

# ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÊMUR DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS FÊMEAS OVARIETOMIZADAS E NÃO OVARIETOMIZADAS SUPLEMENTADAS COM EXTRATO DE *TRIBULUS TERRESTRIS* L.

*Histological analysis of the fem of female swiss mice ovariectomized and not ovariectomized supplements with extract of Tribulus terrestris L*

Thainá Valente Bertozzo<sup>1</sup>

Lucas Roberto Moreira<sup>1</sup>

Jonatas Medeiros de Almeida Angelo<sup>1</sup>

Marcia Clélia Leite Marcellino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Sagrado  
Coração – Bauru/SP

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

## RESUMO

**Introdução:** a incapacidade de gerar filhos é chamada de infertilidade, e acomete grande parte da população, principalmente mulheres entrando no período da menopausa. Tal condição afeta a qualidade de vida, pois aumenta o desgaste ósseo, fazendo com que a busca por tratamentos de reposição hormonal aumente exponen-

Recebido em: 08/01/2019  
Aceito em: 02/06/2019

cialmente. Entretanto, tais tratamentos possuem efeitos colaterais, o que apresenta plantas medicinais como tratamentos alternativos. **Objetivo:** avaliar a histologia do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas tratadas ou não com *Tribulus terrestris* L. (TT) **Métodos:** Foram utilizados 28 camundongos suíços fêmeas divididos em 4 grupos, sendo dois controles com e sem suplementação e dois que sofreram o processo de ovariectomia bilateral, com e sem suplementação. O extrato da planta foi administrado por 21 dias por gavagem. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e o fêmur coletado para análise histológica. **Resultados:** o TT não foi capaz de alterar significativamente o diâmetro do osso. A castração, como esperado, mostrou possível osteopenia. A planta pode ter efeito protetor aos ossos devido a efeito antiartrítico. **Conclusão:** na análise histológica descritiva do fêmur, foram evidenciadas alterações que se associam à osteopenia nos animais castrados e efeito ósseo-protetor nos animais suplementados com o extrato dos frutos do *Tribulus terrestris* L.

**Palavras-chave:** Fêmur. Histology. *Tribulus terrestris* L.

## ABSTRACT

**Introduction:** *inability to generate children is called infertility and affects a large part of the population, especially women entering the menopausal period. Such a condition affects the quality of life, including the use of the bone system, causing the search for hormone replacement services exponentially. However, such treatments shave light collectors, such as medicinal plants as alternative treatments.*

**Objective:** *to evaluate the histology of the treatment of pairs of ovariectomized and non-ovariectomized women treated with or without Tribulus terrestris L. (TT).* **Methods:** *twenty-eight Swiss mice were divided into four groups, two controls with and without supplementation, and two with bilateral ovariectomy, with and without supplementation. The plant extract was administered for 21 days by way of gavage. After the evaluation, the animals were eutanasiated and their femur was collected for histological analysis.*

**Results:** *the TT was not able to change the diameter of the bone. Castration, as expected, allowed for osteopenia. The plant may have a protective effect on bones because of an anti-arthritic effect.*

**Conclusion:** *in the descriptive histological analysis of phosphorus, there were evidences alterations that associate the osteopenia in the*

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

*animals and the bony-protective effects in the animals supplemented with the extract of the fruits of Tribulus terrestris L.*

**Keywords:** *Infertility. Hormones. Tribulus terrestris L.*

## INTRODUÇÃO

A infertilidade é um mal que acomete cada vez mais mulheres ao redor do mundo. Pode ser definida como a incapacidade de gerar filho após um ano de tentativas com vida sexual ativa sem o uso de qualquer método contraceptivo. Também se caracteriza no contexto de infertilidade três ou mais abortos consecutivos. (MARTINS *et al.*, 2009; ABDELMASSIH, 2007).

