

POTENCIAL TERAPÊUTICO DA PLANTA MEDICINAL *Pterodon pubescens* SOBRE O REPARO ÓSSEO EM RATAS OSTEOPORÓTICAS

Júlia Constantino Camilli^{1*}, Catharina Nucci-Martins², Bruna Bighetto-Cain¹, Eduardo A. R. Socca³, José Angelo Camilli³, Wagner José Fávaro⁴.

1. Estudante de IC do Instituto de Biologia da UNICAMP

2. Doutoranda do IB-UNICAMP

3. Pesquisador do IB-UNICAMP

4. IB – UNICAMP – Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Orientador

Resumo:

A planta medicinal *Pterodon pubescens* tem sido utilizada empiricamente há muito tempo para tratamento da osteoporose, porém, a literatura carece de estudos científicos que comprovem esta atividade. O presente estudo pretende contribuir para o esclarecimento do potencial terapêutico da planta medicinal *Pterodon pubescens* no reparo ósseo em quadros de osteoporose por meio de um desenho experimental pré-clínico que investiga aspectos comportamentais, morfológicos e toxicológicos. Nossos resultados demonstram que o extrato etanólico de *Pterodon pubescens* (EPP) foi capaz de promover o reparo de um defeito femoral em osso osteoporótico, além de inibir a hiperalgesia mecânica (dor) sem causar efeitos colaterais de sedação e disfunção motora. Porém, as análises toxicológicas revelaram um potencial efeito hepatotóxico na dose de 100 mg/kg do EPP, que deve ser evitada. Assim, destacamos que o EPP (1-10 mg/kg) pode ser uma alternativa terapêutica útil no tratamento da osteoporose.

Autorização legal: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP: protocolo nº 4358-1.

Palavras-chave: Sucupira; Ovariectomia; Osteotomia.

Apoio financeiro: FAPESP; CAPES; CNPq; FAEPEX.

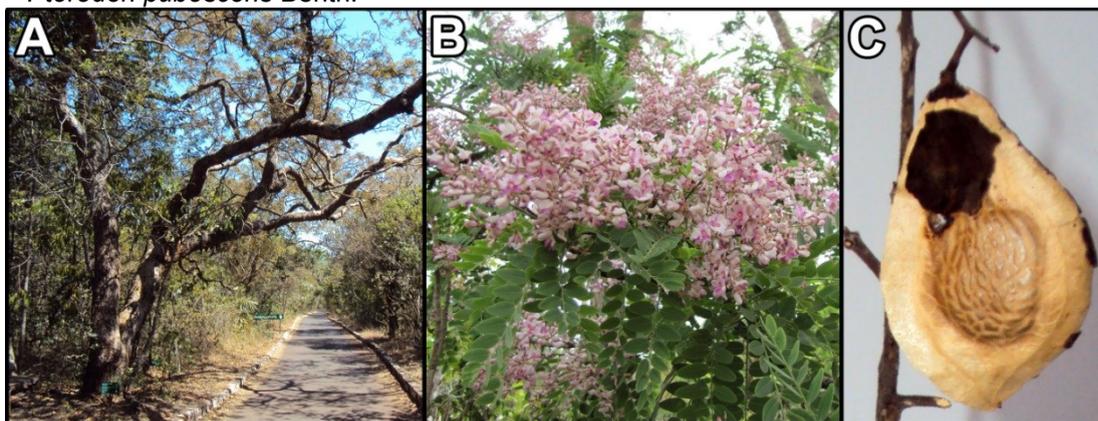
Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Introdução:

Osso, um tecido conjuntivo especializado, é continuamente remodelado/renovado de acordo com os eventos fisiológicos. O osso mineralizado velho é removido pelos osteoclastos e substituído por uma quantidade equivalente de nova matriz óssea pelos osteoblastos, a qual é então submetida à mineralização. Quando há um desequilíbrio contínuo na remodelação óssea em favor da reabsorção, ocorre uma perda cumulativa de massa óssea e enfraquecimento do esqueleto, o que pode levar a uma grande variedade de doenças que se relacionam à perda da massa óssea (RECKER et al., 2004). Neste contexto, a osteoporose ganha papel de destaque, pois é uma doença marcada pela perda progressiva da massa óssea e consequente fragilidade dos ossos, o que pode levar a fraturas graves e de difícil tratamento, sendo a causa mais comum de dores intensas prolongadas e incapacidade física que atinge milhares de pessoas em todo o mundo (OMS, 2003). O envelhecimento da população está aumentando a prevalência da osteoporose, principalmente em mulheres pós-menopausa, sendo comumente associada a um enorme fardo psicológico, social e econômico (REGINSTER; BURLET, 2006).

