The background of the entire page is a microscopic image of cells, likely osteoblasts, showing a dense network of elongated, spindle-shaped cells with prominent nuclei and some darker, more rounded cells interspersed throughout.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ADRIANA ARRUDA MATOS

**Efeito do extrato de aroeira no processo de
proliferação e mineralização de osteoblastos *in vitro***

**BAURU
2013**

ADRIANA ARRUDA MATOS

**Efeito do extrato de aroeira no processo de
proliferação e mineralização de osteoblastos *in vitro***

Dissertação apresentada a Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências no
Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na
área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Versão corrigida

BAURU

2013

M428 Matos, Adriana Arruda
e Efeito do extrato de aroeira no processo de
 proliferação e mineralização de osteoblastos *in vitro*
 / Adriana Arruda Matos – Bauru, 2013.
 131 p. : il. ; 31cm.

 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
 Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

 Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de
 Oliveira

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 096/2011
Data: 01 de Setembro de 2011

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pela vida que me deu. Por me dar força para superar todos os obstáculos e me fazer continuar.

Aos meus pais, Adão e Fátima

Por me darem um amor incondicional e me apoiarem nas minhas escolhas. Pelo amor, carinho e atenção. Por acreditar na minha capacidade de vencer e por fornecer meios para que eu seja uma pessoa melhor a cada dia.

As minhas irmãs, Angélica, Amanda e Andressa e meu irmão Bruno,

Por me ajudarem, me apoiarem e serem meus verdadeiros amigos.

Ao Marcelo,

Pelo amor, paciência e compreensão. Pelo companheirismo, por entender meus momentos de ausência, por estar nos momentos de fraqueza e me fazer acreditar que eu poderia vencer.

Aos meus cunhados Bruno, Pedro e Diego.

Aos meus tios, primos e minha vó Rosa que torceram e rezaram por mim.

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, meu orientador, que deu a oportunidade de ter novas experiências e conhecimentos, sempre disposto a me ajudar. Obrigada pela confiança.

A Flávia Amadeu de Oliveira, minha amiga não só de experimento, mas também uma amiga para a vida toda. Uma pessoa que merece tudo de melhor que a vida pode dar. A admiro pela pessoa de bom coração que é e pelo esforço que tem. Nos momentos em que mais precisei sempre esteve presente. Obrigada por me ajudar a cumprir mais uma etapa de minha vida.

A Dra. Camila Peres Buzalaf, profissional maravilhosa, sempre me ajudou quando precisei. Obrigada pela orientação, paciência, disponibilidade e explicações.

Ao prof. Dr. José Mauro Granjeiro por nos ceder os osteoblastos humanos e pela parceria com nosso grupo de pesquisa.

Agradeço à professora Dra. Anne Ligia Dokkedal Bosqueiro pela parceria com o nosso grupo.

Agradeço a professora Dra Marilia Buzalaf pela oportunidade de conhecer e poder fazer parte do departamento de bioquímica.

Às técnicas do departamento de bioquímica, Aline, Larissa e Thelma pela ajuda nos experimentos laboratoriais.

Ao especialista do departamento de farmacologia Thiago Dionísio. Obrigada pela ajuda, dicas e explicações.

Agradeço a aluna Alessandra Cury Machado, companheira de grupo de pesquisa que gentilmente cedeu o extrato usado nesse trabalho.

Agradeço às minhas companheiras de pesquisa de cultura em células Professora Dra Carla Andreotti Damante, Amanda Amaral, Camila Roque, Paula Karan e Mariana.

Agradeço aos alunos do departamento de bioquímica pela ajuda nas pesquisas, em especial a Priscila Salomão, Heloisa Pinheiro e Mileni Fernandes.

Agradeço aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP) Marcelo, Márcia, Renato e Rafaela e ao professor Vinicius.

Agradeço aos alunos do departamento de patologia Karen Pink e Heliton.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Bauru, USP pela oportunidade fazer parte dessa instituição que é referência mundial.

Agradeço à FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2010/14039-8) pelo auxílio a minha pesquisa.

Agradeço à Vera Rufino, secretária do Departamento de Ciências Biológicas.

Agradeço a todas as pessoas que me apoiaram nas minhas escolhas e sempre acreditaram na minha capacidade. Em especial aos meus pais, irmãos, irmão e amigos.

MUITO OBRIGADA!

“Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

Em virtude do uso indiscriminado de antimicrobianos, a resistência de microrganismos patogênicos à diversas drogas tem aumentado nos últimos anos. Essa situação tem forçado pesquisadores a procurarem por novas drogas, tais como os medicamentos fitoterápicos que são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) de ervas medicinais, utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças. Uma das espécies brasileiras do cerrado que tem despertado o interesse de várias áreas é a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), por apresentar ação antiinflamatória, antiproliferativa, antioxidante e antimicrobiana. Dessa maneira o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira na viabilidade celular dos osteoblastos humanos e analisar a influência do extrato hidroalcoólico de aroeira na expressão de metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e anquilose progressiva humana (ANKH). Nesse estudo foram utilizados osteoblastos humanos cultivados em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB). Após atingirem a subconfluência as células foram plaqueadas e tratadas com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de aroeira (Extrato Bruto; 1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000). Após 24, 48, 72, 96 horas foi realizada a análise da viabilidade celular por meio da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio), captação do vermelho neutro e cristal violeta. Também foi feita a redução do MTT após 7, 14, 21 e 28 dias de tratamento com o extrato, para verificar se as células permaneciam viáveis nesses períodos. A análise da expressão gênica de MMP-2 e ANKH foi realizada pelo RT-PCR em tempo real nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. Os ensaio de viabilidade celular (redução do MTT, captação do vermelho e cristal violeta) mostraram que houve o aumento da viabilidade celular nos grupos tratados com o extrato a 1:10.000; e a diminuição da viabilidade dos osteoblastos humanos nos grupos com extrato bruto e com 1:10. Com relação à expressão de MMP-2 e ANKH, os resultados mostraram que o extrato promoveu uma modulação da expressão desses genes no decorrer dos períodos em comparação com o grupo controle. De um modo geral o extrato, em maiores concentrações (1:100), inibiu a expressão de MMP-2 e aumentou a expressão de ANKH. Tendo em vista os resultados obtidos concluímos que o extrato hidroalcoólico de aroeira em altas concentrações promove

redução e/ou morte celular dos osteoblastos humanos e ainda modulam a expressão de MMP-2 e ANKH.

Palavras-chave: Osteoblastos humanos, extrato de aroeira, *Myracrodruon urundeuva*, viabilidade celular, MMP-2, ANKH.

ABSTRACT

Effect of aroeira extract in the process of proliferation and mineralization of osteoblasts in vitro

Due to the indiscriminate use of antimicrobial, the resistance of pathogenic microorganisms to various drugs has increased in recent years. This situation has forced researchers to search for new drugs, such as herbal medicines that are pharmaceutical preparations (extracts, tinctures, ointments and capsules) medicinal herb, used for the treatment of numerous diseases. One species of the Brazil that has aroused interest in many areas is the aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) because of its anti-inflammatory, antiproliferative, antioxidant and antimicrobial. Thus the aim of this work was to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of aroeira on cell viability of human osteoblasts and to analyze extract on the expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and human progressive ankylosis (ANKH) . In this study, we used human osteoblasts cultured in Eagle's medium modified by Dulbecco (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). After reaching subconfluence cells were plated and treated with different concentrations of the aroeira extract hydroalcoholic (brute extract , 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000). After 24, 48, 72 and 96 hours analysis was performed of cell viability by the reduction of MTT (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 - diphenyltetrazolium bromide) uptake of neutral red and crystal violet. It was also made MTT reduction after 7, 14, 21 and 28 days of treatment with the extract, to check if the cells remained viable during these periods. The analysis of the gene expression of MMP-2 and ANKH was performed by Real Time RT-PCR in periods of 24, 48 hours, 72 hours, 7, 14, 21 and 28 days. The cell viability assay (MTT reduction, uptake of neutral red and crystal violet) showed that there was a tendency of increased cell viability in the groups treated with the extract 1:10.000, and decreased viability of human osteoblast cells in groups with brute extract and 1:10. With respect to expression of MMP-2 and ANKH, the results showed that the extract promoted a modulation of expression of these genes during the periods, compared to the control group. Generally extract at higher concentrations (1:100) both inhibited the expression of MMP-2 and increased the expression of ANKH. Given the results we conclude that the hydroalcoholic extract of aroeira in high concentrations causes a reduction and / or cell death of human

osteoblasts and also modulate the expressio of MMP-2 and ANKH.

Keywords: human osteoblastos, aroeira extract,, *Myracrodruon urundeuva*, cell viability, MMP-2, ANKH.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 -	Árvore e folhas de aroeira (<i>Myracrodruon urundeuva</i> ou <i>Astronium urundeuva</i>).....	50
Figura 2 -	Etapas para a obtenção do extrato hidroalcoólico de aroeira.....	52
Figura 3 -	Cultivo e expansão de osteoblastos humanos.....	54
Figura 4 -	Imagens da placa do ensaio de redução do MTT.....	58
Figura 5 -	Imagens da placa do ensaio de captação do vermelho neutro....	60
Figura 6 -	Imagens da placa do ensaio de cristal violeta.....	62
Figura 7 -	Imagens microscópicas do teste de toxicidade celular.....	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise da redução do MTT de MC3T3 – E1 tratados com extrato hidroalcoólico de aroeira filtrado e não filtrado nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.....	69
Gráfico 2 -	Gráfico da redução do MTT de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 2×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas.....	72
Gráfico 3 -	Gráfico da redução do MTT de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 3×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas.....	73
Gráfico 4 -	Gráfico da captação do vermelho neutro de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 2×10^3 células por poço nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas.....	76
Gráfico 5 -	Gráfico da captação do vermelho neutro de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 3×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas.....	77
Gráfico 6 -	Gráfico do ensaio de cristal violeta de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 2×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas.....	80
Gráfico 7 -	Gráfico do ensaio de cristal violeta de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 3×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas.....	81
Gráfico 8 -	Gráfico da redução do MTT de osteoblastos humanos com densidade de 5×10^2 células por poço, tratados com diferentes	

	diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira, nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias.....	83
Gráfico 9 -	Gráfico da contagem celular de osteoblastos humanos com densidade inicial de 5×10^2 células por poço, tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira, nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias.....	85
Gráfico 10 -	Gráfico da expressão gênica de MMP-2 em osteoblastos humanos com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira, nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias....	87
Gráfico 11 -	Gráfico da expressão gênica de ANKH em osteoblastos humanos com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira, nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração do extrato hidroalcoólico em meio de cultura DMEM.....	55
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AA: Acetona-água

ANK: Anquilose progressiva

ANKH: Anquilose progressiva humana

BMPs: Proteínas Morfogenéticas Ósseas

CV: Cristal Violeta

DMEM: Meio de cultura de Eagle modificado por Dullbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

EB: Extrato bruto

IL-1 β : Interleucina-1beta

kDa: Kilodalton

MA: Metanol-água

MEC: Matriz extracelular

mM: miliMolar

MMP: Metaloproteínases de matriz

MTT: (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio)

NaOCl: Hipoclorito de sódio

nm: Nanômetro

μ g: Micrograma

μ l: Microlitro

μ m: Micrômetro

μ M: MicroMolar

OPG: Osteoprotegerina

PBS: Solução salina tamponada

PPi: Pirofosfato inorgânico

PTH: Hormônio da paratireoide

RT-PCR em tempo real: Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da polimerase em tempo real

SFB: Soro Fetal Bovino

SUS: Sistema Único de Saúde

TBARS: Ácido tiobarbitúrico

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

UFC: Unidades formadoras de colônias

VN: Vermelho neutro

5-ASA: Ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	O TECIDO ÓSSEO	29
2.1.1	Células do tecido ósseo	30
2.2	METALOPROTEÍNASES DE MATRIZ 2 (MMP-2)	32
2.3	ANQUILOSE PROGRESSIVA HUMANA (ANKH)	33
2.4	FITOTERAPIA	34
2.4.1	Considerações gerais	34
2.4.2	2.4.2 Aroeira-do-sertão (<i>Myracrodruon urundeuva</i> ou <i>Astronium urundeuva</i>)	35
3	PROPOSIÇÃO	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA (<i>Myracrodruon urundeuva</i>)	49
4.1.1	Etapas botânica	49
4.1.2	Etapas química	51
4.2	CULTURA DE CÉLULAS	53
4.2.1	Obtenção dos osteoblastos humanos	53
4.2.2	Cultivo e expansão dos osteoblastos humanos	53
4.3	PREPARO DO MEIO CONDICIONADO COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA	55
4.4	TESTE DE TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE AROEIRA	56
4.5	PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA FILTRADO E NÃO FILTRADO	56
4.6	ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR (24 -96 HORAS)	56
4.6.1	Redução do MTT	57
4.6.2	Captação do Vermelho Neutro (VN)	59
4.6.3	Cristal Violeta (CV)	61
4.7	ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR (7 -28 DIAS)	63
4.8	CONTAGEM CELULAR	63
4.9	RT-PCR EM TEMPO REAL	64

4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	64
4.10.1	Análises estatísticas dos ensaios de viabilidade celular	64
4.10.2	Análise estatística do RT-PCR em tempo real	64
5	RESULTADOS	65
5.1	TESTE DE TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE AROEIRA	67
5.2	PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA FILTRADO E NÃO FILTRADO	68
5.3	ANÁLISE DA REDUÇÃO DO MTT (24-96 HORAS)	70
5.4	ANÁLISE DA CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (24-96 HORAS)	74
5.5	ANÁLISE DO CRISTAL VIOLETA (24-96 HORAS)	78
5.6	ANÁLISE DA REDUÇÃO DO MTT (7-28 DIAS)	82
5.7	CONTAGEM CELULAR	84
5.8	ANÁLISE DO RT-PCR EM TEMPO REAL	86
5.8.1	Análise da expressão gênica da MMP-2 nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias	86
5.8.2	Análise da expressão gênica da ANKH nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias	88
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXOS	119

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido dinâmico e que se renova constantemente. Fisiologicamente, além sustentar os tecidos moles, o tecido ósseo funciona com um reservatório de íons de cálcio e magnésio, os quais são importantes para diversas reações químicas. A célula pertencente ao tecido ósseo responsável pela produção e mineralização da parte orgânica da matriz são os chamados osteoblastos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; RUBIN et al., 2006). As principais funções dessas células incluem a produção de fatores de crescimento, a produção de osteocalcina, fosfatase alcalina, secreção de collagenase, regulação do crescimento e diferenciação do osso (RUBIN et al., 2006).

Atualmente, existem diversos compostos utilizados em células ósseas com o objetivo de investigar as possíveis modulações biológicas nesse tipo de célula. Um tipo de composto utilizado para esse fim são as plantas medicinais, que vem se destacando devido à procura por terapias alternativas. Isso ocorre principalmente em decorrência da ineficácia de alguns produtos sintéticos, ao preço alto de medicamentos alopáticos e a procura da população por tratamentos menos agressivos ao organismo. Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) de ervas medicinais provenientes de uma ou mais plantas e utilizadas para o tratamento de inúmeras doenças. Várias são as vantagens para o uso terapêutico, como o baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda (SOARES et al., 2008).

Em levantamento realizado pelo Ministério da Saúde no ano de 2005, em todos os municípios brasileiros, verificou-se que a fitoterapia está presente em 116 municípios, contemplando 22 unidades federadas. Atualmente a fitoterapia faz parte do Sistema Único de Saúde, sendo possível a sua inclusão médica e odontológica (OLIVEIRA et al., 2007).

Entretanto, apesar das inúmeras possibilidades de uso de plantas medicinais por parte dos profissionais da área da saúde, o uso de plantas medicinais na odontologia tem sido pouco explorado, seja para tratar doenças bucais ou para tratar doenças sistêmicas com manifestações bucais. O avanço maior neste sentido está entre as plantas com atividade antimicrobiana e antifúngica, pelo considerável

avanço do desenvolvimento de derivados naturais com ação bactericida ou fungicida (SANTOS et al., 2009).

