



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto  
Departamento de Biologia Básica e Oral



Gabriela Hernandes Campeoti

**Efeito do tratamento com extrato de casca de jabuticaba por via oral sobre a diferenciação osteoblástica de células-tronco derivadas de medula óssea de ratas saudáveis e ovariectomizadas**

Ribeirão Preto

2022

Gabriela Hernandes Campeoti

**Efeito do tratamento com extrato de casca de jabuticaba por via oral sobre a diferenciação osteoblástica de células-tronco derivadas de medula óssea de ratas saudáveis e ovariectomizadas**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP) como parte das exigências para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

**Orientador:** Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Ribeirão Preto

2022

Nome: CAMPEOTI, Gabriela Hernandez

Título: Efeito do tratamento com extrato de casca de jabuticaba por via oral sobre a diferenciação osteoblástica de células-tronco derivadas de medula óssea de ratas saudáveis e ovariectomizadas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____

Prof. Dr.	_____
Instituição:	_____
Julgamento:	_____

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela minha vida e por estar ao meu lado ajudando a ultrapassar todos os obstáculos.

À minha mãe Ana que é minha base e inspiração, que lutou ao meu lado e é tão vitoriosa quanto eu por essa conquista; ao meu padasto Reginaldo gratidão por ter me acolhido e me apoiado todos esses anos.

Ao meu noivo Fábio que incansavelmente me apoiou em dias tristes e felizes, obrigada por ser um pilar na minha vida.

À minha família, obrigada por todo amor, meu bem mais precioso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, por toda dedicação e por ter me dado a oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, Gileade P. Freitas, Helena B. Lopes, Alann T. P. Souza, Robson D. Calixto, colaboradores neste trabalho, pelas orientações e ensinamentos. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Às alunas de Iniciação Científica, em especial Isabella C. Santos, por ter caminhado ao meu lado durante todo meu projeto e por todo companheirismo e amizade.

Ao grupo de pesquisa “Bone Research Lab” por toda ajuda e auxílio dos professores, técnicos e pós-graduandos.

Às minhas amigas Danielle P. C. de Moraes e Júlia C. Raffaini que estiveram ao meu lado nesses 5 anos. Espero levá-las por toda minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Processo nº processo: 2020/14147-7).

A todos os demais professores pelo carinho e dedicação que tornaram esta jornada de aprendizado incrível e que muito contribuíram para realização deste sonho.

A todos, obrigada.

## RESUMO

Muitos produtos naturais têm sido estudados com fins terapêuticos, seja na prevenção ou no tratamento dos danos causados por doenças metabólicas, incluindo a osteoporose. As frutas podem ser fonte de vários compostos bioativos, concentrados principalmente em sua casca. O extrato da casca de jabuticaba (ECJ) tem se mostrado um produto promissor no tratamento da obesidade, pré-diabetes e complicações hepáticas. Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito do ECJ na diferenciação osteoblástica e adipocítica de células-tronco mesenquimais derivadas de animais saudáveis e osteoporóticos. Os resultados mostraram que o ECJ aumenta a diferenciação osteoblástica, evidenciada por maior atividade de fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada, e reduz a diferenciação adipocítica, observada pela redução na formação de acúmulo lipídico. Com base nesses resultados, nossa hipótese é que, devido aos seus efeitos osteogênico e anti-adipogênico, o ECJ pode prevenir ou reduzir a perda óssea induzida pela osteoporose. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da administração do ECJ na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas de ratas ovariectomizadas. Para isso, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral a fim de induzir o hipoenestrogenismo (OVX). Como controle, foram utilizados animais submetidos à cirurgia fictícia (SHAM). Sete dias após o procedimento cirúrgico, tanto animais OVX quanto SHAM receberam administração intragástrica diária da solução de ECJ dissolvido em 1 mL de água filtrada na concentração de 3 mg de ECJ/kg de peso corporal e/ou apenas 1 mL de água filtrada, ambas por 90 dias. Após esse período, as células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea dos fêmures foram coletadas e avaliada a diferenciação osteoblástica dessas por meio das análises de expressão de mRNA de genes osteoblásticos por PCR em tempo real, atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ* por ensaio *Fast Red* e formação de matriz extracelular mineralizada pela colocação com vermelho de alizarina. A análise estatística foi realizada considerando o nível de significância de 5%. O ECJ foi capaz de diminuir a expressão gênica da maioria dos marcadores osteoblásticos nas células derivadas de ratas OVX, bem como regular positivamente os genes osteoblásticos em culturas de células de animais SHAM. Além disso, o ECJ favoreceu o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, determinado por maiores atividade de ALP *in situ* e formação de matriz

extracelular mineralizada nas células derivadas dos animais SHAM, os quais foram diminuídos nas células derivadas dos animais OVX. Com base nesses resultados, concluímos que o ECJ aumenta a diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de animais normoestrogênicos e diminui a de MSCs derivadas de animais hipoestrogênicos.

