



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



RIENNE ASSIS MATOS

**Bioatividade do extrato da pitaya na proteção contra perda
de tecido ósseo femoral. Análise in vivo em ratas
ovariectomizadas.**

Ribeirão Preto
2023

RIENNE ASSIS MATOS

**Bioatividade do extrato da pitaya na proteção contra perda
de tecido ósseo femoral. Análise in vivo em ratas
ovariectomizadas.**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

**Ribeirão Preto
2023**

Autorizo a reprodução e divulgação do teor total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo

Matos, Rienne Assis

Bioatividade do extrato da pitaya na proteção contra perda de tecido ósseo femoral. Análise in vitro e in vivo em ratas ovariectomizadas.

Ribeirão Preto, 2023.

56p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Versão Corrigida

Orientadora: Bombonato-Prado, Karina F

1. Osteoporose. 2. Estrógeno. 3. Extrato da Pitaya. 4. Ratas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matos R.A. **Bioatividade do extrato da pitaya na proteção contra perda de tecido ósseo femoral. Análise in vivo em ratas ovariectomizadas.** 2023. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Células, Biologia Molecular, Anatomia e Histologia do Departamento de Biologia Básica e Oral, todos pertencentes à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida e por permitir que tudo isso acontecesse.

Aos meus pais, **Amenartas** e **Marcos**, e a meu irmão **Rennan**, sei que eles não mediram esforços para que este sonho se realizasse, sem a compreensão, ajuda e confiança deles nada disso seria possível hoje.

Ao meu avô materno **Cícero**, à minha avó materna **Dalva** e ao meu avô paterno **Divino** (*In Memoriam*) por terem sido minha fonte de amor e estarem sempre me protegendo.

À minha tia **Herbea**, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis com todo o seu carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao **programa de pós-graduação da Biologia Básica e Oral da FORP-USP** que me abriu todas as portas e ao qual serei eternamente grata por todo o conhecimento científico e crescimento pessoal que pude obter.

À **Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado**, por ter me aceitado como sua orientada e por toda sua dedicação, carinho e amizade que me foram fundamentais para superar os desafios ao longo desta pesquisa. Serei eternamente grata.

À Pesquisadora da área de processos agroindustriais na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Unidade Agroindústria Tropical - CNPAT - EMBRAPA (Fortaleza - CE) **Dra. Ana Paula Dionísio**, a qual agradeço imensamente por ter me cedido o extrato da pitaya sem o qual essa pesquisa não teria sido viabilizada, e por todo o carinho e atenção para com essa pesquisa.

Ao técnico do laboratório **Luiz Gustavo de Souza** pela amizade dedicada a mim e por toda a ajuda e colaboração para a realização desta pesquisa.

À **Profa. Dra. Selma Siéssere** por ser um exemplo para mim de profissional e ser humano, estando presente em todas as etapas da minha pesquisa sempre com muito carinho.

À **Imaculada Janaíra Miguel**, por sempre ter me auxiliado ao longo deste caminho, e por toda a amizade e carinho dedicados a mim.

À minha amiga do coração **Marcelle Beathriz** por todo o apoio que me deu durante esse percurso, me acolhendo e nos momentos mais difíceis e comemorando comigo em todas as conquistas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa concedida.



O presente trabalho foi realizado com os seguintes apoios:

- Bolsa de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

- Auxílio à Pesquisa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Processo 21/08029-4).

RESUMO

A osteoporose é uma doença multifatorial de alta prevalência na população, promovendo perda de massa óssea e desequilíbrio no sistema de remodelação óssea. A associação entre este desequilíbrio com a deficiência estrogênica que ocorre em mulheres na fase da menopausa ainda é muito investigada, sugerindo-se que a redução na produção de estrógeno pelo próprio organismo após a menopausa favoreça o estresse oxidativo com consequente alteração na atividade funcional das células ósseas. Evidências mostram que os fitoestrógenos possam ser usados como alternativas de tratamento para a osteoporose pós-menopausa por sua capacidade de se ligar a receptores de estrógeno no organismo, o que levaria à um aumento na taxa de deposição e reduzindo a taxa de reabsorção óssea, além de possuir efeito antioxidante, atuando de forma a proteger as células contra os efeitos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Sendo assim, a proposta do presente trabalho foi avaliar o efeito do extrato da pitaya (EPY) comparado ao β -estradiol (EST), na viabilidade de células osteoblásticas e na perda óssea femoral de ratas submetidas a um modelo experimental de osteoporose. Para a análise in vivo, ratas Sprague-Dawley foram divididas em grupos controle (SHAM), ovariectomizado (OVX), estrógeno+OVX (EST+OVX) e extrato da pitaya+OVX (EPY+OVX). Essa administração ocorreu imediatamente após a ovariectomia por 12 semanas e então foi realizada a eutanásia e coleta de material para análise histológica qualitativa e quantitativa. A viabilidade celular foi realizada com um estudo dose-resposta e ensaio de MTT com a linhagem MC3T3-E1. Os dados obtidos foram analisados

estatisticamente pelo software Graph Pad Prism 5.0 com nível de significância de 5%. Os dados obtidos permitiram mostrar que houve um aumento significativo de peso corporal nos animais do grupo OVX, e valores similares para os grupos SHAM, EST+OVX e EPY+OVX. O peso total dos fêmures foi similar para todos os grupos estudados, enquanto que o diâmetro da cabeça do fêmur (mm) e a largura das diáfises (mm) foi significativamente menor para o grupo EPY+OVX e a distância entre epífises (mm) para o grupo EST+OVX. A análise qualitativa mostrou grande presença de adipócitos na medula óssea do grupo OVX quando comparado aos outros grupos. O tecido ósseo trabecular das epífises femorais do grupo OVX apresentou porcentagem significativamente menor quando comparado aos grupos SHAM e EST+OVX, enquanto que o grupo EPY+OVX foi similar a todos os grupos experimentais. A quantidade de osteócitos na matriz mineralizada foi significativamente maior no grupo EPY+OVX quando comparado ao grupo EST+OVX. A viabilidade de células osteoblásticas MC3T3-E1 foi positiva para concentrações mais baixas do extrato da pitaya. Os dados obtidos sugerem que a administração do extrato da pitaya pode favorecer o metabolismo do tecido ósseo em ratas ovariectomizadas, sendo um potencial fitoestrógeno a ser utilizado como coadjuvante no tratamento da osteoporose.

Palavras-chave: Osteoporose, Estrógeno, Extrato da pitaya, Ratas.

ABSTRACT

Osteoporosis is a multifactorial disease of high prevalence in the population, leading to the loss of bone mass and an imbalance in bone remodeling. The association between this imbalance and estrogen deficiency that occurs in menopausal women is still investigated, suggesting that the reduction in estrogen production by the body itself after menopause favors oxidative stress with consequent change in the functional activity of bone cells. Evidence shows that phytoestrogens can be used as an alternative treatment for postmenopausal osteoporosis due to their ability to bind to estrogen receptors in the body, which would lead to an increase in the rate of deposition and reducing the rate of bone resorption, in addition to having an antioxidant effect, acting to protect cells against the effects caused by reactive oxygen species (ROS). Therefore, the purpose of the present investigation was to evaluate the effect of pitaya extract (EPY) compared to β -estradiol (EST), on the viability of osteoblastic and on femoral bone loss in rats submitted to an experimental model of osteoporosis. For in vivo analysis, Sprague-Dawley rats will be divided into a control group (SHAM) and a group with experimental osteoporosis induction. These two groups will be subdivided into three groups: i) Water administration; ii) Administration of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of β -estradiol; iii) Administration of 200 mg/kg EPY. This administration took place immediately after ovariectomy for 12 weeks and then euthanasia was performed with the samples collected for qualitative and quantitative histological analysis. The MC3T3-E1 cell viability was performed with a dose-response MTT assay. The data obtained were statistically analyzed by the Graph Pad Prism 5.0 software

with a significance level of 5%. There was a significant increase in body weight gain of the animals from the OVX group and similar values for SHAM, EST+OVX, and EPY+OVX groups. The total weight of femoral bones was similar to all groups, whereas the femur head diameter and diaphysis width were significantly decreased for the group EPY+OVX and femur length was decreased in the EST+OVX group. Histological qualitative analysis showed a great presence of adipocytes in the bone marrow of the OVX group when compared to the other groups. The trabecular bone of the femoral epiphysis of the OVX group was significantly decreased when compared to SHAM e EST+OVX groups, whereas EPY+OVX was similar to all other groups. The number of osteocytes/histological fields was significantly higher in the group EPY+OVX when compared to EST+OVX. The viability of osteoblastic cells MC3T3-E1 was positive for lower concentrations of pitaya extract. Data obtained suggest that the administration of pitaya extract may benefit the metabolism of bone tissue in ovariectomized rats, being a potential phytoestrogen to be utilized as a coadjuvant in the treatment and prevention of osteoporosis.

Key words: Osteoporosis, Estrogen, Dragon Fruit, Rats

LISTA DE FIGURAS/ QUADROS

Figura 1: Delineamento experimental in vivo.....	23
Figura 2: A: Ovariectomia realizada nas ratas do grupo induzido à osteoporose (OVX) ilustrando a incisão cirúrgica, B: exposição do ovário, C: remoção do ovário, e D aspecto final após sutura	26
Figura 3: A: Aplicação do estrógeno, B: Administração do extrato da pitaya.....	27
Figura 4: Imagem representativa da análise da contagem de trabéculas ósseas pelo programa ImageJ.....	30
Figura 5: Exposição dos cornos uterinos. (A) Corno uterino saudável de rata do grupo SHAM, (B) Corno uterino atrofiado de rata bilateralmente ovariectomizada.....	33
Figura 6: Gráfico ilustrando os resultados dos pesos corporais dos grupos SHAM, OVX, EST + OVX e EPY + OVX.....	34
Figura 7: Gráficos ilustrando as mensurações da cabeça do fêmur, distância entre epífises, largura da diáfise e peso total.....	36
Figura 8: Cortes Histológicos do osso trabecular da epífise de fêmures de animais dos grupos SHAM, OVX, EST + OVX e EPY + OVX.....	38
Figura 9: Cortes Histológicos do osso trabecular da epífise de fêmures de animais dos grupos SHAM, OVX, EST + OVX e EPY + OVX.....	39
Figura 10: Cortes Histológicos do osso trabecular da epífise de fêmures de animais dos grupos SHAM, grupo OVX, grupo EST + OVX e o grupo EPY + OVX.	40
Figura 11: Análise quantitativa da porcentagem de osso trabecular, tecido conjuntivo e osteócitos obtida das imagens histológicas dos fêmures dos grupos SHAM, OVX, EST + OVX e EPY + OVX.....	42

