



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JÉSSICA MARIA DE MELO ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E OSTEOINDUTOR
DO EXTRATO DO MASTRUZ (*Chenopodium ambrosioides* L.)**

CAMPINA GRANDE – PB

2013

JÉSSICA MARIA DE MELO ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E OSTEOINDUTOR
DO EXTRATO DE *Chenopodium ambrosioides* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, em cumprimento dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Linha de pesquisa em Obtenção e Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos de Interesse Farmacêutico.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Edja Maria Melo de Brito Costa

Campina Grande – PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

A447a

Almeida, Jéssica Maria de Melo.

Avaliação do potencial antioxidante e osteoindutor do extrato do mastroz (*Chenopodium ambrosioides* L.) [manuscrito] / Jéssica Maria de Melo Almeida. – 2013.

80 f. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2014.

“Orientação: Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Farmácia.”

1. Saúde óssea. 2. Potencial antioxidante. 3. Diferenciação celular. 4. Erva de Santa Maria. I. Título.

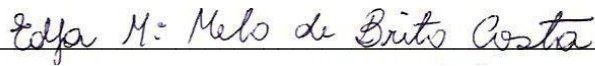
21. ed. CDD 581.981

JÉSSICA MARIA DE MELO ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E OSTEOINDUTOR
DO EXTRATO DO MASTRUZ (*Chenopodium ambrosioides* L.)**

Aprovado em 31 de Outubro de 2013

BANCA EXAMINADORA



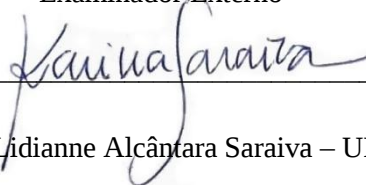
Edja Maria Melo de Brito Costa – UEPB

Orientadora



Carlos Augusto Galvão Barboza – UFRN

Examinador Externo



Karina Lidianne Alcântara Saraiva – UEPB

Examinadora Interna

AGRADECIMENTOS

À UEPB pela formação acadêmica e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

À minha orientadora Dr^a. Edja Maria Melo de Brito Costa, por ter sempre acreditado no meu potencial, mesmo nas mais difíceis circunstâncias, pela orientação, amizade e compreensão.

Aos demais componentes da banca, Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza e Dr^a. Karina Lidianne Alcântara Saraiva, por aceitarem, de bom grado, o convite para participarem da banca examinadora.

Ao professor Hugo Rocha que me acolheu e orientou sempre que possível e à equipe de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL) e do Laboratório de Cultura de Células da UFRN pelo companheirismo e apoio às atividades laboratoriais. Em especial, aos alunos de pós-graduação Moacir Fernandes de Queiroz Neto e Fernanda Ginani Antunes pela disposição e ensinamentos, importantíssimos para a realização do trabalho.

Ao meu pai Clóves e meus irmãos Moisés e Gabriel, por toda demonstração de amor, todo o apoio e compreensão nas várias etapas vivenciadas durante o mestrado. À Gabriel também agradeço as mensagens de força e coragem.

À minha prima Thaymara Rafaellen que sempre fez o possível para me encorajar e sempre acreditou no meu melhor.

À minhas tias Rosemere e Nevinha pelo apoio.

Aos meus colegas de turma do mestrado, em especial à Gabriela Muniz, com personalidade admirável, por ser sempre prestativa e pela amizade, e à Segundo Chaves por também sempre se mostrar à disposição.

Aos meus amigos que se fizeram presentes e me apoiaram muito nessa etapa com palavras de força e sabedoria, principalmente minhas amigas Karine Melo e Amanda Lucena e meus amigos Valbério Porto e Beethoven Gomes. E à Michel Peixoto por ter me ajudado sempre quando pôde e por ter me encorajado e acreditado em meu potencial.

EPÍGRAFE

“Não importa onde você parou...
em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar.
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...
Acreditar em você de novo.
Se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente,
lutarmos pelo melhor...
O melhor vai se instalar em nossa vida.
Porque sou do tamanho daquilo que vejo.
E não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Considerando o uso do *Chenopodium ambrosioides* L. na medicina tradicional para o tratamento de fraturas ósseas e o conhecimento de que compostos antioxidantes podem estar relacionados à saúde óssea, este trabalho foi desenvolvido a fim de analisar a atividade antioxidante bem como a influência do extrato etanólico das folhas do *Chenopodium ambrosioides* L. (EEC) na diferenciação *in vitro* de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1. Foi realizada uma triagem fitoquímica para quantificação de flavonoides, polifenóis e taninos e assim foi verificado que o EEC possui alto teor de taninos (43,27% equivalentes de catequina) sendo as demais classes bem representadas (6,57% para polifenóis e 6,24% para flavonoides). O potencial antioxidante do EEC foi avaliado por meio de testes para atividade antioxidante total (CAT), atividade redutora, sequestro de radicais superóxido e quelação cúprica. Para a análise de diferenciação osteoblástica *in vitro*, foi realizado o ensaio de viabilidade e proliferação celular por redução do corante de tetrazólio (MTT), o doseamento da enzima fosfatase alcalina (FAL) e a análise do grau de mineralização da matriz por coloração von Kossa. O EEC apresentou potencial antioxidante, principalmente para os testes que avaliaram a CAT (120mg equivalentes a ácido ascórbico) e quelação cúprica (79,2% de quelação relativa ao EDTA). Além disso, o EEC foi capaz de interferir positivamente na proliferação das células MC3T3, proporcionando 251% de proliferação em comparação com o controle nas primeiras 24h, na concentração de 150 µg/mL. No entanto, em nenhum dos testes realizados para a diferenciação osteoblástica foi possível observar influência positiva para os tratamentos com o EEC. Assim, o EEC apresentou-se como um potente antioxidante, mas não apresentou poder osteoindutor. Portanto, a sua possível participação no processo de reparação óssea pode estar relacionada com outras vias, incluindo o potencial antirreabsortivo, angiogênico, dentre outros, não analisados neste trabalho.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*; Antioxidantes; Diferenciação Celular; Matriz Óssea.

ABSTRACT

Considering the use of *Chenopodium ambrosioides* L. in folk medicine for the treatment of bone fractures, and the knowledge that antioxidants may be related to bone health, this study was developed to examine the antioxidant activity and the influence of ethanol extract of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. (EEC) on the *in vitro* differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. Phytochemical screening was performed for quantification of flavonoids, polyphenols and tannins and thus it was found that the EEC has a high tannin content (43.27% catechin equivalents) and the remaining classes are well represented (6.57% for polyphenols and 6, flavonides to 24%). The antioxidant potential of the EEC was evaluated by total antioxidant activity (CAT), reducing power, kidnapping of superoxide radicals and copper chelation tests. For *in vitro* osteoblastic differentiation analysis, cell viability and proliferation tests were performed by reduction of tetrazolium dye (MTT), alkaline phosphatase (ALP) assay and observation of the degree of matrix mineralization by von Kossa staining. The EEC showed antioxidant potential, notably for tests that evaluated CAT (equivalent to 120mg of ascorbic acid) and copper chelation (79.2% of chelation compared to EDTA). Furthermore, the EEC was able to positively affect MC3T3 cells proliferation, providing 251% in comparison with control in the first 24 hours, at a concentration of 150 µg/mL. However, in none of the tests for osteoblastic differentiation was observed positive influence of EEC for the treatments. Thus, the EEC presented as a powerful antioxidant, but did not reveal an osteoinductive property. So, the possible involvement of EEC in bone repair may be related to other pathways, including the anti-reabsorptive and angiogenic potential, among others, which were out of scope of this work.

Keywords: *Chenopodium ambrosioides*; Antioxidants; Cell Differentiation, Bone Matrix.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Macroestrutura óssea..	17
Figura 2: Principais fatores produzidos pelos osteoblastos e usados como marcadores dos diferentes estágios de desenvolvimento da diferenciação osteoblástica.	21
Figura 3: Representação esquemática da diferenciação osteoclástica por influência de células da linhagem osteoblástica.	23
Figura 4: Comunicação entre vasos sanguíneos e o BRC como fonte de precursores de osteoclastos e osteoblastos.	25
Figura 5: Fases da remodelação óssea.....	26
Figura 6: Fotomicrografia de culturas de células MC3T3 ao 7º dia de tratamento com EEC, coradas pela técnica de von Kossa. (microscópio invertido 40x).....	57
Figura 7: Fotomicrografia de culturas de células MC3T3 ao 14º dia de tratamento com EEC, coradas pela técnica de von Kossa. (microscópio invertido 40x).	57
Figura 8: Fotomicrografia de culturas de células MC3T3 ao 21º dia de tratamento com EEC, coradas pela técnica de von Kossa. (microscópio invertido 40x).....	58
 Gráfico 1: Curva de calibração para capacidade antioxidante total de ácido ascórbico	50
Gráfico 2: Curva de calibração para atividade redutora de ácido ascórbico.	52
Gráfico 3: Porcentagem relativa para a atividade redutora do EEC.....	52
Gráfico 4: Porcentagem relativa para o sequestro de radicais superóxido pelo EEC.	53
Gráfico 5: Porcentagem relativa de quelação cúprica pelo EEC.....	54
Gráfico 6: Porcentagem de proliferação celular de cada tratamento (concentração do EEC em µg/mL) em relação ao controle para cada período de tempo.	55
Gráfico 7: Quantificação da fosfatase alcalina para cada tratamento nos períodos de 7, 14 e 21 dias de diferenciação.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fases da regeneração óssea ao longo do tempo.....	28
Tabela 2: Principais características, causas, e tratamentos disponíveis para fisiopatologias ósseas.....	30
Tabela 3: Capacidade antioxidante total do EEC em equivalente de ácido ascórbico.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACAM	Herbário Manuel de Arruda Câmara
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AP-1	Proteína Ativador-1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIOPOL	Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
BRC	Compartimento de Remodelação Óssea (do inglês <i>Bone Rebsortion Center</i>)
BSP	Sialoproteína óssea
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CO₂	Gás carbônico
Col1	Colágeno tipo 1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEC	Extrato etanólico das folhas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FoxO	Fatores de transcrição Forkhead da classe O
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
LABDEM	Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos
MAPK	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MC3T3-E1	Linhagem de células pré-osteoblásticas da calvária de embrião de camundongos
MCP-1/CCL2	Proteína quimiotática de monócitos -1
M-CSF	Fator de Crescimento de Monócitos
MEC	Matriz Extracelular

MTT	Teste de viabilidade e proliferação celular por redução do corante de tetrazólio
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NF-κB	Fator Nuclear κ B
O₂⁻	Radical Superóxido
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PEGG2	Prostaglandinas
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde
PPARs	<i>Peroxisome Proliferator- Activated Receptors</i>
PTH	Paratormônio
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa
RUNX2	Fator de transcrição associado ao Runt
SFB	Soro fetal bovino
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante- β
TNFs	Fatores de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site family</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1. OSSO.....	16
3.1.1. Composição e Função	16
3.1.2. Macroestrutura	17
3.1.3. Microestrutura	18
3.1.4. Formação e Metabolismo do Tecido Ósseo	18
3.1.4.1. Diferenciação, Caracterização e Atividade dos Osteoblastos	19
3.1.4.2. Diferenciação, Caracterização e Atividade dos Osteoclastos.....	22
3.1.4.3. Remodelação Óssea.....	24
3.2. REGENERAÇÃO DE FRATURAS	27
3.3. RELEVÂNCIA DE PROBLEMAS ÓSSEOS PARA A SAÚDE PÚBLICA	29
3.4. ABORDAGEM DE AGENTES ANTIOXIDANTES NO METABOLISMO ÓSSEO.....	31
3.5. ETNOMEDICINA NA TRIAGEM DE FÁRMACOS FITODERIVADOS	33
3.6. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	35
3.6.1. Descrição Botânica.....	36
3.6.2. Composição Química	36
3.6.3. Usos e Indicações Terapêuticas.....	38
3.7. CULTIVO CELULAR.....	39
3.8. MC3T3-E1: UM MODELO <i>IN VITRO</i> PARA O DESENVOLVIMENTO ÓSSEO	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. AMOSTRA VEGETAL: COLETA E IDENTIFICAÇÃO	42
4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>C. ambrosioides</i> L. (EEC) ..	42
4.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA	42
4.3.1. Teor de Polifenóis	43
4.3.2. Teor de Flavonoides	43
4.3.3. Teor de Taninos.....	43
4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	44
4.4.1. Capacidade Antioxidante Total (CAT)	45

4.4.2. Atividade Redutora	45
4.4.3. Sequestro de Radicais Superóxido	46
4.4.4. Quelação Cúprica	46
4.5. ENSAIOS EM CULTURA DE CÉLULAS	47
4.5.1. Teste de Viabilidade e Proliferação Celular por Redução do Corante de Tetrazólio (MTT)	47
4.5.2. Análise da Diferenciação Osteoblástica	48
4.5.2.1. Avaliação da Atividade e Quantificação da Fosfatase Alcalina (FAL).....	48
4.5.2.2. Análise do Grau de Mineralização da Matriz por Coloração von Kossa	49
4.6. Análise estatística	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA	50
5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	50
5.2.1. Capacidade Antioxidante Total (CAT)	50
5.2.2. Atividade Redutora	51
5.2.3. Sequestro de Radicais Superóxido	53
5.2.4. Quelação Cúprica	53
5.3. TESTE DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR REDUÇÃO DO CORANTE DE TETRAZÓLIO (MTT).....	54
5.4. DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA FOSFATASE ALCALINA (FAL) .	55
5.5. GRAU DE MINERALIZAÇÃO DA MATRIZ POR COLORAÇÃO VON KOSSA.....	56
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	63
8. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

O osso é um órgão com função de sustentar e proteger outros órgãos além de garantir a homeostase mineral, principalmente devido ao fato de o tecido ósseo ter uma matriz extracelular (MEC) majoritariamente inorgânica, permeada por fibras colágenas. As células ósseas são responsáveis pela produção e manutenção da qualidade dessa matriz, renovando o tecido ósseo constantemente por um processo denominado remodelação. Nesse processo, há a reabsorção da matriz seguida pelo preenchimento das lacunas resultantes com novo tecido ósseo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

No entanto, desordens que alteram o rígido equilíbrio entre a reabsorção e formação óssea, levam a quadros críticos de debilidade física (FENG; McDONALD, 2011). Dentre as doenças decorrentes de alterações do metabolismo ósseo, a osteoporose merece destaque por acometer milhares de pessoas por ano, sendo caracterizada pela redução da qualidade óssea, o que propicia o aumento dos riscos de fraturas (FENG; McDONALD, 2011; NIH, 2000).

Lesões ósseas decorrentes de traumas, facilitadas ou não pela condição osteoporótica, de periodontite ou de problemas oncológicos, também são sérios problemas de saúde pública (BUTTON *et al.*, 2009; KENLEY *et al.*, 1993). Apesar de o osso ter capacidade de regeneração, a reabilitação é um processo demorado e que muitas vezes necessita de intervenções cirúrgicas (KENLEY *et al.*, 1993). No caso de perdas ósseas que impossibilitam ou dificultam o processo de reabilitação natural, o uso de substâncias reabilitadoras e/ou implantes de biomateriais se faz necessário (CHIAPASCO; ROMEO, 2007).

Mesmo com os avanços na área de engenharia tecidual do tecido ósseo, os tratamentos instituídos para a reabilitação óssea nem sempre resultam numa solução ou mesmo alternativa eficaz (CHIAPASCO; ROMEO, 2007; CRANNEY *et al.*, 2002 a, b; KENLEY *et al.*, 1993). Vale ressaltar que o processo de regeneração é dificultado quando se há alterações metabólicas. Assim, há uma busca constante de alternativas que possam auxiliar a cicatrização óssea no caso de lesões ou favorecer a reabilitação da qualidade do tecido ósseo.

Investigações científicas elucidaram várias maneiras de compostos interferirem na saúde óssea. Por diversos mecanismos, podem favorecer a formação do tecido ósseo e/ou atenuar sua reabsorção, ou mesmo auxiliar no processo de regeneração de forma indireta, como promovendo o suprimento sanguíneo à região lesionada. A partir dessas investigações, descobriu-se, por exemplo, que fisiopatologias ósseas estão associadas ao estresse oxidativo

(OZGOCMEN *et al.*, 2007; WAUQUIER *et al.* 2009) e portanto, compostos antioxidantes possuem potencial para afetar positivamente o metabolismo ósseo (CARVALHO, 2013).

Na busca de novas alternativas farmacológicas, os vegetais têm relevância por oferecerem uma variedade de compostos com possíveis potenciais terapêuticos, e a maioria deles ainda não foi investigada (PINTO *et al.*, 2002). O conhecimento popular referente à medicina tradicional tem direcionado investigações científicas que visam garantir a segurança e eficácia do uso pela população e/ou estimular sua utilização como alternativa terapêutica, mas também, têm por objetivo elucidar e isolar compostos para elaboração de fitofármacos (JONAS; LEVIN, 2001; MACIEL *et al.*, 2002; TOLEDO *et al.*, 2003).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) lista várias plantas com potencial terapêutico usadas na medicina popular, com o objetivo de apoiar a fitoterapia e incentivar pesquisas para validar as propriedades farmacológicas das mesmas (BRASIL, 2009). Dentre as plantas listadas, destaca-se a *Chenopodium ambrosioides* L., popularmente conhecida como mastruz, por ser amplamente utilizada pela população (PIO CORREA; PENA, 1884; DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

Dentre às várias indicações, *C. ambrosioides* é utilizada como antehelmíntica, expectorante e cicatrizante (LALL, MEYER, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2006), além de ser empregada no reparo de fraturas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; MORAIS, *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006). Experimentos laboratoriais *in vivo* verificaram a eficácia das folhas desse vegetal para a cicatrização óssea (PINHEIRO NETO, 2005; SOUSA, 2010).

A regeneração de lesões ósseas facilitada por compostos pode estar relacionada ao potencial osteoindutor dos mesmos. Para se avaliar a atividade de uma substância *in vitro*, como o potencial osteoindutor, um método bastante utilizado é a cultura de células. Em especial, os pré-osteoblastos MC3T3 trazem vantagens e facilidades metodológicas (KODAMA *et al.*, 1981; QUARLES *et al.*, 1992; SUDO *et al.*, 1982), de modo que a diferenciação dessas células em osteoblastos maduros pode ser facilmente reconhecida por marcadores do metabolismo osteoblástico, como a fosfatase alcalina (FAL) e pelo grau de mineralização da matriz extracelular (MEC) (GOLUB; BOESZE-BATTAGLIA, 2007).

Considerando o possível potencial do *C. ambrosioides* L. no reparo ósseo, este trabalho investigou a sua atividade antioxidante, bem como a sua influência no processo de diferenciação dos pré-osteoblastos MC3T3 e na atividade osteoblástica de mineralização da MEC durante a diferenciação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante bem como a influência do extrato etanólico das folhas do *Chenopodium ambrosioides* L (EEC) na diferenciação *in vitro* de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antioxidante do EEC; Realizar uma triagem fitoquímica a fim de estabelecer o percentual de polifenóis, flavonoides e taninos presentes no EEC;
- Averiguar o potencial proliferativo das células MC3T3 submetidas ao tratamento com o EEC por MTT;
- Identificar e selecionar, através ensaio de viabilidade celular, três concentrações do EEC a serem empregadas nas análises de diferenciação em cultura de células MC3T3-E1;
- Comparar o grau de diferenciação osteoblástica entre o controle e as células tratadas com as diferentes concentrações do EEC por quantificação da fosfatase alcalina (FAL), empregando-se técnica quimiométrica;
- Avaliar o grau de mineralização da matriz formada pelas células MC3T3 tratadas com as três diferentes concentrações do EEC elegidas, pela técnica de coloração von Kossa.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. OSSO

3.1.1. Composição e Função

O osso é um órgão composto por tecido ósseo (com uma matriz mineralizada, responsável pela sustentação do corpo e órgãos), tecido cartilaginoso (fibras cartilaginosas que amortecem e permitem os movimentos entre os ossos), tecido conjuntivo (periósteo e o endósteo, a fonte energética e osteogênica), tecido adiposo (medula óssea amarela, principal fonte energética) e pelos tecidos nervoso e hematopoiético (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo é formado por células associadas a uma matriz extracelular (MEC) orgânica, reforçada por depósitos de minerais, sendo que esta porção inorgânica representa 60% da constituição do tecido ósseo (ROBEY; BOSKEY, 2008). A porção orgânica da MEC óssea é constituída principalmente por colágeno tipo 1 (95%), os restantes 5% são compostos por proteoglicanos e glicoproteínas (osteocalcina, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento). A parte inorgânica é constituída principalmente por fosfato e cálcio, mas também por bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato (GENESER, 2003).

Tal composição confere ao osso tanto rigidez (MEC inorgânica) quanto certa flexibilidade (MEC orgânica) que se traduzem em uma melhor resistência física. Assim, osso confere suporte mecânico para as articulações, tendões e ligamentos e protege órgãos vitais. Além disso, também age como reservatório mineral, sendo importante para a homeostase principalmente do cálcio e do fosfato no organismo (FENG; McDONALD, 2011).

Muito embora seja composto em grande parte por MEC inorgânica, o osso vivo é dinâmico, sendo metabolicamente ativo e capaz de adaptar-se às condições externas por meio de um processo designado remodelação óssea. A manutenção da qualidade e resistência do tecido ósseo, que garantem a eficácia no desempenho destas funções, bem como a liberação controlada de minerais para o sangue, dependem deste processo (SEEMAN; DELMAS, 2006).