**Palavras-chave:** Osteogênese; Osteoblasto; Osso; Osteoporose; Hipoestrogenismo; Ovariectomia; Jabuticaba; Bioativos; Fitoterápicos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
3.1 Procedimento cirúrgico de ovariectomia .....	9
3.2 Administração do ECJ .....	9
3.3 Avaliação do peso corporal dos animais .....	10
3.4 Obtenção e cultura de MSCs .....	10
3.5 Avaliação da expressão de marcadores osteogênicos por PCR em tempo real .....	11
3.6 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina (ALP) .....	12
3.7 Análise da formação de matriz extracelular mineralizada .....	12
3.8 Análise estatística .....	12
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>13</b>
4.1 Peso corporal dos animais .....	13
4.2 Efeito do ECJ sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de medula óssea de ratas saudáveis e osteoporóticas.....	13
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>20</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos produtos naturais estão sendo estudados como alternativas para o tratamento de diversas doenças, inclusive as do tecido ósseo, como a osteoporose (Sgarbossa et al., 2015; Jiang et al., 2011; Xu e Lawson; 2004). Vários estudos relatam os efeitos benéficos desses produtos no metabolismo ósseo *in vitro* e na formação óssea *in vivo* (Oliveira et al., 2018; Tasadduq et al., 2017; Ardawi et al., 2016; Imura et al., 2015; Mackinnon et al., 2011). Dentre os elementos que são utilizados na preparação desses produtos estão as ervas, frutas, castanhas, assim como suas cascas, raízes, folhas e caule. Suas principais vantagens são o fato de crescerem naturalmente, tendo alta disponibilidade e baixos custos de produção, além de seus compostos derivados serem naturais, causando efeitos colaterais mínimos e com menor toxicidade (Udalamattha et al., 2016). Sendo assim, estes produtos podem ser alternativas seguras e acessíveis em comparação aos medicamentos sintéticos disponíveis, os quais estão associados a muitos efeitos colaterais (Hamadeh et al., 2015; Hough, 2014; Deal et al., 2009).

A jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*) é uma fruta brasileira de 3 a 4 cm de diâmetro, com casca roxa espessa que envolve a polpa branca gelatinosa e possui grande quantidade de compostos fenólicos, incluindo antocianina, quercetina, ácido elágico e ácido gálico (Reynertson et al., 2008; Abe et al., 2007). Os benefícios da ingestão de jabuticaba são inúmeros e dentre eles destacam-se redução de peso, controle dos níveis de colesterol, prevenção da dislipidemia e redução dos níveis séricos de glicose (Lenquist et al., 2015; Araújo et al., 2014; Lenquist et al., 2012).

Cascas de frutas são fontes importantes de vários compostos bioativos e a casca da jabuticaba tem mostrado grande potencial terapêutico (Lenquist et al., 2015; Baptista et al., 2014; Dragano et al., 2013; Lenquist et al., 2012). Recentemente, observou-se o efeito dose-dependente do extrato da casca de jabuticaba (ECJ) na prevenção de obesidade, pré-diabetes e complicações hepáticas, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (Lamas et al., 2018). Adicionalmente, foi demonstrado que o ECJ tem atividade antiproliferativa em linhagens celulares de tumores e atividade antimutagênica em camundongos (Leite-Legatti et al., 2012). Este extrato possui alto teor fenólico e capacidade antioxidante por possuir grandes quantidades de antocianina e flavonoides, preservadas durante sua extração.



A osteoporose é uma desordem sistêmica crônica na qual ocorre a redução da formação óssea pelo aumento da adiposidade da medula óssea (Justesen et al., 2001; Song et al., 2012). Além disso, ela resulta na desestruturação da microarquitetura e na redução da densidade tecidual, com consequente aumento da susceptibilidade à fratura óssea (South-Paul, 2001). Segundo critérios da Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 33% da população de mulheres com idade superior a 65 anos desenvolve osteoporose (Oliveira, 2002). Dados da *National Osteoporosis Foundation* mostram que a prevalência de osteoporose entre homens é também relevante, atingindo aproximadamente 17% da população da raça branca acima de 80 anos (Orwig et al., 2011). Os gastos de planos de saúde privados no Brasil com fraturas de fêmures em pacientes osteoporóticos, entre 2003 e 2004, foi de 12 milhões de reais (Araújo et al., 2005). Com base nesse valor, é possível estimar o impacto dos gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com todos os tipos de fraturas ósseas em pacientes osteoporóticos ou não que poderiam ser beneficiados por novos e mais eficazes tratamentos para essa doença.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa, investigou o efeito do ECJ na diferenciação osteoblástica e adipocítica de células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas de ratas saudáveis e osteoporóticas. Os resultados mostraram que o ECJ favoreceu a diferenciação osteoblástica, evidenciada por maior atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de matriz mineralizada, e inibiu a diferenciação adipocítica, observada pela redução na formação de acúmulo lipídico em ambas as condições sistêmicas avaliadas (Souza et al., 2020). No entanto, até o momento não foram avaliados os efeitos do ECJ administrado por via oral na diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de medula óssea de ratas ovariectomizadas, objetivando prevenir ou amenizar a instalação da osteoporose.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Avaliar o efeito do tratamento com ECJ por via oral sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de medula óssea de ratas ovariectomizadas.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Todas as atividades e procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FORP/USP (CEUA nº 2020.1.520.58.8)

### 3.1 Procedimento cirúrgico de ovariectomia

Foram utilizadas 4 ratas da linhagem *Sprague-Dawley* com 03 meses de idade no início dos experimentos. O procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral (OVX) foi realizado em 2 animais, como descrito previamente por Siéssere e colaboradores (2011). Brevemente, os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal com solução anestésica de Coopazine (Xylazina, Agibrands do Brasil LTDA, Brasil) - sedativo, analgésico e relaxante muscular - e Dopalen (Ketamina, Agibrands) - anestésico geral, na proporção de 1,5 mg/100 g de peso corporal de Xylazina e 7,5 mg/100 g de peso corporal de Ketamina. Realizou-se a analgesia pré-operatória com Flunixin meglumina a 0,25 mg/100 g de peso corporal (Banamine, Schering-Plough, Brasil). Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região abdominal bilateral e antissepsia com solução tópica de povidina-iodo alcoólica. Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais para a exposição e/ou excisão dos ovários, seguida por sutura com fio mononylon 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil) como descrito por Kalu (1991). Em seguida, os animais foram medicados com dose única de Flunixin meglumina 0,2 mg/100 g de peso corporal (Schering, Brasil) e dose única de uma solução de antibiótico contendo Benzilpenicilina benzatina 2,000 UI/100 g de peso corporal, Benzilpenicilina procaína 1,000 UI/100 g de peso corporal, Benzilpenicilina potássica 1,000 UI/100 g de peso corporal, Diidroestreptomicina base (sulfato) 0,83 mg/100 g peso corporal e Estreptomicina base (sulfato) 0,83 mg/100 g peso corporal (Pentabiótico, Fort Dodge, Brasil). Duas ratas foram submetidas ao estresse da cirurgia (SHAM), mas não excisão dos ovários. Após o procedimento cirúrgico e administração da medicação pós-operatória, os animais foram mantidos em número de 2 por caixa por 97 dias, recebendo ração e água "*ad libitum*" e observação constante, sendo feita a limpeza das caixas, com troca da maravalha, 3 vezes por semana.

