

4.03.02 – Farmacognosia.

***Equisetum giganteum* ALIVIA DOR E CONSOLIDA FRATURA FEMORAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA**

Bruna Bighetto-Cain^{1*}, Catharina Nucci-Martins², Júlia C. Camilli¹, Eduardo A. R. Socca⁴, Wagner J. Fávaro⁴, José Angelo Camilli⁵

1. Estudante de IC do Instituto de Biologia da UNICAMP

2. Doutoranda do IB-UNICAMP

4. Pesquisador do IB-UNICAMP

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

Resumo:

A osteoporose é um importante problema de saúde e as terapias atuais são insatisfatórias em seu tratamento. A planta medicinal *Equisetum giganteum* parece ser uma ótima opção terapêutica, pois é utilizada empiricamente no Brasil para tratamento da osteoporose e consolidação de fraturas, porém, faltam estudos na literatura que validem estas atividades. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Equisetum giganteum* (EHEg) sobre a dor e a consolidação de fratura femoral em ratas osteoporóticas, utilizando um desenho experimental pré-clínico que investigou aspectos comportamentais, morfológicos e toxicológicos. Nossos resultados destacam o EHEg como uma alternativa terapêutica eficaz na regeneração de fraturas em ossos osteoporóticos e, ineditamente, no tratamento da dor, por diminuir significativamente a hiperalgesia mecânica dos animais, induzir rápida neoformação óssea e não causar efeitos tóxicos.

Autorização legal: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP: protocolo nº 4217-1.

Palavras-chave: Cavalinha; Osteoporose; Osteotomia.

Apoio financeiro: FAPESP; CAPES; CNPq; FAEPEX.

Introdução:

A osteoporose é uma doença caracterizada pela redução progressiva da massa óssea, causada pelo desequilíbrio na remodelação do tecido ósseo em favor da reabsorção, por aumento da atividade osteoclástica em relação à atividade osteoblástica¹, fato que acomete principalmente mulheres pós-menopausa, visto que supressão estrogênica na menopausa é a principal contribuinte para a patogênese da osteoporose². Esta condição leva à fragilidade esquelética, aumenta o risco de fraturas³ e pode levar à dor crônica, limitações físicas e necessidade de cuidados a longo prazo⁴. Atualmente, sabe-se que as terapias utilizadas para o tratamento de osteoporose podem causar efeitos adversos importantes, tais como osteonecrose e fraturas atípicas relatadas pelo uso de bisfosfonatos⁵, amplamente utilizados no Sistema Único de Saúde (SUS). Dessa forma, é extremamente necessário para a melhoria da qualidade de vida da população acometida, a busca por medicamentos eficazes e mais seguros. Em 2006, com a aprovação da portaria 971 da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) do Ministério da Saúde e posterior instituição da Resolução-RDC10/2010 no SUS, o uso de plantas medicinais para tratamento de saúde foi regulado por ser um recurso eficaz, de baixo custo e aceito culturalmente⁶. Neste sentido, a planta medicinal *Equisetum giganteum* L. (Fig. 1) parece ser uma ótima opção terapêutica, pois é utilizada empiricamente há muito tempo para o tratamento de osteoporose e consolidação de fraturas devido às suas ações remineralizante e anti-inflamatória.

Figura 1 – *Equisetum giganteum* L.