3.1.2. Macroestrutura

Macroscopicamente, o osso apresenta duas regiões de tecido ósseo que são chamadas de substância compacta e esponjosa. A substância esponjosa, ou osso trabecular, cerca de 80% do tecido ósseo total, é composta por filamentos intercomunicantes, as trabéculas, que delimitam espaços, dando a aparência porosa (Figura 1 A e B). Nesses espaços, aloja-se a medula óssea vermelha, com células hematopoiéticas, ou a amarela, formada por adipócitos. Por toda sua extensão, o osso esponjoso é recoberto por uma camada de tecido conjuntivo designada endóstio (GENESER, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Já o tecido ósseo que compõe o osso compacto ou substância compacta, é formado por MEC depositada de forma concêntrica a um canal denominado canal de Havers, por onde os vasos sanguíneos permeiam a massa compacta e nutrem suas células, formando um sistema de Havers ou ósteon (Figura 1 A). Assim, forma, a olho nu, uma massa sem espaços visíveis a qual é recoberta por uma camada de tecido conjuntivo designada perióstio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008) (Figura 1 A e B).

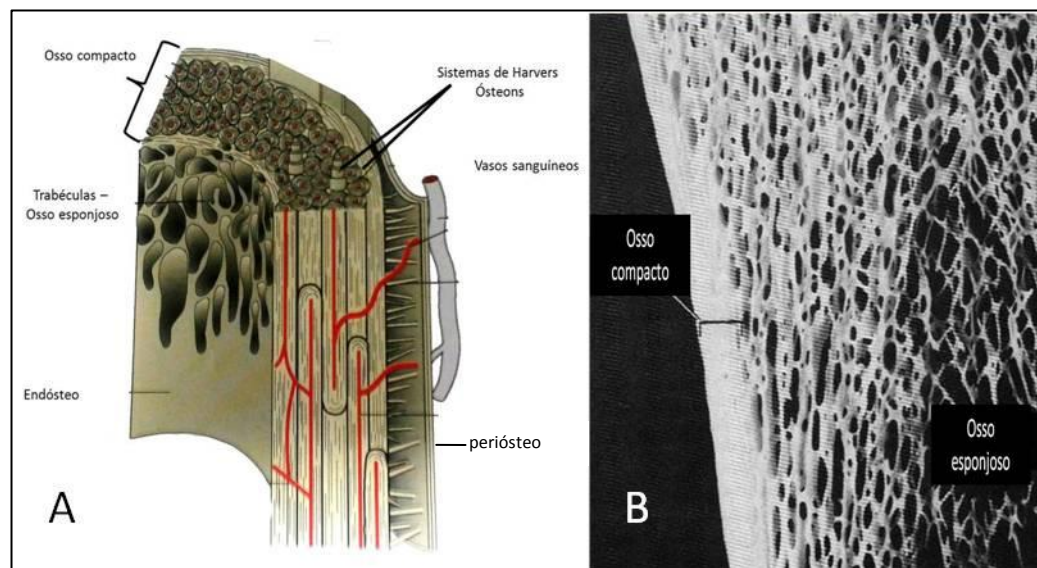


Figura 1: Macroestrutura óssea. **A:** Esquema da macroestrutura óssea do osso compacto, formado por sistema de Havers (ósteons) e recoberto por perióstio, e do osso esponjoso, formado por trabéculas e recoberto pelo endóstio. **B:** Detalhes do tecido ósseo esponjoso, localizado internamente em relação ao tecido ósseo compacto.

Fonte: GENESER (2003) com modificações

Em termos funcionais, o tecido ósseo compacto promove uma atividade mecânica e protetora, já que a relação entre a massa/volume é muito maior em comparação ao esponjoso,

o que significa que tem uma maior densidade, proporcionando maior resistência às forças de compressão, enquanto que o osso esponjoso tem essencialmente funções metabólicas; com uma maior área de superfície por unidade de volume, suas células podem ser mais fácil e diretamente influenciadas, promovendo uma resposta mais rápida aos estímulos mecânicos, químicos e hormonais (FENG; McDONALD, 2011; SILVÉRIO CABRITA, 1993).

3.1.3. Microestrutura

Em se tratando de constituição celular, o tecido ósseo é organizado por células de linhagem osteoblástica, com função anabólica (formação de tecido ósseo) e por osteoclastos, provenientes de precursores hematopoiéticos, com função catabólica (reabsorção do tecido ósseo) (TAKAHASHI *et al.*, 2002). As células da linhagem osteoblástica compreendem um conjunto de células derivadas de células mesenquimais primitivas que se diferenciam em osteoprogenitoras, a partir das quais há uma diferenciação progressiva em pré-osteoblasto, osteoblasto que por fim, tornam-se osteócitos ou células de revestimento (GENESER, 2003).

As células mesenquimais primitivas são pluripotentes, com capacidade para diferenciarem-se também em fibroblastos, condrócitos, adipócitos, células musculares e células do estroma medular, dependendo de vários mecanismos de regulação mediados por fatores de crescimento (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHYAN, 1987; PITTENGER, 1999).

Tanto o periósteo quanto o endósteo são fontes de células osteoprogenitoras. O periósteo é formado por uma membrana de tecido conjuntivo vascularizada que apresenta uma camada externa fibrosa, com uma função de suporte e aporte sanguíneo e nervoso à superfície do tecido ósseo compacto; e uma camada interna osteogênica, formada pelas células osteoprogenitoras, com especial importância no processo de regeneração óssea. Já o endósteo pode ser considerado como uma camada periférica condensada do estroma da medula óssea, apresentando um potencial osteogênico e hematopoiético, reestabelecendo o suprimento sanguíneo à área em regeneração (DIAS, 2004).

3.1.4. Formação e Metabolismo do Tecido Ósseo

A formação e a dinâmica metabólica do tecido ósseo envolvem uma série de fenômenos, a começar pela migração de células precursoras para o local onde ocorre a proliferação e diferenciação dessas células, seguida pela maturação e crescimento, com o

concomitante desempenho de suas respectivas funções. Esses eventos são controlados e coordenados por vários fatores de origem endócrina, parácrina e autócrina, sendo ainda influenciados por forças mecânicas (HUANG *et al.*, 2007; SANTOS; BAKKER; KLEIN-NULEND, 2009; KALAJZIC *et al.*, 2005).

3.1.4.1. Diferenciação, Caracterização e Atividade dos Osteoblastos

No microambiente ósseo, a diferenciação progressiva das células osteoprogenitoras está sob influência de fatores capazes de interferir na migração, diferenciação e atividade celular, tais como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (YAMAGUCHI *et al.*, 2000), fator de crescimento transformante- β (TGF- β) (OTA *et al.*, 2013), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (NIU; ROSEN, 2005), fator de crescimento fibroblástico (FEI *et al.*, 2011), integrinas (TAKEUCHI *et al.*, 1997), caspases (MIURA *et al.*, 2004; MOGI; TOGARI, 2003), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (GE *et al.*, 2007), Wnt (*wingless-type MMTV integration site family*) (WESTENDORF *et al.*, 2004); fatores de transcrição Runx2 (KOMORI, 2002) e Osterix (CAO *et al.*, 2005), além de hormônios, como o paratormônio (PTH) e calcitonina (AGAS *et al.*, 2013).

Durante todo o processo de diferenciação, ou seja, desde pré-osteoblastos até que se tornem osteócitos ou células de revestimento, essas células desempenham uma intensa atividade metabólica, pois são responsáveis pela formação e organização do tecido ósseo. De acordo com a fase do desenvolvimento em que se encontram, as células de linhagem osteoblástica produzem e secretam colágeno tipo I (Col1), proteínas não colagênicas, várias citocinas e fatores de crescimento de efeito local sobre a formação e reabsorção óssea e regulam a mineralização da matriz óssea (GENESER, 2003). Quando na fase de pré-osteoblasto e osteoblasto, as células possuem desenvolvidas organelas relacionadas à síntese e modificação proteica, a saber, o retículo endoplasmático rugoso e o complexo golgiense, que conferem um citoplasma basófilo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos maduros, ocorre aproximadamente num período de 21 a 28 dias e é marcada por três estágios denominados proliferação, maturação e mineralização (CHOI *et al.*, 1996; QUARLES *et al.*, 1992; SUDO *et al.*, 1983). O primeiro momento, que corresponde, aproximadamente, aos dez primeiros dias, é caracterizado pelo aumento da taxa proliferativa, a qual é regida por genes e proteínas

relacionadas ao ciclo celular, como os genes c-fos e c-myc e as proteínas histonas e proteína ativador-1 (AP-1) (CHOI *et al.*,1996; LIAN; STEIN, 1992).

O segundo momento, entre 10 a 20 dias, é marcado pela formação e maturação da matriz extracelular (LIAN; STEIN, 1992), lembrando que a matriz orgânica, produzida pelos osteoblastos, é constituída majoritariamente por colágeno em substância fundamental, sendo esta, composta por proteoglicanas, como sulfato de condroitina e hialuronana, e várias outras proteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Vale destacar que nesse estágio, estão sendo mais abundantemente produzidas a fosfatase alcalina (FAL), fundamental para iniciar e preparar a matriz para o processo de mineralização (GOLUB; BOESZE-BATTAGLIA, 2007), e a osteonectina, com função de adesão, unindo os componentes das superfícies celulares aos da matriz, em especial ao cálcio e ao colágeno (QUARLES *et al.*,1992; VARY *et al.*,2000).

Com a ação dessas e outras proteínas, a MEC sofre uma série de alterações na composição e organização tornando-se competente para o terceiro estágio, o da mineralização. Os monômeros de colágeno rapidamente se polimerizam tornando-se fibras. O tecido resultante, por sua vez, é chamado de osteoide, definido como a matriz óssea ainda não mineralizada (GENESER, 2003).

No início da mineralização há deposição de cálcio amorfo (GENESER, 2003). A fosfatase alcalina catalisa uma reação de hidrólise em meio alcalino, onde é gerado fosfato inorgânico, utilizado na formação do fosfato de cálcio (GOLUB; BOESZE-BATTAGLIA, 2007; SIMÃO *et al.*, 2007). Aos poucos, os sais de cálcio e fosfato começam a se precipitar na superfície das fibras colágenas e estes compostos amorfos, por reações químicas, se organizam em cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH_2)]$. Outros íons como magnésio e potássio também estão presentes na matriz, mas provavelmente não formam cristais típicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A deposição dos cristais e fibras colágenas é estrategicamente concêntrica de forma que os cristais unem-se hermeticamente às fibras. Essa disposição evita o deslocamento desses componentes da MEC, impedindo o cisalhamento do osso (GENESER, 2003).

Nesse terceiro estágio, vários genes que codificam proteínas relacionadas à mineralização são expressos em paralelo com a acumulação de minerais. Tais genes traduzem proteínas ósseas como a sialoproteína, osteopontina e osteocalcina (proteína não colágeno mais abundante no tecido ósseo adulto) (CHOI *et al.*,1996), que são moléculas que permitem a união de células ósseas à matriz (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A mineralização da matriz induz modificações metabólicas e morfológicas dos osteoblastos (STEIN *et al.*,1990).

Quando a mineralização está acentuada, observa-se a máxima expressão do gene da colagenase, relacionada com a remodelação da matriz. Também há células apoptóticas, como um mecanismo para a regulação do número de osteoblastos de superfície que se diferenciarão em osteócitos à posteriori (MARTIN *et al.*, 1993). A Figura 2 traz uma relação temporal das principais proteínas que marcam a diferenciação osteoblástica.

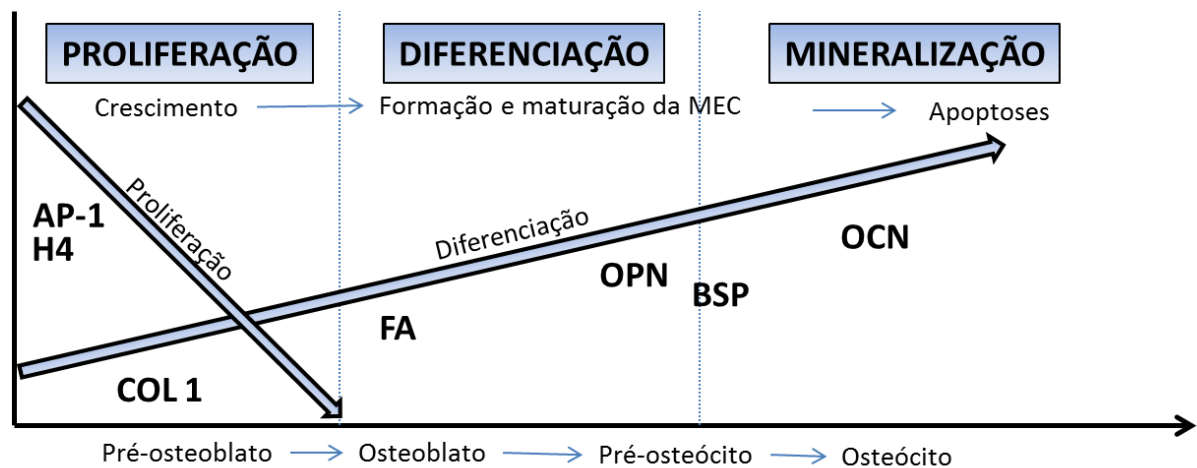


Figura 2: Principais fatores produzidos pelos osteoblastos e usados como marcadores dos diferentes estágios de desenvolvimento da diferenciação osteoblástica. MEC, matriz extracelular; AP-1, proteína ativador-1; H4, histonas; Col1, colágeno tipo 1; FAL, fosfatase alcalina; OPN, osteopontina, OCN, osteocalcina; BSP, sialoproteína óssea.

Fonte: LIAN; STEIN (1992) com modificações.

Após esse processo, os osteoblastos podem se diferenciar em dois tipos celulares: em células de revestimento ou em osteócitos. Quando os osteoblastos são circundados por matriz e diminuem o metabolismo celular, há degradação paulatina do retículo endoplasmático rugoso e do complexo golgiense. Tornam-se, então, quiescentes e passam a ser chamados de osteócitos. Estes se comunicam entre si através de canalículos, uma vez que não há como ocorrer difusão através de uma matriz mineralizada (GENESER, 2003).

Dentro dos canalículos, os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes por onde podem passar pequenas moléculas de um osteócito para outro. A nutrição dos osteócitos também é facilitada pelos canais de Havers e Volkmann (canais que interligam os canais de Havers), com vasos sanguíneos que partem da camada externa do periósteo e intermeiam o osso compacto (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os osteoblastos que permanecem na superfície após a formação do osteoide, passam a ser chamados de células de revestimento, as quais formam uma camada tipo epitélio simples pavimentoso que recobre todas as superfícies ósseas internas e externas com papel importante

na diferenciação de células mesenquimatosas e na atividade anabólica dos osteoblastos, bem como influenciam na atividade dos osteoclastos (EVERTS *et al.*, 2002).

3.1.4.2. Diferenciação, Caracterização e Atividade dos Osteoclastos

O osteoclasto é uma célula gigante e móvel, diferenciada a partir da junção de várias células, sendo, portanto, multinucleada, chegando a possuir em torno de 50 núcleos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Estas células precursoras, de origem hematopoiética, pertencem à linhagem de monócitos/macrófagos (BONUCCI, 1981). O osteoclasto maduro possui numerosas mitocôndrias e complexos golgienses além de vacúolos de fagocitose e lisossomos agrupados preferencialmente sob uma porção especializada da membrana plasmática com várias invaginações, chamada de borda em escova (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Células osteoclásticas apresentam a função de reabsorção do tecido ósseo em áreas de remodelação, pela degradação enzimática da matriz proteica e dissolução ácida dos minerais da MEC óssea. O espaço na MEC resultante da atividade osteoclástica é denominado lacuna de Howship (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A osteoclastogênese ocorre em aproximadamente seis dias, sendo a fase inicial, a de proliferação, com duração de quatro dias, seguida da fase de diferenciação nos últimos dois dias (SUDA *et al.*, 1999). A origem e atividade dos osteoclastos têm influência de hormônios circulantes, incluindo o PTH e os hormônios esteroides gonadais, estrogênio e testosterona (MARTIN; UDAGAWA, 1998). Também são relevantes para a formação e atividade dos osteoclastos, os fatores de necrose tumoral (TNFs), responsáveis por ativar um fator de transcrição chamado fator nuclear κ B (NF- κ B) (MATSUO; IRIE, 2008).

As células da linhagem osteoblástica agem no recrutamento e metabolismo dos osteoclastos de várias formas (Figura 3). Por exemplo, o fator de crescimento de monócitos (M-CSF) liberado por células osteoblásticas, interfere na proliferação e diferenciação dos osteoclastos (BISKOBING *et al.*, 1995). Além disso, induzidos por vitamina D (forma ativa: 1,25-di-hidroxivitamina D₃ ou 1 α ,25(OH)₂D₃), PTH e interleucina-1 (IL-1) (TSUKII *et al.*, 1998), os osteoblastos expressam uma proteína de membrana denominada RANKL, também conhecida como ODF, OPGL ou TRANCE, um membro da família dos TNFs. Na superfície dos osteoclastos, há um receptor para esta molécula, denominado RANK.

A interação entre osteoblastos e osteoclastos por meio de RANKL/RANK ativa o NF- κ B, que é crucial para a fusão dos osteoclastos imaturos e ativação dos mesmos, tornando-os

osteoclastos maduros (MATSUO; IRIE, 2008). Por outro lado, sabe-se que a osteoprotegerina (OPG), que é produzida por osteoblastos, também interage com RANKL, impedindo assim, sua interação com RANK, evitando que ocorra a diferenciação e maturação dos pré-osteoclastos (SUDA *et al.*,1999; WRIGHT *et al.*,2009). Esse meio de ativação dos osteoclastos está esquematizado na Figura 3.

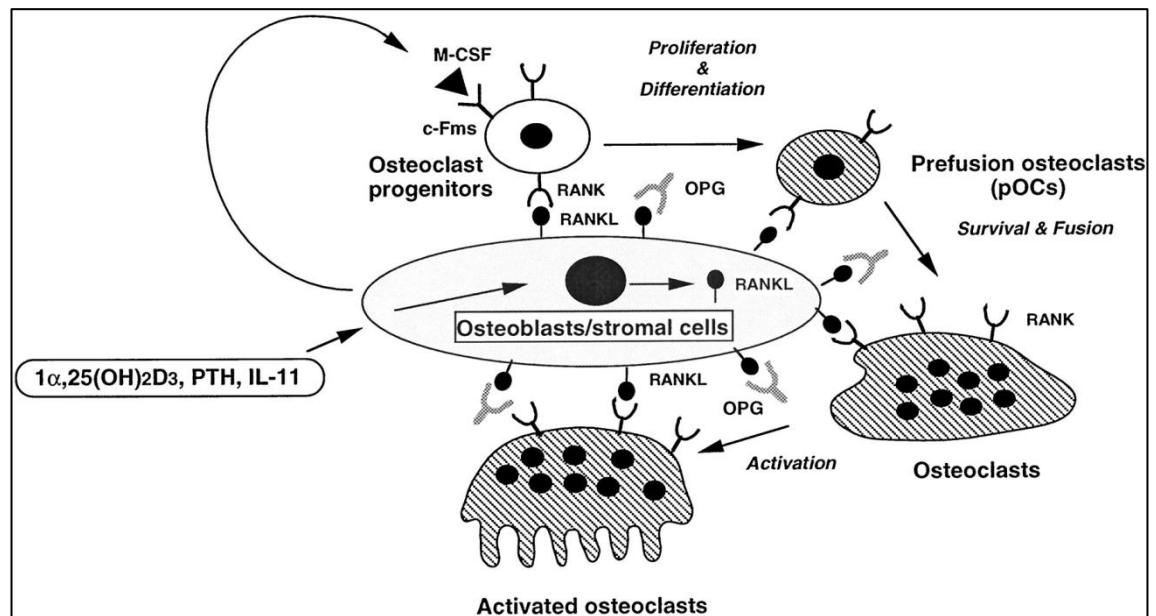


Figura 3: Representação esquemática da diferenciação osteoclástica por influência de células da linhagem osteoblástica.

Fonte: SUDA *et al.* (1999)

Os osteoblastos também produzem outros fatores que servem como mediadores para a formação ou reabsorção óssea, como o fator de crescimento similar à insulina (IGF-I), a interleucina-6 (IL-6) (TSENG *et al.*,2010) e as prostaglandinas (PGE2) (BLACKWELL; RAISZ; PILBEAM, 2010).

O mecanismo de reabsorção envolve a secreção de íons hidrogênio e enzimas proteolíticas para o compartimento de reabsorção (BARON, 1996; TEITELBAUM *et al.*,1996). O líquido desse espaço atinge pH 4 por meio de ATPases presentes na membrana da borda em escova, as quais bombeiam os prótons. Assim, o pH ácido serve para ativar as enzimas lisossômicas, como a collagenase e a catepsina K, que degradam parte da matriz orgânica. Os prótons associam-se com íons cloro, também bombeados pelos osteoclastos, formando ácido clorídrico que dissolve a parte inorgânica da MEC óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

3.1.4.3. Remodelação Óssea

O metabolismo ósseo é resumidamente entendido como um equilíbrio entre a atividade reabsortiva por osteoclastos seguida de formação óssea pelos osteoblastos, em resposta a diferentes estímulos, como a formação de microfissuras ósseas, baixos níveis de cálcio no sangue, carga mecânica, alterações hormonais ou de citocinas (ANDERSEN *et al.*, 2009). Porém, osteócitos e células de revestimento também desempenham papéis cruciais nesse processo.

Os osteócitos são células mecanossensíveis capazes de reconhecer microfissuras e tensão mecânica (SANTOS; BAKKER; KLEIN-NULEND, 2009). Além disso, há transdução de sinal entre os osteoblastos, osteoclastos e células de revestimento com osteócitos (RUBIN; RUBIN; JACOBS, 2006). Assim, os osteócitos reconhecem regiões que necessitam de remodelação e orientam a inicialização do processo.