### 3.2 Administração do ECJ

Este estudo foi desenvolvido em colaboração com o grupo do Professor Dr. Mario Roberto Marostica Junior da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP) que produziu e nos forneceu o ECJ. Após 7 dias do procedimento cirúrgico de ovariectomia ou cirurgia fictícia, 2 animais (n = 01 para OVX e n = 01 para SHAM) receberam a solução de ECJ

dissolvido em água filtrada (3 mg de ECJ/kg de peso corporal diluído em 1 mL de água filtrada) enquanto os outros 2 animais ( $n = 1$  para OVX e  $n = 1$  para SHAM) receberam 1 mL de água filtrada ( $H_2O$ ) por administração intragástrica diária (gavagem), por período de 90 dias, como demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição dos 04 animais entre os grupos e tratamentos

<b>Animal</b>	<b>Tratamento*</b>	<b>Dia 90 (n)</b>
<b>OVX</b>	ECJ	1
	Água	1
<b>SHAM</b>	ECJ	1
	Água	1

\* O tratamento foi iniciado a partir do dia 7 após a cirurgia.

Fonte: Próprio autor.

### 3.3 Avaliação do peso corporal dos animais

Todos os animais foram pesados semanalmente em balança de precisão (Toledo, Brasil). Este procedimento foi repetido até a 14<sup>a</sup> semana, antes da realização do procedimento de eutanásia.

### 3.4 Obtenção e cultura de MSCs

Após o período de administração intragástrica dos diferentes tratamentos, todos os animais foram eutanasiados com sobredosagem de tiopental sódico 1% (Thiopentax, Cristália, Brasil) na concentração de 100-120 mg/Kg, por via intraperitoneal. Os fêmures foram removidos e transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa ( $\alpha$ -MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) suplementado com 500  $\mu$ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3  $\mu$ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia e à remoção de tecidos moles remanescentes. As epífises foram removidas e a medula óssea presente nas diáfises foi extraída por irrigação com meio de crescimento (condição não indutora de diferenciação celular) contendo  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50  $\mu$ g/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3  $\mu$ g/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies). As células foram cultivadas em meio de crescimento em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, EUA) até atingirem a subconfluência de 70% para permitir a seleção de MSCs por aderência ao poliestireno. As culturas foram

mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 48 horas.

Após a subconfluência, as MSCs foram tripsinizadas e cultivadas em meio osteogênico, que é meio de crescimento acrescido de 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich, EUA) e dexametasona 10<sup>-7</sup> M (Sigma-Aldrich) por até 21 dias em placas de 24 poços na concentração de 1x10<sup>4</sup> células/poço, e em placas de 6 poços na concentração de 1x10<sup>5</sup> células/poço. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 48 horas.

### **3.5 Avaliação da expressão de marcadores osteogênicos por PCR em tempo real**

Ao final de 5 dias, a expressão gênica do fator de transcrição relacionado ao runt 2 (*Runx2*), osterix (*Sp7*), fosfatase alcalina (*Alp*), osteocalcina (*Oc*) e osteopontina (*Opn*) foi avaliada por PCR em tempo real. Foi realizada a extração do RNA total através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado a partir de 1 µL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA) e sua integridade, avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Em seguida, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems para PCR em tempo real (Invitrogen-Life Technologies, EUA).

As reações de PCR em tempo real para a quantificação da expressão gênica foram feitas utilizando o sistema de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies) em aparelho QuantiStudio7 (Thermofisher, EUA). As reações foram realizadas em quadruplicata (n=4) com volume final de 10 µL contendo 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 µL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 1,125 ng/µL de cDNA. A reação de amplificação foi composta por: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão).

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (do Inglês, *cycle threshold*), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a

amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permitiu a análise quantitativa da expressão dos genes *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Oc* e *Opn*. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene *Eif2b* que foi usada para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados.

### **3.6 Avaliação da atividade de ALP**

Ao final de 7 dias, a atividade de ALP *in situ* foi avaliada por meio da coloração com *Fast Red*. Para tal, as culturas foram lavadas com solução de Hank's (Hank's Balanced Salts, Sigma-Aldrich) aquecida a 37°C e incubadas com 1 mL de solução tampão Tris (Sigma-Aldrich) 120 mM contendo Fast Red TR (Sigma-Aldrich) 1,8 mM, naftol-ASMX-fosfato (Sigma- Aldrich) 0,9 mM e dimetilformamida (Merck, Alemanha), por 30 minutos, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Os poços foram lavados com PBS (Gibco-Life Technologies) e fotografados com câmera digital (Nikon, Japão). Os dados foram obtidos em quintuplicada (n=5) e a atividade de ALP *in situ* foi quantificada utilizando o software ImageJ (NHI, EUA), sendo os resultados expressos em porcentagem de área corada.