Extratos e óleos de várias espécies mostraram-se eficientes no controle de fungos relacionados a infecções da pele, sobre bactérias patogênicas bucais e sobre uma variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (DUARTE et al., 2004).

Uma das espécies brasileiras do cerrado que tem captado interesse de várias áreas é a aroeira. O termo aroeira tem sido usado para designar plantas classificadas em três gêneros da família *Anacardiaceae*: *Lithraea*, *Schinus* e *Astronium* (QUEIROZ et al., 2002).

A *Astronium urundeuva* ou *Myracrodruon urundeuva*, também conhecida pelos nomes populares de urundeuva, aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-do-campo, aroeira-da-serra, urindeúva, está presente nos Estados do Ceará até o Paraná e Mato Grosso do Sul. É mais comum no nordeste do país, oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e sul dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (LORENZI, 2002).

Um estudo realizado por Menezes et al. (2010), avaliou a influência de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae) e *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae), na forma de extratos aquosos, sobre a contagem de *Streptococcus mutans* e micro-dureza do esmalte dentário de ratos submetidos a desafio cariogênico. Ambos os extratos produziram uma redução significativa na contagem de *S. mutans* e redução da desmineralização do esmalte. Com isso os autores concluíram que os extratos testados tiveram efeito significativo sobre *S. mutans* no biofilme oral dos ratos, diminuindo o acúmulo de *S. mutans* e desmineralização do esmalte.

Vale ressaltar que o Brasil apresenta dimensões continentais e uma biodiversidade com mais de 50 mil espécies vegetais representando atualmente o primeiro lugar no mundo com esta variedade. Considerando este aspecto, aliado ao estudo da nossa biodiversidade vegetal, garantindo o conhecimento, agregando valor econômico, preservando a soberania nacional e impedindo a biopirataria, é importantíssimo o fomento a pesquisa com produtos naturais brasileiros (MARQUES, 2000). Estudar a aroeira (*Myracrodruon urundeuva*), planta muito usada na medicina popular nacional, é algo de relevância e o conhecimento agregado deve ser significativo para a descoberta de novas drogas.

Várias propriedades da aroeira foram pesquisadas, entre elas sua propriedade antimicrobiana tem sido comprovada em vários trabalhos (MENEZES et al., 2009; MUKNE et al., 2011; TRENTIN et al., 2013). Outras propriedades como efeito antiinflamatório também foram demonstrados em vários trabalhos (RODRIGUES et al. 2002; SOUZA et al., 2007). No entanto, poucos trabalhos têm demonstrado (ou comprovado) os mecanismos moleculares / celulares que podem ser modulados pelos extratos de aroeira.

Assim, a investigação do potencial citotóxico do extrato de aroeira em osteoblastos humanos, especificamente aos mecanismos de viabilidade e expressão de metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2) e anquilose progressiva humana (ANKH), poderiam contribuir sobremaneira para sua aplicação racional em processos de reparo (e/ou descontaminação) de tecidos bucais e outras aplicações na odontologia, além de outras áreas da saúde. O entendimento do efeito do extrato de aroeira em proteínas secretadas por osteoblastos pode fornecer informações importantes para sua utilização como terapia alternativa nos casos de reparos de tecidos mineralizados.

2 Revisão de **Literatura**

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, funcionando como suporte para as partes moles e protegendo os órgãos vitais, tais como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano. Ele aloja e protege a medula óssea, que formam as células do sangue. Além disso, os ossos servem como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, mantendo assim constante a concentração desses íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; BEHONICK et al., 2007).

De acordo com Young & Heath (2001); Rubin e colaboradores (2006) os ossos estão organizados com uma camada externa densa e rígida de osso compacto, e com uma zona medular central ou esponjosa com trabéculas ósseas interconectadas. Segundo os mesmos autores citados acima, o número, a espessura e a orientação das trabéculas ósseas são dependentes das forças às quais o osso está exposto.

Esse tecido é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular mineralizado, chamado de matriz óssea. As células pertencentes ao tecido compacto são os osteócitos, que se localizam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, as quais são responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, participando dos processos de sua remodelação e osteoblastos “produtores” da parte orgânica da matriz, além da mineralização da mesma (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; RUBIN et al., 2006).

2.1.1 Células do tecido ósseo

➤ Osteócitos

Os osteócitos são provenientes de osteoblastos com baixo metabolismo presos dentro do osso formado, podem ajudar na nutrição do osso e sinalização em repostas à estímulos externos, situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz (YOUNG & HEATH, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; RUBIN et al., 2006). Os osteócitos caracterizam-se por serem células “estreladas”, que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pequeno e núcleo com cromática condensada. Embora essas características estruturais indiquem pequena atividade sintética, os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; RUBIN et al., 2006).

➤ Osteoclastos

Segundo Junqueira & Carneiro (2004) os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas. Possuem citoplasma granuloso, algumas vezes com vacúolos, nos osteoclastos jovens são pouco basófilos e nos osteoclastos maduros são acidófilos. Os osteoclastos possuem uma zona clara, que corresponde ao sítio de adesão entre esse tipo celular e a matriz óssea, criando um microambiente fechado, no qual a reabsorção óssea ocorre (TEITELBAUM, 2000). Os osteoclastos secretam para dentro desse microambiente fechado, ácido (H^+), colagenases, catepsina K e outras hidrolases que digerem a matriz óssea e dissolvem os cristais de sais de cálcio. As citocinas (pequenas proteínas sinalizadoras), os hormônios como calcitonina (hormônio produzido pela glândula tireóide) e o paratormônio (secretado pelas glândulas paratireoides) são as responsáveis por coordenar a atividade dos osteoclastos (TAKAHASHI et al., 1988; SUNDQUIST et al., 1990; MARSHALL et al., 1997).

➤ **Osteoblastos**

Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea e concentram fosfato de cálcio (na forma de apatita), envolvendo-se na mineralização da matriz. O arranjo se assemelha a um epitélio simples e os osteoblastos estão dispostos nas superfícies ósseas (YOUNG & HEATH, 2001; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004; RUBIN et al., 2006). São cubóides com o citoplasma basófilo quando em intensa atividade sintética. Entretanto, tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui em estado pouco ativo. Quando aprisionados pela matriz recém-sintetizada, os osteoblastos são chamados de osteócitos (STEVENS et al., 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O desenvolvimento de osteoblastos se dá a partir de células mesenquimais indiferenciadas que posteriormente tornando-se pré-osteoblastos, esses por sua vez, diferenciam-se em osteoblastos funcionais. As funções dos osteoblastos consistem principalmente na síntese da maioria das proteínas da matriz óssea extracelular; na expressão de genes fundamentais para a calcificação, na modulação (indução e inibição) da atividade de osteoclastos, na produção de fatores de crescimento, na produção de osteocalcina. Além disso, essas células contêm fosfatase alcalina e receptores para o hormônio paratireoide; secretam collagenase e desempenham um papel fundamental na regulação do crescimento e na diferenciação do osso (MARX & GARG, 1998; NAKASHIMA & de CROMBRUGGHE, 2003; RUBIN et al., 2006; NANJI, 2008).

O colágeno tipo I e a fosfatase alcalina são marcadores moleculares envolvidos na fase inicial de diferenciação e atividade osteoblástica. No estágio tardio da diferenciação dos osteoblastos existe um aumento da expressão da osteocalcina, culminando com a mineralização da matriz óssea extracelular. Além desses marcadores outros também estão envolvidos no desenvolvimento dos osteoblastos tais como a osteonectina (ON), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP), entre outras (MARX & GARG, 1998; NAKASHIMA & de CROMBRUGGHE, 2003; NANJI, 2008).

2.2 METALOPROTEÍNASES DE MATRIZ 2 (MMP-2)

Existem, atualmente, no mínimo 20 tipos de metaloproteínases de matriz (MMPs) humanas, as quais são agrupadas de acordo com a estrutura e substrato específico, tais como as collagenases (MMP-1, -8 e 13), estromelisinases, gelatinases (MMP-2, -9) e metaloproteínases ligadas à membrana plasmática (PEREIRA, 2005; HANNAS et al., 2007; TOCCHI & PARKS, 2013). As MMPs pertencem à família de proteínases zinco dependentes neutras (SOUZA & LINE, 2002). Entre os representantes das MMPs encontram-se as chamadas gelatinases A ou MMP-2 (72 kDa) tipo collagenase IV e gelatinase B ou MMP-9 (92 kDa) que degrada especialmente o colágeno tipo IV e regula o remodelamento das membranas basais (MAKELA et al., 1994; SLOMPO et al., 2012).

A degradação das proteínas da Matriz Extracelular (MEC) é realizada pelas MMPs, enquanto que a atividade das MMPs é modulada pelos chamados inibidores teciduais de metaloproteínases (TIMPs) (PAGE-MCCAW et al., 2007). As MMPs são secretadas por uma grande variedade de células, incluindo células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos), células epiteliais e fibroblastos, em resposta a um estímulo inflamatório (MURPHY & DOCHERTY, 1992; STERNLICHT & WERB, 2001).

No osso a MMP-2 é expressa constitutivamente por diversos tipos de células ósseas (MURPHY et al., 1989; OVERALL et al., 1989; RIFAS et al., 1989, MEIKLE et al., 1992), sendo uma das principais iniciadoras de ativação das outras MMPs na MEC, inclusive da MMP-9, como sugerido por Curran & Murray (1999).

A produção de MMPs por células ósseas *in vivo* e *in vitro* sugere sua importância no remodelamento ósseo (OTSUKA et al., 1984; HU et al., 2000). Neste processo, collagenases produzidas por osteoblastos são importantes na degradação da matriz orgânica, oferecendo a porção mineralizada para a atividade dos osteoclastos (TEZUKA et al., 1994).

As MMPs são sintetizadas e secretadas por algumas células como fibroblastos (SLOMPO et al., 2012), osteoblastos e odontoblastos para a matriz extracelular (PAGE-MCCAW et al., 2007). Sobre condições fisiológicas normais, estas MMPs (2 e 9) são expressas somente quando necessitam de remodelação do tecido. As MMPs estão presentes na cavidade oral sendo produzidas por diferentes tipos celulares, sendo que muitas gelatinases aumentam sua expressão durante a

doença periodontal, enquanto o tratamento periodontal convencional reduz efetivamente os níveis dessas enzimas (CHAUSSIAN-MILLER et al., 2006).

2.3 ANQUILOSE PROGRESSIVA HUMANA (ANKH)

O ANKH, gene humano homólogo da anquilose progressiva (ANK), está localizado no cromossomo 5-p15. 2-p14.1. O produto do gene é um importante fator de calcificação do tecido em ratos e seres humanos. A proteína ANKH transporta, transmembrana, pirofosfato inorgânico (PPi) entre os compartimentos intracelular e extracelular. O PPi é o principal inibidor da calcificação fisiológica e patológica, da mineralização óssea e reabsorção óssea (KOROSTISHEVSKY et al., 2008; KIRSCH, 2012; ZHOU et al., 2012).

Polimorfismos do gene ANKH foram encontrados associados com uma variedade de defeitos esqueléticos e com variações no tamanho e forma dos ossos em indivíduos aparentemente saudáveis (KIRSCH, 2012; ZHOU et al., 2012). A resistência óssea depende em grande parte da composição do tecido ósseo, incluindo a arquitetura; e da distribuição de massa óssea, bem como a geometria do osso. Também depende da taxa de remodelação óssea e dos níveis dos fatores bioquímicos associados, tais como o hormônio da paratireóide (PTH) e osteoprotegerina (OPG). Deficiências nos níveis de proteína ANKH podem causar um desequilíbrio no processo de mineralização e calcificação. As mutações que levam a variações não-funcionais da ANKH diminuem o PPi extracelular, resultando na deposição de fosfato de cálcio básico, e consequentemente causando anquilose progressiva das articulações. A inativação do gene resulta em uma desordem de ANKH e hipermineralização específica conhecida como displasia craniometafisária (KIRSCH, 2012; ZHOU et al., 2012), caracterizada pela esclerose e hiperostose do crânio, juntamente com a queima e modelagem anormal das metáfises dos ossos longos (KOROSTISHEVSKY et al., 2008).

ANKH é expressa em vários tipos de tecido e é provável que tenha papel distinto em outros tecidos, no qual a disfunção ANKH pode levar à calcificação anormal nos vasos e nos rins (CARR et al., 2009).

2.4 FITOTERAPIA

2.4.1 Considerações gerais

A literatura médica relata que desde os séculos XII e XIV os cuidados com a saúde bucal eram limitados aos tratamentos não-invasivos, tais como a utilização de ervas medicinais (ANDERSON, 2004).

Considerando os tempos atuais, o crescimento mundial da fitoterapia entre os programas preventivos e curativos tem incentivado a análise dos extratos de plantas para o uso na odontologia como controle do biofilme dental e diversas patologias bucais, principalmente por que o meio odontológico beneficia-se da riqueza em recursos naturais encontrados na flora brasileira (SOYAMA, 2007; OLIVEIRA et al., 2007). Por esses motivos, os estudos com produtos naturais na odontologia têm aumentado devido à procura por novos produtos com maior atividade terapêutica, menor toxicidade e melhor biocompatibilidade, além de oferecerem custos mais acessíveis à população (AGRA et al., 2007; OLIVEIRA, 2005).

De acordo com Gebara et al. (1996), Soares e colaboradores (2006) o tomilho e o cacau são utilizados na medicina popular como agentes anti-sépticos. Além dessas, outras plantas que apresentam destaque na odontologia são a aroeira, a própolis e a romã, em função das suas propriedades terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2007).

Roberts (2002) constatou que a busca por produtos naturais com atividade antibacteriana no combate a doenças que afetam a saúde bucal tem aumentado, principalmente por causa das cepas multirresistentes aos antibióticos e devido aos efeitos colaterais associados ao uso da clorexidina, considerada padrão ouro no controle da placa bacteriana (JONES, 1997). Os efeitos colaterais da clorexidina incluem a inativação na presença de sulfatos e cálcio (VAN GRUNSVEN & CARDOSO, 1995), manchamento extrínscico no esmalte dentário, hiperplasia de papilas linguais e perda do sentido da gustação.

Segundo Juiz et al. (2009), a utilização de produtos naturais somada ao tratamento preventivo poderia diminuir a alta incidência de doenças que afetam o ambiente oral, como a doença periodontal. A terapia periodontal convencional realizada de forma correta tem o objetivo de manter a saúde dos tecidos

periodontais, entretanto a recolonização da área subgengival pelos periodontopatógenos, resultado de uma terapia preventiva de manutenção incorreta, pode ocasionar em uma doença recorrente. Assim sendo, produtos naturais poderiam ajudar no controle do crescimento do biofilme dental subgengival (JUIZ et al., 2009).

2.4.2 Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* ou *Astronium urundeuva*)

Uma das espécies brasileiras que tem se destacado como fitoterápico é a *Myracrodruon urundeuva* ou *Astronium urundeuva*. Essa planta é conhecida pelos nomes populares de urundeuva, aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-do-campo, aroeira-da-serra, urindeúva e arindeúva (LORENZI, 2002). O termo aroeira tem sido usado para designar plantas classificadas em três gêneros da família Anacardiaceae: *Lithraea*, *Schinus* e *Astronium* (QUEIROZ et al., 2002).

A aroeira é vastamente encontrada no cerrado e caatinga brasileira (LACERDA et al., 1999) e é popularmente conhecida por suas propriedades medicinais, tais como atividade antiinflamatória, cicatrizante e aplicação em infecções urinárias e respiratórias (ANDRADE et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002; ALBUQUERQUE, 2006). Por outro lado a aroeira-do-sertão é conhecida não só por suas propriedades farmacológicas, mas também pelo seu alto poder sensibilizante e irritante, causando alergias, reações urticantes, eczemas e dermatites (DIÓGENES & MATOS, 1999; SOUZA et al., 2012).