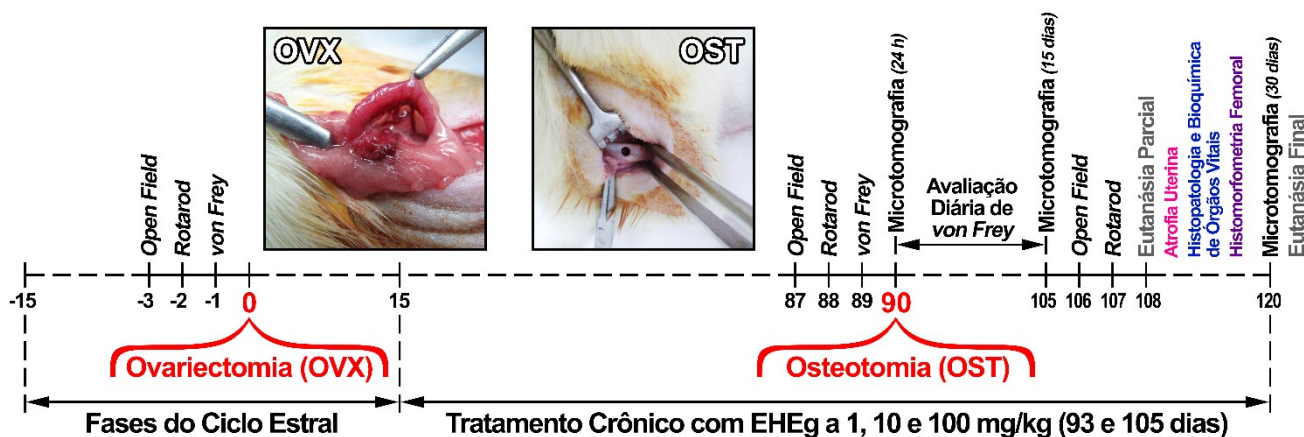
Plantação de *Equisetum giganteum* no Horto Medicinal da Pastoral da Saúde de Florianópolis (27°33'20.05"S 48°29'47.95"W). Aproximação do caule da planta. Fonte: Catharina Nucci Martins.

As plantas do gênero *Equisetum* são ricas em compostos solúveis de silício, já descritos na literatura por serem benéficos no desenvolvimento ósseo^{7,8}. Porém, apenas a ação diurética de *Equisetum giganteum* (Fig. 1) é reconhecida, e a literatura carece de estudos que comprovem também sua ação antiosteoporótica e seu papel na dor causada por fraturas em ossos osteoporóticos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Equisetum giganteum* (EHEg) sobre a dor e a consolidação de fratura femoral em ratas osteoporóticas, por meio de avaliação de dor e de locomoção, análise de microtomografia e histomorfometria óssea, verificação de marcadores bioquímicos de toxicidade e histopatologia de órgãos vitais. Assim, este estudo poderá contribuir para validar cientificamente o uso desta espécie vegetal e agregar novas aplicações para o tratamento de osteoporose.

Metodologia:

Para este estudo, foram utilizadas 32 ratas Sprague-Dawley, com 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 200 g, após a aprovação do protocolo nº 4217-1, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP. Os animais foram divididos homogeneamente em cinco grupos com 6-7 animais e a osteoporose foi induzida por ovariectomia bilateral (OVX) em todos os grupos (OVX, EHEg 1, 10 e 100 mg/kg), exceto no grupo Sham (falso-operado, sem retirada dos ovários). Foi realizado o acompanhamento diário do perfil das fases do ciclo estral das ratas, 15 dias antes e após OVX, totalizando 30 dias de avaliação (Fig. 2), por meio de lavados vaginais para verificar o sucesso da cirurgia e a consequente perda de ciclo estral. Os animais receberam tratamento intragástrico (i.g.) com o extrato hidroalcoólico de *Equisetum giganteum* (EHEg), nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg, preparado de acordo com a metodologia da Pastoral da Saúde e trabalhos anteriores^{9,10}. Os grupos controles (Sham e OVX) receberam apenas pré-tratamento i.g. com a solução veículo (salina + 5% de Tween 80). Todas as avaliações foram realizadas 1 hora após os tratamentos. Os tratamentos tiveram duração total de 93 dias consecutivos, 1 vez por dia, iniciando no 15º dia após cirurgia de ovariectomia (OVX), sendo que 3 animais por grupo tiveram o tratamento prolongado por 105 dias para acompanhamento da regeneração óssea total *in vivo* utilizando o Microtomógrafo Skyscan 1178 (Bruker), em três momentos: 24h, 15 e 30 dias após osteotomia (OST). A segunda cirurgia, de OST, foi realizada para induzir um defeito ósseo (2,3 mm de diâmetro) que mimetiza uma fratura femoral simples na clínica e, assim, acompanhar a regeneração em osso osteoporótico. Foi realizado o teste de *von Frey* eletrônico para avaliação da hiperalgesia mecânica (dor) dos animais, e os testes de *Open-field* e *Rotarod* para verificação da atividade locomotora espontânea e forçada, respectivamente (Fig. 2).

Figura 2 – Cronograma das avaliações realizadas.