### **3.7 Análise da formação de matriz extracelular mineralizada**

Ao final de 21 dias, a formação de matriz extracelular mineralizada foi avaliada por meio da coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich). As culturas foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em álcool etílico 70% a 4°C por 60 minutos e lavadas em PBS e água bidestilada. Em seguida, foram coradas com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) 2%, pH 4,2, à temperatura ambiente por 15 minutos, lavadas com PBS (Gibco-Life Technologies) e água bidestilada, e observadas por epifluorescência em microscópio Leica DMLB (Leica, Alemanha) e fotografados com câmera digital (Nikon, Japão). Os dados foram obtidos em quintuplicada (n=5) e a formação dos nódulos de mineralização foram quantificados utilizando o software ImageJ (NHI, EUA), sendo os resultados expressos em porcentagem de área corada.

### **3.8 Análise estatística**

O peso corporal dos animais não foi submetido a análise estatística. Para as análises de expressão gênica por PCR em tempo real, atividade de ALP *in situ* e

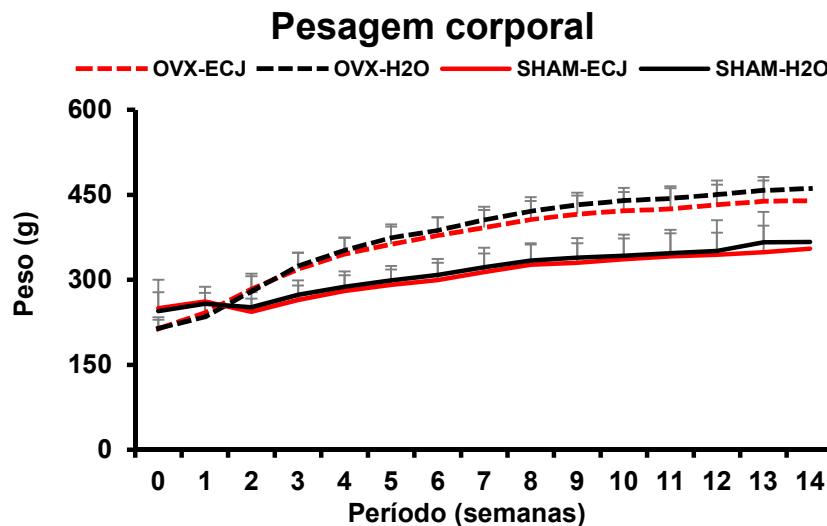
mineralização da matriz extracelular, após verificação da normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, utilizou-se o teste T de *Student* para as comparações entre os grupos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Alemanha) com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Peso corporal dos animais

Antes e após a realização dos procedimentos cirúrgicos todos os animais (SHAM e OVX) foram pesados semanalmente para avaliação do peso corporal. Inicialmente, tanto os animais OVX-ECJ quanto OVX-H<sub>2</sub>O apresentaram peso médio de 214 g, enquanto os animais SHAM-ECJ apresentaram média de 249 g e SHAM-H<sub>2</sub>O, 244 g. Foi observado ganho de peso progressivo e, ao final da 14<sup>a</sup> semana, antecedente ao procedimento de eutanásia, as médias de peso foram as seguintes: 440 g para OVX-ECJ, 461 g para OVX-H<sub>2</sub>O, 354 g para SHAM-ECJ e 366 g para SHAM-H<sub>2</sub>O (Figura 1).

**Figura 1:** Peso corporal dos animais OVX-ECJ (n = 12), OVX-H<sub>2</sub>O (n = 9), SHAM-ECJ (n = 12) e SHAM-H<sub>2</sub>O (n = 11). Os dados estão representados como média e desvio padrão.



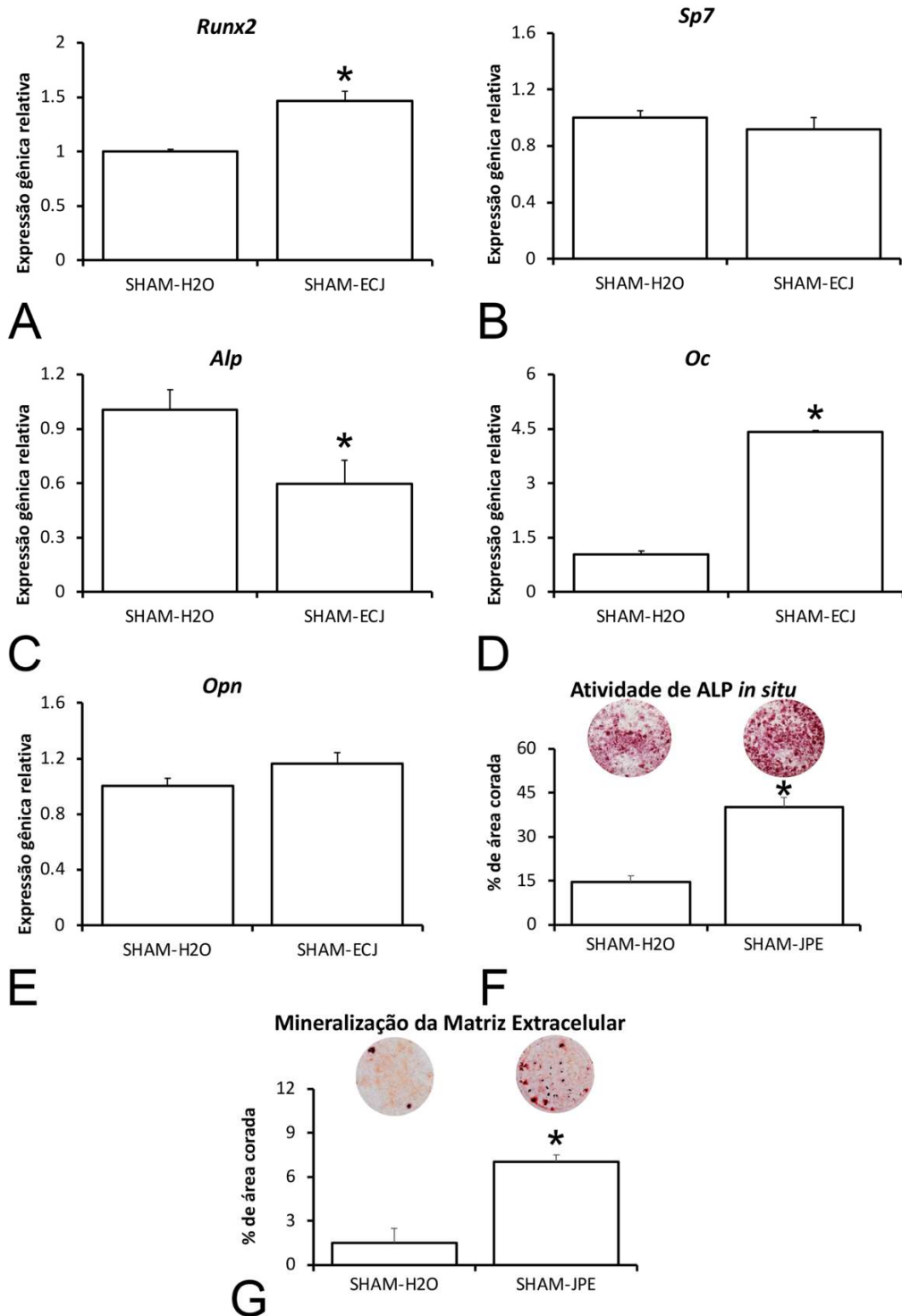
Fonte: Próprio autor.