Segundo Monteiro et al. (2006) os principais componentes químicos encontrados na aroeira são os taninos. Também comprovou-se a presença de alcalóides (LIMA, 2004), terpenos (FORTES, 2006) e substâncias esteróides como chalconas (MOTA, 2006). Haslam (1989) definiu os taninos como sendo metabólitos secundários de natureza polifenólica extraídos de plantas, classificando-os em dois grupos: as proantocianidinas ou taninos condensados, responsáveis pela adstringência e precipitação de proteínas; e os taninos hidrolisáveis, que são ésteres do ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico) com monossacarídeos, principalmente a glucose.

De acordo com Brandão e colaboradores (2007) a aroeira (*Schinus terebinthifolius*) possui propriedade antimicrobiana, antiinflamatória e antiulcerogênica, com ação antisséptica e utilizada no tratamento de estomatites.

Além disso, apresenta atividade bactericida e bacteriostática sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, (*Lactobacillus casei*) e propriedade antifúngica sobre *Cândida albicans*, *Cândida tropicalis* e *Cândida krusei*.

Bianco (2004) constatou que os extratos vegetais aquosos e hidroalcoólicos, de folha de araçá (*Psidium cattleianum*), folha de aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva*), caule de cancerosa (*Maytenus ilicifolius*), casca e folha de candeia (*Vanillosmopsis erythropappa*) folha de jacarandá caroba (*Jacaranda cuspidifolia*) foram capazes de inibir o crescimento bacteriano.

Queiroz et al. (2002) identificaram e quantificaram os taninos da aroeira preta (*Myracrodruon urundeuva*) de extratos em acetona-água (AA) e em metanol-água (MA), nos quais foram determinados os teores de fenóis totais e proantocianidinas. Os resultados mostram que a aroeira-preta contém uma elevada quantidade de taninos, que podem contribuir para sua resistência natural à degradação.

Em outro estudo Costa e colaboradores (2010) avaliaram a ação antimicrobiana dos extratos etanólicos da aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi), da aroeira-do-sertão (*Astronium urundeuva*), da ameixa-do-mato (*Ximenia americana* L.), da quixabeira (*Syderoxylum obtusifolium*) e do hipoclorito de sódio (NaOCl a 2,5% - controle negativo) contra o *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), utilizando-se como controle positivo a clorexidina a 0,12%. Nesse estudo, eles observaram que a quixabeira apresentou os menores halos de inibição, em contra partida a clorexidina a 0,12% e os extratos da aroeira-do-sertão e aroeira-da-praia, na concentração 100%, induziram halos maiores do que o NaOCl a 2,5%, com diferença estatisticamente significativa. Além disso, a aroeira-do-sertão e a aroeira-da-praia apresentaram halos de inibição contra o *Enterococcus faecalis* superiores aos demais extratos vegetais. Com base nisso, eles concluíram que as substâncias analisadas apresentaram atividade antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis*, sugerindo que podem representar uma alternativa no tratamento endodôntico, como solução irrigadora.

Em 2007, Soares e colaboradores avaliaram a ação antibacteriana *in vitro* da tintura da casca da aroeira a 20% sobre o *Streptococcus mutans* e verificaram a eficácia deste fitoterápico na descontaminação de escovas dentais *in vitro* contaminadas com este microrganismo. Os resultados evidenciaram que a tintura de

aroeira com diluição de até 1:8 e de clorexidina (controle positivo) com diluição de até 1:32 apresentaram atividade antibacteriana sobre o *S. mutans*. Em relação a descontaminação das escovas dentárias, observou-se que o inóculo da solução de clorexidina a 0,12% foi o único totalmente límpido após 24 horas. Ao realizar-se a semeadura para contagem das Unidades Formadoras de Colônias por ml (UFC/ml), verificou-se que a clorexidina apresentou UFC/ml igual a zero, a tintura de aroeira obteve UFC/ml igual a 77×10^{-3} ; e o controle negativo apresentou UFC/ml igual a 4432×10^{-3} . Com base nisso eles concluíram que a tintura de aroeira a 20% teve ação antibacteriana *in vitro* sobre *S. mutans* e foi eficiente na redução da contaminação de escovas dentais contaminadas por este microrganismo.

Em outro estudo a atividade antimicrobiana, antifúngica e antiaderente da aroeira-do-sertão, malva e goiabeira foram avaliadas *in vitro* como possíveis substâncias de prevenção da formação do biofilme dental e proliferação de cepas de *Candida*. Os resultados mostraram que todas as linhagens demonstraram serem sensíveis aos extratos hidroalcoólicos analisados. Em relação ao extrato da aroeira-do-sertão, o *Lactobacillus casei* foi o mais sensível. Esse dado é muito importante, pois se sabe que este é o microrganismo responsável pela estabilidade e aumento do biofilme. Os outros resultados mostraram que os três extratos apresentaram atividade antiaderente, ou seja, constatou-se a ausência de aderência da bactéria a parede do tubo de vidro, demonstrando a capacidade dos extratos de inibir a síntese do glucano pela glicosiltransferase. Nesse estudo também observou que o extrato da aroeira-do-sertão apresentou atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Com isso, os autores concluíram que os extratos inibiram o crescimento das bactérias do biofilme dental e os fungos da candidose oral, podendo ser utilizados, clinicamente, como meio alternativo no tratamento da candidose oral e na prevenção do biofilme dental (ALVES et al., 2009).

Menezes (2006) avaliou se os extratos de araçá e de aroeira-do-sertão afetavam a microdureza do esmalte dental de ratos submetidos a desafio cariogênico e avaliaram a ação desses extratos na microbiota cariogênica desses animais. Para esse propósito, foram utilizados 60 ratos do tipo *Wistar*, submetidos ao desafio cariogênico. Metade deles sofreram a cirurgia para remoção das glândulas salivares maiores. Os grupos experimentais receberam, como solução de hidratação, água (controle), extrato de araçá (diluído em água) ou extrato de aroeira

(diluída em água). As coletas da microbiota bucal dos animais foram realizadas semanalmente e, após 53 dias, os animais foram sacrificados. Os dentes dos animais foram preparados e submetidos à análise de microdureza longitudinal do esmalte, assim como os órgãos vitais de alguns animais foram removidos e submetidos à análise histopatológica. Os resultados demonstraram que os dois extratos testados produziram uma redução considerável da microbiota cariogênica nos animais experimentais e o consumo dos mesmos influenciou positivamente a dureza superficial do esmalte. Outro aspecto importante foi que a ingestão dos extratos não alterou de forma significativa os órgãos dos animais, quando comparado com os grupos controle.

Trentin et al. (2013) investigaram a capacidade dos extratos provenientes das cascas dos troncos de *Anadenanthera colubrina*, *Commiphora leptophloeos* e *Myracrodruon urundeuva* em controlar a prevenção e o crescimento da formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, um importante agente patogênico aderente às superfícies de proteção de biofilmes. Os resultados da cinética (0-72 horas) revelaram que o crescimento de bactérias tratadas com extrato foi inibido após 9 horas de incubação, sugerindo uma atividade bacteriostática. A microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia de fluorescência mostraram tanto células viáveis como células não viáveis, indicando dano na membrana bacteriana. Os resultados do ensaio de cristal violeta e da microscopia eletrônica de varredura evidenciaram que os tratamentos com os extratos inibiram consideravelmente a formação do biofilme durante 6 e 24 horas. Além disso, mostraram que a produção da matriz permaneceu prejudicada, mesmo com crescimento restaurado após 24 e 48 horas de incubação. Com base nesses resultados, os autores concluíram que os taninos identificados (condensados e hidrolizáveis) inibiram a formação de biofilme por meio das propriedades bacteriostáticas, danificando a membrana bacteriana e impedindo a produção da matriz.

Carlini et al. (2013) viram que os extratos da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia) e *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) foram potencialmente tóxicos quando administrados cronicamente. Os extratos induziram a má formação óssea nos filhotes de ratas fêmeas tratadas durante a gravidez. Nesse estudo foi constatado que altas doses de *S. terebinthifolius* reduziram significativamente o número de hemoglobina e hematócito. Em relação ao

extrato de *M. urundeuva* constatou-se a redução significativa de hematócitos, e uma diminuição não significativa de eritrócitos e hemoglobina.

Rodrigues e colaboradores (2002) verificaram os aspectos morfológicos (edema, úlceras, etc.) e morfométricos (resto celular, necrose, polimorfonucleares, colágeno, etc.) no processo inflamatório da colite difusa induzida por ácido acético a 10% em ratos tratados com extrato aquoso de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), com ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico (5-ASA) utilizado como padrão e carboximetilcelulose (veículo), utilizado como controle. Os resultados da avaliação morfológica mostraram que com um dia o ácido acético produziu um aumento significativo da necrose nos grupos tratados com extrato de aroeira (10% e 20%) ou 5-ASA do que nos controles. No entanto, com 60 dias, houve maior número de células caliciformes e absortivas nos grupos tratados em comparação com ao controle. Também com 60 dias, observou um aumento significativo de eosinófilos, células multinucleadas e deposição de colágeno no controle em comparação com os grupos tratados. No mesmo período foi detectado um maior número de células polimorfonucleadas no grupo tratado com o extrato de aroeira, porém não foi detectada a presença dessas células no grupo tratado com 5-ASA. Estes dados indicam que os animais tratados com extrato de aroeira ou com o 5-ASA mostraram completa regeneração do tecido epitelial, enquanto que no controle persistiu o exsudato da inflamação crônica e a regeneração tecidual ocorreu por meio de fibrose.

Nobre-Junior et al. (2009) mostraram que o extrato de *Myracrodruon urundeuva*, possui ação neuroprotetora na morte de células neuronais de ratos, induzida por 6-hidroxidopamina(6-OHDA), uma toxina indutora dos fenômenos típicos da Doença de Parkinson. Os resultados desse estudo mostraram que no ensaio de MTT (brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio), ensaio que avaliou a viabilidade celular, o extrato (nas concentrações de 1-100 µg/ml) reverteu a morte celular induzida por 6-OHDA de forma dependente da concentração. Além disso, as células expostas a 6-OHDA (40µM) apresentaram um aumento na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), já o pré-tratamento com o extrato de *Myracrodruon urundeuva* (10-100 µg/ml) reduziu significativamente a formação de TBARS induzidas por 6-OHDA, indicando uma neuroproteção contra a lipoperoxidação. Outro dado importante foi que o extrato de aroeira impediu a formação de óxido nítrico e produção de radicais livres,

produzidos a partir do aumento drástico dos níveis de nitrito, induzido pela 6-OHDA. Os resultados mostraram também que o extrato de aroeira (100 µg/ml) protegeu as células da apoptose e necrose; e ainda aumentou o número de células com morfologia normal. Com esse estudo os autores concluíram que os efeitos neuroprotetores do extrato reduziram o estresse oxidativo e as lesões por apoptose causadas pela 6-OHDA. Além disso, o extrato de aroeira poderia proporcionar benefícios, juntamente com outras terapias, em doenças neurodegenerativas, tais como a Doença de Parkinson.

Botelho e colaboradores (2007, 2008) avaliaram o efeito do gel tópico feito com o óleo da folha do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) 0,5% e com a casca da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) 5% aplicados em ratos que tiveram doença periodontal induzida. Um gel à base de solução salina foi utilizado como controle e um gel à base de doxiciclina 10% foram utilizados como substância de referência. Os resultados mostraram que a perda óssea alveolar foi inibida pelo tratamento combinado de *Lippia sidoides* e *Myracrodruon urundeuva* comparado ao grupo controle. Além disso, o tratamento combinado de *Lippia sidoides* e *Myracrodruon urundeuva* reduziu a lesão tecidual, com preservação parcial do periodonto, associado a uma diminuição da atividade de mieloperoxidase, bem como inibiu significativamente a produção de TNF- α e IL-1 β no tecido gengival em relação ao grupo controle. O tratamento combinado de *Lippia sidoides* e *Myracrodruon urundeuva* também previniu o crescimento de microrganismos orais e a perda de peso dos animais. O tratamento a base de gel das duas plantas impediu a reabsorção óssea alveolar e demonstrou atividades antiinflamatórias e antibacterianas na periodontite experimental.

Desse modo, com o crescente interesse na confirmação e validação científica dos efeitos de plantas medicinais populares, muitas pesquisas têm sido realizadas com uma grande variedade de espécies vegetais. Particularmente, a aroeira tem mostrado bons resultados em pesquisas envolvendo o controle de microrganismos relacionados às patologias bucais. No entanto, necessitamos de outros estudos para comprovar seu mecanismo de ação e estabelecer condições seguras para seu uso em situações (doenças) específicas. Lembrando que efeitos colaterais, não somente com a aroeira, tem sido registrado na literatura. Por isso a importância de se buscar maior conhecimento do seu potencial citotóxico e a modulação de mecanismos celulares e moleculares em outras células, como no

caso dos osteoblastos. Além disso, em condições apropriadas de tratamento, o extrato de aroeira poderia ser utilizado com o objetivo específico de modular o metabolismo do osso, através de alterações metabólicas de osteoblastos e osteoclastos. Certamente estes avanços poderão impactar o tratamento de doenças periodontais progressivas, as quais levam à perda óssea considerável na região do periodonto.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira sobre osteoblastos humanos.

Objetivos específicos

1- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira na viabilidade de osteoblastos humanos;

2- Analisar a influência do extrato hidroalcoólico de aroeira na expressão de MMP-2 e ANKH.

4 Material e **Métodos**

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA (*Myracrodruon urundeuva*)

O extrato hidroalcoólico de aroeira foi obtido (coleta e preparo) e cedido pela aluna Alessandra Cury Machado, aluna de doutorado do Programa de Ciências Odontológicas e Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), área de concentração Biologia Oral.

A aluna de doutorado Alessandra Cury Machado, com a colaboração da Prof^a. Dr^a. Anne Ligia Dokkedal Bosqueiro (Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/ Bauru), fez a caracterização química do extrato de aroeira, encontrando na sua composição taninos, flavonóides e derivados de ácido gálico e de galotaninos (MACHADO, 2013).

4.1.1 Etapa botânica

As folhas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) foram coletadas dentro do campus da UNESP de Bauru. Foram realizadas coletas de plantas em quantidade suficiente para a obtenção dos extratos e para preparação das exsiccatas, seguida de herborização e armazenamento no herbário do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP de Bauru (**Figura 1**).

Figura 1- Árvore e folhas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* ou *Astronium urundeuva*)

4.1.2 Etapa química

➤ **Preparo do extrato hidroalcoólico de aroeira**

As folhas foram separadas das demais partes da planta, e selecionadas para utilização apenas das folhas saudáveis, sem sinais de envelhecimento, doenças e pragas. Antes de retirá-las, realizou uma leve raspagem para remover a superfície impregnada com poeira e insetos. As folhas, em seguida, foram lavadas em água corrente e colocadas para secar inicialmente em locais ventilados à temperatura ambiente (média de 27°C), seguida pela secagem em estufa a temperatura controlada de 37°C, até que se apresentassem secas e quebradiças. Realizou-se a trituração manual seguida da trituração com o gral e pistilo até que as folhas tornassem pó (MATOS, 2002) (**Figura 2**).

As folhas pulverizadas foram extraídas com metanol 80%. A extração foi feita por maceração da planta com o solvente orgânico por uma semana. Este procedimento foi repetido várias vezes, até completa extração das substâncias. Em seguida, as misturas foram filtradas, reunidas e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, em temperatura abaixo de 60°C. O extrato bruto assim obtido foi transferido para vidro tarado e deixado em capela até completa eliminação do solvente. O extrato foi liofilizado para completa remoção da água ou de solventes orgânicos (**Figura 2**) (Para mais informações consulte MACHADO, 2013).

