

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**EFEITOS DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA - P1G10- DERIVADA DO
LÁTEX DE *Vasconcellea cundinamarcensis* SOBRE O REPARO
ÓSSEO: PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS.**

Verlane Gonçalves Santos

Belo Horizonte

2014

Verlane Gonçalves Santos

**EFEITOS DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA - P1G10- DERIVADA DO
LÁTEX DE *Vasconcellea cundinamarcensis* SOBRE O REPARO
ÓSSEO: PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOLASTOS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriam Teresa Paz Lopes

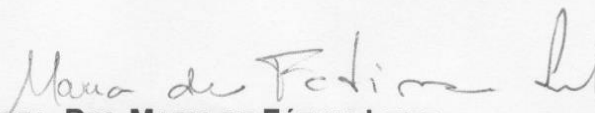
Belo Horizonte

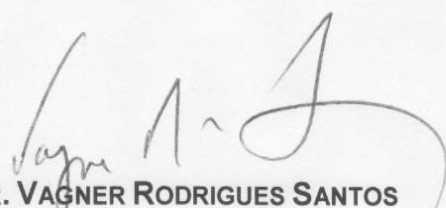
2014

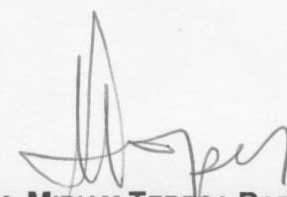
"EFEITOS DA FRAÇÃO PROTEOLÍTICA - P1G10 DERIVADA DO LÁTEX DE *VASCONCELLEA CUNDINAMARCENSIS* SOBRE O REPARO ÓSSEO: PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOBLASTOS"

VERLANE GONÇALVES SANTOS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 14 de janeiro de 2014, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROFA. DR^a. MARIA DE FÁTIMA LEITE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROF. DR. VAGNER RODRIGUES SANTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DR^a. MIRIAM TERESA PAZ LOPES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 14 de janeiro de 2014

COLABORADORES

Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo – Departamento de Bioquímica e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Profa. Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva – Departamento de Morfologia – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me mostrar o melhor caminho.

À minha orientadora, Miriam, pela oportunidade, confiança e ensinamentos, por ser exemplo de dedicação e profissionalismo.

À Profa. Gerluza, pelos ensinamentos, pelo incentivo e dedicação a este trabalho.

Ao Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo pela colaboração e ensinamentos.

À minha família, meu porto seguro, pelo amor incondicional.

À Alano, por estar sempre ao meu lado e compartilhar meus sonhos.

Aos meus amigos do LSAT: Ana Cândida, Ariadne, Dalton, Fernanda Lemos, Kátia, Luciana, Fernanda Duarte, Gabriela e Lívia, vocês foram essenciais para esta conquista. Obrigada pelas críticas, sugestões e auxílio.

Aos agregados do LSAT: Celso, Cinthia, Heveline, Imaculada, Luiz Felipe e Mateus pela amizade.

Ao Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento: Profa. Érica, Íria, Aline C., Cristiane, Aline M., Carol, Sérgio, Wenderson, Juliano, Fernando, Débora, Chico e especialmente ao Igor, pela disposição e dedicação a este trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais e ao Laboratório de Patologia Geral pelo apoio concedido.

Aos amigos do programa de fisiologia e farmacologia, especialmente à Natália e Lorena pela amizade.

RESUMO

P1G10 é uma fração proteolítica obtida do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, que mostrou ter atividade cicatrizante cutânea e gástrica em lesões de diferentes etiologias. Neste estudo objetivamos avaliar a atividade reparadora de P1G10 em modelo de defeito ósseo intrabucal em ratos, mostrando a participação da proliferação e diferenciação de osteoblastos promovida pela sua subfração CMS2 e protease CMS2MS3, purificadas a partir de P1G10. A análise histológica da lesão óssea, confeccionada com o auxílio de uma broca diamantada no primeiro molar superior de ratos Wistar, não mostrou alterações nos diferentes grupos experimentais quanto ao infiltrado inflamatório (discreto) e número de vasos, em um período de 14 dias. Por outro lado, aumento da neoformação óssea foi observada após 7 dias do tratamento com P1G10 nas concentrações 0,01 e 0,05% p/v (20,5% e 26,0%, respectivamente), igualando-se ao demais grupos experimentais aos 14 dias. Análises *in vitro* mostraram que a exposição de osteoblastos primários a CMS2 (10-100 ng/mL) e CMS2MS3 (10 e 50 ng/mL) induziu um efeito mitogênico sobre estas células (aproximadamente 13 e 32%, respectivamente). Além disso, a diferenciação celular também foi estimulada pelo tratamento com CMS2 e CMS2MS3 (0,1-10 ng/ml) quando avaliada pela atividade da fosfatase alcalina (FAL) (aproximadamente 12%) e a mineralização da matriz extracelular (aproximadamente 50 e 60%, respectivamente). Desse modo, sugerimos que a neoformação óssea promovida pela fração P1G10 pode estar vinculada a um estímulo da proliferação e da diferenciação de osteoblastos, uma vez que, estas são células intimamente envolvidas na formação óssea.

Palavras-chave: Cisteíno protease, neoformação óssea, proliferação, diferenciação, osteoblastos.

ABSTRACT

P1G10 is a proteolytic fraction obtained from *Vasconcellea cundinamarcensis* latex, which shows skin and gastric healing activities in lesions of different etiologies. In this study, we aimed to evaluate bone repair activity of this fraction using a model of intraoral bone defect in rats, showing a probable involvement of proliferation and differentiation of osteoblasts promoted by the treatment with subfraction CMS2 and protease CMS2MS3, purified from P1G10. Histological analysis of bone injury performed with the aid of a drill on the maxillary first molar of Wistar rats showed no changes in the different experimental groups regarding the inflammatory infiltrate (discrete) and number of vessels in a period of 14 days. On the other hand, was observed the increased bone formation after 7 days of treatment with P1G10 at 0.01 and 0.05% w/v (20.5% and 26.0%, respectively) equaling the other experimental groups at 14 days. Analysis in vitro showed that exposure of primary osteoblasts at CMS2 (10-100 ng/ml) and CMS2MS3 (10 and 50 ng/ml) induced a mitogenic effect on these cells (approximately 13 and 32%, respectively). In addition, cell differentiation was also stimulated by treatment with CMS2 and CMS2MS3 (0.1-10 ng/ml) when assessed by activity of the alkaline phosphatase (ALP) (about 12%) and the mineralization of the extracellular matrix (about 50 and 60%, respectively). Thus, we suggest that bone formation promoted by P1G10 fraction may be bound to a stimulation of proliferation and differentiation of osteoblasts, since these cells are intimately involved in bone formation.

Keywords: Cysteine protease, bone formation, proliferation, differentiation, osteoblasts.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	por cento
% p/v	percentual peso por volume
% v/v	percentual volume por volume
D.O.	densidade ótica
et al	e outros
e.v	endovenosa
g	gramas
h	hora
i.p	intraperitoneal
M	molaridade
mM	
min	minuto
mL	mililitro
ng	nanograma
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s	segundo
s.c.	subcutânea
v.o.	via oral
µL	microlitro (10^{-6} L)

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de variância, do inglês analysis of variance
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês deoxyribonucleic acid
H.E.	Hematoxilina e Eosina
EUA	Estados Unidos da América
e.p.m	Erro padrão da média
FAL	Fosfatase alcalina
FGF	Fator de crescimento de Fibroblastos
FNT	Formalina neutra tamponada
IGF	Fator de crescimento insulina-símile
MEC	Matrix extracelular
PDGF	Fator de crescimento Derivado de Plaquetas
PMN	Polimorfonucleares
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	Ligante do receptor do fator nuclear kapa B
TGF-β	Fator de crescimento Transformante- β
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Ilustração do microambiente ósseo durante o processo de reparação.....	17
Figura 2. Ilustração do remodelamento ósseo.....	18
Figura 3: Expressão de genes relacionados a proliferação e diferenciação de osteoblastos.....	21
Figura 4. Imagens ilustrativas das etapas de confecção do defeito ósseo intrabucal.....	37
Figura 5. Avaliação da neoformação óssea realizada com auxílio do <i>software</i> ImageJ 1.46.....	40
Figura 6. Imagens demonstrativas da obtenção da calvária para extração de osteoblastos primários	42
Figura 7. Ilustração da divisão anatômica do defeito ósseo realizado no maxilar de ratos.....	46
Figura 8. Reparação tecidual nos defeitos ósseos intrabucais, após 3 dias do tratamento com P1G10.....	49
Figura 9. Reparação epitelial sobre os defeitos ósseos intrabucais, após 7 dias do tratamento com P1G10.....	50
Figura 10: Aspecto inflamatório nos defeitos ósseos intrabucais, após 7 dias do tratamento com P1G10.....	51
Figura 11. Neoformação vascular nos defeitos ósseos intrabucais, após 7 dias do tratamento com P1G10.....	52

Figura 12: Neoformação óssea após 7 dias do tratamento com a fração P1G10.....	54
Figura 13. Neoformação vascular nos defeitos ósseos intrabucais, após 14 dias do tratamento com P1G10 0,01-0,1%(p/v)	55
Figura 14: Neoformação óssea após 14 dias do tratamento com a fração P1G10.....	57
Figura 15. Imagem ilustrativa da cultura primária de osteoblastos obtidos da calvária de ratos.....	58
Figura 16: Efeitos de CMS2 e CMS2MS3 sobre a proliferação de osteoblastos primários.....	59
Figura 17: Efeitos de CMS2 sobre a atividade da fosfatase alcalina (FAL) em osteoblastos primários.....	61
Figura 18: Efeitos de CMS2MS3 sobre a atividade da fosfatase alcalina (FAL) em osteoblastos primários.....	62
Figura 19: Efeitos de CMS2 e CMS2MS3 sobre a mineralização da matriz extracelular (MEC) de osteoblastos primários.....	64
Tabela 1. Descrição dos critérios de exclusão aplicados para avaliar o reparo nos defeitos ósseos intrabucais.....	39
Tabela 2: Índices utilizados para análise do infiltrado inflamatório após 3 e 7 dias do tratamento com P1G10.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Características do tecido ósseo	14
1.2 Princípios de reparação óssea	15
1.3. Abordagens terapêuticas para promover o reparo ósseo	18
1.4 Modelos experimentais <i>in vivo</i> e envolvimento da atividade das células ósseas <i>in vitro</i> , utilizados para o estudo do reparo ósseo	19
1.5 Propriedades farmacológicas da fração P1G10 de <i>Vasconcellea cundinamarcensis</i> sobre o reparo tecidual.....	22
1.5.1 Atividade cicatrizante cutânea e gástrica de P1G10	22
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral:	27
2.2 Objetivos Específicos:	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Material	28
3.2 Métodos	34
3.2.1 Obtenção e purificação das frações do látex de <i>V. cundinamarcensis</i>	34
3.2.1.1 Obtenção da fração P1G10.....	34
3.2.1.2 Obtenção da subfração CMS2 e da protease purificada CMS2MS3	35
3.2.2 Avaliação do reparo em defeito ósseo intrabucal.....	36
<i>Procedimento cirúrgico</i>	36
<i>Tratamento com a fração P1G10</i>	38
<i>Processamento histológico</i>	38
3.2.2.1 Análise histológica e morfométrica do reparo ósseo	39
<i>Análise da neoformação vascular</i>	40
<i>Avaliação morfométrica da formação óssea</i>	40
3.2.3 Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3 sobre a proliferação e diferenciação de osteoblastos	41
<i>Obtenção e cultivo da cultura primária de osteoblastos</i>	41
3.2.3.1 Avaliação da proliferação celular	42
<i>Avaliação da incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU)</i>	42
3.2.3.2 Avaliação da diferenciação celular.....	43

<i>Determinação da atividade da fosfatase alcalina</i>	43
<i>Avaliação da mineralização da matriz extracelular</i>	44
Análise Estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Avaliação da atividade reparadora óssea de P1G10	46
4.1.1 Estabelecimento do defeito ósseo intrabucal.....	46
4.1.2 Avaliação histológica e morfométrica do defeito ósseo na presença da fração proteolítica P1G10	47
4.1.2.1 Avaliação histológica do defeito ósseo após 3 dias do tratamento ...	47
4.1.2.2 Avaliação histológica e morfométrica do defeito ósseo após 7 dias do tratamento.....	49
4.1.2.3 Avaliação histológica e morfométrica do defeito ósseo após 14 dias do tratamento.....	55
4.2 Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3 sobre a proliferação e diferenciação de osteoblastos	58
4.2.1 Obtenção da cultura primária de osteoblastos.....	58
4.2.2 Efeitos da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3 sobre a proliferação de osteoblastos.....	58
4.2.3 Efeitos da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3 sobre a diferenciação de osteoblastos.....	59
4.2.3.1 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina (FAL).....	59
4.2.3.2 Avaliação da mineralização da matriz extracelular	62
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	71
APÊNDICE.....	86
APÊNDICE A	86
ANEXO	90
ANEXO A.....	90

1. INTRODUÇÃO

O osso desempenha funções essenciais na fisiologia humana, incluindo a proteção, o movimento, o apoio de outros órgãos, a hematopoiese, o armazenamento e a homeostase de minerais. A sua importância, torna-se evidente, no caso de doenças que conduzem a perda óssea, tais como, osteoartrite, osteomielite, osteoporose e osteogênese imperfeita. Essas doenças, juntamente com lesão traumática, cirurgia ortopédica e excisão de tumor primário podem levar a formação de defeitos ósseos (PORTER et al., 2009). A fratura é um dos defeitos esqueléticos mais comuns e, em uma de cada cinco fraturas não se obtém reparo satisfatório, comprometendo a mobilidade e a qualidade de vida do indivíduo. Além disso, a reconstrução desses defeitos apresenta um alto custo, se fazendo necessárias abordagens eficazes para o tratamento dos mesmos (FEI et al., 2012).

1.1 Características do tecido ósseo

O tecido ósseo é composto de matriz e células ósseas. A matriz óssea, por sua vez, é constituída por colágeno tipo I (90%) e o restante é composto por proteínas não colágenas como a osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea e diversos proteoglicanos. Essas proteínas não colágenas participam do processo de maturação da matriz, na mineralização e podem regular a atividade funcional das células ósseas (KASSEM et al., 2008). Os constituintes celulares do tecido ósseo consistem em células precursoras osteogênicas, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e as células de revestimento ósseo (KALFAS, 2001; RAGGATT & PARTRIDGE, 2010).

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, sendo, portanto, as células responsáveis pela formação do osso, além de serem reguladoras da mineralização da matriz e, também, participarem do remodelamento ósseo (NEVE et al., 2011). Depois de aprisionado pela matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito (CHEN et al., 2012). Os osteoblastos podem se diferenciar, ainda, em células de revestimento do osso, células quiescentes que cobrem as superfícies ósseas (KULAR et al., 2012). Já os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão de células

progenitoras mononucleares da família dos monócitos/macrófagos e tem como função principal realizar a reabsorção óssea (WAGNER & KARSENTY, 2001).

O osso é formado por dois mecanismos distintos, pela ossificação intramembranosa (KATAGIRI & TAKAHASHI, 2002) e ossificação endocondral (ORTEGA et al., 2004). No primeiro mecanismo as células mesenquimais se diferenciam diretamente em osteoblastos. Esse tipo de ossificação ocorre em ossos do crânio, da face e participa, também, da formação da clavícula (NAKASHIMA & CROMBRUGGHE, 2003). Por outro lado, na ossificação endocondral os precursores mesenquimais, primeiramente, se diferenciam em células cartilaginosas e, em seguida, a ossificação se desenvolve sobre estas. Esse mecanismo é responsável pela formação da maioria do esqueleto axial e apendicular (ORTEGA et al., 2004). Nesses dois processos de formação óssea, o primeiro tecido originado é do tipo primário, que ocorre tanto durante o desenvolvimento embrionário como na reparação de fraturas, sendo gradativamente substituído por tecido secundário (SHAPIRO, 2008).

Nesse contexto, histologicamente se podem distinguir dois tipos de tecido ósseo: imaturo (primário ou trabecular) e maduro (secundário ou lamelar). Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz, porém, apresentam diferentes organizações em suas fibras colágenas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). O primário apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções sem organização definida, tem menor quantidade de minerais e maior proporção de osteócitos do que o tecido ósseo secundário. Esse último apresenta osteócitos distribuídos regularmente, além de fibras colágenas organizadas em lamelas, dispostas paralelamente umas às outras e em camadas concêntricas, em torno de um canal, denominado canal de Havers, no qual se encontram vasos sanguíneos e nervos (DOBLARÉ et al., 2004).

1.2 Princípios de reparação óssea

O tecido ósseo tem uma capacidade única de reparação sem o desenvolvimento de cicatriz fibrosa, que é característica da cicatrização de feridas em tecidos moles. Caso o osso desenvolvesse cicatrizes fibrosas as propriedades mecânicas do esqueleto estariam comprometidas (KANCZLER & OREFFO, 2008).

Assim, o processo de reparo ocorre de forma similar ao desenvolvimento embrionário esquelético (GERIS et al., 2008; DIMITRIOU et al., 2011).

O reparo de fraturas é um processo complexo, constituído por fases de inflamação, reparação e remodelamento (Figuras 1 e 2) (CLAES et al., 2012). A maioria dos eventos celulares envolvidos nesse processo é regulada por fatores de crescimento e citocinas e influenciados por fatores locais, tais como o suprimento sanguíneo, estímulos mecânicos e o microambiente da lesão (LALANI et al., 2005).

Após o trauma ocorre necrose aguda e hipóxia do tecido circundante. Essa perturbação da circulação conduz à ativação de uma cascata de coagulação, que forma um coágulo fechando a área lesionada (KANCZLER & OREFFO, 2008). O coágulo também atua como uma matriz provisória para a invasão ativa de células inflamatórias. Esse microambiente é hipóxico e com baixo pH, além de conter células inflamatórias e citocinas pró- e anti-inflamatórias (CLAES et al., 2012).

Durante a resposta inflamatória as células imunes são rapidamente recrutadas para a região da lesão, os neutrófilos são as primeiras células a invadir o local, seguidas pelos macrófagos e linfócitos. Tais células são uma fonte importante de fatores de crescimento e citocinas, que desencadeiam a fase proliferativa do processo regenerativo (WERNER & GROSE, 2003), que incluem o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as interleucinas-1, 6, 8, e 12 (IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β) e o fator de crescimento insulina-símile-1 (KOLAR et al., 2010). Essas substâncias ativadas podem recrutar células osteoprogenitoras e mesenquimais (KANCZLER & OREFFO, 2008).

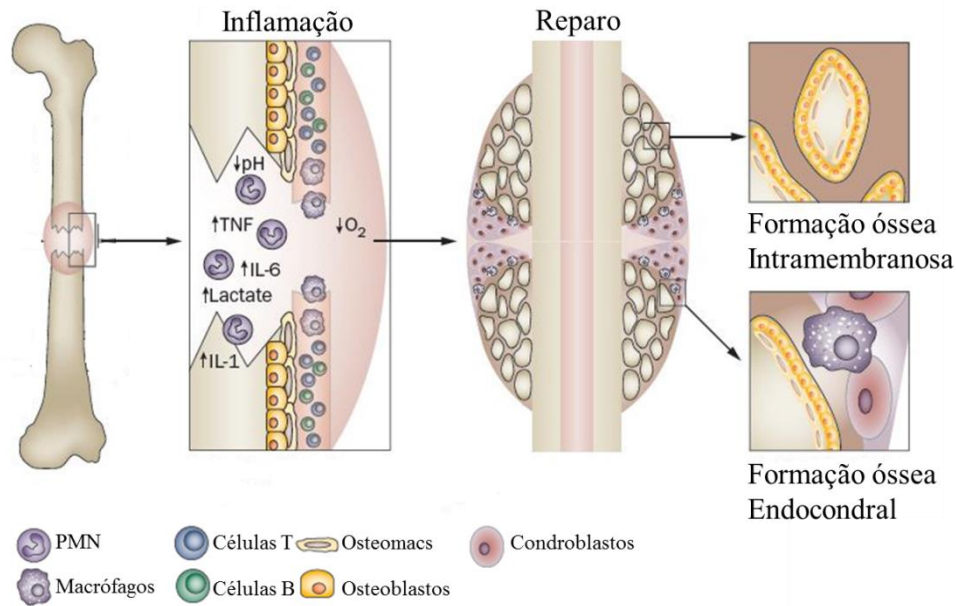


Figura 1: Ilustração do microambiente ósseo durante o processo de reparação. Adaptado de Claes et al., 2012.

Imediatamente após a resposta inflamatória se inicia a fase do reparo com migração de fibroblastos para o local da fratura, sendo estes, responsáveis pela síntese de uma matriz de colágeno, que, junto aos capilares recém-formados, caracteriza o tecido de granulação, que substitui o coágulo. À medida que o tecido de granulação amadurece as fibras colágenas, tornam-se mais abundantes fornecendo maior resistência ao tecido. Osteoblastos residentes e aqueles diferenciados, a partir de células osteoprogenitoras, formam um osso novo, através das vias já mencionadas, originando o tecido ósseo (BARNES et al., 1999). Aliado a isso, as fibras colágenas depositadas formam uma rede, na qual ocorre deposição de osso neoformado (SHYNG et al., 1999).

Com a evolução do reparo, ocorre a estabilização do tecido e da vasculatura local e se inicia a cascata de remodelamento (KANCZLER & OREFFO, 2008). O remodelamento ósseo (Figura 2) depende da atividade integrada dos osteoclastos e osteoblastos (BARNES et al., 1999; HARDY & COOPER, 2009), que mantém comunicações através do contato célula-célula, fatores parácrinos e interação célula-matriz óssea. Para iniciar esse processo, precursores hematopoiéticos que expressam receptores de superfície celular, incluindo o receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANK), são recrutados e induzidos a se diferenciar em osteoclastos, após o contato com os osteoblastos que expressam seus ligantes (RANKL). Após a diferenciação, essas células se tornam células multinucleadas e reabsorvem o osso,

posteriormente, ocorre uma transição para a fase de formação óssea com ativação dos osteoblastos (MATSUO & IRIE, 2008), que preenchem as lacunas de reabsorção com osso novo. Esse processo conduz à formação de tecido ósseo com uma estrutura trabecular, sendo finalizado com a mineralização da matriz óssea (EINHORN, 2005).