A remodelação pode ser dividida em quatro fases: a primeira corresponde à iniciação da remodelação num local específico; a segunda fase é caracterizada pelo recrutamento dos precursores de osteoblastos e osteoclastos até o local, seguida da reabsorção osteoclástica; na terceira fase, ocorre a diferenciação dos osteoblastos que iniciam o preenchimento da lacuna de Howship resultante da digestão osteoclástica; e a última fase refere-se à mineralização do osteoide (FENG; McDONALD, 2011).

Na primeira fase, a iniciação se dá por um processo de degradação da matriz orgânica, principalmente do colágeno da MEC óssea, pelas células de revestimento, que assim se desprendem dessa matriz agora majoritariamente inorgânica (EVERTS *et al.*, 2002; LERNER, 2006). Desse modo, forma-se um espaço entre a monocamada de revestimento e a matriz. Este é, portanto, um sistema fechado, denominado compartimento de remodelação óssea (do inglês *Bone Reabsorption Center* - BRC) que está em contato com vasos sanguíneos (HAUGE *et al.*, 2001; ANDERSEN, *et al.*, 2009).

Provavelmente há angiogênese local e assim, vasos sanguíneos recobrem o BRC e têm sido inclusive relatados como parte integrante desse centro de reabsorção (ANDERSEN *et al.*, 2009; DODD; RALEIGH; GROSS, 1999; PACICCA *et al.*, 2003). Importante destacar que precursores osteoblásticos têm localização perivascular, inclusive no periósteo e endósteo (SHI; GRONTHOS, 2003). Assim, tanto os precursores dos osteoblastos como dos osteoclastos (de origem hematopoiética e por isso presentes na corrente sanguínea) permeiam a barreira de células de revestimento para o interior do BRC por meio dessa comunicação vascular (ANDERSEN, *et al.*, 2009; FENG; McDONALD, 2011) (Figura 4).

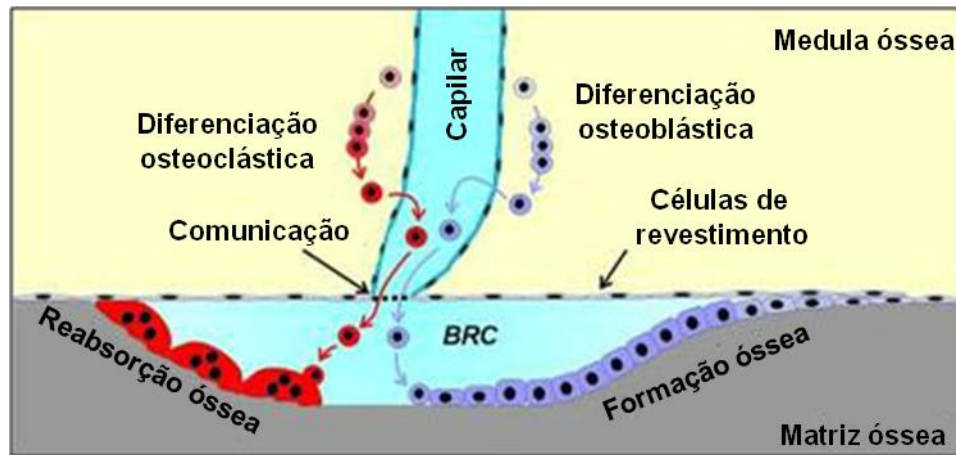


Figura 4: Comunicação entre vasos sanguíneos e o BRC como fonte de precursores de osteoclastos e osteoblastos.

Fonte: Andersen *et al.*, 2009, com modificações.

Os precursores osteoclásticos no BRC são estimulados à diferenciação por vários fatores e citocinas já discutidos anteriormente, principalmente pela expressão de RANKL nas células de revestimento e pelos precursores osteoblásticos locais. A degradação do colágeno superficial pelas células de revestimento também tem sua relevância por permitir que os osteoclastos maduros entrem em contato com a porção inorgânica da MEC, o que é importante para que possam iniciar o processo de degradação da matriz (LERNER, 2006).

Quando a reabsorção é finalizada, as células de revestimento degradam os restos de matriz orgânica deixados pela atividade osteoclástica e recobrem a matriz com uma fina camada proteica, finalizada com fibras colágenas, chamada linha de cemento (EVERTS *et al.*, 2002). Esta é importante para a deposição dos osteoblastos e início de sua atividade de formação do osteoide, seguida pela mineralização deste (EVERTS *et al.*, 2002; LERNER, 2006). À posteriori, alguns desses osteoblastos se diferenciarão em osteócitos enquanto outros farão parte da camada de revestimento. A Figura 5 traz um esquema desse ciclo de remodelação durante as quatro fases.

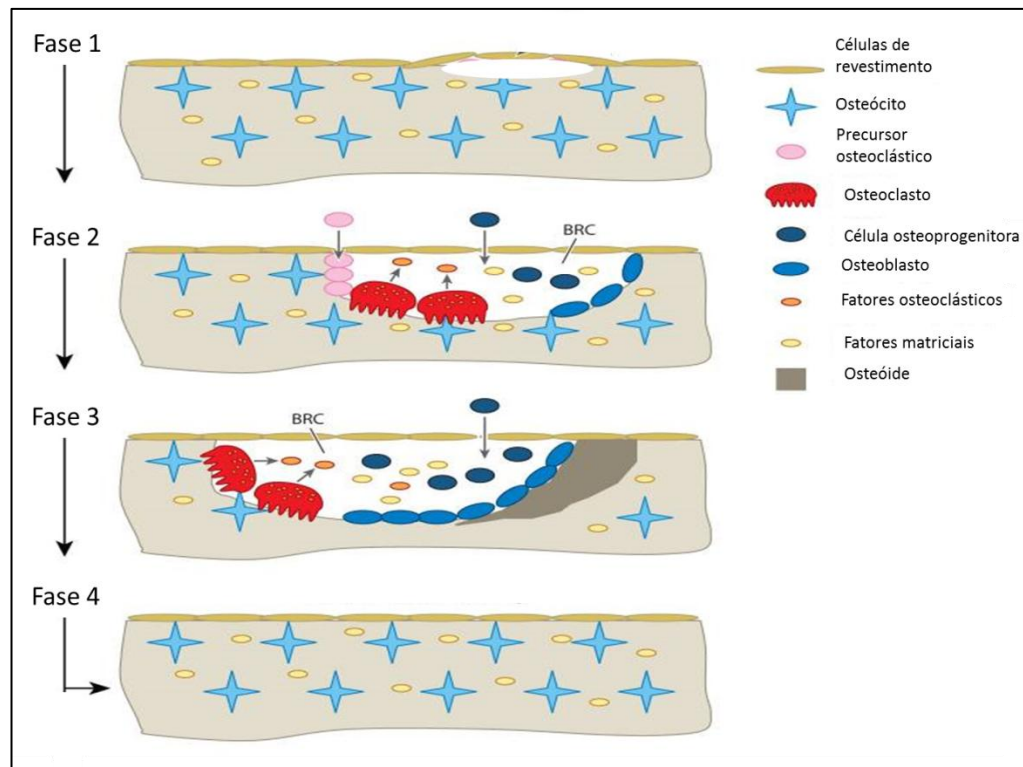


Figura 5: Fases da remodelação óssea

- Fase 1: Iniciação / ativação da remodelação óssea em um local específico. Antes da fixação dos osteoclastos à superfície, células de revestimento digerem a matriz orgânica e se desprendem da superfície óssea formando o BRC.
- Fase 2: Recrutamento de precursores de osteoblastos e osteoclastos seguida de reabsorção. Preosteoclastos atravessam a camada de revestimento, se diferenciam em osteoclastos maduros, iniciam e finalizam o processo de reabsorção dentro do BRC.
- Fase 3: Diferenciação e função osteoblástica (síntese do osteoide). Células de revestimento ocupam as lacunas do Howship e digerem as sobras de colágeno deixadas pelos osteoclastos. Depois, formam uma linha de cemento e depositam uma fina camada de colágeno fibrilar nas superfícies limpas (não ilustrado).
- Fase 4: Mineralização de osteoide e conclusão da remodelação óssea. Deposição do osteoide seguida de mineralização pelos osteoblastos.

Fonte: (FENG; McDONALD, 2011) com modificações.

Assim sendo, o processo de remodelação óssea, por meio do qual ocorre a renovação da matriz e o reparo de microfissuras, é fundamental para a manutenção da qualidade do osso e, conseqüentemente, para garantir a eficácia no desempenho de suas funções, além de promover a homeostasia mineral (FENG; McDONALD, 2011).

Esse processo requer um equilíbrio rígido entre a reabsorção e a reposição do tecido ósseo, garantindo que não haja alterações na massa ou qualidade do osso após cada ciclo. No entanto, uma variedade de fatores, incluindo as mudanças hormonais associadas à menopausa, fatores relacionados com a idade, mudanças na atividade física, uso de certos medicamentos e

doenças secundárias, afetam esse equilíbrio levando ao desenvolvimento de patologias (FENG; McDONALD, 2011).

3.2. REGENERAÇÃO DE FRATURAS

Há dois tipos básicos de regeneração de fraturas. Quando a lesão ainda permite a proximidade mínima (200 a 500 μm) entre as duas porções ósseas, a regeneração é baseada no processo de remodelação natural (TOSOUNIDIS *et al.*, 2009). Quando há uma distância maior, como ocorre nos casos de perda óssea, a regeneração se dá similarmente ao processo embriológico de formação óssea e é chamada de regeneração secundária (FERGUNSON *et al.*, 1999; GERSTENFELD *et al.*, 2003a), sendo a forma mais comum de cicatrização nos casos de fraturas (GERSTENFELD *et al.*, 2006).

Na regeneração secundária, inicialmente ocorre hemorragia na região devido à ruptura de vasos do periósteo. Inicia-se uma resposta inflamatória a qual faz com que o hematoma coagule. O coágulo serve de molde para a formação do calo ósseo (GERSTENFELD *et al.*, 2003b). Vale ressaltar que embora as citocinas inflamatórias tenham um efeito reabsortivo (BLACKWELL; RAISZ; PILBEAM, 2010), moléculas pró-inflamatórias, principalmente o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucinas (IL), são fundamentais para o início da regeneração do tecido ósseo (COOPER *et al.*, 2010; GERSTENFELD *et al.*, 2003b). Por exemplo, Lu *et al.* (2013) demonstraram que o TNF- α estimula o recrutamento, a proliferação e a diferenciação osteogênica de células mesenquimais provenientes do tecido adiposo, além de também levar a um aumento de BMPs.

Após a formação do hematoma primário, células recrutadas se diferenciam em condrócitos que produzem e secretam fibras cartilaginosas para a formação de um calo ósseo primário, que promove maior estabilidade na região local da fratura (DIMITRIOU *et al.*, 2005). Esse calo primário é posteriormente mineralizado por osteoblastos e passa a ser chamado de calo secundário. No entanto, o mesmo proporciona apenas uma estabilidade biomecânica e não restaura completamente as propriedades do osso normal. Assim, necessariamente o calo ósseo aos poucos vai sendo substituído e organizado pelo processo lento de remodelação óssea (GERSTENFELD *et al.*, 2003b; KENLEY *et al.*, 1993; TOSOUNIDIS *et al.*, 2009). A tabela 1 resume as fases da regeneração ao longo do tempo

Tabela 1: Fases da regeneração óssea ao longo do tempo.

FASE	TEMPO	ATIVIDADES/Considerações
Indução	0 a 2 dias	- Formação do hematoma - Atividade de células do sistema imunológico
Inflamação	2 a 14 dias	- Liberação de fatores de indução, crescimento e inflamatórios
Calo primário	2 a 8 semanas	- Liberação de colágeno - Condrogênese e angiogênese - Mineralização
Calo secundário	2 a 12 meses	- Formação óssea trabecular - A fratura é considerada curada nesse estágio
Remodelação	1 ano ou mais	- Formação do tecido ósseo compacto

Fonte: KENLEY *et al.*(1993) com modificações

Muitas vezes, em casos de perdas ósseas, é necessário o uso de biomateriais que são implantados no local da lesão. Entende-se por biomaterial, qualquer substância, excluindo os fármacos, ou combinação de substâncias, sintética ou natural quanto à origem, que pode ser utilizada em qualquer período de tempo, como tratamento total ou parcial, aumento ou reposição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo (WILLIAMS, 1999). Por ação quimiotática, são capazes de acelerar e/ou ordenar o processo de reparo ósseo.

O biomaterial ideal para esse fim deve ser biocompatível ou biotolerado, além de ter taxa de biodegradação aceitável para permanecer no organismo por um tempo compatível para sua substituição por um novo tecido ósseo. Deve ser também de fácil manipulação, esterilizável, facilmente obtido, econômico, não devendo atuar como substrato para a proliferação de patógenos, não ser cancerígeno ou teratogênico. Ainda, deve pelo menos conduzir devidamente a orientação do osso em formação (osteocondutor), no entanto ainda melhor caso tenha a capacidade de induzir a formação de células ósseas pelo receptor (osteoindutor) e/ou ser osteogênico, quando o próprio biomaterial porta células vivas capazes de diferenciação em células ósseas (CHIAPASCO; ROMEO, 2007).

3.3. RELEVÂNCIA DE PROBLEMAS ÓSSEOS PARA A SAÚDE PÚBLICA

Problemas relacionados à saúde óssea são comuns e surgem principalmente em decorrência de desordens metabólicas, traumas, anormalidades congênitas, problemas oncológicos ou de infecções, como ocorre na periodontite. No entanto, tratamentos disponíveis para os diversos casos nem sempre resultam numa solução ou mesmo alternativa eficaz (BUTTON *et al.*, 2009; CRANNEY *et al.*, 2002 a, b; KENLEY *et al.*, 1993; LERNER, 2006).

No caso de regeneração de lesões no tecido ósseo, pode-se haver dificuldades no que diz respeito ao tempo natural de regeneração desse tecido de formação complexa (2 meses a anos) (KENLEY *et al.*, 1993), principalmente quando se há perdas ósseas, sendo necessário, nesses casos, o uso de biomateriais, no entanto, ainda não dispomos de alternativas realmente eficazes que atendam a maior parte das características de um biomaterial ideal (CHIAPASCO; ROMEO, 2007). Nesse sentido, avanços na biologia celular permitiram o surgimento de alternativas que ajudam o processo de regeneração, como por exemplo, a implementação de moléculas osteoindutoras ao arcabouço do biomaterial como as BMPs (KIM *et al.*, 2013; CAROFINO; LIBERMAN, 2008).

Desordens metabólicas, por sua vez, levam à remodelação desequilibrada, que pode ser refletida em perdas de massa óssea, tal como ocorre na osteoporose, ou, mais raramente, um ganho, como na osteopetrose, ou mesmo formações ósseas desordenadas, como ocorre na doença de Paget e na osteodistrofia renal. Esse desequilíbrio pode ainda levar à calcificação de tecidos não ósseos, como o vascular (FLORE *et al.*, 2013). A tabela 2 traz as principais características, causas e tratamentos disponíveis para algumas dessas doenças.

Tabela 2: Principais características, causas, e tratamentos disponíveis para fisiopatologias ósseas

DOENÇA	CARACTERÍSTICAS	CAUSAS	PRINCIPAIS TRATAMENTOS
Osteoporose	Comprometimento da resistência óssea, levando ao aumento do risco de fraturas	Aumento da reabsorção por: • Osteoporose primária: • Diminuição dos níveis de hormônios esteroides, principalmente do estrógeno pós menopausa • Problemas associados ao envelhecimento natural do organismo • Osteoporose secundária: • Induzida por uso de glicocorticoides • Induzida por imobilização óssea	• Bisfosfonados • Reposição hormonal
Osteopetrose	Aumento da densidade óssea que leva a fraturas, artrite, hipocalcemia e vários níveis de insuficiência da medula óssea.	Doenças hereditárias raras - mutações que afetam a função dos osteoclastos • Levam a uma maior reabsorção por osteoclastos, no entanto, seguida por uma acentuada atividade osteoblástica.	Transplante de células-tronco hematopoéticas Gestão das complicações
Doença de Paget	Deformações ósseas.	Doença de cunho genético ou desencadeada por algumas doenças virais, que levam ao aumento tanto da atividade osteoclástica quanto da osteoblástica, mas de forma desregulada	Bisfosfonados
Osteodistrofia renal	Em alguns casos leva ao aumento da massa óssea e em outros, à diminuição	Doença renal crônica	• Quando leva ao aumento da massa óssea: • Restrição de fósforo ou uso de aglutinantes de fosfato, corrigindo a deficiência de vitamina D, • Uso ocasional de suplementos de cálcio • Quando leva à diminuição: • Tratamentos que elevam os níveis de PTH. • Redução de cálcio e vitamina D

Fonte: FENG; McDONALD, (2011)

A osteoporose é mundialmente considerada um dos principais problemas de saúde pública por acometer milhares de pessoas por ano em todo o mundo e levar à mortalidade, morbidade, incapacidade funcional e social com a diminuição da força de trabalho (CUMMINGS; MELTON, 2002; FULLER, 2000). Trata-se de uma doença caracterizada por uma resistência óssea comprometida, predispondo a um aumento do risco de fraturas (NIH, 2000).

A resistência óssea diz respeito tanto à densidade óssea, em gramas de mineral por área ou volume, quanto à qualidade óssea, que refletem a arquitetura, a rotatividade, a acumulação de dano (por exemplo, microfraturas) e mineralização (NIH, 2000) Essa condição resulta de um envelhecimento natural, deficiências hormonais, como por exemplo, do estrógeno na

mulher após a menopausa, desnutrição ou uso de corticosteroides (FENG; McDONALD, 2011; NIH, 2000).

Atualmente, a prevenção e tratamento da osteoporose consiste essencialmente na utilização de agentes de anti-reabsorção, com alvo na ação dos osteoclastos (como os bisfosfonados) (FENG; McDONALD, 2011; LERNER, 2006, NIH, 2000). Fitoderivados também podem ser empregados como medida preventiva ou no tratamento adicional de distúrbios metabólicos que afetam os tecidos mineralizados, como a osteoporose, ou mesmo nos casos de fraturas, desde que ajam de forma direta ou indireta como anti-reabsorptivos ou osteoindutores (CHEN *et al.*,2011; JEONG *et al.*,2011; KONO *et al.*,2011; KANNO; HIRANO; KAYAMA, 2003; PANG *et al.*,2006; PINHEIRO NETO, 2005)

3.4. ABORDAGEM DE AGENTES ANTIOXIDANTES NO METABOLISMO ÓSSEO

Os radicais livres são moléculas ou átomos com um ou mais elétrons desemparelhados, o que lhes confere uma instabilidade química que conseqüentemente torna-os muito reativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) são os radicais livres mais relevantes em sistemas biológicos, pois são gerados como subprodutos do metabolismo celular normal (BALABAN; NEMOTO; FINKEL, 2005).

EROs são normalmente sequestradas por antioxidantes sintetizados no organismo e/ou adquiridos por meio da alimentação, no entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de EROs e o sequestro das mesmas, entra-se numa condição denominada estresse oxidativo, que condiciona várias fisiopatologias (ALMEIDA *et al.*,2007; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em equilíbrio, EROs podem ter efeitos benéficos, agindo como reguladores normais de rotas metabólicas em sistemas de sinalização (DRÖGE, 2002; FORMAN; FUKUTO; TORRES, 2004). Estudos têm demonstrado que EROs são moduladores chave do metabolismo ósseo e, portanto, o estresse oxidativo está envolvido com fisiopatologias de tecidos mineralizados (OZGOCMEN *et al.*,2007; WAUQUIER *et al.* 2009).

Essa correlação entre EROs e a fisiologia óssea está principalmente atrelada aos osteoclastos, os quais tanto as produzem (STEINBECK *et al.*,1994) quanto são ativados por elas (GARRETT *et al.*,1990). Como moduladores, EROs têm influência na diferenciação (LEE, *et al.*, 2005) e no metabolismo dos osteoclastos (HA *et al.*,2004).

Assim, pesquisas foram realizadas a fim de se elucidar essa relação moduladora da atividade osteoclástica mediada por EROs. Um importante mecanismo foi elucidado: EROs agem favorecendo a ativação de NF- κ B por RANKL e TNF- α (HA *et al.*, 2004; LEE, *et al.*, 2005). Além de estar relacionado com a diferenciação e com o desencadear da reabsorção por osteoclastos, RANKL também age aumentando a sobrevivência dessas células e acelerando o processo de reabsorção (FULLER *et al.*, 1998).

Por outro lado, em células osteoblásticas, EROs desempenham um papel, pelo menos em parte, na diferenciação dos osteoblastos por haver vias de sinalização EROs-dependentes envolvidas nesse processo (ARAKAKI *et al.*, 2013). No entanto EROs podem agir atenuando a diferenciação e função celular, de forma indireta. Um dos motivos está relacionado com a via de sinalização Wnt. A sinalização Wnt reúne moléculas que ativam vias de transdução de sinal, o que resulta em alterações na expressão genética que afetam o comportamento da célula, inclusive sendo importante para o destino da diferenciação, proliferação e migração celular (MOON *et al.*, 2002).