A infertilidade feminina é de caráter multifatorial, tendo como até 30% das ocorrências os fatores de oligomenorreia, amnorreia e anovulação. Outros importantes fatores de causa para a infertilidade feminina são alterações estruturais, distúrbios imunológicos, endometriose, síndrome de ovários policísticos (SOP), obesidade, frequência de relação sexual, tabagismo, etilismo, consumo de drogas, sedentarismo, doenças sexualmente transmissíveis (DST's) e idade avançada. (MARTINS *et al.*, 2009; REMOALDO *et al.*, 2011).

O envelhecimento caracteriza na mulher a condição de hipogonadismo, na qual ela entra no período conhecido como menopausa, que gera um declínio hormonal muito grande. Os hormônios em questão são hormônios esteroidais, derivados da molécula de colesterol, como androgênios e estrogênios. Essa condição possui diversos sintomas que afetam significativamente a qualidade de vida da mulher na fase senil, fazendo com que muitas busquem por tratamentos como reposição hormonal com o hormônio sintético. No entanto essa prática é um tanto quanto controversa, uma vez que seus sintomas adversos muitas vezes podem se sobressair aos efeitos desejados. Essa relação de não confiança em um tratamento de reposição hormonal abre portas para a busca por tratamentos alternativos que sanem o problema ou minimizem seus sintomas com prejuízo ou efeitos adversos menores. (SUNKARA *et al.*, 2011).

O *Tribulus terrestris* L. é uma planta de origem comumente citada na Ásia e na África, que, de acordo com a sabedoria popular, possui efeitos afrodisíacos por aumentar as concentrações séricas de testosterona. Diversos estudos ao redor do mundo já foram realizados tentando esclarecer as propriedades funcionais da planta, entretanto, muitos são de resultados controversos ou com dados insuficientes para aplicação terapêutica. (GAUTHMAN *et al.*, 2008).

Assim, por meio deste trabalho, objetivou-se a análise do fêmur de camundongos suíços fêmeas com e sem ovariectomia bilateral suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Animais

Foram utilizados 28 camundongos suíços, fêmeas, adultas, cedidas pelo Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Durante o período experimental, os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno. A oferta de ração comercial para roedores e água foi *ad libitum*, e o ambiente foi mantido em ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura entre 22 e 25°C, sempre limpo e arejado.

O projeto teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da USC, pelo protocolo n° 2224230216.

### 2. Divisão dos grupos

Os animais foram divididos em 4 grupos de experimento:

- Grupo Controle sem ovariectomia e sem suplementação (n=7): receberam 0,2mL de veículo aquoso sem extrato, por gavagem.
- Grupo controle com ovariectomia e sem suplementação (n=7): receberam 0,2mL de veículo aquoso sem extrato, por gavagem.
- Grupo suplementado com *Tribulus terrestris*L. com ovariectomia (n=7): receberam 10mg/kg concentrado em 0,2 mL de veículo aquoso, por gavagem.
- Grupo suplementado com *Tribulus terrestris*L. sem ovariectomia (n=7): receberam 10mg/kg concentrado em 0,2 mL de veículo aquoso, por gavagem.

A administração do extrato e do veículo aquoso foi através de gavagem durante 21 dias. O extrato foi comprado na Farmácia Formulare, em Bauru/SP, que emitiu o laudo de controle de qualidade do mesmo.

### 3. Ovariectomia bilateral

Dois grupos passaram pelo processo de ovariectomia bilateral a fim de mimetizar a redução hormonal e simular o ocorrido na menopausa.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina (Anasedan®, 0,2 mL) e Cloridrato de Ketamina (Dopalen®, 0,2 mL), por via intraperitoneal. Ao notar a ausência de resposta a estímulos, foi realizada a assepsia com Povodine tópico® e a retirada dos pelos na região ventral. Foi realizada uma incisão de, em média, dois centímetros na região dorsal paravertebral à direita. A musculatura foi afastada com ajuda de farabeufs e o peritônio aberto abaixo da última costela, expondo assim a gordura peritoneal, que foi pinçada e nela foram localizados e seccionados o útero e os ovários. Finalizada a secção, os animais foram suturados com fio de algodão agulhado 3.0.