### 4.2 Efeito do ECJ sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de medula óssea de ratas saudáveis e osteoporóticas

O tratamento com ECJ aumentou a expressão de *Runx2* ( $p=0,021$ , Figura 2A), não afetou a de *Sp7* ( $p=0,451$ , Figura 2B), reduziu a de *Alp* ( $p=0,005$ , Figura 2C),

aumentou a de *Oc* ( $p=0,001$ , Figura 2D) e não afetou a de *Opn* ( $p=0,244$ , Figura 2E), e aumentou a atividade de ALP *in situ* ( $p<0,001$ , Figura 2F) e a formação de matriz extracelular mineralizada ( $p=0,008$ , Figura 2G) em MSCs derivadas de medula óssea de ratas saudáveis.

**Figura 2.** Diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de medula óssea de ratas saudáveis (SHAM) e tratadas com ECJ. Expressão gênica de *Runx2* (A), *Sp7* (B), *Alp* (C), *Oc* (D) e *Opn* (E), atividade de ALP *in situ* (F) e formação de matriz extracelular mineralizada (G). Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=4 para expressão gênica e n=5 para atividade de ALP *in situ* e formação de matriz extracelular mineralizada). Asterisco indica diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

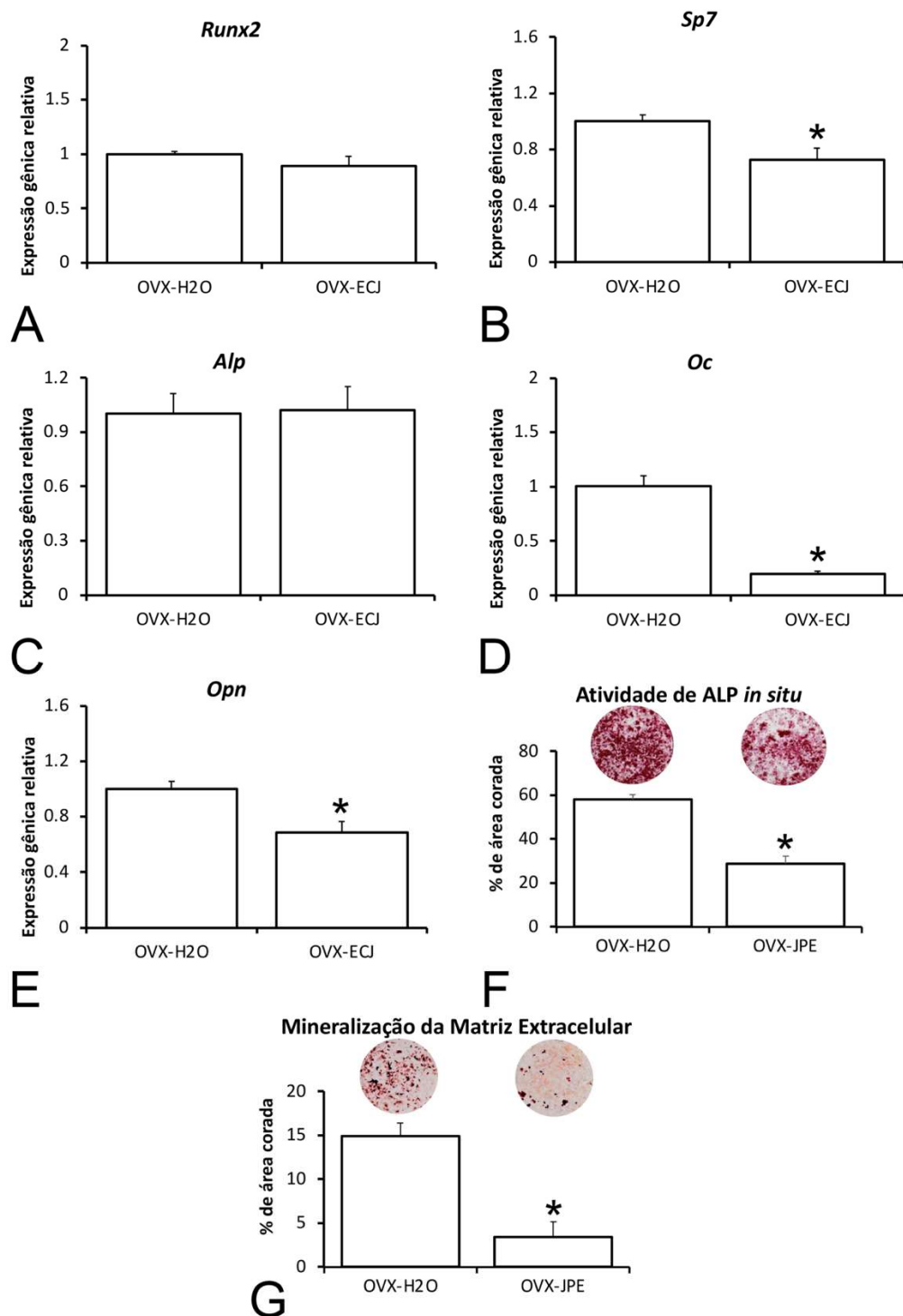


Fonte: Próprio autor.