Sabe-se que membros da família Wnt conduzem a ativação da β -catenina, que por sua vez, ativa fatores de transcrição no núcleo celular. Em células osteoblásticas, Wnt/ β -catenina pode desempenhar um papel na diferenciação e maturação das linhagens de células precursoras mesenquimais (RODDA; McMAHON, 2006; WESTENDORF; KAHLER; SCHROEDER, 2004). Na presença de EROs, a β -catenina é desviada para ativação de outro grupo de fatores de transcrição pertencentes à família de proteínas Forkhead da classe “O” (FoxO), o que resulta numa supressão da diferenciação osteoblástica, propiciando o surgimento de patologias (ALMEIDA *et al.*, 2007). Também foi comprovado que o estresse oxidativo estimula a apoptose osteoblástica (BAI *et al.*, 2004).

O envelhecimento natural do organismo muitas vezes é mencionado como causa de patologias ósseas, como a osteoporose (FENG; McDONALD, 2011). Esta relação se deve tanto à maior produção de EROs quanto à redução das defesas antioxidantes no organismo ao longo do tempo (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Além disso, Lean *et al.* (2003) demonstraram que a relação entre a deficiência de estrogênio e a redução da massa óssea pode estar associada à consequente redução de antioxidantes tiol e indução de TNF- α em osteoclastos, pois o estrogênio atua aumentando as defesas antioxidantes e regula a expressão de TNF- α .

Compostos antioxidantes, portanto, empenham uma função preventiva ao estresse oxidativo uma vez que agem estabilizando ou neutralizando os radicais livres. Foi evidenciado na prática que suplementação antioxidante auxiliou pacientes com osteoporose (SENDUR *et al.*, 2009; YAZDANPANAHI *et al.*, 2007). Melhus *et al.*, (1999) avaliaram a

influência da ingestão de vitaminas antioxidantes no desenvolvimento de fratura de quadril em fumantes. Eles concluíram que a baixa ingestão de vitaminas E e C aumentou o risco relativo de fratura de quadril em quase 5 vezes.

Muitos dos antioxidantes estudados para a modulação do tecido ósseo têm origem vegetal, como flavonoides e carotenoides (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Para a maioria deles, foi observada uma dupla ação benéfica para a saúde óssea: anabólica e antirreabsortiva (CARVALHO, 2013). Alguns outros estudos correlacionam o potencial antioxidante de extratos vegetais com a bioatividade frente a células ósseas (BRAYBOY *et al.*, 2001).

Além dos mecanismos já esclarecidos de ação direta, alguns antioxidantes estudados tiveram influência positiva por agirem: inibindo a produção e secreção de ácido clorídrico por osteoclastos; aumentando a produção osteoblástica de receptores para estrógeno, o que eleva a produção de OPG; suprimindo os receptores PPARs (*Peroxisome Proliferator- Activated Receptors*), responsáveis pela estimulação da adipogênese em detrimento da osteoblastogênese; diminuindo os níveis da caspase 3, responsável pela apoptose de osteoblastos; elevando as defesas antioxidantes das células ósseas (enzimas SOD, catalase e GSH); estimulando a AMPK (*AMP-activated protein kinase*), relacionada com a estimulação e produção osteoblástica; ativando a produção de genes para proteínas que estão ligadas à formação e mineralização óssea nas células osteoblásticas, incluindo da FAL; e ligando-se ao receptor de estrógeno (CARVALHO, 2013).

3.5. ETNOMEDICINA NA TRIAGEM DE FÁRMACOS FITODERIVADOS

Etnomedicina, ou medicina tradicional, é um termo usado para designar as práticas ou saberes de finalidade medicinal de uma dada cultura. Fazendo parte da etnologia, tais saberes são ditos tradicionais, os quais se referem aos conhecimentos acumulados e passados de geração a geração, tendo como base as experiências e o misticismo (JONAS; LEVIN, 2001).

A etnomedicina pode ser considerada uma subárea da etnobotânica e etnozoologia uma vez que tanto os vegetais como os animais podem ser utilizados para fins medicinais por essas populações. Entretanto, os vegetais são mais amplamente estudados nesse aspecto por serem fontes de princípios ativos diversificados (PINTO *et al.*, 2002). As plantas empregadas na medicina popular são elencadas há milênios e representam, ainda hoje, uma fonte de cura procurada por grande parte da população, possivelmente por se tratar de um recurso mais acessível quando comparado aos medicamentos industrializados (PINTO *et al.*, 2002).

Por outro lado, é importante ressaltar que há riscos inerentes ao uso indiscriminado de produtos naturais utilizados como remédios pela população, já que estes não são inócuos e podem apresentar efeitos danosos à saúde. A utilização de doses altas ou por períodos prolongados, ou ainda por via de administração incorreta, e a não padronização das concentrações e do modo de preparo, aumentam a probabilidade de toxicidade em seres humanos e podem apresentar riscos à saúde (ALEXANDRE; GARCIA; SIMÕES, 2005; JONAS; LEVIN, 2001). Além disso, pelo fato de um preparado vegetal poder conter diversos compostos biologicamente ativos, pode haver compostos que tragam malefícios a longo prazo, imperceptíveis durante o uso.

Assim, o reconhecimento e o isolamento do composto, ou misturas de compostos, que serve especificamente para determinado fim, bem como sua caracterização química e biológica, são determinações almejadas pela indústria farmacêutica. Todavia, até que se chegue a esse objetivo, realizam-se longos estudos preliminares, como o de análise da atividade biológica do extrato bruto, para depois se confirmar e caracterizar química e biologicamente compostos a partir do mesmo (MACIEL *et al.*, 2002; TOLEDO *et al.*, 2003).

Dessa maneira, o estudo das plantas medicinais tradicionalmente utilizadas é válido tanto como uma pesquisa de drogas com potencial quimioterapêutico, quanto como medida de segurança para o uso popular. Devido ao fato de a maioria dos fitoderivados, sobretudo aqueles baseados em plantas nativas, não ter sido analisada cientificamente quanto à eficácia e à segurança de sua utilização a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PNPIC) atribui às Instituições de Ensino Superior, a responsabilidade de implementar estudos etnobotânicos nos cursos de graduação da área de ciências biológicas e da saúde e de desenvolver pesquisas nesta área (BRASIL, 2006).

Estudos com plantas medicinais devem ser estimulados, sobretudo porque se tem no Brasil uma riqueza de espécies cujos princípios ativos ainda são desconhecidos, podendo constituir uma promissora fonte de novas drogas (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). Não apenas as plantas ainda não estudadas podem ser fontes promissoras, mas aquelas com constituição química já revelada ou mesmo com comprovada atividade biológica, podem também vir a ter potencial para fins ainda não estudados ou confirmados.

Na ciência de que os estudos nesse âmbito devem ser ampliados, foi estabelecida a Portaria nº 3916/98, que aprova a Política Nacional de Medicamentos, a qual estabelece: "...deverá ser continuado e expandido o apoio às pesquisas que visem o aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais, enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas" (BRASIL, 2001).

Em se tratando da saúde óssea, os benefícios do uso de plantas medicinais ou de fitoderivados é reconhecido, como suplementação alimentar ou sendo empregadas topicamente à lesão (GARCÍA-MARTÍN *et al.*, 2012; LAGARI; LEVIS, 2012; MACKINNON *et al.*, 2011; MORAIS, *et al.*, 2005; NIEVES, 2013; PENG *et al.*, 2010; PINHEIRO NETO, 2005; SOUSA, 2010; WEI, 2012). Além disso, fitoderivados também são investigados para a possibilidade de serem utilizados na construção de biomateriais (CALIXTO *et al.*, 2001; IGNÁCIO *et al.*, 2002; MARIA; PADILHA FILHO; CASTRO, 2003; SWETHAA *et al.*, 2010).

Apesar do crescente avanço na engenharia tecidual, que elucidou alternativas empregáveis na regeneração óssea, como a implementação de moléculas osteoindutoras no arcabouço do biomaterial, o emprego dessas alternativas ainda está longe do uso comum (CAROFINO; LIBERMAN, 2008; DAHABREH *et al.*, 2009), o que sustenta a necessidade da busca de medidas mais rentáveis e que possam ser empregadas com maior urgência.

A fitoterapia atende estas exigências e vem sendo empregada para esse fim. Moléculas ou extratos de origem vegetal são frequentemente testados em ensaios *in vitro* ou *in vivo*, e alguns resultados mostram-se bastante promissores (BRAYBOY *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2011; CHIN *et al.*, 2011; CHOI *et al.*, 2001; CHOI, 2005; CHOI; KIM; LEE, 2009; JEONG *et al.*, 2004; JEONG *et al.*, 2011; KANNO; HIRANO; KAYAMA, 2004; KONO *et al.*, 2011; LEE; CHOI, 2006; LIU *et al.*, 2007; PANG *et al.*, 2006; TANG; HALLIWELL, 2010; WANG *et al.*, 2012; WATTEL *et al.*, 2002).

3.6. *Chenopodium ambrosioides* L.

Chenopodium ambrosioides L. (*C. ambrosioides*) popularmente conhecida como mastruz, menstruz, mastruço, menstruço, ambrósia, erva-formigueira, erva mata-pulgas, erva-de-santa-maria, quenopódio, chá-do-méxico e uzaidela, é uma planta milenarmente usada na medicina popular (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; PIO CORREA; PENA, 1884). Trata-se de uma erva originária da América Central e do Sul, porém atualmente é considerada cosmopolita podendo ser encontrada na forma silvestre ou cultivada em várias partes do mundo (LORENZI; MATOS, 2002).

Em 2008 foi lançado o programa RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), que visa apoiar a fitoterapia como tratamento alternativo de doenças e também incentivar pesquisadores brasileiros a validar as propriedades farmacológicas destas

plantas, incluindo a sua eficácia e segurança. *C. ambrosioides* faz parte dessa lista de 71 plantas usadas na medicina popular brasileira (BRASIL, 2009).

3.6.1. Descrição Botânica

C. ambrosioides pertence ao Gênero *Chenopodium*, o qual é abundante nos trópicos e regiões adjacentes, especialmente na América Tropical e África, onde pode ser encontrada uma grande variedade de espécies com propriedades medicinais (PIO CORREA; PENA, 1984). Análises filogenéticas levaram a conclusão de que as famílias Chenopodiaceae, a qual pertenciam *C. ambrosioides*, e Amaranthaceae, formam um grupo monofilético e, por isso, as espécies da família Chenopodiaceae passaram a pertencer à Amaranthaceae (APG III, 2009).

O nome *Chenopodium* originou-se do grego (“*chen*” - ganso e “*podus*” - pés), uma vez que as folhas de algumas espécies desse gênero assemelham-se à pés de ganso. Já o epíteto específico *ambrosioides*, refere-se à semelhança da inflorescência do mastroz com as típicas das espécies do Gênero *Ambrosia* (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

A *C. ambrosioides* apresenta um porte herbáceo com forte aroma, caule ereto com altura variando de 0,20 a 1,50m (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). O caule é sulcado e intensamente ramificado com inflorescências axilares contendo glomérulos de muitas flores pequenas e verde amareladas. As folhas, que apresentam margens serrilhadas, são geralmente alternas e sem espículas. O fruto é envolto pelo cálice contendo sementes muito pequenas, verdes ou pretas e lustrosas, quando secas (PIO CORREA; PENA, 1984). A produção das sementes é muito intensa, podendo chegar a dezenas de milhares por planta. Esta espécie prefere solos de textura média, com boa fertilidade e suprimento moderado de água, tolerando solos salinos (AELLEN; JUST, 1943).

3.6.2. Composição Química

As plantas são fontes de diversos compostos químicos que podem ser originados por rotas do metabolismo primário ou secundário. Metabólitos primários são compostos necessários para processos metabólicos com funções essenciais a todos os vegetais, tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Como exemplos destes, destacam-se os aminoácidos, nucleotídeos, certos lipídios, carboidratos e clorofila (PERES, 2004).

Em contrapartida, os metabólitos secundários não são os mesmos para todas as plantas, já que versatilidade é permitida quando não há relação com processos metabólicos fundamentais, havendo, portanto, uma série de compostos que podem, inclusive, ser exclusivos de um determinado táxon vegetal, apesar de suas vias de formação serem basicamente as mesmas para todos os vegetais (PERES, 2004).

Esses compostos são geralmente relacionados ao sistema de defesa particular para o táxon (família, gênero ou espécie), de acordo com respostas adaptativas às condições adversas às quais foram submetidas ao longo da evolução, como predadores e patógenos. Assim, pela ampla gama de compostos diferentes e por seus potenciais bioativos, são alvos de pesquisa na busca de fitofármacos (ALVES, 2001).

Os metabólitos secundários são formados por várias rotas biossintéticas culminando em moléculas com diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como ácidos graxos e seus ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos, alcaloides, compostos fenólicos e cumarinas (ALVES, 2001) e várias dessas moléculas podem ser princípios ativos de interesse farmacológico.

Podemos classificar os metabólitos secundários em três classes: 1) compostos fenólicos, como os flavonoides, polifenóis, antocianinas, taninos e lignina; 2) terpenos, como óleos essenciais, piretroides, giberelinas, carotenoides, lactonas e saponinas; e 3) alcaloides, com várias substâncias com efeito sobre o sistema nervoso, como nicotina, cafeína, cocaína, atropina, morfina, e codeína (PERES, 2004).

Investigações fitoquímicas revelam que os terpenoides são majoritários dentre os metabólitos secundários de *C. ambrosioides*, destacando-se o ascaridol, um monoterpene bicíclico considerado bom vermífico e tóxico, estando provavelmente relacionado à inibição da cadeia respiratória mitocondrial (GILLE *et al.*, 2010; KOBAYASHI *et al.*, 2009). Anteriormente, Lawrence (1999) destacou diversos estudos demonstrando que o princípio ativo predominante encontrado em *C. ambrosioides* L. é o ascaridol, ocorrendo diferenças no que se refere à sua quantificação, o que pode estar relacionada à variedade botânica e sazonalidade.

No entanto, Gbolade *et al* (2010), que identificaram 78% dos constituintes do óleo essencial do *Chenopodium ambrosioides* L, apesar de ratificar o fato de o mesmo ser composto principalmente de hidrocarbonetos monoterpênicos (76,8%), verificaram que o componente anti-helmíntico amplamente divulgado como majoritário, o ascaridol, esteve numa concentração muito menor que a esperada, representando 1,1%. De acordo com seus resultados, os terpenoides eram representados em sua maioria pelo α -Terpineno (53,4%) e p-

cimeno (21,1%). Os hidrocarbonetos de baixo peso molecular incluíram o limoneno (1,4%) e γ -Terpineno (0,8%).

Por outro lado, um composto que também merece atenção farmacológica e é encontrado em *C. ambrosioides* L. é o monoterprenoide denominado carvacrol (KOBÁ *et al.*, 2009), por ter boa eficácia anti-inflamatória (LIMA *et al.*, 2013) e antioxidante (NAFEES *et al.*, 2013; MUÑOZ-ACEVEDO, *et al.*, 2009), além de ter propriedades bactericidas e fungicidas (BOTELHO *et al.*, 2007; CHAMI *et al.*, 2004; NUMPAQUE *et al.*, 2011).

Quanto às outras classes de metabólitos secundários, um ensaio com o extrato de acetato de etila das folhas frescas de *C. ambrosioides* L, forneceu os flavonoides campferol e um até então desconhecido, o qual foi nomeado ambroside (ARISAWA *et al.*, 1971). Campferol é uma flavonoide antioxidante com conhecida ação na saúde óssea (PANG *et al.*, 2006).

3.6.3. Usos e Indicações Terapêuticas

C. ambrosioides é uma planta milenarmente usada na medicina popular, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde uma das espécies mais utilizadas entre os remédios tradicionais no mundo (LORENZI, MATOS, 2002). Sua inclusão dentre as plantas com potencial para gerar produtos fitoterápicos divulgadas no RENISUS, tem norteado estudos e pesquisas que visam o desenvolvimento de produtos naturais a partir da mesma que possam ser utilizados de forma segura e eficiente pela população.

Na literatura, várias indicações e usos são relatados. Tem indicação fungicida (DELESPAUL *et al.*, 2000), para tratamento de doenças pulmonares, distúrbios intestinais, bactericida (LALL, MEYER, 1999), moluscicida (HMAMOUCI; LAHLOU; AGOUMI, 2000), expectorante (SOUZA, FELSELI, 2006), imunoestimulatória, antihelmíntica, cicatrizante e antitumoral (NASCIMENTO *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2007).

C. ambrosioides também tem sido usada em cicatrização de fraturas ósseas (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; PINHEIRO NETO, 2005) e como antiinflamatório tópico em tombos e luxações (SILVA *et al.*, 2006). No caso das fraturas ósseas, as folhas, também, são aplicadas no local da lesão com a intenção de agilizar o reparo ósseo (MORAIS *et al.*, 2005).

Recentemente, foi demonstrado que o extrato produzido a partir das folhas, caule e sementes apresenta efeitos antiinflamatório e cicatrizante nos tecidos pulpar e periodontal, além de estimular o reparo do osso alveolar (SOUSA, 2010).

3.7. CULTIVO CELULAR

A cultura de células foi experimentada com sucesso há menos de um século pelo cientista Harrison e logo foi reconhecida como um grande avanço metodológico para pesquisas científicas, e até então, vem sendo uma importante ferramenta de estudo (PERES; CURI, 2005). Por meio dessa técnica, vários aspectos da fisiologia celular podem ser estudados a fim de se caracterizar fenômenos e testar novos fármacos (PERES; CURI, 2005).

Vale ressaltar que, por se tratar de material biológico vivo, mantido em meio externo, são elevados os riscos de contaminação celular por bactérias, micoplasmas e fungos, que vem a comprometer toda a cultura e consequentemente os experimentos. Por esse motivo, foi estabelecida uma série de cuidados que reduzem tais riscos e a perda de tempo, reagente e material biológico, garantindo maior credibilidade e reprodutividade da técnica (PERES; CURI, 2005).

Para garantir a sobrevivência *in vitro* e conservar as características fenotípicas das células, as culturas são mantidas em condições ambientais controladas que simulam as condições às quais são submetidas *in vivo*. Assim, são mantidas em incubadoras com controle de temperatura a 37°C e submetidas a uma atmosfera contendo 5% de CO₂ (PERES; CURI, 2005).

Além disso, quando *in vivo*, cada tipo celular está em contato com vários fatores químicos que determinam e favorecem sua manutenção, proliferação e diferenciação. No entanto, Eagle verificou que era possível manter células viáveis em meios contendo apenas nutrientes essenciais para sua sobrevivência, os “meios mínimos” de cultura (EAGLE, 1955).

Basicamente, um meio de cultura deve possuir em sua composição sais inorgânicos (cálcio, ferro, magnésio, potássio, entre outros), aminoácidos essenciais e não essenciais, vitaminas, antibióticos, uma fonte de energia, como a glicose, e um indicador de pH como o fenol red, por exemplo. Como propriedades fundamentais, os meios de cultura devem possuir osmolaridade e pH ótimos, e capacidade de tamponamento para diminuir as oscilações de pH induzidas por possíveis perdas de CO₂ ou acidificação do meio devido à produção de ácido láctico pelas células (PERES; CURI, 2005).

Hodiernamente, a ATCC (*American Type Culture Collection*) oferece bancos de dados referentes às mais diversas linhagens de células e os respectivos meios mais adequados para cada tipo celular. Os mais comuns meios de cultura incluem Meio Mínimo Essencial Eagle (*Minimum Essential Medium Eagle* - MEM) e Meio Eagle Modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - DMEM). Esses meios podem ser ainda suplementados de acordo com o objetivo da pesquisa ou do tipo celular.

A suplementação com soro (5-20%) é a mais importante em cultivos celulares. O soro, que pode ser obtido a partir do homem, cavalo, feto de boi, dentre outros animais, tem uma composição rica em proteínas (albumina, globulinas, transferrina), hormônios, como fatores de crescimento, lipídios, vitaminas, alguns minerais e certos inibidores do crescimento celular (PERES; CURI, 2005).

Para a manutenção das células, o meio deve ser trocado periodicamente a fim de ressuplementá-las com os nutrientes necessários e eliminar os metabólitos excretados que podem inclusive mudar as propriedades químicas do meio a ponto de torná-lo tóxico, como a alteração do pH (PERES; CURI, 2005).

O ambiente de cultivo celular favorece o espraçamento e a proliferação celular mais que *in vivo*. Por isso, para a manutenção de cultura de células aderentes, é importante conhecer os estágios em que as células passam em conjunto, até por que são influenciadas por fatores como o contato célula-célula ao longo do tempo (PERES; CURI, 2005).

Dessa maneira, as células passam por uma fase de adaptação ao ambiente em que foram inseridas e interagem com o substrato e se aderem a ele. Após essa fase, entram em um período de rápida proliferação. Quando o número de células preenche o substrato, entra-se num estágio denominado confluência. Se as células forem mantidas em confluência, provavelmente entrarão em senescência e apoptose. Isso se deve ao fato de as células em tecidos, assim como em confluência, entrarem em sincronismo, compartilhando o mesmo estágio de sobrevivência e envelhecimento. O sincronismo celular é regido principalmente pelo contato célula-célula o que justifica o comportamento quando se está nesse estágio de confluência (PERES; CURI, 2005).

Assim, uma pequena quantia de células deve ser repicada e devidamente transferida para um novo ambiente de cultivo, o que é chamado de subcultivo. As células entrarão mais uma vez no início das fases até atingirem confluência, assim chamada de primeira passagem. No entanto, o tempo de vida genético garante que a técnica de passagem celular não seja eficiente por período indeterminado (PERES; CURI, 2005).

Além disso, o acúmulo de mutações que ocorrem normalmente pode não garantir a manutenção do fenótipo normal das células ao longo das passagens. Cada tipo celular estudado apresenta um certo número de passagens consideradas como confiáveis para a manutenção das características fundamentais, já disponíveis em bancos de dados científicos (PERES; CURI, 2005).