Figura 12: Curva dose-resposta de células da linhagem MC3T3-E1 expostas à concentrações de 30 a 200 ug/ml de extrato da pitaya, para comparação com o controle e com o Triton.....43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Delineamento experimental.....	23
3.2. Extrato da pitaya.....	23
3.3. Experimentos in vivo	24
3.3.1 Animais e cálculo amostral.....	24
3.3.2 Indução de osteoporose	24
3.3.3 Grupo SHAM	26
3.3.4 Administração in vivo do beta-estradiol e do extrato da pitaya.....	27
3.3.5 Eutanásia dos animais e coleta do material	27
3.3.6 Dimensões anatômicas dos fêmures e seu peso absoluto.....	28
3.3.7 Análise histológica qualitativa e quantitativa.....	28
3.3.8 Análise da viabilidade celular por dose-resposta.....	30
3.3.9 Forma de análise dos resultados.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia.....	33
4.2 Peso Corporal	34

4.3 Medição das dimensões anatômicas dos fêmures e seu peso absoluto.....	35
4.4 Análise histológica qualitativa.....	37
4.5 Análise histológica quantitativa.....	41
4.6 Viabilidade celular da linhagem MC3T3-E1 em relação a diferentes doses do extrato de pitaya.....	43
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

O processo biológico de envelhecimento é caracterizado por um declínio progressivo na função celular e aptidão corporal do indivíduo, aumentando a probabilidade de risco de doenças associadas à idade (Kong et al., 2014). O aumento progressivo da expectativa de vida traz consigo algumas adversidades relacionadas à carga de doenças debilitantes prevalentes na população idosa, e que afetam negativamente o envelhecimento saudável, como por exemplo, a osteoporose (Vatner et al., 2020), que é vista como uma doença caracterizada pela diminuição da massa e ruptura da arquitetura óssea, comprometendo sua resistência e aumentando o risco de fraturas. Considerada uma doença silenciosa, uma vez que geralmente não apresenta sintomas até que ocorra a primeira fratura, suas complicações associadas são causas comuns de morbidade e mortalidade em idosos. Acometendo ambos os sexos, as mulheres devem ser monitoradas para osteoporose a partir dos 65 anos, já os homens devem se preocupar quando fatores de risco estão presentes (Johnston e Dagar, 2020).

O estresse oxidativo, também conhecido como dano oxidativo, é um evento provocado quando ocorre o acúmulo de radicais livres no corpo o qual não se pode ser processado gradualmente ou em caso de pouca disponibilidade da proteção antioxidante natural do corpo, implicando em danos aleatórios e indiscriminados a uma ampla gama de biomoléculas (Halliwell, 2007), sendo capaz de inibir a diferenciação de células ósseas (Mody et al., 2001), implicando assim impreterivelmente na osteoporose pós-menopausa (Zhao et al., 2021). Assim, a proteção contra o estresse oxidativo é um dos

principais mecanismos de mediação do aumento da longevidade e qualidade de vida (Vatner et al., 2020).

Atualmente, a escolha da terapia para tratamento de pacientes com osteoporose, na grande maioria das vezes é de cunho farmacológico, sendo o bisfosfonato o medicamento de primeira escolha (Johnston e Dagar, 2020). Contudo, a literatura demonstra que a utilização específica dessa medicação pode apresentar efeitos colaterais graves, como efeitos adversos gastrointestinais, reação à infusão, hipocalcemia, artralgia, mialgia, efeitos adversos oculares, fraturas atípicas do fêmur e osteonecrose da mandíbula (Ganesan et al., 2020). Pensando-se nos efeitos colaterais da terapia medicamentosa, os produtos naturais têm sido um aliado terapêutico complementar na medicina tradicional de muitos países (John et al., 2020).

Segundo exposto por Ceverino et al. (2021), substâncias naturais com efeitos antioxidantes podem beneficiar a prevenção e o tratamento de doenças ósseas após a menopausa, como a osteoporose. Seu estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* da pré-administração de extrato da erva-mate no metabolismo de osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 quando expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), concluindo que a administração desse extrato, pode possibilitar a manutenção da matriz extracelular na presença de estresse oxidativo. Assim, um interesse crescente tem sido observado nos antioxidantes naturais como os flavonoides que incluem flavonóis (quercetina), flavonas (luteolina), flavanonas (naringenina), antocianidinas (cianidina) e isoflavonas (genisteína), além de compostos não flavonóides como estilbenos, chalconas, lignanas e cumarinas (Teixeira et al., 2019).

Por serem consideradas fontes valiosas de ingredientes funcionais com alto teor fitoquímico (particularmente ácidos fenólicos e flavonoides), com atividade antioxidante, anti-inflamatória, prebiótica, antimicrobiana e quimiopreventiva, algumas frutas vêm sendo estudadas para aplicação de seus extratos na prevenção e tratamento de doenças crônicas como a osteoporose (Chang et al., 2019). Além de níveis extremamente elevados de antioxidantes, fibras, vitaminas, minerais e outros nutrientes que contribuem para a melhora da saúde, elas também têm sido alvo de interesse da indústria como fonte de novos sabores para os consumidores (Dembitsky et al., 2011; Yamaguchi et al., 2015).

A pitaya vermelha (*Hylocereus polyrhizus*), vulgarmente conhecida como a fruta do dragão, originária da América Latina, é um membro da família Cactaceae (Stintzing et al., 2002). Os membros dessa família são principalmente apreciados por suas qualidades ornamentais, existindo pelo menos 250 espécies frutíferas cultivadas com a característica benéfica de serem resistentes à seca (Le Bellec et al., 2006). Conhecida por suas propriedades fármaco-terapêuticas e nutracêuticas, a pitaya é identificada como um alimento funcional. Seus fitoconstituintes podem ser extraídos da polpa, casca e sementes da fruta, sendo conhecida por ser uma rica fonte de betacianina, vitamina C e licopeno (Joshi e Prabhakar, 2020). A fruta do dragão vermelha tem forte potencial como antioxidante para reduzir a formação de radicais livres (Harahap e Amelia, 2019).

Estudos recentes realizados com essa fruta revelaram ter a pitaya vermelho-púrpura, um perfil útil como um corante natural para alimentos (Lima

et al., 2020). No estudo de Lira et al. (2020), com a polpa e a casca da pitaya, descobriu-se que o material possui efeito ansiolítico por meio do sistema GABAérgico, o que sugere que a fruta tem potencial como uma terapia ansiolítica alternativa natural, sendo sua casca, a qual normalmente é descartada durante seu processamento e acaba como resíduo e fonte de poluição, ter valor como potencial ingrediente para transtornos de ansiedade (Lira et al., 2020). Assim, resíduos descartados podem ter um alto teor nutritivo, incluindo componentes enzimáticos, fibras, óleo de semente, pectina, compostos cítricos além de fitoquímicos valiosos para o uso terapêutico. Além disso, a utilização destes resíduos colabora também com a redução dos problemas ambientais, ajudando na sustentabilidade de países produtores tropicais (Sharma e Kaur, 2017; John et al., 2020).

Existem poucos estudos sobre os efeitos in vivo/in vitro do extrato da pitaya nas células e tecido ósseo. Entre eles, Hartono et al. (2020) observaram que o extrato da polpa da pitaya vermelha favoreceu a proliferação e diferenciação de células mesenquimais da medula óssea de coelhos. Ainda assim, é incipiente a publicação de dados referentes ao efeito destes compostos em ossos longos com os parâmetros propostos neste projeto. Diante do exposto, temos duas hipóteses: 1) de que o extrato da pitaya possa atuar nas células osteogênicas com efeito semelhante ao do β -estradiol, impedindo a injúria na atividade proliferativa de células osteoblásticas e 2) que o extrato da pitaya favoreça uma diminuição da perda óssea em ratas submetidas a um modelo experimental de osteoporose com efeitos semelhantes à terapia estrogênica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente projeto foi avaliar por meio de parâmetros bioquímicos e morfológicos, o potencial do extrato da pitaya na atividade proliferativa de células osteoblásticas e na remodelação óssea de ratas ovariectomizadas quando comparado ao estrógeno.

2.2. Objetivos específicos

Os parâmetros in vivo analisados para todos os grupos experimentais foram:

- ✓ Ganho de peso corporal.
- ✓ Mensuração dos fêmures: diâmetro da cabeça do fêmur (mm), distância entre epífises (mm), largura das diáfises (mm) e peso (g).
- ✓ Análise histológica qualitativa do tecido ósseo das epífises femorais dos animais (tecido ósseo trabecular, tecido conjuntivo e osteócitos).
- ✓ Análise histológica quantitativa do tecido ósseo das epífises femorais dos animais (tecido ósseo trabecular, tecido conjuntivo e número de osteócitos).

O parâmetro in vitro analisados para todos os grupos experimentais foi:

- ✓ Viabilidade celular em estudo de dose-resposta com células osteoblásticas MC3T3-E1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

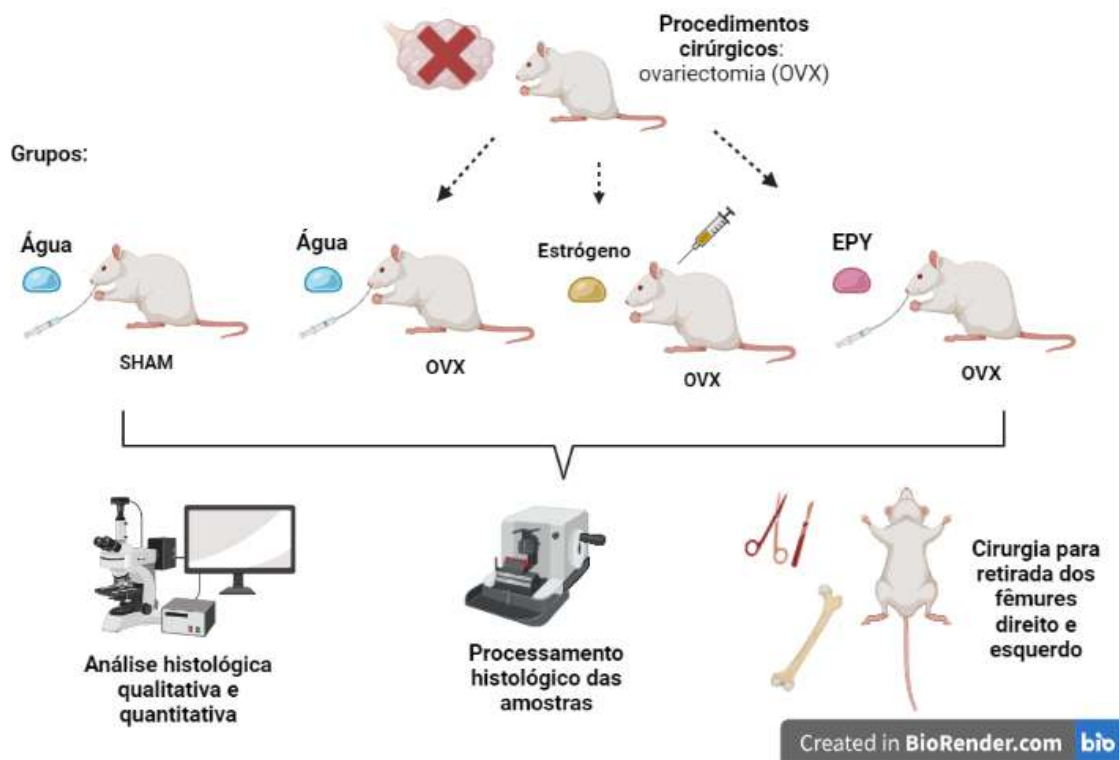


Figura 1. Delineamento experimental in vivo. Criado com Biorender.com

3.2. Extrato da pitaya

O extrato da pitaya foi gentilmente fornecido pela pesquisadora Dra. Ana Paula Dionísio, da área de processos agroindustriais na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Unidade Agroindústria Tropical - CNPAT - EMBRAPA (Fortaleza - CE). O extrato foi obtido de acordo com o protocolo de Lima et al. (2020), onde o processo segue um tratamento enzimático da polpa, seguida de microfiltração e concentração a vácuo. Inicialmente, a polpa de pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) foi tratada com Pectinex® Ultra AFP (2000 mg L⁻¹, a 40 °C, durante 45 min, a 150 rpm), em Shaker (Marca New Brunswick™