Figura 2 - Etapas para a obtenção do extrato hidroalcoólico de aroeira. **(A)** Secagem das folhas. **(B)** Trituração manual das folhas. **(C)** Trituração com gral e pistilo. **(D)** Folhas pulverizadas. **(E)** Folhas pulverizadas com metanol 80%. **(F)** Armazenamento do extrato.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS

4.2.1 Obtenção dos osteoblastos humanos

Os osteoblastos humanos foram doados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. José Mauro Granjeiro e teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense-UFF (CEP CMM/HUAP n°232/08) e do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-FOB/USP (CEP n°096/2011) (**Anexo 1**). As células foram coletadas no Hospital Universitário Antônio Pedro-UFF a partir de explantes ósseos obtidos em cirurgias ortopédicas (artroplastias). Os explantes foram tratados em colagenase 0,25% por 2 horas e depois acondicionados em frascos plásticos de 25 cm² em meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco – *NUTRICELL* - Campinas, Brasil) suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino- *NUTRICELL* - Campinas, Brasil). As células (na primeira cultura) obtiveram a monocamada após aproximadamente 30 dias. Os osteoblastos foram mantidos e incubados a 37°C numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2.2 Cultivo e expansão dos osteoblastos humanos

Uma vez que essa linhagem celular cresce em monocamada aderente, para a sua subcultura foi necessário a dissociação entre células e a matriz, e entre as células adjacentes. Neste caso foi utilizada uma enzima proteolítica, chamada de tripsina, que digere as adesões célula-célula e também dissocia as células do frasco de cultura. Após a lavagem das células com solução de PBS (solução salina tamponada), foi adicionada uma solução de tripsina – ácido etilenodiamina tetracético (0,25% tripsina, 1mM EDTA- *Sigma-Aldrich*) diluída em PBS (2:8), mantida por 5 minutos na estufa de CO₂ a 37°C e em seguida a enzima foi inativada com meio de cultura complementado com 10% SFB. As células foram transferidas para um tubo *falcon* e centrifugadas com 1.200 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o *pellet* foi ressuspenso em meio DMEM com 10% SFB. Uma parte das células foi utilizada para os ensaios (Passagem 15) e outra parte foi congelada para a formação de um banco de células (**Figura 3**).

Figura 3 – Cultivo e expansão de osteoblastos humanos. **(A)** Capela de fluxo laminar. **(B)** Incubadora de CO₂. **(C)** Frasco de cultura com osteoblastos humanos. **(D)** Fotomicrografia de osteoblastos humanos em microscópio de fase invertida LEICA/ DM IRBE, objetiva 10X.

4.3 PREPARO DO MEIO CONDICIONADO COM O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA

A concentração usada para o experimento foi de 1 mg/ml (extrato hidroalcoólico de aroeira / meio de cultura DMEM). Segundo a ISO nº 10993-5, para teste *in vitro* do extrato do material é indicado diferentes diluições, por esse motivo foi feita uma adaptação da norma da ISO e escolheu-se 1 mg/ml como sendo a diluição inicial (grupo chamado de extrato bruto - EB). Feito isso, pesou-se 1 mg do extrato bruto hidroalcoólico de aroeira para cada 1 ml de meio DMEM com 10% SFB e em seguida agitou-se no vórtex para a solubilização da solução. Posteriormente, realizou-se as diluições seriadas de 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000 a partir do extrato bruto (EB). As diluições foram realizadas nos dias dos tratamentos e utilizadas imediatamente após a sua confecção.

Os grupos experimentais foram divididos em grupo controle (grupo I), contendo DMEM a 10% SFB e grupos tratados (II, III, IV, V e VI correspondendo a EB, 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000; respectivamente) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Concentração do extrato hidroalcoólico em meio de cultura DMEM.

Grupos	Concentração do extrato em meio de cultura DMEM
I	Controle (meio DMEM 10% SFB)
II	Extrato bruto (1mg de extrato / 1 ml de DMEM 10% SFB)
III	1:10 extrato /DMEM
IV	1:100 extrato /DMEM
V	1:1.000 extrato /DMEM
VI	1:10.000 extrato /DMEM

4.4 TESTE DE TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE AROEIRA

Após atingirem a subconfluência no frasco de cultura, os osteoblastos foram cultivados com meio DMEM 10% SFB acrescido do extrato bruto na concentração de 1mg / 1ml. As células foram mantidas na estufa por 72 horas e em seguida foi realizada a contagem celular, na qual as células foram removidas com tripsina 0,25% e centrifugadas para a formação do *pellet*. O *pellet* foi ressuspensão e as células foram contadas utilizando a câmara de *Neubauer* após a adição de azul de *tripan*.

4.5 PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA FILTRADO E NÃO FILTRADO

Foi realizado um experimento piloto de redução do MTT nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas com as células da linhagem MC3T3 – E1 (pré-osteoblastos) obtidos de camundongos, plaqueados na densidade de 5×10^3 para estabelecer se seria usado o extrato filtrado ou não filtrado para os próximos experimentos com os osteoblastos humanos. A partir desse teste ficou estabelecido que o extrato a ser usado seria o não filtrado, por preservar mais as suas propriedades (antimicrobianas, por exemplo), além de conservar compostos importantes que poderiam ser removidos no processo de filtração (esse último ponto foi uma sugestão da Prof^a. Dr^a. Anne Ligia Dokkedal Bosqueiro).

4.6 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR (24 -96 HORAS)

Foram testadas duas densidades celulares para os ensaios de viabilidade celular. Os osteoblastos humanos foram plaqueados na densidade de 2×10^3 e 3×10^3 células por poço em placas de 96 poços para o teste de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio), captação do vermelho neutro (VN) e cristal violeta (CV), nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas após a adição do meio condicionado com o extrato hidroalcoólico de aroeira nas diferentes concentrações.

Para períodos curtos (24-96 horas), após incubação por 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM complementado por 10% de SFB e diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de aroeira (1:10; 1:100; 1:1.000;

1:10.000). Para os períodos longos (7-28 dias), além do DMEM 10% SFB com extrato em diferentes concentrações também foi adicionado β - glicerofosfato (10 mM) e ácido ascórbico (50 μ g), conhecido como meio osteogênico, utilizado para induzir a diferenciação celular e as trocas dos meios das placas foram realizadas a cada dois dias. As soluções hidroalcoólicas de aroeira não foram filtradas e o grupo do extrato bruto foi excluído após o teste de toxicidade.

Posteriormente a cada período experimental, o meio de cultura contendo o extrato de aroeira foi removido, as células foram lavadas com PBS e divididas para realização dos diferentes ensaios.

4.6.1 Redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio)

A análise da atividade mitocondrial das células foi realizada pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio) (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantificou a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, foi solubilizado e, então, sua concentração foi determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro. Primeiramente as células foram lavadas duas vezes com PBS para remover qualquer resquício do extrato de aroeira, em seguida as células foram incubadas numa solução de 0,5 mg de MTT para 1ml de DMEM sem SFB, essa solução foi preparada no momento do seu uso e foi filtrada em filtro *Millipore* (0,22 μ m) antes de ser adicionado nas placas. Após esse procedimento, as placas foram deixadas por 4h a 37°C; em seguida removeu-se a solução, o pigmento insolúvel reduzido intracelularmente foi extraído em DMSO (dimetilsulfóxido) e deixado em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, a absorbância foi mensurada a 562 nm (*FLUOstar OPTIMA*, *BMG Labtech*, *Offenburg*, Alemanha). Para análise estatística, os dados de densidade óptica (DO), ou seja, de viabilidade celular, foram apresentados como média e desvio-padrão (**Figura 4**).

Figura 4 – Imagens da placa do ensaio de redução do MTT. **(A)** Placa com a solução de MTT (0,5 mg/ml). **(B)** Extração do formazan (pigmento insolúvel reduzido intracelularmente) com DMSO.

4.6.2 Captação do Vermelho Neutro (VN)

A partir de uma solução estoque de vermelho neutro 0,4% foi obtida uma solução de 50 µg de vermelho neutro para 1 ml de DMEM. A solução obtida permaneceu em estufa 37°C "overnight" para haver a precipitação de cristais, sendo em seguida filtrada em filtro *Millipore* (0,22 µm). As células foram lavadas duas vezes com PBS e tratadas com essa solução de VN (50 µg/ml), posteriormente as placas foram incubadas por 3h, a 37°C, para permitir a captação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Os poços foram lavados com PBS e o corante foi extraído com uma solução com 50 % de etanol e 1% de ácido acético. Em seguida, a absorbância foi determinada a 540 nm (*FLUOstar OPTIMA*, *BMG Labtech*, *Offenburg*, Alemanha) (**Figura 5**).

Figura 5 – Imagens da placa do ensaio de captação do vermelho neutro. **(A)** Placa com solução de vermelho neutro (50 µg/ml). **(B)** Placa com solução de 50% de etanol e 1% de ácido acético.

4.6.3 Cristal Violeta (CV)

O teste de cristal violeta é responsável por corar os ácidos nucleicos das células (KUENG et al., 1989). Para a realização desse ensaio, as células foram lavadas duas vezes com PBS e em seguida foi adicionado metanol 100% durante 10 minutos. Após esse período retirou-se o metanol e adicionou-se a solução de cristal violeta 0,2% em etanol 20% por 3 minutos. Em seguida, removeu-se a solução e novamente lavou-se duas vezes os poços com PBS para remover o excesso do corante. Por fim, acrescentou-se a solução de citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ com 50% de etanol durante 10 minutos. A absorbância foi determinada a 540nm (*FLUOstar OPTIMA*, *BMG Labtech*, *Offenburg*, Alemanha) (**Figura 6**).

Figura 6 - Imagens da placa do ensaio de cristal violeta. **(A)** Placa com solução de cristal violeta. **(B)** Extração do corante com citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

4.7 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR (7 -28 DIAS)

Esse ensaio foi realizado para verificar se os osteoblastos humanos permaneciam viáveis durante longos períodos em contato com extrato hidroalcoólico de aroeira. Para isso, foram plaqueadas com 5×10^2 células por poço em placas de 96 poços analisados nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias após a adição do meio osteogênico [β -glicerofosfato (10mM) e ácido ascórbico(50 μ g)] a 10% SFB acrescido das diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de aroeira (1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000). Para essa finalidade, após 24 horas do plaqueamento o meio de cultivo foi substituído por meio DMEM osteogênico com as diluições do extrato e a troca dos meios das placas foi realizada a cada dois dias. Assim como nos outros ensaios de viabilidade as soluções hidroalcoólicas de aroeira não foram filtradas e o grupo do extrato bruto foi excluído após o teste de toxicidade.

Após cada período experimental, o meio de cultura contendo o extrato de aroeira foi removido, as células foram lavadas com PBS e realizou-se o ensaio da redução do MTT. A absorbância foi mensurada a 562 nm (*LEITORA SYNERGY MX MONOCHROMATOR-BASED, BIOTEK*, Estados Unidos).

4.8 CONTAGEM CELULAR

As células de três poços da placa de 96 poços foram removidas utilizando-se tripsina 0,25% diluída em PBS (2:8), essa por sua vez foi inativada com DMEM 10% SFB, sendo então transferidos para microtubos e centrifugados a 1.200 rpm, 4°C por 5 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspenso em DMEM e as células foram contadas utilizando a câmara de *Neubauer* após a adição do azul de *tripan* a 0,2%. Essa contagem foi realizada nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias para comprovar a viabilidade e garantir que até o final do experimento a densidade celular não ultrapassasse 5×10^5 células por poço para o ensaio de RT-PCR em tempo real, pois essa foi a densidade máxima recomendada pelo fabricante do kit de extração de RNAm.

4.9 RT-PCR EM TEMPO REAL (TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL)

Os osteoblastos humanos foram plaqueados na densidade de 5×10^2 células por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas da adesão celular foi feita a troca por um meio osteogênico [DMEM 10% SFB complementado de β -glicerofosfato (10 mM) e ácido ascórbico (50 μ g)] com as diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de aroeira (1:100; 1:1.000 e 1:10.000), além do grupo controle contendo apenas meio osteogênico. Foram realizadas as trocas dos meios a cada dois dias. O grupo 1:10 foi excluído do ensaio de RT-PCR em tempo real após a análise dos resultados de viabilidade celular. Com 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias o RNAm foi extraído e transcrito para cDNA através do kit *TaqMan® Gene Expression Cells-to-CT™* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras de cDNA foram incubadas com *Taqman® Gene Expression master mix* e com *Taqman® Gene Expression assay* (Applied Biosystems) para MMP-2 e ANKH. A β -actina foi utilizada como controle endógeno.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.10.1 Análises estatísticas dos ensaios de viabilidade celular

As análises estatísticas dos ensaios de viabilidade celular foram feitas no *software GraphPad Prism 5* selecionando o teste estatístico *two-way ANOVA* complementado por *Bonferroni*, com indicação de $p < 0,05$.

4.10.2 Análise estatística do RT-PCR em tempo real

As análises estatísticas dos resultados de RT-PCR em tempo real foram feitas no *software GraphPad Prism 5* selecionando o teste estatístico *one-way ANOVA* complementado pelo teste de *Tukey*, com indicação de $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1. TESTE DE TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DE AROEIRA

Durante a contagem celular não foi encontrado nenhuma célula viável no frasco de cultura e na câmara de *Neubauer*. Esse teste mostrou que o extrato na concentração de 1mg/1ml (extrato bruto – grupo EB), provocou a morte celular dos osteoblastos humanos (**Figura 7A e 7B**). Dessa maneira, o grupo EB foi eliminado da análise dos ensaios de redução do MTT, captação do vermelho neutro, cristal violeta e do RT-PCR em tempo real.

Figura 7 – Imagens microscópicas do teste de toxicidade celular. **(A)** Imagem microscópica do cultivo de osteoblastos humanos com extrato bruto de aroeira no período de 72 horas. **(B)** Imagem microscópica da câmara de *Neubauer* para contagem celular com o protocolo do azul de *tripan*.

5.2 PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA FILTRADO E NÃO FILTRADO - ANÁLISE DA REDUÇÃO DO MTT (24 – 96 HORAS) EM PRÉ-OSTEOBLASTOS (MC3T3-E1)

Nesse ensaio notou-se que os grupos de extrato de aroeira filtrado e não filtrado não apresentaram grandes diferenças entre si no período de 24 horas, ficando evidente que o extrato não filtrado não contaminou as células, sugerindo seu possível potencial antibactericida. Apesar dos grupos com o extrato filtrado apresentarem maiores valores de absorbância em alguns períodos e grupos, os valores de absorbância tendem a serem maiores nos grupos não filtrados, principalmente nos períodos de 72 e 96 horas. Analisando os resultados (**Gráfico 1**), observou-se que com 24 horas os grupos 1:10 (filtrado e não filtrado) e o grupo 1:10.000 não filtrado foram estatisticamente diferentes entre si e em relação ao controle. No período de 48 horas, apenas os grupos 1:10 tanto filtrado como não filtrado foram diferentes dos demais grupos. Com 72 horas, os grupos 1:10 (filtrado e não filtrado), os grupos 1:100 (filtrado e não filtrado) e o grupo 1:1.000 filtrado foram estatisticamente diferentes do controle. No último período (96 horas) o grupo 1:100 filtrado foi diferente dos demais grupos. Também é possível perceber que o grupo 1:10, tanto filtrado como não filtrado, apresenta uma expressiva redução da viabilidade celular, e essa redução se mantém em todos os períodos experimentais, indicando uma possível toxicidade celular (**Gráfico 1**). Outro dado importante é que na maioria dos grupos, e na maioria dos períodos, não houve diferenças estatísticas entre 1:10; 1:100; 1:1.000 e 1:10.000 filtrados comparados com 1:10; 1:100; 1:1.000 e 1:10.000 não filtrados, com exceção do grupo 1:10.000 no período de 24 horas e do grupo 1:1.000 no período de 96 horas (**Gráfico 1**).

A partir desses resultados optou-se por utilizar o extrato não filtrado para os demais experimentos, pois de maneira geral não houve diferenças entre filtrados e não filtrados, além disso, a filtração poderia reter algumas substâncias que em períodos longos poderiam ser importantes para a viabilidade celular.