Linhagens totipotentes ou pluripotentes, no entanto, são chamadas de immortalizadas por que são geneticamente programadas para não envelhecerem. Assim, para esses tipos celulares o número de passagens só é importante no sentido de predisposições a danos genéticos (PERES; CURI, 2005).

3.8. MC3T3-E1: UM MODELO *IN VITRO* PARA O DESENVOLVIMENTO ÓSSEO

Nas últimas décadas, pré-osteoblastos e osteoblastos vêm sendo amplamente utilizados *in vitro* para estudos do metabolismo ósseo e interações células/biomaterial. As linhagens utilizadas são provenientes de ratos (UMR-106), camundongos (MC3T3-E1), fetos humanos (hFOB 1.19) e osteosarcoma (SAOS-2) (COELHO *et al.*, 2000 a,b; DECLERCQ *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 1999;).

Dentre elas, a cultura primária de osteoblastos humanos é um excelente modelo de estudo, porém, apresenta a grande desvantagem de impossibilitar utilização da mesma amostra de células durante o estudo, devido à sua limitada vida útil *in vitro* (FRESHNEY, 2000; COELHO *et al.*, 2000 a,b), além de apresentarem heterogeneidade do fenótipo e baixas taxas de crescimento (SUBRAMANIAM *et al.*, 2002).

As células MC3T3-E1 são pré-osteoblastos que apresentam a vantagem de pertencerem a uma linhagem celular immortalizada espontaneamente, e de apresentar alta atividade de FAL (KODAMA *et al.*, 1981). Os pré-osteoblastos fornecem importantes informações à resposta de fatores de crescimento, transdução de sinais e mineralização (LONG, 2001). Essas células têm demonstrado ter capacidade de diferenciar-se em osteoblastos e formar uma matriz óssea mineralizada em estudos *in vitro* (QUARLES *et al.*, 1992; SUDO *et al.*, 1982).

Sabe-se que as células MC3T3 apresentam características fenotípicas de células diferenciadas (osteoblastos) por volta do 21º dia de tratamento com ácido ascórbico e β -glicerofosfato (FRANCESCHI; IYER, 1992; QUARLES *et al.*, 1992).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRA VEGETAL: COLETA E IDENTIFICAÇÃO

A planta foi coletada pela manhã na região rural de Lagoa Seca (PB), cujo espécime testemunho encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba, com o registro: *Chenopodium ambrosioides* L. (nº 042/ACAM).

A planta foi levada ao Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios em Medicamentos (Labdem) e suas folhas foram postas em estufa com circulação de ar até a sua desidratação, sendo em seguida, moídas para obtenção do extrato.

4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *C. ambrosioides* L. (EEC)

Para obtenção do extrato, as folhas moídas foram submetidas primeiramente a um processo de maceração, tendo permanecido em repouso por cinco dias em um percolador contendo álcool etílico a 98% (v/v). Após o repouso, sucedeu-se a percolação, sendo assim, filtrado. Esse procedimento foi repetido até que a coloração do extrato indicasse uma concentração mínima de substâncias extraídas. Em seguida, o extrato foi rotaevaporado e liofilizado, sendo desta forma utilizado em todos os experimentos.

4.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA

O teor de flavonoides, taninos e polifenóis do EEC foi aferido por método espectrofotométrico (espectrofotômetro Shimadzu® UV mini – 1240) em triplicata. Para cada ensaio foi construída uma curva de calibração com o objetivo de encontrar a margem de confiança do experimento bem como para possibilitar a análise comparatória dos resultados. Cada um dos testes requereu um padrão, o qual representa a classe a ser analisada, bem como solventes conhecidamente compatíveis para cada teste.

4.3.1 Teor de Polifenóis

Para a determinação do teor de polifenóis totais, utilizou-se o método descrito por Chandra e Mejía (2004). Adicionou-se 1 mL da solução aquosa EEC a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 minutos. A leitura foi feita a 757 nm em espectrofotômetro contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de carbonato de sódio.

Para a obtenção da curva analítica, uma solução padrão de 100 µg/mL de ácido gálico foi preparada pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 µg/mL. A concentração de polifenóis foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico.

4.3.2. Teor de Flavonoides

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda *et al.* (2005). A cada 5 mL de cada solução (em metanol) do EEC foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 minutos e em seguida a leitura foi realizada a 415 nm, contra um branco composto pela solução de AlCl_3 .

A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 µg/mL, preparada pela dissolução de 10 mg de quercetina em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram feitas diluições em triplicata, obtendo-se soluções de quercetina nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 26, 28 e 30 µg/mL. A concentração de flavonoides foi expressa em miligramas equivalentes de quercetina.

4.3.3. Teor de Taninos

O teor de taninos condensados foi quantificado utilizando-se o método de Makkar e Becker (1993). Um volume de 0,5 mL do EEC foi adicionado a 3 mL de uma solução de vanilina (4% p/v em metanol); em seguida, adicionou-se 1,5 mL de ácido clorídrico (HCl)

concentrado (37%). A reação ocorreu em tubos de ensaio, mergulhados em água a cerca de 22 °C. A leitura foi feita a 500 nm, contra um branco composto pela solução de vanilina, HCl e uma solução de etanol 50% (v/v) em água.

A curva de calibração para este ensaio foi obtida a partir de uma solução padrão de catequina obtida pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de metanol. A partir dessa solução, foram realizadas diluições em triplicata, de forma a obter soluções de catequina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL. A concentração de taninos condensados foi expressa em miligramas equivalentes de catequina.

4.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

As análises para determinação da atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

O EEC liofilizado foi diluído em água destilada para a concentração de 10mg/mL a fim de facilitar a utilização da amostra nas massas/concentrações requeridas nos testes. Foram realizados os seguintes testes espectrofotométricos para avaliar a capacidade antioxidante: Capacidade antioxidante total (CAT), atividade redutora, sequestro de radicais superóxido e quelação cúprica.

Em todos os testes foram montadas primeiramente curvas de calibração. Estas expressam os resultados de cada teste para compostos tidos como padrão antioxidante, por terem sua atividade reconhecida, como o ácido ascórbico e o ácido gálico. Por se conhecer o resultado antioxidante esperado para estes padrões, incoerências podem ser indicativas de falhas metodológicas ou problemas com os reagentes que serão utilizados nos testes, conferindo maior credibilidade aos resultados. Além disso, a curva de calibração serve como norte para os resultados que são expressos em porcentagem relativa ou atividade equivalente em relação ao padrão utilizado.

Como todos os resultados foram obtidos por espectrofotometria e a amostra possui coloração natural, em cada um dos testes também foram preparadas soluções contendo apenas a amostra em água (branco da amostra) nas concentrações utilizadas em cada teste, para que ao final das leituras, as absorbâncias geradas nos respectivos comprimentos de onda empregados, possam ser subtraídas do resultado final. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.4.1. Capacidade Antioxidante Total (CAT)

O teste da capacidade antioxidante total (CAT) avalia a habilidade que uma amostra tem em doar elétrons para compostos oxidados com potencial reativo. Prieto, Pineda e Aguilar (1999) propuseram uma metodologia hoje largamente utilizada para se determinar essa capacidade. O ensaio é baseado na redução de Molibdênio⁺⁶, proveniente da solução de Molibdato de Amônio, em Molibdênio⁺⁵ que, sob as condições de pH ácido e temperatura de 95°C, forma um complexo com o fosfato. Este complexo fosfomolibdênio possui coloração esverdeada que pode ser monitorada espectrofotometricamente a 695 nm.

Primeiramente, a amostra foi pipetada em tubos tipo eppendorf nas massas de 0,1 e 1 mg. Uma solução de Molibdato de Amônio 4 mM foi preparada e ácido sulfúrico PA 0,6 M, para garantir o pH ácido ideal para a reação. Esta solução foi acrescentada aos tubos eppendorf e em seguida, acrescentou-se a solução de fosfato de sódio 28 mM. Os tubos foram agitados e colocados na estufa a 95°C por 90 minutos. Após esfriarem, foram lidos em espectrofotômetro à 695nm. A capacidade antioxidante total foi expressa como equivalentes de ácido ascórbico em mg/g de amostra. Esse valor foi obtido a partir da equação da curva analítica.

4.4.2. Atividade Redutora

O teste avalia o poder que a amostra tem de reduzir o ferricianeto de potássio à ferrocianeto de potássio, o qual, na presença de cloreto de ferro, gera uma coloração azul esverdeada (azul de Prússia), monitorada a 700 nm.

O poder redutor das amostras foi quantificado de acordo com metodologia previamente descrita (OYAIZU, 1986; ATHUKORALA; KIM; JEON, 2006). Diferentes massas da amostra (0,05; 0,01; 0,025; 0,5; 1mg) foram postas em tubos de hemólise em tampão fosfato (0,2 M, pH 6.6), e acrescidas de ferricianeto de potássio. Os tubos foram incubados por 20 minutos a 50 °C. A reação foi finalizada pela adição da solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Foram realizadas as leituras a 700 nm e o resultado foi expresso como a porcentagem de redução em relação à maior absorbância obtida para o padrão de ácido ascórbico.

4.4.3. Sequestro de Radicais Superóxido

O ensaio é baseado na capacidade da amostra em inibir a redução fotoquímica do nitroblue tetrazolium (NBT) no sistema riboflavina-luz-NBT (DASGUPTA; DE, 2004). O radical superóxido (O_2^-) reduz o NBT a formazan, em pH 7,4, à temperatura ambiente e na presença de luz. Este subproduto faz com que ocorra uma mudança da coloração amarelo pálido para uma coloração púrpura, a qual é acompanhada por espectrofotometria a 560 nm. As moléculas que atuam como antioxidantes reagem com O_2^- inibindo a produção do formazan.

O teste foi realizado em tubos de hemólise contendo tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,8), metionina (13 mM), riboflavina (2 μ M), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (100 μ M), NBT (75 μ M) e uma solução de 1 ml da amostra nas diferentes massas (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 mg). A produção de formazan foi monitorada pelo aumento da absorbância a 560 nm após 15 minutos de iluminação com lâmpada fluorescente. Para o branco, que representa 0% de redução, tubos com apenas os reagentes foram mantidos no escuro, sendo nosso controle positivo. Para o controle negativo, nenhum antioxidante foi adicionado e os tubos foram expostos à luz, representando 100% de redução, e portanto, 0% de sequestro de radicais O_2^- . O resultado é apresentado na forma de porcentagem de sequestro de radicais O_2^- equivalente ao ácido gálico.

4.4.4. Quelação Cúprica

O método é baseado na capacidade de quelação de íons cobre pela amostra. Neste teste, utiliza-se o reagente violeta de pirocatecol, o qual se associa a íons cobre livres na solução gerando uma coloração violeta, monitorada a 632 nm (SAIGA; TANABE; NISHIMURA, 2003).

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços. As concentrações μ g/ μ L da amostra (0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2) foram adicionadas aos poços em tampão acetato 50 mM, pH 6,0. A solução do violeta de pirocatecol (4mM) e de sulfato de cobre II pentahidratado (50 μ g/mL) foi acrescentada aos poços.

Aos brancos, foram acrescentados apenas os reagentes e tampão (sendo seu resultado em absorbância, equivalente a 0% de quelação por ausência de antioxidante). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 632 nm e os resultados foram expressos em porcentagem de quelação de íons cobre equivalente ao EDTA.

4.5. ENSAIOS EM CULTURA DE CÉLULAS

Os ensaios realizados por meio do cultivo celular foram realizados no laboratório de cultura de células do Departamento de Bioquímica do Centro de Biociências da UFRN. As células da linhagem MC3T3-E1 foram obtidas do banco de células da UFRN, mantidas congeladas em nitrogênio. Depois de descongeladas, foram passadas para uma placa de cultivo em meio α -MEM, acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB). O meio foi trocado a cada dois dias até que as células passassem a se proliferar a uma velocidade adequada.

Essas células foram tripisinizadas (para ficarem em suspensão) e transferidas para uma garrafa de crescimento celular a fim de se obter uma quantidade de células suficiente para os experimentos. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer e assim, foram devidamente distribuídas em microplacas de 96 poços e postas na incubadora (atmosfera humidificada constituída por 95% de ar e 5% de CO₂ a 37° C, e 100% de umidade relativa).

4.5.1. Teste de Viabilidade e Proliferação Celular por Redução do Corante de Tetrazólio (MTT)

A proliferação/viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT que se baseia na determinação espectrofotométrica do formazan, produto formado pela redução do sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) por células viáveis. Dessa maneira, a quantidade de formazan, de coloração púrpura medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSSMAN, 1983).

Foram realizados três ensaios com MTT, que representam cada placa em tratamento pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. Aproximadamente 5×10^3 células foram colocadas em cada poço das três placas estéreis de 96 poços, para um volume final de 100 μ L de meio α -MEM suplementado com 10% de SFB. Após o período de cada ensaio, o meio foi removido dos poços e as células foram carenciadas por 24h com meio sem soro. Posteriormente, o meio foi aspirado e as células foram estimuladas a sair da fase G0 (fase do ciclo celular onde a célula permanece indefinidamente na intérfase) pelo acréscimo de meio com SFB 10%, na ausência (controle) e na presença dos extratos (50; 100; 150; 200 e 250 μ g/mL). Em seguida, o sal de MTT (1 mg/mL) foi adicionado às células e as placas foram incubadas por mais 4 horas.

Durante este período, o MTT é incorporado às células viáveis (células metabolicamente ativas) e reduzido, havendo, portanto, a deposição de cristais de formazan no citoplasma.

Após o período de 4 horas, o meio foi aspirado, e adicionou-se 100 µL de álcool etílico P.A. para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de placa de 96 poços no comprimento de onda de 570 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo os resultados obtidos por comparação entre as células tratadas e os controles.

4.5.2. Análise da Diferenciação Osteoblástica

Para promover a diferenciação dos pré-osteoblastos MC3T3, foi utilizado um kit com meio de diferenciação osteoblástica (STEMPRO®). Os testes de diferenciação (atividade da fosfatase alcalina (FAL) e grau de mineralização da matriz por coloração von Kossa) foram realizados em placa de cultivo celular de 6 poços. Durante o período de diferenciação, 21 dias, o meio foi trocado duas vezes por semana.

4.5.2.1. Avaliação da Atividade e Quantificação da Fosfatase Alcalina (FAL)

Primeiramente, uma quantia de 5×10^4 células/mL foi adicionada em cada poço da placa de cultivo. Após a adesão celular aos poços, o meio α -MEM foi aspirado em câmara de fluxo e substituído pelo meio de diferenciação acrescidos ou não (controle) do EEC (50, 100 e 150µg). O sobrenadante dos poços foi recolhido nos intervalos de 7, 14 e 21 dias após o início do tratamento, e conservado a -20°C. Os sobrenadantes estocados foram descongelados para serem empregados no ensaio.

A atividade da FAL foi avaliada por meio de um kit comercial fosfatase alcalina liquiform (Labtest, Brasil ref. 79), que otimiza todas as condições da reação, incluindo temperatura, pH, concentração dos reagentes e volume fracional da amostra. O kit traz dois reagentes: o reagente 1 contém tampão pH 10,4, EDTA 2 mmol/L, sulfato de zinco 1,2 mmol/L, acetato de magnésio 2,5 mmol/L e azida sódica 8 mmol/L; o reagente 2 contém p-nitrofenilfosfato 60 mmol/L e fenol 50 mmol/L. Para a realização do teste, os reagentes foram misturados e 1mL do resultante foi posta em cada tubo de hemólise juntamente com 0,02 mL da amostra, no caso, o sobrenadante. Esta solução foi transferida para uma cubeta termostaticada a $37 \pm 0,2$ °C.

Em pH alcalino, a FAL presente na amostra desfosforila o reagente p-nitrofenilfosfato, liberando fosfato inorgânico e p-nitrofenol. Este pode ser monitorado a 405 nm, e a

absorbância gerada pode ser considerada diretamente proporcional à atividade enzimática da FAL. Após 1 minuto de reação, foi feita a leitura da absorbância inicial (A1). No segundo minuto, outra leitura foi feita (A2). A quantificação da FAL é determinada pela fórmula: $(A2 - A1/2) \times FC$, sendo FC o fator de correção calculado para as condições descritas na realização do teste: 2764, e o resultado é expresso em unidades de FAL por litro (U/L).

4.5.2.2. Análise do Grau de Mineralização da Matriz por Coloração von Kossa

O emprego do ensaio descrito por McGee-Russell (1958), permite a visualização de nódulos mineralizados a partir da reação do fosfato de cálcio com o nitrato de prata, formando fosfato de prata, o qual é posteriormente reduzido à prata metálica pela radiação UV. Assim, os nódulos tornam-se facilmente identificáveis ao microscópio como depósitos negros na camada celular.

Cada poço das três placas (sendo uma placa analisada para cada intervalo de tempo de 7, 14 e 21 dias) foi submetido à fixação com paraformaldeído 4% pH 7,4 por 20 minutos. Em seguida, as culturas foram cobertas com uma solução de nitrato de prata a 5% e expostas à radiação solar durante 30 minutos. Depois de lavadas com água destilada, foram recobertas com uma solução de tiosulfato de sódio a 5%, durante 2 minutos, para a remoção do excesso de prata sob a forma não precipitada, sendo novamente lavadas com água destilada.

As células foram contracoradas com uma solução de hematoxilina (1 mg/mL) por 5 minutos, lavadas com água destilada mais uma vez, e cobertas com PBS. Em seguida, a placa foi levada ao microscópio de luz invertida e cada poço foi fotografado para análises comparativas.

4.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão e analisados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste t de Student para os ensaios com MTT e para a quantificação de FAL, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p é inferior a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA

A caracterização fitoquímica evidenciou alto teor de taninos, sendo encontrado o valor de 43,27% equivalentes de catequina. Para polifenóis totais, encontrou-se o valor de 6,57% equivalentes de ácido gálico e, para flavonoides, de 6,24% equivalentes de quercetina.

5.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

5.2.1. Capacidade Antioxidante Total (CAT)

O teste avaliou o potencial antioxidante da amostra em relação ao padrão de ácido ascórbico, a partir da equação da reta aplicada à curva de calibração (coeficiente de correlação: $r^2 = 0,98$): $y = 35,89x - 0,0355$. Esta equação correlaciona a absorbância obtida (eixo y) para cada massa (mg) de ácido ascórbico analisada (eixo x).

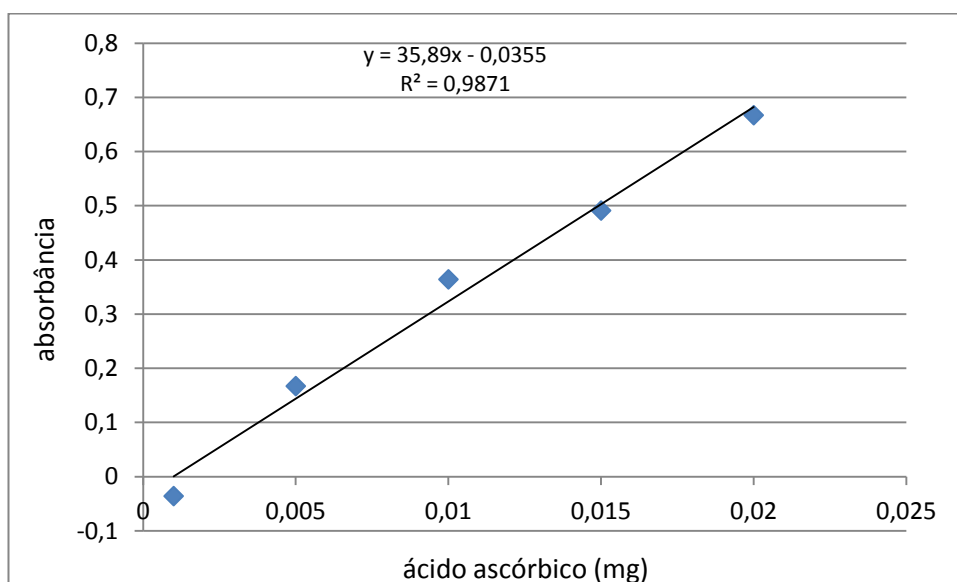


Gráfico 1: Curva de calibração para capacidade antioxidante total de ácido ascórbico

Nesse ensaio, duas massas da amostra (0,1 e 1 mg) foram testadas em triplicata. Os valores espectrofotométricos obtidos estão discriminados na Tabela 3.

Tabela 3: Capacidade antioxidante total do EEC em equivalente de ácido ascórbico

Amostra (mg)	Absorbância da Amostra (Aa)*	Branco da amostra (Ba)	Aa-Ba	Equivalente de ácido ascórbico** (mg/g)
0,1	0,744	0,277	0,467	120
1	2,03	0,372	1,658	-

* Absorbância da amostra refere-se à absorbância obtida para cada massa subtraída da absorbância do branco (apenas os reagentes).

** Para o cálculo de equivalentes de ácido ascórbico, considerou-se (Aa-Ba) como valor de x na equação da reta e o valor em miligrama (mg) foi transformado para grama (g).

Utilizou-se duas massas de amostra para que ao menos uma das absorbâncias correspondentes pudesse ser válida para o cálculo do equivalente. Para ser válida, deve estar dentro da faixa de absorbâncias obtida para a curva de ácido ascórbico. Pressupõe-se que para um bom antioxidante, apenas a absorbância para a menor massa estará dentro dessa faixa. Como para 1mg da amostra, a absorbância obtida não foi válida para o cálculo do equivalente, o mesmo foi realizado para a massa de 0,1 mg. A partir desse valor, foi verificado que 1g da amostra tem CAT equivale à 120mg de ácido ascórbico.