Innova® 44, modelo Incubador Shaker Series), com inativação enzimática a 80 °C por 5 minutos. Após, a polpa foi filtrada através de um sistema de microfiltração composto por quatro módulos de membrana cerâmica tubular dispostos em série (indústria Pall, modelo Membralox, Saint-Germain-en-Laye, França) (0,2 µm de diâmetro dos poros) com coleta da parte permeada do processo. Depois, essa parte permeada foi concentrada até 63 °Brix em concentrador a vácuo (Tecnint). A temperatura de evaporação foi de 40 ± 5 °C, pressão de vácuo de 700 mmHg. O extrato da pitaya (EPY) foi armazenado a 7 °C (± 2 °C) e submetido a análises específicas.

3.3. Experimentos in vivo

3.3.1. Animais e cálculo amostral

Foi realizado cálculo amostral, à priori, utilizando a calculadora cleancalc.com/stats/samplesize.aspx. Para realizar o cálculo, utilizamos valores da média de trabéculas ósseas do fêmur do artigo de Oliveira et al. (2019) como variável primária (grupos Sham + licopeno 30,5±8,3 e OVX + licopeno 22,5±6,0). Considerando o poder do teste de 80% e nível de significância de 5%, foi definido o número de 9 animais por grupo. Assim, após a aprovação do projeto no Comitê de Ética no uso de animais da FORP-USP (protocolo 0024/2021R1), foram utilizado um total de 36 ratos para os experimentos.

3.3.2. Indução de osteoporose

Foram utilizadas ratas Sprague-Dawley para este experimento. Seguindo o protocolo de Hsu et al. (2016) e de Hara et al. (2001), os animais foram

ovariectomizados com 8 semanas, bilateralmente. Primeiramente, eles foram pesados e então anestesiados com a solução anestésica de Dopaser (Xylazina) - sedativo, analgésico e relaxante muscular; e Ketamina Agener (Ketamina) - anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA - Campinas, SP, Brasil, na proporção de 10mg/Kg e 75mg/Kg de cetamina respectivamente, injetada por via intramuscular. Também foi feita a aplicação em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, de uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas. Após a anestesia os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais. Foi feita a assepsia dos locais incisionados com álcool iodado (PVPI). Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários e excisão dos mesmos (Kalu, 1991). Foi realizada a sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil) e uma dose de 1,1mg/Kg de anti-inflamatório e analgésico flunixin meglumina (Banamine Pet Injetável, Schering-Plough Coopers Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por 12 semanas e receberam ração e água ad libitum. Os animais operados ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana. A comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia foi feita pelo exame do ciclo estral, peso uterino

e exame macroscópico dos cornos uterinos (Hoar e Hickman, 1975; Marcondes et al., 2002). Além disso, os animais foram pesados semanalmente para a análise da influência dos tratamentos no seu ganho de peso.

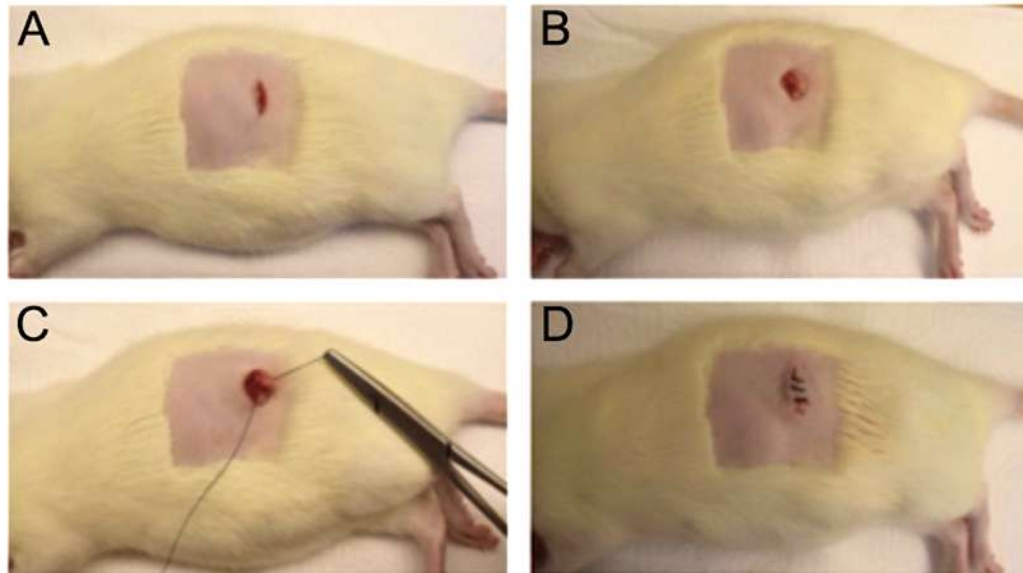


Figura 2. Imagens da ovariectomia realizada, ilustrando a incisão cirúrgica (A), exposição do ovário (B), remoção do ovário (C), e aspecto final após sutura (D). Crédito da imagem: Vargas-Sanchez PK, 2019.

3.3.3. Grupo SHAM

Os animais do grupo controle/sham foram submetidos ao procedimento, com anestesia, de exposição dos ovários e sutura dos tecidos. Receberam também, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil) e uma dose de 1,1mg/Kg de anti-inflamatório e analgésico flunixinina meglumina (Banamine Pet Injetável, Schering-Plough Coopers Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os animais receberam ração e água *ad libitum* e ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana.

3.3.4. Administração in vivo do beta-estradiol e do extrato da pitaya

O extrato da pitaya na concentração de 200 mg/kg (Harahap et al., 2019) foi diluído em água destilada e o estrógeno (B-Estradiol, Sigma) na concentração de 20 ug/kg (Zhang et al., 2019) foi diluído em óleo mineral. A administração da água destilada e do extrato da pitaya foi feita por gavagem (sonda gástrica) por um período de 12 semanas imediatamente após o procedimento de ovariectomia, a cada dois dias. O estrógeno foi administrado por via subcutânea no mesmo período de tempo. Assim, os grupos experimentais foram divididos em: *controle (SHAM)*, *ovariectomizado (OVX)*, *estrógeno + OVX (EST+OVX)* e *extrato da pitaya + OVX (EPY + OVX)*.

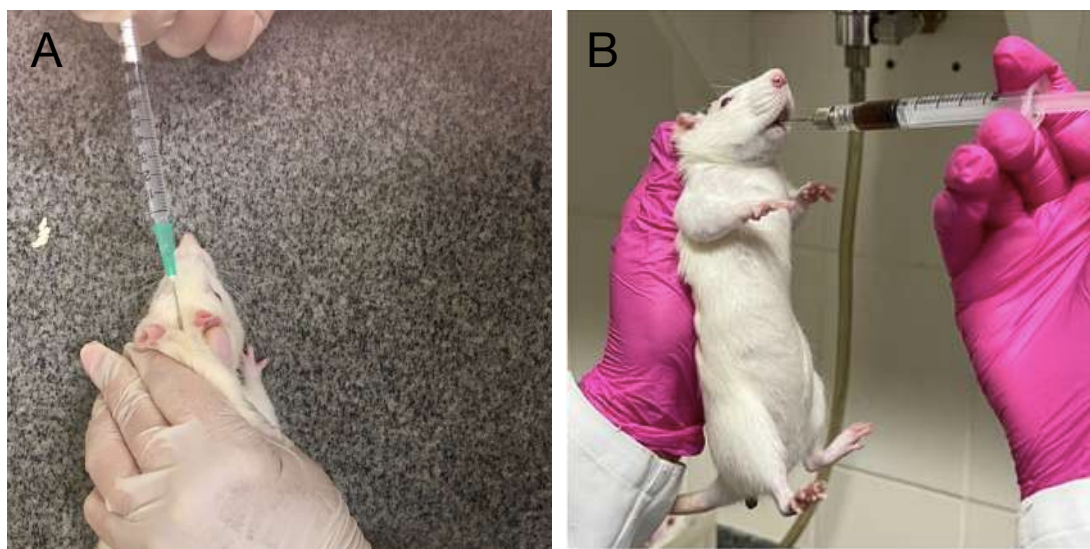


Figura 3A. Aplicação do estrógeno e **3B.** Administração do extrato da pitaya (Imagem realizada e cedida por Sayuri Poli Suguimoto, mestrandia do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral da FORP- USP, 2022).

3.3.5. Eutanásia dos animais e coleta do material

As ratas foram eutanasiadas após 12 semanas da cirurgia de ovariectomia por meio de anestesia, seguindo o protocolo de Hara et al. (2001) e de Hsu et al. (2016) nas mesmas doses indicadas no item 3.3.2., seguida por

decapitação. Após a eutanásia, foi realizada a coleta dos fêmures para a realização de avaliações descritas a seguir.

3.3.6. Dimensões anatômicas dos fêmures e seu peso absoluto

Os fêmures coletados foram mantidos em paraformaldeído a 4% para fixação e então foi realizada a mensuração do peso absoluto dos fêmures, baseando-se na metodologia de Souza et al. (2021). Toda a musculatura e tendões do fêmur foram removidos e, quando limpo, foi realizada a sua pesagem em balança analítica (M214Ai, Bel Engineering, Milano, Itália), sendo esse o peso absoluto (em g). Após a pesagem dos fêmures foi realizada a medição das dimensões (em mm) apresentadas com o auxílio de um paquímetro analógico (MAUb Stainless, Polônia). Para as medições foram usadas estruturas anatômicas como referência e padronização, sendo três dimensões mensuradas: 1) distância da cabeça do fêmur ao côndilo medial, 2) diâmetro da diáfise e 3) diâmetro da cabeça do fêmur.