Foi realizado o acompanhamento do perfil das fases do ciclo estral por 30 dias consecutivos (15 dias antes e após OVX). Dois procedimentos cirúrgicos foram realizados: ovariectomia (OVX) bilateral (indução de osteoporose) e osteotomia (OST) femoral (indução de fratura para avaliação da regeneração óssea) e testes comportamentais para observação do quadro funcional clínico dos animais, como o teste de *von Frey* para verificação da hiperalgesia mecânica (dor) e testes de *Open-field* e *Rotarod* para verificação da atividade espontânea e forçada dos animais. A microtomografia foi realizada 24h, 15 e 30 dias após OST. Também foram realizadas observação macroscópica de atrofia uterina, histomorfometria dos fêmures e análises toxicológicas (histopatologia e bioquímica dos órgãos). Fonte: Elaborado pela autora (2018).

A observação macroscópica de atrofia uterina foi realizada no dia da eutanásia dos animais (por aprofundamento anestésico com xilazina e cetamina), para reforçar a eficácia do modelo de OVX. O sangue foi recolhido para análises bioquímicas de marcadores de função hepática, renal e cardíaca, 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 e creatina quinase (CK) utilizando kits comerciais específicos. Além disso, os fêmures direitos foram dissecados, incluídos em Paraplast Plus®, cortados em 5 µm de espessura (cortes transversais) e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise histomorfométrica da região do defeito ósseo. Da mesma maneira, foi realizada a análise histopatológica de alguns órgãos vitais tais como coração, pulmões, fígado, baço e rins. Em todas as análises, os valores de *P* foram considerados estatisticamente significantes apenas quando inferiores a 0,05 ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão:

As observações basais dos lavados vaginais mostraram a presença de ciclo estral normal antes da realização da OVX, sendo possível determinar as fases metaestro, diestro, proestro e estro deste ciclo a partir da proporção dos tipos celulares encontrados (leucócitos, células epiteliais arredondadas e nucleadas e células cornificadas irregulares), corroborando com outros trabalhos da literatura¹¹. Em 15 dias após a OVX foi possível observar a ausência de ciclo de estral. A observação macroscópica de atrofia uterina, 93 dias pós-OVX, demonstrou uma importante diminuição na espessura dos cornos uterinos dos animais do grupo OVX em relação ao grupo Sham. Estes dados sugerem que a cirurgia de ovariectomia foi eficaz na eliminação de esteroides ovarianos endógenos e ressaltam os achados da literatura¹², mostrando uma importante relação do estrógeno com a morfologia do útero, em que realização da ovariectomia gera uma consequente depleção do estrógeno induzindo autofagia no epitélio uterino, o que resulta em atrofia uterina acentuada já em 4 semanas após OVX.

O teste de *von Frey* demonstrou ineditamente que o extrato é capaz de inibir significativamente a hiperalgisia mecânica, apresentando potência de inibição da resposta nociceptiva de $95 \pm 5\%$, 100% e 100%, 1 hora após tratamento com o EHEg nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg, respectivamente. Este efeito foi mantido por 6 horas após o tratamento com a dose de 1 mg/kg e por até 7 horas após tratamento com as doses de 10 e 100 mg/kg. Além disso, nos primeiros 10 dias de avaliação, a média de inibição da hiperalgisia mecânica foi de $88 \pm 4\%$, 100% e 100% para as doses de 1, 10 e 100 mg/kg, respectivamente. A pausa no tratamento no 11º e 12º dias de avaliação de *von Frey* revelou que o tratamento crônico com EHEg (1-100 mg/kg, i.g.) não apresenta efeitos colaterais como tolerância e/ou efeito cumulativo, pois no 13º dia, a média de inibição da hiperalgisia mecânica foi de $80 \pm 6\%$, 100% e 100% para as doses de 1, 10 e 100 mg/kg, respectivamente, mostrando que o EHEg tem uma eficaz e constante capacidade de inibição da hiperalgisia mecânica. Os resultados do teste de locomoção espontânea (*Open-field Test*) mostraram que o tratamento crônico com o EHEg (1-100 mg/kg, i.g.) não interfere na deambulação espontânea dos animais, quando comparado com o grupo controle-OVX. O teste de locomoção forçada em cilindro giratório (*Rotarod Test*) destaca o resultado obtido com a dose de 10 mg/kg, que recuperou em $83 \pm 28\%$ a coordenação motora e o equilíbrio dos animais. Assim, podemos sugerir que o tratamento crônico com o EHEg (1-100 mg/kg, i.g.) não apresenta efeito colateral aparente sobre a locomoção dos animais. A microtomografia *in vivo* mostrou que a dose de 1 mg/kg do EHEg foi capaz de regenerar 100% do defeito ósseo femoral, 30 dias após OST. Além disso, a histomorfometria realizada 15 dias após a OST revelou que o tratamento crônico com o EHEg (1-100 mg/kg) foi capaz de diminuir a extensão do defeito ósseo em $92 \pm 4\%$, $64 \pm 8\%$ e $72 \pm 5\%$, para as doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente.