5.2.2. Atividade Redutora

A partir da plotagem da curva de calibração (Gráfico 2), foi possível elucidar a massa de ácido ascórbico na qual se obteve a maior absorbância, definindo-a como referência. Os resultados estão expressos como sendo a porcentagem de redução que a amostra obteve em suas diferentes massas em relação a esse referencial. Assim, a absorbância de 0,843, obtida para a massa de 0,05mg de ácido ascórbico, representa 100% de redução.

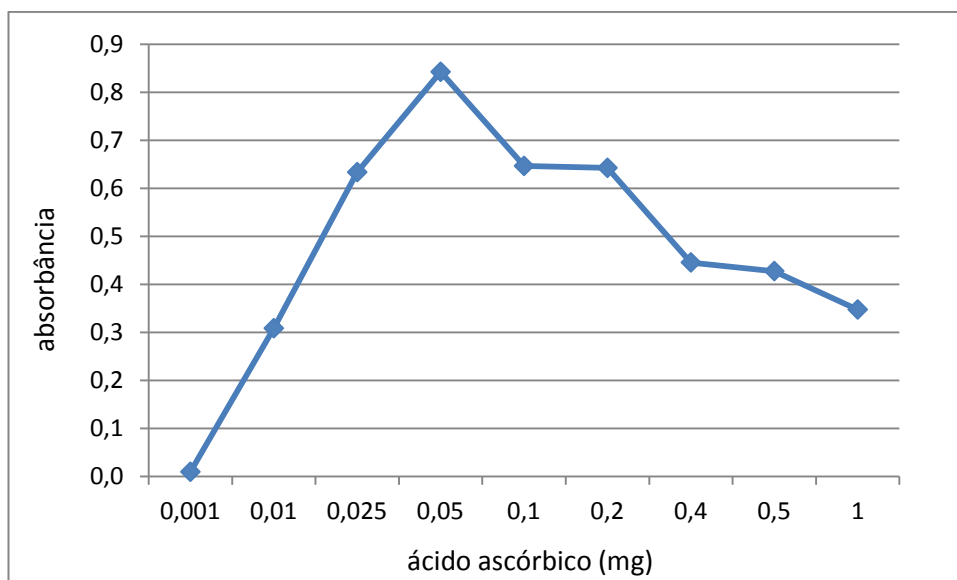


Gráfico 2: Curva de calibração para atividade redutora de ácido ascórbico.

A partir do referencial obtido, os equivalentes para cada massa da amostra analisada foram calculados (Gráfico 3).

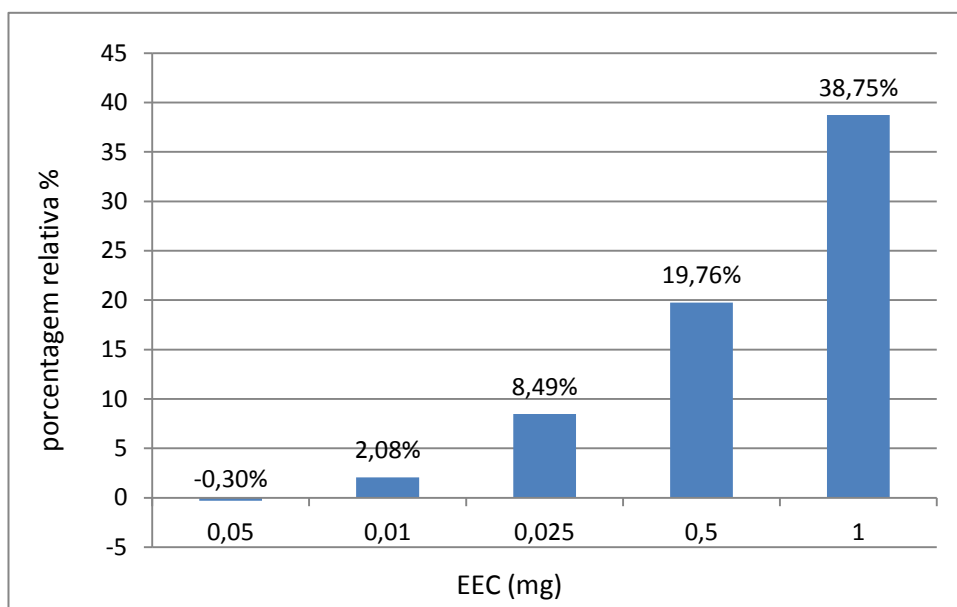


Gráfico 3: Porcentagem relativa para a atividade redutora do EEC.

A atividade redutora do EEC mostrou-se dose dependente, tendo potencial de redução equivalente de 38,75% na massa de 1mg.

5.2.3. Sequestro de Radicais Superóxido

Nesse ensaio, a porcentagem de sequestro de radicais O_2^- foi estabelecida a partir dos dados obtidos para a amostra em análise, para o controle, que representa 100% de redução pela ausência de antioxidante, e para o branco que equivale a 100% de sequestro, a partir da fórmula:

% sequestro = $(Ac - Aa)/(Ac - Ab)$; sendo Ac a absorbância do controle, Aa a absorbância da amostra, e Ab a absorbância do branco. Os resultados obtidos foram dose-dependente e estão discriminados no Gráfico 4.

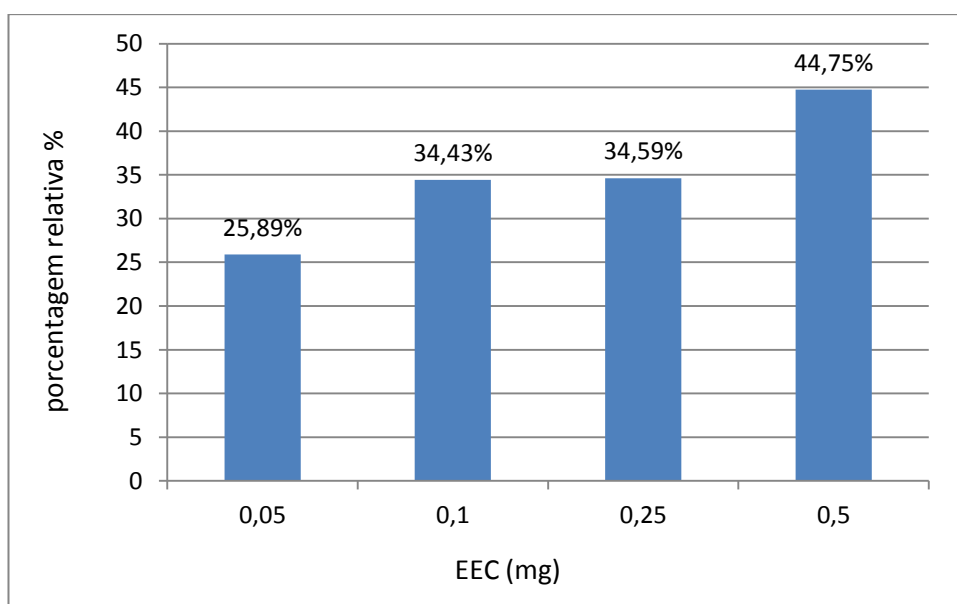


Gráfico 4: Porcentagem relativa para o sequestro de radicais superóxido pelo EEC.

5.2.4. Quelação Cúprica

A determinação da porcentagem de quelação de íons cobre pela amostra (Gráfico 5) foi estabelecida por comparação ao branco, que simboliza 0% de quelação (máxima absorbância para o violeta monitorada a 632 nm). Para tanto, utilizou-se a seguinte fórmula: $(Ab - Aa)/Ab \times 100$, onde Ab é a absorbância do branco e Aa , absorbância da amostra.

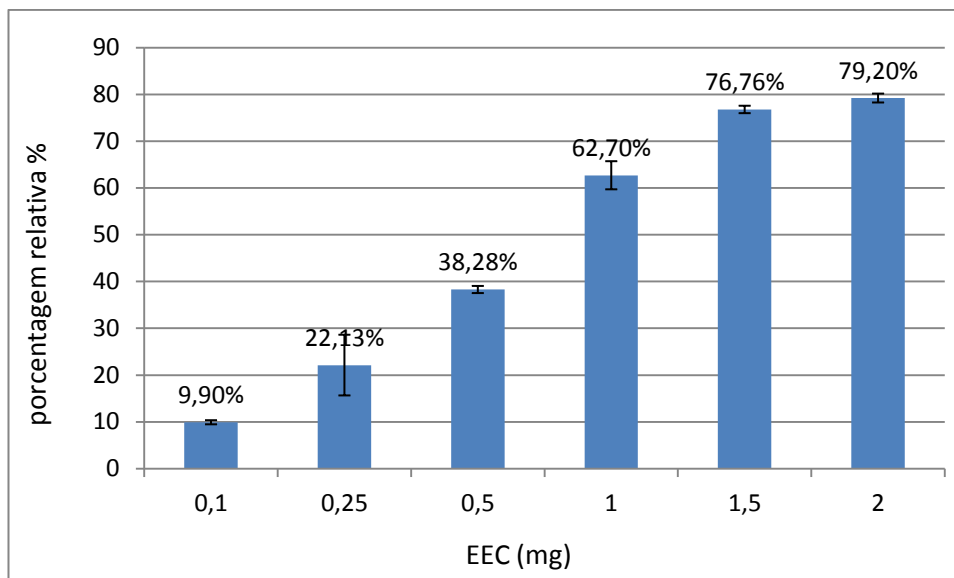


Gráfico 5: Porcentagem relativa de quelação cúprica pelo EEC.

5.3. TESTE DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR POR REDUÇÃO DO CORANTE DE TETRAZÓLIO (MTT)

Nesse ensaio, a viabilidade e proliferação das células tratadas com as concentrações da amostra (50; 100; 150; 200 e 250 µg/mL) foram determinadas por comparação entre as absorbâncias obtidas para os tratamentos em relação às obtidas para os controles (células não tratadas com o EEC). A absorbância obtida para os controles em cada intervalo de tempo, representaram 100% de viabilidade e proliferação daquele período. A porcentagem relativa para os tratamentos foi obtida a partir da fórmula: $(M_t / M_c) \times 100$, sendo M_t , média das absorbâncias para os tratamentos, e M_c , média das absorbâncias para os controles. Assim, valores acima de 100% representam maior quantia de células viáveis, e valores abaixo de 100%, indicam que o tratamento afetou a viabilidade celular.

De acordo com a análise estatística, todos os ensaios mostraram diferenças quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$) nos três testes realizados (24, 48 e 72h), com exceção do tratamento com 250 µg/mL. O Gráfico 6 traz as porcentagens de proliferação obtidas (eixo y) para cada tratamento em cada período de tempo (eixo x), em comparação com os controles obtidos para cada período de tempo.

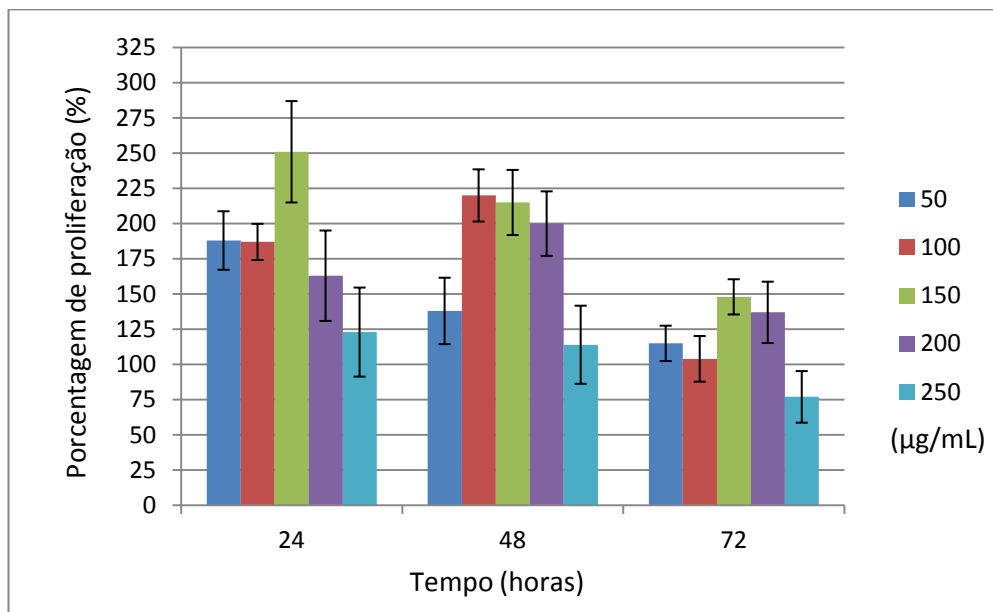


Gráfico 6: Porcentagem de proliferação celular de cada tratamento (concentração do EEC em µg/mL) em relação ao controle para cada período de tempo.

Com base nos resultados, as concentrações de 50; 100 e 150 µg/mL da amostra foram escolhidas para os testes de diferenciação celular.

5.4. DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA FOSFATASE ALCALINA (FAL)

A mudança na coloração do analito, após a adição da amostra aos reagentes, indica a variação quantitativa do produto da atividade enzimática, o p-nitrofeol. Assim, a atividade da fosfatase alcalina (FAL) foi determinada pela diferença das absorbâncias obtidas no intervalo de tempo de um minuto de acordo com a fórmula: $(A_2 - A_1/2) \times FC$, sendo FC o fator de correção calculado para as condições descritas na realização do teste: 2764. O resultado é expresso em unidades de FAL por litro (U/L).

O valor de referência para comparação dos resultados foi o obtido para controle positivo (células tratadas apenas com o meio do kit de diferenciação). O Gráfico 7 traz os valores obtidos para a quantificação da FAL a partir de sua atividade (eixo y) para cada tratamento e para os controles nos três períodos analisados (7, 14 e 21 dias). De acordo com a análise estatística empregada, não houve relevância entre os controles e os tratamentos, nem entre os tratamentos no mesmo dia, nem entre o mesmo tratamento nos diferentes dias ($p > 0,05$).

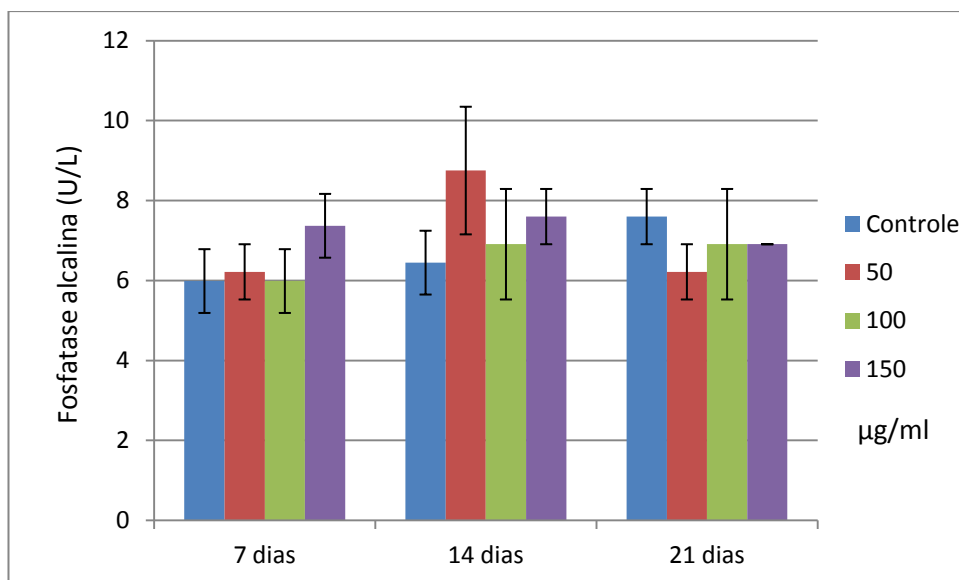


Gráfico 7: Quantificação da fosfatase alcalina para cada tratamento nos períodos de 7, 14 e 21 dias de diferenciação.

5.5. GRAU DE MINERALIZAÇÃO DA MATRIZ POR COLORAÇÃO VON KOSSA

O grau de mineralização da MEC formada pelas células em cultura é refletido pela área mineralizada identificável ao microscópio invertido após o tratamento com nitrato de prata pelo método de coloração von Kossa. As fotomicrografias foram obtidas para os períodos de 7, 14 e 21 dias após o início do tratamento para diferenciação osteoblástica.

As imagens obtidas para o período de 7 dias serviram como controle negativo já que nesse período, as células MC3T3 estão em fase de maturação da MEC. É possível, portanto, observar apenas células em semiconfluência (Figura 6).

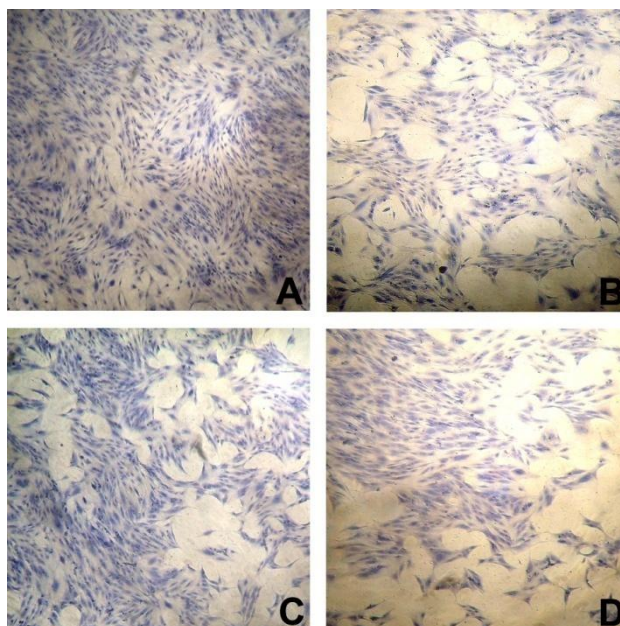


Figura 6: Fotomicrografia de culturas de células MC3T3 ao 7º dia de tratamento com EEC, coradas pela técnica de von Kossa. (microscópio invertido 40x). A: Controle; B: 50 µg/mL; C: 100 µg/mL; D: 150 µg/mL

No período de 14 dias também não foi observada a presença de nódulos mineralizados em nenhum dos tratamentos, nem para o controle (Figura 7).

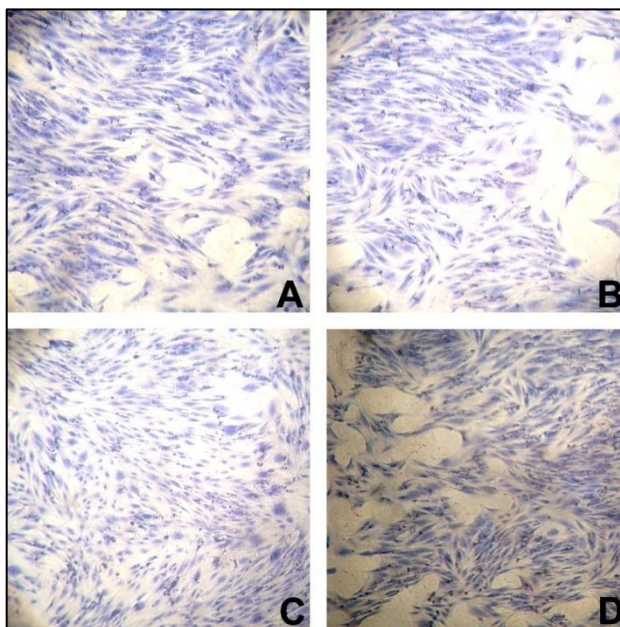


Figura 7: Fotomicrografia de culturas de células MC3T3 ao 14º dia de tratamento com EEC, coradas pela técnica de von Kossa. (microscópio invertido 40x). A: Controle; B: 50 µg/mL; C: 100 µg/mL; D: 150 µg/mL.

Aos 21 dias, algumas regiões foram coradas, indicando a presença de fosfato de cálcio no meio, no entanto, os típicos nódulos mineralizados não foram identificados (Figura 8).

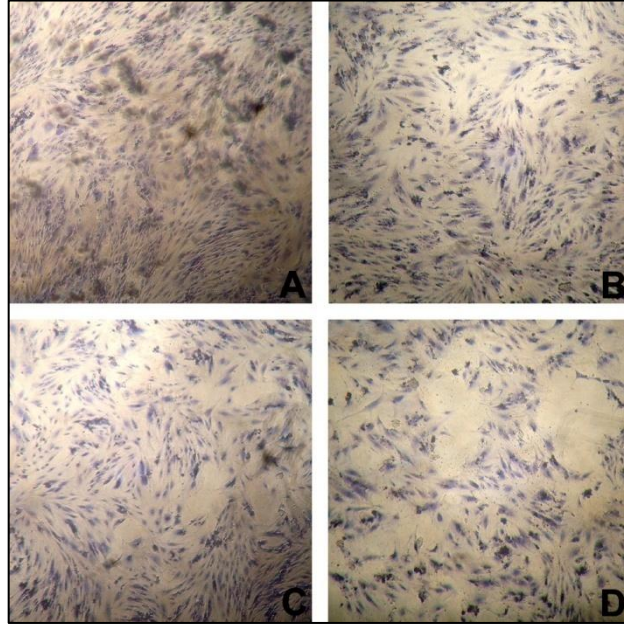


Figura 8: Fotomicrografia de culturas de células MC3T3 ao 21º dia de tratamento com EEC, coradas pela técnica de von Kossa. (microscópio invertido 40x). A: Controle; B: 50 µg/mL; C: 100 µg/mL; D: 150 µg/mL

6. DISCUSSÃO

Apesar de a *C. ambrosioides* ser amplamente utilizada na medicina tradicional (LORENZI, MATOS, 2002) e ser reconhecidamente um vegetal com compostos bioativos com potencial farmacológico (BRASIL, 2009), a literatura permanece escassa em relação aos dados que comprovem cientificamente suas propriedades biológicas e farmacológicas. Dentre as várias indicações terapêuticas na medicina tradicional, o mastruz tem sido utilizado para tratar lesões ósseas (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; MORAIS, *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006), e alguns estudos comprovaram sua eficácia *in vivo* (PINHEIRO NETO, 2005; SOUSA, 2010), sugerindo a existência de compostos nesta planta com potencial para o desenvolvimento de agentes farmacológicos para o tratamento de lesões ou doenças que afetem a integridade óssea.