O tratamento da osteoporose é um importante desafio enfrentado pela medicina moderna. Os fármacos atualmente utilizados para o tratamento da osteoporose, ou possuem eficácia insatisfatória ou têm potencial para causar efeitos secundários graves no manejo clínico da osteoporose pós-menopausa (LUFKIN et al., 2004; MILLER, P. D.; DERMAN, 2010). Com isso, a busca por medicamentos mais eficazes e seguros, bem como novas abordagens para o tratamento da osteoporose, são urgentemente necessários.

A planta medicinal *Pterodon pubescens* (Fig.1), uma espécie arbórea nativa do cerrado brasileiro, conhecida popularmente por sucupira ou faveiro, parece ser uma ótima opção terapêutica, pois vem sendo utilizada empiricamente há muito tempo para o tratamento de doenças musculoesqueléticas, incluindo osteoporose. Porém, a literatura carece de estudos científicos que comprovem esta atividade. Assim, este estudo propõe-se a analisar o potencial dessa espécie vegetal na reparação óssea do fêmur de ratas osteoporóticas por meio de um desenho experimental pré-clínico que investigará aspectos comportamentais, morfológicos e toxicológicos.

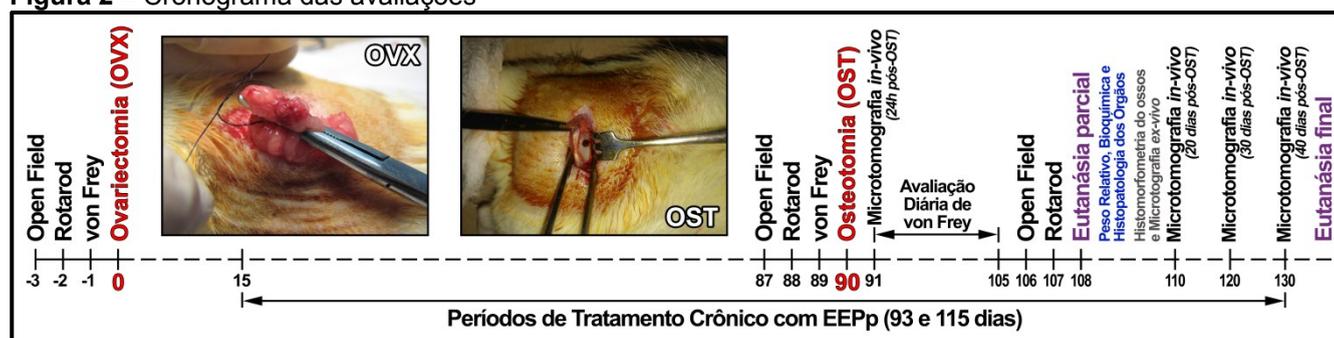
Figura 1 – *Pterodon pubescens* Benth.

(A) Árvore de *Pterodon pubescens* do Jardim Botânico de Brasília – DF, localizada em 15°52'1.01" S; 47°49'45.65" W. (B) Foto obtida na época de floração. (C) Fruto de *Pterodon pubescens*. Fonte: Adaptado de (NUCCI, 2014).

Metodologia:

O estudo foi realizado com 32 ratas Sprague-Dawley com 8 semanas de idade e aproximadamente 200 g. Todos os experimentos foram conduzidos somente após aprovação do protocolo n° 4358-1, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP. Os animais foram homogeneamente divididos em cinco grupos de 6-8 animais e a osteoporose foi induzida por ovariectomia bilateral (OVX) em todos os grupos (OVX, EEPp 1, 10 e 100 mg/kg), exceto nos animais do grupo Sham (falso-operado / sem retirada dos ovários). O extrato etanólico de *Pterodon pubescens* (EEPp) foi preparado como descrito em trabalhos anteriores (NUCCI et al., 2012; NUCCI-MARTINS et al., 2015) e os animais foram tratados diariamente, por via intragástrica (i.g.), com EEPp (1-100 mg/kg), por 93 dias consecutivos a partir do 15° dia após OVX, sendo que 3 animais por grupo tiveram o tratamento prolongado por 115 dias para acompanhamento do reparo ósseo por microtomografia *in vivo*. Os animais dos grupos OVX e Sham foram tratados com veículo (salina + 5% Tween 80) nos mesmos períodos. Para permitir o estudo do reparo ósseo em osso osteoporótico, foi realizada uma segunda cirurgia, uma osteotomia (OST) de 2,3 mm de diâmetro no fêmur direito das ratas osteoporóticas. As análises de microtomografia foram realizadas com dois aparelhos diferentes: Skyscan 1178 (Bruker), para acompanhamento *in vivo* do reparo ósseo por até 40 dias pós-OST; Skyscan de alta resolução 1272 (Bruker), para uma análise preliminar *ex vivo* dos fêmures dos animais controle doentes (OVX) em relação ao grupo controle saudável (Sham) para comparação da perda de massa óssea. Além disso, a dor dos animais foi avaliada antes e depois da osteotomia pelo teste de *von Frey* eletrônico, e as atividades locomotoras espontânea e forçada foram avaliadas pelos testes *Open-field* e *Rotarod*, respectivamente (Fig. 2).

