária de placebo (0,5 mL de água filtrada) em dose única, por gavagem sempre no mesmo horário, às 11 horas.

- **Grupo Resveratrol Obeso (G-RO):** animais alimentados com dieta hiperlipídica descrita no Grupo G-CO, mais suplementação diária de resveratrol descrita no Grupo G-RM.

Ao final do experimento foi realizada colheita de sangue por punção cardíaca após anestesia geral dos ratos com a associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil[®]) na dose de 30 mg/kg e tiopental sódico (Thiopentax[®]) na dose de 60 mg/kg (KANASHIRO & CASSU., 2002). O sangue foi colhido em tubos a vácuo com heparina e centrifugado por 15 minutos a 750g para obtenção do plasma que foi armazenado a -20°C para posterior dosagem de progesterona (P4) pelo método de radioimunoensaio (RIA). A dosagem de P4 foi realizada no laboratório de Endocrinologia da UNESP Campus de Araçatuba-SP utilizando “kit” comercial (coat-a-count, Diagnostic Products Corporation, CA, USA).

Amostras de ovário e útero foram fixadas em solução de Davidson durante 24 horas em seguida foram processadas de acordo com a técnica de rotina histopatológica para inclusão em parafina. Cortes com 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, depositados em lâminas e em seguida permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas para fixação dos cortes à lâmina, e em seguida as mesmas foram cortadas pelos métodos da Hematoxilina e Eosina (H/E, MICHALANY, 1998), e AgNOR todo o processo foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica da Unoeste.

Técnica da AgNOR

A técnica empregada foi descrita por Ploton (1986), com adaptações por Sanches (2010). Os cortes foram desparafinizados, hidratados em série alcoólica decrescente e lavados em água destilada e deionizada. A solução à base de nitrato de prata para uso foi constituída de uma parte da solução A (1g de gelatina incolor, 0,5mL de ácido fórmico e 50 mL de água deionizada) e 12,5 g de nitrato de prata e 25 mL de água deionizada (Solução B), sendo uma parte de solução A e duas partes de solução B.

Para se evitar o aparecimento de precipitados de gelatina sobre as células, que pode mimetizar as NORs, filtrou-se a solução corante antes de colocar as lâminas para

incubar. Em seguida o material foi incubado em solução contendo nitrato de prata a 60°C, em câmara úmida ao abrigo da luz por 30 minutos. Quando as amostras apresentaram coloração marrom- escura, retirou- se da solução corante e lavou- se as lâminas em água deionizada a 45°C, para retirar o precipitado formado pela gelatina. Após este processo as lâminas foram imersas em solução de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos, com a finalidade de retirar a prata reduzida depositada sobre as células. Em seguida, realizou- se o processo de desidratação e montagem das lâminas.

Avaliação quantitativa das NORs

A avaliação quantitativa das NORs seguiu a metodologia descrita por Lohr et al., (1997), onde contou-se as NORs por núcleo em 100 células epiteliais, em dez campos microscópicos aleatórios utilizando- se a objetiva de 100x, fazendo- se a média das NORs por amostra.

Os folículos foram classificados como primordial e primário pela presença de um oócito rodeado por uma única camada de células da granulosa, escamosas ou cubóides, respectivamente, os folículos secundários foram identificados como tendo mais de uma camada de células da granulosa sem antro visível. Folículos terciários ou antrais possuíam pequenas áreas de fluido folicular (antro) ou um único espaço antral grande.

Nas camadas celulares do endométrio utilizou- se a técnica de HE. Os cornos uterinos foram emblocados e seccionados de modo longitudinal no sentido ápice do corno, e foram escolhidos 10 campos, de forma linear, nos quais a altura de endométrio foi obtida em microscópio óptico acoplado ao sistema digitalizador com o programa Motic Images Plus (version 2.0).

A proliferação do endométrio também foi avaliada através de medidas e quantificação das NORs mediante impregnação dos cortes histológicos de útero pela prata

(Ag) segundo a técnica descrita por Ploton et al., (1986), adaptada por Sanches et al. (2010). Após 24 h na solução de Davidson os órgãos foram lavados para retirada do fixador e transferidos para uma solução de álcool 70% e, posteriormente, desidratadas em soluções alcoólicas crescentes (álcool 80%,96% e 100%). Para a coloração foi utilizado uma mistura de solução aquosa de nitrato de prata a 50% com solução de ácido fórmico a 1%, contendo 2% de gelatina microbiológica incolor. A incubação foi feita em câmara úmida e escura a 37°C por 20 minutos. Em uma secção histológica foram quantificadas e medidas as NORs, bem como área e perímetro celular do endométrio de 10 células em 10 campos, totalizando 100 células. As análises morfométricas foram realizadas em objetiva de 100x em microscópio de luz acoplado ao sistema digitalizador de imagens Motic Images Plus (version 2.0). Foram incluídas na contagem das NORs, os núcleos que se encontravam individualizados como pontos pretos e quando se apresentavam agrupados eram registrados como um único NOR, conforme descrito por CROCKER et AL; (1989).