Para alívio da dor pós-procedimento, foi administrado dipirona sódica 0,5 g/mL e o antibiótico enrofloxacino a 10mg/kg (Flotril® 2,5%, Schering-Plough) por via intramuscular.

#### 4. Suplementação com *Tribulus terrestris* L.

Os animais suplementados com extrato dos frutos do *Tribulus terrestris* L. o receberam por 21 dias através de gavagem, na concentração de 10 mg/kg e volume de 0,2 ml.

#### 5. Coleta do Fêmur para Confecção de lâminas histológicas

Os animais foram eutanasiados com dose letal de Tiopental (150 mg/kg) e lidocaína (10 mg/kg), e foram coletados ossos (fêmur) do lado esquerdo do corpo dos animais para fixação em lâmina, com o objetivo de observar possíveis mudanças na configuração óssea dos animais. Após a secção, o osso fêmur foi posicionado sobre a placa de parafina e com auxílio de paquímetro foi mensurado o diâmetro da área mediana da haste do osso. Os ossos foram armazenados em pequenos potes contendo formol, e posteriormente encaminhados ao setor de histologia da USC. O processo consistiu em deixá-los cerca de quinze dias em solução de EDTA para descalcificação dos ossos, e após concluído, serem feitos os cortes em transversal, para serem fixados em lâmina. As etapas de corte e emblocamento foram acompanhadas, seguidas da fixação e coloração com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson.

## 6. Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do Software Graphpad Prism 5, sendo empregado o teste paramétrico T-Student, com  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta as médias do diâmetros do fêmur dos camundongos de cada grupo de experimento. Não foram evidenciadas alterações significativas (Teste T-Student,  $p < 0,05$ ) no diâmetro do osso na comparação de ambos os grupos.

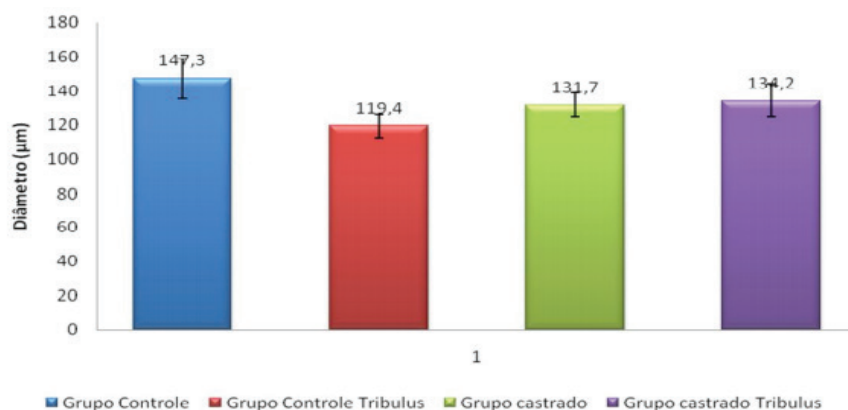


Figura 1 - Médias dos diâmetros do fêmur dos camundongos. Software Graphpad Prism 5; Teste T-Student ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que a planta *Tribulus terrestris* L. não foi capaz de alterar significativamente o diâmetro do osso, no entanto, a análise histológica descritiva evidenciou alterações nos grupos castrado e suplementado. A figura 2 representa os ossos do grupo controle sem tratamento, evidenciando um tecido ósseo rico em células, com lacunas com osteócitos (setas) na matriz. Presença de tecido de revestimento (#) e poucas linhas de reversão (\*). Isso significa que se trata de um tecido ósseo normal.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. SALUSVITA, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