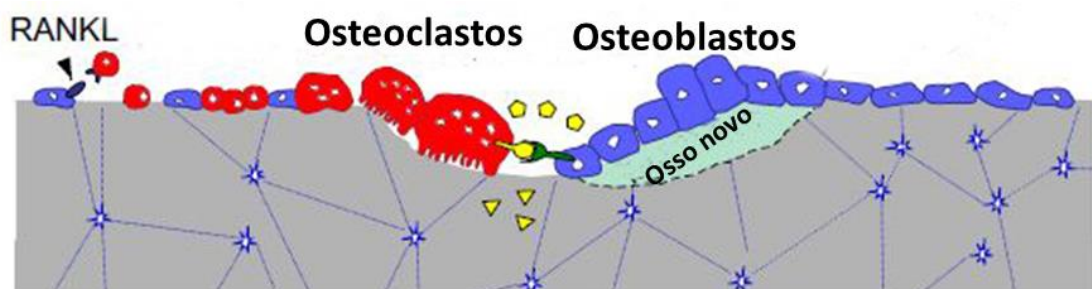


Figura 2: Ilustração do remodelamento ósseo. Fonte: Adaptado de Matsuo & Irie, 2008.

1.3. Abordagens terapêuticas para promover o reparo ósseo

As pesquisas direcionadas a regeneração do tecido ósseo objetivam melhorar e acelerar o reparo das fraturas (CHEUNG, 2005). Deformidades ósseas são comuns, principalmente, na rotina da clínica ortopédica e maxilo facial (CRANE et al., 1995) e as estratégias para reparar esses defeitos precisam restaurar as características funcionais e estéticas da região afetada (KRETLOW et al., 2009).

O enxerto ósseo autógeno é considerado o padrão ouro na recuperação da estrutura óssea (BASMNAV et al., 2008), principalmente pelas suas propriedades de osteocondução, osteoindução e osteogênese. A osteocondução é a capacidade que o enxerto tem de servir como uma superfície favorável à adesão celular. A liberação de fatores de crescimento pelo osso autógeno induz a diferenciação de precursores osteoblásticos, o que caracteriza a osteoindução. Além disso, o osso autógeno é osteogênico por conter células viáveis capazes de se diferenciar em osteoblastos (KOFRON et al., 2004). No entanto, o enxerto autógeno apresenta limitações como a baixa disponibilidade de tecido doador (MEYER et al., 2004), além da possibilidade de complicações como morbidade do sítio doador, hematomas, hospitalização prolongada e aumento do risco de infecção (LICHTTE et al., 2011). Outra possibilidade seria a utilização do aloenxerto, a partir de um indivíduo doador, porém apresenta

baixos índices de celularidade e revascularização em relação ao enxerto ósseo autógeno. Também tem sido utilizados enxertos de biomateriais, como matrizes ósseas desmineralizadas, compostos sintéticos (metais, cerâmicas e polímeros), com o propósito de fornecer um suporte para o crescimento ósseo (MEIJER et al., 2007).

Além disso, estudos direcionados a bioengenharia tecidual, tem revelado abordagens alternativas ao enxerto ósseo e, incluem, a utilização de células mesenquimais, fatores de crescimento (WENG et al., 2006), além de genes e moléculas envolvidas no recrutamento e proliferação de células atuantes no desenvolvimento e reparo do tecido ósseo (ZHAO et al., 2009). Apesar dessas possibilidades terapêuticas, a restauração da função esquelética e a regeneração do tecido ósseo continuam sendo um desafio importante (YE et al., 2011).

1.4 Modelos experimentais *in vivo* e envolvimento da atividade das células ósseas *in vitro*, utilizados para o estudo do reparo ósseo.

Apesar das possibilidades terapêuticas existentes, a regeneração do tecido ósseo, principalmente, nas áreas de ortopedia e cirurgia bucomaxilofacial continua sendo um desafio importante (SOUCACOS et al., 2008; YE et al., 2011), desse modo, tornam-se necessários modelos experimentais para avaliação de novas terapias (UUSITALO et al., 2001). Nesse contexto, a influência de medidas cirúrgicas e farmacológicas na reparação óssea vem sendo estudadas em diferentes sítios do esqueleto como calvária (HONMA et al., 2008), maxila (XU et al., 2004), mandíbula (AROSARENA & COLLINS, 2005), tíbia (MELO et al., 2005) e fêmur (ZHAO et al., 2013) de ratos. Esses modelos são úteis para avaliar o reparo de ossos do esqueleto e, portanto, de uma perda óssea mais extensa. Em contrapartida, na clínica odontológica, em muitos casos, o volume ósseo é insuficiente para dar suporte a um implante dentário, o que pode levar a deformações faciais (BEZERRA et al., 2012). O modelo de estudo da reparação óssea em alvéolos dentários após exodontia em ratos tem sido bastante utilizado (WENG et al., 2006), porém apresenta limitações como a variação de tamanho dos alvéolos, além de serem cavidades muito pequenas, com baixa perda óssea. Por outro lado, o modelo de defeito ósseo intrabucal confeccionado no osso maxilar de ratos, é capaz de reproduzir as características do

meio bucal, além de possibilitar o estudo de um volume ósseo maior e impedir o acesso do animal à lesão (COSTA-FILHO, 2012).

Como já visto a formação e reparo ósseo estão intimamente relacionados à atividade das células ósseas, assim, um desequilíbrio favorecendo a atividade de osteoblastos ou osteoclastos pode conduzir a estados patológicos (WAGNER & KARSENTY, 2001; KULAR et al., 2012). Estudos sobre a atividade de osteoblastos são de importância para a melhor compreensão dos eventos que participam do desenvolvimento ósseo (LONG, 2012). Nesse sentido, sistemas de cultivo *in vitro* refletem os diferentes estágios de maturação das células osteoblásticas (YAMAGUCHI et al., 2000).

Vários modelos de culturas de osteoblastos têm sido utilizados com esse intuito, incluindo culturas de osteoblastos primários provenientes de diferentes espécies, de osteoblastos obtidos a partir da diferenciação de células-tronco pluripotentes e de linhagens celulares imortalizadas (KARTSOGIANNIS & NG, 2004). Ressalta-se, que o cultivo de células primárias apresenta atratividade, uma vez que o comportamento celular *in vitro* pode reproduzir melhor aquilo que ocorre *in vivo*. Esse sistema tem sido empregado como modelo para a investigação *in vitro* da regulação da diferenciação celular, envolvimento de citocinas e regulação hormonal, síntese e secreção de proteínas da matriz, além de possibilitar o estudo dos mecanismos moleculares de doenças ósseas (CZEKANSKA et al., 2012).

A cultura primária de osteoblastos da calvária de ratos é um sistema comumente utilizado para estudar a formação óssea *in vitro*. Na literatura, estão bem definidos os procedimentos de isolamento das células, as condições de cultivo (BELLOWS & AUBIN, 1989; SOEJIMA et al., 2001), a sequência temporal da diferenciação osteoblástica e a expressão de proteínas da matriz (LIAN & STEIN, 1992). As células osteoblásticas cultivadas *in vitro* passam por três fases durante o desenvolvimento da cultura (Figura 3).

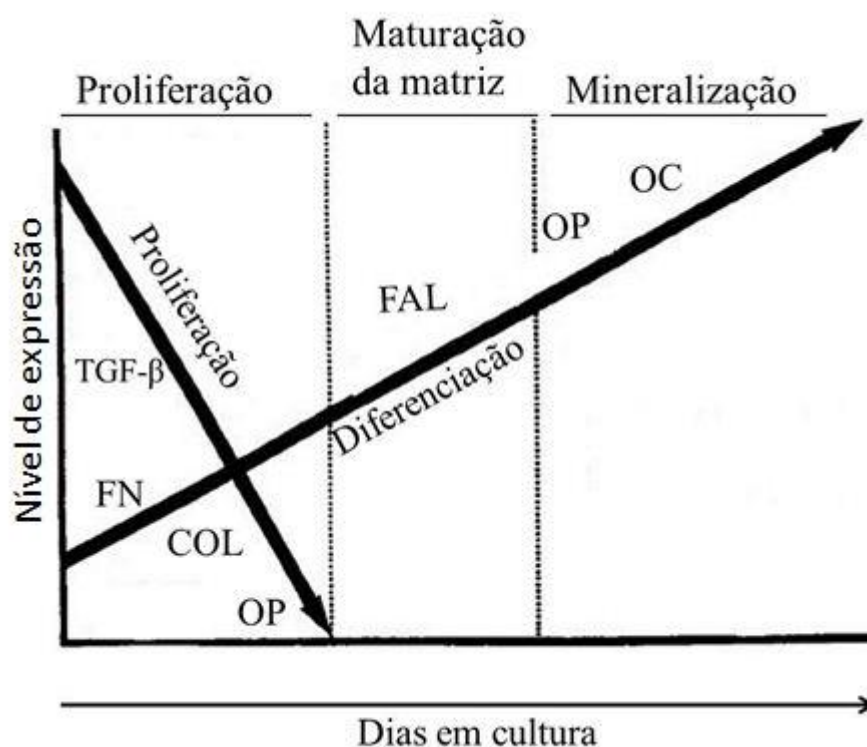


Figura 3: Expressão de genes relacionados a proliferação e diferenciação de osteoblastos. Fonte: Adaptado de Lian & Stein, 1992.

Primeiramente ocorre uma fase de intensa atividade mitótica, caracterizada pela expressão de genes reguladores do ciclo (histonas) e crescimento celular (c-myc, c-fos e c-jun). Em seguida, genes associados com a formação da matriz extracelular (MEC) são ativamente expressos, tais como o do colágeno tipo I, da fibronectina e do TGF-β (LIAN & STEIN, 1992), caracterizando a fase de maturação da matriz com deposição de colágeno na MEC, o que contribui para a cessação da proliferação celular (LIAN & STEIN, 1995). Imediatamente após isso, proteínas associadas ao fenótipo osteoblástico são observadas, tais como a fosfatase alcalina marcador inicial da diferenciação celular (KARTSOGIANNIS & NG, 2004). Desse modo, a diferenciação de osteoblastos em cultura é refletida pela produção e deposição de elementos da matriz extracelular, principalmente de colágeno, formação de nódulos com múltiplas camadas celulares e na sequência, deposição de mineral, formando uma organização semelhante a do tecido ósseo. Nessa última etapa do desenvolvimento do osteoblasto in vitro, proteínas como osteocalcina e osteopontina, que caracterizam a maturação celular, estão abundantemente expressas (LIAN & STEIN, 1992). Os nódulos de mineralização se formam na cultura quando os osteoblastos são cultivados em meio suplementado com ácido ascórbico, um cofator

para a síntese de colágeno e com β -glicerofosfato (MALAVAL et al., 1999), que funciona como uma fonte de fosfato inorgânico (ARONOW et al., 1990). Desse modo, a cinética de maturação dessa cultura, permite o estudo de compostos capazes de estimular ou modular a função osteoblástica (LIAN & STEIN, 1992).

1.5 Propriedades farmacológicas da fração P1G10 de *Vasconcellea cundinamarcensis* sobre o reparo tecidual

Nosso grupo vem caracterizando bioquímica e farmacologicamente cisteíno-proteases (fração P1G10) derivadas do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, sinonímia *Carica candamarcensis*, uma planta típica da costa oeste da América do Sul, que dentre outras propriedades a atividade antitumoral e antimetastática em diferentes modelos murinos (DITZ Jr. et al., submetido; FIGUEIREDO 2009; VIANA, 2010), além de uma atividade reparadora tecidual mostrada em lesões cutâneas (MELLO et al., 2006; GOMES et al., 2010) e gástricas (MELLO et al., 2008; SILVA et al., 2010), que detalhamos a seguir.

1.5.1 Atividade cicatrizante cutânea e gástrica de P1G10

A partir da observação da capacidade de reparo do tecido vegetal, após uma excisão no epicarpo do fruto de plantas da família *Caricaceae*, objetivou-se avaliar a possibilidade de existir uma atividade semelhante em tecidos de mamíferos. Em modelos murinos de reparação tecidual cutânea, a fração P1G10 incorporada em creme Polawax[®] mostrou ser eficiente em acelerar o processo cicatricial após lesões por abrasão no dorso de camundongos *Hairless* na concentração de 0,1% p/p (MELLO et al., 2006). Além disso, a atividade cicatrizante de P1G10 também foi avaliada em um modelo de queimadura por escaldadura da pele em concentrações variando entre 0,01 p/p e 1% p/p. Os animais tratados tiveram a cicatrização das queimaduras aceleradas, com período de retração da lesão, significativamente menor quando comparado ao controle. A análise histológica revelou que o infiltrado inflamatório foi mais discreto e, até mesmo, ausente nos animais tratados com P1G10 0,1% (GOMES et al., 2010).

Em outro estudo do nosso grupo, foi avaliado o efeito da fração P1G10 incorporada em creme Polawax® em concentrações entre 0,01 e 0,1% sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais, confeccionadas com um furador circular de 5 mm de diâmetro no dorso de camundongos C57B16. Foi observado que no terceiro dia de tratamento, os animais do grupo P1G10 0,05% já apresentaram um percentual de retração da ferida significativamente maior em relação ao grupo controle. No sétimo dia de tratamento, esse mesmo grupo apresentou 80% de fechamento da ferida. Constatou-se ainda, que a atividade cicatrizante de P1G10 é dependente da sua atividade proteolítica, uma vez que a inibição desta atividade com iodoacetamida (PIG10-IAA) não resultou em um efeito cicatrizante satisfatório. O tratamento com P1G10 promoveu a redução da área do tecido de granulação, além de diminuição dos índices de apoptose, aumento do depósito e maior organização do colágeno (FREITAS, 2011).

Estudos subsequentes também mostraram a atividade cicatrizante da fração P1G10 em lesões induzidas por radiações UVB. Nesses ensaios, a queimadura foi promovida por UVB em área delimitada do dorso de camundongos *Hairless* que, posteriormente, foram tratados com a concentração de 0,1% de P1G10 e 0,1% de P1G10-IAA ou salina durante sete dias. Observou-se no sétimo dia que o grupo tratado com P1G10 0,1% apresentou 90% de fechamento da ferida, enquanto o grupo que recebeu P1G10-IAA não apresentou diferença em relação aos animais controles (dados não publicados).

Com intuito de avaliar a absorção cutânea da fração P1G10, a mesma foi marcada com o isótopo radioativo ^{99m}Tc e a permeação e retenção da amostra aplicada topicamente em pele íntegra e sem estrato córneo (EC) de camundongos "*Hairless*" foram determinadas. Observou-se na primeira condição, uma permeabilidade 10x menor, após aplicação da formulação em creme Polawax®, quando comparada à aplicação da solução aquosa. A taxa de retenção cutânea também foi maior após aplicação da solução aquosa em comparação com a formulação em Polawax®. O mesmo perfil se observa na pele sem EC, quanto às taxas de permeação e retenção, após aplicação de ambas as formulações (LEMOS et al., 2011).

Para determinar a toxicidade tópica da fração P1G10 foram feitas aplicações desta nas concentrações de 0,1; 1 e 10% (p/v) incorporado em creme Polawax® no

dorso de camundongos *Hairless*. Após um período de 10 dias de tratamento foi observada uma resposta inflamatória epidérmica, caracterizada por vermelhidão difusa no local da aplicação apenas nos animais tratados com P1G10 10% p/v. Enquanto que, as menores concentrações não promoveram qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como efeito tóxico. As avaliações da toxicidade tóxica subcrônica e crônica de P1G10 0,1% foram realizadas após três e seis meses de tratamento, respectivamente. As massas do baço, estômago, fígado, pulmão e rim não sofreram alterações durante o tratamento e as análises histológicas do fígado, pulmão e da pele não mostraram diferenças em relação ao grupo controle correspondente (LEMOS et al., 2011).

A partir da observação da cicatrização de lesões cutâneas promovida por P1G10, nosso grupo se empenhou em investigar se o efeito reparador desta fração se estendia sobre lesões em outros tipos teciduais. Em lesões agudas produzidas por etanol, estresse e ligadura pilórica, P1G10 apresentou significativa atividade gastroprotetora, sendo a dose de melhor efeito a de 10 mg/kg (SILVA et al., 2010). No modelo de indução de úlcera crônica com ácido acético, a administração oral de P1G10 na dose de 10 mg/kg, estimulou a cicatrização das lesões induzidas, de maneira similar ao grupo tratado com omeprazol 10 mg/kg e superior ao apresentado pela ranitidina 100 mg/kg. Já nas lesões induzidas por indometacina, P1G10 (v.o.) nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg reduziu significativamente o número e a intensidade das lesões, de maneira dose dependente, atingindo em sua maior dose um efeito similar aos dos medicamentos controle (MELLO et al., 2008).

Estudos farmacocinéticos foram realizados utilizando ^{99m}Tc -P1G10 em camundongos Swiss, na dose de 1 mg/kg, por vias endovenosa (e.v.), subcutânea (s.c.) ou oral (v.o.). As maiores relações de áreas sob a curva entre órgãos e sangue (coeficiente de partição – kp), após administração por vias e.v. e s.c., foram observadas nos órgãos relacionados à eliminação de fármacos (fígado, rins e bexiga). Já para a via v.o., as maiores taxas de kp foram encontradas nos órgãos do trato gastrointestinal, corroborando com o pequeno valor de biodisponibilidade por essa via (8,3%). Por via s.c. a biodisponibilidade foi de aproximadamente 100% (LEMOS et al., submetido).

A toxicidade sistêmica aguda de P1G10 foi avaliada, determinando-se as doses não letais da fração, como sendo abaixo de 5 mg/kg para as vias intraperitoneais (i.p)

e intravenosa (*i.v*) e abaixo de 300 mg/kg para administração oral (*v.o.*). Esses resultados demonstram a baixa toxicidade de P1G10 por via sistêmica, permitindo a execução de estudos pré-clínicos e clínicos com segurança. A avaliação da atividade mutagênica também foi realizada pelo teste de Ames (MARON & AMES, 1983) e da formação de Micronúcleos (OECD 474, 1997). O primeiro foi realizado com um painel de cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 97, 98, 100 e 102), na presença e ausência de extrato S9 (extrato hepático de ratos tratados com fenobarbital). Os resultados mostraram que P1G10 não apresenta efeito mutagênico nas concentrações estudadas, uma vez que o número de colônias que sofreram reversão pelo tratamento com a fração nas concentrações de 0,1 e 1% p/v foi semelhante ao número de reversões espontâneas observadas com o controle negativo e 10 vezes menores que o obtido após a exposição à azida sódica (controle positivo) (VILLALBA et al., 2010). No teste de Micronúcleos, P1G10 foi administrada via *i.p.* a camundongos Swiss, nas doses de 5 e 10 mg/kg. A avaliação de células da medula óssea desses animais, após 36 horas da administração, mostrou que P1G10 não apresenta genotoxicidade, uma vez que não provocou micronucleação maior que o controle utilizado (VILLALBA, 2010).

As evidências que podem justificar a atividade cicatrizante cutânea e gástrica de P1G10 consistem na sua atividade angiogênica *in vivo*, avaliada em modelo de implantes de polietileno afixados na região subcutânea dorsal de camundongos Swiss que receberam soluções de P1G10 nas concentrações de 0,1 e 1%, durante 8 dias. O conteúdo de hemoglobina presente nos implantes foi determinado e verificou-se que P1G10 a 0,1% promoveu um aumento de 57% na concentração dessa proteína em relação ao controle (MELLO et al., 2008). Outra justificativa seria a atividade proliferativa *in vitro* das suas subfrações e proteases purificadas sobre fibroblastos da linhagem celular L929 (Gomes et al., 2005; 2009), sobre células epiteliais gástricas da linhagem AGS (dados não publicados), além da atividade proteolítica, que auxilia no processo de cicatrização por promover o debridamento das lesões (AYELLO & CUDDIGAN, 2004).

Devido aos resultados já obtidos indicando a fração P1G10 como um agente promissor para o reparo tecidual, estudos clínicos de Fase I e um estudo inicial de Fase II utilizando esta fração, também, já foram desenvolvidos. A fase I realizada com indivíduos hígidos (n=25), objetivando verificar a segurança e a inocuidade da fração,

mostrou ausência de evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade de P1G10 0,1%. Resultados preliminares de ensaio clínico de fase II (n=10), com o objetivo de avaliar a taxa de cicatrização em voluntários portadores de úlceras de pressão e venosas, mostraram que P1G10 0,1% reduziu os valores de comprimento (51,0%), largura (67,0%) e profundidade (37,0%) das feridas, enquanto que apenas os valores de profundidade das feridas tratadas com sulfadiazina de prata 1,0% (tratamento padrão) foram diminuídos (74,0%) (GOMES, 2009).

Considerando que P1G10 mostra atividade proliferativa, demonstrada sobre fibroblastos e células epiteliais, e atividade angiogênica inferimos que essas propriedades poderiam ser favoráveis sobre a reparação do tecido ósseo. Além disso, resultados preliminares nos mostraram que CMS2MS2 (protease purificada de uma subfração de P1G10) ativou a proliferação de osteoblastos extraídos de calvária de ratos neonatos, medida pela incorporação de timidina radioativa após 42 h de exposição. Em tratamentos mais longos, entre 7 e 20 dias, a protease foi capaz de promover a diferenciação dos osteoblastos, determinada pela atividade de fosfatase alcalina (dados não publicados). Dessa forma, neste trabalho nos propomos a investigar o efeito reparador ósseo promovido por P1G10, bem como, mostrar a possível influência da proliferação e diferenciação de osteoblastos no efeito mencionado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a atividade reparadora óssea da fração P1G10, obtida do látex de *V. cundinamarcensis*, utilizando-se um modelo de defeito ósseo intrabucal em ratos. Além disso, investigar a participação da proliferação e da diferenciação de osteoblastos promovida por CMS2 e CMS2MS3, subfração de P1G10 e protease constituinte de CMS2, respectivamente.

2.2 Objetivos Específicos:

No modelo de defeito ósseo intrabucal em ratos, avaliar na ausência e presença de P1G10, após 3, 7 e 14 dias do tratamento:

- o grau de reparação epitelial, por meio de análise histológica;
- o processo de reparação do tecido ósseo, pela análise do infiltrado inflamatório e tipos celulares predominantes na região do defeito;
- a neoformação vascular pela contagem do número de vasos na região do defeito;
- o percentual de neoformação óssea, por análise morfométrica.