Para verificar se os parâmetros aferidos diferiram entre grupos recorreu-se ao teste de análise de variância em uma via (ANOVA *one-way*) com contrastes pelo teste de Tukey. Para as variáveis que apresentaram violação no pressuposto de homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene, empregou-se ANOVA com correção de Welch e contrastes pelo método de Games-Howell. Todas as análises foram realizadas com auxílio do Programa SPSS for Windows® v. 13.0, seguindo-se as recomendações de FIED, (2009). O nível de significância adotado foi de 5%.

III. Resultados

Na tabela 1 estão demonstrados os valores obtidos do peso dos ovários, bem como a quantidade das estruturas ovarianas Corpus Lúteos (CL) e folículos e a concentração plasmática de Progesterona (P4). O peso dos ovários no G-RM foi significativamente

($p < 0,05$) superior aos outros grupos (G-CM, G-CO e G-RO) e a quantidade média de Corpos Lúteos (CL) no grupo G-RM também foi superior ($p < 0,05$) aos grupos G-RO e G-CO e não diferiu do G-CM. A média de folículos primários no G-RO foi superior ($p < 0,05$) aos demais grupos (G-CM, G-CO e G-RM). Com relação aos folículos secundários e terciários, o G-RO apresentou média maior ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos G-CM, G-CO e não diferiu estatisticamente do grupo G-RM.

Os valores demonstrados na tabela 2 mostram que o peso do útero e altura do endométrio não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos (G-CM, G-CO, G-RM e G-RO). Por outro lado, o número de NORs por núcleo celular diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os grupos, sendo maior no G-RO, seguido por G-RM, G-CO e G-CM. A área dos NORs, o Perímetro de NORs no G-CM foi significativamente ($p < 0,05$) maior que nos grupos G-CO, G-RM e G-RO, os quais foram iguais. A área do nuclear no G-RO foi maior ($p < 0,05$) que nos grupos G-CM e G-CO e não diferiu do G-RM, já o perímetro do núcleo celular no grupo G-RO foi significativamente ($p < 0,05$) maior que nos outros grupos (G-CM, G-CO e G-RM).

IV. Discussão

A fase do ciclo estral foi determinada pela concentração plasmática de P4 nos grupos G-CO, G-CM e G-RO, aliada as características histológicas do endométrio em todos os grupos G-CO, G-CM, G-RM e G-RO. Portanto foram utilizadas fêmeas em metaestro e diestro, fases progesterônicas.

Nos grupos que foi dosado P4, não houve diferença significativa na concentração desse hormônio, sendo que no G-CM 100% (14/14) das amostras dosadas apresentaram concentração plasmática maior que 4,2 ng/mL, igualmente no G-CO 100% (12/12) e no G-RO das 15 amostras analisadas 93,3% foram maiores que 6 ng/mL e apenas 1 apresentou 2,88 ng/mL. Em ratas ciclando normalmente, a concentração de progesterona foi menor no estro $2,7 \pm 1,1$ quando comparada ao restante do ciclo $7,7 \pm 4,1$ a $12,6 \pm 3,0$ ng/mL (LU et al.,

1979). Em outro estudo visando avaliar o efeito do hipertireoidismo sobre os ovários e concentração de esteróides ovarianos em ratas Wistar, a concentração plasmática de progesterona, em estágio aleatório do ciclo estral, nas ratas controle variou de $21,08 \pm 13,84$ a $30,08 \pm 9,49$ ng/mL e não diferiu do grupo hipertireoideo (SERAKIDES et al., 2001), isso demonstra a presença de sincronia do ciclo estral quando as fêmeas são mantidas juntas.

Nos animais restantes para completar o n de cada grupo (n=16), assim como amostras do grupo G-CM, utilizou-se como parâmetro o peso e aparência do órgão, presença ou não de líquido no lúmen uterino observado no momento de dissecação e características histológicas. Não houve diferença ($p > 0,05$) na altura de endométrio, nem tampouco no peso do útero entre os grupos avaliados. No metaestro há continuação da degeneração do epitélio endometrial que é intensa no estro e retorno da atividade mitótica, com ambos, atividade mitótica e degeneração, vistos juntos. No diestro o útero se caracteriza por apresentar tamanho pequeno, avascular, lúmen fechado e revestido por epitélio colunar. Inicialmente poucas mitoses, mas com algum aumento durante esta fase. Apenas ocasional degeneração celular e edema estromal no final do diestro (WESTWOOD, 2008).