Gráfico 1 - Análise da redução do MTT de MC3T3 – E1 tratados com extrato hidroalcoólico de aroeira filtrado e não filtrado nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. Com 24 horas os grupos 1:10 (filtrado e não filtrado) e o grupo 1:10.000 não filtrado foram estatisticamente diferentes entre si e em relação ao controle. Com 48 horas, apenas os grupos 1:10 tanto filtrado como não filtrado foram diferentes dos demais grupos. Com 72 horas, os grupos 1:10 (filtrado e não filtrado), os grupos 1:100 (filtrado e não filtrado) e o grupo 1:1.000 filtrado foram estatisticamente diferentes do controle. Com 96 horas os grupos 1:10 (filtrado e não filtrado) e 1:100 filtrado foi diferente dos demais grupos. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.3 ANÁLISE DA REDUÇÃO DO MTT EM OSTEOLASTOS HUMANOS TRATADOS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA NAS DENSIDADES DE 2×10^3 E 3×10^3 CÉLULAS POR POÇO NOS PERÍODOS DE 24, 48, 72 E 96 HORAS

No ensaio da redução do MTT com a densidade de 2×10^3 células por poço, os resultados mostraram que os valores da absorbância ficaram muito baixos, principalmente os grupos tratados que obtiveram valores menores que 0,4. De um modo geral, houve o aumento da viabilidade dos osteoblastos humanos no controle e no grupo com o extrato de aroeira na diluição de 1:10.000; também houve a diminuição da viabilidade com o extrato diluído a 1:10, no decorrer dos períodos experimentais (**Gráfico 2**). Os resultados mostraram que no período de 24 horas os grupos com o extrato hidroalcoólico de aroeira diluído nas concentrações de 1:10, 1:1.000 e 1:10.000 foram estatisticamente diferentes do controle e dos demais grupos, porém 1:1.000 e 1:10.000 não foram diferentes entre si. Com 48 horas todos os grupos tratados com o extrato de aroeira foram diferentes do controle, entretanto 1:100, 1:1.000 e 1:10.000 não apresentaram diferenças entre si. No período de 72 horas todos os grupos tratados com a aroeira foram estatisticamente diferentes do controle, além disso, o grupo 1:10 foi diferente dos grupos 1:1.000 e 1:10.000. No último período (96 horas) o grupo controle também foi estatisticamente diferente dos demais grupos, além disso, os grupos tratados também foram diferentes entre si, com exceção do grupo 1:1.000, que não apresentou diferenças em relação ao 1:10 e 1.100 (**Gráfico 2**).

No teste de redução do MTT com 3×10^3 células por poço notamos que, em geral, houve oscilações na viabilidade celular dos grupos tratados com as diferentes concentrações do extrato de aroeira, no caso do grupo 1:10, no período de 24 horas, este apresentou um aumento significativo da viabilidade celular comparado com o grupo controle e com os demais grupos (1:100; 1:1.000 e 1:10.000). Novamente o grupo 1:10, no período de 48 horas, teve um aumento significativo em relação ao controle e aos outros grupos (**Gráfico 3**). Entretanto, o grupo 1:10.000 teve uma redução significativa em relação ao controle. Em 72 horas, o grupo 1:10 não foi diferente do grupo controle. Além disso, o grupo controle obteve uma taxa mais alta e significativamente diferente dos grupos tratados com o extrato

de aroeira. Com 96 horas, a viabilidade do grupo controle foi maior e estatisticamente significativa quando comparado com todos os grupos tratados. Além disso, o grupo 1:10.000 se mostrou maior que os outros grupos tratados e mais próximo do controle. Em geral, no decorrer de todos os períodos notou-se a queda da viabilidade celular com o tratamento de 1:10 e o aumento da viabilidade com o tratamento 1:10.000 nos osteoblastos humanos (**Gráfico 3**).

Comparando-se os resultados das duas densidades celulares (2×10^3 e 3×10^3) (**Gráficos 2 e 3**) foi observado que o perfil dos ensaios da redução do MTT com 2×10^3 e 3×10^3 é semelhante, apesar da absorbância ser menor com a densidade de 2×10^3 células por poço do que com 3×10^3 . O ensaio com essas duas densidades mostrou que houve a tendência do aumento da viabilidade celular nos grupos controle e no grupo com extrato diluído a 1:10.000; e a diminuição da viabilidade dos osteoblastos humanos no grupo 1:10, conforme o transcorrer dos períodos.

Gráfico 2 – Gráfico da redução do MTT de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 2×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas. O gráfico mostra que no período de 24 horas os 1:10, 1:1.000 e 1:10.000 foram estatisticamente diferentes do controle e dos demais grupos. Com 48 e 72 horas todos os grupos tratados com o extrato de aroeira foram diferentes do controle. Com 96 horas o grupo controle também foi estatisticamente diferente dos demais grupos, além disso, os grupos tratados também foram diferentes entre si, com exceção do grupo 1:1.000, que não apresentou diferenças em relação ao 1:10. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$). e 1.100. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Gráfico 3 – Gráfico da redução do MTT de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 3×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas. Com 24 horas o grupo 1:10 apresentou um aumento significativo da viabilidade celular comparado com o grupo controle e com os demais grupos. Com 48 horas o grupo 1:10 teve um aumento significativo em relação ao controle e aos outros grupos, por outro lado o grupo 1:10.000 teve uma redução significativa em relação ao controle. Com 72 horas o grupo 1:10 não foi diferente do grupo controle. Com 96 horas a viabilidade do grupo controle foi maior e estatisticamente significativa quando comparado com todos os grupos tratados. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.4 ANÁLISE DA CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS TRATADOS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA NAS DENSIDADES DE 2×10^3 E 3×10^3 CÉLULAS POR POÇO NOS PERÍODOS DE 24, 48, 72 E 96 HORAS

A captação do vermelho neutro (VN) em osteoblasto humanos com a densidade de 2×10^3 células por poço, mostrou que tanto no período de 24 horas como no de 48 horas não obteve-se diferenças estatísticas. Em contrapartida, no período de 72 horas todos os grupos tratados com o extrato de aroeira apresentaram diferenças em relação ao controle e entre si, com exceção dos grupos 1:100 e 1:10.000 que não foram diferentes entre si. Além disso, nesse período houve o aumento da viabilidade celular dos grupos 1:100, 1:1.000 e 1:10.000 em relação aos períodos anteriores. No período de 96 horas houve o aumento da viabilidade celular dos grupos controle e 1:10.000, ficando a absorbância do grupo 1:10.000 muito próxima ao do controle. Em adição, nesse período notou-se a diminuição da viabilidade celular dos osteoblastos nos outros grupos tratados (**Gráfico 4**).

Em relação a captação do vermelho neutro na densidade de 3×10^3 células, notamos uma manutenção da viabilidade celular nos períodos de 24, 48 e 72 horas para os grupos 1:10, 1:100 e 1:1.000. No período de 48 horas, todos os grupos tratados com o extrato de aroeira foram menores e estatisticamente diferentes em comparação ao grupo controle, porém não foram diferentes entre si (**Gráfico 5**). No período de 72 horas todos os grupos tratados com o extrato de aroeira também foram menores e estatisticamente diferentes do controle, entretanto os grupos 1:1.000 e 1:10.000 não foram diferentes dos grupos 1:100 e 1:10, respectivamente. Por fim, no período de 96 horas os grupos 1:10, 1:100 e 1:1.000 tiveram uma diminuição da viabilidade e os mesmos foram diferentes tanto do controle como do grupo 1:10.000. Em contrapartida, os grupos controle e 1:10.000 apresentaram um aumento na viabilidade celular com o decorrer dos períodos experimentais. Com o passar dos períodos observou-se a diminuição da viabilidade celular quando as células foram tratadas com o extrato 1:10 e um aumento nas células tratadas com o extrato 1:10.000, ou seja, esses dois grupos (controle e 1:10.000) apresentaram os maiores valores de viabilidade no período final dos experimentos (96 horas) (**Gráfico 5**).

Comparando-se a captação do vermelho neutro nas densidades de 2×10^3 e 3×10^3 (**Gráficos 4 e 5**) é notório que, assim como no ensaio da redução do MTT, os perfis das viabilidades celulares com 2×10^3 e 3×10^3 são parecidos. Os ensaios com essas duas densidades mostram que nos períodos iniciais (24 e 48 horas) a viabilidade entre os grupos tratados e controle se mantém próximos e que nos períodos tardios (72 e 96 horas) há a diminuição da viabilidade celular dos osteoblastos humanos tratados com extrato de aroeira na concentração de 1:10 e a crescente viabilidade celular dos osteoblastos tratados com o extrato de aroeira na concentração de 1:10.000.

Gráfico 4- Gráfico da captação do vermelho neutro de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 2×10^3 células por poço nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas. O gráfico mostra que tanto no período de 24 horas como no de 48 horas não houve diferenças estatísticas. Com 72 horas todos os grupos tratados com o extrato de aroeira apresentaram diferenças em relação ao controle. No período de 96 horas houve o aumento da viabilidade celular dos grupos controle e 1:10.000. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Gráfico 5 – Gráfico da captação do vermelho neutro de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 3×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas. Com 24 horas apenas o grupo 1:100 foi estatisticamente diferente e maior que o grupo controle. . No período de 48 horas, todos os grupos tratados foram menores e estatisticamente diferentes em comparação ao grupo controle. Com 72 horas todos os grupos tratados também foram menores e estatisticamente diferentes do controle. Com 96 horas os grupos controle e 1:10.000 apresentaram um aumento na viabilidade celular no decorrer dos períodos experimentais. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.5 ANÁLISE DO CRISTAL VIOLETA EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS TRATADOS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA EM NAS DENSIDADES DE 2×10^3 E 3×10^3 CÉLULAS POR POÇO NOS PERÍODOS DE 24, 48, 72 E 96 HORAS

O ensaio do cristal violeta com 2×10^3 células por poço mostrou que com 24 e 48 horas somente o grupo 1:10.000 apresentou-se estatisticamente diferente em relação ao controle. Nesses dois períodos iniciais não houve grandes variações na viabilidade celular dos osteoblastos humanos. Tanto com 72 como com 96 horas todos os grupos tratados com extrato de aroeira apresentam diferenças estatísticas comparados ao controle (**Gráfico 6**). Além disso, com 72 e 96 horas os grupos tratados foram estatisticamente diferentes entre si, com exceção dos grupos 1:10 e 1:100, que não foram diferentes entre si. Com a densidade de 2×10^3 foi possível perceber que os grupos 1:10 e 1:100 não sofreram variações da viabilidade celular de período para período. Também notou-se que com essa densidade a viabilidade das células tratadas com o extrato 1:1.000 e 1:10.000 aumenta nos períodos experimentais finais (72 e 96 horas) (**Gráfico 6**).

Para o ensaio do cristal violeta com 3×10^3 , nos períodos de 24 e 48 horas, os grupos tratados com o extrato não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si e em relação ao controle, porém todos os grupos se mantiveram bem próximos nesses dois períodos iniciais. De maneira contrária, no período de 72 horas todos os grupos tratados apresentaram-se menores e estatisticamente diferentes do controle. Além disso, o grupo 1:10 foi estatisticamente menor quando comparado com os grupos 1:1.000 e 1:10.000, porém não foi diferente do grupo 1:100 (**Gráfico 7**). Outro dado obtido foi que o grupo 1:100 se manteve intermediário aos demais grupos não apresentando diferença estatística em relação aos mesmos (1:10, 1:1.000 e 1:10.000). No último período, ou seja, 96 horas, os grupos 1:10; 1:100 e 1:1.000 foram menores e diferentes tanto do controle como do grupo 1:10.000, porém 1:10, 1:100 e 1:1.000 não foram diferentes entre si. Outro ponto foi que o grupo 1:10.000 não teve diferença estatística em relação ao controle, pois se apresentou o mais próximo do mesmo. Em síntese, com o decorrer dos períodos, houve a tendência dos grupos 1:1.000 e 1:10.000 de aumentarem e se aproximarem do controle. Enquanto nos grupos 1:10 e 1:100 houve diminuição da

viabilidade celular ficando abaixo do controle e dos outros grupos tratados com extrato de aroeira (**Gráfico 7**).

Ao analisar as densidades celulares (2×10^3 e 3×10^3) (**Gráficos 6 e 7**) por meio do ensaio do cristal violeta, foi notado que, assim como nos ensaio da redução do MTT e da captação do vermelho neutro, houve aumento da viabilidade principalmente com os grupos 1:1.000, 1:10.000 e controle no decorrer dos períodos experimentais.

Gráfico 6 – Gráfico do ensaio de cristal violeta de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 2×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas. Com 24 e 48 horas somente o grupo 1:10.000 apresentou-se estatisticamente diferente em relação ao controle. Por sua vez, tanto com 72 como 96 horas, todos os grupos tratados com extrato de aroeira apresentaram diferenças estatísticas comparados ao controle. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Gráfico 7- Gráfico do ensaio de cristal violeta de osteoblastos humanos tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira com densidade celular de 3×10^3 células por poço, nos períodos de 24, 28, 72 e 96 horas. Nos períodos de 24 e 48 horas, os grupos tratados com o extrato não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si e em relação ao controle. Porém, com 72 horas todos os grupos tratados apresentaram-se menores e estatisticamente diferentes do controle. Além disso, o grupo 1:10 foi estatisticamente menor quando comparado com os grupos 1:1.000 e 1:10.000. Com 96 horas, os grupos 1:10; 1:100 e 1:1.000 foram menores e diferentes tanto do controle como do grupo 1:10.000. Já o grupo 1:10.000 não teve diferença estatística em relação ao controle. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.6 ANÁLISE DA REDUÇÃO DO MTT EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS TRATADOS COM EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE AROEIRA NA DENSIDADE DE 5×10^2 CÉLULAS POR POÇO NOS PERÍODOS DE 7-28 DIAS

O ensaio da redução do MTT (7-28 dias) mostrou que mesmo em períodos longos, os osteoblastos humanos permaneceram viáveis, tanto nos grupos controles como nos grupos 1:100, 1:1.000 e 1:10.000. A única diluição em que as células não permaneceram viáveis foi na diluição de 1:10, essa diluição induziu a morte celular, por isso esse grupo foi excluído da análise estatística (**Gráfico 8**).

Nos períodos de 7, 21 e 28 dias notou-se que apenas o grupo 1:100 foi menor e estatisticamente diferente do controle e dos demais grupos tratados, os outros grupos apresentaram viabilidade próxima ao controle (**Gráfico 8**).

No período de 7 dias observou-se que o grupo 1:10.000 teve a viabilidade de osteoblastos maior em relação ao controle e ao grupo 1:100, porém não foi estatisticamente diferente do grupo 1:1.000 (**Gráfico 8**).

De uma maneira geral o período de 7 dias foi o que apresentou maiores valores de absorbância, nos demais períodos não houve grandes variações na viabilidade celular (**Gráfico 8**).

Gráfico 8 – Gráfico da redução do MTT de osteoblastos humanos com densidade de 5×10^2 células por poço, tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira, nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias. O gráfico evidencia que mesmo em períodos longos, como 7, 14, 21 e 28 dias, os osteoblastos humanos permaneceram viáveis, tanto nos grupos controles como nos grupos 1:100, 1:1.000 e 1:10.000, com exceção da diluição de 1:10. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.7 CONTAGEM CELULAR DE OSTEOLASTOS HUMANOS COM A DENSIDADE INICIAL DE 5×10^2 CÉLULAS POR POÇO NOS PERÍODOS DE 7 - 28 DIAS

A contagem celular, semelhante aos resultados do MTT, comprovou que os osteoblastos humanos estavam viáveis nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias e ainda comprovou que o número de células não ultrapassou a densidade de 10^5 , que é a densidade máxima recomendada pelo fabricante do kit de extração de RNA usado nesse trabalho.

A densidade celular média encontrada no período de 7 dias foi de 5×10^4 no grupo controle; 2×10^4 no grupo 1:100; $4,75 \times 10^4$ no grupo 1:1.000 e $5,75 \times 10^4$ no grupo 1:10.000 (**Gráfico 9**).

Com 14 dias as densidades médias foram $4,75 \times 10^4$ para o controle; $1,75 \times 10^4$ para 1:100; $4,25 \times 10^4$ para 1:1.000 e $5,5 \times 10^4$ para 1:10.000 (**Gráfico 9**).