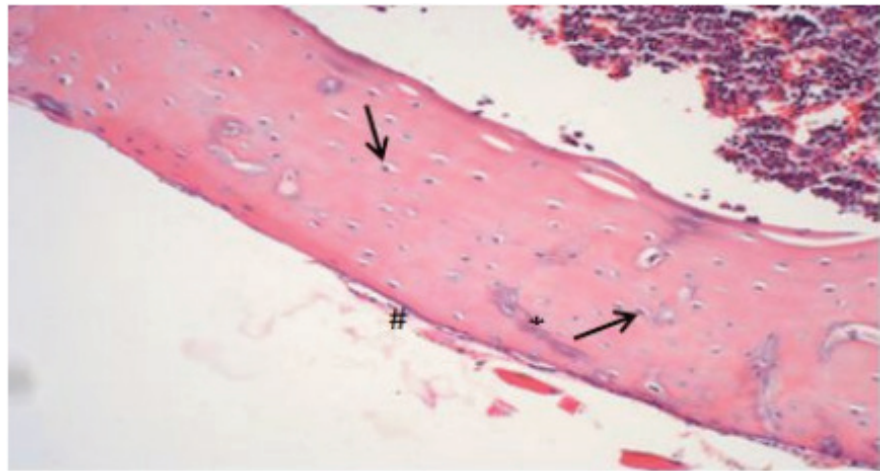


Figura 2 - Tecido ósseo íntegro (Grupo Controle sem tratamento). Aumento 20x. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE).

Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 3 se refere ao grupo controle com tratamento em que a matriz óssea se apresenta com numerosos osteócitos (\*) e grande quantidade de linhas de reversão (#). Periosteio preservado (seta). Isso significa que se trata de um tecido misto, passando do tecido primário (imaturo) para o secundário (maduro), indicando um metabolismo acelerado. Supostamente, o extrato do *Tribulus terrestris* L. foi capaz de alterar o metabolismo ósseo.

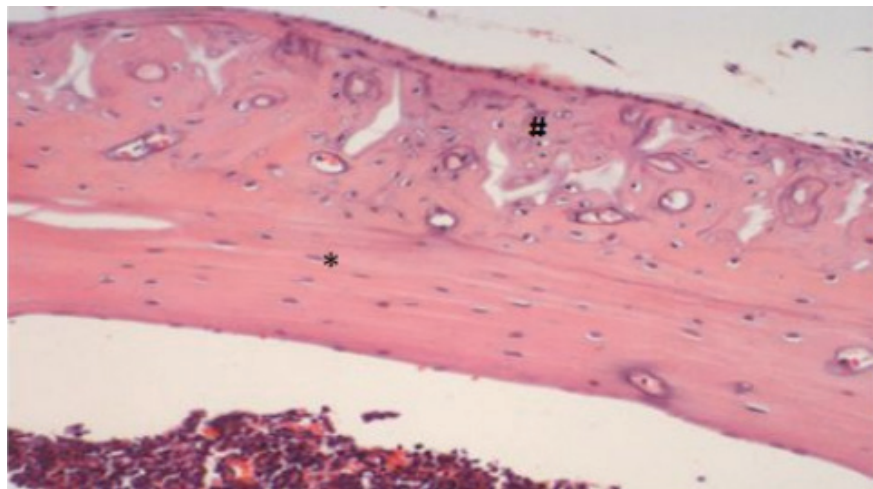


Figura 3 - Tecido ósseo em intensa atividade metabólica (Grupo controle com tratamento). Aumento 20x. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE).

Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 4 representa o grupo castrado sem tratamento. Nota-se tecido ósseo ricamente celularizado (\*). Muitas linhas de reversão (#) e aumento dos espaços medulares e de canais vasculares (setas). Esses espaços medulares indicam perda de massa óssea, simulando uma osteopenia. Diante do exposto, postula-se que a castração realizada nos animais foi capaz de alterar o metabolismo ósseo, fazendo com que o tecido fique mais frágil.