O tratamento com ECJ não afetou a expressão de *Runx2* ( $p=0,057$ , Figura 3A), reduziu a expressão de *Sp7* ( $p<0,001$ , Figura 2C), não afetou a expressão de *Alp* ( $p=0,846$ , Figura 3C), reduziu a expressão de *Oc* ( $p<0,001$ , Figura 3D) e *Opn* ( $p<0,001$ , Figura 3E), e diminuiu a atividade de ALP *in situ* ( $p<0,001$ , Figura 3F) e a formação de matriz extracelular mineralizada ( $p<0,001$ , Figura 3G) em MSCs derivadas de medula óssea de ratas OVX.

**Figura 3.** Diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de medula óssea de ratas submetidas à ovariectomia (OVX) e tratadas com ECJ. Expressão gênica de *Runx2* (A), *Sp7* (B), *Alp* (C), *Oc* (D) e *Opn* (E), atividade de ALP *in situ* (F) e formação de matriz extracelular mineralizada (G). Os dados são apresentados como média e desvio padrão (n=4 para expressão gênica e n=5 para atividade de ALP *in situ* e formação de matriz extracelular mineralizada). Asterisco indica diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Próprio autor.

## 5 DISCUSSÃO

O osso é um tecido dinâmico que passa por constantes remodelações para manter a saúde do esqueleto ao longo do tempo. As evidências são crescentes de que alterações biológicas na atividade hormonal podem afetar diretamente a saúde desse tecido, ocasionando doenças ósseas evidentes (Funatsu et al., 2006; Omori et al., 2020). Uma das patologias ósseas mais citadas na literatura com alta influência hormonal, mais especificamente devido ao hipoestrogenismo, é a osteoporose (Zheng et al., 2018).

A osteoporose é uma doença osteometabólica considerada como um grave problema de saúde pública, uma vez que apresenta uma alta taxa de morbidade e mortalidade nos indivíduos acometidos devido ao alto risco de fraturas complexas e problemas associados (Yu et al. 2012; Caires et al., 2017). Esta doença acomete pessoas de todos os sexos, apresentando maior incidência em mulheres com idade superior a 45 anos que se encontram no período de pós-menopausa, e que se agrava com o envelhecimento (Watts, 2018). Essa desordem óssea é representada por perda considerável da massa óssea e está associada com a diminuição dos níveis de estrógeno, uma vez que esse hormônio estimula a ação de osteoblastos, inibe a ação dos osteoclastos e eleva os níveis do paratormônio (PTH), gerando um processo de descalcificação óssea dado o desequilíbrio metabólico (Kanatani et al., 1998; Gracitelli et al., 2002; Jia et al., 2014). O estrógeno é um hormônio sexual importante para homens e mulheres. É amplamente produzido pelos ovários, mas também é encontrado em menores quantidades no tecido adiposo e no cérebro (Omori et al., 2020). Este hormônio é capaz de afetar diretamente o crescimento, desenvolvimento e manutenção do osso por meio da regulação intracelular (Khosla et al., 2002; Manolagas et al., 2002; Gennari et al., 2003). Adicionalmente, a deficiência desse hormônio pode levar a um processo denominado de osteoporose pós-menopausa; portanto, um modelo animal que mimetize esse tipo de osteoporose deve possuir as mesmas características.

A literatura mostra que vários animais podem ser usados para estudar a influência dos hormônios sexuais como o estrógeno no metabolismo ósseo (Turner, 2001; Pufe et al., 2007; Gomes et al., 2021). Dentre esses animais, os modelos murinos permitem grande reprodutibilidade, uma vez que mais de 90% do seu genoma pode ser dividido em regiões correspondentes ao do genoma de humanos (Waterson

et al., 2002; Komori, 2015). Além disso, o procedimento cirúrgico de ovariectomia tem sido usado nos últimos 30 anos e tem se mostrado o método mais popular e eficiente para induzir a osteoporose neste mesmo modelo animal (Komori, 2015; Almeida et al., 2019; Nepal et al., 2020). Neste estudo, utilizamos ratas ovariectomizadas para mimetizar a indução dos efeitos deletérios do hipoestrogenismo, além de mostrar que esse mesmo modelo experimental pode servir como uma fonte confiável para obtenção de MSCs.

Dentre as estratégias alternativas atuais para o tratamento de doenças ósseas, percebe-se um crescente avanço científico no uso de bioativos e fitoterápicos obtidos a partir de compostos naturais (Suthon et al., 2016; Diyanat et al., 2018). Lim e colaboradores (2009) ao estudarem o papel do extrato etanólico de *Psoralea corylifolia* L. e seu princípio ativo *Bakuchiol* na atividade óssea e estrogênica de ratas ovariectomizadas, observaram que ambos os tratamentos reduziram a perda óssea nesses animais e aumentaram a mineralização óssea, atividade de ALP e concentração de cálcio. Já Udomsuk e colaboradores (2012) ao estudarem o papel do fitoestrogênio *Miroestrol*, na regulação de genes relacionados à osteoporose de camundongos fêmeas ovariectomizadas, mostraram que o tratamento com os compostos naturais também foi capaz de diminuir a perda óssea nesses animais, uma vez que houve um efeito modulatório positivo de osteoprotegerina e negativo de receptor do fator nuclear kappa B ligante (*Rankl*), cuja interação é primordial para a maturação de osteoclastos.