A quantidade de CLs foi maior ($p < 0,05$) no grupo G-RM o que justifica o peso maior ($p < 0,05$) dos ovários neste grupo, indicando que ratas magras com suplementação de resveratrol exibem maior atividade ovariana.

Houve aumento significativo na quantidade de folículos primordiais nos grupos G-RM e G-RO, o aumento desses folículos não era esperado, pois em mamíferos, o início da foliculogênese/oogênese ocorre na fase fetal. As oogônias diferenciam-se em oócitos, os quais, associados com as células da granulosa, constituem os folículos primordiais. Os oócitos iniciam o processo de divisão meiótica, o qual se interrompe na prófase da meiose I, no estágio de diplóteno. A meiose somente é retomada na puberdade e perdura até o final da fase reprodutiva das fêmeas (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). Esse paradigma da biologia

feminina perdura desde 1870 (BYSKOV et al., 2005), no entanto um grupo de pesquisadores da Universidade de Harvard colocou essa teoria em xeque quando sustentou a idéia de neofoliculogênese pós natal, em algumas situações, a partir de células tronco (JOHNSON et al., 2004; 2005).

Quanto ao número de folículos primários o grupo G-RO foi superior ($p < 0,05$) aos grupos G-CM, G-CO e G-RM. Em trabalho recente o uso de resveratrol não restabeleceu a reserva ovariana de folículos primordiais, mas aumentou folículos primários e em crescimento no grupo de ratas idosas tratadas com resveratrol, melhorou a fertilidade dessas fêmeas, as quais foram capazes de produzir ninhadas iguais às fêmeas jovens (LIU et al., 2013). Já nos folículos secundários o grupo G-RO foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos G-CM e G-CO, mas não difere de G-RM; G-RM não difere dos grupos G-CM e G-CO. Nos folículos terciários G-RM e G-RO foram superiores ($p < 0,05$) aos outros grupos G-CM e G-CO, mas diferiram entre si, enquanto que os grupos G-CM e G-CO, e G-RM não diferiram entre si.

Pra avaliar a proliferação do endométrio foi utilizada a técnica de AgNOR. As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são definidos como componentes do nucléolo, os quais contêm os genes ribossomais e um conjunto de proteínas arginofílicas, que seletivamente coradas pelos métodos de prata. Depois corados pela prata as NORs podem ser facilmente identificados como pontos escuros localizados exclusivamente na área nucleolar e são chamados de “AgNORs” (TRÈRE, 2000). O interesse por esta técnica aumentou no final da década de 1980 após a observação que as células malignas frequentemente apresentavam maior quantidade de AgNOR em comparações células benignas ou normais (DERENZINI; PLOTON, 1991; DERENZINI et al., 1994).

O número de AgNORs foi maior no G-RO, seguido por G-RM, G-CO e G-CM. A área e o perímetro dos AgNORs no G-CM foram maior que nos outros grupos. A área

do núcleo celular no G- RO não diferiu do G- RM e o perímetro do núcleo celular no G- RO foi significativamente ($p < 0,05$) maior que nos outros grupos. A quantidade de proteína AgNOR representa um parâmetro importante da cinética celular, sendo significativamente associada com a rapidez de duplicação celular (revisado por TRÈRE, 2000). Demonstrando, portanto, que nos grupos tratados com resveratrol houve maior proliferação celular. Provavelmente esse resultado é devido ao resveratrol atuar como agonista do estradiol (GEHN et AL., 1997) e sabe-se que esse hormônio induz a proliferação do endométrio.

Pelos resultados obtidos concluí-se que o peso do útero, e a altura do endométrio não sofreram alterações tanto com a suplementação com resveratrol quanto sem esta. Mas houve aumento da atividade ovariana evidenciada pelo aumento de CLs no grupo G-RM, bem como aumento na população de folículos ovarianos dos grupos G-RM e G-RO.

No útero dos animais que receberam o resveratrol houve maior capacidade proliferativa demonstrada pela característica das NORs, que aumentaram em quantidade e diminuíram em área, indicando assim o aumento da proliferação celular, e esta é proporcional a síntese de proteína.

Referências

ALBERDI, G., RODRÍGUEZ,V., MIRANDA,J., MACARULLA,M., ARIAS,N., LACUEVA,A., PORTILLO,M. Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. **Nutrition & Metabolism**, v.8, p.29, 2011.