Figura 2 – Cronograma das avaliações



Foram realizadas duas cirurgias: ovariectomia (OVX) bilateral (indução da osteoporose) e osteotomia (OST) femoral (indução de fratura para avaliação do reparo ósseo) e testes comportamentais para observação do quadro funcional clínico dos animais, tais como o teste de *von Frey* para verificação da hiperalgesia mecânica (dor) e testes de *Open-field* e *Rotarod* para verificação da atividade locomotora espontânea e forçada nos animais. A microtomografia foi realizada antes, durante e após a OST. Também foram realizadas histomorfometria dos fêmures e análises toxicológicas (peso relativo, cor, textura, bioquímica e histopatologia dos órgãos). Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Após a eutanásia dos animais, realizada por aprofundamento anestésico (xilazina e cetamina), os fêmures foram devidamente dissecados para realização de histomorfometria do defeito ósseo usando coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). Para análise toxicológica, foram realizadas histopatologia de alguns órgãos vitais (coração, pulmões, fígado, baço e rins), utilizando coloração de HE, e análise bioquímica com alguns marcadores séricos de lesão hepática e renal, tais como atividade das enzimas transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e gama glutamil transferase (GGT), e as concentrações séricas de creatinina e ureia através da utilização de kits comerciais específicos. Ademais, foi realizada uma avaliação macroscópica de cor, textura e peso relativo (CRUZ et al., 2006). Para a extração do peso relativo, foi calculado o arco-seno da razão peso corporal / peso órgão e extraída a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) desses dados (KYSELOVA et al., 2003). Em todas as análises, os valores de *P* foram considerados estatisticamente significantes apenas quando inferiores a 0,05 ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão:

Nossos resultados demonstraram que o EEPp é capaz de inibir a hiperalgesia mecânica, pelo teste de *von Frey*, apresentando efeito antinociceptivo significativo, com potência de inibição da resposta nociceptiva de $98 \pm 9\%$, $81 \pm 9\%$ e $87 \pm 4\%$, 1 hora após tratamento com o EEPp nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg, respectivamente. Este efeito durou até 4 horas após tratamento em todas as doses do extrato (EEPp 1, 10 e 100 mg/kg, i.g.), apresentando inibição de $43 \pm 4\%$, $40 \pm 2\%$ e $45 \pm 4\%$, respectivamente. Além disso, nos primeiros 9 dias de avaliação, a média de inibição da hiperalgesia mecânica foi de $70 \pm 5\%$, $72 \pm 7\%$ e $73 \pm 7\%$ para as doses de 1, 10 e 100 mg/kg, respectivamente. Ademais, no 15º dia, o extrato foi capaz de bloquear 100% da resposta nociceptiva causada pela OST, mostrando que o EEPp tem um importante efeito antinociceptivo sobre a hiperalgesia mecânica. Os resultados do teste de locomoção espontânea (*Open-field Test*) mostraram que o tratamento crônico com o EEPp (1-100 mg/kg, i.g.) não interfere na atividade locomotora dos animais, quando comparado com o controle OVX. Já o teste de locomoção forçada em cilindro giratório (*Rotarod Test*) mostrou recuperação significativa dos animais em todos os grupos tratados com o EEPp (1-100 mg/kg, i.g.), chegando a valores próximos ou ainda maiores que os níveis basais. Assim, podemos sugerir que o tratamento crônico com o EEPp (1-100 mg/kg, i.g.) não apresenta efeito colateral aparente sobre a locomoção dos animais. A microtomografia *in vivo* mostrou que o EEPp foi capaz de recuperar o defeito ósseo produzido no fêmur 40 dias após OST em 70%, 40% e 30% para as doses de 1, 10 e 100 mg/kg do EEPp, respectivamente. Corroborando com a literatura (EL KHASSAWNA et al., 2013), nossos dados da microtomografia *ex vivo* mostraram que os animais do grupo OVX (controle doente) tem uma perda de 14% do volume total de osso em comparação com os animais do grupo Sham (controle saudável). Além disso, a histomorfometria revelou que o tratamento crônico com o EEPp (1-100 mg/kg) foi capaz de regenerar a extensão do defeito ósseo em $89 \pm 3\%$, $79 \pm 6\%$ e $74 \pm 10\%$, para as doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente.