No nosso estudo, nossa estratégia foi avaliar o efeito do ECJ na prevenção do desenvolvimento da osteoporose em ratas ovariectomizadas, uma vez que, além de possuir propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, o ECJ tem efeitos anti-adipogênico e pro-osteogênico sobre MSCs derivadas de animais saudáveis ou osteoporóticos (Lamas et al., 2018; Souza et al., 2020).

O ECJ foi capaz de regular positivamente os genes osteoblásticos *Runx2* e *Oc* em culturas de células de animais saudáveis (SHAM) e foi capaz de diminuir a expressão gênica de *Sp7*, *Oc* e *Opn* em MSCs derivadas de animais OVX. Além disso, o ECJ aumentou os parâmetros relacionados ao fenótipo osteoblástico, como a atividade de ALP *in situ* e mineralização extracelular em MSCs derivadas de animais saudáveis (SHAM), enquanto diminuiu nos animais do grupo OVX. Esses achados sugerem que as MSCs derivadas de animais OVX podem ter sofrido alterações

importantes em suas características após o procedimento de ovariectomia, na tentativa de prevenir o desenvolvimento da osteoporose. Essa hipótese é corroborada por um estudo que mostrou que na ausência do estrógeno, o metabolismo pode sofrer ajustes para tentar compensar os efeitos deletérios da ausência de estrógeno. Como a remoção dos ovários reduz a concentração de estrógeno, o organismo cria uma necessidade de aumentar a função dos osteoblastos para compensar os efeitos da diminuição hormonal (Yu et al., 2012).

## 6 CONCLUSÃO

O ECJ favorece a diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de animais saudáveis e reduz a diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de animais hipoestrogênicos. Apesar do efeito negativo sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs derivadas de ratas ovariectomizadas, o uso terapêutico do ECJ não deve ser descartado dado seu efeito positivo sobre a diferenciação osteoblástica de células derivadas de animais saudáveis e estudos *in vivo* são necessários para investigar os efeitos desse extrato sobre o tecido ósseo.

## REFERÊNCIAS

- Abadi GR. et al. Experimental ovarian transplantation on stomach for bone repair in ovariectomized rabbits. *Acta Cir Bras*. 2013; 28:412-418.
- Ardawi MM, Badawoud MH, Hassan SM, Rouzi AA, Ardawi JMS, AlNosani NM, Qari MH, Mousa SA. Lycopene treatment against loss of bone mass, microarchitecture and strength in relation to regulatory mechanisms in a postmenopausal osteoporosis model. *Bone*. 2016 Feb;83:127-140.
- Caires ELP, Bezerra MC, Junqueira AFTA, Fontenele SMA, Andrade SCA, d'Alva CB. Treatment of postmenopausal osteoporosis: a literature-based algorithm for use in the public health care system. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2017 May-Jun;57(3):254-263. English, Portuguese. doi: 10.1016/j.rbre.2017.01.001. Epub 2017 Feb 15. PMID: 28535898.
- Diyanat S, Salehi M, Koochi-Hosseiniabadi O, Tanideh N, Dehghani F, Koochpeyma F, Daneshi S. Effects of the Hydroalcoholic Extract of the *Psidium guajava* Fruit on Osteoporosis Prevention in Ovariectomized Rats. *Iran J Med Sci*. 2018 Nov;43(6):623-632. PMID: 30510339; PMCID: PMC6230939.
- Fidelis M, Vieira do Carmo MA, Azevedo L, Cruz TM, Marques MB, Myoda T, Sant'Ana AS, Furtado MM, Wen M, Zhang L, Rosso ND, Genovese MI, Oh WY, Shahidi F, Pap N, Granato D. Response surface optimization of phenolic compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* [Mart.] O.Berg) seeds: Antioxidant, antimicrobial, antihyperglycemic, antihypertensive and cytotoxic assessments. *Food Chem Toxicol*. 2020 Aug;142:111439. doi: 10.1016/j.fct.2020.111439. Epub 2020 May 22. PMID: 32450285.