3.3.7. Análise histológica qualitativa e quantitativa

Os fêmures foram imersos em formaldeído a 4% tamponado, por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M, e as soluções foram trocadas a cada dois dias. Após o período de descalcificação, que poderá variar de quinze a trinta dias, a ação do ácido foi neutralizada em uma solução de sulfato de sódio a 5%, por vinte e quatro horas. Após esse período os fêmures foram desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram, então,

realizados cortes semi-seriados longitudinais de 6 μm em toda a espessura da amostra. Os cortes foram corados em hematoxilina-eosina, que permite a avaliação morfológica do tecido ósseo neoformado. A análise qualitativa das lâminas permitiu avaliar o tecido ósseo em remodelação nos grupos experimentais, assim como do tecido conjuntivo medular. Foi utilizado um microscópio de luz Leica DM 4000B, acoplado a uma câmera digital de vídeo Leica EC3 para captura das imagens as quais foram analisadas em objetivas de 20x e 40x. Foram confeccionadas lâminas com cortes semi-seriados dos fêmures com um intervalo de distância de 25 μm . A quantificação de trabéculas ósseas, osteócitos e tecido conjuntivo das epífises femorais foi realizada com auxílio do software ImageJ aplicando-se um sistema teste (grade) nas imagens histológicas coradas pelo método de hematoxilina-eosina contando os pontos que recaíssem sobre as respectivas estruturas (imagem 4). Foram utilizadas 40 imagens por grupo, totalizando 160 imagens.

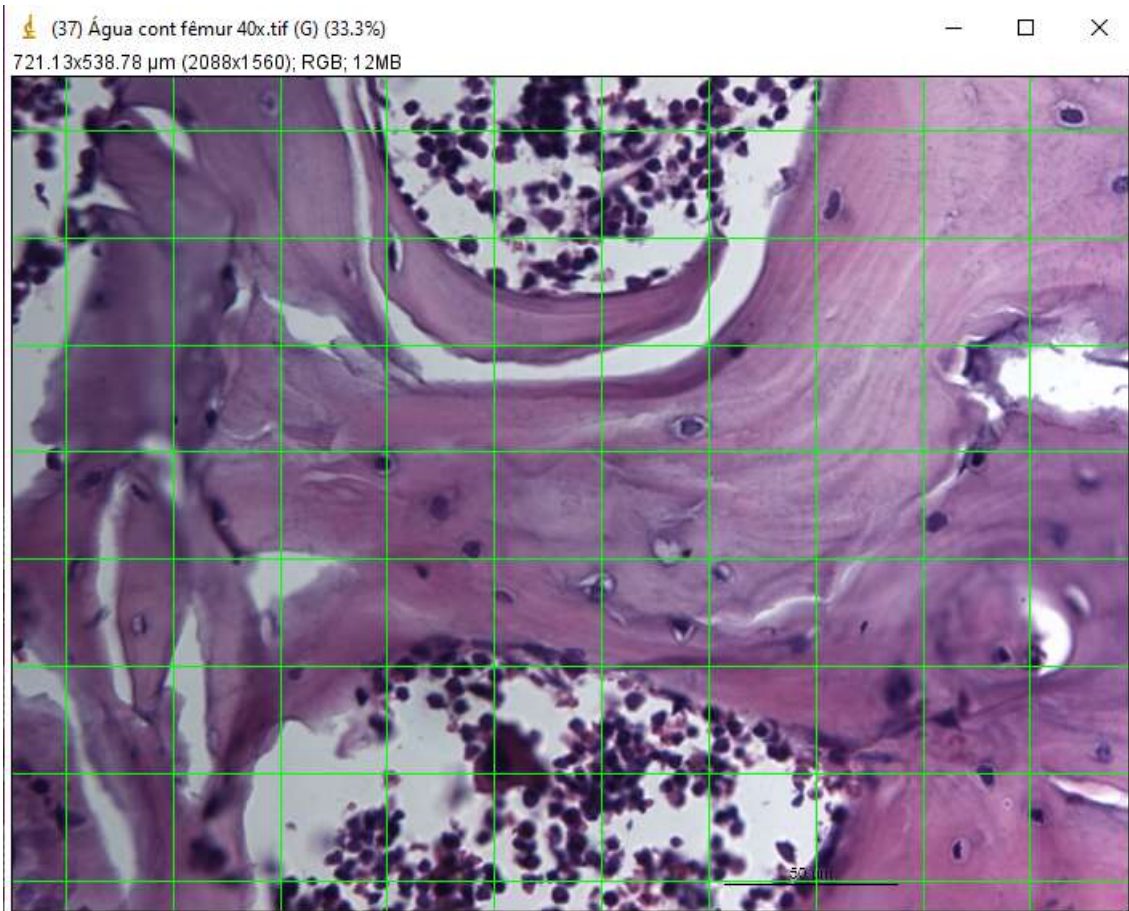


Figura 4. Imagem representativa da análise da contagem de trabéculas ósseas, tecido conjuntivo e osteócitos pelo programa ImageJ.

3.3.8. Análise da viabilidade celular por dose-resposta

Para a análise da viabilidade de células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, foi realizada de uma curva dose-resposta, visto que não haviam dados na literatura em que se utilizassem esses fitoestrógenos em cultura destas células. Para isso, as mesmas foram cultivadas em garrafas de 75 cm² contendo 15 mL de meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina, com troca do meio a cada 48 horas até a obtenção de 70% de subconfluência. As células foram mantidas em atmosfera umidificada a 37°C contendo 95% de ar atmosférico e 5% de

CO₂ durante a expansão e, posteriormente, na diferenciação. Ao atingir a subconfluência as células foram então removidas das garrafas com solução de EDTA 1mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco), plaqueadas em placas de 96 poços com densidade de plaqueamento igual a 1x10⁴ células por poço (n=4), com utilização de meio osteogênico (suplementado com 1% de solução de ácido ascórbico e β-glicerofosfato). Para a obtenção da curva dose-resposta foram testadas diferentes concentrações de extrato da pitaya variando de 30 µg/mL a 500 µg/mL, com a utilização de um grupo controle positivo (sem adição de tratamento) e um controle negativo (com adição de 1% de Triton (Triton X-100, Sigma, Alemanha). Após 48 horas a partir do plaqueamento foram realizados ensaios para avaliação da viabilidade celular (MTT). Para isso, foi removido o meio de cultura dos poços e então as células foram incubadas com solução de MTT em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo de 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, a solução foi removida dos poços e estes lavados com 200 µL de solução PBS aquecida. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de isopropanol ácido em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. A medição colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro (*µQuant, Bio-tek Instruments, Inc.*) a 570nm. Os valores obtidos foram submetidos à análise estatística através do *software GraphPad Prism 5.0*. Foram realizadas três repetições do ensaio conforme descrito da metodologia acima.

3.3.9. Forma de análise dos resultados

Os dados quantitativos foram tabulados e submetidos a teste de avaliação de normalidade (Shapiro-Wilk webversion). Sendo assim, puderam ser utilizados testes paramétricos (ANOVA) seguido de pós-teste para comparações múltiplas entre os grupos. O nível de significância foi de 5%, com a utilização do software GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

4.1. Comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia

Durante a coleta dos fêmures e mandíbulas no momento da eutanásia foi realizada a exposição dos cornos uterinos para comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia. Os cornos uterinos apresentavam-se atrofiados quando comparados aos cornos das ratas do grupo SHAM, como demonstrado na figura 3. Na imagem é possível observar uma maior quantidade de tecido adiposo na região abdominal da rata ovariectomizada quando comparada à rata do grupo SHAM, o que corrobora os dados apresentados no item 4.2, onde foi possível observar que ratas submetidas ao procedimento de ovariectomia e, conseqüentemente, osteoporose experimental, apresentam um maior ganho de massa corporal.

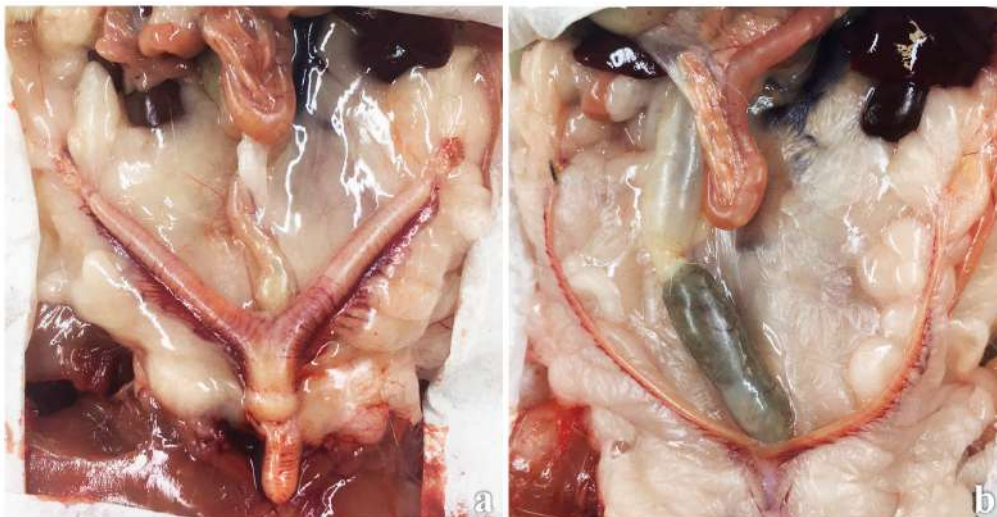


Figura 5. Exposição dos cornos uterinos. **(A)** Corno uterino saudável de rata do grupo SHAM. **(B)** Corno uterino atrofiado de rata bilateralmente ovariectomizada. (Imagem realizada e cedida por Maria Carolina Coelho, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral da FORP- USP, 2022.)

4.2. Peso corporal

Pode ser observado na Figura 6 que não houve diferença significativa para os pesos entre os grupos SHAM, EST + OVX e EPY +OVX. O grupo OVX apresentou aumento significativo de peso corporal médio quando comparado aos demais grupos experimentais ($p < 0,001$).