O conhecimento do metabolismo ósseo também direciona a busca de alternativas farmacológicas. Sabe-se, por exemplo, que o estresse oxidativo condiciona fisiopatologias do tecido ósseo (WAUQUIER *et al.* 2009; OZGOCMEN *et al.*, 2007), o que tem motivado investigações científicas de substâncias com potencial antioxidante. Nesta perspectiva, as substâncias naturais ganham destaque, em função do seu potencial redutor e neutralizador de radicais livres (PIETTA, 2000; NORDBERG; ARNÉR, 2001; RASTOGI *et al.*, 2010). Neste estudo, os testes para avaliação do potencial antioxidante do EEC apontaram pronunciada atividade antioxidante, principalmente para a capacidade antioxidante total (CAT de 120mg equivalentes de ácido ascórbico) e quelação de íons cobre (79,2% de quelação relativa ao EDTA).

Compostos antioxidantes têm ação direta ou indireta no metabolismo ósseo. Eles podem interferir no recrutamento de células osteoprogenitoras, favorecer a diferenciação e função osteoblástica (ALMEIDA *et al.*, 2007), mas principalmente, atenuam a diferenciação osteoclástica e diminuem o tempo de sobrevivência dessas células (LEE *et al.*, 2005; HA *et al.*, 2004). Assim, a *C. ambrosioides* pode ter um potencial antirreabsortivo que necessita ser investigado. Já foi verificado que a *C. ambrosioides* possui um composto fenólico antioxidante de efeito antirreabsortivo, denominado campferol (ARISAWA *et al.*, 1971). Pang *et al.* (2006) demonstraram que essa molécula tem efeito dose dependente na produção de TNFs, das citocinas interleucina-6 (IL-6) e da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1/CCL2) por osteoblastos, que influenciam a maturação e atividade osteoclástica. Em outro

estudo, Choi (2011) comprovou o potencial protetor do campferol ao estresse oxidativo em células MC3T3.

Nesse estudo, foi realizada uma triagem inicial para determinação do teor de polifenóis, flavonoides e taninos, e verificou-se que todas essas classes de compostos estão bem representadas, mas não são majoritárias, ratificando outros estudos que comprovam que os terpenos são os principais metabólitos dessa planta (GBOLADE *et al.*, 2010; GILLE *et al.*, 2010; KOBAYASHI *et al.*, 2009). No entanto, confirmar a presença de flavonoides e polifenóis foi importante no sentido de essas moléculas serem os principais compostos antioxidantes em vegetais (SOARES, 2002). Além disso, os taninos frequentemente são relacionados ao processo de cicatrização (LOPES *et al.*, 2005).

Além do potencial antioxidante foi analisado o potencial anabólico do extrato da *C. ambrosioides*. Para esse fim, foram utilizados métodos com culturas de células. Ao utilizar este método para testar compostos, inicialmente, é importante conhecer o grau de toxicidade e solubilidade dos mesmos e sua interferência na proliferação e morfologia da linhagem celular escolhida (PERES, CURI, 2005). A avaliação desses parâmetros caracteriza o estudo da viabilidade do emprego desses compostos em cultura. Neste estudo, utilizou-se o ensaio do MTT, por constituir um método simples e eficaz para avaliar a viabilidade e proliferação celular (MOSSMAN, 1983). O emprego dessa metodologia é importante, uma vez que define as concentrações a serem empregadas nos testes de diferenciação celular.

As diferentes concentrações do EEC não apresentaram citotoxicidade e estimularam a proliferação de osteoblastos, com exceção da concentração de 250 µg/mL, que não apresentou relevância estatística quando comparada ao controle em nenhum dos períodos. Vale ressaltar que foi observada uma acentuada proliferação das células submetidas aos demais tratamentos, chegando a quase triplicar a população celular na concentração de 150 µg/mL nas primeiras 24h (crescimento de 251%). Esses resultados sugerem que o EEC é capaz de acelerar e estimular a proliferação de pré-osteoblastos, essencial para a primeira fase da cicatrização e da remodelação óssea (CHOI *et al.*, 1996; QUARLES *et al.*, 1992; SUDO *et al.*, 1983). Com base nos melhores resultados do ensaio do MTT, as doses de 50, 100 e 150 µg/mL foram escolhidas para o ensaio de diferenciação celular.

Primeiramente, a atividade da fosfatase alcalina (FAL) foi avaliada. Esta enzima está associada ao processo de mineralização da matriz extracelular, mas sua ação é máxima na segunda fase da diferenciação osteoblástica, uma vez que é responsável pela maturação da matriz, que posteriormente será mineralizada (GOLUB; BOESZE-BATAGLIA, 2007; LIAN; STEIN, 1992). Nesse sentido, a FAL promove a hidrólise de fosfatos orgânicos (no caso das

culturas celulares, o β -Glicerofosfato) aumentando a concentração de íons fosfato que, juntamente com os íons cálcio (presentes no meio circundante), promovem a formação de depósitos de fosfato de cálcio durante a subsequente mineralização da matriz (TER BRUGGE; JANSSEN, 2002; HUANG *et al.*, 2002; IM *et al.*, 2005). Por apresentar esse papel central, e pela facilidade de doseamento bioquímicos e histológicos, a FAL tornou-se o marcador de escolha na avaliação do fenótipo ou maturação do desenvolvimento de células de tecidos mineralizados (GOLUB; BOESZE-BATTAGLIA, 2007).

Os resultados indicam que o mecanismo de ação do EEC não deve estar diretamente relacionado com a diferenciação osteoblástica, uma vez que não houve diferenças expressivas na quantificação de FAL pelas células submetidas aos tratamentos em comparação com os controles, nem foi possível observar nódulos mineralizados ao 21º dia. Esses resultados não confirmam a hipótese do potencial osteoindutor da *C. ambrosioides*, embasada na medicina tradicional, onde esta planta é utilizada topicamente em lesões ósseas, com o intuito de acelerar o processo de regeneração (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; PINHEIRO NETO, 2005; MORAIS, *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006). Apesar de não ser uma prática disseminada no Brasil, na cultura chinesa, extratos vegetais são comumente usados topicamente há mais de 3000 anos para a mesma finalidade, e os resultados são comprovadamente benéficos (PENG *et al.*, 2010).

A formação de uma matriz mineralizada traduz a expressão completa do fenótipo osteoblástico (DENG *et al.*, 2008; HAYAMI *et al.*, 2007; WEINZIERL *et al.*, 2006). O método da coloração von Kossa é simples e permite a visualização dos nódulos mineralizados em cultura de células (MOSSMAN, 1983). No entanto, não foi possível a visualização desses nódulos em nenhum dos grupos (teste e controle), indicando que não houve mineralização eficaz da matriz. No período de 21 dias após o início do tratamento para diferenciação celular, o grupo controle apresentou discretas manchas acinzentadas, que podem representar o início da formação nodular. As células MC3T3 levam aproximadamente 21 dias para se diferenciar e podem apresentar nódulos mineralizados a partir da segunda semana de diferenciação (QUARLES *et al.*, 1992; FRANCESCHI; IYER, 1992), no entanto, mais tempo pode ser requerido para uma mineralização mais pronunciada. Sudo *et al.* (1983) observaram as pequenas formações nodulares aos 21 dias de tratamento para diferenciação das células MC3T3, sendo a matriz majoritariamente orgânica nessa fase; apenas após 24 dias, os nódulos tornaram-se mais pronunciados, mas com fácil identificação, após 40 dias de tratamento.

O enfoque para a atividade osteoindutora foi dado pelo fato de ser a ação mais eficaz no tratamento de problemas ósseos. Apesar de hodiernamente a maioria dos tratamentos para a

osteoporose serem baseados em agentes antirreabsortivos (FENG; McDONALD, 2011; NIH, 2000), já se tem evidências de que a função osteoblástica aumentada poderia ser mais promissora (CRANNEY *et al.*, 2002a, b; LERNER, 2006).

Embora os resultados não confirmem a ação osteoindutora do EEC, não se deve excluir a possibilidade de o mesmo ser eficaz para a saúde óssea na regeneração de lesões ósseas e/ou na manutenção/recuperação da massa óssea normal. Mesmo que a atividade antioxidante seja correlacionada ao combate ao estresse oxidativo de fato benéfico à saúde óssea, EROs em baixas concentrações também agem como moduladores tanto para osteoclastos quanto para osteoblastos. Em osteoblastos, foi verificado que BMPs geram EROs importantes para a ativação da FAL (MANDAL *et al.*, 2011), bem como que as MAPK são induzidas por EROs (GREENBLATT *et al.*, 2010).

Sendo assim, uma vez que as células em tratamento no presente estudo não estavam sob tal condição de estresse oxidativo, a presença de um forte antioxidante pode ter interferido negativamente na diferenciação osteoblástica, como observou Arakaki *et al.* (2013). Neste recente estudo, os autores verificaram que as células MC3T3-E1 incubadas na presença de antioxidantes N-acetil-cisteína, nas quais a produção de EROs foi suprimida significativamente, a mineralização também foi suprimida, ratificando que as EROs desempenha um papel importante na regulação da diferenciação osteoblástica. Assim, talvez a avaliação de concentrações menores pudesse apresentar resultados positivos na diferenciação mesmo que estas não tivessem influenciado significativamente no processo de proliferação verificado pelo ensaio do MTT.

Além disso, compostos podem influenciar positivamente a saúde óssea de diferentes maneiras. Alguns são capazes de promover o efeito anabólico, atuando na linhagem osteoblástica, estimulando a proliferação, a diferenciação e a mineralização, outros apresentam efeito anticatabólico, atuando na diferenciação e função dos osteoclastos.

Compostos prontamente pro-angiogênicos ou analgésicos, por exemplo, também são úteis para o processo de regeneração de lesões ósseas (PENG *et al.*, 2010), apesar de não serem eficientes para o tratamento/prevenção de doenças metabólicas como a osteoporose. Isso se explica pelo fato de a regeneração de uma lesão óssea ser complexa e ter várias etapas (KENLEY *et al.*, 1993). Assim, *C. ambrosioides*, além de promover a pronunciada proliferação celular, importante no processo de cicatrização, pode agir nesse sentido ou ter influência em processos que não foram passíveis de análise por meio da metodologia empregada nesse estudo.

7. CONCLUSÃO

O extrato etanólico das folhas de *C. ambrosioides* mostrou ser um potente antioxidante, mas não apresentou poder osteoindutor verificável pela metodologia empregada nesse estudo. Assim, para comprovar a eficácia dessa planta para a saúde óssea, outros estudos devem ser realizados. A confirmação de seu benefício *in vivo* para a cicatrização de fraturas e para o poder angiogênico no local da lesão deve ser seguida pela avaliação *in vitro* da atividade antirreabsortiva e mesmo osteoindutora, considerando-se outras metodologias e concentrações.

8. REFERÊNCIAS

AELLEN, P.; JUST, T. Key and synopsis of the American species of the genus *Chenopodium* L. **American Midland Naturalist**, v. 30, p.47-76, 1943

AGAS, D.; MARCHETTI, L.; CAPITANI, M.; SABBieti, M. G. The dual face of parathyroid hormone and prostaglandins in the osteoimmune system. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 2013

ALEXANDRE, R. F.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia Baseada em Evidências. Parte 1. Medicamentos Fitoterápicos Elaborados com *Ginkgo*, *Hipérico*, *Kava* e *Valeriana*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 9, 2005

ALMEIDA, M.; HAN, L.; MARTIN-MILLAN, M.; O'BRIEN, C. A.; MANOLAGAS, S. C. Oxidative stress antagonizes wnt signaling in osteoblast precursors by diverting β -catenin from T cell factor to forkhead box O-mediated transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 27298-305, 2007.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. v. 3, p.1-15, 2001

ANDERSEN, T. L.; SONDERGAARD, T. E.; SKORZYNSKA, K. E.; DAGNAES-HANSEN, F.; PLESNER, T. L.; HAUGE, E. M.; PLESNER, T.; DELAISSE, J. M. A Physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, 2009

APG III. Uma atualização da classificação Grupo de Filogenia Angiospermas para as ordens e famílias de plantas com flores. APG III. Bot. J. Linn. Soe. v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.

ARAKAKI, N.; YAMASHITA, A.; NIIMI, S.; YAMAZAKI, T. Involvement of reactive oxygen species in osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells accompanied by mitochondrial morphological dynamics. **Biomedical Research**, v. 34, n. 3, p. 161-166, 2013.

ARISAWA, M.; MINABE, N.; SAEKI, R.; TAKAKUWA, T.; NAKAOKI, T.. Studies on unutilized resources. V. Components of the flavonoids in *Chenopodium* genus plants. 1. Flavonoids of *Chenopodium ambrosioides*. **Yakugaku Zasshi**. v. 91, n. 5, p. 522-524, 1971

ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p.1065-1074, 2006

BAI, X. C.; LIU, A. L.; ZHANG, Z. M.; LI, X. M.; ZOU, Z. P.; ZENG, W. S.; CHENG, B. L.; LUO, S. Q. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. **Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 17, p. 17497-17506, 2005.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell.**; v. 120, p. 483–95, 2005.

BARON, R. Molecular mechanisms of bone resorption: therapeutic implications. **Revue du rhumatisme (English ed.)** v. 63, n. 10, p. 633-8, 1996.

BISKOBING, D. M.; FAN, X.; RUBIN, J. Characterization of MCSF-induced proliferation and subsequent osteoclast formation in murine marrow culture. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, p. 1025-1032, 1995.

BLACKWELL, K. A.; RAISZ, L. G.; PILBEAM, C. C. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 21, n. 5. P. 294-301, 2010.

BONUCCI, E. New knowledge on the origin, function and fate of osteoclasts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 158, p. 252-261, 1981.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Tropical Plant Pathology**. Brasília, v.36 n.1, 2011.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. RENISUS - **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 2009.

BRASIL. **Política Nacional de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRAYBOY, J. R.; CHEN, X. W.; LEE, Y. S.; ANDERSON, J. J. B. The protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) against free radical damage to osteoblast-like bone cells (MC3T3-E1) and the proliferative effects of EGb 761 on these cells. **Nutrition Research**. v. 21, p. 1275–1285, 2001.

BUTTON, M. L.; SPRAGUE, S.; GHARSAA, O.; LaTOUCHE, S.; BHANDARI, M. Economic evaluation of bone stimulation modalities: **A systematic review of the literature**. v. 43, n. 2, p. 168-174, 2009.

CALIXTO, R. F. E.; LAMANO CARVALHO, T. L.; TEÓFILO, L. G. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. **Pesquisa Odontológica Brasileira**; v. 15, n. 3, p. 257-262, 2001.

CAO, Y.; ZHOU, Z.; CROMBRUGGHE, B.; NAKASHIMA, K.; GUAN, H.; DUAN, X.; JIA, S. F.; KLEINERMAN, E. S. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. **Cancer Research**. v. 65, n.4, 2005.

CAROFINO, B. C.; LIEBERMAN, J. R. Gene therapy applications for fracture-healing. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 90, p. 99–110, 2008.

CARVALHO, B. S. A. S. **Influência dos antioxidantes na regeneração óssea**. Dissertação de mestrado, Universidade do Porto, 2013.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v.8 n.3 Salvador, 2004.

CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHEN, L.; LEI, L.; DING, P.; TANG, Q.; WU, Y. Osteogenic effect of *Drynariae rhizoma* extracts and *Naringin* on MC3T3-E1 cells and an induced rat alveolar bone resorption model. **Archives of Oral Biology**, v.56, p. 1655 – 1662, 2011.

CHIAPASCO, M; ROMEO, E. **Cirurgias pré implantes nas atrofia maxilares**. In: Reabilitação oral com prótese implantossuportada para casos complexos. São Paulo: Santos. Cap. 3, p.131-160, 2007.

CHIN, A.; YANG, Y.; CHAI, L.; WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Effects of medicinal herb *Salvia Miltiorrhiza* on osteoblastic cells *in vitro*. **Journal of Orthopaedic Research**, 2011.

CHOI, J. Y.; LEE, B. H.; SONG, K. B.; PARK, R. W.; KIM, I. S.; SOHN, K. Y.; JO, J. S.; RYOO, H. M. Expression patterns of bonerelated proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 61, n. 4, p. 609-18, 1996.

CHOI, E. M. KIM, G. H.; LEE, Y. S. *Atractylodes japonica* root extract protects osteoblastic MC3T3-E1 cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1537–1542, 2009.

CHOI, E. M. The licorice root derived isoflavan glabridin increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochemical Pharmacology**. v.70, p. 363–368, 2005.

CHOI, E. M.; SUH, K. S.; KIM, Y. S.; CHOUE, R. W.; KOO, S. J. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Phytochemistry**. v. 56, 2001.

COELHO, M. J.; CABRAL, A. T.; FERNANDES, M. H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. **Biomaterials**. v. 21, p. 1087-1094, 2000a.

COELHO, M. J.; FERNANDES, M. H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. **Biomaterials**. v. 21, p. 1095-1102, 2000b.

COOPER, P. R.; TAKAHASHIA, Y.; GRAHAMA, L. W.; SIMONA, S.; IMAZATOB, S.; SMITH, A. J. Inflammation–regeneration interplay in the dentine–pulp complex. **Journal of Dentistry**. 38, n. 9, p. 687–697, 2010.

CRANNEY, A.; TUGWELL, P.; ADACHI, J.; WEAVER, B.; ZYTARUK, N.; PAPAIOANNOU, A.; ROBINSON, V.; SHEA, B.; WELLS, G.; GUYATT, G. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. III. Meta-analysis of risedronate for the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 517–523, 2002b.

CRANNEY, A.; WELLS, G.; WILLAN, A.; GRIFFIT, L.; ZYTARUK, N.; ROBINSON, V.; BLACK, D.; ADACHI, J.; SHEA, B.; TUGWELL, P.; GUYATT, G. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal women. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 508–516, 2002a.

CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; PATRÍCIO, F. J.; COSTA, G. C.; SOUSA, S. M.; FRAZÃO, J. B.; ARAGÃO-FILHO, W. C.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M. M.; BARROQUEIRO, E. S. B.; GUERRA, R. N. M.; NASCIMENTO, F. R. F. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 148–154, 2007.

CUMMINGS, S. R.; MELTON, L. J. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. **The Lancet**, v. 18, 2002.

DAHABREH, Z.; CALORI, G. M.; KANAKARIS, N. K.; NIKOLAOU, V. S.; GIANNOUDIS, P. V. A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7 **International Orthopaedics**, v. 33 p. 1407–1414, 2009.

DASGUPTA, N. DE, B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 88, p. 219–224, 2004.

DECLERCQ, H.; VAN de VREKEN, N.; De MAYER, E.; VERBEECK, R.; SCHACHT, E.; De RIDDER, L.; CORNELISSEN, M. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. **Biomaterials**, v. 25, p. 757-768, 2004.

DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; MICHEL, G.; MARQUIER-VIÑUALES, C.; BESSIÈRE, J. M. The antifungal activity of oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 2, p. 256-66, 2000.

DENG, C. H.; SUN, X. Z.; GAO, Y.; LUO, D. S.; LIU, G. H.; HUANG, Y. P. An experimental study of the culture, isolation and biological characteristics of rat adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*. **Zhonghua Nan Ke Xue**, v.14, n. 2 p. 99-105, 2008.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais da Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Editora UnESP, 2002.

DIAS, M. I. R. **Regeneração Óssea - Efeito do volume ou da associação ao plasma enriquecido em plaquetas nas propriedades osteogênicas do enxerto de osso esponjoso autólogo. Estudo dos marcadores bioquímicos de formação óssea durante o processo de cicatrização das fraturas ósseas**. Dissertação de Doutorado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2004.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v.36, p.1392-1404, 2005.

DODD, J. S.; RALEIGH, J. A.; GROSS, T. S. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway. **American Journal of Physiology**, 1999.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

EAGLE, H., Nutrition needs of mammalian cells in culture. **Science**, v. 122, p. 501, 1955.

EVERTS, V; DELAISSE, J. M.; KORPER, W. D. C; JANSEN,, W.; TIGCHELAAR-GUTTER, P.; SAFTIG; W.; BEERTSEN. The bone lining cell: its role in cleaning howship's lacunae and initiating bone formation. **Journal of Bone and Mineral Research**; 17 :77–90. 2002.

FEI, Y.; XIAO, L.; DOETSCHMAN, T.; COFFIN, D. J.; HURLEY, M. M. Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway. *J Biol Chem*. 2011.

FENG , X. ; McDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 121–145. 2011.

FERGUNSON, C.; ALPERN, E.; MICLAU, T.; HELMS, J. A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mechanisms Development*. **Limerick**, v. 87, p. 57-66, 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLORE, R.; PONZIANI, F. R.; DI RIENZO, T. A.; ZOCCO, M. A.; FLEX, A.; GERARDINO, L.; LUPASCU, A.; SANTORO, L.; SANTOLIVU, A.; DI STASIO, E.; CHIERICI, E.; LANTI, A.; TONDI, P.; GASBARRINI, A. Something more to say about calcium homeostasis: the role of vitamin K2 in vascular calcification and osteoporosis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 18, p. 2433-40, 2013.