- Funatsu M, Sato K, Mitani H. Effects of growth hormone on craniofacial growth. *Angle Orthod*. 2006; 76:970-977.
- Gennari L. et al. Longitudinal association between sex hormone levels, bone loss, and bone turnover in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:5327-5333.
- Gomes NA. et al. Mandibular-related bone metabolism in orchietomized rats treated with sex hormones. *Arch Oral Biol*. 2021; 122:105000.
- Hamadeh IS, Ngwa BA, Gong Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw. *Cancer Treat Rev*. 2015 May;41(5):455-64.
- Hough FS, Brown SL, Cassim B, Davey MR, de Lange W, de Villiers TJ, Ellis GC, Lipschitz S, Lukhele M, Pettifor JM; National Osteoporosis Foundation of South Africa. The safety of osteoporosis medication. *S Afr Med J*. 2014 Apr;104(4):279-82.
- Jia HB, Ma JX, Ma XL, Yu JT, Feng R, Xu LY, Wang J, Xing D, Zhu SW, Wang Y. Estrogen alone or in combination with parathyroid hormone can decrease vertebral MEF2 and sclerostin expression and increase vertebral bone mass in ovariectomized rats. *Osteoporos Int*. 2014 Dec;25(12):2743-54. doi: 10.1007/s00198-014-2818-y. Epub 2014 Jul 30. PMID: 25074352.
- Jiang M, Zhang C, Cao H, Chan K, Lu A. The role of Chinese medicine in the treatment of chronic diseases in China. *Planta Med*. 2011 Jun;77(9):873-81.
- Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Nov;23(11):576-81.
- Kanatani M, Sugimoto T, Takahashi Y, Kaji H, Kitazawa R, Chihara K. Estrogen via the estrogen receptor blocks cAMP-mediated parathyroid hormone (PTH)-stimulated osteoclast formation. *J Bone Miner Res*. 1998 May;13(5):854-62. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.5.854. PMID: 9610750.
- Khosla S, Melton LJ, Riggs BL. Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:1443-1450.
- Lim SH, Ha TY, Kim SR, Ahn J, Park HJ, Kim S. Ethanol extract of *Psoralea corylifolia* L. and its main constituent, bakuchiol, reduce bone loss in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Br J Nutr*. 2009 Apr;101(7):1031-9. doi: 10.1017/S0007114508066750. Epub 2008 Sep 19. PMID: 18801207.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method. *Methods*. 25(4): 402-8, 2001.
- Mackinnon ES, Rao AV, Josse RG, Rao LG. Supplementation with the antioxidant lycopene significantly decreases oxidative stress parameters and the bone resorption marker N-telopeptide of type I collagen in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2011 Apr;22(4):1091-101.
- Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res*. 2002; 57:385-409.
- Mauro E.C. Gracitelli, André Alexis C. Vidoris Ricardo Luba. Parathyroid hormone and osteoporosis: solving the puzzle. Physiologic rationale for the therapeutic use of PTH in osteoporosis. *Revisões • Arq Bras Endocrinol Metab* 46 (3), Jun 2002.
- Oliveira GR, Vargas-Sanchez PK, Fernandes RR, Ricoldi MST, Semeghini MS, Pitol DL, de Sousa LG, Siessere S, Bombonato-Prado KF. Lycopene influences osteoblast functional activity and prevents femur bone loss in female rats submitted to an experimental model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2019 Jul;37(4):658-667.
- Omori MA. et al. Effect of ovariectomy on maxilla and mandible dimensions of female rats. *Orthod Craniofac Res*. 2020; 23:342-350.

- Pufe T. et al. Influence of estradiol on vascular endothelial growth factor expression in bone: a study in Gottingern miniature pigs and human osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2007; 80:184-191.
- Sgarbossa A, Giacomazza D, di Carlo M. Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. *Nutrients.* 2015 Jul 15;7(7):5764-82.
- Souza ATP, Freitas GP, Lopes HB, Totoli GGC, Tarone AG, Marostica-Junior MR, Rosa AL, Beloti MM. Jabuticaba peel extract modulates adipocyte and osteoblast differentiation of MSCs from healthy and osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab.* 2021 Mar;39(2):163-173. doi: 10.1007/s00774-020-01152-8. Epub 2020 Sep 5. PMID: 32889573.
- Suthon S, Jaroenporn S, Charoenphandhu N, Suntornsaratoon P, Malaivijitnond S. Anti-osteoporotic effects of *Pueraria candollei* var. *mirifica* on bone mineral density and histomorphometry in estrogen-deficient rats. *J Nat Med.* 2016 Apr;70(2):225-33. doi: 10.1007/s11418-016-0965-5. Epub 2016 Jan 27. PMID: 26815435.
- Tasadduq R, Gordon J, Al-Ghanim KA, Lian JB, Van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Shakoori AR. Ethanol Extract of *Cissus quadrangularis* Enhances Osteoblast Differentiation and Mineralization of Murine Pre-Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *J Cell Physiol.* 2017 Mar;232(3):540-547.
- Turner AS. Animal models of osteoporosis - necessity and limitations. *European Cells and Materials.* 2001; 1:66-81.
- Udalamaththa VL, Jayasinghe CD, Udagama PV. Potential role of herbal remedies in stem cell therapy: proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Aug 11;7(1):110.
- Udomsuk L, Chatuphonprasert W, Monthakantirat O, Churikhit Y, Jarukamjorn K. Impact of *Pueraria candollei* var. *mirifica* and its potent phytoestrogen miroestrol on expression of bone-specific genes in ovariectomized mice. *Fitoterapia.* 2012 Dec;83(8):1687-92. doi: 10.1016/j.fitote.2012.09.024. Epub 2012 Oct 4. PMID: 23041523.
- Waterson RH. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002; 420: 520-562.
- Watts NB. Postmenopausal Osteoporosis: A Clinical Review. *J Womens Health (Larchmt).* 2018 Sep;27(9):1093-1096. doi: 10.1089/jwh.2017.6706. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29583083.
- Xu H, Lawson D. Effects of Chinese herbal medicine on bone structure and function. *J Tradit Chin Med.* 2004 Sep;24(3):224-32.
- Yu SJ, Liu HC, Ling-Ling E, Wang DS, Zhu GX. Proliferation and differentiation of osteoblasts from the mandible of osteoporotic rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012 Apr;237(4):395-406.
- Zheng X. et al. Dynamic expression of matrix metalloproteinases 2, 9 and 13 in ovariectomy induced osteoporosis rats. *Exp Ther Med.* 2018; 16:1807-1813.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

Comissão de Graduação

**Folha de Informação**

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

**Prof. Dr. Michel Reis Messori**  
Presidente da Comissão de Graduação  
FORP/USP



Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Maria Cristina Borsato**

Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

**FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)**

<b><u>DADOS PESSOAIS</u></b>	
Nome: Gabriela Hernandes Campeoti	
Nº USP: 10294140	Período: 9º período
Telefone de contato: (19) 98137-5521	E-mail USP: gabihernandes@usp.br
<b><u>INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</u></b>	
Nome do Orientador(a): Márcio Mateus Beloti	
Departamento: DBBO	
Área de conhecimento: Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial	
Subárea: Diferenciação osteoblástica	
<b><u>MODALIDADE</u></b>	
Modalidade:	
Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional	
<b><u>ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)</u></b>	

Eu, Prof(a). Dr(a). Márcio Mateus Beloti, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.

Gabriela Hernandes Campeoti

Márcio Mateus Beloti