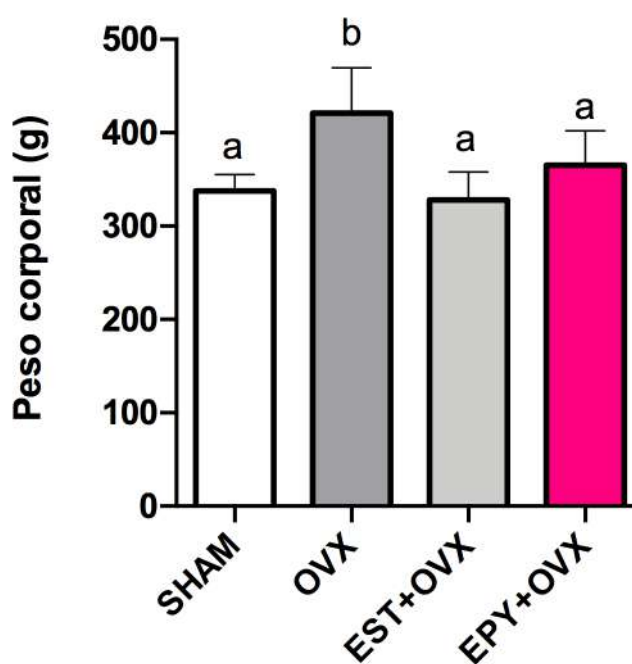


Figura 6. Gráfico ilustrando os resultados dos pesos corporais dos grupos SHAM, OVX, EST + OVX e EPY + OVX. Análise estatística ANOVA para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.3. Medição das dimensões anatômicas dos fêmures e seu peso absoluto

A Figura 7 ilustra os resultados obtidos em relação ao diâmetro da cabeça do fêmur (mm), distância entre epífises (mm) largura das diáfises (mm) e peso (g). Foi observado que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais na mensuração do diâmetro da cabeça do fêmur direito ($p=0,208$). Já o diâmetro da cabeça do fêmur esquerdo foi significativamente menor no grupo EPY+OVX quando comparado aos outros grupos experimentais ($p<0,01$).

Com relação à distância das epífises femorais direitas não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($p=0.240$). Já com relação à distância das epífises femorais esquerdas a diferença estatística foi similar para os grupos SHAM, OVX e EPY+OVX, e o grupo EST+OVX teve a diferença estatística similar aos grupos SHAM e EPY + OVX ($p<0,05$).

A diferença estatística em relação à largura da diáfise direita foi similar entre os grupos SHAM, OVX e EST+OVX, e também entre os grupos OVX e EPY + OVX ($p<0,05$). Com relação à largura das diáfises esquerdas não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($p=0,980$).

A análise do peso do fêmur direito e esquerdo nos evidenciou que não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,333$).

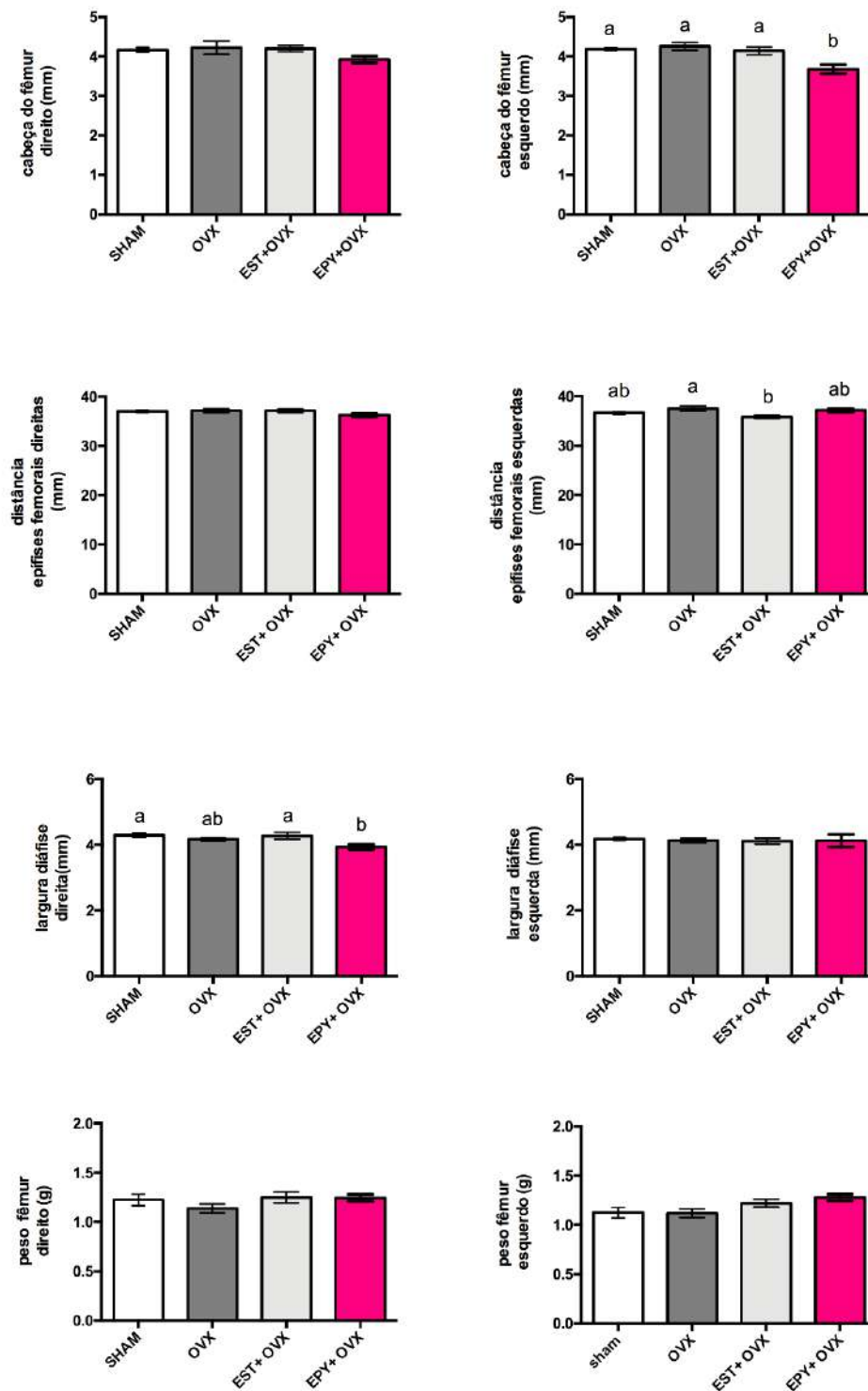


Figura 7. Gráficos ilustrando as mensurações da cabeça do fêmur, distância entre epífises, largura da diáfise e peso total. Análise estatística ANOVA para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística para $p < 0,05$.

4.4. Análise histológica qualitativa

A Figura 7 mostra o campo histológico representativo das epífises femorais do fêmur dos grupos selecionados. A análise qualitativa do tecido ósseo localizado nas epífises femorais do grupo SHAM mostrou um tecido ósseo com trabéculas densas, conectadas, com osteócitos em lacunas e osteoblastos revestindo sua superfície. Também foi observado a presença de alguns adipócitos em tecido conjuntivo medular com células progenitoras e megacariócitos.

Já no grupo OVX, observou-se um trabeculado ósseo mais delgado, desconectado e esparso, com predominância de tecido conjuntivo no qual podemos notar a grande presença de adipócitos. O grupo EST+OVX apresentou características histológicas similares ao grupo SHAM, com o tecido ósseo organizado em matriz densa preenchida por osteócitos e tecido conjuntivo medular bem constituído. O grupo EPY+OVX mostrou grande similaridade com os grupos SHAM e EST+OVX, salvo pela maior presença de adipócitos no tecido conjuntivo. Entretanto, este grupo apresentou trabéculas ósseas mais densas e organizadas quando comparado ao grupo OVX.

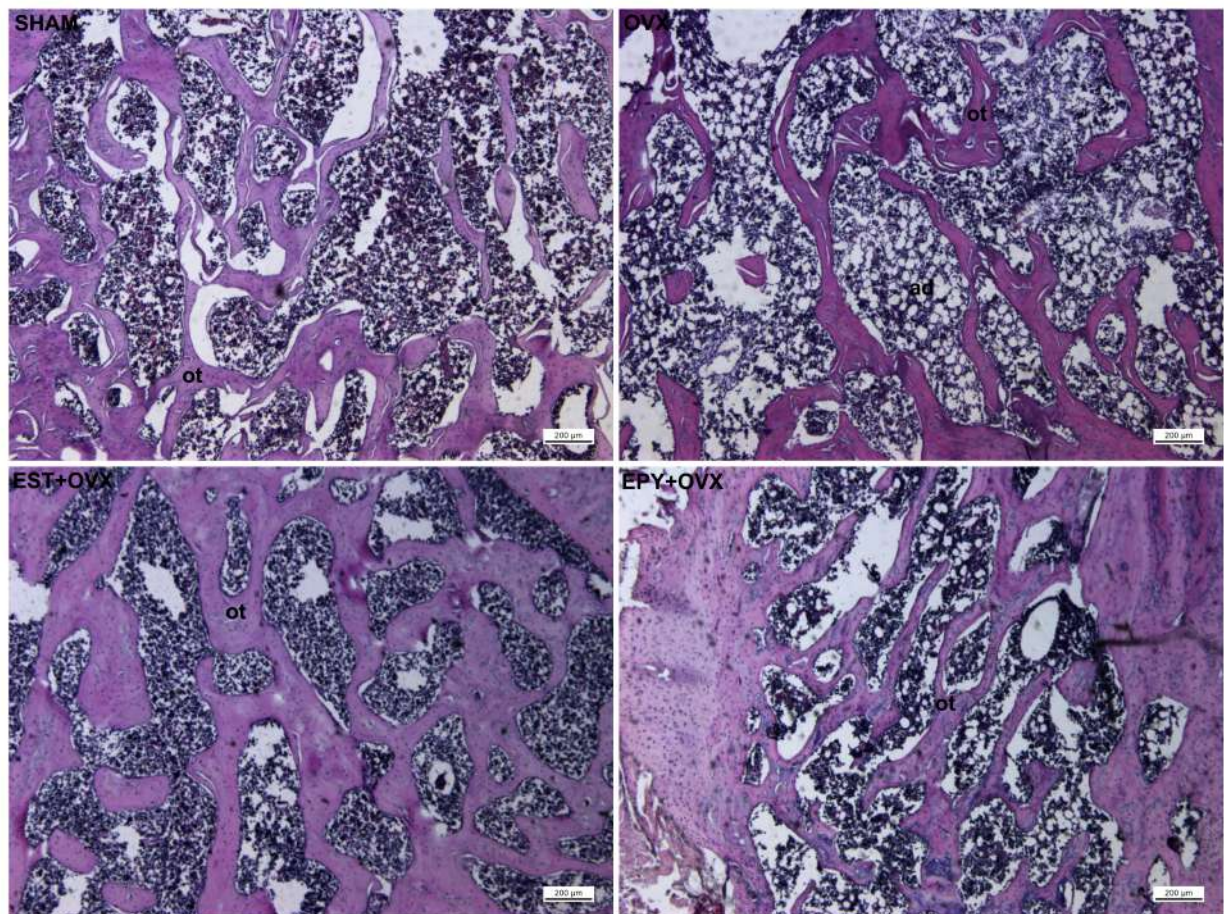


Figura 8. Cortes Histológicas do osso trabecular da epífise de fêmures de animais dos grupos SHAM, OVX, EST + OVX e EPY + OVX. Hematoxilina e Eosina (H&E). Barra: 200 µm. São observados osso trabecular (**ot**) tecido conjuntivo/medula óssea (**tc**) e adipócitos (**ad**).