Em culturas de osteoblastos *in vitro* avaliar na ausência e presença da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3:

- a proliferação celular, determinada pela incorporação de BrdU;
- a diferenciação celular, investigando a atividade da enzima fosfatase alcalina e a formação de matriz mineralizada, avaliada pela coloração com alizarina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Biológicos

-Ratos recém-nascidos (2 a 3 dias) e com aproximadamente 45 dias de idade, machos, da linhagem Wistar adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

-Látex exsudado de frutos imaturos de *V. cundinamarcensis* (*C. candamarcensis*), cuja exsicata foi depositada no herbário da Universidade de La Serena, Chile (número 15063).

Reagentes

- Ácido etilenodiaminotetra-acético - sal dissódico (EDTA), ácido clorídrico (HCl), ácido fórmico, álcool etílico absoluto, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), formaldeído 37%, fosfato monobásico de potássio, fosfato monobásico e dibásico de sódio hidróxido de sódio, hidróxido de amônio, peróxido de hidrogênio, xilol (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, São Paulo, Brasil).
- Vermelho de alizarina, meio de cultura Alpha-MEM, ampicilina sódica, estreptomicina, sulfato de gentamicina, azul de tripan (Sigma Chemical Co, Maryland, EUA).
- Cloreto de alumínio Anidro, Lauril sulfato de sódio (SDS), Ácido acético glacial (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil).
- ATV (solução aquosa de tripsina) contendo: tripsina (0,20 g), versene (0,02 g) e água deionizada q.s.p. (100,00 mL) (Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil).
- Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (p/v) estéril (Laboratórios Sanobiol, Minas Gerais, Brasil).
- Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco-BRL, Maryland, EUA).

- Flunixin meglumina - Banamine® (Schering-Plough, Boxmeer, Holanda).
- Oxitetraciclina - Terramicina® (Laboratórios Pfizer Ltda, São Paulo, Brasil).
- Quetamina - Cetamin® (Rhubifarma Indústria Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil).
- Xilasina - Dopaser® (Laboratórios Calier S.A).

Kits e anticorpos

Kit NBT/BCIP substrato para fosfatase alcalina (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, Brasil).

Kit ELISA para proliferação celular- BrdU (Roche, Ltda, Rio de Janeiro, Brasil).

Materiais Diversos

Barras magnéticas - Fizatron, Equipamentos Eletrônicos para Laboratórios, São Paulo, Brasil.

Béqueres, erlenmeyers, funis, pipetas graduadas, provetas, quitassatos, balões volumétricos- Pyrex®, Cidade do México, México.

Frasco de cultivo celular de 25 cm² e 75 cm² e placas de poliestireno multicavidades de 24 e 96 cavidades – TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça.

Hemocitômetro (Câmara de Neubauer) - Neubauer Improved Bright-line Kinittel Gläser.

Fio de sutura agulhado (Mononylon 6.0) - Biosut suturas cirúrgicas, Minas Gerais, Brasil.

Luvas de látex com talco bioabsorvível - Supermax, Curitiba, Paraná, Brasil).

Luvas de látex sem talco - Descarpack Descartáveis do Brasil Ltda, Santa Catarina, Brasil).

Material cirúrgico (Pinças, tesouras, porta-agulhas e agulhas) - Procare-Cirúrgico, Minas Gerais, Brasil.

Membranas filtrantes de nitrato de celulose, com 0,45 µm e 0,22 µm de diâmetro de poro- Millipore Corporation, Bedford, MA, EUA.

Microtubos de fechamento seguro com capacidade para 0,5, 1,5 e 2,0 mL - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA.

Pipetadores automáticos com capacidade máxima de 2, 20, 200 e 1000 µL, acompanhados de ponteiras de polipropileno (Fisher Brand Elite®) - Thermo Scientific, Joensuu, Finlândia.

Tubos de polipropileno, com fundo cônico, de 15 e 50 mL de capacidade e dotados de tampa rosqueável - Quimex Corning Incorporated, New York, EUA.

Equipamentos

Agitador magnético modelo 252- Fizatron Equipamentos Elétricos para Laboratório, São Paulo, Brasil.

Balança eletrônica analítica modelo AR-2140 - Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Paulo, Brasil.

Banho-maria calibrado a 37°C, centrífuga Excelsa 2 modelo 205 N- Fanem, São Paulo, Brasil.

Bomba aspirante modelo "H"- Nevoni Equipamentos Médicos e Odontológicos, São Paulo, Brasil.

Câmera digital para microscópio invertido, Moticam 2500 5.0 MPixel - Motic, Xiamen, China.

Câmera digital para microscópio, Q-Color 3.2 MPixel - Olympus America Inc., Japão.

Capela com fluxo laminar de ar ultrafiltrado - Veco do Brasil Indústria & Companhia de Equipamentos, São Paulo, Brasil.

Centrífuga refrigerada, Sorvall ST 16R – Thermo Fisher Scientific, Salisbury, Wiltshire, Inglaterra.

Contra-ângulo odontológico Driller acoplado a uma ponta broca diamantada cilíndrica (MASI equipamentos odontológicos, São Paulo, Brasil).

Deionizador de água por meio de osmose reversa - Milipore Corporation, Bedford, Massachusetts, EUA.

Estufa incubadora 36,5 °C, atmosfera controlada e contendo 5% CO₂ (v/v) - Nuair Equipaments, Plymouth, Minneapolis, EUA.

Leitor de microplacas de ELISA- Spectramax Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA.

Medidor de pH modelo NT-PH2 (Nova técnica Equipamentos para Laboratórios, São Paulo, Brasil), equipado com eletrodo modelo V-620 C -Analion Aparelhos & Sensores Ind. & Com., São Paulo, Brasil.

Microscópio ótico linha CB, microscópio ótico invertido- modelo CK2, microscópio ótico- modelo BX41, Olympus Corporation, New York, EUA.

Motor para Implante Smart Driller - MASI equipamentos odontológicos, São Paulo, Brasil

Refrigerador ajustado à temperatura de 4°C; freezer à temperatura de -20°C - Consul - Multibrás Eletrodomésticos S/A, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.

Soluções

Solução anestésica

Quetamina 10%0,10 mL
Xilasina 2%0,10 mL

Solução para ajuste de pH:

NaOH 10 M
Água destilada q.s.p.100,00 mL

Solução para fixação tecidual: Formalina neutra tamponada 10% (FNT)

Fosfato sódico dibásico anidro40 mM
Fosfato sódico monobásico monohidratado20 mM
Formaldeído 37%.....100,00 mL
Água destilada q.s.p1000,00 mL

Soluções para desmineralização tecidual

Solução de Planck Rychlo

Cloreto de alumínio	50 mM
Ácido clorídrico	8,50 mL
Ácido fórmico	5,00 mL
Água destilada q.s.p.	100,00 mL

Dissolver primeiramente o cloreto de alumínio, depois adicionar vagarosamente o ácido clorídrico e, em seguida, o ácido fórmico.

Solução de EDTA 10%

EDTA	260 mM
Água q.s.p.	1000,00 mL

Ajustar o pH da solução para 7,2 a 7,4 com NaOH 10 M.

Soluções para cultivo e contagem celular

Meio Alpha-MEM

Meio Alpha-MEM	10,10 g
Bicarbonato de sódio	26,2 mM
Ampicilina sódica	0,26 mM
Estreptomicina	0,13 mM
Gentamicina	0,2 mM
Água deionizada q.s.p.	1000,00 mL

O pH é ajustado para 7,1 a 7,2 com NaOH. e o meio de cultura é esterilizado por filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm.

Tampão PBS/EDTA pH 7,4:

Fosfato dibásico de sódio	0,008 M
Fosfato monobásico de potássio	0,001 M
Cloreto de sódio	0,14 M
Cloreto de potássio	0,002 M
EDTA	0,003 M
Água destilada q.s.p.	1000,00 mL

O pH é ajustado para 7,4 com NaOH e o tampão é esterilizado por autoclavação a 120°C durante 40 min.

Solução salina 0,9% (p/v)

NaCl0,015 M
Água destilada q.s.p.100,00 mL

Solução corante de azul de tripan

Azul de tripan0,137 mM
Solução NaCl 0,9% q.s.p30,00 mL

Soluções para determinação da atividade da fosfatase alcalina (FAL)

Solução NBT/BCIP (Nitroblue tetrazólio/Bromo-cloro-indolil fosfato)

NBT1,00 mL
BCIP1,00 mL
Água destilada8,00 mL

Preparar a solução de NBT/BCIP no momento do uso e proteger da luz.

Tampão PBS pH 7,4

Fosfato dibásico de sódio 0,008M
Fosfato monobásico de potássio0,001M
Cloreto de sódio 0,140 M
Cloreto de potássio 0,002 M
Água destilada q.s.p.1000,00 mL

O pH é ajustado para 7,4 com NaOH e o tampão é esterilizado por autoclavação a 120°C durante 40 min.

Solução SDS10%- HCl

SDS0,034 M
HCl0,33 mL
Água destilada q.s.p.100,00 mL

Soluções para avaliação da mineralização

Solução de Vermelho de Alizarina 2% (p/v)

Vermelho de alizarina0,008 M
Água destilada q.s.p.100,00 mL
O pH da solução é ajustado para 4,1 a 4,3 com HCl 10M.

Solução de ácido acético 10% (v/v)

Ácido acético glacial.10,00 mL
Água destilada q.s.p.100,00 mL

Solução de hidróxido de amônio 10% (v/v)

Hidróxido de amônio.....10,00 mL
Água destilada q.s.p.100,00 mL

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção e purificação das frações do látex de *V. cundinamarcensis*

3.2.1.1 Obtenção da fração P1G10

A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, o látex foi coletado e armazenado a 4°C, sendo a seguir liofilizado e novamente armazenado a -20°C. No processo de separação cromatográfica foram dissolvidos 15,0 g do látex liofilizado em 75,0 mL em tampão de ativação. A seguir, a mistura foi agitada durante 30 min e centrifugada (9.000 g) durante 10 min a 4°C. Após a filtração do sobrenadante, o resíduo obtido foi novamente submetido ao procedimento descrito acima, utilizando 25,0 mL de tampão de ativação. O produto filtrado foi aplicado em uma coluna de gel-filtração contendo resina Sephadex® G-10 equilibrada por 48 h com tampão de acetado de sódio 1,0 M. As frações protéicas foram coletadas mediante um fluxo constante de 0,25 mL/min à temperatura ambiente. Foram coletadas frações de 5 mL as quais, posteriormente, foram triadas mediante a determinação da densidade ótica

em 280 nm formando dois picos de perfis cromatográficos distintos, sendo as do primeiro pico reunidas para compor a fração P1G10 e do segundo para compor a fração P2G10 (GOMES et al, 2005). Para caracterização, a fração P1G10 foi submetida à determinação da atividade amidásica, utilizando o substrato BAPNA e da concentração protéica (BAEZA et al., 1990).

A fração P1G10 foi obtida e fornecida pelo Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG.

3.2.1.2 Obtenção da subfração CMS2 e da protease purificada CMS2MS3

A resina CM-Sephadex, foi equilibrada com 200 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) durante 48 h à temperatura ambiente. Após esse período, a resina foi deaerada e empacotada em uma coluna de vidro. Então, equilibrou-se a coluna por 24 h com tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) com um fluxo constante de 0,5 mL/min. Após a aplicação da amostra (P1G10), a coluna foi eluída com o tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) a 0,5 mL/min durante 24 h à temperatura ambiente; e então, eluída em um gradiente linear de concentração de acetato de sódio pH 5,0 de 0,1 a 1,5 M com o mesmo fluxo. As frações foram coletadas a cada 10 mL de acetato de sódio aplicado e monitoradas quanto à concentração de proteína e atividade amidásica. Após essa caracterização, pode-se obter três frações principais denominadas de CMS1 a CMS3 que, posteriormente, foram concentradas usando um sistema de ultrafiltração a 4°C (TEIXEIRA et al., 2008).

A protease CMS2MS3 foi obtida, a partir da purificação da fração CMS2. Para isso, foi utilizada a coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose acoplada ao sistema FPLC. Aplicou-se uma quantidade de proteínas variando de 1 a 5 mg na coluna, sendo eluídas com um gradiente não linear de cloreto de sódio (0,1 mM a 400 mM) juntamente com 5 mM de EDTA e 25 mM de tampão tetraborato de sódio (pH 9,5). O fluxo foi de 1 ml/min e as frações foram coletadas de acordo com os picos de densidade ótica em 280 nm. Os picos semelhantes das diferentes cromatografias realizadas nesse sistema foram reunidos e concentrados no sistema de ultrafiltração a 4°C. Posteriormente, foram avaliadas quanto à concentração protéica e atividade amidásica (TEIXEIRA et al., 2008).

3.2.2 Avaliação do reparo em defeito ósseo intrabucal

Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com as normas e regulamentos do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), protocolo de aprovação nº 107/2013.

Procedimento cirúrgico

Ratos Wistar machos (n=6 por grupo), com peso variando entre 270 e 300g foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, acondicionados em gaiolas individuais e sob controle de luz automática (6-18h). Os animais foram mantidos antes do procedimento experimental sob dieta normal (ração comercial) e com livre acesso à água.

Os animais receberam três doses subcutâneas do antibiótico Terramicina (6mg/kg), uma a cada 24 h e dose única do analgésico e anti-inflamatório Flunixinina meglumina (1mg/kg) antes da cirurgia. Para iniciar o procedimento os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular de xilazina 2% e Ketamina 10% na proporção de 1:1 dos fármacos, sendo administrados 0,1ml por 100g de peso do animal. Após isso, foram colocados em posição de decúbito dorsal e imobilizados em mesa cirúrgica (Figura 4). Para realizar a extração dentária foi utilizado um instrumento *Hollemback* para afastamento da mucosa gengival e uma pinça dente de rato para luxação e os dentes primeiros molares superiores direitos e esquerdos foram extraídos. Após extração dentária, foi criado um defeito ósseo no lado direito e esquerdo do maxilar, com auxílio de uma broca diamantada cilíndrica, acoplada a um micromotor odontológico, sob irrigação constante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio 0,9% (p/v). Desse modo, foi obtida uma cavidade padrão de 2,5 mm de diâmetro e 2,5 mm de profundidade (COSTA-FILHO, 2012).

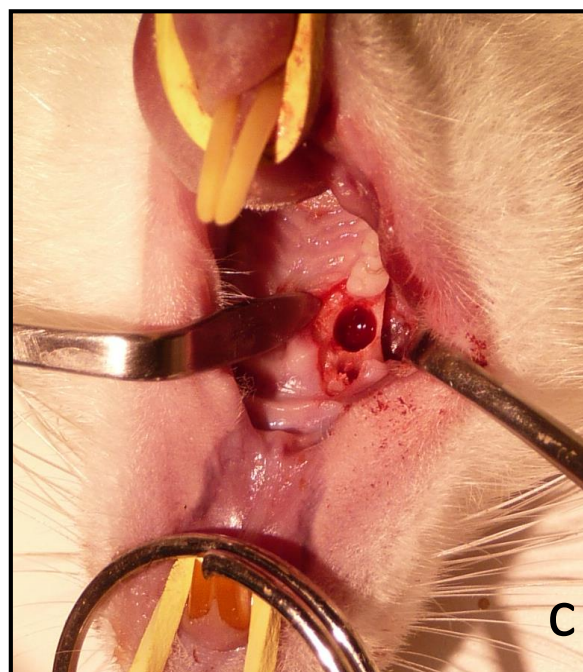
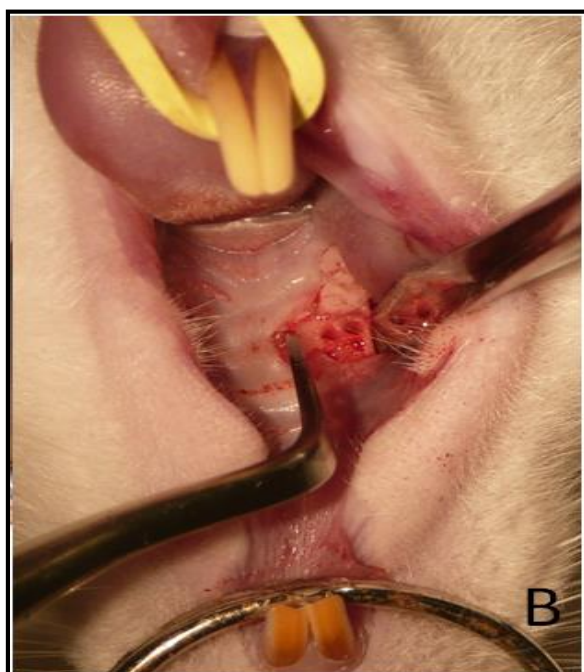
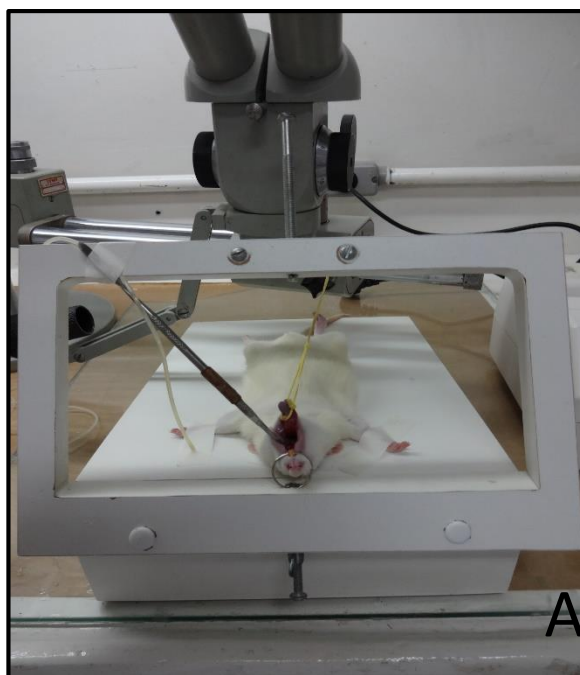


Figura 4: Imagens ilustrativas da confecção do defeito ósseo intrabucal. Ratos Wistar foram colocados em decúbito dorsal e imobilizados em mesa cirúrgica (A). Com auxílio de uma pinça cirúrgica foi realizada a extração do dente primeiro molar superior dos lados direito e esquerdo do maxilar (B) Em seguida, confeccionou-se um defeito ósseo, utilizando-se uma broca diamantada (C) com dimensões iguais a 2,5 mm de diâmetro e profundidade.

Tratamento com a fração P1G10

Como dito, anteriormente, foram realizados dois defeitos ósseos (lado direito e esquerdo do maxilar). Desse modo, cada animal pode receber de um lado o tratamento com a solução de P1G10 e o lado contralateral ser utilizado para constituir o grupo controle. Esse último, não recebeu a administração de qualquer tipo de solução, sendo os defeitos preenchidos apenas por coágulo. O tratamento foi realizado logo após a confecção do defeito com diferentes concentrações da fração P1G10 (0,01-0,1% p/v), sendo administrados 20 µl em dose única, com auxílio de uma seringa estéril e, após isso, a mucosa foi suturada com fio mononylon 6.0.

Após o término do procedimento cirúrgico e consecutivo tratamento os animais foram mantidos recebendo uma dieta pastosa composta de fubá comercial, nos primeiros sete dias pós-cirúrgicos, além de água *ad libitum* e, após este período, ração comercial até a data do sacrifício. Os animais foram sacrificados por decapitação após 3, 7 e 14 dias do tratamento. Após o sacrifício as suas cabeças foram dissecadas, removendo-se a pele e o tecido muscular e as maxilas imediatamente fixadas por imersão em FNT 10%, durante 72h, à temperatura ambiente.

Processamento histológico

Após a fixação, as maxilas foram imersas em água corrente durante 30 min para remoção do excesso de fixador. Em seguida, foram desmineralizadas em solução de Planck Rychlos durante 24 h e, posteriormente, em solução de EDTA 10% p/v (pH entre 7,2 e 7,4), por um período de aproximadamente 5 dias. A fim de otimizar a descalcificação tecidual as peças foram submetidas a 8 ciclos de aquecimento em micro-ondas estando imersas em banhos de EDTA 10% p/v. Após a desmineralização das maxilas a área do defeito ósseo foi dividida ao longo do plano frontal mediano, a fim de separá-la em duas metades iguais, denominadas peças "A" e "B". As peças foram, então, lavadas em água corrente para remoção do excesso de EDTA, previamente à imersão em álcool 70% por 12 h. Posteriormente as seguintes etapas foram realizadas:

a) Fase de desidratação: imersão das peças em séries crescentes de álcool etílico (80% I e II, 90%, 95%, absoluto I, II, III e IV) por um período de 30 min em cada banho.

b) Fase de diafanização: imersão das peças em três banhos de xilol por um período de 20 min cada.

c) Fase de infiltração: imersão das peças em três banhos de parafina a 58°C, sendo de 40 min cada.

d) Fase de inclusão: inclusão em parafina contida em moldes pré-definidos.

Após a inclusão em parafina a peça “A” foi utilizada nos próximos passos, enquanto a “B” foi reservada. De cada peça “A” foram realizados cerca de cem cortes semi-seriados de 6µm de espessura, que foram montados em lâminas histológicas, previamente tratadas com silano 3%. As lâminas foram armazenadas para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Gomori, conforme protocolos de rotina do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG .

3.2.2.1 Análise histológica e morfométrica do reparo ósseo

Para avaliação histológica e morfométrica do reparo ósseo os cortes foram selecionados de acordo aos critérios de exclusão pré-estabelecidos que compreenderam desde a fase de confecção do defeito ósseo até a obtenção dos cortes histológicos. Os critérios adotados para seleção estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos critérios de exclusão aplicados para avaliar o reparo nos defeitos ósseos intrabucais

Critérios de exclusão	
Fase cirúrgica	Fase de análise histológica
Fratura de raiz dentária	Presença de algodão
Perfuração da parede óssea	Restos de alimento
	Corpos estranhos em geral presentes no interior do defeito

Fonte: COSTA-FILHO, 2012.

A análise histológica se baseou no aspecto microscópico da área do defeito ósseo, observando-se os seguintes parâmetros: presença de infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, células osteogênicas e tecido ósseo neoformado.