No período de 21 dias foram encontradas as densidades celulares médias de 4×10^4 para o controle; $1,5 \times 10^4$ para 1:100; 4×10^4 para 1:1.000 e $5,5 \times 10^4$ para 1:10.000 (**Gráfico 9**).

Por fim, no período de 28 dias as densidades celulares médias foram de $3,25 \times 10^4$ para o controle; 1×10^4 para 1:100; $2,75 \times 10^4$ para 1:1.000 e 5×10^4 para 1:10.000 (**Gráfico 9**). Com esse teste percebeu-se que os grupos que apresentaram maiores números de células foram os grupos controles e os grupos 1:10.000 em todos os períodos experimentais, comprovando que em concentrações mais baixas o extrato não causa grandes variações na densidade de osteoblastos humanos (**Gráfico 9**).

Gráfico 9 – Gráfico da contagem celular de osteoblastos humanos com densidade inicial de 5×10^2 células por poço, tratados com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira, nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias. A contagem celular, semelhante aos resultados do MTT, comprovou que os osteoblastos humanos estavam viáveis nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias. Com esse teste percebeu-se que os grupos que apresentaram maiores números de células foram os grupos controles e os grupos 1:10.000 em todos os períodos experimentais, comprovando que em concentrações mais baixas o extrato não causa grandes variações na densidade de osteoblastos humanos. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.8 ANÁLISE DO RT-PCR EM TEMPO REAL (TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL)

5.8.1 Análise da expressão gênica da MMP-2 nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias

O RT-PCR em tempo real demonstrou que expressão de MMP-2 não manteve uma regularidade no decorrer dos períodos. Com 24 horas houve a diminuição da expressão de MMP-2 nos grupos tratados com o extrato de aroeira, porém apenas o grupo 1:10.000 foi estatisticamente diferente do controle (**Gráfico 10**).

No período de 48 horas, a expressão de MMP-2 oscilou bastante. Os grupos 1:100 e 1:1.000 apresentaram menores expressões de MMP-2 comparados ao controle e ao grupo 1:10.000. Porém a expressão de MMP-2 nos grupos tratados com 1:100 e 1:1.000 não foi estatisticamente diferente (**Gráfico 10**).

Com 72 horas os osteoblastos humanos não apresentaram diferenças estatísticas na expressão de MMP-2 comparando-se os grupos tratados com aroeira entre si e com o grupo controle (**Gráfico 10**).

Com 7 dias, o grupo com a diluição de 1:10.000 foi o que apresentou maior expressão de MMP-2 em relação ao controle e aos outros grupos tratados, porém essa expressão não foi estatisticamente diferente do controle, mas foi diferente do grupo 1:100 (**Gráfico 10**).

A expressão gênica de MMP-2 no período de 14 dias foi maior no grupo controle do que nos grupos tratados com o extrato e essa variação na expressão foi estatisticamente diferente das células tratadas com extrato na diluição de 1:10.000 (**Gráfico 10**).

A expressão de MMP-2 ainda se manteve maior no grupo controle em comparação aos grupos tratados, no período de 21 dias. Apenas o grupo 1:10 foi estatisticamente menor comparado ao controle (**Gráfico 10**).

Com 28 dias, o perfil da expressão gênica de MMP-2 em osteoblastos humanos foi parecido com a expressão de MMP-2 no período anterior. Nesse período o grupo 1:10 foi estatisticamente menor em relação ao controle e ao demais grupos tratados (**Gráfico 10**).

Gráfico 10 – Gráfico da expressão gênica de MMP-2 em osteoblastos humanos com diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de aroeira, nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. Com 24 horas houve a diminuição da expressão de MMP-2 no grupo 1:10. Em relação ao controle. No período de 48 horas, grupos 1:100 e 1:1.000 apresentaram menores expressões de MMP-2 comparados ao controle e ao grupo 1:10.000.. Com 72 horas não houve diferenças estatísticas na expressão de MMP-2 comparando-se os grupos tratados com aroeira entre si e com o grupo controle. Com 7 dias, o grupo 1:10.000 foi o que apresentou maior expressão de MMP-2 em relação ao controle e aos outros grupos tratados, porém essa expressão não foi estatisticamente diferente do controle, mas foi diferente do grupo 1:100. No período de 14 dias e 21 dias a expressão de MMP2 foi maior no grupo controle do que nos grupos tratados com o extrato. Com 28 dias, o grupo 1:10 foi estatisticamente menor em relação ao controle e ao demais grupos tratados. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

5.8.2 Análise da expressão gênica da ANKH nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias

A expressão de ANKH no período de 24 horas foi maior no controle e essa expressão foi estatisticamente diferente em comparação com os demais grupos tratados com o extrato de aroeira. Além disso, os grupos 1:100 e 1:10.000 foram estatisticamente diferentes entre si (**Gráfico 11**).

No período de 48 horas a expressão de ANKH também foi maior no grupo controle e estatisticamente diferente dos demais grupos, porém os grupos tratados não foram diferentes entre si (**Gráfico 11**).

Com 72 horas, assim como na expressão de MMP-2, não houve diferenças estatísticas na expressão de ANKH (**Gráfico 11**).

Em 7 dias a expressão de ANKH foi maior no grupo 1:100 comparando-se com o controle e com os outros grupos tratados, entretanto os grupos 1:1.000 e 1:10.000 não apresentaram diferenças entre si e o controle (**Gráfico 11**).

No período de 14 dias não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle. Nesse período, ocorreu a menor expressão de ANKH nos grupos tratados com o extrato e no grupo controle. (**Gráfico 11**).

No período de 21 dias a expressão de ANKH também não apresentou diferenças estatísticas nos grupos tratados com o extrato e no grupo controle (**Gráfico 11**).

Por fim, no período de 28 dias apenas o grupo 1:100 foi estatisticamente diferente dos grupos tratados e do controle, sendo o grupo 1:100 o que apresentou maior expressão de ANKH nesse período (**Gráfico 11**).

Gráfico 11 – Gráfico da expressão gênica de ANKH em osteoblastos humanos com diferentes diluições do extrato hidroalcolico de aroeira, nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. A expressão de ANKH no período de 24 horas foi maior no controle e essa expressão foi estatisticamente diferente em comparação com os demais grupos tratados. No período de 48 horas a expressão de ANKH também foi maior no grupo controle e estatisticamente diferente dos demais grupos. Com 72 horas, não houve diferenças estatísticas na expressão de ANKH. Com 7 dias a expressão de ANKH foi maior no grupo 1:100 comparando-se com o controle e com os outros grupos tratados. No período de 14 e 21 dias não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle. Com 28 dias apenas o grupo 1:100 foi estatisticamente diferente dos grupos tratados e do controle. Letras diferentes representam diferenças estatística ($p < 0,05$).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado/mineralizado do organismo humano que apresenta diversas funções específicas, tais como ser o maior reservatório de cálcio; proporcionar ao corpo força e movimento, juntamente com os músculos e tendões, proteger órgãos vitais constituídos de tecidos moles, ser resistente e ao mesmo tempo permanecer flexível e elástico (ROSEN & THIES 1992; DEMPSTER, 1999). Entretanto, uma das características mais interessantes é a sua capacidade de regeneração espontânea e perfeita que, às vezes, se torna difícil identificar a localização de uma lesão (FEINBERG & LARSEN, 1991; BEHONICK et al., 2007).

Tendo em vista as importantes características do tecido ósseo, no presente estudo optamos por utilizar osteoblastos humanos cultivados *in vitro* com o intuito de mimetizar os eventos que poderiam acontecer *in vivo*. As técnicas de pesquisa *in vitro*, utilizando culturas de células e sistemas biológicos modelo constituem-se numa importante ferramenta de relevância em pesquisa e desenvolvimento (SORAGGI, 2006). Comparando-se com os testes *in vivo*, apresentam vantagens significativas, tais como: simplicidade, rapidez, diminuição dos custos efetivos (SPANGBERG, 1969; CHANG et al., 1998), possibilidade de repetições em menor tempo e minimização do uso de animais e da implicação ética com ele associada (SCHWEIKL & SCHMALZ, 1996; KEISER et al., 2000), além de permitir um maior controle sob as condições experimentais (manutenção do pH, concentração de CO₂, níveis de moléculas sinalizadoras, etc.), diminuindo assim as variáveis (KEISER et al., 2000; SORAGGI, 2006). Dessa maneira, no nosso estudo, o modelo *in vitro* foi escolhido por permitir a realização de experimentos prévios e pilotos de condições que ainda não foram bem definidos pela literatura. Nosso estudo avaliou os efeitos do extrato de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) na viabilidade celular e na expressão de MMP-2 e ANKH, genes envolvidos na remodelação e mineralização óssea, respectivamente.

As pesquisas com produtos naturais na área odontológica têm aumentado devido à procura por novos produtos com maior atividade terapêutica, menor toxicidade, melhor biocompatibilidade e custos mais acessíveis à população (AGRA et al., 2007; OLIVEIRA, 2005). Cabe ressaltar que um esforço tem sido feito por

órgãos governamentais (Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos dentro do Sistema Único de Saúde – SUS; Portaria interministerial 2.960/2008) para o desenvolvimento de produtos fitoterápicos (BETTEGA et al., 2011), uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo, com estimativas apontando que os ecossistemas do Brasil compreendem 22% das espécies biológicas do mundo, sendo a floresta amazônica constituindo como reservatório de cerca de 55 mil espécies de plantas, o que torna evidente o Brasil quanto ao patrimônio biológico (MARQUES, 2000).

Em estudos *in vitro* e *in vivo* com a aroeira têm demonstrado efeitos antiinflamatórios, antiproliferativos, antioxidantes, antitumor de polifenóis (ARAIM et al., 2002; QUEIRES et al., 2006; RÉCIO et al., 2012; ROMANO et al., 2013) e em alguns trabalhos teve ação antimicrobiana (MENEZES et al., 2009; MUKNE et al., 2011; TRENTIN et al., 2013).

Giberllini et al. (2011) e Chahar e colaboradores (2012) comprovaram que os flavonoides, substâncias presentes na aroeira, têm atividade anticâncer por meio da combinação de mecanismos, tais como inativação cancerígena, antiproliferação, parada do ciclo celular, indução de apoptose e inibição da angiogênese. Trentin et al. (2013) concluíram que a aroeira inibiu a formação de biofilme por meio das propriedades bacteriostáticas, danificando a membrana bacteriana. Nossos resultados parecem convergir com os resultados dos últimos autores, uma vez que, em todos os experimentos realizados para o presente trabalho (pilotos, prévios e finais) e também do nosso grupo (MACHADO, 2013) não foram observados indícios de contaminação com o material preparado com a aroeira.

Melo Junior et al. (2000) testaram a atividade antimicrobiana de dezessete plantas medicinais em osteíte alveolares induzidas em ratos. Nesse estudo o extrato da casca da aroeira foi uma das espécies que apresentou maiores halos de inibição. Os testes bacteriológicos mostraram que a aroeira apresentou atividade em todas as bactérias gram positivas estudadas, (*Enterococcus* do grupo D, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus* não do grupo A.B.D., Bacilo gram-positivo corineforme), porém em nenhuma gram-negativa (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*). Novamente os resultados descritos na literatura nos permitiram a escolha de um modelo experimental com segurança para o manuseio do extrato da aroeira. Uma vez que o presente estudo avaliou o extrato hidroalcoólico de aroeira filtrado e não filtrado e a

partir desse teste ficou comprovado que independente da filtração em membrana de *Millipore*, o extrato não interferiu na viabilidade celular, comprovando sua ação antibacteriana, pois os extratos após sua purificação foram armazenados e manipulados e não passaram por um processo de esterilização específico.

Queires et al. (2006) avaliaram os efeitos do extrato de aroeira em células da linhagem humana de carcinoma de próstata. Nesse estudo os autores descreveram que o extrato de aroeira inibiu a proliferação dessas células. Além disso, o extrato promoveu uma parada no ciclo celular (G0/G1) e induziu apoptose. Os relatos de Queires e colaboradores (2006) se assemelham aos nossos resultados de viabilidade celular (ensaios de redução do MTT, captação do vermelho neutro e cristal violeta), pois nossos estudos demonstraram a redução na viabilidade celular de osteoblastos humanos tratados com o extrato hidroalcoólico de aroeira na concentração bruta e na diluição 1:10 tanto nas densidades celulares de 2×10^3 como 3×10^3 .

Outro aspecto importante encontrado no trabalho de Queires e colaboradores (2006) é um possível mecanismo de ação de indução de autofagia das células de carcinoma pelos polifenóis presentes no extrato da aroeira, o qual parece ter promovido uma alteração na atividade da fosfatase ácida lisossomal. Esse achado também pode se relacionar com os nossos resultados, pois no ensaio da captação do vermelho neutro, teste responsável por corar lisossomos de células viáveis, observamos a morte celular induzida pelo extrato bruto e redução da viabilidade dos osteoblastos humanos tratados com o extrato 1:10 nos períodos experimentais. Ou seja, num primeiro momento (período de 24 horas) os dados de absorbância (para o vermelho neutro) do grupo tratado com o extrato mais concentrado (1:10) foi maior que os outros grupos, diminuindo (ou se mantendo) com o decorrer dos períodos. Isso pode ser interpretado como uma maior ativação de lisossomos, e consequentemente fosfatase ácida lisossomal, para a autofagia das células. No entanto, esses dados devem ser confirmados futuramente com avaliação da atividade da fosfatase ácida lisossomal nesses tratamentos.

De um modo geral nossos estudos de viabilidade celular mostraram que o extrato bruto promoveu a morte celular e a 1:10 inibiu a viabilidade celular. Porém, em concentrações mais altas, tais como 1:1.000 e 1:10.000, o extrato não afetou a viabilidade celular dos osteoblastos humanos. Nesse sentido, nossos resultados são semelhantes aos encontrados em um estudo, ainda não publicado, realizado pelo

nosso grupo de pesquisa com fibroblastos gengivais humanos, no qual o extrato de aroeira em altas concentrações promoveram a redução da viabilidade celular, entretanto, diluições superiores à 1:1.000 não interferiram na viabilidade dos fibroblastos (MACHADO, 2013).

Uma teoria sugerida por Machado (2013), em conjunto com os resultados de outros autores (PELLEGRINA et al., 2005; SAKAO et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; SOUZA, 2012), é de que a redução da viabilidade celular, pelas altas concentrações do extrato de aroeira, pode estar associada à presença de alguns componentes, entre eles o ácido gálico e a quercitina em maiores concentrações. No próprio trabalho de Machado (2013) e outros autores (SOUZA, 2012) foram encontrados esses componentes no extrato de aroeira preparado. Essa proposta de Machado (2013) parece estar convergente com nossos achados, uma vez que o extrato de aroeira era preparado com o mesmo protocolo do autor, ou seja, validando a presença dos componentes identificados anteriormente (ácido gálico e quercitina, entre outros), e também promoveu uma redução na viabilidade celular com o decorrer dos períodos para os tratamentos com o extrato mais concentrado, semelhante aos resultados de Machado (2013) com fibroblastos humanos.

Nosso estudo também mostrou que em períodos mais longos, (7, 14, 21 e 28 dias), períodos nos quais a atividade proliferativa é menor e tem-se maior atividade de diferenciação, o extrato hidroalcoólico de aroeira em concentrações mais baixas (diluição 1:10.000) promoveu o aumento da viabilidade celular aferida pela redução do MTT.

Em um estudo Lisboa Neto e colaboradores (1998) utilizaram o extrato hidroalcoólico da casca do caule da aroeira no tratamento da osteíte alveolar induzida em ratos. Com esse trabalho os autores observaram que após os primeiros cinco dias de uso da solução, contendo o extrato, houve diferença significativa no reparo dos alvéolos dentários, quando comparado ao grupo controle. Essa diferença estava relacionada ao infiltrado inflamatório e neoformação óssea, tornando o reparo mais favorável. Com quinze dias de tratamento com o extrato, observaram infiltrado linfo-histiocitário com fibrose e neoformação óssea intensa. Esses resultados apresentados por Lisboa Neto et al. (1998) em conjunto com os resultados do presente trabalho, sugerem que o extrato de aroeira pode modular alguns eventos moleculares em osteoblastos, uma vez que não só encontramos modulação na viabilidade de osteoblastos como também encontramos uma diferença na expressão

de algumas moléculas envolvidas com o processo de reparo tecidual (MMP-2) e mineralização óssea (ANKH).