BAILE, C.A., YANG, J.Y., RAYALAM,S., HARTZELL,D.L., LAI, C.Y., ANDERSEN, C. et al: Effect of resveratrol on fat mobilization. **Ann N Y Acad Sci**, v.1215, p.40-47, 2011.

BASINI,G., TRINGALI,C., BAIONI,L., BUSSOLATI,S., SPATAFORA,C., GRASSELLI,F. Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, p.236-243, 2010.

BOWERS,J.L., TYULMENKOV,V.V., JERNIGAN,S.C., KLINGE,C.M. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**. Oct; v.14,1p.3657-67, 2000.

BYSKOV,A.G., FADDY,M.J., LEMMEN,J.G., ANDERSEN,C.Y. Eggs forever? **Differentiation**, v.73, p.438-46, 2005.

CROCKER,J., BOLDY,D.A., EGAN,M.J. How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. **J Pathol**. Jul; v.158, p.185-8, 1989.

ESTADELLA,D., OYAMA,L.M., DÂMASO,A.R., RIBEIRO,E.B. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v.20, p.218-224, 2004.

FIED,A. **Descobrimo a estatística usando o SPSS**. 2ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2009.

FRÉMONT,L. **Biological effects of resveratrol**. Life Sci, v.66, p.663-673, 2000.

GEHM,B.D., MCANDREWS,JM., CHIEN,P.Y., JAMESON,JL.: Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p.14138-14143, 1997.

GOLDBERG,D.M.N.G., YAN,J., KARUMANCHIRI,A. Regional differences in resveratrol isomer concentrations of wines from various cultivars. **Journal of Wine Research**, v.7, p.13-24, 1996.

JAMES,P., RIGBY,N., LEACH,R., FORCE, I.O.T. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil**, v.11, p.3-8, 2004.

JOHNSON, J., BAGLEY, J., SKAZNIK-WIKIEL, M., LEE, H.J., ADAMS, G.B., NIIKURA, Y., et al. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. **Cell**; v.122, p.303-15, 2005

JOHNSON,J., CANNING,J., KANEKO,T., PRU,J.K., TILLY,J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**; v.428, p.145-50, 2004.

KANASHIRO,G.P., CASSU,R.N. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade SF, editor. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3^a ed., São Paulo: Rocca; p. 727-46, 2002.

LAGOUGE,M., ARGMANN,C., GERHART-HINES,Z., MEZIANE,H., et al; Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v.27, p.1109-1122, 2006.

LU,K.H., HOPPER,B.R., VARGO,T.M., YEN,S.S.C. Chronological Changes in Sex Steroid, Gonadotropin and Prolactin Secretion in Aging Female Rats Displaying Different Reproductive States. **Biology of Reproduction**, v.21, p.193-203, 1979.

MENEZES,E.F. Efeito da indução de obesidade pela dieta de cafeteria a partir dos 21 dias de idade sobre a estrutura e o desenvolvimento folicular de ratas Wistar. 55f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Biológicas). **Instituto de Ciências Biológicas da Saúde. Universidade Feredarl do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre. 2010.

MICHALANY,J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. 1^a ed., São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária; p.277, 1998.

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nuclear organizer regions at the optical level. **Histochem. J.** v.18, p.5-14, 1986.

SANCHES,O.C. Quantificação dos mastócitos nas neoplasias mamárias malignas de cadelas: análise histopatológica, histoquímica e imunohistoquímica. 83f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu. 2010.

SERAKIDES, R., NUNES,V.A., NASCIMENTO,E.F., RIBEIRO,A.F.C., SILVA,C.M. Foliculogênese e Esteroidogênese Ovarianasem Ratas Adultas Hipertireóideas. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.45, p.258-264, 2001.

VAN DEN HURK,R., ZHAO,J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**; v.63, p.1717-51, 2005.

WESTWOOD,F.R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicol Pathol**, v.36, p.375, 2008.

WONG,D.H., VILLANUEVA,J.A., CRESS,A.B., DULEBA, A.J. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. **Mol Hum Reprod**, v.16, p.251-259, 2010.

WU,J.M., WANG,Z.R., HSIEH,T.C., BRUDER,J.L., ZOU,J.G.E., HUANG,Y.Z. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). **Int.J.Mol.Med.** 8, 3-17, 2001.

ZAMORA-ROS,R., ANDRES-LACUEVA,C., LAMUELA-RAVENTÓSR., BERENQUER,T. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: **European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort.** **Br J Nutr.**, v.100, p.188-196, 2008.

Tabela 1. Média \pm desvio padrão da média do peso do ovário (g), concentração plasmática de progesterona (ng/mL), quantidade de corpos lúteos e folículos ovarianos obtidos de ratas Wistar suplementadas ou não com resveratrol nos grupos G-CM (Controle Magro), G-CO (Controle Obeso), G-RM (Resveratrol Magro) e G-RO (Resveratrol Obeso).

	G-CM	G-CO	G-RM	G-RO
Ovário (g)	0,14 \pm 0,01a	0,13 \pm 0,02a	0,16 \pm 0,01b	0,14 \pm 0,02a
Progesterona (ng/mL)	11,92 \pm 10,80a	15,25 \pm 8,22a	18,80 \pm 9,39a
Corpo Lúteo	2,66 \pm 0,63ab	1,87 \pm 0,80a	3,2 \pm 0,8b	2,00 \pm 1,20a
Folículo Primordial	11,81 \pm 3,46a	12,12 \pm 3,70a	19,44 \pm 4,81b	22,5 \pm 4,35b
Folículo Primário	7,75 \pm 2,67ac	9,06 \pm 2,46a	5,87 \pm 2,12ac	14,62 \pm 4,24b
Folículo Secundário	5,56 \pm 2,39a	6,81 \pm 3,20a	7,18 \pm 4,10ab	10,25 \pm 4,12b
Folículo terciário	5,06 \pm 2,79a	6,81 \pm 3,01ac	9,81 \pm 2,83bc	12,06 \pm 5,11b

Tabela 2. Média \pm desvio padrão da média do peso do útero (g), altura de endométrio (μm), quantidade média de NORs por célula, área das NORs (μm), área e perímetro da célula (μm), perímetro das NORs (μm) obtidos de ratas Wistar suplementadas ou não com resveratrol nos grupos G-CM (Controle Magro), G-CO (Controle Obeso), G-RM (Resveratrol Magro) e G-RO (Resveratrol Obeso).

	G-CM	G-CO	G-RM	G-RO
Útero (g)	0,54 \pm 0,14a	0,49 \pm 0,14a	0,56 \pm 0,24a	0,50 \pm 0,15a
Endométrio	573,88 \pm 184,36a	570,30 \pm 115,44a	630,70 \pm 171,24a	581,16 \pm 88,42a
(μm) Altura				
n^o NORs	3,81 \pm 2,60a	12,31 \pm 4,19b	19,50 \pm 6,88c	24,43 \pm 5,48d
Área NORs	189,46 \pm 99,45a	77,58 \pm 37,61b	47,28 \pm 14,67b	44,60 \pm 10,68b
(μm)				
Perímetro	64,78 \pm 31,04a	39,03 \pm 8,95b	34,15 \pm 15,47b	30,68 \pm 6,11b
NORs (μm)				
Área	2675,51	3031,16	3452,25	4098,36
nuclear (μm)	\pm	\pm	\pm	\pm
	774,86a	634,45ac	10,4bac	780,25b
Perímetro	227,00 \pm 36,29a	252,90 \pm 33,03a	260,60 \pm 50,88a	302,36 \pm 46,30b
nuclear (μm)				

ANEXO

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A revista [ABE&M](#) aceita contribuições em Endocrinologia Clínica e Básica e ciências afins, nas seguintes categorias: (1) Artigo Original, (2) Artigo de Revisão, (3) Apresentação de Caso Clínico, (4) Caso Especial, (5) Perspectiva, (6) Controvérsias, (7) Memórias, (8) Editoriais e (8) Cartas ao Editor.

Os manuscritos (MS) devem ser redigidos em português ou inglês e estar de acordo com as instruções do Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas - International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), também conhecido como Normas de Vancouver.

Autoria

Todas as pessoas designadas como autores devem responder pela autoria do MS e ter participado suficientemente do trabalho para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo. O crédito de autoria deve ser baseado apenas por contribuições substanciais durante: (i) concepção, planejamento, execução, análise e interpretação dos resultados, (ii) redação ou revisão do MS de forma intelectualmente importante, e (iii) aprovação final da versão a ser publicada. A participação limitada à obtenção de fundos, coleta de dados, supervisão geral ou chefia de um grupo de pesquisa não justifica autoria.

Os Editores podem solicitar justificativa para a inclusão de autores durante o processo de revisão, especialmente se o total de autores exceder a seis. Os autores devem explicitar se há ou não potencial conflito de interesse, informação que deve ser incluída na seção Agradecimentos.

Os conceitos e os fundamentos epistemológicos, os dados, as experiências, as fontes de pesquisa e as conclusões emitidos nos trabalhos assinados são da inteira responsabilidade do(s) seu(s) autor(es). Os trabalhos submetidos ao ABE&M serão passíveis de revisão linguística por revisores e relatores qualificados pelo Conselho Editorial, sem perda do crédito de autoria e do vínculo de responsabilidade do autor em relação à obra de criação intelectual.

Submissão dos artigos

A partir de 1 de janeiro de 2009, toda submissão de manuscrito (MS) deverá ser realizada por meio eletrônico através do endereço <http://www.abem-sbem.org.br>. O MS deve estar em formato Word (arquivo.doc) com opção de inclusão de arquivos suplementares. Todo artigo deve destinar-se exclusivamente para a revista ABE&M.

Processo de avaliação

Todos os MS submetidos aos ABE&M que estiverem de acordo com as "Instruções para Autores" e com a política editorial da revista, são analisados pelo Conselho Editorial para avaliar seu mérito e adequação científica.

Aprovados nesta fase, o MS é encaminhado aos avaliadores de reconhecida competência no assunto para seu parecer (*peer review*), cujo anonimato é garantido durante todo o processo de julgamento. A decisão final sobre a aceitação ou rejeição do MS é tomada pelos Editores

Manuscritos aceitos

Todo o MS publicado torna-se propriedade da revista "Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia" e não poderá ser reproduzido, republicado ou divulgado por meio eletrônico sem autorização. Os autores após a aceitação do seu artigo para publicação, transferem implicitamente seus direitos aos ABE&M.

Por razões editoriais, os Editores reservam-se o direito de proceder a pequenas modificações gráficas ou redacionais no texto, sem interferir em seu conteúdo.

Elaboração dos Manuscritos

1. ARTIGO ORIGINAL

É uma contribuição científica destinada a divulgar resultados de pesquisa original que não tenha sido publicada ou submetida em outros meios de divulgação. O MS deve ser digitado em espaço duplo, formatado em papel carta (216 x 279 mm) ou A4 (212 x 297 mm) com pelo menos 2,5 cm de margens de cada lado. Cada uma das seguintes seções deve ser iniciada em uma nova página: (A) Página título, (B) Resumo e Descritores, (C) Abstract (resumo em inglês) e Keywords, (D) Texto completo, (E) Agradecimentos, (F) Referências, (G) Tabelas (cada uma com título e rodapé), (H) Legendas das figuras e (I) Figuras. As páginas devem ser numeradas consecutivamente começando com a página título.

A. Página Título

Deve conter: (a) título do MS (em português e inglês), (b) nome e filiação institucional de todos os autores, (c) nome do(s) Serviço(s) e/ou Departamento(s) e Instituição(ões) onde o trabalho foi realizado, (d) nome e endereço completo (incluindo e-mail) do(a) autor(a) responsável pela correspondência, (e) "título abreviado", com até 40 caracteres (incluindo espaços entre palavras).

B/C. Resumo e Abstract

A segunda página deve conter um Resumo semi-estruturado do trabalho (contendo: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões), com até 150 palavras.

Em página separada, apresentar o *Abstract*, que deve ser a tradução fiel do resumo para o idioma inglês.

Ao final do Resumo e do *Abstract* devem ser fornecidos 4 a 6 descritores do MS (e *keywords* correspondentes), para facilitar sua indexação posterior.

Estes descritores devem estar de acordo com os padrões do Index Medicus, que podem ser consultados no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>.

D. Texto

Deve ser dividido nas seguintes seções: (I) Introdução, (II) Métodos, (III) Resultados e (IV) Discussão.

I. Introdução: deve conter o propósito do trabalho, resumizando os motivos do estudo e relevância científica. A revisão do assunto deve ser sucinta e evitar a inclusão de resultados ou conclusões do estudo a ser apresentado.

II. Métodos: deve conter uma descrição do modelo experimental empregado (pacientes ou animais de laboratório) com indicação de que o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital ou Instituição de Pesquisa onde o estudo foi realizado, seguindo a Declaração de Helsinque e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea).

Descrição dos métodos empregados citando os principais aparelhos e equipamentos utilizados (nome do fabricante e/ou origem do material entre parênteses) com detalhes técnicos suficientes dos procedimentos que possam permitir a reprodução do estudo apresentado. Métodos amplamente estabelecidos podem ser citados através de referências. Os métodos estatísticos devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a verificação dos resultados àqueles que tiverem acesso.

III. Resultados: devem ser apresentados em seqüência lógica no texto, evitando repetir dados apresentados em tabelas ou figuras; somente as observações importantes devem ser enfatizadas.

Unidades de Medidas - As medidas e as respectivas abreviaturas devem obedecer a Unidade do Sistema Internacional (SI, <http://physics.nist.gov/cuu/Units>). As medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser relatadas em unidades do sistema métrico (metro, quilograma, litro) ou seus múltiplos decimais; temperaturas em graus centígrados (°C); pressão arterial em milímetro de mercúrio (mmHg) e os valores hematimétricos e químicos devem ser fornecidos no sistema métrico tradicional.

IV. Discussão: deve comentar os aspectos novos e importantes obtidos do estudo em relação ao acervo da literatura disponível. Ainda nessa seção devem-se focalizar as conclusões obtidas. Evitar repetir resultados ou informações já apresentadas em outras seções. Deve-se ressaltar as implicações dos achados, suas limitações e mesmo recomendações para estudos futuros.

E. Agradecimentos

Em nova página, incluir: (i) contribuições que necessitem agradecimentos, mas não justifiquem autoria, (ii) agradecimentos a auxílio técnico, financeiro e material, incluindo auxílio governamental e/ou de laboratórios farmacêuticos, e (iii) Conflito de Interesse (inclusão obrigatória): descrever as colaborações

financeiras que possam representar potencial conflito de interesse e/ou declarar a inexistência de conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade do trabalho científico.

F. Referências (máximo de 40 para artigo original)

Devem ser numeradas consecutivamente em ordem de aparecimento no texto e identificadas por numerais arábicos entre parênteses, conforme o exemplo: "Houve uma atualização da medicina molecular (3), seguida de avanços na área de genética aplicada (4-6), que ...".

Quando houver referências em tabelas e figuras deverá obedecer à ordem correspondente à localização onde as tabelas e figuras estão mencionadas no texto.

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus e seguindo o formato de citação recomendado pelo [ICMJE](#).

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do autor.

Trabalhos aceitos, mas ainda não publicados, podem ser incluídos, fornecendo-se o nome do periódico seguido do ano e da informação: (no prelo). Deve-se evitar a citação de resumos apresentados em congressos.

Recomendamos a utilização de programas de editoração de referências bibliográfica (por exemplo, EndNote, Reference Manager) selecionando-se a opção de estilo Vancouver.

Alguns exemplos:

Artigo em Revistas (listar todos os autores, mas se o número exceder seis, acrescentar: et al.):

Suszko MI, Lo DJ, Suh H, Camper SA, Woodruff TK. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter by activin. *Mol Endocrinol*. 2003;17(3):318-32.

Thomas TZ, Wang H, Niclasen P, O'Bryan MK, Evans LW, Groome NP, et al. Expression and localization of activin subunits and follistatins in tissues from men with high grade prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(11):3851-8.

Artigo eletrônico na Internet publicado antes da versão impressa:

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood*. 2002;100(10):3828-31. Epub 2002 Jul 5.

Artigo eletrônico na Internet sem versão impressa:

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an

advisory role. Am J Nurs. [serial on the Internet]. 2002 [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:

<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Capítulo de Livro:

Conte FA, Grumbach MM. Abnormalities of sexual determination and differentiation. In: Greenspan FS, Gardner DG, editors. Basic & clinical endocrinology. 6th ed. New York:McGraw-Hill; 2001.p.509-46.

Livro:

Leder P, Clayton DA, Rubenstein E. Introduction to molecular medicine. New York: Scientific American; 1994.

Base de dados na Internet:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from:

http://www.nlm.nih.gov/archive//20061212/mesh/jablonski/syndrome_title.html

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>
Files updated weekly

G. Tabelas

Cada tabela deve ser apresentada em folha separada, digitada em espaço duplo e numerada em arábico, conforme seu aparecimento no texto; deve conter um título breve na parte superior e as explicações, legenda e estatística indicadas adequadamente no rodapé.

H/I. Figuras e Legendas

As figuras deverão ser preparadas originalmente em arquivo TIFF (*Tagged Image File Format*) ou EPS (*Encapsulated PostScript*) ou GIF (*Graphics Interchange Format*). As letras, os números e os símbolos inseridos nas figuras devem ser claros e de tamanho suficiente para serem legíveis, mesmo após redução substancial para publicação. Os títulos e legendas das figuras devem ser fornecidos em folha separada, e nunca na própria figura.

Por ocasião da submissão inicial, as figuras poderão estar inseridas no arquivo Word ou PowerPoint, no entanto, quando aceito o MS, deverão ser enviadas as figuras nos arquivos originais com resolução mínima de 300 dpi. A publicação padrão contempla somente duas cores (preto - vermelho) por isso devem ser evitadas figuras multicoloridas. A inclusão de figura colorida implicará no encargo financeiro (R\$ 900,00/cada figura) que será custeado pelo autor,

oportunamente solicitada pelo editor.

2. ARTIGO DE REVISÃO

Constitui uma avaliação crítica ampliada e sistematizada da literatura sobre determinado assunto, devendo conter os procedimentos adotados, esclarecendo a delimitação e os limites do tema, e finalizando com conclusões do autor. Os artigos desta categoria são encomendados pelos editores a autores com experiência comprovada na área. A revista não está aceitando a submissão artigo de revisão de material não encomendado (a partir de 1º de maio de 2008).