Com intuito de avaliar a progressão da reparação tecidual, foram adotados índices para o infiltrado inflamatório encontrado na área do defeito ósseo de animais controles e tratados com P1G10, os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Índices utilizados para análise do infiltrado inflamatório após 3 e 7 dias do tratamento com P1G10.

Grau de inflamação	Índice
Ausente	0
Leve	1
Moderada	2
Intensa	3

Análise da neoformação vascular

A contagem dos vasos foi realizada em cortes histológicos corados por Tricrômico de Gomori evidenciados 200x, sendo quantificados os vasos presentes em cinco campos, que abrangem toda a área do defeito ósseo. Foram contados como vasos sanguíneos as estruturas com lúmen, que continham ou não glóbulos vermelhos, conforme descrito por FERREIRA et al., (2004).

Avaliação morfométrica da formação óssea

A análise foi realizada a partir da seleção de 3 cortes para cada animal, sendo cada um deles representativo das regiões distal, central e mesial do defeito ósseo.

As imagens dos cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Gomori foram capturadas com objetiva de 4x por uma câmera Q-color 3 acoplada ao microscópio para quantificação da formação óssea. A análise morfométrica foi realizada pela leitura da deposição óssea na área central do defeito com auxílio do *software* ImageJ 1.46 (National Institute of Health, USA) como mostrado na Figura 5. A formação óssea foi contrastada de acordo os recursos do software, que calculou a área ocupada pela

mesma em porcentagem, conforme realizado em estudos prévios (COSTA-FILHO, 2012).

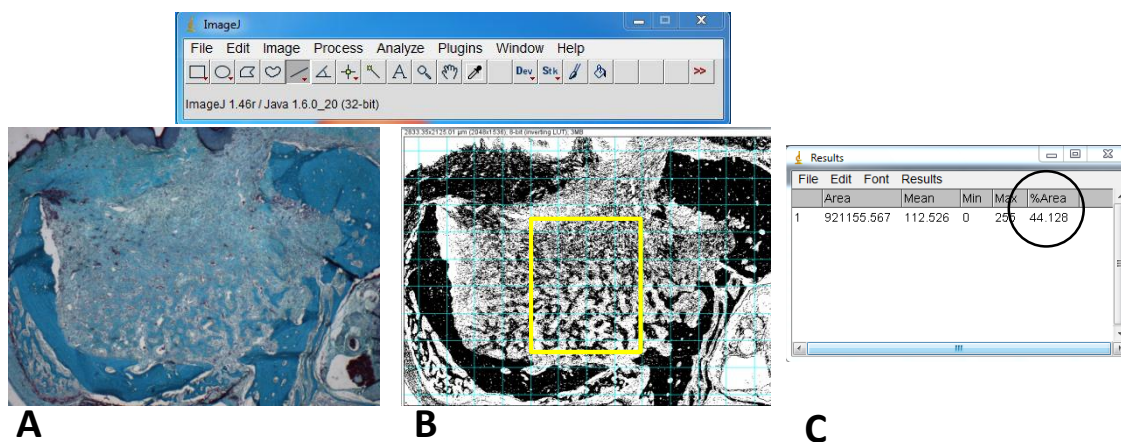


Figura 5: Avaliação da neoformação óssea realizada com auxílio do software ImageJ 1.46. A- Imagem original do defeito, corada com Tricrômico de Gomori, 40x. B- Contraste e delimitação da área de leitura. C- Resultado do cálculo da porcentagem de neofomação óssea.

3.2.3 Avaliação *in vitro* dos efeitos da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3 sobre a proliferação e diferenciação de osteoblastos

Obtenção e cultivo da cultura primária de osteoblastos

Os osteoblastos utilizados para cultivo primário foram provenientes de calvárias de ratos Wistar com idade pós-natal igual a 2 ou 3 dias. Os animais foram sacrificados e com uma incisão na região entre os olhos a pele foi cortada e retirada para expor a calvária, que em seguida foi removida. Após isso, as calvárias foram colocadas em meio de transporte (PBS, gentamicina 50 µg/ml) à temperatura ambiente e levadas para capela de fluxo laminar estéril.

As calvárias foram lavadas 4 vezes com PBS, retirando-se todo o tecido aderente com auxílio de pinça e navalha estéreis. Após a limpeza as calvárias foram levemente picotadas e colocadas em solução de tripsina 0,25% agitadas e incubadas a 37°C durante 20 min. Essa primeira população de células foi descartada e, em seguida, foi realizada uma incubação com collagenase tipo II 0,2% a 37°C durante 20 min, agitando-se a cada 5 min. O sobrenadante dessa primeira incubação com collagenase foi descartado, por conter uma grande quantidade de fibroblastos periosteos.

Posteriormente, foram realizadas três incubações sequenciais com colagenase tipo II 0,2% a 37°C durante 15 min cada. O sobrenadante destas três incubações foram centrifugados a 1000 g por 5 min e o *pellet* de células foi suspenso em 5 ml de meio Alpha-MEM suplementado com 10% (v/v) de SFB e 50 µg/mL de gentamicina. As células para o ensaio de mineralização foram semeadas em placas de cultivo de 24 cavidades, enquanto para os demais experimentos foram semeadas em frascos de cultivo celular T25 cm² e mantidas em estufa de cultura a 37°C, com atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO₂. A troca do meio de cultivo foi realizada após, aproximadamente, 24h da extração. O crescimento foi aguardado para que as células da primeira confluência pudessem ser utilizadas (SILVER et al., 2001).



Figura 6: Imagens demonstrativas da obtenção da calvária para extração de osteoblastos primários. Ratos Wistar com idade pós-natal igual a 2-3 dias (A) foram utilizados para remoção das calvárias (B). Foram realizados banhos sequenciais em PBS com as calvárias isoladas (C) e a remoção das suturas e tecidos aderentes para posterior isolamento dos osteoblastos, através de digestão enzimática.

3.2.3.1 Avaliação da proliferação celular

Avaliação da incorporação de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU)

A suspensão celular foi semeada em placas de 96 cavidades na densidade 4×10^3 células/cavidade. Após atingirem cerca de 50% de confluência as células foram carenciadas da presença de fatores de proliferação através da incubação com meio Alpha-MEM com SFB 1% v/v. Tendo decorrido 24 h de carenciamento o tratamento das células foi realizado durante 48h com a subfração CMS2 e a protease CMS2MS3 em concentrações entre 1-100 ng/ml.

A proliferação celular foi determinada, utilizando-se o imunoensaio colorimétrico, baseado na medição da incorporação de BrdU durante a síntese de DNA. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (ROCHE®). A solução de BrdU (10 µl/cavidade) foi adicionado na cultura celular e deixado em incubação durante as últimas 18 horas de exposição ao tratamento. Durante este período, o BrdU é incorporado no DNA das células em proliferação. Depois o sobrenadante da cultura celular foi removido e as células foram fixadas, e em seguida, incubadas com um anticorpo anti-BrdU conjugado com peroxidase (anti-BrdU-POD). Este anticorpo liga-se ao BrdU que tenha sido incorporado no DNA. O anti-BrdU-POD foi detectado por uma reação com substrato e, em seguida, quantificada, através de leitura espectrofotométrica realizada em dois comprimentos de onda distintos 370 e 492 nm. Foi realizado o cálculo da diferença entre os valores de densidades óticas (D.O.) e o resultado expresso como porcentagem de incorporação de BrdU.

3.2.3.2 Avaliação da diferenciação celular

A diferenciação celular foi avaliada pela determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina (ensaio de BCIP/NBT), após 3, 9 e 14 dias de cultivo celular na presença das frações proteolíticas. Como também, pela avaliação da mineralização da matriz extracelular (ensaio de Alizarina Red S), após 14 dias de tratamento.

Determinação da atividade da fosfatase alcalina

Neste estudo, investigou-se a atividade de fosfatase alcalina (FAL) pelo ensaio do BCIP/NBT, que se baseia numa reação cromogênica iniciada pela clivagem do grupo fosfato do BCIP pela fosfatase alcalina presente nas células osteoblásticas. Esta reação produz um próton, que por sua vez, reduz o NBT produzindo um precipitado púrpura insolúvel, que é solubilizado com solução de SDS 10% - HCl e, em sequência, quantificado por leitura espectrofotométrica (VALÉRIO et al., 2005). Para esse ensaio a suspensão celular foi semeada em placas de 24 cavidades na densidade 2×10^4 células/cavidade. Após atingirem cerca de 80% de confluência as células foram carenciadas da presença de fatores de proliferação através da incubação com meio Alpha-MEM com SFB 1% v/v durante 24 h. Após o

carenciamento as células foram cultivadas em meio osteogênico constituído por meio de cultura Alpha-MEM com SFB 1% v/v, suplementado com 10 mM de β -glicerofosfato e 50 μ g/mL de ácido ascórbico. As células foram então incubadas com as proteases em concentrações variando entre 0,1-10 ng/ml, durante 3, 9 e 14 dias. Trocas do meio de cultivo celular foram realizadas a cada 72 h.

Após o tempo de exposição das células ao tratamento a placa de cultura foi lavada 2x com PBS estéril e adicionados 200 μ L da solução de BCIP/NBT, substrato para a fosfatase alcalina. Em seguida, a placa foi incubada por 2 h em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% (v/v) de CO₂. Decorrido esse tempo, as células foram observadas no microscópio óptico e os precipitados insolúveis solubilizados em 200 μ L de SDS10%-HCl por 24 h em estufa. Em seguida, foram retirados 200 μ L de cada cavidade da placa e realizada a leitura espectrofotométrica a 595 nm. O branco foi realizado utilizando 100 μ L NBT/BCIP + 100 μ L SDS-HCL. A atividade de FAL foi normalizada em relação ao controle (100%), sendo expressa como porcentagem de atividade (CARVALHO et al., 2012).

Avaliação da mineralização da matriz extracelular

A mineralização da matriz extracelular foi avaliada após 14 dias de tratamento dos osteoblastos primários, através da coloração com vermelho de alizarina. Este corante permite a visualização dos nódulos de mineralização, uma vez que se liga seletivamente aos depósitos de cálcio, corando-os de vermelho escuro (CHAUDHARY et al., 2004).

A suspensão celular foi semeada em placas de 24 cavidades na densidade 2x10⁴ células/cavidade. Após atingirem cerca de 80% de confluência as células foram expostas a fração CMS2 e a protease CMS2MS3 em concentrações entre 0,1-10 ng/mL. As trocas do meio de cultivo foram feitas a cada 72 h e após 14 dias de tratamento procedeu-se a coloração com o vermelho de alizarina. Para isso, meio de cultivo celular foi descartado e a monocamada lavada 3 vezes com solução de PBS. As células então foram fixadas com álcool etílico 70% (4°C, 1h). Posteriormente, foram lavadas com PBS e água deionizada sequencialmente. Em seguida, realizou-se a coloração com solução a 2% de vermelho de alizarina durante 15 min à temperatura ambiente. Após isso, foram lavadas com água deionizada para retirar o excesso de

corante e a monocamada celular foi incubada com PBS durante 15 min. Em seguida, descartou-se o PBS e a placa de cultura foi deixada à temperatura ambiente para secagem. Após isso, foram obtidas imagens da mineralização em microscópio ótico invertido. A análise quantitativa do acúmulo de cálcio foi realizada conforme o método de extração de ARS, proposto por GREGORY et al., 2004. Para isso, foram adicionados 190 µL de solução de ácido acético 10% v/v em cada cavidade da placa de cultivo, que foi deixada sob agitação durante 30 min. A camada de células foi raspada e o conteúdo dos poços homogeneizados e transferidos para tubos de 1,5 mL e colocados em agitação durante 30 seg. Após isso, os tubos foram aquecidos a 85°C por 10 min, resfriados em gelo durante 5 min e centrifugados a 13.000 rpm por 20 min à 21°C. De cada tubo foram transferidos 100 µL de sobrenadante para placa de 96 cavidades e acrescidos 40µl de hidróxido de amônio 10% v/v em cada poço. Em seguida, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 405 nm.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm e.p.m e as análises estatísticas realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de múltipla comparação, utilizando-se o método de Student Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

4. RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos na avaliação *in vivo* da reparação óssea promovida pela fração P1G10 (item 4.1) e os dados obtidos *in vitro* relacionados à avaliação da proliferação e diferenciação de osteoblastos após o tratamento com a subfração CMS2 e a protease CMS2MS3 (item 4.2).

4.1 Avaliação da atividade reparadora óssea de P1G10

4.1.1 Estabelecimento do defeito ósseo intrabucal

O defeito ósseo intrabucal foi realizado, como descrito no item 3.2.2, no maxilar superior de ratos, com auxílio de uma broca diamantada, sob irrigação. Na Figura 7 é apresentada uma ilustração do defeito ósseo, que é dividido anatomicamente em terços: apical, a metade inferior do defeito, médio e cervical, a região superior do defeito.

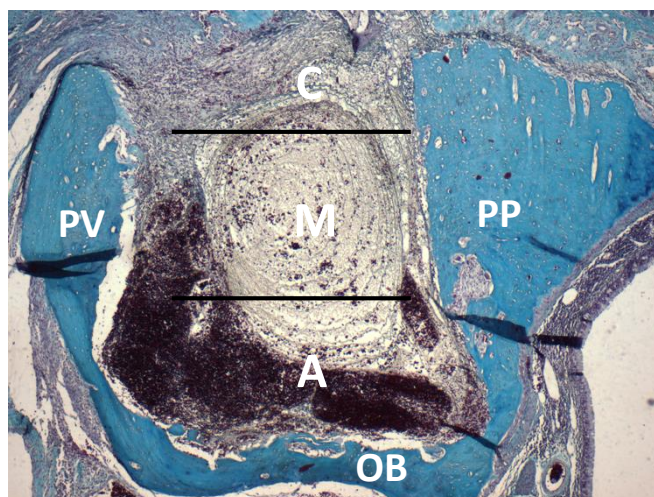


Figura 7: Imagem representativa da divisão anatômica do defeito ósseo realizado no maxilar de ratos. Defeito ósseo; terços: A- apical; M- médio; C- cervical. OB- osso basal; PV-plano vestibular; PP-plano palatino. (Tricrômico de Gomori, evidenciado 40X).

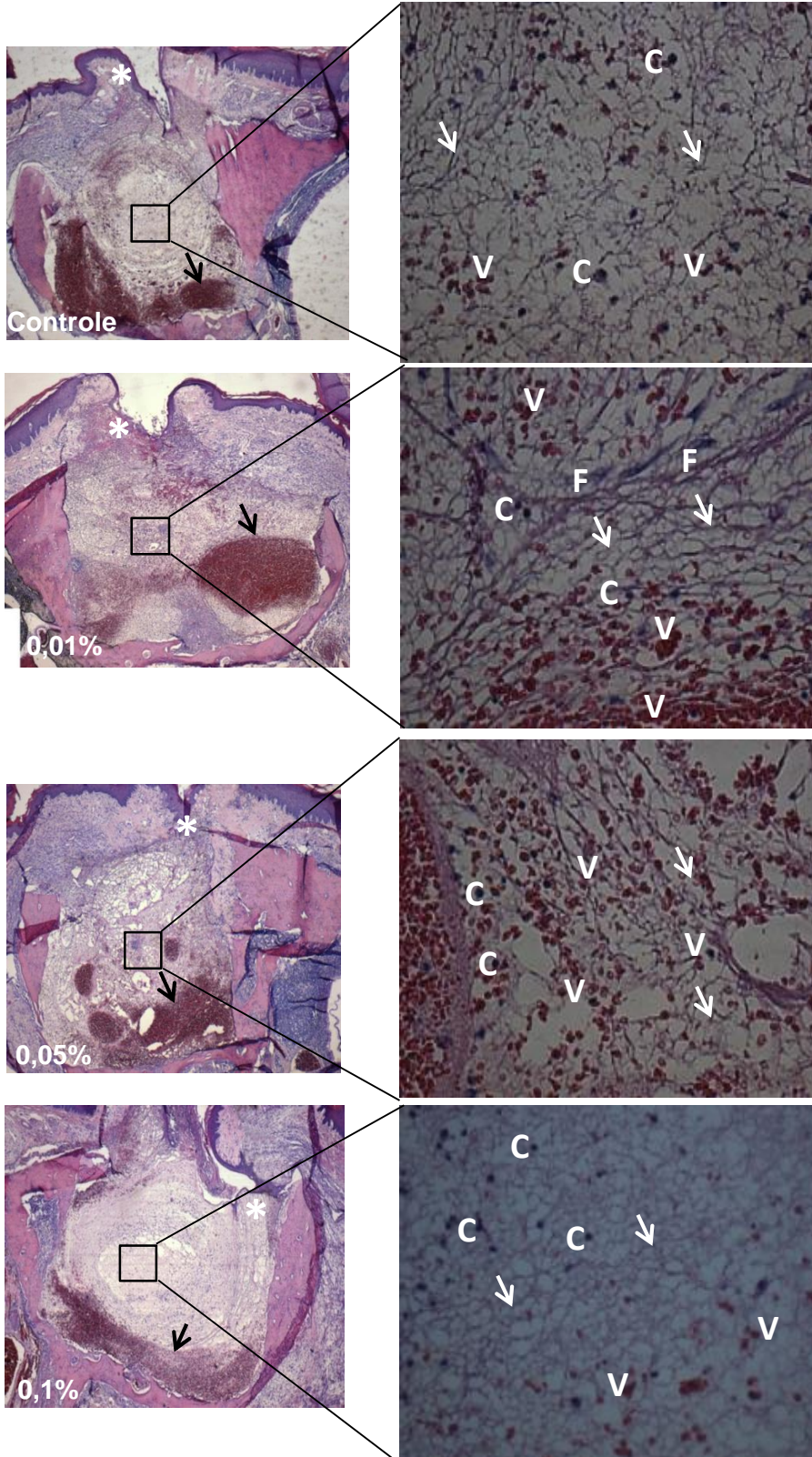
4.1.2 Avaliação histológica e morfométrica do defeito ósseo na presença da fração proteolítica P1G10

4.1.2.1 Avaliação histológica do defeito ósseo, após 3 dias do tratamento

Após a confecção dos defeitos ósseos, estes foram expostos a P1G10 (0,01-0,1% p/v) e tiveram as bordas da mucosa gengival suturadas. No terceiro dia após o tratamento, observa-se que a área do defeito ósseo, se encontra preenchida por coágulo sanguíneo entremeado pela rede de fibrina. Notam-se ainda células inflamatórias e o início da proliferação de fibroblastos indicando a progressão do processo de reparo, porém, ainda não há evidências de deposição óssea. Tais características histológicas foram comuns a todos os grupos (Figura 8). Com intuito de quantificar o infiltrado inflamatório presente nos defeitos ósseos foram adotadas pontuações, conforme os parâmetros descritos em 3.2.2.1. Os resultados mostraram um grau de inflamação semelhante entre os grupos tratados com P1G10 0,01 ($1,0 \pm 0,0$), 0,05 ($1,0 \pm 0,0$), 0,1% ($1,3 \pm 0,3$) e o grupo controle ($1,0 \pm 0,0$) (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls).

Nesse período, não foi realizada análise morfométrica para avaliar o preenchimento ósseo, pois neste tempo, como já mencionado e será mostrado nas imagens da Figura 8, não há constatação de neoformação óssea.

A



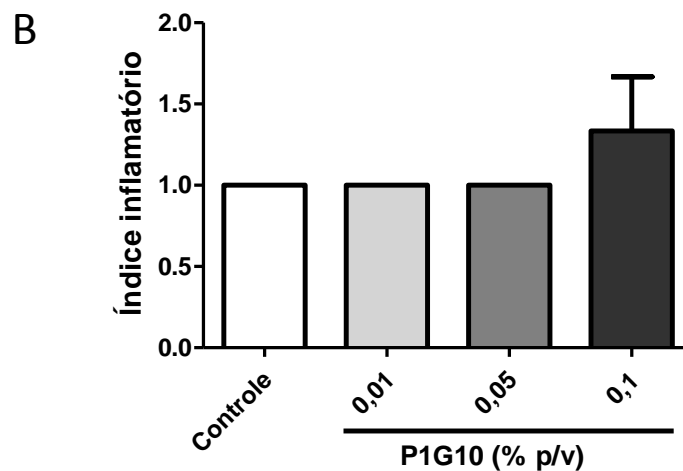


Figura 8: Aspecto histológico nos defeitos ósseos intrabucais após 3 dias do tratamento com P1G10. Ratos Wistar foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com P1G10 (0,01-0,1% p/v) ou permaneceram sem receber qualquer tipo de tratamento (grupo controle) durante 3 dias. (A)- Fotomicrografias dos cortes histológicos. Coloração com H.E, 40x. (*) Epitélio gengival; Setas pretas: coágulo sanguíneo. Os terços médios dos defeitos são enfatizados em 400x ao lado de cada grupo. C: células inflamatórias; V: glóbulos vermelhos; Setas brancas: rede de fibrina; F: fibras colágenas. (B)- Níveis inflamatórios nos defeitos ósseos controles e tratados. Índices foram atribuídos ao infiltrado inflamatório presente nos defeitos ósseos, conforme descrito em 3.2.2.1. Cada coluna representa a média ± e.p.m. do índice inflamatório em cada grupo. Resultados não estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls).

4.1.2.2 Avaliação histológica e morfométrica do defeito ósseo, após 7 dias do tratamento

Após 7 dias do tratamento os achados histológicos indicam que o defeito ósseo apresenta uma organização histológica característica de um estágio de reparação mais avançado, quando comparado aos 3 dias do tratamento. Em relação ao tecido epitelial, é possível notar que o mesmo foi reparado de forma independente do tratamento, já sendo possível observar o processo de queratinização (Figura 9).