A análise histopatológica evidenciou que o tratamento crônico com o EHEg nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg não altera morfológicamente a organização estrutural dos tecidos avaliados. Não houve ocorrência de massa tumoral, focos inflamatórios ou fibrose, sugerindo que o EHEg não apresenta efeitos tóxicos aparentes no coração, pulmão, fígado, baço e rins. A investigação bioquímica toxicológica demonstrou que o tratamento crônico com EHEg (1-100 mg/kg) também não altera a atividade das enzimas TGO, TGP e GGT, bem como concentrações séricas de ureia e creatinina e CK em relação aos grupos controle doente (OVX) e controle saudável (Sham), sugerindo que a planta medicinal *Equisetum giganteum* não apresenta efeitos tóxicos.

Conclusões:

Os resultados desse estudo destacam o modelo cirúrgico de ovariectomia bilateral como satisfatório na eliminação de esteroides ovarianos endógenos, por causar ausência de ciclo estral 15 dias após-OVX e atrofia uterina, sendo eficaz, portanto, na indução de osteoporose pós-menopausa. Ressaltam ainda, ineditamente, a planta medicinal *Equisetum giganteum* como uma opção terapêutica útil para a regeneração de fraturas em ossos osteoporóticos, por ser capaz de induzir rápida e significativa neoformação óssea na região do defeito femoral. Destacamos também o inédito efeito analgésico observado pela diminuição significativa da hiperalgisia mecânica em ratas ovariectomizadas por até 15 dias após a realização de osteotomia femoral. Além disso, o tratamento crônico com o EHEg não altera a atividade locomotora dos animais, não causa efeitos tóxicos na morfologia dos órgãos vitais e em marcadores bioquímicos de função hepática, renal e cardíaca. Desta forma, este estudo contribuiu enormemente para a elucidação científica do uso popular de *Equisetum giganteum* e de sua ação antiosteoporótica, podendo suportar a inserção desta espécie vegetal na lista de plantas medicinais da Resolução-RDC10/2010, da portaria 971 da PNPIC do MS, para a consolidação óssea e/ou dor em quadros de osteoporose no SUS.

Referências bibliográficas

1. MANOLAGAS, S. C. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 115-137, 2000.
2. THOMPSON D. D., SIMMONS H. A., KE H. Z. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v. 17, n. 4 Suppl, p. 125S-133S, Oct., 1995.

3. TANAKA T., KAWAGUCHI N., ZAIMA N., MORIYAMA T., FUKUTA Y., SHIRASAKA N. Antiosteoporotic activity of a syringic acid diet in ovariectomized mice. **Journal of Natural Medicines**, Jul. 05, 2017.
4. PAOLUCCI T., SARACENI V. M., PICCININI G. Management of chronic pain in osteoporosis: challenges and solutions. **Journal of Pain Research**, v. 9, p. 177-86, 2016.
5. HAMADEH I.S., NGWA B.A., GONG Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw. **Cancer Treatment Reviews**, 41, p. 455, 2015.
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE. RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010. Brasil, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0010_09_03_2010.html>. Acesso em: 20 Fev., 2018.
7. HOLZHÜTER G., NARAYANAN K., GERBER T. Structure of silica in Equisetum arvense. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 4, p. 512-7, Jun., 2003.
8. MLADENOVIC Z., JOHANSSON A., WILLMAN B., SHAHABI K., BJORN E., RANSJO M. Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 406-18, Jan., 2014.
9. 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.
10. 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.
11. MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 609-14, Nov., 2002.
12. ZHOU S., ZHAO L., YI T., WEI Y., ZHAO X. Menopause-induced uterine epithelium atrophy results from arachidonic acid/prostaglandin E2 axis inhibition-mediated autophagic cell death. **Scientific Reports**. v. 6, p. 31408, 2016.