Deve apresentar Título (português e inglês), Título Resumido de até 40 caracteres, Resumo/Abstract (sem necessidade de estruturação), Descritores/Keywords, Texto (com ou sem subtítulos), Agradecimentos e Referências. As instruções gerais para a Página Título, Figuras/tabelas, Agradecimentos e Referências são as mesmas dos artigos originais.

As revisões não devem ultrapassar 30 laudas, incluindo o máximo de 60 referências e, as minirrevisões não devem ultrapassar 15 laudas com máximo de 20 referências. A menção de artigos previamente publicados na revista, assim como a inclusão de ilustrações do tipo tabelas, figuras, gráficos ou uma combinação destes são recomendadas. Mencionar a fonte e/ou solicitar autorização para utilização de figuras previamente publicadas.

3. APRESENTAÇÃO DE CASOS CLÍNICOS

Esta seção destina-se à publicação de casos clínicos interessantes e que apresentem alguma originalidade, curiosidade ou aspecto não convencional. Deverá mostrar aspectos clínicos, laboratoriais e evolutivos de interesse, devendo estar suficientemente documentados. As instruções gerais para a Página Título, Resumo/Abstract, Descritores/Keywords, Texto, Figuras/tabelas, Agradecimentos e Referências são as mesmas dos artigos originais.

4. CASO ESPECIAL

Nesta seção são contemplados casos de interesse didático especial, que tenham sido devidamente estudados e apresentados em reuniões clínicas de centros ou serviços de Endocrinologia reconhecidos nacionalmente. O MS deve incluir, necessariamente, o resumo do caso e a discussão geral do público presente naquela reunião, com nomes completos e titulações explicitados. O material deverá ser previamente editorado por um responsável pelo caso ou pela reunião científica. Os autores do MS devem limitar-se ao(s) apresentador(es) e discuidor(es) do caso, devendo constar data e local da apresentação e nome e endereço do(a) responsável pelo MS. Incluir Página Título, Resumo, *Abstract*, descritores e *keywords*, Agradecimentos e Referências.

5. PERSPECTIVAS

O propósito desta seção é servir como veículo de divulgação de novas idéias e conceitos em Endocrinologia, tanto na área básica, como na aplicada ou, ainda, na que trata de ensino e treinamento. Os artigos podem abranger: (a) ensaios interpretativos que utilizem dados de pesquisa próprios do(a) autor(a) para o

desenvolvimento de novas idéias, (b) propostas de pesquisa para estudos colaborativos entre diversos centros, (c) ensaios inovadores que tratem da inter-relação da Endocrinologia com outras áreas, (d) quadros da história da Endocrinologia Brasileira ou Internacional que incluam a análise crítica de eventos, figuras ou instituições. As instruções gerais são as mesmas dos artigos originais ou revisões.

6. CONTROVÉRSIAS

O objetivo desta seção é o de apresentar temas de Endocrinologia Clínica, especialmente no aspecto de diagnóstico e tratamento de doenças endócrinas da prática corrente, que não tenham conduta suficientemente uniformizada e que possam, portanto, apresentar diferentes opções de manuseio. Os MS apresentados nesta seção são encomendados pelos Editores a dois ou mais especialistas no assunto, que tenham necessariamente opiniões e/ou condutas diversas em relação ao tema escolhido.

7. MEMÓRIAS

Esta seção visa lembrar e homenagear pessoas, instituições e situações que foram importantes ou historicamente relevantes para a Endocrinologia, especialmente a brasileira. O MS pode ser submetido espontaneamente ou encomendado pelos editores aos autores que tenham tido maior convivência com a referida pessoa, lugar ou situação.

8. EDITORIAIS

Os editoriais são escritos ou encomendados pelos Editores, abordando temas diversos da especialidade e/ou relativos à revista, ou discutindo um ou mais artigos publicados naquele número da revista, e que apresentem interesse especial para os leitores. O autor do editorial deve ressaltar as contribuições do artigo apontado e comentar aspectos semelhantes eventualmente já publicados pela nossa revista em manuscritos anteriores, quando pertinentes. Os editoriais não devem ultrapassar 4 laudas, incluindo Agradecimentos e o máximo de 10 referências.

9. CARTAS AO EDITOR

Inclui cartas que visam a comentar ou a discutir artigos recentes publicados na revista ou relatar resumidamente pesquisas originais ou achados científicos significativos. Não devem ultrapassar 8 laudas, incluindo Agradecimentos e o máximo de 15 referências.