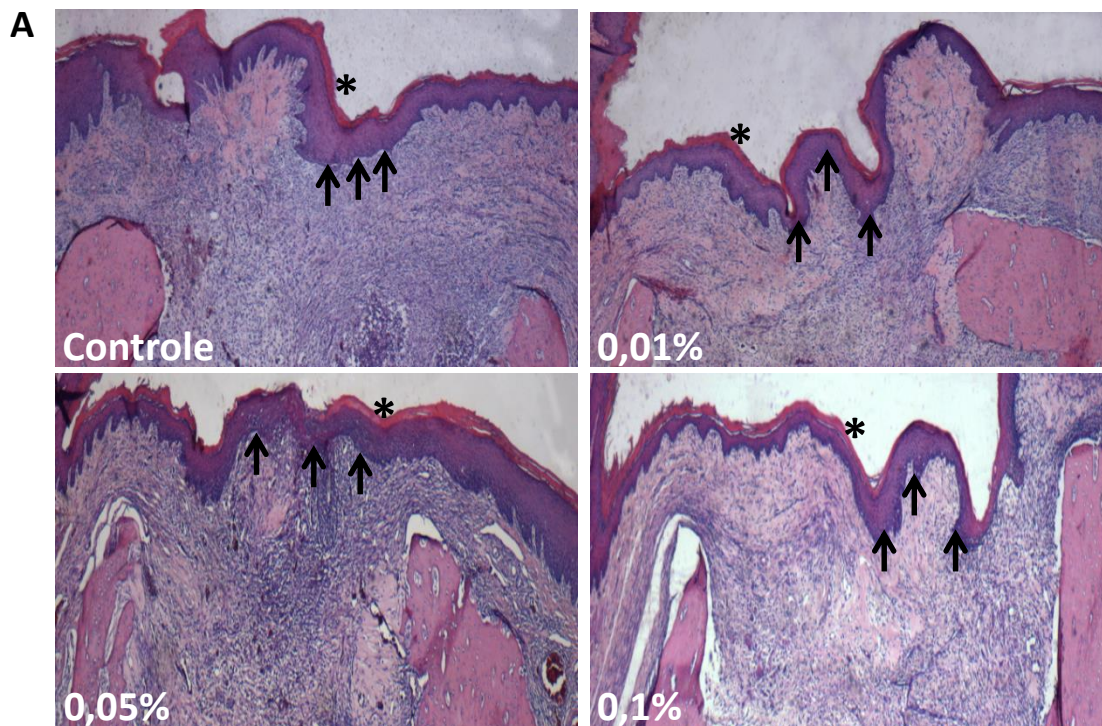


Figura 9: Reparação epitelial nos defeitos ósseos intrabucais após 7 dias do tratamento com P1G10. Ratos Wistar foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com P1G10 (0,01-0,1% p/v) ou permaneceram sem receber qualquer tipo de tratamento (grupo controle) durante 7 dias. A- Fotomicrografias dos cortes histológicos mostrando a reparação epitelial sobre os defeitos ósseos. Coloração com H.E., 40X. Setas: epitelização; (*) queratinização.

A determinação dos índices inflamatórios mostrou que o tratamento com P1G10 não foi capaz de alterar o grau de inflamação presente na região do defeito ósseo (Figura 10). Os índices atribuídos foram $(1,2 \pm 0,1)$, $(1,0 \pm 0,0)$ e $(1,2 \pm 0,2)$, para os grupos P1G10 0,01; 0,05 e 0,1%, respectivamente, não sendo diferentes do grupo controle $(1,2 \pm 0,1)$ (ANOVA, pós-teste Student Newman-Keuls).

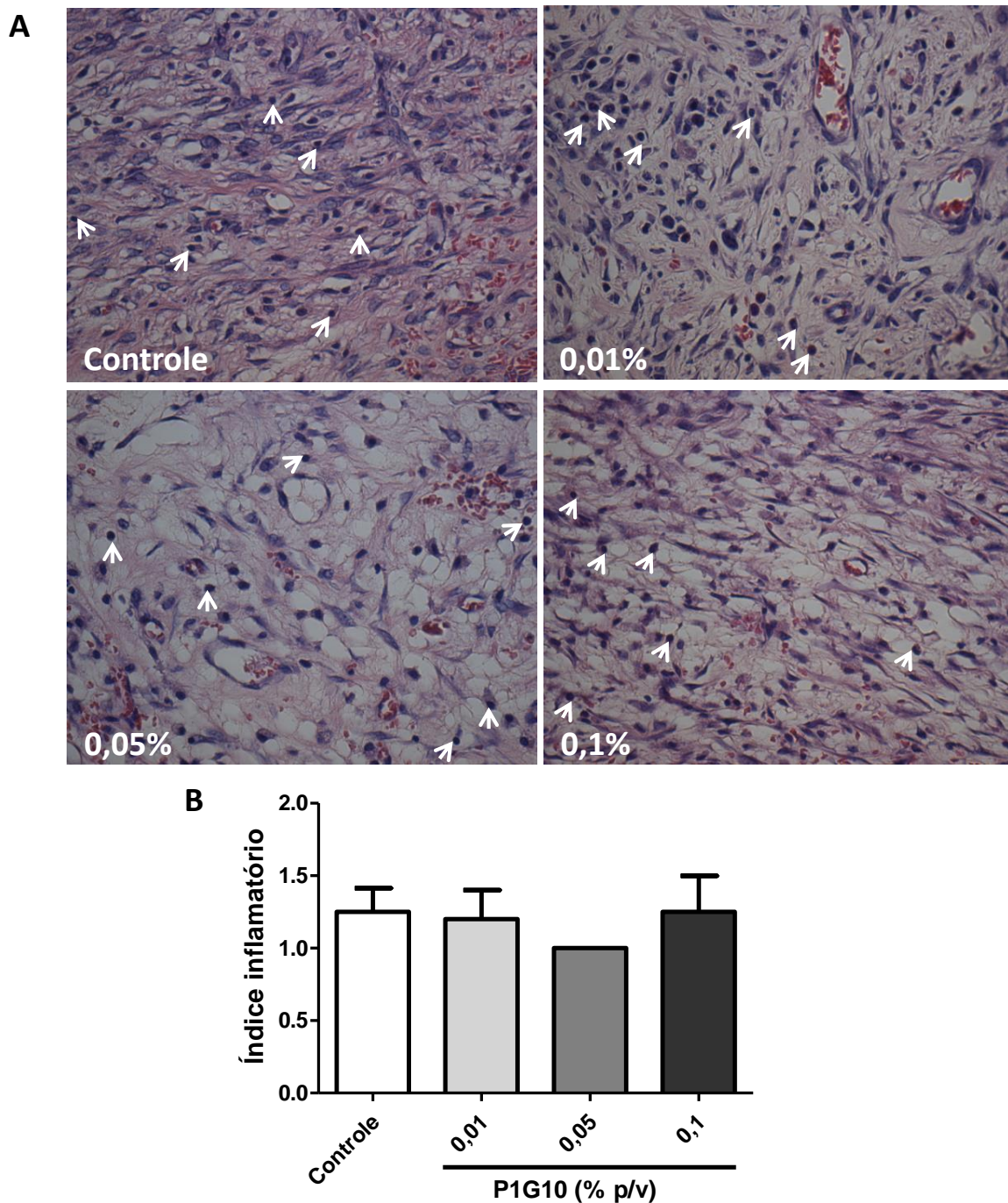


Figura 10: Aspecto inflamatório nos defeitos ósseos intrabucais, após 7 dias do tratamento com P1G10. Ratos Wistar foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com P1G10 (0,01-0,1% p/v) ou permaneceram sem receber qualquer tipo de tratamento (grupo controle) durante 7 dias. (A)- Fotomicrografias dos cortes histológicos. Coloração com HE, 400x. Setas: células inflamatórias. (B)- Níveis inflamatórios nos defeitos ósseos. Índices foram atribuídos ao infiltrado inflamatório presente nos defeitos ósseos tratados e controles, conforme descrito em 3.2.2.1. Cada coluna representa a média ± e.p.m. do índice inflamatório em cada grupo. Resultados não estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls).

A densidade de vasos nos defeitos ósseos controles e tratados foi quantificada como descrito em 3.2.2.1. Como se pode observar na Figura 11, o número de vasos nos animais tratados com P1G10 0,01 ($17,3 \pm 2,6$), 0,05 ($20,3 \pm 3,9$) e 0,1% (p/v) ($17,9 \pm 1,1$) foi semelhante ao grupo controle ($17,5 \pm 1,01$ vasos/campo) (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls).

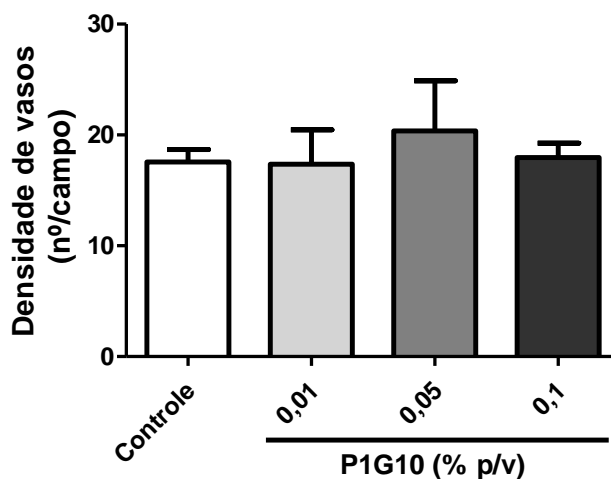


Figura 11: Neoformação vascular após 7 dias do tratamento com P1G10. Ratos Wistar foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com solução de P1G10 (0,01-0,1% p/v) ou permaneceram sem receber qualquer tipo de tratamento (grupo controle) durante 7 dias. (A) Quantificação da neoformação vascular realizada como descrito em 3.2.2.1. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. do número de vasos em cada grupo. Resultados sem diferença estatística em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls).

Após 7 dias do tratamento é possível notar que já se iniciou o processo de preenchimento ósseo nas áreas dos defeitos. Observa-se a presença de tecido ósseo imaturo com osteoblastos ao redor trabéculas recém-formadas e espaços intertrabeculares vascularizados, sendo que estas características podem ser observadas em todos os grupos. Em relação aos níveis de preenchimento ósseo, pode-se notar que está mais acelerado nos animais tratados com a fração P1G10 0,01 e 0,05% (p/v), constatando-se que a formação óssea abrange as regiões central e lateral dos defeitos. Nos defeitos dos grupos P1G10 0,1% (p/v) e controle, observa-se neoformação óssea, porém de menor intensidade e de forma menos abrangente sobre a região do defeito (Figura 12 A).

O resultado da análise morfométrica, após 7 dias do tratamento (Figura 12 B) mostra que a neoformação óssea aumentou de 7,6% ($7,56 \pm 1,93$) nos defeitos ósseos

controles para 20,5% ($20,47 \pm 4,43$, $p < 0,05$, ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls) nos defeitos tratados com P1G10 0,01% (p/v) e para 25,6% ($25,58 \pm 4,25$, $p < 0,01$, ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls) no grupo 0,05% (p/v). Enquanto que o tratamento com P1G10 0,1% (p/v) aumentou para 13% ($12,78 \pm 3,94$) a neoformação óssea, porém não foi diferente em relação ao controles (ANOVA, pós-teste Student Newman-Keuls).

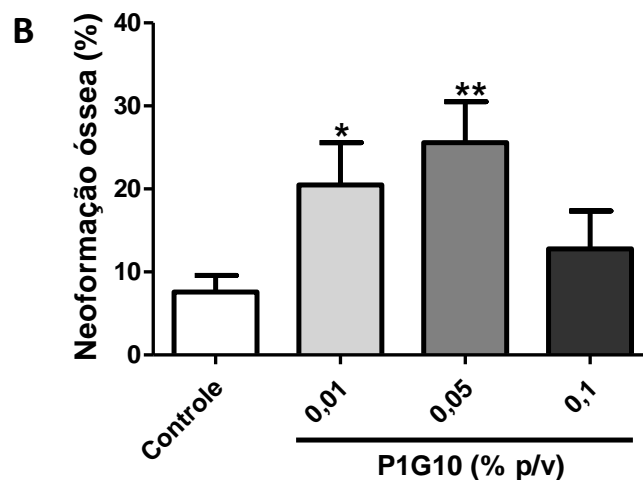
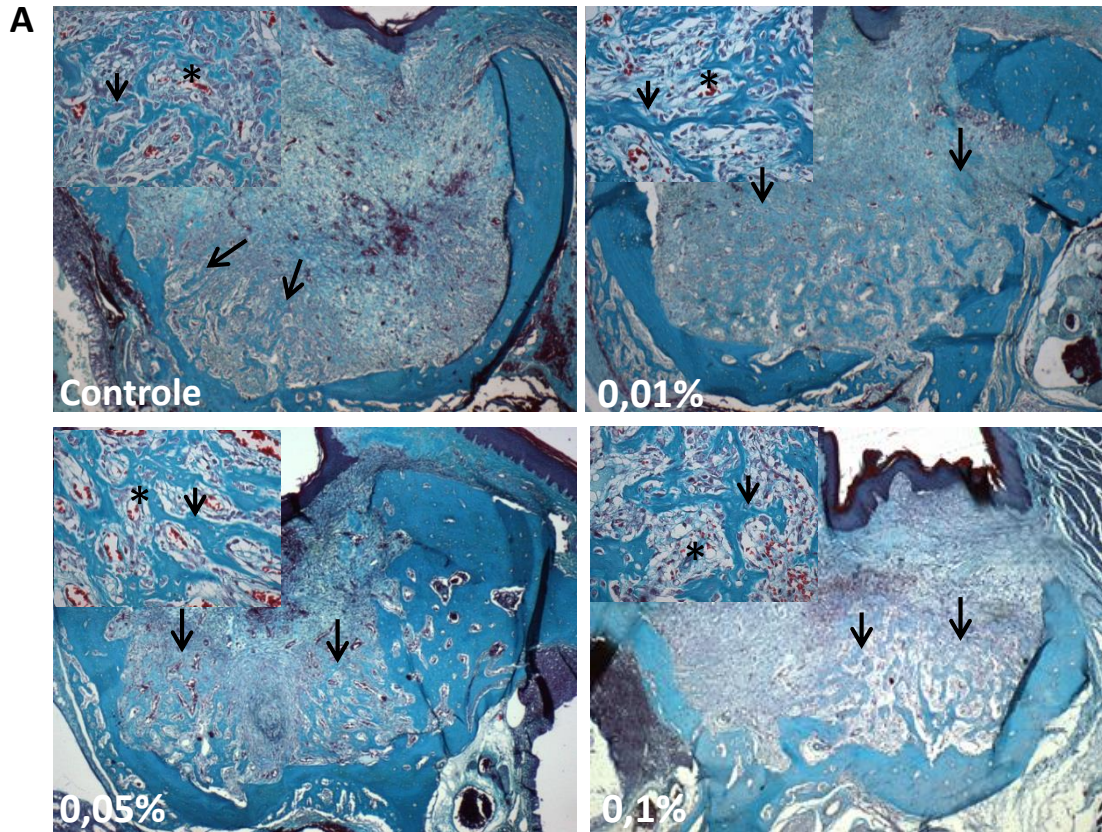


Figura 12: Neoformação óssea após 7 dias do tratamento com a fração P1G10. Ratos Wistar foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com solução de P1G10 (0,01-0,1% p/v) ou permaneceram sem receber qualquer tipo de tratamento (grupo controle) durante 7 dias. (A)- Fotomicrografias de cortes histológicos. Coloração com Tricrômico de Gomori, 40x, nas quais se observa o início do preenchimento ósseo (setas). Em cada grupo é enfatizado o aspecto histológico da área de neoformação óssea (400x). Setas: trabéculas ósseas (*) vasos sanguíneos nos espaços intertrabeculares.. (B)- Quantificação da formação óssea realizada como descrito em 3.2.2.1. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. da porcentagem de neoformação óssea em cada grupo. Resultados estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle - * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls).

4.1.2.3 Avaliação histológica e morfométrica do defeito ósseo, após 14 dias do tratamento

Após 14 dias de evolução, nas áreas dos defeitos ósseos não há infiltrado inflamatório e as mesmas se encontram predominantemente ocupadas por trabéculas ósseas. O número de vasos nos defeitos ósseos tratados com P1G10 0,01 ($16,2 \pm 2,9$); 0,05 ($15,1 \pm 2,2$) e 0,1% (p/v) ($14,0 \pm 1,1$), não foram diferentes do grupo controle ($13,0 \pm 1,7$ vasos/campo) (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls) (Figura 13).

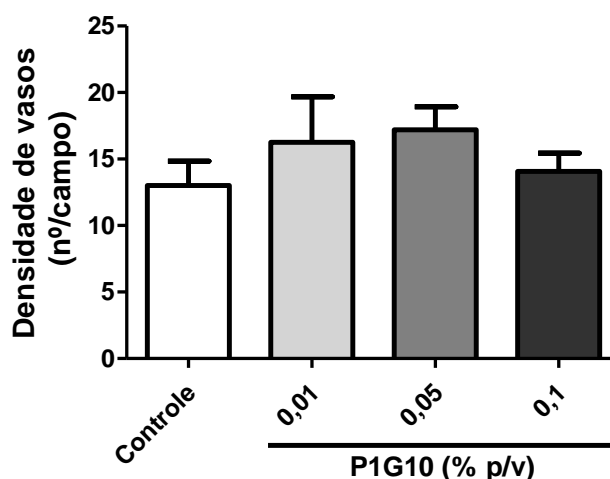


Figura 13: Neoformação vascular após 14 dias do tratamento com P1G10 0,01-0,1% (p/v). Ratos Wistar foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com solução de P1G10 (0,01-0,1% p/v) ou permaneceram sem receber qualquer tipo de tratamento (grupo controle) durante 14 dias. (A) Quantificação da neoformação vascular realizada como descrito em 3.2.2.1. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. do número de vasos em cada grupo. Resultados sem diferença estatística em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls).

Em relação ao aspecto histológico tecidual, nota-se que tanto no grupo controle, quanto nos tratados com P1G10 (0,01-0,1% p/v), o tecido ósseo predominante é do tipo primário ou imaturo e que as trabéculas ósseas estão preenchendo os terços médios dos defeitos. Observam-se ainda, numerosos osteócitos, além de largos espaços medulares vascularizados (Figura 14 A).

A análise morfométrica, realizada como descrito em 3.2.2.1 mostrou que a porcentagem de neoformação óssea nos defeitos, após 14 dias do tratamento foi de 33 ($33,6 \pm 2,8$), 35 ($35,4 \pm 5,3$) e 40% ($40,5 \pm 3,8$), para P1G10 0,01; 0,05 e 0,1% (p/v),

respectivamente. Enquanto, para os defeitos ósseos do grupo controle foi obtida uma média de aproximadamente 33% ($33,3 \pm 2,0$). Dessa forma, não houve diferenças na neoformação óssea entre os grupos avaliados neste período (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls) (Figura 14 B).

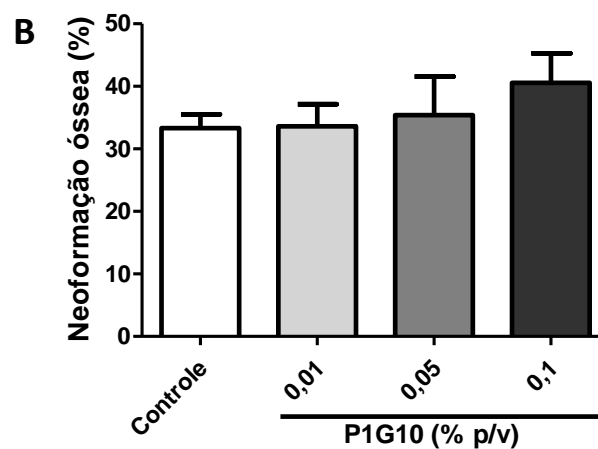
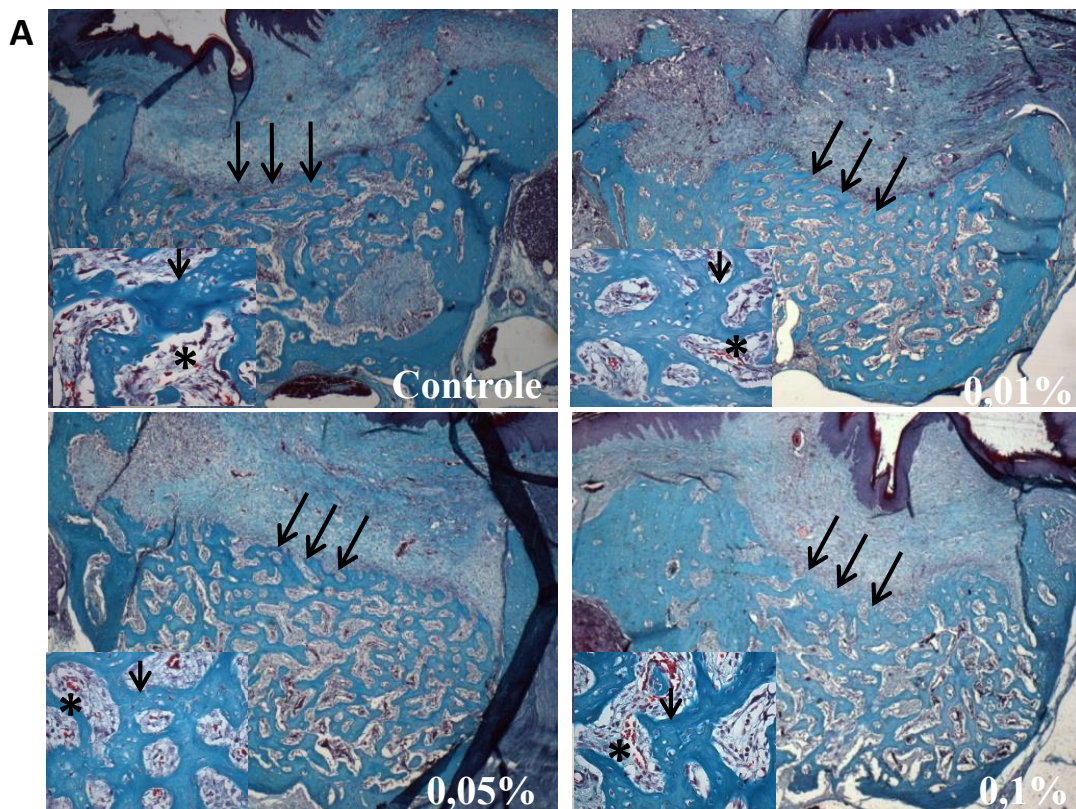


Figura 14: Neoformação óssea após 14 dias do tratamento com a fração P1G10. Ratos Wistar foram submetidos ao defeito ósseo e tratados com solução de P1G10 (0,01-0,1% p/v) ou permaneceram sem receber qualquer tipo de tratamento (grupo controle) durante 14 dias. (A)- Fotomicrografias de cortes histológicos (40x), nas quais se observa o início do preenchimento ósseo (setas). Em cada grupo é enfatizado o aspecto histológico da área de neoformação óssea (400x). Setas: trabéculas ósseas; (*) vasos sanguíneos. Coloração com Tricrômico de Gomori. (B)- Quantificação da formação óssea realizada como descrito em 3.2.2.1. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. da porcentagem de neoformação óssea em cada grupo. Resultados sem diferença estatística em relação ao grupo controle (ANOVA seguida de pós-teste Student Newman-Keuls).