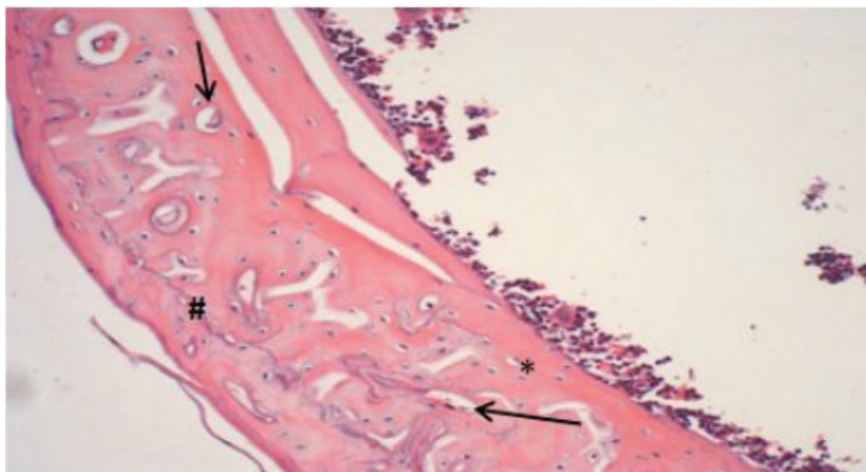


Figura 4 - Tecido ósseo com indícios de osteopenia (Grupo castrado sem tratamento). Aumento 20x. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE).

Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 5 demonstra o grupo castrado com tratamento. Este apresentou matriz óssea celularizada com lacunas preenchidas por osteócitos (setas). Presença de linhas de reversão (\*), caracterizando atividade metabólica do tecido ósseo. Presença de tecido de revestimento (periósteo - #) contornando o osso. Pode-se notar aumento no metabolismo do tecido, uma vez que não há indícios de osteopenia, mesmo o grupo sendo castrado. Supostamente o *Tribulus terrestris* L. foi capaz de reduzir a perda óssea.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. SALUSVITA, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.



BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. SALUSVITA, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

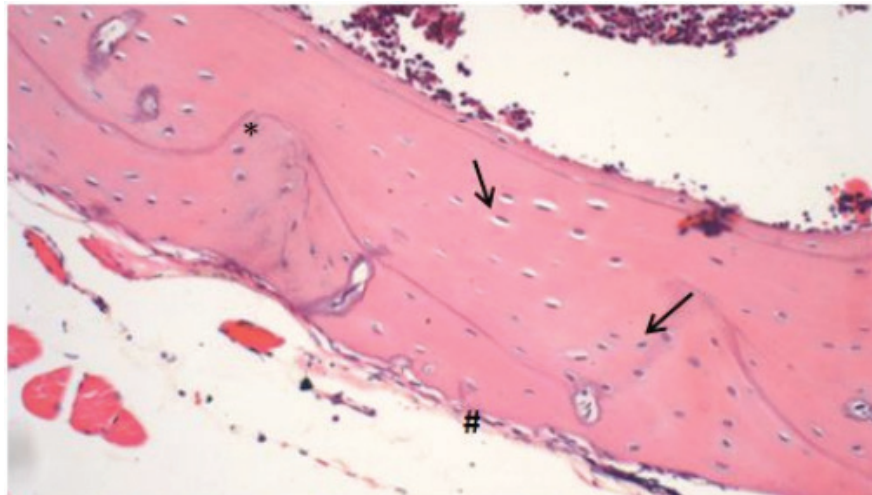


Figura 5 - Tecido ósseo preservado (Grupo castrado com tratamento). Aumento 20x. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE).

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com Schwartz *et al.* (2000), a redução da massa óssea ocorrida no hipogonadismo está relacionada ao comprometimento na absorção de cálcio decorrente da menor formação da proteína ligadora de cálcio, chamada calbindina. Esta enzima está presente no intestino delgado e, ao se conectar à vitamina D3 ativa (calcitriol), aumenta a absorção intestinal deste mineral. No presente estudo, os animais submetidos à ovariectomia bilateral apresentaram alterações ósseas caracterizadas pela presença de muitas linhas de reversão, aumento dos espaços medulares e de canais vasculares. Esses espaços medulares indicam perda de massa óssea, simulando uma osteopenia. Nesta condição, o hipogonadismo, induzido pela castração neste grupo de experimento, e a lesão óssea evidenciada corroboram com a citação, no entanto, novos estudos que avaliem o teor sérico de cálcio tornam-se relevantes.

Em um estudo feito por Mishra (2013), utilizando o extrato de *Tribulus terrestris* L. para avaliar a atividade da planta em relação à artrite, demonstrou a atividade antiartrítica. Outro estudo feito por Park (2017), utilizando ratos com osteoartrite induzida e com tratamento com o extrato da planta, indicou melhora da doença, através de uma atividade anti-osteoartrite, redução da erosão de ossos e diminuição de dano à cartilagem. Estes estudos corroboram com os resultados morfológicos aqui apresentados, uma vez que os animais castrados e tratados com o extrato apresentaram preservação do tecido ósseo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na análise histológica descritiva do fêmur, foram evidenciadas alterações que se associam à osteopenia nos animais castrados e efeito ósseo-protetor nos animais suplementados com o extrato dos frutos do *Tribulus terrestris* L.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meus pais Lucia e José, minha amiga e irmã Thaís, meu companheiro Victor e amigos. Agradeço também à Universidade do Sagrado Coração pela estrutura e pelo desenvolvimento do projeto, bem como todos os funcionários que auxiliaram no andamento desta pesquisa: Fabiane, Maira, Alexandre Brás, Wilson Orsini, Patrícia Saraiva e Lígia Belmonte. À Márcia Marcellino, orientadora que permitiu que este projeto acontecesse. Aos meus colegas e co-autores Lucas Moreira e Jonatas Angelo.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

BERTOZZO, Thainá Valente *et al.* Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. *SALUSVITA*, Bauru, v. 38, n. 2, p. 369-379, 2019.

## REFERÊNCIAS

ABDELMASSIH, R. **Avanços em Reprodução Humana Assistida**. São Paulo: Atheneu, 2007.

GAUTHAMAN K, Ganesan AP. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the managements of male erectile dysfunction-an evaluation using primates, rabbits and rat. **Phytomedicine**. Stuttgart, v.15 p. 44–54, 2008. Disponível em

MARTINS, M. A.; et al. **Clínica Médica**, v. 1, p. 501-506. São Paulo: Manole, 2009.

MISHRA N.K. et. al. Anti-arthritic activity of *Tribulus terrestris* studied in Freund's adjuvant induced arthritic rats. **J. Pharm. Educ. Res.** [s.i] v.4 p. 41-46, 2013.

PARK et al., Effects of *Tribulus terrestris* on mono sodium iodo acetate-induced osteo arthritis pain in rats. **Molecular medicine reports**. Athens, v.16 p. 5303-5311, 2017.

REMOALDO, P.C.A., MACHADO H.C.F. A infertilidade no Conselho de Guimarães:

contributos para o bem-estar familiar. **Universidade do Minho**. 2011.

SCHWARTZ, B., SMIRNOFF, P., SHANY, S., SLIE, Y. Estrogen control sex pression and bioresponse of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in the rat colon. **Mol Cell Biochem.** [s.i] v. 203 p. 87-93, 2000.

SUNKARA SK, Pundir J, Khalaf Y. Effect of androgen supplementation or modulation on ovarian stimulation outcome in poor responders: a meta-analysis. **Reprod Biomed Online**. Amsterdam, v.22 n.6 p. 545-55, 2011.