Em 2002, Melo Junior e colaboradores realizaram outro estudo para avaliar os efeitos da aroeira na osteíte alveolar induzida em ratos e constataram que a aroeira apresentou atividade antimicrobiana semelhante ao antibiótico, gentamicina, neoformação óssea significativa em seis dias, quando comparado ao grupo controle, e melhor regeneração do alvéolo dentário. Esse trabalho *in vivo* (MELO JUNIOR et al., 2002) também apresenta resultados em concordância com nossos resultados *in vitro*: modulação da atividade (viabilidade e expressão de algumas proteínas) de osteoblastos, além de atividade antimicrobiana.

Sousa et al. (2006) verificam a ação e os efeitos terapêuticos da aroeira no combate ao processo inflamatório e no processo de reparo do tecido sobre as lesões ulceradas da mucosa bucal do rato. Para esse estudo criaram-se lesões nas línguas dos animais por meio da aplicação tópica diária de hidróxido de sódio a 40% e as lesões foram tratadas pela aplicação tópica do extrato da aroeira. Esse estudo comprovou que o extrato atuou acelerando o processo de reparo do tecido epitelial, estimulando a ceratinização. Além disso, o extrato atuou no reparo do tecido conjuntivo, diminuindo rapidamente a intensidade do processo inflamatório crônico e a angiogênese; e acelerando a maturação do colágeno.

Em estudos realizado por Botelho et al. (2007 e 2008) ficou comprovado que a combinação de um gel topico à base de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) e aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) aplicados em ratos, que tiveram doença periodontal induzida impediu a reabsorção óssea alveolar e demonstrou atividades anti-inflamatórias e antibacterianas na periodontite experimental. De acordo com esses trabalhos da literatura, além de outros, a aroeira parece modular os processos inflamatórios e/ou, consequentemente, o processo de reparo tecidual. Nossos resultados de expressão de MMP-2 e ANKH podem reforçar os achados dos autores citados anteriormente, uma vez que essas proteínas estão envolvidas com processos inflamatórios e de reparo tecidual.

Nesse trabalho também avaliamos a expressão gênica da MMP-2 em diversos períodos experimentais frente a utilização do extrato de aroeira. As MMPs contribuem tanto para a remodelação tecidual normal quanto patológica (SLOMPO et al., 2012). Os papéis fisiológicos das MMPs incluem a migração celular, a remodelação do tecido durante organogênese e crescimento, cicatrização de feridas,

a angiogênese e formação do esmalte (HANNAS et al., 2007; TOCCHI & PARKS, 2013).

As MMPs tem papel fundamental no desenvolvimento de remodelação dos tecidos orais. Relatos na literatura mostram a participação dessas enzimas no desenvolvimento do esmalte dental e estabelecimento da fluorose (BARTLETT et al., 2004; HANNAS et al., 2007). As principais MMPs encontradas na cavidade bucal são MMP-8 (colagenase) MMP-2 e MMP-9 (gelatinases) e MMP-20 (estromelisinase). Nossos resultados mostraram que a expressão de MMP-2 sofreu oscilações dependendo da concentração do extrato e dependendo do período experimental. Na maioria dos períodos experimentais houve uma maior expressão de MMP-2 no grupo controle, com exceção do período de 48 horas, no qual a expressão de MMP-2 foi maior no grupo 1:10.000. Nossos resultados mostram claramente que a aroeira parece modular a atividade da MMP-2, inibindo sua expressão. Esses nossos achados parecem reforçar alguns relatos da literatura (LORENZI & MATOS, 2002; RODRIGUES et al., 2002; SOUZA et al., 2007), além da própria medicina popular (DESMARCHELIER, 1999; DEHARO et al., 2003; CARTAXO et al., 2010), uma vez que as MMPs são mais expressas em condições patológicas (especialmente quadros inflamatórios). Nossos achados aliados a alguns trabalhos da literatura, citados anteriormente, parecem comprovar esse efeito antiinflamatório exercido pela aroeira. Sugerindo também que as “indicações” da medicina popular para a aroeira (algumas doenças inflamatórias) poderiam se basear nessa propriedade (modulação da atividade das MMPs) comprovada pelos nossos resultados e outros da literatura.

Além da expressão de MMP-2, avaliamos a expressão de ANKH dos osteoblastos humanos tratados com o extrato de aroeira. A proteína ANKH é uma proteína transmembrana com a função de transportar o pirofosfato (KIRSCH, 2012; ZHOU et al., 2012), sua função biológica está associada ao processo de mineralização, modulando (em alguns casos inibindo o processo de mineralização) (KIRSCH, 2012; ZHOU et al., 2012). Camundongos nocautes para o gene ANK apresentam calcificação nas articulações e também morte em alguns meses de vida (SWEET & GREEN, 1981; HAKIM et al., 1984; GURLEY et al., 2006). Em nosso estudo ficou comprovado que, assim como com a MMP-2, o extrato de aroeira promoveu uma modulação na expressão da ANKH. Sua expressão sofreu oscilações no decorrer dos períodos.

Em geral, a expressão da ANKH nos períodos mais longos (7-28 dias, correspondentes aos períodos de mineralização pelos osteoblastos) foi superior no grupo tratado com a maior concentração testada (1:100). Esse perfil pode sugerir uma inibição da mineralização pela alta concentração do extrato de aroeira, uma vez que sua presença está associada a inibição/modulação da mineralização e sua ausência pode promover a ocorrência de ossificação ectópica (KIRSCH, 2012; ZHOU et al., 2012).

Em resumo, como citado por toda essa discussão, muitos trabalhos *in vivo* e *in vitro* tem comprovado o efeito antimicrobiano do extrato da aroeira. No entanto, poucos trabalhos tem pesquisado o mecanismo molecular envolvido com as propriedades descritas pela medicina popular para a aroeira. Assim novos trabalhos são necessários para entendermos melhor os mecanismos celulares e moleculares envolvidos, permitindo a correta aplicação/validação desse e de outros fitoterápicos.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- O extrato hidroalcoólico de aroeira em altas concentrações promove redução e/ou morte celular dos osteoblastos humanos;
- Em concentrações mais baixas o extrato não causa grandes variações na viabilidade celular;
- O extrato de aroeira modular a expressão da MMP-2, inibindo sua expressão;
- Altas concentrações do extrato aumentam a expressão de ANKH, gene envolvido na mineralização óssea, sugerindo uma redução da mineralização óssea.

Pelo descrito anteriormente, o extrato de aroeira promove uma modulação na viabilidade de osteoblastos humanos bem como na expressão dos genes MMP-2 e ANKH.

Referências

REFERÊNCIAS

Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. Rev. bras. Farmacogn. 2007;17(1):114-40.

Albuquerque UP, de Oliveira RF. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? J Ethnopharmacol. 2007; 113(1):156-170.

Alves PM, Queiroz LM, Pereira JV, Pereira M do SV. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus Candida. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(2):222-4.

Anderson TOM. Dental treatment in Medieval England. Br Dent J. 2004;197(7):419-25.

Andrade MW, Luz JMQ, Lacerda AS, Melo PRA. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). Ciências e Agrotecnologia. 2000;24:174-80.

Araim O, Ballantyne J, Waterhouse AL, Sumpio BE: Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols. Eur J Vasc Surg. 2012;35(6):1226-32.

Behonick DJ, Xing Z, Lieu S, Bukckey JM, Lotz JC, Marcucio RS, et al. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. PLOS ONE. 2007;2(11):1150.

Bettega PVC, Czusniak GR, PIVA R, Namba EL, Ribas CR, Gregio AMT. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. Arch Oral Res. 2011;7(1):89-97,

Bianco KG. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre *Streptococcus mutans* e a sua capacidade de desmineralização e a adesão à superfície de vidro [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2004.

Botelho MA, Rao VS, Carvalho CBM, Bezerra-Filho JG, Fonseca SGC, Vale ML, et al. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar resorption in experimental periodontitis in rats. *Journal Ethnopharmacology* 2007;113(3):471-8.

Botelho MA, Rao VS, Montenegro D, Bandeira MA, Fonseca SG, Nogueira NA, Ribeiro RA, Brito GA. Effects of an herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phytother Res* 2008; 22(4):442-9.

Brandão EHS, Oliveira LD, Landucci LF, Kogalto CY, Jorge AOC. Antimicrobial activity of coffee-based solutions and their effects on *Streptococcus mutans* adherence. *Bras J Oral Science*. 2007;6(20):1274-7.

Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Jaboch R. Assessment of the toxicity of the brasilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da praia) e *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão). *Phytoterapy Research*. 2013;27:692-8.

Carr G, Mochhala SH, Eley L, Vandewalle A, Simmons NL, Sayera JA. The Pyrophosphate Transporter ANKH is Expressed in Kidney and Bone Cells and Colocalises to the Primary Cilium/Basal Body Complex. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24:595-604.

Cartaxo SL, Souza MMA, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;131:326–42.

Chahar MK, Sanjaya Kumar DS, Lokesh T, Manohara KP. *In vivo* antioxidant and immunomodulatory activity of mesuol isolated from *Mesua ferrea* L. seed oil. *Int Immunopharmacol*. 2012;13(4):386–91.

-
- Chang YC, Huang FM, Cheng MH, et al. In vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblasts. J Endod. 1998;24:604–6.
- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menahi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. J Dent Res. 2006;85(1):22-32.
- Costa EMMB, Barbosa AS, Arruda TA, Oliveira PT, Dametto FR, Carvalho RA, et al. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. Bras Patol Med Lab. 2010;46(3):175-80.
- Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol. 1999;189(3):300-8.
- Desmarchelier C, Lisboa RR, Coussio J, Ciccio G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “Caatinga” region in northeastern Brazil. J Ethnopharmacol. 1999; 67(1): 69-77.
- Deharo E, Baelmans R, Gimenez A, Quenevo C, Bourdy G. In vitro immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolívia. Phytomedicine. 2004;11:516–22.
- Dempster D W. New concepts in bone remodeling. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. Dynamics of bone and cartilage metabolism. San Diego: Academic Press. 1999:261-73.
- Diogenes MJN, Matos FJA. Dermatites causadas por plantas. Anais Brasileiro de Dermatologia. 1999;74:629 - 34.
- Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. Rev. Bras. Farmacognosia. 2004;14(1):6-8.

Fortes JC, Guedes MIF. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton Argyrophylloides* Muell Arg e de frações isoladas dos extratos de *Astronium urundeuva*(Allemão) Engl. In: Anais da 58ª Reuniao Anual da SBP, 2006.

Ferreira Júnior WS, Ladio AH, Albuquerque UP. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. *Ethnopharmacol.* 2011;138(1):238-52.

Feinberg SE, Larsen PE. Healing of Traumatic Injuries. In: Fonseca RJ, Walkor Rev. Oral and Maxillofacial Trauma. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1991.

Gebara ECE, Zardetto CGC, Mayer MPA. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1996;10(4):251- 6.

Gurley KA, Chen H, Guenther C, et al. Mineral formation in joints caused by complete or joint-specific loss of ANK function. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1238-47.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontologica Scandinavica.* 2007;65:1-13.

Hakim FT, Cranley R, Brown KS, et al. Hereditary joint disorder in progressive ankylosis (ank/ank) mice. I. Association of calcium hydroxyapatite deposition with inflammatory arthropathy. *Arthritis Rheum.* 1984;27:1411-20.

Haslam E. Plant polyphenols:vegetable tannins revisited. Cambridge University press. 1989, 220.

Hu N, Qian L, Hu Y., Shou JZ., Wang C, Giffen C, et al. Quantitative real-time RT-PCR validation of differential mRNA expression of SPARC, FADD, Fascin, COL7A1, CK4, TGM3, ECM1, PPL and EVPL in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2006;6(33).

-
- ISO 10993-5 (1999) Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. International Organization for Standardization. Geneva.
- Jones CG Chlorhexidine: is it still the gold standart? *Periodontol* 2000. 1997;15:55-62.
- Juiz PJL, Alves RJC, Barros TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Braz Journal Pharmacognosy*. 2009; 20(1):134-9.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2004.
- Kirsch T. Biomineralization: an active or passive process? *Connect Tissue Res*. 2012;53(6):438-45.
- Korostishevsky M, Vistoropsky Y, Malkin I, Kobylansky E, Livshits G. Anthropometric and bone-related biochemical factors are associated with different haplotypes of ANKH locus. *Annals of Human Biology*. 2008;35(5):535–46.
- Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*. 1989;182(1):16-9.
- Lacerda, CMB, Kageyama PY, Ferraz EM. Diversidade isoenzimática em *Myracrodruon urundeuva* em duas situações antrópicas no semi - árido. *Scientia Forestalis*. 1999;55:89-95.
- Lima EO, Pereira FO, Lima IO, Trajano V N, Souza EL. *Schinus terebenthifolius Raddi*: avaliacao do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. *Infarma*. 2004;16:7- 8.
- Lisboa Neto JA et al. Avaliação do efeito cicatrizante da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e do mastruço (*Chenopodium ambrosioides*) em feridas de extração dental em ratos. Estudo histológico. *Rev ABO Nac (Porto Alegre)*. 1998;6(3):173-6.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.

Machado A C. Caracterização do extrato de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e seu efeito sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos [Tese]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.

Makela M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. J Dent Res. 1994; 73:1397-1406.

Marques MB. Patentes farmacêuticas e acessibilidade aos medicamentos no Brasil. História, Ciências Saúde. 2000;7(1):7-21.

Marshall K, Nash K, Haussman G, Cassady I, Hume D, de Jersey J, et al. Recombinant human and mouse purple acid phosphatases: expression and characterisation. Arch Biochem Biophys. 1997;345(2):230–6.

Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. Implant Dent. 1998;7(4):267-76.

Matos FJA. Farmácias vivas. Fortaleza: Editora UFC. 2002; 267

Meikle MC, Bord S, Hembry RM., Compston J, Croucher PI, Reynold, JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. J Cell Sci. 1992;103:1093–99.

Melo Junior EJM et al. Estudo comparativo sobre a influência da limpeza cirúrgica associada a diferentes substâncias antimicrobianas, como soluções irrigadoras, no

processo de reparo perturbado pela alveolite em ratos: análises histológica e microbiológica [Tese]. Araçatuba, 1995.

Menezes TEC. Influência do extrato de araçá (*Psidium cattleianum*) e aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*) na prevenção à cárie em modelos animais [dissertação]. Araçatuba 2006.

Menezes TEC, Delbero ACB, Brighenti FL, Okamoto AC, Gaetti-Jardim Jr. E. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. Department of Pediatric Dentistry, Pham Biol. 2010;48(3):300-5.

Monteiro JM, de Albuquerque UP, Lins-Neto EM, de Araújo EL, de Amorim EL. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. J Ethnopharmacol. 2006;105(1-2):173-86.

Mors WB, Rizzin CT, Pereira NA. Fitoterapia com base científica. Ciência Hoje. 2002;31(182):78-9.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth. 1983;65:55-63.

Mota CWC. Efeito da chalconas (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) nas fraturas expostas induzidas em ratos [Dissertação].Ceará; 2006.

Mukne AP, Viswanathan V, Phadatare AG. Structure prerequisites for isoflavones as effective antibacterial agents. Pharmacogn Rev. 2011;5(9):13-8.

Murphy G, Ward R, Hembry RM, Reynolds JJ, Kuhn K, Tryggvason K. Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. Biochem J. 1989;258:463-72.

Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992;7(2):120-5.

Nanci, A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. Philadelphia, USA: Elsevier. 2008, 411.

Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* 2003;19:458–66.

Nobre-Júnior HV, Oliveira RA, Maia FD, Nogueira MAS, Manoel, Moraes MO, et al. Neuroprotective Effects of Chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced Cytotoxicity in Rat Mesencephalic Cells. *Neurochem Res.* 2009;34:1066–75.