4.2 Avaliação *in vitro* dos efeitos da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3 sobre a proliferação e diferenciação de osteoblastos

4.2.1 Obtenção da cultura primária de osteoblastos

Os osteoblastos utilizados neste trabalho foram provenientes de cultura primária realizada como descrito no item 3.2.3, a partir da digestão enzimática de fragmentos de calvárias de ratos Wistar recém-nascidos. Na figura 15 é mostrada uma fotomicrografia para ilustrar o aspecto da monocamada celular.

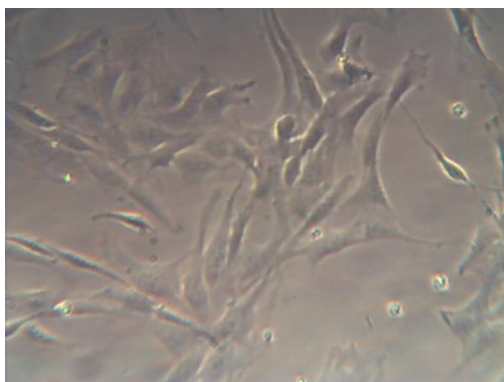


Figura 15: Imagem ilustrativa da cultura primária de osteoblastos obtidos da calvária de ratos. Monocamada celular, após 48h de cultivo, aumento de 400x.

4.2.2 Efeitos da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3 sobre a proliferação de osteoblastos

A avaliação da proliferação celular foi realizada como descrito em 3.2.3.1, pelo ensaio do BrdU, um análogo da timidina, que é incorporado pelo DNA de células em proliferação. A medida da proliferação celular foi realizada, com amostras de CMS2 e CMS2MS3 em concentrações entre 1 e 100 ng/mL durante 48h (Figura 16). As células tratadas com CMS2 e CMS2MS3 ambas em concentração de 1 ng/ml obtiveram uma taxa de proliferação igual a 102 e 110%, respectivamente, não sendo diferente da proliferação das células do grupo controle (atribuiu-se um valor de 100% à média de proliferação obtida com SFB 1% ($100,00 \pm 2,06$). Por outro lado, os dados obtidos revelaram um aumento da proliferação de osteoblastos tratados com CMS2 nas concentrações de 10, 50 e 100 ng/ml em 13 ($112,92 \pm 2,83$, $p < 0,05$), 14 ($114,18 \pm 3,82$, $p < 0,05$) e 16% ($115,55 \pm 3,49$, $p < 0,05$). Já o tratamento com CMS2MS3

estimulou a mitogênese em 13 ($113,00 \pm 0,89$, $p < 0,05$) e 32% ($131,66 \pm 1,59$, $p < 0,001$) nas concentrações de 10 e 50 ng/mL, respectivamente, não sendo observado esse efeito com a exposição das células a CMS2MS3 100 ng/mL ($100,50 \pm 5,09$) (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

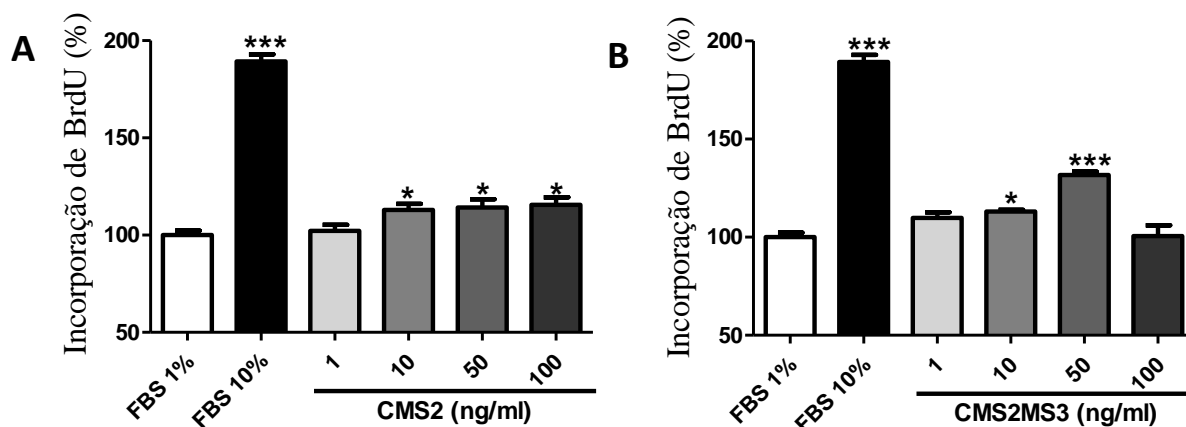


Figura 16: Efeitos de CMS2 e CMS2MS3 sobre a proliferação de osteoblastos primários. Os osteoblastos foram cultivados em placas de 96 cavidades, carenciados durante 24 h e, então, submetidos ao tratamento com CMS2 (A) e CMS2MS3 (B) em concentrações crescentes (1-100 ng/mL), SFB 10% (controle positivo de proliferação) ou controle (SFB 1%) durante 48h. A incorporação de BrdU pelas células foi avaliada conforme descrito no item 3.2.3.1. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. do valor de densidade óptica (Δ entre 370 e 492 nm). O valor está apresentado como percentagem de incorporação do BrdU, considerando a média de proliferação obtida nas células controles como 100%. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.2.3 Efeitos da subfração CMS2 e da protease CMS2MS3 sobre a diferenciação de osteoblastos

A influência do tratamento com CMS2 e CMS2MS3 sobre a diferenciação de osteoblastos, obtidos da calvária de ratos recém-nascidos foi avaliada pela medida da atividade da enzima fosfatase alcalina (FAL) e pela análise da mineralização da matriz, através da coloração com o vermelho de alizarina.

4.2.3.1 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina (FAL)

Em placas de cultivo, após o carenciamento com redução da concentração de SFB as células foram expostas durante 3, 9 e 14 dias a CMS2 e a CMS2MS3 ambas

em concentrações entre 0,1-10 ng/ml (Figuras 17 e 18). A exposição da cultura de osteoblastos a ambas as amostras durante 3 dias não foi capaz de alterar a atividade de FAL em qualquer uma das concentrações analisadas. Após 9 dias de tratamento os resultados mostraram que tanto CMS2 quanto o CMS2MS3 estimularam a atividade desta enzima. A fração CMS2 nas concentrações de 1 e 10 ng/mL foi capaz de aumentar significativamente a atividade enzimática em 13% ($113,28 \pm 2,07$; $p < 0,01$ e $113,16 \pm 2,24$; $p < 0,05$, respectivamente). Do mesmo modo, CMS2MS3 nas concentrações de 1 e 10 ng/mL aumentou a atividade de FAL em 16 ($116,45 \pm 2,31$; $p < 0,01$) e 15% ($114,92 \pm 2,31$; $p < 0,05$), respectivamente, em relação ao controle ($99,56 \pm 0,41$). Por outro lado, CMS2 e CMS2MS3 em concentração de 0,1 ng/mL não foram capazes de promover um aumento da atividade de FAL ($105,53 \pm 2,42$) e ($102,34 \pm 3,54$), respectivamente. A evolução do tratamento até 14 dias foi realizada com as duas menores concentrações para ambas as amostras. Os dados mostraram que os tratamentos estimularam a atividade de FAL em relação aos seus controles, quando tratados com a concentração de 1 ng/mL aumentando a atividade de FAL em 11 ($111,09 \pm 1,17$; $p < 0,05$ - CMS2) e 9% ($109,27 \pm 1,03$; $p < 0,05$ - CMS2MS3), respectivamente (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

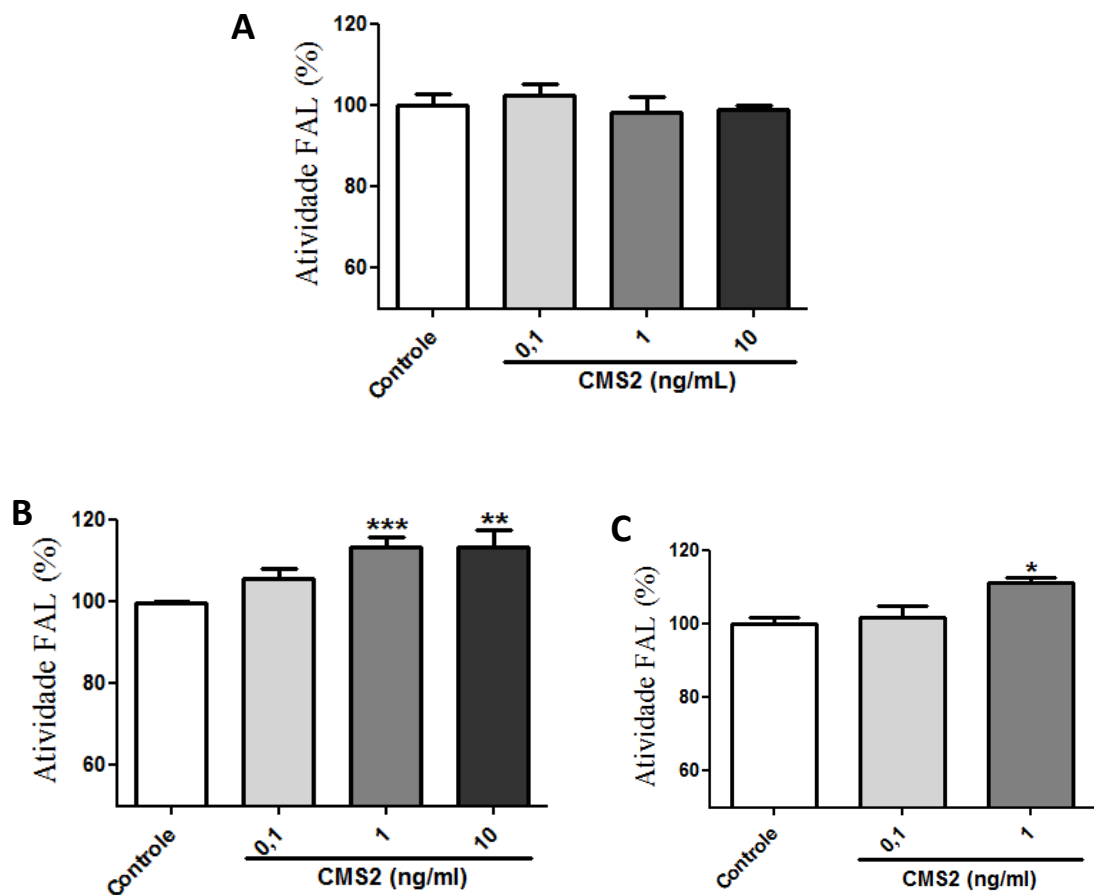


Figura 17: Efeitos de CMS2 sobre a atividade da fosfatase alcalina (FAL) em osteoblastos primários. Os osteoblastos foram cultivados em placas de 24 cavidades, carenciados da presença de fatores de crescimento durante 24 h e, então, submetidos ao tratamento com CMS2 em concentrações entre 0,1-10 ng/mL ou controle (meio de cultura osteogênico) durante 3 (A), 9 (B) ou 14 dias (C). A atividade enzimática da FAL foi determinada pelo ensaio de metabolização do BCIP/NBT, conforme descrito no item 3.2.3.2. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. do valor de densidade óptica (D.O em 595nm). O valor está apresentado como porcentagem de atividade de FAL considerando a média obtida nas células controles como 100% de atividade. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

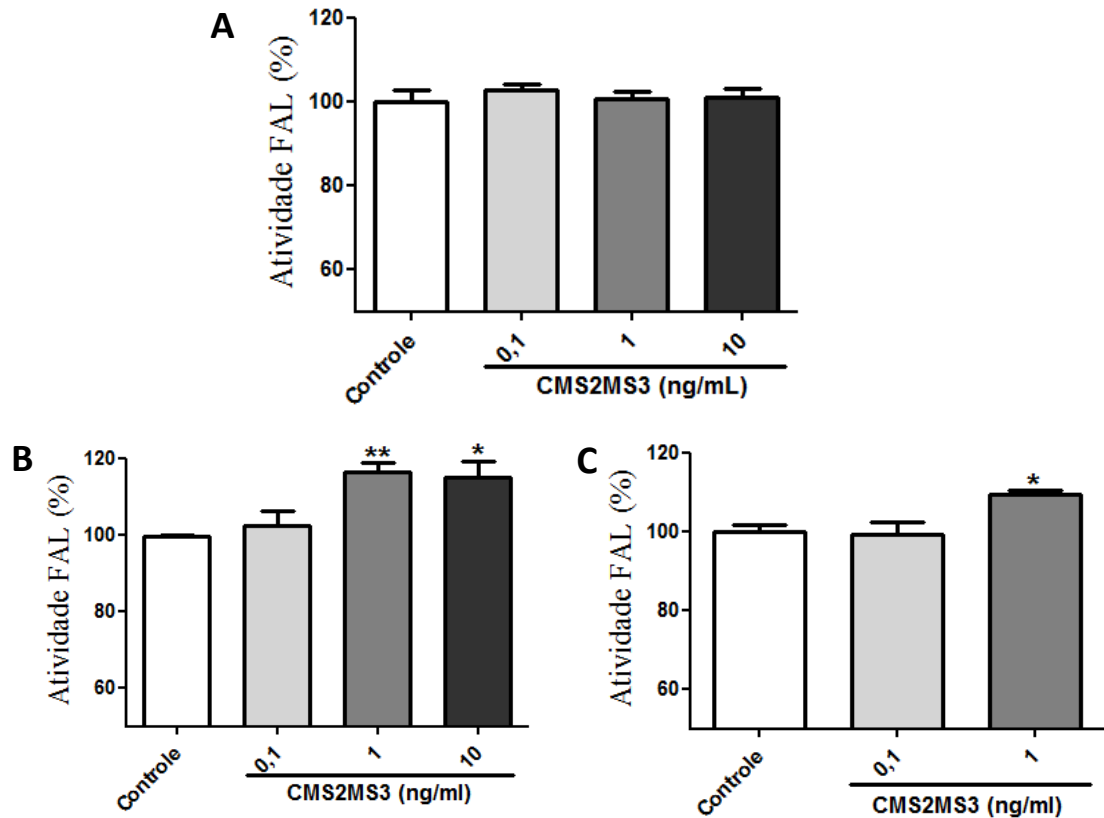


Figura 18: Efeitos de CMS2MS3 sobre a atividade da fosfatase alcalina (FAL) em osteoblastos primários. Os osteoblastos foram cultivados em placas de 24 cavidades, carenciados da presença de fatores de crescimento durante 24 h e, então, submetidos ao tratamento com CMS2MS3 em concentrações entre 0, 1-10 ng/mL ou controle (meio de cultura osteogênico) durante 3 (A), 9 (B) ou 14 dias (C). A atividade enzimática da FAL foi determinada pelo ensaio de metabolização do BCIP/NBT, conforme descrito no item 3.2.3.2. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. do valor de densidade óptica (D.O em 595nm). O valor está apresentado como porcentagem de atividade de FAL considerando a média obtida nas células controles como 100% de atividade. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.2.3.2 Avaliação da mineralização da matriz extracelular

A avaliação da mineralização da matriz extracelular foi realizada após 14 dias de tratamento em osteoblastos primários. A taxa de mineralização obtida com CMS2 0,1; 1 e 10 ng/mL foi igual a 149 ($149,23 \pm 4,83$, $p < 0,05$), 143 ($142,92 \pm 12,28$, $p < 0,05$) e 156% ($155,82 \pm 12,13$, $p < 0,05$), respectivamente, sendo significativamente diferentes da mineralização observada nas células controles ($100,00 \pm 2,99\%$). A protease CMS2MS3 nas concentrações de 0,1 ($162,60 \pm 15,40$, $p < 0,05$), 1 ($140,4 \pm 9,2$, $p < 0,05$) e 10 ng/mL ($161,9 \pm 10,44$, $p < 0,05$) também foi capaz de estimular a mineralização, sendo significativamente maior do que a observada nas células controle ($100,00 \pm 2,99\%$) (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls) (Figura 19).

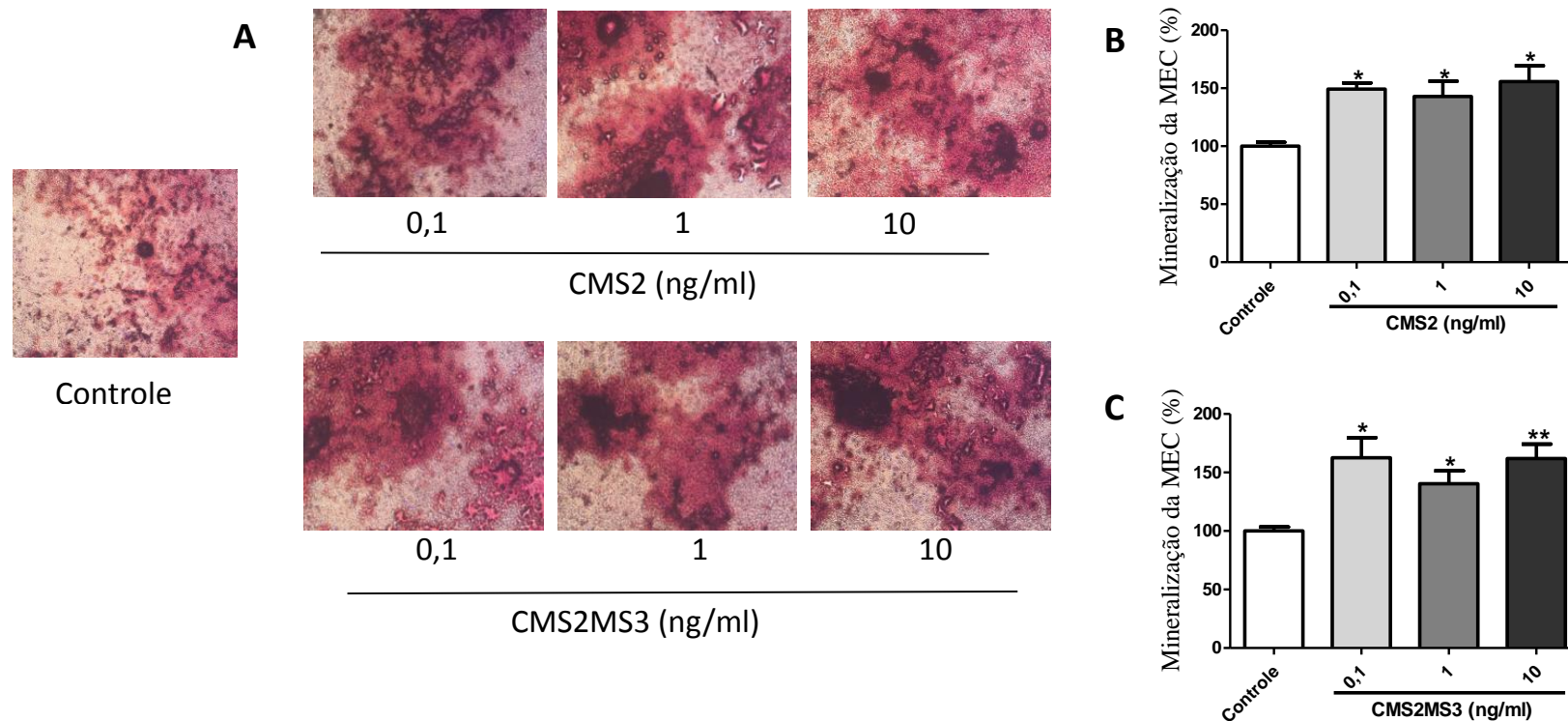


Figura 19: Efeitos de CMS2 e CMS2MS3 sobre a mineralização da matriz extracelular (MEC) de osteoblastos primários. Os osteoblastos foram submetidos ao tratamento com CMS2 e CMS2MS3 em concentrações entre 0,1-10 ng/mL ou controle (meio de cultura osteogênico) durante 14 dias. A mineralização foi avaliada pela coloração com vermelho de alizarina, conforme descrito no item 3.2.3.2. A- Imagens ilustrativas da mineralização da matriz extracelular, 40x. B e C- Análise quantitativa da mineralização, após tratamento com CMS2 e CMS2MS3, respectivamente. Cada coluna representa a média \pm e.p.m. do valor de densidade óptica (D.O em 405nm) em cada grupo. O resultado está apresentado como porcentagem de mineralização, considerando a média obtida nas células controles como 100% de mineralização. Resultados estatisticamente diferentes do grupo controle - * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA, pós-teste Student-Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Como anteriormente descrito, P1G10 é uma fração proteolítica obtida do látex de *V. cundinamarçensis*, que em estudos *in vivo* demonstrou ter atividade cicatrizante cutânea e gástrica em lesões de diferentes etiologias (MELLO et al., 2006, 2008, GOMES et al., 2010). Essas ações são atribuídas ao efeito angiogênico (MELLO et al., 2008) e ao estímulo proliferativo celular sobre diferentes linhagens celulares (GOMES et al., 2009). A proliferação e a angiogênese são eventos também essenciais durante o processo de reparação de outros tecidos, como o ósseo (CARANO & FILVAROFF, 2003). Neste estudo, investigamos a atividade reparadora óssea de P1G10, utilizando-se para isso, um modelo de defeito ósseo intrabucal, confeccionado no osso maxilar de ratos.

Em relação à cicatrização epitelial (terço cervical), um componente importante envolvido no reparo do defeito ósseo, observou-se que o tratamento com P1G10 0,01-0,1% (p/v) não apresentou diferenças significativas em relação ao controle após 7 ou 14 dias do tratamento. Por questões metodológicas, não foi possível fazer inferências quanto à reparação epitelial, após 3 dias do tratamento, uma vez que nesse tempo para remover alguns pontos, foi necessário utilizar instrumentos cirúrgicos que poderiam “danificar” o tecido recém-formado. Por outro lado, em estudos *in vitro* foi mostrado pelo nosso grupo que as proteases CMS2MS2 e CMS2MS3 purificadas, a partir de P1G10, apresentam efeito mitogênico sobre células epiteliais, evento que poderia favorecer a reepitelização da mucosa sobre a área do defeito (GOMES, 2008). Contudo, como ainda não se avaliou a taxa de proliferação nessas amostras teciduais, não podemos afirmar que P1G10 não promoveu mitogênese simplesmente por não termos observado a reepitelização de forma diferente entre os grupos controle e tratados. Isto se deve ao fato da reepitelização ser um evento complexo, que não depende somente da proliferação celular, mas também da migração de células epiteliais, bem como dos componentes presentes no leito da lesão (KOIVISTO et al., 2011).

RABIE et al. (1996) relatam que para o reparo ósseo há necessidade de algum tipo de preenchimento do defeito com a finalidade de prevenir o colapso de tecido mole no interior do mesmo. Entretanto, no presente estudo, optou-se pela administração isolada de P1G10, sem a interferência de outro composto ou

biomaterial, com intuito de se conhecer sua atuação em um modelo de lesão, nunca antes utilizado para esta amostra. Importante ressaltar, que mesmo sem o referido preenchimento, não foi observado comprometimento da área do defeito, pois como visto em resultados, após 14 dias o preenchimento ósseo já alcançava a maior parte do terço médio dos defeitos, com e sem tratamento.

A avaliação do nível de inflamação revelou a presença de um infiltrado leve nos defeitos controles e tratados com P1G10 (0,01-0,1% p/v), após 3 e 7 dias do tratamento e, em 14 dias, a inflamação esteve ausente. Conforme afirmam MARSELL & EINHORN (2011), a resposta inflamatória aguda ocorre durante os primeiros 7 dias, após a fratura óssea em ratos. Este evento envolve interações entre células, citocinas e fatores de crescimento, que estimulam a angiogênese, atraem e promovem a diferenciação de células-tronco mesenquimais e a síntese de matriz extracelular, sendo isto, crucial para a reparação (XING et al., 2010). No terceiro dia, os defeitos se apresentaram preenchidos por coágulo e rede de fibrina, além de células inflamatórias e fibroblastos em proliferação, não sendo observadas diferenças no reparo entre os grupos experimentais. No entanto, observa-se que a população de células semelhantes a fibroblastos difere quanto a sua distribuição no defeito, sendo que nos controles estão localizados no terço apical e no grupo P1G10 0,01% se encontravam no terço médio. Essa observação sugere um processo de reparo mais avançado, uma vez que, como já constatado, a reparação do defeito se inicia, a partir do terço apical (COSTA-FILHO, 2012).

Da mesma forma, em um modelo de reparo ósseo de alvéolos dentários, após 3 dias do tratamento com os fatores de crescimento, proteína morfogenética óssea-4 (BMP-4) e o fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1), em solução, foi observado que os alvéolos estavam preenchidos por coágulo sanguíneo e infiltrado inflamatório, sem diferenças histológicas em relação ao seu controle. Possivelmente, essa ausência de diferença entre tratados e controles se dê pelo período precoce de avaliação ou, realmente, por uma baixa atividade, uma vez os alvéolos que receberam BMP-4 e TGF- β 1 veiculados em lipossomas apresentaram-se preenchidos por tecido conjuntivo, contendo células fibroblastóides e vasos sanguíneos (FERREIRA et al., 2013).

Neste estudo, também foi analisada a densidade de vasos presentes nos defeitos controles e tratados após 7 e 14 dias do tratamento. A angiogênese é

essencial para a reparação e desenvolvimento ósseo (MARSELL & EINHORN, 2011), uma vez que permite o transporte de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento e de diferenciação (VO et al., 2012). Como observado nas Figuras 12 e 14 não houve diferenças significativas na análise quantitativa realizada nesses dois períodos de avaliação, no entanto, há uma tendência de aumento do número de vasos nos grupos P1G10 0,01 e 0,05%, que poderia ser melhor quantificada com métodos mais sensíveis, como a marcação imunohistoquímica.

Seguindo com o propósito de avaliar o processo de reparo, procedeu-se a mensuração da neoformação óssea. Como mostrado em resultados, 3 dias após o tratamento não foi constatada neoformação óssea em nenhum dos grupos experimentais. Embora seja de conhecimento prévio, que comumente, não há neoformação óssea nesse período, o mesmo foi selecionado para estudo a fim de se ter uma cinética do reparo ósseo promovido pela fração P1G10. Decorridos 7 dias do tratamento, a quantificação da neoformação óssea revelou que as concentrações de P1G10 0,01 e 0,05% (p/v) foram eficazes em acelerar a neoformação óssea (20,5 e 25,6%, respectivamente) em relação aos controles (7,6%), não sendo constatado esse efeito para P1G10 0,1% (p/v) (12,8%) (Figura 12). Após 14 dias, os índices de neoformação óssea entre os grupos experimentais foram semelhantes (Figura 14).

Confrontando esses dados com os anteriores do nosso grupo, obtidos ao administrar P1G10 em lesões cutâneas, verifica-se que nas lesões por escoriações na pele, a concentração eficaz em acelerar o processo cicatricial foi 0,1% (p/v) (MELLO et al., 2006), 0,01 e 0,1% (p/v) em lesões por queimadura (GOMES et al., 2010) e em um modelo de lesão excisional foi 0,05% (p/v) (FREITAS, 2011). Desse modo, as concentrações que demonstraram eficácia na reparação óssea, apesar de atuarem em tipos teciduais diferentes são da mesma ordem de grandeza daquelas eficazes na cicatrização cutânea. Provavelmente, isso ocorre porque o processo de reparo no tecido ósseo e cutâneo envolve eventos clássicos de reparação regulados por células, matriz extracelular e fatores de crescimento (AGAIBY & DYSON 1999, LUGINBUEHL et al., 2004). Em ambos os tecidos a resposta inicia-se pela hemostasia e desencadeamento de uma resposta inflamatória (EINHORN et al., 1995). À medida que evolui, o coágulo é substituído por um tecido de granulação, o qual será formado, principalmente, por fibroblastos que sintetizam fibras colágenas e, também, por vasos sanguíneos em proliferação (HOLLINGER et al., 1996). Na fase de reparo

propriamente dita, os eventos diferem-se nos tipos teciduais, uma vez que envolvem linhagens celulares específicas.

Na literatura se encontram relatos de outras classes de proteases relacionadas ao reparo ósseo. A trombina, que é uma serino protease, que desempenha um papel na coagulação sanguínea, através da clivagem do fibrinogênio (SONG et al., 2005). Além disso, é capaz de estimular a proliferação de células musculares lisas (ANTONACCIO et al., 1993), células endoteliais (BRASS & MOLINO, 1997) e fibroblastos (CHEN et al., 1994). Há descrito que o peptídeo TP508, que representa a sequência do domínio de ligação ao receptor de trombina humana, apresenta um potencial papel terapêutico na reparação de fraturas. Esse peptídeo promove a angiogênese e aumenta a formação óssea pela indução de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios (WANG et al., 2005). Apesar de não se conhecer estudos realizados com outras cisteíno proteases em modelos de defeitos ósseos, há descrições da utilização da bromelina (BRIEN et al., 2004) e da papaína (ARAVIND et al., 2013), cisteíno proteases obtidas da *Ananas comosus* e da *Carica papaya*, respectivamente, pelas suas propriedades anti-inflamatórias no tratamento da osteoartrite, uma condição patológica que pode acarretar perda de massa óssea (BRIEN et al., 2004).

A formação óssea envolve uma série de eventos, que incluem a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, resultando na formação de matriz mineralizada. Os osteoblastos são as principais células envolvidas nesse processo, assim, os agentes que regulam a formação óssea podem atuar aumentando a proliferação dessas células ou promovendo a diferenciação de precursores de osteoblastos (WANG et al., 2012). A partir da constatação da atividade reparadora óssea promovida por P1G10, estudou-se o efeito de uma de suas subfrações CMS2 e da protease CMS2MS3, derivada desta última, sobre os eventos de proliferação e diferenciação de osteoblastos primários. Optou-se pela análise da atividade das subfrações de P1G10, uma vez que Gomes (2008) ao avaliar a proliferação de fibroblastos promovida por P1G10, não observou efeito mitogênico sobre essa linhagem celular, provavelmente, pela alta atividade proteolítica da fração.

Como visto em resultados, CMS2 (10-100 ng/mL) e CMS2MS3 (10-50 ng/mL) estimularam a proliferação celular entre 13 e 32%, não tendo sido observado efeito mitogênico nas concentrações inferiores avaliadas (0,1 e 1 ng/mL). Esse efeito sobre

osteoblastos ocorreu numa faixa de concentração, que se assemelha a que demonstrou efeito mitogênico sobre fibroblastos, porém em níveis de estimulação mais baixos (22% e 70%, respectivamente) (GOMES, 2008).

As células osteoblásticas maduras são caracterizadas por um aumento da expressão de fosfatase alcalina (FAL), um marcador precoce de diferenciação, aumento da produção de matriz e eventual mineralização da matriz extracelular. A FAL, é uma enzima ubíqua que catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato em meio com pH alcalino (SABOKBAR et al., 1994), sendo um dos marcadores bioquímicos mais utilizados na avaliação da atividade dos osteoblastos (SAY et al., 1991). Após 3 dias de tratamento com CMS2 e CMS2MS3 não houve alterações na atividade de FAL em qualquer uma das concentrações avaliadas. Já no nono dia de tratamento, CMS2 e CMS2MS3 nas concentrações de 1 e 10 ng/mL foram capazes de estimular a atividade de FAL. A evolução do tratamento até 14 dias mostrou que a concentração de 1 ng/mL tanto de CMS2, quanto de CMS2MS3, permaneceu eficaz em estimular a atividade de FAL em relação as células controles.

Para prosseguir com a avaliação da diferenciação de osteoblastos, procedeu-se a análise da mineralização da matriz extracelular, que indica a diferenciação avançada. A análise foi realizada após 14 dias de tratamento, pela coloração com o vermelho de alizarina em cultura de osteoblastos que não sofreram qualquer tripsinização. Isso porque, é descrito na literatura que os nódulos de mineralização podem ser diminuídos com o número de passagens (HOEMANN et al., 2009). Os resultados obtidos mostraram que nas células tratadas com CMS2 e CMS2MS3 (0,1-10 ng/mL) a deposição de mineral foi maior quando comparadas as células controles. De acordo com as medidas de FAL, as concentrações de 1 e 10 ng/mL para ambas as amostras foram as eficazes no estímulo dessa atividade. Esperava-se que essas mesmas concentrações fossem as únicas a aumentar a mineralização da matriz extracelular. Contudo, como já visto, para CMS2 e CMS2MS3 em 0,1 ng/mL também foi observado estímulo da formação de matriz mineralizada. Isso pode ser devido a uma maior sensibilidade do ensaio de coloração com o vermelho de alizarina.

Nesse contexto, os resultados obtidos neste estudo, estão de acordo ao descrito na literatura sobre o desenvolvimento osteogênico. Culturas osteogênicas, incluindo de osteoblastos primários e linhagens imortalizadas, seguem um processo de desenvolvimento em duas fases, durante a primeira (primeira semana de cultivo)

apresentam atividade de FAL e expressam outros genes ósseos específicos, além de produzir uma matriz de colágeno. Durante a segunda fase de maturação (segunda semana de cultivo), observa-se a mineralização da matriz com deposição de cristais de fosfato de cálcio (WANG et al., 1999).

Em estudos *in vitro* foi mostrado que o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) apresenta efeito mitogênico sobre osteoblastos na mesma faixa de concentrações que a determinada neste trabalho, entre 1-100 ng/mL. Em relação à diferenciação dessas células, avaliada pela mineralização da matriz extracelular, a sinalização induzida pelo FGF desempenha um duplo papel. Constatou-se que um tratamento limitado em tempo (3 dias) de culturas de osteoblastos primários com FGF teve um efeito estimulador sobre a diferenciação celular e mineralização da matriz, porém este efeito não foi verificado quando o tratamento das células foi contínuo, mostrando um efeito dependente do estágio de maturação celular (FAKHRY et al., 2005).

Vários outros fatores de crescimentos têm sido investigados pelo seu potencial terapêutico na regeneração de defeitos ósseos, incluindo as BMPs, TGF- β , IGF, VEGF e PDGF (LIEBERMAN et al., 2002) e, também, *in vitro* na promoção da proliferação e diferenciação de osteoblastos (XIAO et al., 2002; QIN et al., 2005). Esses fatores de crescimento atuam na promoção da formação óssea expandindo as populações celulares, como as das células mesenquimais osteoprogenitoras, bem como, induzem a expressão do fenótipo osteoblástico diferenciado. O VEGF tem potencial para a reparação óssea, uma vez que estimula a angiogênese, um pré-requisito para a formação do tecido ósseo (WOZNEY & SEEHERMAN, 2004).

A análise da atividade reparadora em alvéolos dentários promovida por PDGF-BB ou IGF, isolados ou veiculados em lipossomas, mostrou que após 7 dias do tratamento, nos alvéolos que receberam os fatores de crescimento contidos em lipossomas a formação óssea foi maior (ABREU et al., 2013). Os FGFs também têm funções reguladoras importantes na formação óssea. O papel desse fator foi avaliado na formação óssea em ratos nocautes para o FGF-2, sendo observada uma diminuição significativa no volume ósseo trabecular nestes animais (MONTERO et al., 2000).

Em relação aos mecanismos envolvidos nos efeitos aqui discutidos, ressalta-se que as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) podem estar

envolvidas, uma vez que é descrito a sua participação na regulação de respostas celulares, como proliferação, diferenciação e apoptose (PEARSON et al. 2001). Já foi mostrado pelo nosso grupo, que o estímulo de proliferação celular promovido por CMS2MS2, outra protease contida na subfração CMS2, sobre fibroblastos é dependente da ativação de ERK-quinase regulada por sinal extracelular (GOMES et al., 2009). Do mesmo modo, RAUCCI et al. (2008) mostraram que a ativação de ERK é necessária para a mitogênese de osteoblastos induzida pelo FGF.

Várias especulações têm sido feitas, a fim de desvendar o envolvimento da via das MAPKs durante a diferenciação de osteoblastos. Tem sido descrito que interações célula-matriz, através de integrinas geram sinais essenciais para a diferenciação osteoblástica. Nessas células a interação entre o colágeno tipo 1 e a integrina $\alpha 2$ - $\beta 1$ induz a ativação da quinase de adesão focal (FAK) e de ERK. A interação BMP-integrina e FAK-ERK ativadas por colágeno é necessária para a diferenciação osteoblástica. No entanto, ainda pouco se conhece sobre essas interações (SUZAWA et al., 2002). As MAPKs constituem um importante transdutor de sinais de integrinas para o núcleo celular (XIAO et al., 2002), sendo requerida para a transcrição dependente de Cbfa1, um fator de transcrição específico dos osteoblastos (XIAO et al., 2000). Além desses mecanismos, Raucci et al. (2008) observaram que durante a diferenciação de osteoblastos primários tanto a ERK1/2 quanto a AKT estão fosforiladas. No entanto, a inibição da ERK 1/2 promove uma pequena redução da diferenciação celular, ao passo que a inibição da AKT a reduz drasticamente, constatando que a AKT regula fortemente a diferenciação de osteoblastos. Nesse contexto, sabendo-se do envolvimento da via das MAPKs na proliferação e diferenciação de osteoblastos, pode-se sugerir que a mesma também esteja envolvida da atividade proliferativa e diferenciadora de osteoblastos promovida por CMS2 e CMS2MS3, se fazendo necessário estudar tais mecanismos.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, evidenciamos a atividade reparadora óssea exercida pela fração P1G10 em modelo de defeito ósseo intrabucal. Aliado a isso, verificamos que a subfração CMS2 e a protease CMS2MS3, purificadas a partir de P1G10, estimulam a proliferação e diferenciação de osteoblastos, efeitos que podem estar vinculados ao reparo ósseo observado, uma vez que os osteoblastos são células intimamente envolvidas na formação óssea.

7. REFERÊNCIAS

ABREU, F. A. M. FERREIRA, C. L.; SILVA, G. A. B. et al. Effect of PDGF-BB, IGF-I growth factors and their combination carried by liposomes in tooth socket healing. **Braz. Dent. J.** 24(4): 299-307, 2013.

AGAIBY, A.D.; DYSON, M. Immuno-inflammatory cell dynamics during cutaneous wound healing. **J. Anat.** 195:531-542, 1999.

ANTONACCIO, M. J.; NORMANDIN, D.; SERAFINO, R, MORELAND, S. Effects of thrombin receptor activating peptides on rat aortic vascular smooth muscle. **J. Phamacol. Exp. Ther.**, 266: 125-132, 1993.

ARAVIND, G.; BHOWMIK, D.; DURAIVEL, S.; HARISH, G. et al. Traditional and Medicinal Uses of *Carica papaya*. **J Med Plants Res.** 1 (1), 2013.

ARONOW, M. A. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. **J. Cell. Physio** 143:213-221, 1990.

AROSARENA, O. A.; COLLINS, W. L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: A comparison of two carriers. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 132:592-597, 2005.

AYELLO, E. A.; CUDDIGAN, J. E. Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. **Adv Skin Wound Care.** 17(2):66-75, 2004.

BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS, C. E. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. **J Sci Food Agric.** 51:1-9, 1990.

BARNES, G. L.; KOSTENUIK, P. J.; GERSTENFELD, L. C. Growth factor regulation of fracture repair. **J. Bone Miner. Res.** 11, 1999.

BASMANAV, F.B.; KOSE, G. T.; HASIRCI, V. Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering. **Biomaterials**. 29:4195-4204, 2008.

BELLOWS, C.G.; AUBIN, J. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. **Dev Biol**. 133:8-13, 1989.

BEZERRA, B. B.; BRAZÃO, M. A. M.; CAMPOS, M. L. G. et al. Association of hyaluronic acid with a collagen scaffold may improve bone healing in critical-size bone defects. **Clin. Oral Impl. Res.** 23:938-942, 2012.

BRASS, L.F.; MOLINO, M. Protease-activated G protein-coupled receptors on human platelets and endothelial cells. **Thromb. Haemost.** 78: 234-241, 1997.

BRAVO, L. M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C. A biochemical comparison between latex from *C. candamarcensis* and *C. papaya*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 27:2831-2862, 1994.

BRIEN, S.; LEWIS G.; WALKER, A. et al. Bromelain as a Treatment for Osteoarthritis: a Review of Clinical Studies. **ECAM**. 1(3):251-257, 2004.

CARANO, R.A.D.; FILVAROFF, E.H. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discov Today**. 8(21):980-89, 2003.

CARVALHO, L.R.P.; BREYNER, N. M.; HELL, R. C. R. et al. Healing Pattern in Calvarial Bone Defects Following Bone Regeneration in Rats Guided by Chitosan Scaffold and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. **The Open Tissue Engineer Regener Med J**. 5: 25-34, 2012.

CHAUDHARY, L. R.; HOFMEISTER, A. M.; HRUSKA, K. A. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. **Bone**. 34: 402-411, 2004.

CHEN, Y.H.; POUYSSÉGUR, J.; COURTNEIDGE, S. A. et al. Activation of SRC family kinase activity by the G protein-coupled thrombin receptor in growth-responsive fibroblasts. **J. Biol. Chem.** 269: 27372-27377, 1994.

CHEN, G.; DENG, C.; LI, Yi-Ping. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. **Int. J. Biol. Sci.** 8(2), 2012.

CHEUNG, C. The future of bone healing. **Clin Podiatr Med Surg.** 22:631-641, 2005.

CLAES, L.; RECKNAGEL, S.; IGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nat. Rev. Rheumatol.** 8(3):133-43, 2012.

COSTA-FILHO, L.B. da. **Efeito dos biomateriais a base de quitosana e ácido hialurônico no reparo de defeito ósseo intrabucal em ratos.** 104f. 2012. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

CRANE, G.M. ISHAUG, S. L.; MIKOS, A. G. Bone tissue engineering. **Nat. Med.** 1:1322-1324, 1995.

CZEKANSKA, E.M.; STODDART, M.J.; RICHARDS, R.G.; HAYES, J.S. In search of an osteoblast cell model for *in vitro* research. **Eur Cell Mater.** 24:1-17, 2012.

DIMITRIOU, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine.** 9:66, 2011.

DITZ, D.; FIGUEIREDO, C.; LEMOS, F. O. et al. The antitumoral activity of proteases from *C. candamarcensis* on murine melanoma B16F1 involves antiangiogenic action, loss of cell adhesion and apoptosis. Submetido.

DOBLARÉ, M. et al. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Eng Fract Mech.** 71(13):1809-1840, 2004.

EINHORN, T. A.; MAJESKA, R. J.; RUSH, E.B. et al. The expression of cytokine activity by fracture callus. **J Bone Miner Res.** 10(8):1272-81, 1995.

EINHORN, T. A. The Science of Fracture Healing. **J Orthop Trauma.** 19(10), 2005.

FAKHRY, A.; RATISOONTORNA, C.; VEDHACHALAM, C. et al. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. **Bone.** 36:254-266, 2005.

FEI, Y.; XU, Ren-He; HURLEY, M. M. Stem cell-based bone repair. **Am J Stem Cell.** 1(2):106-113, 2012.

FERREIRA, M. A. N. D.; BARCELOS, L. S.; CAMPOS, P. P. et al. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor deficient mice (PAFR-KO). **Br J Clin Pharmacol.** 141:1185-1192, 2004.

FERREIRA, C. L.; ABREU, F. A. M.; SILVA, G. A. B. et al. TGF- β 1 and BMP-4 carried by liposomes enhance the healing process in alveolar bone. **Arch Oral Biol.** 58:646-656, 2013.

FIGUEIREDO C. **Avaliação das propriedades antitumoral e antimetastática de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* em modelo de melanoma murino.** 87f. 2009. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

FREITAS, K. M. **Avaliação dos efeitos da fração proteolítica P1G10 de *Vasconcellea cundinamarcensis* sobre a cicatrização de lesões cutâneas excisionais em camundongo.** 63f. 2011. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

GERIS L.; GERISCH, A.; SLOTEN, J.V. et al. Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. **J Theor Biol.** 251:137-158, 2008.

GOMES, M. T. R.; MELLO, V. J.; RODRIGUES, K. C. et al. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. **Planta Med**, 71:244-248, 2005.

GOMES M.T.R. **Caracterização bioquímica e farmacológica de proteases do látex de *Carica candamarcensis* com atividade mitogênica.** 146f. 2008. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica e Imunologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

GOMES, M.T.R.; TURCHETTI, A. P; LOPES M.T.; SALAS, C. E. Stimulation of fibroblast proliferation by the plant cysteine protease CMS2MS2 is independent of its proteolytic activity and requires ERK activation. **J. Biol. Chem.** 390:1285-1291, 2009.

Gomes, F. S. L. **Efeito da fração proteolítica de *Carica candamarsensis* na cicatrização cutânea: avaliação pré-clínica e clínica fase I.** 270f. 2009. Tese (Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem), Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais

GOMES, F. S.L.; SPÍNOLA, C. V.; RIBEIRO, H. A. et al. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. **Burns.** 36: 277-283, 2010.

GREGORY, C. A.; GUNN, W. G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D. J. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem.** 329(1):77-84, 2004.

HARDY, R.; COOPER, M. S. Bone loss in inflammatory disorders. **J. Endocrinol.** 201, 309-320, 2009.

HOEMANN, C. D.; EL-GABALAWY, H.; MCKEE, M. D. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. **Pathol Biol.** 57:318-323, 2009.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. K.; ORE, P. et al. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surg. Oral Med. Oral.** 82(6), 1996.

HONMA, T. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Dis.** 14:457-464, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: **Histologia Básica.** 9.ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.

KALFAS, I.H. Principles of bone healing. **Neurosurg Focus.** 10(4):E1, 2001.

KANCZLER, J.M; OREFFO, R.O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. **Eur Cell Mater.** 2(15):100-14, 2008.

KARTSOGIANNIS, V.; NG, K.W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. **Mol Cell Endocrinol.** 228:79-102, 2004.

KASSEM M.; ABDALLAH, B.M; SAEED H. Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. **Arch Biochem Biophys.** 473(2):183-7, 2008.

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast an osteoclast differentiation. **Oral Diseases**, v.8, n.3, p.147-59, 2002.

KOFRON, M.D.; LI X., Laurencin CT. KOFRON, M.D. et al. Protein- and gene-based tissue engineering in bone repair. **Curr Opin Biotechnol.** 15:399-405, 2004.

KOIVISTO, L.; HÄKKINEN, L.; LARJAVA, H. Re-epithelialization of wounds. **Endodontic Topics.** 24(1):59-93, 2011.

KOLAR, P. The Early Fracture Hematoma and Its Potential Role in Fracture Healing. **Tissue Eng Part B Rev.** 16(4), 2010.

KRETLOW, J. D.; YOUNG, S.; KLOUDA, L. et al. Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues. **Adv. Mater.** 21(32-33): 3368-3393, 2009.

KULAR, J.; TICKNER, J.; CHIM, S. M., XU, J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. **Clin. Biochem.** 45:863-873, 2012.

LALANI, Z.; WONG, M.; BREY, E.M. et al. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. **J Oral Maxillofac Surg.** 63: 1500-1508, 2005.

LEMOS, F.O.; FERREIRA, L.A.M.; CARDOSO, V.N. et al. Skin-healing activity and toxicological evaluation of a proteinase fraction from *Carica candamarcensis*. **European Journal of Dermatology**, v.21, n.5, p.722-30, 2011.

LEMOS, F. O.; VILLALBA, M. I. C.; TAGLIATI, C. A. et al., Biodistribution, pharmacokinetic and toxicity of a *Vasconcellea cundinamarcensis* (*Carica candamarcensis*) proteinase fraction with pharmacological activity. Submetido.

LEON, J. Botánica de Los Cultivos Tropicales. San Jose: IICA, 445, 1987.

LIAN J.B.; STEIN, G. S. Concepts of osteoblast growth and differentiation. basis for modulation of bone cell development and tissue formation. **Crit Rev Oral Biol Med.** 3(3):269-305, 1992.

LIAN J. B.; STEIN, G. S. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. **Iowa Orthop J.** 15: 118-140, 1995.

LICHTE, P.; PAPE, H.C.; PUFE, T. et al. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. **Injury.** 42: 569-573, 2011.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. **J Bone Joint Surg.** 84A (6), 2002.

LONG, Fanxin. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 13(1):27-38, 2012.

LUGINBUEHL, V.; MEINEL, L.; MERKLE, H. P. et al. Localized delivery of growth factors for bone repair. **Eur J Pharm Biopharm.** 58(2):197-208, 2004.

MALAVAL, Luc et al. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. **J Cell Biochem.** 74:616-627, 1999.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. The biology of fracture healing. **Injury.** 42:551-555, 2011.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. **Mutation Research**, 113:173-215, 1983.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast–osteoblast communication. **Arch. Biochem. Biophys.** 473: 201–209, 2008.

MEIJER, G.J.; BRUIJN, J. D.; KOOLE, R. et al. Cell-based bone tissue engineering. **PLoS Med.** 4(2):260-264, 2007.

MELO, L.G.N. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. **Clin. Oral Impl. Res.** 16:683-691, 2005.

MELLO, V. J.; GOMES, M. T. R.; RODRIGUES, K. C. L. et al. Plant Proteinases: their potential as therapeutic drugs. In: Govil, J.N., Singh, V.K., Arunachalam, C. **Drug Develop Molec Texas Studium Press**, 211-224, 2006.

MELLO, V. J.; GOMES, M. T. R.; LEMOS, F. O. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**. 15(4):237-244, 2008.

MONTERO, A.; OKADA, Y.; TOMITA, M. et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. **J Clin Invest**. 105(8):1085-93, 2000.

MEYER, U.; JOOS, U.; WIESMANN, H. P., Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering Part III, **Int J Oral Maxillofac Surg**. 33(7):635-41, 2004.

NAKASHIMA, K.; CROMBRUGGHE, B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation, **Trends in Genetics**. 19(8): 458-66, 2003.

NEVE, A.; CORRADO, A.; CANTATORE, F.P. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. **Cell Tissue Res**. 343: 289-302, 2011.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Test N° 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. S.I.: OECD Publications, 1997.

ORTEGA, N., BEHONICK, D. J.; WERB, Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. **Trends Cell Biol**. 14(2):86-93, 2004.

PEARSON, G.; ROBINSON F.; GIBSON, T. B. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr Rev**. 22(2):153-183, 2001.

PORTER, J.R.; RUCKH, T.T; POPAT, K.C. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnol Prog**. 25(6), 2009.

QIN, L.; TAMASI, J.; RAGGATT, L. et al. Amphiregulin Is a Novel Growth Factor Involved in Normal Bone Development and in the Cellular Response to Parathyroid Hormone Stimulation. **J. Biol. Chem.** 280:3974-3981, 2005.

RABIE, A. B.; DENG, Y.M.; SAMMAN, N. et al. The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone grafts in rabbit skull defects. **J Dent Res.** 75(4):1045-51, 1996.

RAGGATT, L.J.; PARTRIDGE, N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **J. Biol. Chem.** 285:25103-108, 2010.

RAUCCI, A.; BELLOSTA, P.; GRASSI, R. et al. Osteoblast proliferation or differentiation is regulated by relative strengths of opposing signaling pathways. **J Cell Physiol.** 215(2):442-51, 2008.

SABOKBAR, A.; MILLETT, P. J.; MYER, B.; RUSHTON, N. et al. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells *in vitro*. **Bone Miner.** 27, 57-67, 1994.

SAY, J.C.; CIUFFI, K.; FURRIEL, R. P. M. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. **Biochim Biophys Acta.** 1074:256-62, 1991.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **Eur Cell Mater.** 15:53-76, 2008.

SHYNG, Y.C.; DEVLIN, H.; RICCARDI, D. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. **Arch Oral Biol.** 44:751-757, 1999.

SILVA, A. C. A.; LEMOS, F. O.; FIGUEIREDO, C. et al. Evaluation of the gastric antiulcer activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* latex. In: 16th

World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2010, Copenhagen. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. v. 107. p. 180, 2010.

SILVER, I.A.; DEAS, J.; ERECIŃSKA, M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. **Biomaterials**. 22:175-85, 2001.

SOEJIMA, K.; KLEIN-NULEND, J.; SEMEINS, C.M.; BURGER, E.H. Different responsiveness of cells from adult and neonatal mouse bone to mechanical and biochemical challenge. **J Cell Physiol**. 186:366-70, 2001.

SONG, S. J.; PAGEL, C. N.; CAMPBELLET, T. M. et al. The Role of Protease-Activated Receptor-1 in Bone Healing. **American Journal of Pathology**, 166(3), 2005.

SOUCACOS, P.N.; JOHNSONB, E. O.; BABISC, G. et al. An update on recent advances in bone regeneration. **Injury**. 39S2, S1-S4, 2008.

SUZAWA, M.; TAMURA, Y.; FUKUMOTO, S. et al. Stimulation of Smad1 transcriptional activity by Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. **J Bone Miner Res**.17(2), 2002.

TEIXEIRA, R. D.; RIBEIRO, H. A. L.; GOMES, M. T. R. et al. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Physiol. Biochem**. 46, 956-961, 2008.

UUSITALO, H.; RANTAKOKKO, J.; AHONEN, M. et al. A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. **Bone**. 28(4) :423-429, 2001.

VALÉRIO, P.; GUIMARÃES, M. H. R.; PEREIRA, M. M.; LEITE, M. F.; GOES, A. M. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams. **J. Mater. Sci. Mater. Med**. 16:851-856, 2005.

VIANA, C. T. R. **Avaliação da atividade antitumoral e imunomodulatória de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* Hook 1835 em modelo de carcinoma de Ehrlich.** 69f. 2010. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

VILLALBA, M. I. C. **Avaliação de parâmetros toxicológicos da fração P1G10, obtida do látex de *Carica candamarcensis*.** 117f. 2010. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

VILLALBA, M. I. C.; SILVA, A.; TAGLIATI, C. et al. Acute systemic toxicological and mutagenic evaluation of a proteolytic fraction from the latex of *Carica candamarcensis*. **In: XII International Congress of Toxicology.** Barcelona, Spain, 2010.

VO, T. N.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G.. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 64(12):1292-1309, 2012.

WAGNER, E.F.; KARSENTY, G.. Genetic control of skeletal development. **Curr Opin Genet Dev.** 11:527-532, 2001.

WALRAEVENS, V.; VANDERMEERS-PIRET, M. C.; VANDERMEERS, A. et al. Isolation and primary structure of the CCl papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook. **J. Biol. Chem.**, 380(4):485-488, 1999.

WANG D.; CHRISTENSEN, K.; CHAWLA, K. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation mineralization potential. **J Bone Miner Res.**14:893-903, 1999.

WANG, H.; LI, X.; TOMIN, E. et al. Thrombin peptide (TP508) promotes fracture repair by up-regulating inflammatory mediators, early growth factors, and increasing angiogenesis. **J Orthop Res.** 23:671-679, 2005.

WANG, W.; OLSON, D.; CHENG, B. *Sanguis Draconis* resin stimulates osteoblast alkaline phosphatase activity and mineralization in MC3T3-E1 cells. **J Ethnopharmacol.** 142:168-174, 2012.

WENG Y.; WANG, M.; LIU, W. Repair of experimental alveolar bone defects by tissue-engineered bone. **Tissue Eng.** 12(6), 2006.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.** 83: 835-870, 2003.

WOZNEY, J. M.; SEEHERMAN, H. J. Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair. **Curr Opin Biotechnol.** 15:392-398, 2004.

XIAO, G.; JIANG, D.; THOMAS, P. et al. MAPK Pathways Activate and Phosphorylate the Osteoblast-specific Transcription Factor, Cbfa1. **J. Biol. Chem.** 275:4453-4459, 2000.

XIAO, G.; GOPALAKRISHNAN, R.; JIANG, D. et al. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. **J Bone Miner Res.** 17(1), 2002.

XING, Z.; LU, C.; HU D. et al. Multiple roles for CCR2 during fracture healing. **Dis Model Mech.** 3(7-8): 451-458, 2010.

YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins. **Endocr Rev.** 21(4): 393-411, 2000.

YE, J.H.; XU, Yuan-Jin; GAO, J. et al. Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2- modified iPSCs. **Biomaterials.** 32(22): 5065-76, 2011.

ZHAO, J.; SHINKAI, M.; TAKEZAWA, T. Bone regeneration using collagen type I vitrigel with bone morphogenetic protein-2. **J Biosci Bioeng.** 107(3):318-23, 2009.

ZHAO, Y. P.; TIAN, Qing-yun; FRENKELET, S. et al. The promotion of bone healing by progranulin, a downstream molecule of BMP-2, through interacting with TNF/TNFR signaling. **Biomaterials.** 34:6412-6421, 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Características da espécie *Vasconcellea cundinamarcensis* e caracterização bioquímica do seu látex.

Vasconcellea cundinamarcensis

Vasconcellea cundinamarcensis, antes denominada como *Carica candamarcensis* (Figura 1), é uma espécie que pertence à família *Caricaceae*, nativa da América do Sul, localizada principalmente na região Andina, a qual se estende do Panamá até o Chile. É encontrada predominantemente em altitudes superiores a 1000 metros, sendo popularmente conhecida como “mamão da montanha” (WALRAEVENS et al., 1999).

O fruto de *V. cundinamarcensis* é elipsóide, de coloração amarelada quando maduro (Figura 1C), possui cinco depressões largas e longitudinais, mede de 5 a 15 cm de comprimento e contém uma polpa delgada, aquosa e aromática, que somente pode ser consumido após o cozimento (LEON, 1987). No látex extraído desta planta são encontrados carboidratos, vitaminas e peptídeos de baixo peso molecular, além de enzimas do grupo das cisteíno-proteases dotadas de atividade proteolítica superior à encontrada em *Carica papaya*, uma das espécies mais conhecidas desta família, da qual se obtém a enzima papaína (BAEZA et al., 1990; BRAVO et al., 1994).



Figura 1: *Vasconcellea cundinamarcensis*. A-Inflorescências; B- Frutos imaturos; C- Fruto maduro. Fonte: Ecocrop.fao.org e fruitipedia.com. Acesso: 14/11/13.

Caracterização bioquímica: separações cromatográficas sequenciais do látex de *V. cundinamarcensis*

A primeira separação cromatográfica do látex de *V. cundinamarcensis*, em coluna Sephadex G10 leva a obtenção de frações protéicas, que se agrupam em dois picos cromatográficos principais denominados P1G10 e P2G10 (Figura 2).

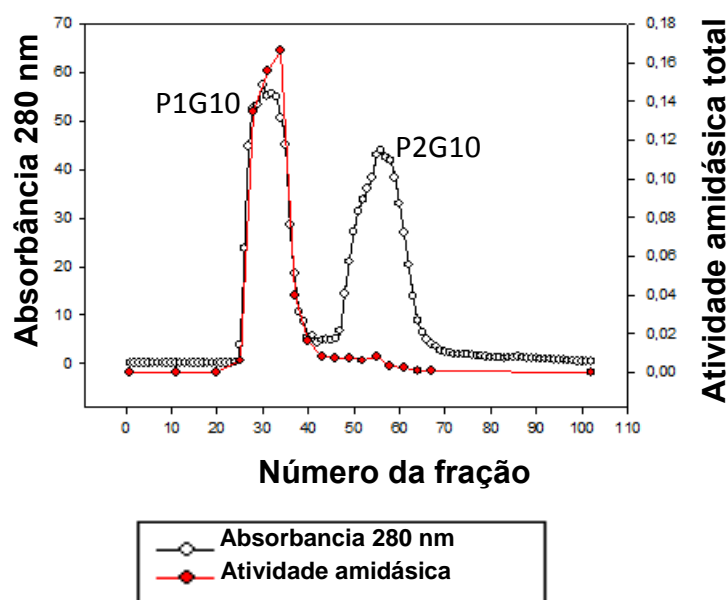


Figura 2: Perfil cromatográfico do látex em resina Sephadex G-10. A solução de látex ativado de *V. cundinamarcensis* foi aplicada em coluna contendo resina Sephadex G-10 e eluída com solução de acetato de sódio 1,0 M (pH 5,0), com fluxo de 0,25 mL/min. Frações de 5 mL foram coletadas para determinação do perfil protéico (absorbância a 280 nm) e atividade amidásica total.

Em vista da maior atividade proteolítica apresentada por P1G10, objetivou-se investigar quais são as proteases que compõem esta fração. Para isso, a mesma foi submetida a outras duas etapas de purificações cromatográficas sequenciais. Em coluna de troca catiônica CM-Sephadex C-25, após a aplicação de P1G10, houve uma separação em picos denominados CMS1 a CMS3 (Figura 3). A subfração CMS1 apresenta característica mais básica e atividade proteolítica maior, seguida por CMS2 que é mais ácida com moderada atividade proteolítica. Na maioria dos processos cromatográficos realizados o pico da subfração CMS3 aparece como um “ombro” do pico de CMS2 (TEIXEIRA et al., 2008). A avaliação do efeito mitogênico dessas subfrações, mostrou atividade proliferativa para CMS2 e CMS3 sobre fibroblastos L929 (GOMES et al., 2005).

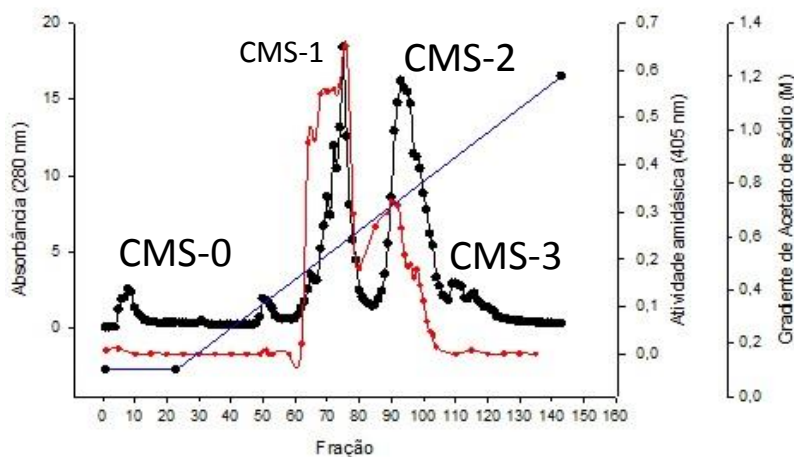


Figura 3: Separação cromatográfica de subfrações proteolíticas, a partir da fração P1G10 em coluna CM-Sephadex. A solução de P1G10 foi inicialmente eluída com solução de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), com fluxo de 0,5 mL/min. Após lavagem exaustiva, iniciou-se a aplicação do gradiente de acetato de amônio até 1,5 M. Frações de 20 mL foram coletadas para determinação do perfil protéico (absorbância a 280 nm) e atividade amidásica.

A fração CMS2 foi submetida a uma coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose, mostra ser composta por cinco proteases denominadas como CMS2MS1 a CMS2MS5, sendo que duas delas (CMS2MS2 e CMS2MS3) apresentam estímulo proliferativo sobre fibroblastos L929 (GOMES et al., 2009).

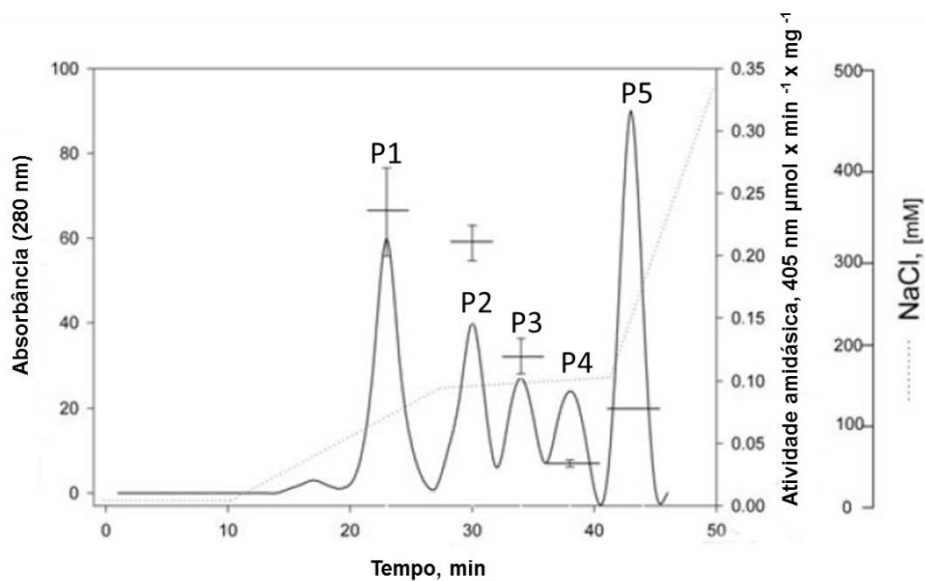



Figura 9: Separação cromatográfica da subfração CMS2 em coluna de troca catiônica Mono-S Sepharose. Nesta cromatografia foram aplicados 3 mg de CMS2. As amostras foram eluídas com um gradiente não linear de NaCl, com 5 mM de EDTA e 25 mM de tampão tetraborato de sódio (pH 9,5). O perfil protéico foi medido pela absorbância em 280 nm. A cromatografia foi realizada com fluxo de 1 ml/min. “P1”, “P2”, “P3”, “P4” e “P5” representam as proteases denominadas CMS2MS1, CMS2MS2, CMS2MS3, CMS2MS4 e CMS2MS5, respectivamente.

ANEXO

ANEXO A

 <p>UFMG</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 107 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação dos efeitos de frações do látex de <i>Vasconcellea cundinamarzensis</i> sobre a reparação de defeitos ósseos em ratos.", que tem como responsável Miriam Teresa Paz Lopes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 02/07/2013. Este certificado espira-se em 02/07/2018.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 107 / 2013, related to the Project entitled "Effects of latex <i>Vasconcellea cundinamarzensis</i> fractions on repair of bone defects in rats.", under the supervision of Miriam Teresa Paz Lopes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 02/07/2013. This certificate expires in 02/07/2018.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 02/07/2013.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>	