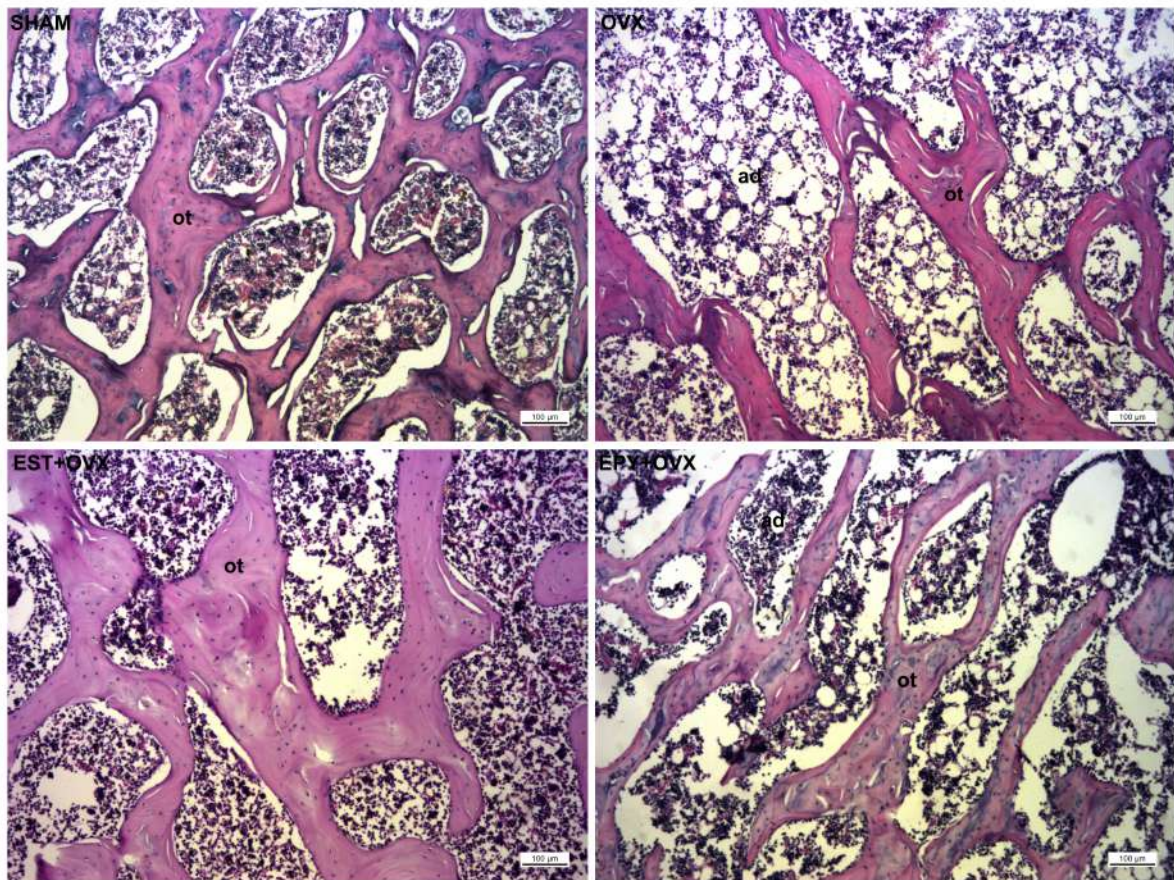


Figura 9. Cortes Histológicos do osso trabecular da epífise de fêmures de animais dos grupos SHAM, OVX, EST + OVX e EPY + OVX. Hematoxilina e Eosina (H&E). Barra: 200 µm. São observados osso trabecular (**ot**) tecido conjuntivo/medula óssea (**tc**) e adipócitos (**ad**).

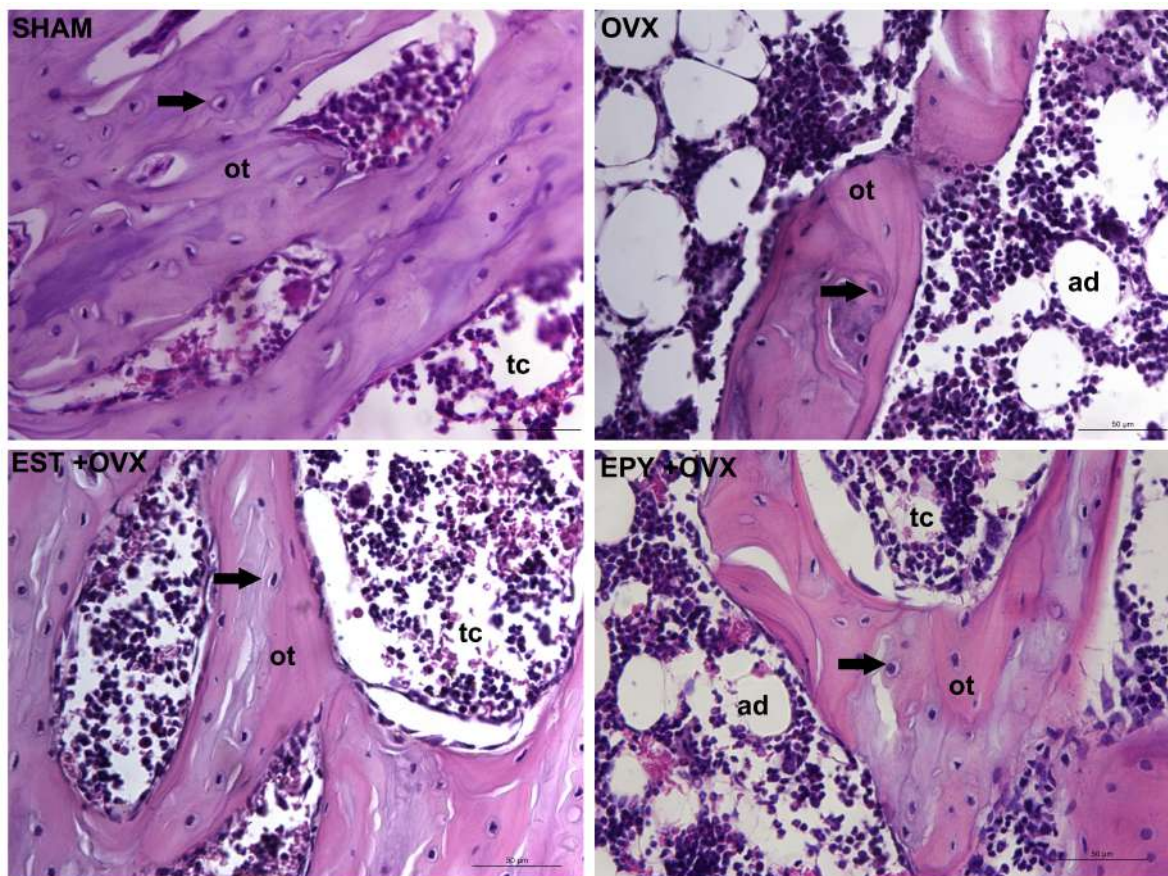


Figura 10. Cortes Histológicos do osso trabecular da epífise de fêmures de animais dos grupos SHAM, grupo OVX, grupo EST + OVX e o grupo EPY + OVX. Hematoxilina e Eosina (H&E). Barra: 50 µm. São observados osso trabecular (ot) exibindo vários osteócitos (seta), tecido conjuntivo/medula óssea (tc) e adipócitos (ad).

4.5. Análise histológica quantitativa

A Figura 11 mostra os resultados obtidos na histomorfometria para a quantificação de porcentagem de trabéculas ósseas, tecido conjuntivo e osteócitos por campo histológico.

Foi observado que a porcentagem de osso trabecular foi significativamente menor no grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM e ao grupo EST+OVX. Já os grupos EST+OVX e SHAM mostraram porcentagens de trabéculas similares entre si e também com relação ao grupo EPY+OVX, o qual por sua vez apresentou similaridade estatística também com o grupo OVX ($p < 0,05$).

A porcentagem de osteócitos foi maior para o grupo EPY+OVX quando comparado aos grupos SHAM e EST+OVX, porém similar ao grupo OVX, sendo este similar com os grupos SHAM e EST+OVX, sendo apresentada também similaridade estatística entre ambos esses dois grupos. ($p < 0,001$).

A porcentagem de tecido conjuntivo foi maior para o grupo OVX, e similar entre os grupos SHAM e EST+OVX, sendo o grupo EPY+OVX apresentando sua porcentagem similar a todos os grupos ($p < 0,01$).

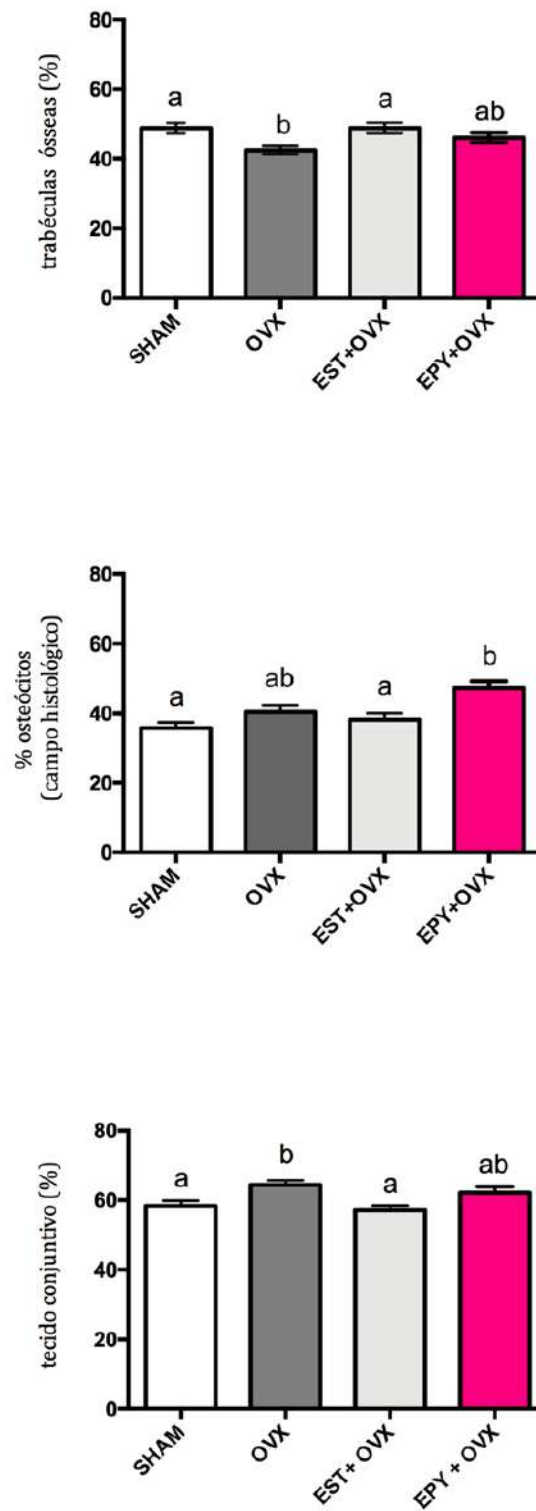


Figura 11. Análise quantitativa da porcentagem de osso trabecular, tecido conjuntivo e osteócitos obtida das imagens histológicas dos fêmures dos grupos SHAM, OVX, EST + OVX e EPY + OVX. Análise estatística ANOVA para $p < 0,05$. Letras diferentes indicam diferença estatística para $p < 0,05$.

4.6. Viabilidade celular da linhagem MC3T3-E1 em relação a diferentes doses de extrato da pitaya

Os resultados obtidos através do ensaio de viabilidade celular (absorbância 570nm) foram analisados para avaliação da dose que mantém 80% das células vivas em cultura, além da análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis ($p \leq 5\%$). Na Figura 12 é possível observar que as doses testadas de extrato da pitaya não foram tóxicas para as células, visto que em nenhuma dose houve o decaimento considerável da viabilidade celular quando comparados aos controles positivo e negativo. Ainda foi possível observar que as concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ de extrato da pitaya aumentaram a viabilidade com valores próximos ou maiores ao do grupo sem tratamento.

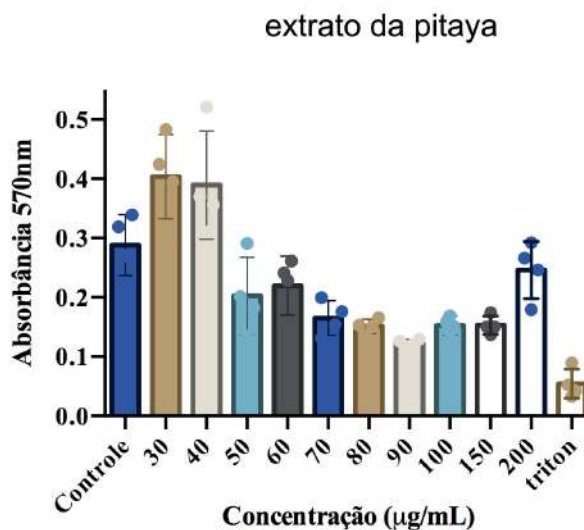


Figura 12. Curva dose-resposta de células da linhagem MC3T3-E1 expostas à concentrações de 30 a 200 $\mu\text{g/mL}$ de extrato da pitaya, para comparação com o controle e com o Triton.

5. DISCUSSÃO

A osteoporose é considerada um dos maiores problemas de saúde pública das últimas décadas, apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade devido às fraturas decorrentes da fragilidade óssea. Essa doença não é considerada apenas um problema relacionado à terceira idade, mas também à fatores intrínsecos das mulheres na pós-menopausa. Apesar da reposição hormonal estrogênica apresentar efeitos positivos, sabe-se que essa terapia hormonal pode desencadear efeitos colaterais indesejáveis como o desenvolvimento do câncer de mama e de útero. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi apresentar uma alternativa à terapia hormonal, com o uso de uma substância natural como o extrato da fruta pitaya (EPY), o qual tem grande potencial antioxidante, onde através da análise in vivo investigamos se a mesma foi capaz de estimular a atividade funcional osteoblástica e minimizar a perda de tecido ósseo em ratas com osteoporose.

Na presente proposta deste trabalho, a osteoporose foi induzida mediante a remoção dos ovários, cuja técnica já foi amplamente discutida na literatura (Deng et al., 2022; Li et al., 2022; Lorenzo, J., 2021; Liang, et al., 2018; Liu, et al., 2020; Liu et al., 2017; Semeghini et al., 2018). Este procedimento cirúrgico tem como objetivo diminuir os níveis de hormônios estrogênicos nas ratas usadas no experimento e assim simular a osteoporose pós-menopáusicas que ocorre nas mulheres adultas. Na avaliação do ganho de peso corporal entre os grupos, foi observado aumento no ganho de peso no grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM, sendo contínuo até o final do experimento, e também quando comparado ao grupo que recebeu estrógeno (EST+OVX) e ao

grupo tratado com a pitaya (EPY+OVX). Este resultado não difere dos dados obtidos em outras investigações que utilizaram o modelo de indução da osteoporose mediante a remoção dos ovários, onde pesquisadores observaram um maior ganho de peso no grupo OVX quando comparado aos demais grupos (Li et al., 2022), destacando que o grupo que recebeu o extrato da pitaya manteve o peso similar ao grupo SHAM, como já evidenciado em estudos com fitoestrógenos que os mesmos são alternativas potenciais para manter o peso (Liu et al., 2021). As mensurações realizadas no osso femoral das ratas estudadas sugerem que o procedimento de ovariectomia não influencia no peso total do fêmur, assim como os tratamentos com estrógeno e com o extrato da pitaya. Além disso, as diferenças encontradas, como por exemplo, menor diâmetro da cabeça do fêmur e largura da diáfise no grupo EPY+OVX e menor distância interepifisária no grupo EST+OVX foram observados somente em um dos lados (direito ou esquerdo). Não foram encontrados artigos na literatura que tivessem realizado estas mensurações para comparação com os presentes dados.

Sabemos que o período pós-menopausa é considerado crítico para a saúde óssea das mulheres, caracterizado por perdas de densidade óssea como descrito por diversos autores (Karlmanngla; Burnett-Bowie; Crandall, 2018; Taneja et al., 2019; Pepe et al., 2020). Tal fato pode ser corroborado com os resultados de nossa avaliação sobre a porcentagem de trabéculas ósseas por parâmetros morfológicos e histomorfométricos, metodologia já utilizada na literatura em outros experimentos para quantificação de trabéculas ósseas (Chavassieux et al., 2019). As análises qualitativa e quantitativa

mostraram que o grupo OVX apresentou uma maior perda óssea quando comparado ao grupo SHAM e ao grupo EST+OVX, comprovando o êxito do modelo experimental proposto e confirmando achados histológicos que demonstraram a redução significativa do percentual da porção trabecular da epífise do fêmur de animais do grupo OVX em comparação aos grupos SHAM, EST+OVX e EPY+OVX. Além disso pudemos comprovar uma maior quantidade de adipócitos e tecido conjuntivo no grupo OVX.

O grupo EPY+OVX apresentou menor perda de trabéculas ósseas quando feita a análise qualitativa, mas na análise quantitativa fica evidenciado que o extrato da pitaya não causou efeito significativo para estabilização da perda óssea quando comparado com o uso do b-estradiol. Esta observação pode ser feita pelo fato deste grupo ser estatisticamente similar aos grupos SHAM, OVX e EST+OVX.

A análise histológica discutida acima pode ser corroborada pela análise histomorfométrica em relação ao percentual dos osteócitos, células que desempenham um papel crítico na manutenção da homeostase óssea e na regulação da resposta esquelética aos hormônios e cargas mecânicas (Cui et al., 2022; Ding et al., 2022). No presente trabalho, foram encontradas diferenças significativas entre o grupo EPY+OVX, que apresentou maior porcentagem de osteócitos se comparado ao grupo SHAM e o grupo EST + OVX, mas com similaridade percentual com o grupo OVX. Este dado é similar ao observado no estudo de Semeghini et al. (2022), onde após administração do carotenoide licopeno, houve um aumento no número de osteócitos e

osteoblastos quando comparados aos grupos SHAM e OVX no osso trabecular da epífise distal do fêmur após análise realizada com o método estereológico.

No modelo experimental proposto para essa pesquisa, tivemos na análise histomorfométrica a quantificação da porcentagem de tecido conjuntivo, sendo demonstrado aumento significativo deste percentual na porção trabecular da epífise do fêmur de animais do grupo OVX em comparação aos grupos SHAM, EST+OVX, porém o grupo EPY+OVX apresentou similaridade estatística com todos os demais grupos.

Este estudo também apresentou um parâmetro *in vitro*, que foi a análise da viabilidade celular de células de uma linhagem pré-osteoblástica (MC3T3-E1) com várias concentrações. Este experimento sugere que o extrato não apresenta citotoxicidade quando em contato com as células em cultura osteogênica, principalmente entre as concentrações de 30 e 40 $\mu\text{g/ml}$, possibilitando a sua aplicação em outros parâmetros *in vitro* que possam investigar o papel deste extrato no metabolismo de células ósseas.

Os modelos experimentais utilizados neste estudo foram satisfatórios para confirmar o prejuízo da osteoporose no metabolismo ósseo da epífise femoral de ratas ovariectomizadas verificados por variados parâmetros de estudo. Além disso, foi demonstrado que o extrato da pitaya tem potencial para mostrar efeitos positivos e protetores na perda óssea em uma situação de osteoporose.

Este estudo apresentou algumas limitações quanto aos parâmetros *in vivo*, por exemplo em relação à caracterização da arquitetura óssea associada com a força e resistência, o que poderia ser investigado com avaliação mecânica dos ossos femorais. Além disso, o estudo *in vitro* deveria ser mais

investigado, adicionando parâmetros relacionados à proliferação e atividade funcional de células osteoblásticas de ratas ovariectomizadas em contato com o extrato da pitaya, trazendo novos dados para a literatura. Assim, mais estudos devem ser realizados para que o extrato da pitaya se torne uma alternativa promissora para o tratamento e prevenção da osteoporose.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho sugerem as seguintes conclusões:

✓ O modelo de ovariectomia promoveu aumento significativo de ganho de peso corporal quando comparado ao grupo controle; a administração de estrógeno e do extrato da pitaya em ratas ovariectomizadas favoreceu um ganho de peso similar ao grupo controle.

✓ A mensuração dos fêmures mostrou valores similares para os grupos estudados, havendo diferenças no diâmetro da cabeça do fêmur (mm) /largura das diáfises (mm) e distância entre epífises (mm) para os grupos que receberam extrato da pitaya e estrógeno respectivamente, mas somente para ou lado direito ou lado esquerdo.

✓ O procedimento de ovariectomia resultou em menor presença de trabeculado ósseo com mais tecido conjuntivo e predominância de adipócitos. A administração de estrógeno impediu a perda de tecido ósseo trabecular (similar ao grupo controle).

✓ A administração do extrato da pitaya impediu parcialmente a perda de tecido ósseo trabecular da epífise femoral, com menor presença de adipócitos e maior presença de osteócitos.

✓ A viabilidade de células osteoblásticas MC3T3-E1 foi positiva para concentrações mais baixas do extrato da pitaya.

7. REFERÊNCIAS

Ceverino GC, Sanchez PKV, Fernandes RR, Alves GA, de Santis JB, Tavares MS, Siéssere S, Bombonato-Prado KF. Preadministration of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) helps functional activity and morphology maintenance of MC3T3-E1 osteoblastic cells after in vitro exposition to hydrogen peroxide. *Mol Biol Rep.* 2021 Jan;48(1):13-20. doi: 10.1007/s11033-020-06096-w. Epub 2021 Jan 17. PMID: 33454904.

Chang SK, Alasalvar C, Shahidi F. Superfruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health effects - A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(10):1580-1604. doi: 10.1080/10408398.2017.1422111. Epub 2018 Jan 23. PMID: 29360387.

Chavassieux P, Chapurlat R, Portero-Muzy N, Roux JP, Garcia P, Brown JP, Libanati C, Boyce RW, Wang A, Grauer A. Bone-Forming and Antiresorptive Effects of Romosozumab in Postmenopausal Women With Osteoporosis: Bone Histomorphometry and Microcomputed Tomography Analysis After 2 and 12 Months of Treatment. *J Bone Miner Res.* 2019 Sep;34(9):1597-1608. doi: 10.1002/jbmr.3735. Epub 2019 Jun 24. PMID: 31233639; PMCID: PMC7027577.

Cui J, Shibata Y, Zhu T, Zhou J, Zhang J. Osteocytes in bone aging: Advances, challenges, and future perspectives. *Ageing Res Rev.* 2022 May;77:101608. doi: 10.1016/j.arr.2022.101608. Epub 2022 Mar 11. PMID: 35283289.

Dembitsky, V.M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S. and Gorinstein, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International.* 2011;44: 1671-1701.

Deng YX, He WG, Cai HJ, Jiang JH, Yang YY, Dan YR, Luo HH, Du Y, Chen L, He BC. Analysis and Validation of Hub Genes in Blood Monocytes of Postmenopausal Osteoporosis Patients. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022

Jan 13;12:815245. doi: 10.3389/fendo.2021.815245. PMID: 35095774; PMCID: PMC8792966.

Ding P, Gao C, Gao Y, Liu D, Li H, Xu J, Chen X, Huang Y, Zhang C, Zheng M, Gao J. Osteocytes regulate senescence of bone and bone marrow. *Elife*. 2022 Oct 28;11:e81480. doi: 10.7554/eLife.81480. PMID: 36305580; PMCID: PMC9678362.

Ganesan K, Bansal P, Goyal A, Roane D. Bisphosphonate. 2020 Jul 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 29262103.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):1147-50. doi: 10.1042/BST0351147. PMID: 17956298.

Hara T, Sato T, Oka M, Mori S, Shirai H. Effects of ovariectomy and/or dietary calcium deficiency on bone dynamics in the rat hard palate, mandible and proximal tibia. *Arch Oral Biol*. 2001 May; 46(5):443-51.

Harahap NS, Amelia R. Red Dragon Fruit (*Hylocereus Polyrhizus*) Extract Decreases Lactic Acid Level and Creatine Kinase Activity in Rats Receiving Heavy Physical Exercise. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019 Jul 20;7(14):2232-2235. doi: 10.3889/oamjms.2019.626. PMID: 31592070; PMCID: PMC6765083.

Hartono MR, Suardita K, Yuliati A. Proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow- derived mesenchymal stem cell after exposure to red flesh dragon fruit extract. *Dent Res J (Isfahan)*.2020;17(2):107-113.

Hoar W, Hickman CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W Hoar & CP Hickman, editors. *General and comparative physiology*. 2^a ed. New jersey: prentice-hall; 1975. p. 265.

Hsu PY, Tsai MT, Wang SP, Chen YJ, Wu J, Hsu JT. Cortical bone

morphological and trabecular bone microarchitectural changes in the mandible and femoral neck of ovariectomized rats. *PLoS One*. 2016 Apr 29;11(4):e0154367. doi: 10.1371/journal.pone.0154367.

John OD, du Preez R, Panchal SK, Brown L. Tropical foods as functional foods for metabolic syndrome. *Food Funct*. 2020 Aug 19;11(8):6946-6960. doi: 10.1039/d0fo01133a. PMID: 32692322.

Johnston CB, Dagar M. Osteoporosis in Older Adults. *Med Clin North Am*. 2020 Sep;104(5):873-884. doi: 10.1016/j.mcna.2020.06.004. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32773051.

Joshi M, Prabhakar B. Phytoconstituents and pharmaco-therapeutic benefits of pitaya: A wonder fruit. *J Food Biochem*. 2020 Jul;44(7):e13260. doi: 10.1111/jfbc.13260. Epub 2020 May 7. PMID: 32378233.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991 15(3):171– 192.

Karlamangla AS, Burnett-Bowie SM, Crandall CJ. Bone Health During the Menopause Transition and Beyond. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2018 Dec;45(4):695-708. doi: 10.1016/j.ogc.2018.07.012. Epub 2018 Oct 25. PMID: 30401551; PMCID: PMC6226267.

Kong Y, Trabucco SE, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging. *Interdiscip Top Gerontol*. 2014;39:86-107. doi: 10.1159/000358901. Epub 2014 May 13. PMID: 24862016.

Le Bellec F, Vaillant F, Imbert E. Pitahaya (*Hylocereus spp.*): A new fruit crop, a Market with a future. *Fruits*. 2006; 61:237-250.

Li X, Wu K, Dong Q, Chen H, Li C, Ren Z, Liu F, Yue X, Xia C, Wang Y, Luo Y, Li L, Zhao R, Wang Z, Qin D. Overall adjustment acupuncture improves osteoporosis and exerts an endocrine-modulating effect in ovariectomized rats.

Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Nov 17;13:1074516. doi: 10.3389/fendo.2022.1074516. PMID: 36465626; PMCID: PMC9712736.

Liang Q, Lv M, Zhang X, Hu J, Wu Y, Huang Y, Wang X, Sheng J. Effect of Black Tea Extract and Thearubigins on Osteoporosis in Rats and Osteoclast Formation *in vitro*. Front Physiol. 2018 Sep 3;9:1225. doi: 10.3389/fphys.2018.01225. Erratum in: Front Physiol. 2020 Feb 25;11:136. PMID: 30233402; PMCID: PMC6129951.

Lima ACV, Dionisio AP, Abreu FAP, Silva GSD, Lima Junior RD, Magalhães HCR, Garruti DDS, Araújo IMDS, Artur AG, Taniguchi CAK, Rodrigues MDCP, Zocolo GJ. Microfiltered red-purple pitaya colorant: UPLC-ESI-QTOF-MS^E-based metabolic profile and its potential application as a natural food ingredient. Food Chem. 2020 Nov 15;330:127222. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127222. Epub 2020 Jun 2. PMID: 32521400.

Lira SM, Dionísio AP, Holanda MO, Marques CG, Silva GSD, Correa LC, Santos GBM, de Abreu FAP, Magalhães FEA, Rebouças EL, Guedes JAC, Oliveira DF, Guedes MIF, Zocolo GJ. Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MS^E and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. Food Res Int. 2020 Jan;127:108701. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108701. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31882110.

Liu J, Deng X, Liang X, Li L. The phytoestrogen glabrene prevents osteoporosis in ovariectomized rats through upregulation of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. J Biochem Mol Toxicol. 2021 Feb;35(2):e22653. doi: 10.1002/jbt.22653. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33113278.

Liu T, Ding S, Yin D, Cuan X, Xie C, Xu H, Wang X, Sheng J. Pu-erh Tea Extract Ameliorates Ovariectomy-Induced Osteoporosis in Rats and Suppresses Osteoclastogenesis *In Vitro*. Front Pharmacol. 2017 May 31;8:324. doi: 10.3389/fphar.2017.00324. PMID: 28620304; PMCID: PMC5450042.

Lorenzo J. From the gut to bone: connecting the gut microbiota with Th17 T lymphocytes and postmenopausal osteoporosis. *J Clin Invest.* 2021 Mar 1;131(5):e146619. doi: 10.1172/JCI146619. PMID: 33645543; PMCID: PMC7919711.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* 2002; 62 : 609–614.

Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med.* 2001 Aug 15;31(4):509-19. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00610-4. PMID: 11498284.

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. doi: 10.1007/s00774-018-0970-8. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30357566.

Pepe J, Body JJ, Hadji P, McCloskey E, Meier C, Obermayer-Pietsch B, Palermo A, Tsourdi E, Zillikens MC, Langdahl B, Ferrari S. Osteoporosis in Premenopausal Women: A Clinical Narrative Review by the ECTS and the IOF. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Aug 1;105(8):dgaa306. doi: 10.1210/clinem/dgaa306. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Mar 25;106(4):e1931. PMID: 32453819.

Semeghini, M. S. et al. Menopause transition promotes distinct modulation of mRNAs and miRNAs expression in calvaria and bone marrow osteoblastic cells. *Cell biology international*, v. 42, n. 1, p. 12–24, jan. 2018.

Sharma HK, Kaur M. *Food Processing By-Products and their Utilization. Utilization of Waste from Tropical Fruits.* Ed. AK Anal, John Wiley & Sons LTD,

2017, cap.3,p.27-51.

Souza DB, Brasil FB, Marchon RG, Félix-Patrcio B. Effects of nandrolone decanoate on femur morphology. Experimental study. *Acta Cir Bras.* 2021 Jun 18;36(5):e360507. doi: 10.1590/ACB360507. PMID: 34161434; PMCID: PMC8221801.

Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry* 2002;77(1): 101-106.

Taneja C, Gera S, Kim SM, Iqbal J, Yuen T, Zaidi M. FSH-metabolic circuitry and menopause. *J Mol Endocrinol.* 2019 Oct;63(3):R73-R80. doi: 10.1530/JME-19-0152. PMID: 31454787; PMCID: PMC6992500.

Teixeira J, Chavarria D, Borges F, Wojtczak L, Wieckowski MR, Karkucinska-Wieckowska A, Oliveira PJ. Dietary Polyphenols and Mitochondrial Function: Role in Health and Disease. *Curr Med Chem.* 2019;26(19):3376-3406. doi: 10.2174/0929867324666170529101810. PMID: 28554320.

Vatner SF, Zhang J, Oydanich M, Berkman T, Naftalovich R, Vatner DE. Healthful aging mediated by inhibition of oxidative stress. *Ageing Res Rev.* 2020 Dec;64:101194. doi: 10.1016/j.arr.2020.101194. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33091597; PMCID: PMC7710569.

Zhang Y, Hua F, Ding K, Chen H, Xu C, Ding W. Angiogenesis changes in ovariectomized rats with osteoporosis treated with estrogen replacement therapy. *Biomed Res Int.* 2019 Jul 4;2019:1283717. doi: 10.1155/2019/1283717.

Zhao F, Guo L, Wang X, Zhang Y. Correlation of oxidative stress-related biomarkers with postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Osteoporos.* 2021 Jan 5;16(1):4. doi: 10.1007/s11657-020-00854-w. PMID: 33400044.

Yamaguchi KK, Pereira LF, Lamarão CV, Lima ES, da Veiga-Junior VF. Amazon acai: chemistry and biological activities: a review. *Food Chem.* 2015 Jul 15;179:137-51. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.055. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25722148.