Um importante achado foi revelado nas análises toxicológicas. A avaliação macroscópica exibiu alterações de cor, textura e aumento significativo do peso relativo do coração ($6 \pm 1\%$), pulmões ($7 \pm 2\%$) e, principalmente, do fígado ($21 \pm 1\%$) nos animais tratados com a dose de 100 mg/kg de EEPp. Este dado, corroborou com a análise histopatológica do fígado, revelando uma hepatomegalia causada pelo tratamento crônico com a dose de 100 mg/kg de EEPp. Além disso, a análise bioquímica de um importante marcador de lesão hepática, a atividade da enzima GGT, mostrou um aumento de $15,7 \pm 1,8\%$ nos animais tratados com a dose de 100 mg/kg do EEPp. Assim, o conjunto de resultados das análises toxicológicas sugerem que a dose de 100 mg/kg de EEPp pode não ser segura para uso em tratamento crônico, devendo ser evitada.

Conclusões:

Os resultados deste estudo destacam a planta medicinal *Pterodon pubescens* como uma alternativa terapêutica útil para o reparo ósseo em quadros de osteoporose por apresentar efeito benéfico sobre a dor causada por microfraturas osteoporóticas espontâneas observadas no efeito antinociceptivo do EEPp verificado antes da OST e pela redução da dor após fratura de osso osteoporótico observada por até 15 dias após osteotomia. Além disso, o tratamento crônico com o EEPp não altera a atividade locomotora dos animais e tem um importante papel na regeneração de fraturas em osso osteoporótico. Porém, as análises toxicológicas indicam que a dose de 100 mg/kg do EEPp, quando administrada cronicamente, pode ter um potencial hepatotóxico, o que foi observado nas análises macroscópica, bioquímica e histopatológica. Desta forma, podemos sugerir que o EEPp (1 e 10mg/kg) apresenta boa eficácia e segurança em tratamentos crônicos e que a dose de 100mg/kg não é recomendada em tratamentos de longa duração, a fim de garantir a segurança do paciente.

Referências bibliográficas

- CRUZ R. C. B., MEURER C.D., SILVA E.J., SCHAEFER C., SANTOS A.R.S., BELLA CRUZ A., CECHINEL FILHO V. Toxicity evaluation of Cucurbita maxima seed extract in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 4, p. 301-303, Jun 2006.
- EL KHASSAWNA, T., BÖCKER, W., GOVINDARAJAN, P., SCHLIEFKE, N., HÜRTER, B., KAMPSCHULTE, M., SCHLEWITZ G., ALT V., LIPS K. S., FAULENBACH M., MÖLLMANN H., ZAHNER D., DÜRSELEN L., ...HEISS C. Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. **PLoS One**, 8(8), e71665, 2013.
- KYSELOVA V., PEKNIKOVA J., BUCKIOVA D., BOUBELIK M. 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, Mar 24 2003.
- LUFKIN E. G., SARKAR S., KULKARNI P. M., CIACCIA A. V., SIDDHANTI S., STOCK J., PLOUFFE Jr. L. A. Antiresorptive treatment of postmenopausal osteoporosis: review of randomized clinical studies and rationale for the Evista alendronate comparison (EVA) trial. **Current Medical Research and Opinion**, v. 20, n. 3, p. 351-7, Mar 2004.
- MILLER P. D.; DERMAN R. J. What is the best balance of benefits and risks among anti-resorptive therapies for postmenopausal osteoporosis? **Osteoporosis international**, v. 21, n. 11, p. 1793-802, Nov 2010.
- NUCCI, C. **Potencial terapêutico do extrato etanólico dos frutos da Pterodon pubescens Benth. no controle da dor aguda e crônica**. 2014. Dissertação de Mestrado. UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

NUCCI C. MAZZARDO-MARTINS L., STRAMOSK J., BRETHANHA L. C., PIZZOLATTI M. G., SANTOS A. R.S., MARTINS D. F. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 170-8, Aug 30 2012.

NUCCI-MARTINS C., MARTINS D. F., NASCIMENTO L. F., VENZKE D., OLIVEIRA A. S., FREDERICO M. J., SILVA F. R.M.B., BRIGHENTE I. M.C., PIZZOLATTI M. G., SANTOS A. R.S. Ameliorative potential of standardized fruit extract of *Pterodon pubescens* Benth on neuropathic pain in mice: Evidence for the mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 273-86, Dec 4 2015.

OMS – Organização Mundial da Saúde. WHO Technical Report Series – 921: Prevention and management of osteoporosis 2003. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42841/1/WHO_TRS_921.pdf >. Acesso em: 14 fev. 2018

RECKER R., LAPPE J., DAVIES K. M., HEANEY R. Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 10, p. 1628-33, Oct 2004.

REGINSTER, J.-Y.; BURLET, N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. **Bone**, v. 38, n. 2, Supplement 1, p. 4-9, 2// 2006.