FORMAN, H. J.; FUKUTO, J. M.; TORRES, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 287, p. 246–256, 2004.

FRANCESCHI, R. T.; IYER, B. S. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 2, 1992.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique**. 4. ed. New York: Wiley-liss, 2000.

FRIEDENSTEIN, A. J. CHAILAKHYAN R. K. Bone marrow osteogenic stem cells: *In vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 20, p. 263-272, 1987.

FULLER, G. F. Falls in the elderly. **American Family Physician**. Apr 1;61(7):2159-68, 2173-4. 2000.

FULLER, K.; WONG, B.; FOX, S.; CHOI, Y.; CHAMBERS, T. J. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 5, p. 997-1001, 1988.

GARCÍA-MARTÍN, A.; CHARNECO, M. Q.; GUISADO, A. A.; MOLEÓN J. J. J.; JOYA, J. F.; MUÑOZ-TORRES, M. Effect of milk product with soy isoflavones on quality of life and bone metabolism in postmenopausal Spanish women: randomized trial. **Medicina Clínica (Barcelona)**, v. 138, n. 2, p. 47-51, 2012.

GARRETT, I. R.; BOYCE, B.F.; OREFFO, R. O.; BONEWALD, L.; POSER, J.; MUNDY, G. R. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, p. 632–639, 1990.

GBOLADE, A. A.; TIRA-PICOS, V.; NOGUERIA, J. M. F. Chemical constituents of *Chenopodium ambrosioides* var. anthelminticum herb essential oil from nigeria. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 46, n. 4, 2010.

GE, C.; XIAO, G.; JIANG, D.; FRANCESCHI, R. T. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 5, p. 709-18, 2007.

GENESER, F. **Histologia: Com bases biomoleculares**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 632, 2003.

GERSTENFELD, L. C.; ALKHIARY, Y. M.; KRALL, E. A.; NICHOLLS, F. H.; STAPLETON, S. N.; FITCH, J. L. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. Baltimore, v. 54, p. 1215-1228, 2006.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L.; GRAVES, D. T.; EINHORN, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulations. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.88, p.873-884, 2003a.

GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 88, n. 5, p. 873-884, 2003b.

GILLE, L.; MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K. Toxicity of ascaridole from *Chenopodium ambrosioides* in mammalian mitochondria. **BMC Pharmacology**, 2010.

GOLUB, E. E.; BOESZE-BATTAGLIA, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. **Basic Science**, 2007.

GREENBLATT, M. B.; SHIM, J. H.; ZOU, W.; SITARA, D.; SCHWEITZER, M.; HU, D.; LOTINUN, S.; SANO, Y.; BARON, R.; PARK, J. M.; ARTHUR, S.; XIE, M.; SCHNEIDER, M. D.; ZHAI, B.; GYGI, S.; DAVIS, R.; GLIMCHER, L. H. The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 2457–2473, 2010.

HA, H.; KWAK, H. B.; LEE, S. W.; JIN, H. M.; KIM, H. M.; KIM, H. H.; LEE, Z. H. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. **Experimental Cell Research**, v. 301, n 2, p. 119-27, 2004.

HAUGE, E. M.; QVESEL, D.; ERIKSEN, E. F.; MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, 2001.

HAYAMI, T.; ZHANG, Q.; KAPILA, Y.; KAPILA, S. Dexamethasone's enhancement of osteoblastic markers in human periodontal ligament cells is associated with inhibition of collagenase expression. **Bone**, v. 40, p. 93-104, 2007.

HMAMOUCI, M.; LAHLOU, M.; AGOUMI, A. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 71, 2000.

HUANG, J. I.; BEANES, S. R.; ZHU, M.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H.; BENHAIM, P. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 109, n. 3, p. 1033-1041, 2002.

HUANG, W.; YANG, S.; SHAO, J.; LI, Y. P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. **Frontiers in Bioscience**, 2007.

IGNÁCIO, H.; MAZZER, M.; BARBIERI, C. H.; CHIERICE, G. O. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 37, n. 5, 2002.

IM, G.; SHIN, Y.; LEE, K. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrowderived cells? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, p. 845-853, 2005.

JEONG, H. M.; HAN, E. H.; JIN, Y. H.; CHOI, Y. H.; LEE, K. Y.; JEONG, H. G. Xanthohumol from the hop plant stimulates osteoblast differentiation by RUNX2 activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, 2011.

JEONG, J. C.; LEE, J. W.; YOON, C. H.; KIM, H. M.; KIM, C. H. Drynariae Rhizoma promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells through regulation of bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase, type I collagen and collagenase-1. **Toxicology in Vitro**, v. 18, p. 829–834, 2004.

JONAS, W. B.; LEVIN, J. S. **Tratado de medicina complementar e alternativa**. Editora Manole Ltda, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 11. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008.

KALAJZIC, I.; STAAL, A.; YANG, W. P.; WU, Y.; JOHNSON, S. E.; FEYEN, J. H.; KRUEGER, W.; MAYE P, Y. U. F.; ZHAO, Y.; KUO, L.; GUPTA, R. R.; ACHENIE, L. E.; WANG, H. W.; SHIN, D. G.; ROWE, D. W. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 24618-26, 2005.

KANNO, S.; HIRANO, S.; KAYAMA, F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. **Toxicology**, v. 196,p. 137–145, 2004.

KENLEY, R. A.; YIM, K.; ABRAMS J.; RON, E.; TUREK, T.; MARDEN, L. J.; HOLLINGER, J. O. Biotechnology and bone graft substitutes. **Pharmaceutical Research**. v. 10, n. 10, 1993.

KIM, S.; JEONG, J.; CHE, X.; PARK1, Y.; LEE, S.; JUNG, E.; CHOE, S.; CHOI, J. Reconstruction of radial bone defect using gelatin sponge and a BMP-2 combination graft. **BMB Reports**, v. 46, n. 6, p. 328-333, 2013.

KOBA, K.; CATHERINEB, G.; RAYNAUDC, C.; CHAUMONTB, J. P.; SANDAA, K.; LAURENCE, N. Chemical composition and cytotoxic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil from togo. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 44, n. 4, p. 435-440, 2009.

KODAMA, H.; AMAGAI, Y.; SUDO, H.; KASAI, S.; YAMAMOTO, S. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. **Japanese Journal of Oral Biology**, v. 23, p. 899-901, 1981.

KOMORI, T. Cbfa1/Runx2, an essential transcription factor for the regulation of osteoblast differentiation. **Nihon Rinsho**, v. 60, p. 91-7 2002.

KONO, P.; OKUNO, Y.; INADA, K.; TOKUDA, A.; HASHIZUME, H.; YOSHIDA, M.; NAKAMURA, M.; UTSUNOMIYA, H. A *Prunus mume* extract stimulated the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 10, p. 1907–1911, 2011.

KUMAR, R.; MISHRA, A. K.; DUBEY, N. K.; TRIPATHI, Y. B. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 159–164, 2007.

LAGARI, V. S.; LEVIS, S. Phytoestrogens and bone health. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 17, n. 6, p. 546-53, 2010.

LALL, N.; MEYER, J. J. M. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 347-54, 1999.

LAWRENCE, B. M. Progress in essential oils. **Perfumer and flavorist**, v. 24, n. 6, p.45-53, 1999.

LEAN, J. M.; DAVIES, J. T.; FULLER, K.; JAGGER, C. J.; KIRSTEIN, B.; PARTINGTON, G. A.; URRY, Z. L.; CHAMBERS, T. J. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 915–923, 2003.

LEE, K. H.; CHOI, E. M. Stimulatory effects of extract prepared from the bark of *Cinnamomum cassia* blume on the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 952–960, 2006.

LEE, N. K.; CHOI, J. G.; BAIK, J. Y.; HAN, C. Y.; JEONG, D.; SOO, Y. B.; KIM, N.; LEE, S. Y. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 852-859, 2005.

LERNER, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. **Journal of Dental Research**. v. 85, n. 7, p. 584-95, 2006.

LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 3, n. 3, p. 269-305, 1992.

LIMA, M. da S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A.; KANETO, C. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: Evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, p. 112–117, 2013.

LIU, Y. R.; QUA, S. X.; MAITZ, M. F.; TANC, F.; WENG, J. The effect of the major components of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge on bone marrow cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 573–583, 2007.

LONG, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 27, n. 3, p. 677-90, 2001.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; HERNANDES, L. de MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 542 p., 2002.

LU, Z.; WANG, W.; DUNSTAN, C. R.; CHEN, Y.; LU, W. Y.; DAVIES, B.; ZREIQAT, H. Activation and promotion of adipose stem cells by tumour necrosis factor-alpha preconditioning for bone regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 8, p. 1737-1744, 2013.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MACKINNON, E. S.; RAO, A. V.; JOSSE, R. G.; RAO, L. G. Supplementation with the antioxidant lycopene significantly decreases oxidative stress parameters and the bone resorption marker N-telopeptide of type I collagen in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 4, p. 1091-101, 2011.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MANDAL, C. C.; GANAPATHY, S.; GORIN, Y.; MAHADEV, K.; BLOCK, K.; ABOUD, H. E.; HARRIS, S. E.; GHOSH-CHOUDHURY, G.; GHOSH-CHOUDHURY, N. Reactive oxygen species derived from Nox4 mediate BMP2 gene transcription and osteoblast differentiation. **Biochemical Journal**, v. 433, p. 393-402, 2011.

MARIA, P. P.; PADILHA FILHO, J. G.; CASTRO, M. B. Análise macroscópica e histológica do emprego da poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicada na tíbia de cães em fase de crescimento. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 4, 2003.

MARTIN, T. J.; UDAGAWA, N. Hormonal regulation of osteoclast function. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 6-12, 1998.

MARTIN, T. J., FINDLAY, D. M., HERTH, J. K. NG, K.W. Osteoblasts: Differentiation and function. In: Edts. MUNDY, G. R.; MARTIN, T. J. **Handbook of experimental pharmacology**, Springer-Verlag:. Berlin, v. 107, p. 149-183, 1993.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2 p. 201-9, 2008.

McGEE-RUSSELL, S. M. Histochemical methods for calcium. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 6, n. 1, p. 22-42, 1958.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUлма, O. G.. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents; In: Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MELHUS, H.; MICHAELSSON, K.; HOLMBERG, L.; WOLK, A.; LJUNGHALL, S. Smoking, antioxidant vitamins and risk of hip fracture. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, p. 129-135, 1999.

MIURA, M.; CHEN, X. D.; ALLEN, M. R.; BI, Y.; GRONTHOS, S.; SEO, B. M.; LAKHANI, S.; FLAVELL, R. A.; FENG, X. H.; ROBEY, P. G.; YOUNG, M.; SHI, S. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.114, n 12,p. 1704-13, 2004.

MOGI, M.; TOGARI, A. Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 48, p. 47477-82, 2003.

MOON, R. T.; BOWERMAN, B.; BOUTROS, M.; PERRIMON, N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. **Science**, v. 296, p. 1644–1646, 2002.

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169-77, 2005.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 –63, 1983.

MUÑOZ-ACEVEDO, A.; KOUZNETSOV, V. V.; STASHENKO, E. E. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. **Revista de la Universidad Industrial de Santander: Salud**, v. 41, n. 3, p. 287-294, 2009.

NAFEES, S.; AHMAD, S.; ARJUMAND, W.; RASHID, S.; ALI, N.; SULTANA, S. Carvacrol ameliorates thioacetamide-induced hepatotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in liver of Wistar rats. **Human & Experimental Toxicology**, v. 32, n. 12, p. 1292-304, 2013.

NASCIMENTO, F. R. F.; CRUZ, G. V. B.; PEREIRA, P. V. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AZEVEDO, A. P. S.; BARROQUEIRO, E. S. B.; GUERRA, R. N. M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v. 78, p. 2650–2653, 2006.

NIEVES, J. W. Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 3, p. 771-86, 2013.

NIH. Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. **Journal of the American Medical Association**, 2000.

NIU, T.; ROSEN, C. J. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. **Gene**, v. 361, p. 38-56, 2005.

NORDBERG, J.; ARNÉR, S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NUMPAQUE, M. A.; OVIEDO, L. A.; GIL, J. H.; GARCÍA, C. M.; DURANGO, D. L. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 3–13, 2011.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32 n. 3, 2009.

OTA, K.; QUINT, P.; WEIVODA, M. M.; RUAN, M.; PEDERSON, L.; WESTENDORF, J. J.; KHOSLA, S.; OURSLER, M. J. Transforming growth factor beta 1 induces CXCL16 and leukemia inhibitory factor expression in osteoclasts to modulate migration of osteoblast progenitors. **Bone**, v. 57, n. 1, p. 68-75, 2013.

OYAIZU, M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon ShoKuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 35, p. 771–775, 1986.

OZGOCMEN, S.; KAYA, H.; FADILLIOGLU, E.; AYDOGAN, R.; YILMAZ, Z. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. **Mol Cell Biochem**, v. 295, p. 45-52, 2007.

PACICCA, D. M.; PATEL, N. LEE, C.; SALISBURY, K.; LEHMANN, W; CARVALHO, R.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. **Bone**, v. 33, p. 889-898, 2003.

PANG, J. L.; RICUPERO, D. A.; HUANG, S.; DHIRENDRA, N. F.; SINGH P.; ROMERO, J. R.; CHATTOPADHYAY, N. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, 2006.

PENG, L. H.; KO; C. H.; SIU, S. W.; KOON, C. M.; YUE, G. L.; CHENG, W. H.; LAU, T. W.; HAN, K. B.; NG, K. M.; FUNG, K. P.; LAU, C. B. S.; LEUNG, P. C. *In vitro* & *in vivo* assessment of a herbal formula used topically for bone fracture treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 282–289, 2010.

PERES, C. M.; CURI, R.; **Como Cultivar Células**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINHEIRO NETO, V. F.; ARAÚJO, B. M. A.; GUERRA, P. C.; BORGES, M. O. R.; BORGES, A. C. R. Efeitos do cataplasma das folhas de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) na reparação de tecidos mole e ósseo em rádio de coelhos. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2 p. 62-66, 2005.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PIO CORREA, M.; PENNA, L. A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Defesa Florestal, v. 4. 172p. 1984.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A., SIMMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143, 1999.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a fosphomolybdenum complex: specific aplication to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

QUARLES, L. D.; YOHAY, D. A.; LEVER, L. W.; CATON, R.; WENSTRUP, R. J. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 6, p. 683-92, 1992.

RASTOGI G, BHALLA A, ADHIKARI A, BISCHOFF KM, HUGHES SR, CHRISTOPHER LP, SANI RK. Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains. **Bioresource Technology**, 101(22):8798-806, 2010.

ROBEY, P. G.; BOSKEY, A. L. The composition of bone. In: ROSEN, C. J., editor. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Am. Res; Washington, DC: 2008

RODDA, S. J.; McMAHON, A. P. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. **Development**, v. 133, n. 16, 2006.

RUBIN, J; RUBIN, C.; JACOBS, C.R. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. **Gene**, v. 367 p. 1–16, 2006.

SAIGA, A.; TANABE, S.; NISHIMURA, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myoWbrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3661–3667, 2003.

SANTOS, A.; BAKKER, A. D.; KLEIN-NULEND, J. The role of osteocytes in bone mechanotransduction. **Osteoporosis International**, v. 20 p. 1027–31, 2009.

SEEMAN, E.; DELMAS, P. D. Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 21, p. 2250–2261, 2006.

SENDUR, O. F.; TURAN, Y.; TASTABAN, E.; SERTER, M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: A controlled study. **Joint Bone Spine**. v. 76, n. 5, p. 514-8, 2009.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 4 p. 696-704, 2003.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SILVÉRIO CABRITA, A. M. Tecido ósseo – Alguns aspectos morfológicos e funcionais. **Revista Portuguesa de Ortopedia e Traumatologia**, v. 1, p. 102-108, 1993.

SIMÃO, A. M. S.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L.; OLIVEIRA, P. T.; GRANJEIRO, J. M.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: A useful source of alkaline phosphatase. **Cell Biology International**, v. 31, p. 1405-1413, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, 2002.

SOUSA, J. N. L. **Ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius raddi*) e do mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L) no processo de reparo de dentes de ratos reimplantados.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Odontologia), Universidade Potiguar, Natal - RN, 2010.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-42, 2006.

STEIN, G. S., LIAN, J. B., OWEN, T. O. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3111-3123, 1990.

STEINBECK, M. J.; APPEL, W. H.; Jr.; VERHOEVEN, A. J.; KARNOVSKY, M. J. NADPH-oxidase expression and in situ production of superoxide by osteoclasts actively resorbing bone. **Journal of Cell Biology**, v. 126, p. 765-772, 1994.

SUBRAMANIAM, M.; JALAL, S. M.; RICKARD, D. J.; HARRIS, S. A.; BOLANDER, M. E.; SPELSBERG, T. C. Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER α cells: bone formation *in vivo* and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 87, p. 9-15, 2002.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; JIMI, E.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 3, p. 345-57, 1999.

SUDO, H.; KODAMA, H. A.; AMAGAI, Y.; YAMAMOTO, S.; KASAI, S. *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. **Journal of Cell Biology**, v. 96, n. 1 p. 191-198, 1983.

SWETHAA, M.; SAHITHIA, K.; MOORTHIA, A.; SRINIVASANB, N.; RAMASAMYA, K.; SELVAMURUGAN, N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue Engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, 2010.

TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; SUDA, T. Cells of bone. Osteoclast generation. In: Eds. BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**. Academic Press, San Diego, v. 1, 2a ed., 109-126 p. 2002.

TAKEUCHI, Y.; SUZAWA, M.; KIKUCHI, T.; NISHIDA, E.; FUJITA, T.; MATSUMOTO, T. Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 29309-29316, 1997.

TANG, S. W.; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, 2010.

TEITELBAUM, S. L.; TONDRAVI, M. M.; ROSS, F. P. Osteoclast biology. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. Eds. **Osteoporosis**. San Diego, CA, Academic Press, 61–94 p.1996.

TER BRUGGE, P. J.; JANSEN, J. A. *In vitro* osteogenic differentiation of rat bone marrow cells subcultured with and without dexamethasone. **Tissue Engineering**, v. 8, n. 2, p. 321–331, 2002.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 6, 2003.

TOSOUNIDIS, T.; KONTAKIS, G; NIKOLAOU, B.; PAPATHANASSOPOULOS, A.; GIANNOUDIS, P. V. Fracture healing and bone repair: an update. **Trauma**, v. 11 p. 145–156, 2009.

TSENG, W.; LU, J.; BISHOP, G. A.; WATSON, A. D.; SAGE, A. P.; DEMER, L.; TINTUT, Y. Regulation of interleukin-6 expression in osteoblasts by oxidized phospholipids. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 5 p. 1010–1016, 2010.

TSUKII, K.; SHIMA, N.; MOCHIZUKI, S.; YAMAGUCHI, K.; KINOSAKI, M.; YANO, K.; SHIBATA, O.; UDAGAWA, N.; YASUDA, H.; SUDA, T.; HIGASHIO, K. Osteoclast differentiation factor mediates signal essential for bone resorption induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, prostaglandin E₂ or parathyroid hormone in the microenvironment of the bone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 337 -341, 1998.

VARY, C. P.; LI, V.; RAOUF, A.; KITCHING, R.; KOLA, I.; FRANCESCHI, C.; VENANZONI, M.; SETH, A. Involvement of Ets transcription factors and targets in osteoblast differentiation and matrix mineralization. **Experimental Cell Research**, v. 257, n. 1, 2000.

WANG, D.; CHRISTENSEN, K.; CHAWLA, K.; XIAO, G.; KREBSBACH, P. H.; FRANCESCHI, R. T. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct *in vitro* and *in vivo* differentiation/mineralization potential. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 6, 1999.

WANG, W.; OLSON, D.; CHENG, B.; GUO, X.; WANG, K. Sanguis Draconis resin stimulates osteoblast alkaline phosphatase activity and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142 p. 168–174, 2012.

WATTEL, A.; KAMEL, S.; MENTAVERRI, R.; LORGET, F.; PROUILLET, C.; PETIT, J. P.; FARDELONNE, P.; BRAZIER, M. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on *in vitro* osteoclast bone resorption. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 35-42, 2003.

WAUQUIER, F.; LEOTOING, L.; COXAM, V.; GUICHEUX, J.; WITTRANT, Y. Oxidative stress in bone remodeling and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.15, n.10 2009.

WEI, P.; LIU, M.; CHEN, Y.; CHEN, D. C. Systematic review of soy isoflavone supplements on osteoporosis in women. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2012.

WEINZIERL, K.; HEMPRICH, A.; FRERICH, B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 34, n. 8, p. 466-471, 2006.

WESTENDORF, J. J.; KAHLER, R. A.; SCHROEDER, T. M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. **Gene**. v. 341, p.19-39, 2004.

WILLIAMS, D. F. **Dictionary of biomaterials**. Liverpool, Liverpool University Press, p. 42, 1999.

WRIGHT, H. L.; McCARTHY, H. S.; MIDDLETON, J.; MARSHALL, M. J. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine**, v. 2, n. 1, p. 56-64, 2009.

YAMAGUCHI A, KOMORI T, SUDA T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. **Endocrine Reviews**, v. 4, p. 393-411, 2000.

YAZDANPANA, N.; ZILLIKENS, M. C.; RIVADENEIRA, F.; JONG, R.; LINDEMANS, J.; UITTERLINDEN, A. G.; POLS, H. A.; vanMEURS, J. B. Effect of dietary B vitamins on BMD and risk of fracture in elderly men and women: the Rotterdam study. **Bone**, v. 4, n. 6, p. 987-94, 2007.