Novais TS, Costa JFO, David JPL, David JM, Queiroz LP, França F, et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Rev Bras Farmacogn.* 2003;13(2):5-8.

Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev. bras. Farmacogn.* 2007;17(3):1-11.

Oliveira MFS. Fitoterapia e Biodiversidade no Brasil: saúde, cultura e sustentabilidade. *Revista Ideas Ambientales*, 2005.

Page-Mccaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-33.

Pellegrina CD, Padovani G, Mainente F, Zoccatelli G, Bissoli G, Mosconi S et al. Antitumor potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. *Cancer Lett.* 2005;226:17-25.

Pereira ALA, Veras SSL, Silveira EJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteínases em carcinomas

de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. Rev Bras Otorrinolaringol. 2005;71(1):81-6.

Queires LC, Fauvel-Lafève F, Terry S, De la Taille A, Kouyoumdjian JC, Chopin DK, et al. Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. Anticancer Res. 2006;26(1):379-87.

Queiroz CRAA, Morais SAL, Nascimento EA. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). Rev. Árvore. 2002;26(4):493-7.

Récio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. Curr Med Chem. 2012;19(14):2088-2103.

Rifas L, Halstead LR, Peck HW, Avioli LV, Welgus HG. Human osteoblasts in vitro secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major cellular products. J Clin Invest. 1989;84:686-94.

Roberts MC. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. Periodontol 2000. 2002;28:280-97.

Rodrigues LV, Ferreira FV, Regadas SP, Matos D, Viana GSB. morphologic and morphometric analyses of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon Urundeuva* Fr. All. (Aroeira do Sertão) Phytother. Res. 2002;16:267–72.

Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milic N, Borrelli F. Novel Insights into the Pharmacology of Flavonoids. Phytother Res, 2013.

Rosen V, Thies RS. The BMP proteins in bone formation and repair. Trends Genet. 1992;8(3):97-102.

Rubin E, Gorstein F, Rubin, R, Schwarting R, Strayer D. Rubin Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 2006.

Sakao K, Fujii M, Hou DX. Acetyl derivate of quercetin increases the sensitivity of human leukemia cells toward apoptosis. Biofactors. 2009;35(4):399-405.

Santos EB, Dantas GS, Santos HB, Diniz MFFM, Sampaio FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa. Rev. bras. farmacogn. 2009;19(1b).

Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. Eur J Oral Sci. 1996;104:292–9.

Slompo C, Buzalaf CP, Damante CA, Martins GM, Hannas AR, Buzalaf MA, et al. Fluoride modulates preosteoblasts viability and matrix metalloproteinases-2 and -9 activities. Braz Dent J. 2012;23(6):629-34.

Soares DGS, Oliveira CB, Leal C, Drumond MRS, Padilha WWN. Atividade antibacteriana in vitro da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo S. mutans. Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa. 2007;7(3):253-7.

Soares SP, Vinholis AHC, Casemiro LA, Silva MLA, Cunha WR, Martins CHG. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. Rev Odonto Ciênc. 2008;23(2):141-4.

Soraggi CL. Atividade biológica e citotoxicidade de matriz polimérica com doador de oxido nítrico [tese]. Campinas (SP): Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas; 2006.

-
- Sousa MH, Sartoretto, Josiane, Lanzoni TA, Ribas, MO, Noronha L, et al. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato Rev Odonto Ciênc.. 2006;21(53).
- Souza SMC, Aquino LCM, Milach Jr AC, Bandeira MAM, Nobre MEP, Viana GSB. Antiinflammatory and Antiulcer Properties of Tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents Phytother. Res. 2007;1:220–5.
- Souza LP. Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva* (Anacardiácea) [dissertação]. Araraquara, 2012.
- Soyama P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. Cienc Cult. 2007; 59(1):12-3.
- Stevens A, Lowe J, Young B. Wheater Histopatología Básica. Atlas y texto en color. 4 ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2003.
- Sternlich MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.
- Sundquist K, Lakkakorpi P, Wallmark B.; Vaananen KL. Inhibition of osteoclast proton transport by bafilomycin A1 abolishes bone resorption. Biochem Biophys Res Commun. 1990;168(1):309–13.
- Sweet HO, Green MC. Progressive ankylosis, a new skeletal mutation in the mouse. J Hered. 1981;72:87-93.
- Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ. Et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology, 1988;122(4):1373-82.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science. 2000;289 (5484):1504-8.

Trentin DS, Silva DB, Amaral MW, Zimmer KR, Silva MV, Lopes NP, et al. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. PLoS One. 2013;8(6).

Tocchi A, Parks WC. Functional interactions between matrix metalloproteinases and glycosaminoglycans. FEBS J. 2013;280(10):2332-41.

Van Grunsven MF, Cardoso EBT. Atendimento odontológico em crianças especiais. Ver Assoc Paul Cir Dent. 1995;49:364-70.

Young B, Heath JW. Wheater Histologia Funcional. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

Zhou X, Cui Y, Zhou X, Han J. Phosphate/Pyrophosphate and MV-related Proteins in Mineralisation: Dis-coveries from Mouse Models. Int. J. Biol. Sci. 2012;8(6):778.

Anexos

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº096/2011

Bauru, 1 de setembro de 2011.

Senhor Professor,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **Efeito do extrato de aroeira no processo de proliferação e mineração de osteoblastos in vitro**, a ser desenvolvido pela aluna Adriana Arruda Matos e colaboração de Flávia Amadeu de Oliveira, Camila Peres Buzalaf, Alessandra Cury Machado, Carla Andreotti Damante, Anne Bosqueiro Dokkedal, sob sua orientação, foi novamente analisado em reunião realizada no dia **31 de agosto de 2011**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria -
Coordenador

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Anexo 2: Valores de absorbância (média e desvio-padrão) do teste de MTT em pré-osteoblastis MC3T3 tratados com extrato hidroalcoólico de aroeira filtrado e não filtrado nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,503 ^A ±0,067	0,657 ^A ±0,079	0,790 ^A ±0,096	0,771 ^{ADE} ±0,084
1:10 Filtrado	0,020 ^B ±0,005	0,0165 ^B ±0,005	0,012 ^B ±0,005	0,013 ^B ±0,005
1:10 Não filtrado	0,060 ^B ±0,014	0,059 ^B ±0,009	0,048 ^B ±0,005	0,034 ^B ±0,004
1:100 Filtrado	0,453 ^A ±0,095	0,551 ^A ±0,029	0,633 ^C ±0,052	0,483 ^C ±0,079
1:100 Não filtrado	0,412 ^A ±0,071	0,598 ^A ±0,023	0,581 ^C ±0,048	0,746 ^{AC} ±0,073
1:1.000 Filtrado	0,394 ^A ±0,117	0,598 ^A ±0,045	0,642 ^C ±0,033	0,893 ^{DE} ±0,144
1:1.000 Não filtrado	0,389 ^A ±0,028	0,552 ^A ±0,054	0,667 ^{AC} ±0,055	0,823 ^E ±0,133
1:10.000 Filtrado	0,307 ^A ±0,022	0,646 ^A ±0,040	0,650 ^{AC} ±0,106	0,674 ^A ±0,159
1:10.000 Não filtrado	0,237 ^C ±0,055	0,600 ^A ±0,032	0,673 ^{AC} ±0,050	0,689 ^A ±0,090

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 3: Valores de absorbância (média e desvio-padrão) do teste de redução do MTT em osteoblastos humanos na densidade 2×10^3 células por poço tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,093 ^A ± 0,010	0,108 ^A ± 0,003	0,190 ^A ± 0,012	0,580 ^A ± 0,062
1:10	0,140 ^B ± 0,019	0,163 ^B ± 0,034	0,133 ^B ± 0,017	0,122 ^B ± 0,022
1:100	0,074 ^{AC} ± 0,015	0,067 ^C ± 0,010	0,114 ^{BC} ± 0,014	0,054 ^C ± 0,015
1:1.000	0,047 ^C ± 0,010	0,051 ^C ± 0,017	0,087 ^{CD} ± 0,035	0,084 ^{BC} ± 0,037
1:10.000	0,037 ^C ± 0,008	0,031 ^C ± 0,012	0,071 ^D ± 0,020	0,224 ^D ± 0,088

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 4: Valores de absorvância (média e desvio-padrão) do teste de redução do MTT em osteoblastos humanos na densidade 3×10^3 células por poço tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,162 ^A ± 0,014	0,206 ^A ± 0,018	0,311 ^A ± 0,009	0,741 ^A ± 0,125
1:10	0,264 ^B ± 0,046	0,312 ^B ± 0,037	0,319 ^A ± 0,069	0,224 ^B ± 0,034
1:100	0,148 ^{AC} ± 0,021	0,170 ^A ± 0,012	0,267 ^A ± 0,050	0,106 ^C ± 0,022
1:1.000	0,078 ^C ± 0,016	0,147 ^{AC} ± 0,049	0,080 ^B ± 0,033	0,111 ^C ± 0,039
1:10.000	0,079 ^C ± 0,021	0,092 ^C ± 0,027	0,170 ^C ± 0,043	0,381 ^D ± 0,125

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 5: Valores de absorvância (média e desvio-padrão) do teste de captação do vermelho neutro em osteoblastos humanos na densidade 2×10^3 células por poço tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,031 ^A ± 0,005	0,085 ^A ± 0,007	0,189 ^A ± 0,047	0,239 ^A ± 0,018
1:10	0,033 ^A ± 0,010	0,068 ^A ± 0,018	0,046 ^B ± 0,010	0,038 ^B ± 0,011
1:100	0,050 ^A ± 0,009	0,060 ^A ± 0,011	0,091 ^C ± 0,047	0,042 ^B ± 0,019
1:1.000	0,028 ^A ± 0,009	0,060 ^A ± 0,018	0,143 ^D ± 0,041	0,053 ^B ± 0,042
1:10.000	0,025 ^A ± 0,006	0,050 ^A ± 0,009	0,092 ^C ± 0,044	0,203 ^A ± 0,055

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 6: Valores de absorbância (média e desvio-padrão) do teste de captação do vermelho em osteoblastos humanos na densidade 3×10^3 células por poço tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,065 ^A ± 0,015	0,165 ^A ± 0,009	0,217 ^A ± 0,040	0,225 ^A ± 0,022
1:10	0,090 ^{AB} ± 0,016	0,115 ^B ± 0,013	0,084 ^{BD} ± 0,021	0,077 ^B ± 0,010
1:100	0,103 ^B ± 0,030	0,105 ^B ± 0,010	0,138 ^C ± 0,035	0,063 ^B ± 0,016
1:1.000	0,059 ^A ± 0,025	0,121 ^B ± 0,015	0,126 ^{CD} ± 0,048	0,044 ^B ± 0,030
1:10.000	0,055 ^A ± 0,020	0,123 ^B ± 0,009	0,101 ^D ± 0,043	0,153 ^C ± 0,018

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 7: Valores de absorbância (média e desvio-padrão) do teste de cristal violeta em osteoblastos humanos na densidade 2×10^3 células por poço tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,101 ^{AB} ± 0,011	0,199 ^A ± 0,019	0,599 ^A ± 0,019	1,15 ^A ± 0,151
1:10	0,143 ^{AB} ± 0,017	0,153 ^{AB} ± 0,009	0,204 ^B ± 0,039	0,198 ^B ± 0,035
1:100	0,131 ^{AB} ± 0,020	0,145 ^{AB} ± 0,011	0,190 ^B ± 0,039	0,189 ^B ± 0,052
1:1.000	0,166 ^A ± 0,027	0,158 ^{AB} ± 0,021	0,512 ^C ± 0,053	0,634 ^C ± 0,082
1:10.000	0,077 ^B ± 0,010	0,090 ^B ± 0,012	0,414 ^D ± 0,075	0,745 ^D ± 0,066

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 8: Valores de absorvância (média e desvio-padrão) do teste de cristal violeta em osteoblastos humanos na densidade 3×10^3 células por poço tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (HORAS)			
	24	48	72	96
Controle	0,144 ^A ± 0,013	0,336 ^A ± 0,031	0,627 ^A ± 0,063	1,06 ^A ± 0,082
1:10	0,218 ^A ± 0,056	0,243 ^B ± 0,027	0,186 ^B ± 0,045	0,288 ^B ± 0,045
1:100	0,222 ^A ± 0,037	0,252 ^{AB} ± 0,024	0,374 ^C ± 0,121	0,226 ^B ± 0,066
1:1.000	0,144 ^A ± 0,047	0,270 ^{AB} ± 0,038	0,534 ^D ± 0,041	0,811 ^C ± 0,102
1:10.000	0,404 ^B ± 0,082	0,237 ^B ± 0,034	0,457 ^{CD} ± 0,077	0,672 ^D ± 0,072

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 9: Valores de absorbância (média e desvio-padrão) do teste de MTT em osteoblastos humanos na densidade 5×10^2 células por poço tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	PERÍODOS (DIAS)			
	7	14	21	28
Controle	1,120 ^A ± 0,061	0,616 ^A ± 0,031	0,518 ^A ± 0,025	0,525 ^A ± 0,050
1:100	0,486 ^B ± 0,046	0,546 ^A ± 0,027	0,418 ^B ± 0,048	0,284 ^B ± 0,113
1:1.000	1,130 ^{AC} ± 0,059	0,559 ^A ± 0,028	0,514 ^A ± 0,023	0,549 ^A ± 0,042
1:10.000	1,210 ^C ± 0,025	0,545 ^A ± 0,043	0,546 ^A ± 0,039	0,568 ^A ± 0,050

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 10: Valores de expressão gênica de MMP 2 (média e desvio-padrão) em osteoblastos humanos tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias.

PERÍODOS EXPERIMENTAIS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Controle	1:100	1:1.000	1:10.000
24 Horas	1,720 ^A ±0,467	0,467 ^{AB} ±0,151	1,400 ^{AB} ±0,299	1,240 ^B ±0,491
48 Horas	1,570 ^A ±0,070	1,100 ^B ±0,194	0,810 ^B ±0,143	2,680 ^C ±0,112
72 Horas	1,260 ^A ±0,171	1,210 ^A ±0,288	1,030 ^A ±0,193	1,120 ^A ±0,171
7 dias	1,230 ^{AB} ±0,157	0,992 ^A ±0,117	1,280 ^{AB} ±0,212	1,600 ^B ±0,278
14 dias	1,720 ^A ±0,467	1,460 ^{AB} ±0,151	1,400 ^{AB} ±0,299	1,240 ^B ±0,491
21 dias	1,250 ^A ±0,144	0,806 ^B ±0,074	0,886 ^{AB} ±0,155	1,080 ^{AB} ±0,200
28 dias	1,710 ^A ±0,207	1,140 ^B ±0,083	1,360 ^{AB} ±0,137	1,600 ^A ±0,112

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes

Anexo 11: Valores de expressão gênica de ANKH (média e desvio-padrão) em osteoblastos humanos tratados com o extrato de aroeira nos períodos de 24, 48, 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias.

PERÍODOS EXPERIMENTAIS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	Controle	1:100	1:1.000	1:10.000
24 Horas	1,160 ^A ± 0,099	0,604 ^B ± 0,088	0,709 ^{BC} ± 0,041	0,835 ^C ± 0,071
48 Horas	1,100 ^A ± 0,251	0,582 ^B ± 0,103	0,598 ^B ± 0,067	0,758 ^B ± 0,098
72 Horas	0,747 ^A ± 0,167	0,911 ^A ± 0,106	0,759 ^A ± 0,073	0,737 ^A ± 0,076
7 dias	0,932 ^A ± 0,097	1,400 ^B ± 0,215	1,06 ^A ± 0,141	0,958 ^A ± 0,142
14 dias	0,269 ^A ± 0,084	0,362 ^A ± 0,043	0,284 ^A ± 0,056	0,280 ^A ± 0,028
21 dias	0,472 ^A ± 0,025	0,668 ^A ± 0,042	0,530 ^A ± 0,027	0,516 ^A ± 0,075
28 dias	1,310 ^A ± 0,132	1,590 ^B ± 0,252	1,150 ^A ± 0,106	1,260 ^A ± 0,104

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes