



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ANTÔNIO SECCO MARTORANO

EFEITO DO EXTRATO DA *Ilex paraguariensis* SOBRE CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS

RIBEIRÃO PRETO

2020

Antônio Secco Martorano

EFEITO DO EXTRATO DA *Ilex paraguariensis* SOBRE CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa M. S. C. Raucci

RIBEIRÃO PRETO

2020

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da Biblioteca Central da
UNAERP - Universidade de Ribeirão Preto

Martorano, Antônio Secco, 1995-
M387e Efeito do extrato da *Ilex paraguariensis* sobre células
osteoblásticas / Antônio Secco Martorano. - Ribeirão Preto, 2020.
57 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa M. S. de Castro Raucci.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Odontologia, área de concentração: Implantodontia. Ribeirão Preto, 2020.

1. Osteogênese. 2. *Ilex paraguariensis*. 3. Antioxidantes.
I. Título.

CDD 617.692

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO ANTÔNIO SECCO MARTORANO, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA. Título do trabalho: “**Efeito do extrato da Ilex paraguariensis sobre células osteoblásticas**”.

Aos vinte e nove dias do mês de janeiro de 2020, às nove horas, na sala 13 do Bloco “C” da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, instalou-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado do CD Antônio Secco Martorano, aluno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UNAERP, Área de Implantodontia, sob a presidência da Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci - Professora Assistente Doutora da Universidade de Ribeirão Preto – Curso de Odontologia (UNAERP), com a presença do Proa. Dr. André Pitondo da Silva - Professor Assistente Doutor da Universidade de Ribeirão Preto - Curso de Odontologia - UNAERP e do Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira Professor Doutor Professor Doutor do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic (SLMANDIC). Em seguida, a Senhora Presidente determinou o início dos trabalhos. Após a apresentação o candidato foi arguido pelos senhores examinadores na conformidade das disposições regulamentares pertinentes. Encerrada a arguição cada examinador expressou o seu julgamento considerando o candidato (*aprovado*). Do que, para constar, foi lavrada a presente Ata que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora e pela secretária do Programa de Pós-Graduação, Carla Roberta de Almeida, que secretariou os trabalhos. Ribeirão Preto, 29 de janeiro de 2020.

Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci
(Presidente)

Prof. Dr. André Pitondo da Silva

Prof. Dr. Lucas Novaes Teixeira

Carla Roberta de Almeida
Secretária

Aprovada pelo Conselho de Pós-Graduação em Odontologia no dia 30/01/2020

Prof.ª Dr.ª Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Odontologia

Homologada pela Comissão Central de Pós-Graduação em 30/01/2020

Prof.ª Dr.ª Neide Aparecida de Souza Leffeld
Presidente da Comissão Central de Pós-Graduação



Este estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, com a colaboração dos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP-USP).

Dedico este trabalho

Aos meus amados pais, **José Paulo Martorano** e **Silvia Margareth Secco Martorano**, por serem sempre meus exemplos de vida, amor, cuidado, carinho, companheirismo e dedicação. Por apoiar sempre minhas decisões, acreditando no meu potencial e contribuindo para formar quem realmente sou. Pelas batalhas travadas e vencidas ao longo dos anos, pela educação, segurança, afeto e força que traçaram meus caminhos. Sou grato de coração, corpo e alma pelo incansável apoio e amor incondicional, a vocês todo o meu respeito e admiração. Amo muito vocês!

À minha **Família**, à qual sou extremamente abençoado em fazer parte. Por estarem sempre presentes em todos os momentos dessa longa caminhada, oferecendo força, apoio e motivação. São essas pessoas, que através da sua presença, seus sorrisos, abraços e palavras, tornam minha jornada mais fácil e prazerosa de viver.

Aos meus **amigos**, que se mostraram companheiros em todas as situações. Por isso primeiramente agradeço a todos de coração. Vocês possuem hospedagem de luxo no coração e nas melhores lembranças deste que escrevo. É transcendente o que sinto por vocês e são poucas as coisas na vida que superam isso. Levarei sempre comigo as memórias dos momentos em que me fizeram sorrir, das brincadeiras, do companheirismo diário, dos momentos difíceis, de cada detalhe dos dias que vivemos. Não pensem que por não citar nomes, ficaram de fora dessa singela homenagem. Listar nomes é apenas algo simbólico, o que sinto por vocês, vai muito além disso, cada um tem um lugar especial dentro de mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, *Profa. Dra. Larissa M. S. de Castro Raucci*, que acreditou em mim; que ouviu pacientemente minhas considerações, compartilhando todas as suas idéias, seu vasto conhecimento e experiência, sempre me motivando a ir mais longe. Quero expressar minha gratidão e admiração pela sua pessoa, um exemplo de seriedade e competência, por toda a dedicação, inspiração, disponibilidade, paciência, carinho, amizade, pela humildade e pela atenção que direciona aos que a procuram, sempre com um sorriso gigante no rosto. Durante esses dois anos de orientação não ganhei apenas uma orientadora com enorme conhecimento científico, mas também uma amiga, mãe e companheira de todos os assuntos e momentos. Tenho muito a agradecer pela oportunidade de ser seu orientado, pela confiança, pelo estímulo, sem os quais este trabalho não se tornaria real. Desejo que Deus possa continuar lhe abençoando cada dia mais e nunca se esqueça, foi uma honra poder ser seu orientado. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da sua Magnífica Reitora **Profa. Elmara Lucia O. Bonini**, personalidade constante e pioneira na educação nacional.

Às coordenadoras do curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha C. Silva Sousa** e **Profa. Dra. Danielle Cristine F. Messias**.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha C. Silva Sousa**, agradeço por sempre participar da minha formação desde a graduação e agora como mestre, pelos valiosos ensinamentos que nos motiva e nos faz seguir seu exemplo de ótima profissional.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto: **Prof. Dr. André Pitondo da Silva**, **Profa. Dra. Andrea Marcia Macaccini**, **Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda**, **Prof. Celso Bernardo de Souza Filho**, **Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias**, **Prof. Dr. Edson Alfredo**, **Profa. Dra. Érica Alves Gomes**, **Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior**, **Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni**, **Profa. Dra. Izabela Cristina Mauricio Moris Rivera**, **Profa. Dra. Larissa Spinola de Castro Raucci**, **Prof. Dr. Paulo Esteves Pinto Faria**, **Prof. Dr. Silvio Rocha Correa da Silva**, **Prof. Dr. Walter Raucci Neto** e **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, pela dedicação, atenção, pelos conhecimentos repassados e colaboração à minha formação.

Ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, por toda parceria e conhecimento, possibilitando o desenvolvimento do meu trabalho nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP-USP).

À **Rayana Longo Bigueti Trevisan**, por toda ajuda do mundo dentro e fora do laboratório, com palavras de conforto, conhecimentos e amizade. Obrigado por tudo que tem sido para mim.

Ao **Roger Rodrigo Fernandes**, por toda paciência e conhecimento a mim passados. Obrigado por ter me recebido de braços abertos, por ter puxado a orelha nos momentos necessários e por manter todo laboratório em pleno funcionamento.

À todos os colegas do Laboratório de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, em especial ***Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, Fabíola Singaretti de Oliveira, Milla Sprone Tavares e Adriana Luisa Gonçalves de Almeida.***

Aos funcionários da Universidade de Ribeirão Preto, por todos os bons momentos que estivemos juntos, pela atenção e carinho que tiveram por mim durante esses anos de convívio, desde a graduação até o mestrado.

À ***Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*** (CAPES-PROSUP) pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Já vivi tanta coisa, tenho tantas a viver,
Tô no meio da estrada e nenhuma derrota vai me vencer,
Hoje eu acordei livre: não devo nada a ninguém,
Não há nada que me prenda.

Humberto Gessinger

RESUMO

A utilização de suplementos alimentares e a funcionalização de biomateriais com compostos naturais têm sido avaliadas como estratégias para a obtenção de maior controle e previsibilidade sobre o processo de osseointegração. Embora alguns estudos mostrem benefícios da erva do chá mate (*Ilex paraguariensis*) em diferentes células e tecidos, seus efeitos sobre o tecido ósseo ainda não estão bem estabelecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do extrato de *Ilex paraguariensis* St. Hil (IP) sobre a viabilidade celular, metabolismo e aquisição do fenótipo osteogênico em cultura de células osteoblásticas. Para isso, osteoblastos da linhagem UMR-106 foram plaqueados a 3.000 células/poço em placas de 96 poços, deixados aderir por 24 horas e então expostos ao extrato nas concentrações de 0 (Controle); 3,9; 15,6; 62,5 ou 250 µg/mL do IP em meio osteogênico. Foram avaliados: a viabilidade celular pelo kit live/dead no dia 2, a atividade mitocondrial pelo ensaio colorimétrico MTT nos dias 2 e 5, a atividade de fosfatase alcalina *in situ* por marcação com *Fast red* no dia 3, e a formação de matriz mineralizada por coloração com vermelho de alizarina ao final de 7 dias. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, quando apropriado ($\alpha=5\%$). A análise qualitativa da viabilidade celular mostrou predominância de células viáveis em todos os grupos, embora culturas expostas a 250 µg/mL do IP tenham exibido redução da quantidade de células. O ensaio MTT revelou maior atividade mitocondrial em culturas expostas ao IP a 62,5 µg/mL em relação apenas ao Controle e ao grupo exposto a 250 µg/mL ($p<0,05$). Aos 5 dias, valores semelhantes de atividade mitocondrial foram observados entre os grupos Controle e aqueles expostos a concentrações de até 62,5 µg/mL do IP ($p>0,05$), e redução significativa desse parâmetro no grupo 250 µg/mL ($p<0,05$). A análise qualitativa da marcação por *Fast red* aos 3 dias revelou que todos os grupos exibiram atividade de ALP. Ao final de 7 dias, menor marcação para depósitos de cálcio foi observada em culturas crescidas na presença de 250 µg/mL do IP, enquanto que aspectos macroscópicos semelhantes aos do Controle foram observados nas demais concentrações. Conclui-se que, dentro das condições experimentais utilizadas, concentrações de até 62,5 µg/mL do IP não exibiram citotoxicidade e permitiram a aquisição do fenótipo osteogênico em osteoblastos da linhagem UMR-106 de forma similar ao de culturas Controle, exibindo efeito neutro sobre a osteogênese.

Palavras-chave: Osteogênese. *Ilex paraguariensis*. Antioxidantes.

SUMMARY

The use of dietary supplements and the functionalization of biomaterials with natural compounds have been evaluated as strategies for obtaining greater predictability over the osseointegration process. Although some studies show benefits of the mate tea herb (*Ilex paraguariensis*) in different cells and tissues, its effects on bone tissue are not well known. The aim of the present study was to evaluate the effects of *Ilex paraguariensis* *St. Hil* (IP) extract on cell viability, metabolism and acquisition of the osteogenic phenotype in osteoblastic cell culture. For this, osteoblasts of the UMR-106 strain were plated at 3,000 cells/well in 96-well plates, allowed to adhere for 24 hours and then exposed to the extract at concentrations of 0 (Control); 3.9; 15.6; 62.5 or 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of the PI in osteogenic medium. The following were evaluated: cell viability by the live / dead kit on day 2, mitochondrial activity by the MTT colorimetric assay on days 2 and 5, alkaline phosphatase activity *in situ* by Fast red labeling on day 3, and the formation of mineralized matrix by staining with alizarin red after 7 days. Quantitative data were submitted to ANOVA test, followed by Tukey's post-test, when appropriate ($\alpha = 5\%$). The qualitative analysis of cell viability showed a predominance of viable cells in all groups, although cultures exposed to 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of the PI have shown a reduction in the number of cells. The MTT assay revealed greater mitochondrial activity in cultures exposed to IP at 62.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ compared to the Control and the group exposed to 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ only ($p < 0.05$). At 5 days, similar values of mitochondrial activity were observed between the Control groups and those exposed to concentrations of up to 62.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of the PI ($p > 0.05$), and a significant reduction of this parameter in the 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ group ($p < 0.05$). Qualitative analysis of Fast red labeling at 3 days revealed that all groups exhibited ALP activity. At the end of 7 days, less marking for calcium deposits was observed in cultures grown in the presence of 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of IP, while macroscopic aspects similar to those of the Control were observed in the other concentrations. It was concluded that, under the experimental conditions used, concentrations of up to 62.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of the PI did not exhibit cytotoxicity and allowed the acquisition of the osteogenic phenotype in osteoblasts of the UMR-106 strain in a similar way to that of Control cultures, exhibiting a neutral effect about osteogenesis.

Key-words: Osteogenesis. *Ilex paraguariensis*. Antioxidant.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 19 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 19 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... | 20 |
| 3.2 OBTENÇÃO DA CULTURA CELULAR..... | 21 |
| 3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES E EXPOSIÇÃO DAS CULTURAS..... | 21 |
| 3.4 VIABILIDADE CELULAR..... | 22 |
| 3.5 ATIVIDADE MITOCONDRIAL..... | 23 |
| 3.6 ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA (ALP) <i>IN SITU</i> | 23 |
| 3.7 FORMAÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA..... | 24 |
| 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 25 |
| 4 RESULTADOS | 26 |
| 4.1 EFEITOS DO EXTRATO DE IP SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE OSTEÓBLASTOS DA LINHAGEM UMR-106..... | 26 |
| 4.2 POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO EXTRATO DE IP SOBRE OSTEÓBLASTOS DA LINHAGEM UMR-106..... | 30 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 35 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 40 |

REFERÊNCIAS

APÊNDICE

ANEXOS

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o padrão alimentar sofreu diversas mudanças, afetando diretamente a qualidade dos alimentos ingeridos. Devido ao novo estilo de vida adotado, a preferência por refeições rápidas e satisfatórias ao paladar, porém de menor apelo nutritivo, tomou proporções mundiais (ABREU et al., 2001; FLANDRIN & MONTANARI, 1996; FRANÇA et al., 2012; PINHEIRO, 2001; SOUZA & HARDT, 2002; OLIVEIRA, 1997). Associado à queda na qualidade alimentar, o envelhecimento populacional tem acarretado transformações na incidência e prevalência de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) (Moreira et al., 2013), como a diabetes *mellitus*, doenças respiratórias e cardiovasculares, câncer, obesidade e, inclusive, problemas ósseos relacionados à redução em sua densidade mineral (como a osteoporose) (ALKHATIB et al., 2017; MALTA et al., 2011; TILMAN; CLARK, 2014; VARGAS et al., 2019).

Na odontologia, diversos fatores podem interferir no processo de osseointegração, i.e., na união estável e funcional entre o osso e uma superfície de titânio, entre eles, a presença de doenças sistêmicas. Por exemplo, a osteoporose influencia negativamente o processo de remodelação óssea, impedindo ou retardando a osseointegração (ALBREKTSSON, 1987), além de estar relacionada ao aumento da reabsorção óssea em usuários de próteses convencionais (WOWERN, 2001).

Assim, em pacientes com distúrbios sistêmicos, a reabilitação oral com o uso de implantes osteointegráveis constitui, ainda hoje, um grande desafio clínico (SCULLY; HOBKIRK; D DIOS, 2007; JAVED; ROMANOS, 2009). As doenças crônicas podem apresentar um impacto significativo na taxa de sucesso de novos implantes, onde, por exemplo, pacientes que sofrem com baixo volume e densidade óssea (osteoporose),

apresentam condições ósseas menos favoráveis, aumentando consideravelmente o risco de perda implantar (MOMBELLI; CIONCA, 2006).

É bem estabelecido que as DCNTs podem ser agravadas pelo estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade de ação dos antioxidantes (KOURY; DONANGELO, 2003). O excesso dessas moléculas desempenha um papel importante no desenvolvimento de danos e patologias aos tecidos do organismo (SIES, 1986, SCHINELLA et al., 2000).

Em condições fisiológicas, EROs são produzidos de forma controlada e atuam como moléculas importantes de sinalização celular, regulando a função imunológica, a inflamação, a divisão celular e a resposta ao estresse oxidativo (MA, 2013; KALLAPURA et al., 2014). O acúmulo massivo de EROs pode ser induzido por fatores como radiação, invasão de patógenos, idade, doenças e estresse térmico (BLOKHINA et al., 2003, FINKEL; HOLBROOK, 2000, IKEDA et al., 1999; BHATNAGAR, 1994). Se o sistema antioxidante endógeno for insuficiente para neutralizar completamente as EROs, o dano oxidativo à macromoléculas pode ser observado (SCHINELLA et al., 2000). A oxidação de radicais livres tem como principal consequência o dano ao DNA (possivelmente também às nucleoproteínas): acredita-se que as rupturas das fitas duplas sejam a lesão inicial podendo gerar aberrações aos cromossomos e as cromátides, posteriormente levando a instabilidade genômica com perda de informações ou rearranjos cromossomais, que são eventos moleculares fundamentais na etiologia de diversas patologias, incluindo distúrbios neurológicos e câncer (JACKSON; BARTEK, 2009; MCKINNON, 2009; SIES, 1986). O equilíbrio entre auto-renovação, proliferação e diferenciação de células-tronco progenitoras no sistema hematopoiético depende da regulação dos níveis intracelulares de EROs. A incapacidade de regular altos níveis de EROs leva à anomalias na proliferação, parada do crescimento e morte celular (RICHARDSON; YAN; VESTAL, 2015). No tecido ósseo, as EROs além induzirem a

morte celular, bloqueiam e reduzem a atividade dos osteoblastos e osteócitos, reduzindo a mineralização e favorecendo o processo de osteoclastogênese (ALMEIDA et al., 2007; BONEWALD, 2008, 2011; HENRIKSEN, 2009; JILKA; NOBLE; WEINSTEIN, 2004; LEE et al., 2006; ROMAGNOLI et al., 2013).

Sabe-se que a homeostase do tecido ósseo é mantida pelo equilíbrio entre a atividade de osteoblastos e osteoclastos, células responsáveis pelos processos de formação e reabsorção óssea, respectivamente. Esses processos podem ser modulados por fatores sistêmicos, como hormônios e condições nutricionais, e fatores locais, como citocinas e mediadores locais (KATCHBURIAN; ARANA, 2017). Tendo em vista que os alimentos ingeridos influenciam os processos moleculares das células do organismo humano, têm-se buscado a prevenção e a promoção de saúde através de alimentos e compostos funcionais (LOPEZ-VARELA; GONZALEZ-GROSS; MARCOS, 2002; JIMENEZ-GARCIA et al., 2013; RICORDI; GARCIA-CONTRERAS; FARNETTI, 2015).

A utilização de suplementos alimentares e a funcionalização de biomateriais com compostos naturais têm sido avaliadas como estratégias para a obtenção de maior controle e previsibilidade sobre o processo de regeneração óssea (CAZZOLA et al., 2018; DA SILVA BRASILINO et al., 2018; BRITO et al., 2019). De acordo com a literatura, agentes antioxidantes têm capacidade de favorecer o mecanismo de diferenciação osteoblástica e a formação óssea (BANFI; IORIO; CORSI, 2008; FONTANI et al., 2015; JUN, 2008; ROMAGNOLI et al., 2013), manter vitais os osteócitos que atuam na manutenção do osso e, concomitantemente, reduzir a atividade e diferenciação osteoclástica, evitando queda na densidade óssea (DOMAZETOVIC et al., 2017).

Os efeitos antioxidantes promovidos pelos compostos derivados de ervas naturais têm despertado interesse, devido seu alto valor nutricional e papel na promoção da saúde e

combate a doenças (SCHINELLA et al., 2000). Descrita por Auguste de Saint-Hilaire e popularizada como “erva do chá mate”, a *Ilex paraguariensis* (IP) (LORENZI; MATOS, 2008) é muito consumida nos países da América do Sul, produzida e comercializada principalmente no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina (BRACESCO et al., 2011). No Brasil, o cultivo e colheita são feitos pela extração diretamente da floresta natural ou por um sistema misto, que consiste na combinação do crescimento natural das florestas associado à práticas corretas de cultivo artificial (HECK; DE MEJIA, 2007). A planta pertence à família das *Aquifoliaceae*, de composição química variável, tendo como principais constituintes os compostos fenólicos, xantinas, sapominas, além de grandes concentrações dos derivados de cafeoil, como o ácido clorogênico e o ácido caféico. Encontra-se também a presença de flavonoides, como a rutina e a quercetina, além de minerais e vitaminas (GRIGIONI et al., 2004; FILIP et al., 2001; SMALL; CATLING, 2001; HECK; DE MEJIA, 2007). O preparo da bebida é feito por meio da infusão de folhas secas e picadas da IP. Seu consumo é dado principalmente por suas propriedades diuréticas, anti-inflamatórias e, principalmente, por suas propriedades estimulantes suaves (SCHINELLA et al., 2000), porém, o interesse científico pela erva-mate aumentou principalmente em função de sua composição química, que inclui moléculas responsáveis por inúmeras atividades biológicas e farmacológicas conhecidas, como a eliminação de radicais livres, redução na glicação e tratamento de doenças inflamatórias (JUNIOR; MORAND, 2016).

Os principais e mais estudados constituintes nesta planta são os compostos fenólicos, responsáveis por sua atividade antioxidante. Polifenóis são compostos com um ou mais grupos hidroxila ligados a um anel benzeno (FRAGA et al., 2010), capazes de minimizar o estresse oxidativo pela eliminação dos EROs e geração de radicais fenólicos mais estáveis (SEVERINO et al., 2009). A concentração de polifenóis no IP tem forte correlação com sua capacidade antioxidante (CHANDRA; GONZALEZ DE MEJIA, 2004): estudos mostraram

que os níveis de polifenóis do extrato da IP são superiores aos do chá verde e similares aos dos vinhos tintos (GUGLIUCCI et al., 2009 a, b; BASTOS et al., 2007). O ácido clorogênico presente no IP (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007; MENINI et al., 2007; DE MORAIS et al., 2009; FILIP; DAVICINO; ANESINI, 2010) é capaz de eliminar radicais livres e metais, e modular positivamente a expressão gênica de enzimas antioxidantes (CLIFFORD, 1999, 2004; OLTHOF et al., 2001; JAISWAL et al., 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram o potencial da erva mate na eliminação de EROs (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; CAMPOS et al., 1996; GUGLIUCCI, 1996; (BOAVENTURA et al., 2013), sendo sua atividade antioxidante equivalente ou superior ao das vitaminas C e E, consideradas padrões-ouro para essa propriedade (VINSON; DABBAGH, 1998; SCHINELLA et al., 2000; GUGLIUCCI; MENINI, 2002; CHANDRA; GONZALEZ DE MEJIA, 2004). Além da atividade antioxidante, o IP promove uma série de benefícios à saúde: atua na regulação da adipogênese (ARÇARI et al., 2013), exibe propriedades de redução de peso e antiobesidade (ARÇARI et al., 2009, 2011b; BORGES et al., 2013), efeito antiinflamatório (ARÇARI et al., 2011; MOSIMANN; WILHELM-FILHO; DA SILVA, 2006; MIRANDA et al., 2008; BERTÉ et al., 2011; BORGES et al., 2013), vasodilatador (STEIN et al., 2005), melhora a hiperlipidemia, inibe a glicação, atua na saúde cardiovascular, reduzindo a progressão da aterosclerose (BALZAN et al., 2013; GAO et al., 2013; LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; MOSIMANN; WILHELM-FILHO; DA SILVA., 2006) e também melhora a resistência à insulina (ARÇARI et al., 2011).

Embora os efeitos da IP sobre o tecido ósseo sejam alvo de investigações, os dados da literatura são contraditórios. Estudos apontam que o consumo de IP pode apresentar benefícios ao tecido ósseo, favorecendo a formação óssea durante a cicatrização de alvéolos de ratos após extração dentária (DA SILVA BRASILINO et al., 2018), aumentando a densidade óssea em mulheres pós-menopausa (CONFORTI, GALLO; SARAVÍ, 2012), e

melhorando a arquitetura óssea e reduzindo marcadores da atividade osteoclástica em ratas perimenopausa (PEREIRA et al., 2017). Contudo, em outros estudos, foi verificado efeito neutro do IP, tanto sobre o metabolismo ósseo em mulheres após a menopausa (DA VEIGA et al., 2018), como sobre parâmetros da microestrutura óssea e resistência óssea em ratos normais (BRUN et al., 2015).

Assim, ainda não estão bem estabelecidos os efeitos do IP sobre o tecido ósseo, e são raros os estudos que avaliem seu impacto sobre células que compõem esse tecido, isoladamente. Em estudo recente, Brito et al. (2019) mostraram que o extrato da IP pode exibir potencial osteogênico em células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. Considerando a relevância de estratégias que visem estimular a formação óssea e aumentar a previsibilidade e sucesso da reabilitação com implantes osseointegráveis, é relevante o desenvolvimento de estudos que avaliem os efeitos do IP sobre o metabolismo das células formadoras deste tecido, os osteoblastos. A hipótese nula a ser testada neste estudo é de que o IP não interfira nos parâmetros de viabilidade, metabolismo celular e aquisição do fenótipo osteogênico em cultura de osteoblastos maduros.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do extrato da *Ilex paraguariensis* *St. Hil* (IP) sobre cultura de células osteoblásticas da linhagem UMR-106.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

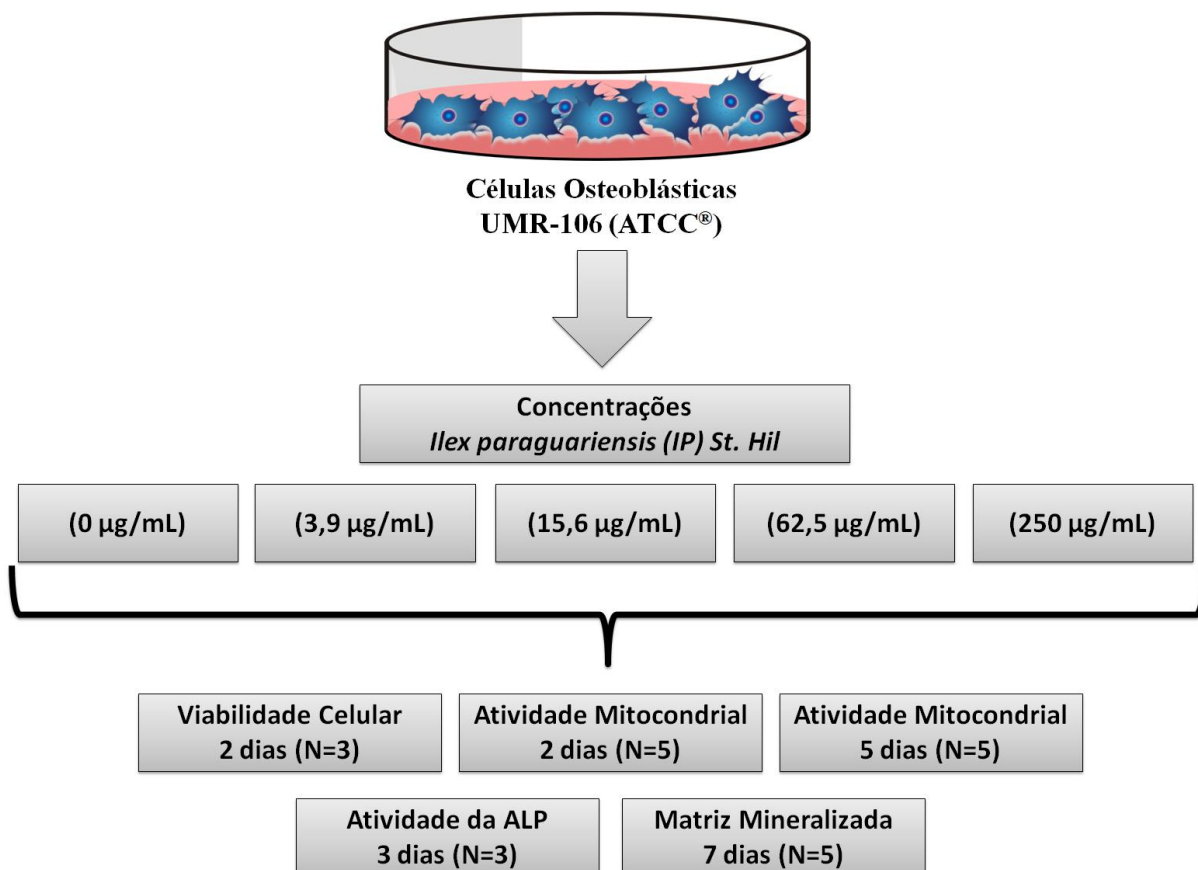
- Avaliar os efeitos do extrato de IP sobre viabilidade celular e atividade mitocondrial de osteoblastos da linhagem UMR-106.
- Determinar o potencial osteogênico do extrato de IP sobre osteoblastos da linhagem UMR-106, por meio da avaliação da atividade de fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para este trabalho, o fator em estudo foi o tratamento com diferentes concentrações do extrato liofilizado da erva *Ilex paraguariensis* St. Hil (IP). As variáveis de resposta foram a viabilidade celular, a atividade mitocondrial, a atividade de fosfatase alcalina e a formação de matriz mineralizada em osteoblastos da linhagem UMR-106 (Figura 1).

Figura 1. Delineamento experimental.



Fonte: Autor

3.2 OBTENÇÃO DA CULTURA CELULAR

Para este estudo, foi utilizada a linhagem celular imortalizada UMR-106, de osteoblastos de ratos (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, EUA). As células osteoblásticas foram cultivadas em meio de expansão composto por meio essencial mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen) e solução de estreptomicina/penicilina a 100 µg/mL e 100 UI/mL, respectivamente (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As garrafas foram mantidas em ambiente umidificado a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Quando atingida subconfluência, as células foram removidas por tratamento com tripsina (5%, Gibco, Thermo Fisher Scientific) e ácido etilenodiaminotetracético (solução de EDTA - 1 mM, Gibco / Thermo Fisher Scientific), contadas e plaqueadas à 3.000 células/poço em placas de poliestireno de 96 poços (Corning Inc., Corning, New York, EUA). Para o cultivo celular, utilizou-se o meio de expansão suplementado adicionalmente com β-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA – 154804-51-0) e 50 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich – 50-81-7). As células foram deixadas aderir por 24 horas previamente à sua exposição ao composto em estudo.

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES E EXPOSIÇÃO DAS CULTURAS

Cápsulas contendo 500 mg de suplemento a base do extrato liofilizado da IP foram obtidas comercialmente (1,6% de ácido clorogênico e 5,72% de cafeína, Botica Vitale – Farmácia de Manipulação, Ribeirão Preto, SP, BR). O extrato liofilizado foi obtido a partir de procedimento convencional de extração por solvente em uma solução de etanol, obtendo um

pó fino, de cor preta, aromático e com capacidade de absorção de água (certificado de análise disponível em Anexos). Para a obtenção das concentrações de trabalho, o extrato foi removido das cápsulas e diluído diretamente em meio de plaqueamento (DMEM; 10% de SFB, solução de estrepto/penicilina, β -glicerofosfato e ácido arcórbico) nas concentrações de 0 (Controle); 3,9; 15,6; 62,5; e 250 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a cada troca eram feitas novas diluições. As concentrações do extrato utilizadas neste estudo foram determinadas a partir de estudo piloto, disponibilizado no Apêndice. Decorrido período de 24 horas após o plaqueamento celular, 100 μL de cada concentração foram distribuídos nos poços de placas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), e os tempos experimentais foram determinados a partir da exposição ao extrato. O meio de cultura foi trocado a cada três dias, sendo realizadas novas diluições a cada troca.

3.4 VIABILIDADE CELULAR

No 2º dia de exposição ao extrato da IP, a viabilidade celular foi avaliada qualitativamente pelo kit comercial para determinação de viabilidade/citotoxicidade LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity, for mammalian cells, Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As células viáveis foram marcadas com fluorescência verde, pela reação da calceína ($\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{13}$) com esterases intracelulares, e as células mortas, marcadas por fluorescência vermelha, devido à ligação do homodímero-1 de etídio (EthD-1) a ácidos nucleicos. As imagens foram obtidas em microscópio invertido trilocular, por fluorescência direta (Led B-g-u-uv Trinocular, Digilab, Piracicaba, SP, BR). com câmera digital Nikon acoplada.

3.5 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Ao final do 2º e 5º dia de exposição ao extrato da IP, a atividade mitocondrial foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma-Aldrich – 298-93-1), um sal de coloração amarelada que é reduzido por proteinases mitocondriais, presentes apenas em células viáveis (MOSMANN, 1983). Alíquotas de MTT a 5 mg/mL em solução salina tamponada (PBS) (Gibco) foram preparadas, diluídas em meio suplementado (concentração a 10%) e 200µL foram despejados em cada poço, seguido por incubação de 4 horas a 37°C. Após decorrido tempo, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS a 37°C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) em cada poço sob agitação por 5 minutos, a fim de garantir uma completa solubilização do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570, nm, Epoch 2, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA).

3.6 ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA (ALP) *IN SITU*

Após 3 dias de exposição, foi realizado ensaio para identificação da atividade de ALP *in situ*, por marcação pelo método *Fast red* (MAJORS et al., 1997). O meio de cultura foi removido e os poços, e as culturas lavadas com solução de Hank (Hank's Balanced Salts, Sigma-Aldrich) aquecida a 37°C. Foi adicionado 1 mL/poço de solução tampão Tris (Sigma-Aldrich) a 120 mM com pH 8,4, contendo 1,8 mM de *Fast red* TR (Sigma-Aldrich), 0,9 mM de naftol-ASMX-fosfato (Sigma-Aldrich) e 1:9 de dimetilformamida (Merck®). As

placas foram mantidas por 30 minutos em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após este período, a solução foi removida e os poços foram deixados secar à temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$). Imagens macroscópicas dos poços foram obtidas com estereomicroscópio MZ6 (Leica, *Wetzlar*, Lahn-Dill, Alemanha), em aumento final de 8X, utilizando câmera DC300 F (Leica) de 1,3 Mega Pixel de resolução.

3.7 FORMAÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA

Em 7 dias, os poços de cultura foram lavados com solução Hanks, fixados em álcool etílico a 70% a 4 °C por 60 minutos e lavados com PBS e água deionizada. Posteriormente, foram corados com vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,2 à temperatura ambiente (TA) por 15 minutos, novamente lavados com PBS e água deionizada e deixados secar. Imagens macroscópicas dos poços foram obtidas com estereomicroscópio MZ6 (Leica, *Wetzlar*, Lahn-Dill, Alemanha), em aumento final de 8X, utilizando câmera DC300 F (Leica) de 1,3 Mega Pixel de resolução. A quantificação bioquímica da mineralização foi realizada por método colorimétrico de acordo com Gregory et al. (2004). Após a coloração com o vermelho de Alizarina, foram adicionados 360 μL de ácido acético a 10 % em cada poço, e a placa foi levada ao agitador por 30 min em TA. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo eppendorf, e então aquecidos a 85 °C por 10 min e, posteriormente, mantido no gelo por 5 min. Os tubos foram centrifugados a 10.500 g, à 23°C, por 15 min. Em seguida, 100 μL do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para um novo tubo. Então, 40 μL de hidróxido de amônia a 10 % foram adicionados em cada tubo para neutralizar o ácido, e todo o conteúdo (140 μL) foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (405 nm, Epoch 2).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

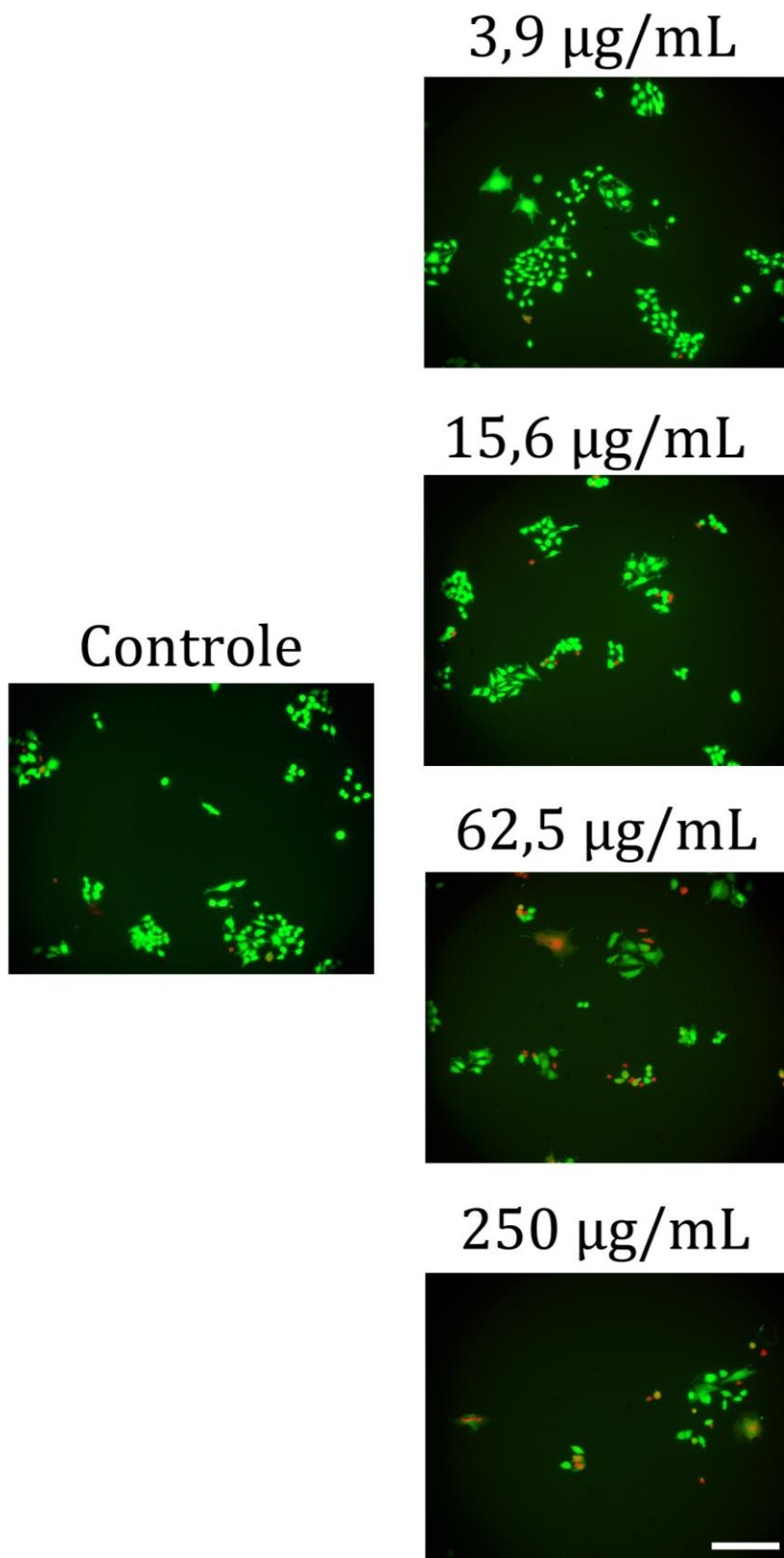
Resultados representativos de uma duplicata biológica, com quintuplicata técnica (n=5), onde os dados quantitativos foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA, seguido pelo pós-teste Tukey, quando apropriado. O nível de significância adotado foi de 5%. Dados apresentados em relação ao Controle.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DO EXTRATO DA IP SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE OSTEÓBLASTOS DA LINHAGEM UMR-106

A partir das imagens de epifluorescência de culturas marcadas com o kit live/dead no período de 48 horas, pôde-se observar células aderidas e espreiadas em todos os grupos experimentais, com predominância de células viáveis. Na comparação entre grupos, verificou-se maior densidade celular nos campos microscópicos de culturas Controle e daquelas expostas a concentrações de até 62,5 µg/mL do IP, e redução da densidade celular em culturas tratadas com IP a 250 µg/mL (Figura 2).

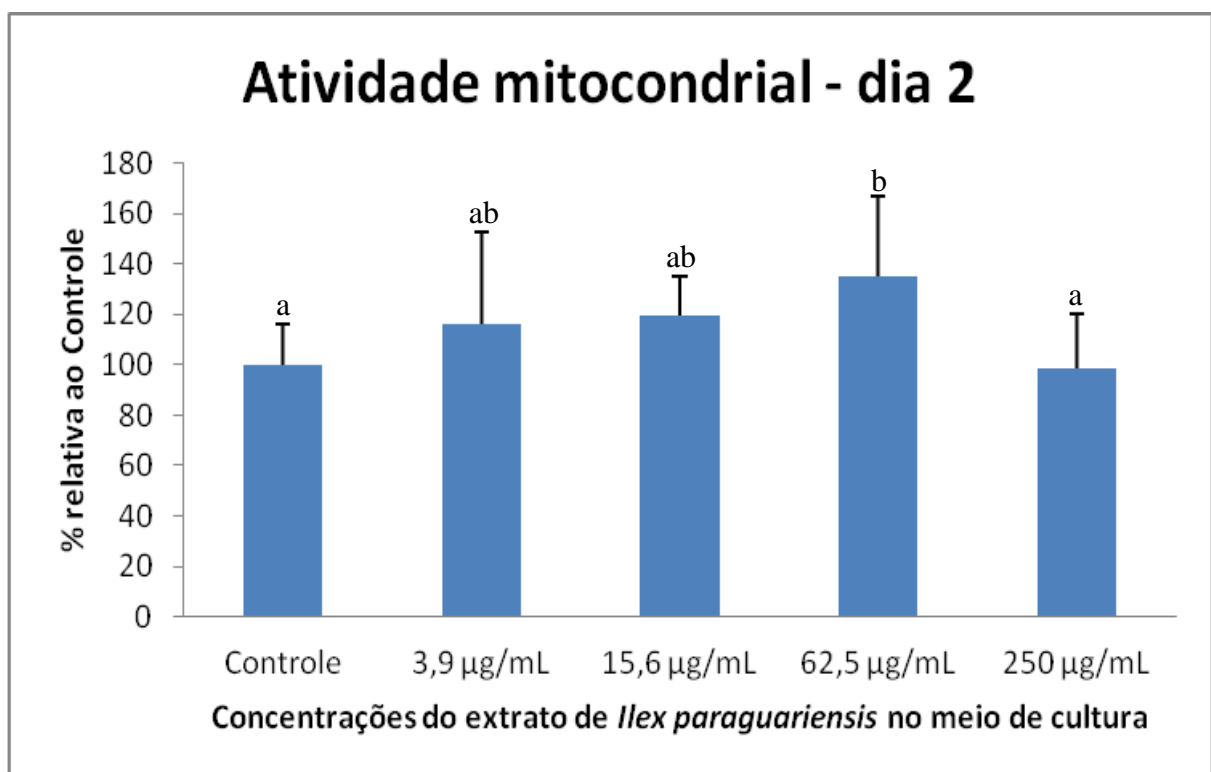
Figura 2. Aspectos microscópicos de culturas de osteoblastos da linhagem UMR-106 cultivados por 2 dias na presença ou não (Controle) de diferentes concentrações do extrato da IP, após marcação pelo kit Live/Dead. Em verde, células viáveis e, em vermelho, as células mortas. Barra de escala = 200 μ m.



Fonte: Autor.

Após dois dias de exposição, observaram-se maiores valores de atividade mitocondrial em culturas expostas a concentrações de 62,5 µg/mL em relação ao Controle e ao grupo exposto à 250 µg/mL do IP (ANOVA/TUKEY; $p < 0,05$). Não foi observada significância estatística para as demais comparações ($p > 0,05$; Figura 3).

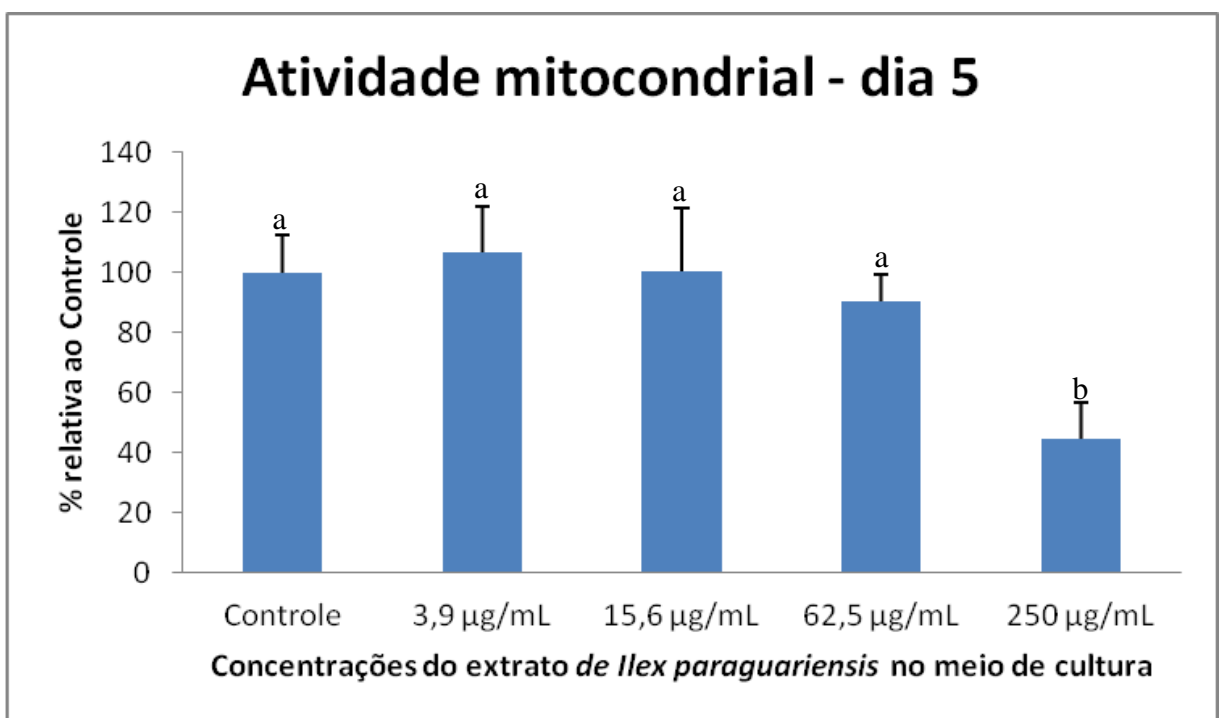
Figura 3. Valores de média e desvio padrão da atividade mitocondrial/viabilidade celular em culturas de osteoblastos da linhagem UMR-106 cultivados por 2 dias com diferentes concentrações do extrato da IP. Letras distintas indicam significância estatística (ANOVA/TUKEY; $p < 0,05$).



Fonte: Autor.

Aos 5 dias de exposição, o ensaio colorimétrico MTT revelou valores similares de atividade mitocondrial entre culturas Controle e expostas a concentrações da IP de 3,9; 15,6 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (ANOVA/TUKEY; $p>0,05$). Contudo, foram verificados valores estatisticamente inferiores para a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ em relação aos demais grupos, ($p<0,05$, Figura 4).

Figura 4. Valores de média e desvio padrão da atividade mitocondrial/viabilidade celular em culturas de osteoblastos da linhagem UMR-106 cultivados por 5 dias com diferentes concentrações do extrato da IP. Letras distintas indicam significância estatística (ANOVA/TUKEY; $p<0,05$).

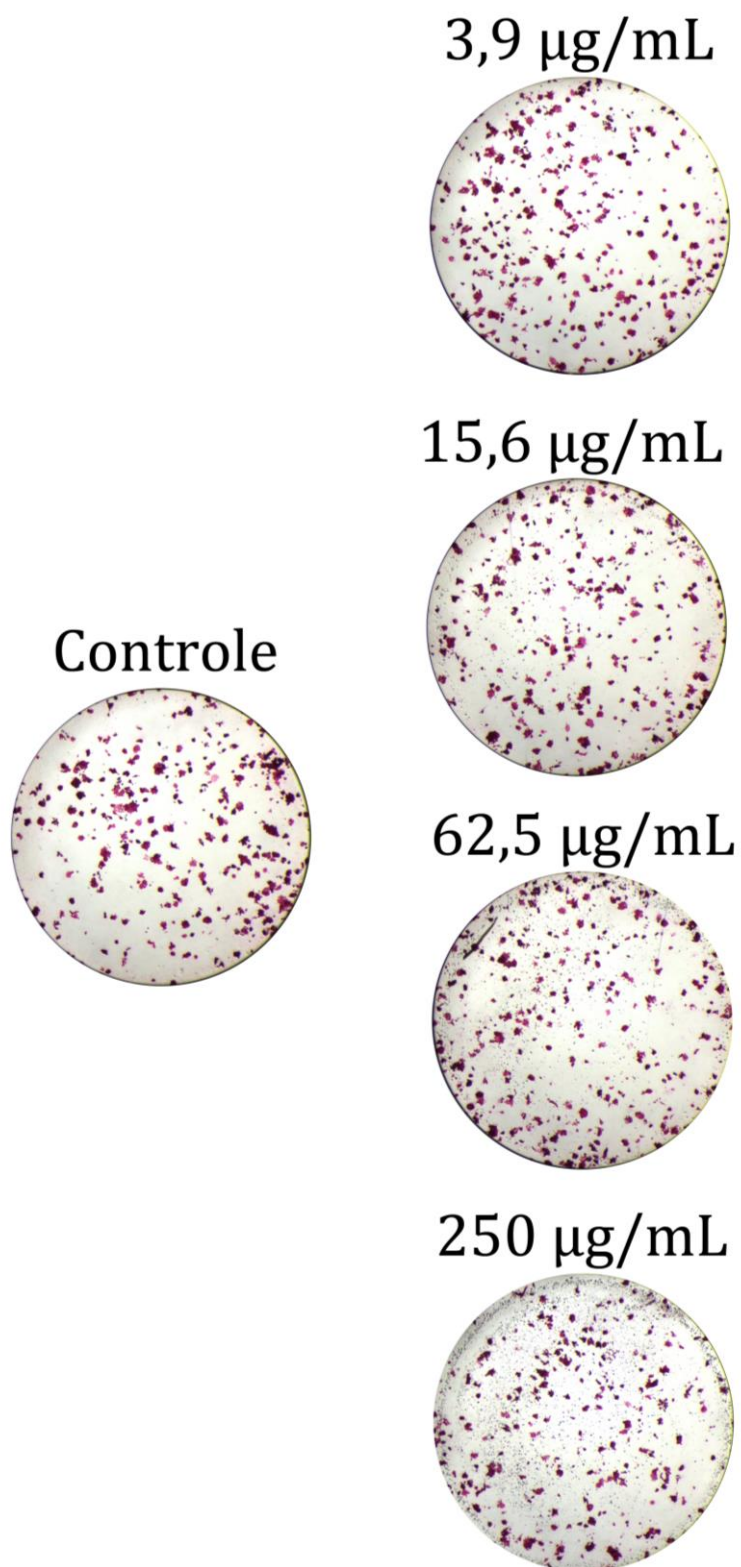


Fonte: Autor.

4.2 POTENCIAL OSTEOGÊNICO DO EXTRATO DA IP SOBRE OSTEOBLASTOS DA LINHAGEM UMR-106

A partir da avaliação qualitativa da atividade de ALP por marcação por *Fast red*, verificou-se colônias positivas para atividade da enzima fosfatase alcalina em todos os grupos experimentais, uniformemente distribuídas por todo o substrato. Foram observados aspectos macroscópicos semelhantes entre os grupos Controle e aqueles tratadas com IP (Figura 5).

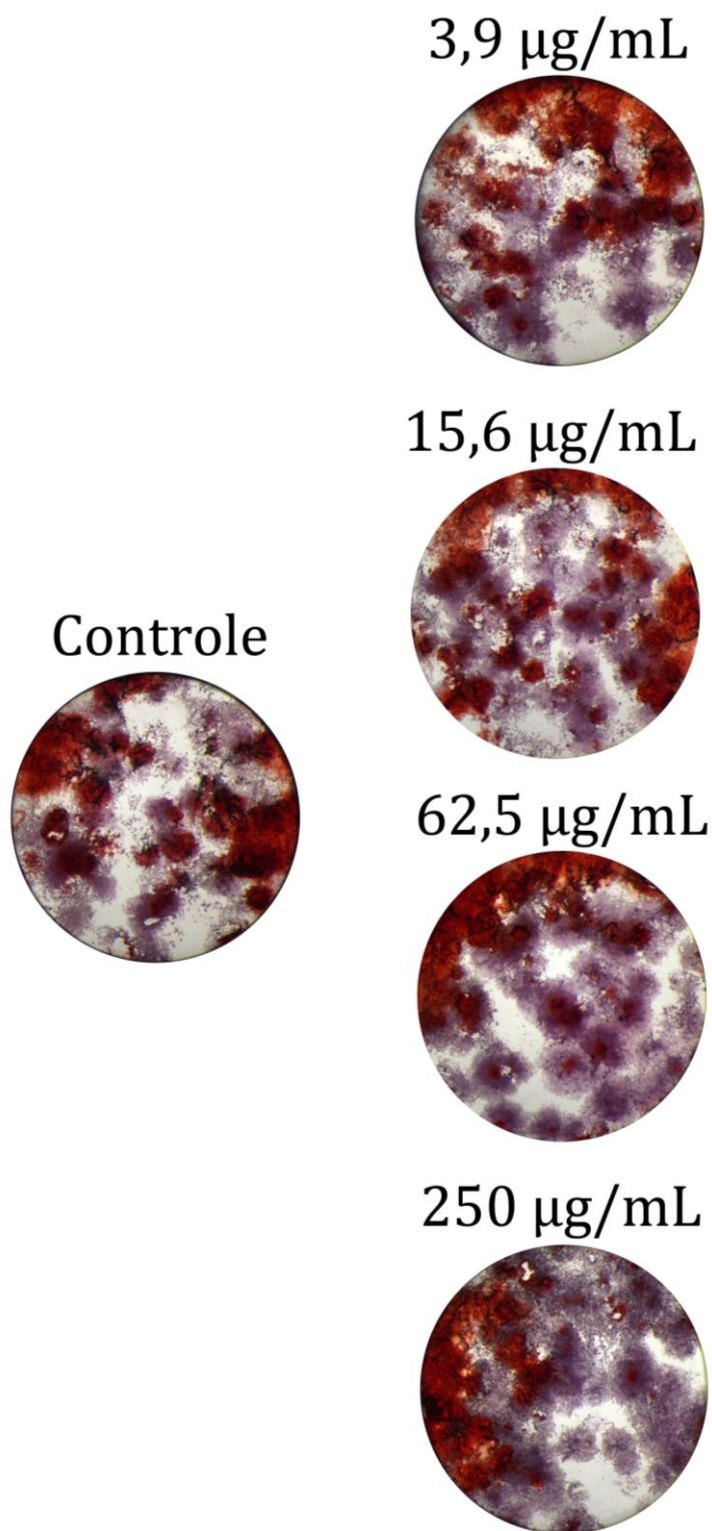
Figura 5. Aspectos macroscópicos de culturas de osteoblastos da linhagem UMR-106 cultivados por 3 dias na presença ou não (Controle) de diferentes concentrações do extrato da IP, após marcação por *Fast Red*. Em vermelho, colônias positivas para atividade de fosfatase alcalina. Barra de escala = 3 mm.



— Fonte: Autor.

Ao final de 7 dias, a coloração por vermelho de alizarina mostrou depósitos de cálcio em formações nodulares em todos os grupos experimentais, embora tenham sido observadas diferenças nos aspectos qualitativos da marcação entre os grupos avaliados. Na comparação entre grupos, áreas mais extensas da coloração por vermelho de alizarina foram observadas nos grupos Controle e tratados com IP até 15,6 $\mu\text{g/mL}$, notando uma discreta queda nas demais concentrações (Figura 6).

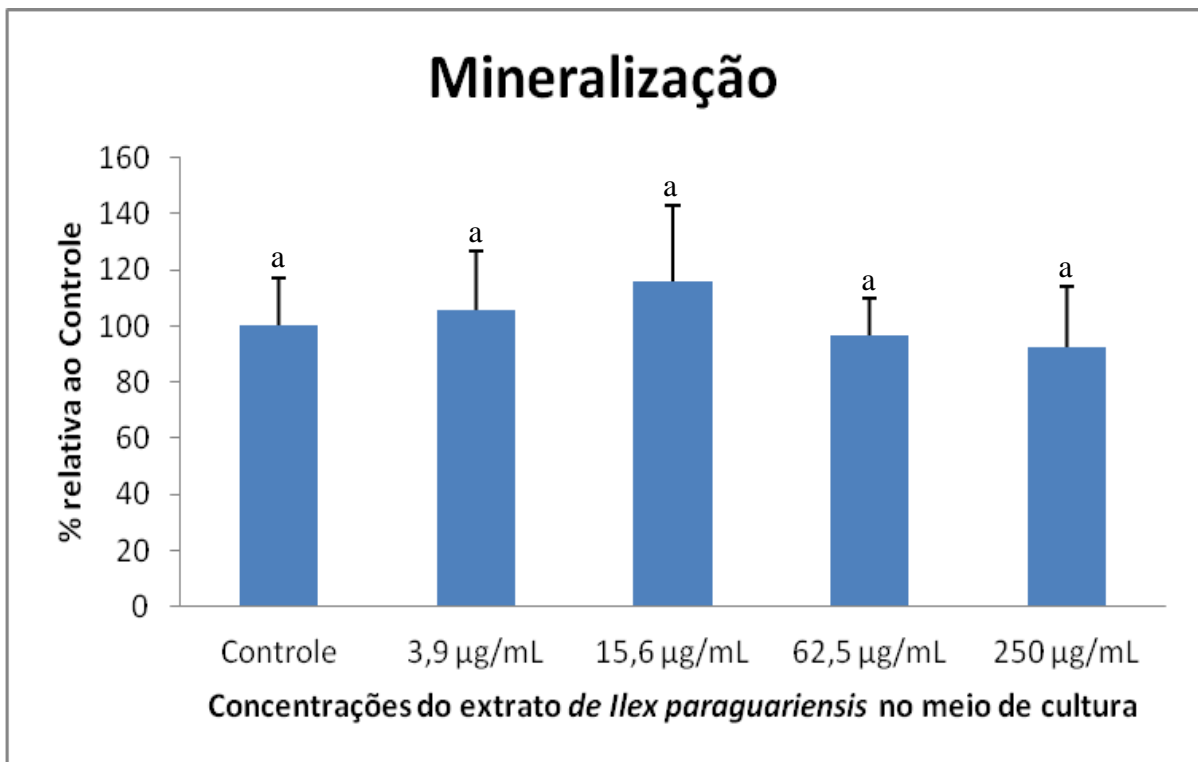
Figura 6. Aspectos macroscópicos de culturas de osteoblastos da linhagem UMR-106 cultivados por 7 dias na presença ou não (Controle) de diferentes concentrações do extrato da IP, após marcação por vermelho de alizarina. Em vermelho, depósitos de cálcio, indicativos de formação de matriz mineralizada. Barra de escala = 3 mm.



Fonte: Autor.

A avaliação quantitativa da formação de matriz mineralizada revelou valores similares entre culturas expostas ou não ao extrato da IP nas diferentes concentrações, apesar das diferenças numéricas observadas (ANOVA/TUKEY; $p>0,05$; Figura 7).

Figura 7. Valores de média e desvio padrão da extração do vermelho de alizarina (formação de matriz mineralizada) em culturas de osteoblastos da linhagem UMR-106 cultivados por 7 dias com diferentes concentrações do extrato da IP. Letras distintas indicam significância estatística (ANOVA/TUKEY ; $p<0,05$).



Fonte: Autor.

5 DISCUSSÃO

O consumo do IP na forma de suplemento alimentar ou bebida tem aumentado em função dos relatos sobre seus benefícios para a saúde, reduzindo o risco ao desenvolvimento de patologias cuja etiologia envolva o estresse oxidativo (BRACESCO et al., 2011; MAO et al., 2017). Estudos têm demonstrado benefícios do IP no tecido ósseo por sua capacidade de modulação do estresse oxidativo (PEREIRA et al., 2017), com melhora na densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa e de aceleração da cicatrização do alvéolo em ratos após a extração dentária (CONFORTI; GALLO; SARAVÍ, 2012; DA SILVA BRASILINO et al., 2018). Porém, seus efeitos isolados sobre células do tecido ósseo foram pouco explorados. De acordo com os resultados obtidos, a hipótese nula foi parcialmente descartada, já que, embora o IP não tenha interferido no potencial osteogênico das culturas em nenhuma das concentrações testadas, a maior concentração do extrato de IP exibiu efeito citotóxico, reduzindo a viabilidade e metabolismo celular.

No presente estudo, para avaliar os efeitos do IP, utilizou-se células da linhagem UMR-106, que exibem fenótipo osteoblástico preservado, sendo capazes de formar uma matriz extracelular rica em colágeno do tipo I quando o ácido ascórbico é incluído no meio de cultura, de expressar proteínas matricelulares típicas de osteoblastos e de mineralizar a matriz (PARTRIDGE et al., 1983; FERRAZ et al., 2017). Esta linhagem, proveniente de osteossarcoma de rato, é classicamente utilizada na literatura para avaliação da resposta a diferentes compostos e biomateriais (TAM; SCHOTLAND; GREEN, 1998; CORTIZO et al., 2000; FERRAZ et al., 2017), pois suas células compartilham muitas características fenotípicas dos osteoblastos, incluindo a capacidade de resposta a hormônios calciotrópicos e citocinas (TAM; SCHOTLAND; GREEN, 1998), sendo considerada como um modelo para estudo de osteoblastos maduros (CORTIZO et al., 2000, CORTIZO et al., 2003).

Avaliando os efeitos do tratamento com diferentes concentrações da IP sobre osteoblastos da linhagem UMR-106, verificou-se, de modo geral, que nenhuma das concentrações utilizadas promoveu aumento da viabilidade ou da atividade mitocondrial sobre esta linhagem ao final de 5 dias. Além disso, a maior concentração, de 250 µg/mL, reduziu significativamente estes parâmetros, indicando que altas concentrações do extrato podem promover efeito citotóxico. Embora tenham mostrado inúmeros benefícios em função de suas propriedades antioxidantes, os polifenóis também exibem potencial pró-oxidativo e citotóxico (MAO et al., 2017): por se tratar de moléculas instáveis, os polifenóis também sofrem reações oxidativas que resultam na formação de EROs, como o H₂O₂ (HALLIWELL, 2008). Valores diferenciais de citotoxicidade do IP foram relatados na literatura, dependendo de sua concentração e do tipo celular utilizado (DE MEJÌA et al., 2010; FRANT; CZAJKA; PADUCH, 2012; GOSMANN et al., 2012). Os resultados de viabilidade e atividade mitocondrial observados no presente estudo estão em acordo com aqueles observados por Brito et al. (2019), que avaliando os efeitos do extrato da IP sobre células tronco mesenquimais da medula óssea também observaram potencial citotóxico do IP quando em elevada concentração (200 µg/mL), sendo que neste estudo, os autores estimaram IC50 (concentração inibitória capaz de matar 50% da população celular) a partir de 160 µg/mL.

O potencial osteogênico do IP poderia ocorrer em função da combinação de seus componentes: estudos anteriores mostraram que as sapominas exibem efeitos promotores osteogênicos em culturas de células indiferenciadas (JEONG et al., 2010; LI et al., 2011); o ácido clorogênico, um dos principais polifenóis presentes, demonstra uma melhora na qualidade óssea em estudos *in vivo* com ratas ovariectomizadas, além de melhorar a diferenciação osteoblástica por meio da via de sinalização Shp2/PI3K/Akt (ZHOU et al., 2016); o alcalóide teobromina tem o caráter de aumentar a atividade da ALP, a produção de OPG e a mineralização das células-tronco mesenquimais da medula óssea humana primária

(CLOUGH et al., 2017); o flavonóide kaempferol demonstrou ativar a via Wnt/ β -catenina em pré osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 (WANG; CHEN; ZHANG, 2019) e estimulou a diferenciação osteogênica, aumentando a atividade da ALP e colágeno 1, osteonectina e dos fatores de transcrição Runx2 e osterix, por meio da sinalização do receptor de estrogênio em culturas primárias de calvárias de ratos (GUO et al., 2012). Contudo, são escassos os estudos que avaliem especificamente os efeitos do IP sobre células ósseas. Em estudo recente, Brito et al. (2019) mostraram que células indiferenciadas da medula óssea expostas a baixas concentrações (10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) exibiram um aumento na deposição de matriz óssea, e da expressão de genes que atuam na transcrição e proteínas relacionadas ao processo de diferenciação e mineralização osteoblástica. Nesse sentido, este estudo avaliou o potencial osteogênico do IP sobre osteoblastos maduros.

A atividade da enzima ALP é considerada um marcador precoce da diferenciação dos osteoblastos (ZERNIK; TWAROG; UPHOLT, 1990). Como a ALP é um produto da atividade dos osteoblastos, o aumento de sua atividade tem sido relacionado à formação óssea ativa. A atividade osteogênica de osteoblastos da linhagem UMR-106 expostos ao IP foi verificada por meio da atividade de ALP e do depósito de cálcio, utilizados como marcadores precoces e tardios da osteogênese, respectivamente. Na literatura, são escassos os estudos que avaliem os efeitos do IP sobre a atividade de ALP do tecido ósseo. Da Silva Brasilino et al. (2018), avaliando os efeitos da ingestão de com 20 mg/kg/dia da IP sobre a regeneração de alvéolos dentais após extração dentária em ratos, observaram aumento da atividade de ALP no plasma sanguíneo. Brito et al. (2019) demonstraram *in vitro* um discreto aumento na atividade dessa enzima em células tronco-mesenquimais tratadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ da IP. No presente estudo, a avaliação qualitativa da atividade da ALP *in situ* revelou aspectos macroscópicos similares da marcação por *Fast red* entre grupos tratados ou não com IP, não

sendo evidente efeito estimulatório sobre a atividade de ALP em nenhuma das concentrações avaliadas.

Em acordo com os achados de atividade de ALP, a marcação por vermelho de alizarina revelou aspectos quantitativos similares entre culturas controle e aquelas crescidas na presença de diferentes concentrações do IP. Esses resultados diferem daqueles reportados por Brito et al. (2019), que observaram efeito osteogênico do IP. Aspectos diferenciais da resposta de células em estágios distintos de diferenciação osteoblástica frente a um mesmo estímulo já foram descritos na literatura (CORTIZO et al., 2003; CROES et al., 2015) e poderiam relacionar-se aos achados do presente estudo, que utilizou modelo de osteoblastos maduros e não de células indiferenciadas. Além disso, efeito neutro do IP sobre o tecido ósseo também foi reportado por Brun et al. (2015) ao avaliarem parâmetros da estrutura e resistência óssea em ratos normais após consumo de IP por 90 dias, embora estes autores tenham observado que, em ratos submetidos à dieta pobre em cálcio, houve melhora no volume trabecular.

A maior parte dos estudos sobre os efeitos positivos do IP sobre o tecido ósseo envolve condições de estresse ou quebra da homeostase desse tecido, em função de fatores locais (como estresse cirúrgico ou inflamação) (DA SILVA BRASILINO et al., 2018), ou sistêmicos (alterações hormonais, osteoporose e deficiências nutricionais) (CONFORTI; GALLO; SARAVÍ, 2012; PEREIRA et al., 2017; BRUN et al., 2015). Nesse sentido, considerando os resultados do presente estudo e dos dados da literatura, pode-se elaborar a hipótese de que os efeitos positivos do IP sobre o tecido ósseo sejam mais evidenciados quando exista desequilíbrio nesse tecido. No entanto, essa hipótese precisa ser investigada por meio de estudos que mimetizem condições que propiciem a quebra da homeostase óssea, como por exemplo, o cultivo de osteoblasto na presença de altas concentrações de EROs ou de mediadores inflamatórios, como aqueles liberados em função do estresse cirúrgico.

Além disso, não se pode excluir que os benefícios do IP sobre o tecido ósseo possam envolver a modulação da diferenciação e função de osteoclastos, já que a redução de sua atividade favoreceria uma maior densidade e volume ósseo. De fato, já foi demonstrado potencial do IP em reduzir marcadores da atividade osteoclástica em ratas perimenopausa (PEREIRA et al., 2017), e o potencial do ácido clorogênico, polifenol mais abundante do IP, em inibir a diferenciação osteoclástica e reabsorção óssea (KWAK et al., 2013). Nesse sentido, os resultados deste estudo não podem ser considerados definitivos porque, embora o modelo de cultura celular permita a investigação dos efeitos do IP em osteoblastos sob condições controladas, ainda possui limitações. Todos os protocolos *in vitro* não são capazes reproduzir as complexas interações celulares e moleculares do ambiente *in vivo*. Assim, mais estudos são necessários para a compreensão dos IP sobre o tecido ósseo, focando em seus efeitos sobre a interação osteoblasto-osteoclasto, além de parâmetros relacionados à sobrevivência e atividade osteoclástica.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo, conclui-se que, dentro das condições experimentais utilizadas:

- O extrato do IP em concentrações de até 62,5 µg/mL suportam a viabilidade e atividade mitocondrial para níveis comparáveis aos do Controle em culturas da linhagem UMR-106. Contudo, concentrações altas (250 µg/mL) exibem efeito citotóxico.
- O extrato do IP exibiu efeito neutro sobre o potencial osteogênico de culturas da linhagem UMR-106 nas concentrações avaliadas.

REFERÊNCIAS

ABREU, E. S. et al. Alimentação mundial: uma reflexão sobre a história. **Saúde e sociedade**, v. 10, p. 3-14, 2001.

ALBREKTSSON, T.; ALBREKTSSON, B. Osseointegration of bone implants: A review of an alternative mode of fixation. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 58, n. 5, p. 567-577, 1987.

ALKHATIB, A. et al. Functional foods and lifestyle approaches for diabetes prevention and management. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1310, 2017.

ALMEIDA, M. et al. Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 27285-27297, 2007.

ARÇARI, D. P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 110-115, 2011a.

ARÇARI, D. P. et al. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 17, n. 12, p. 2127-2133, 2009.

ARÇARI, D. P. et al. Effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) supplementation on oxidative stress biomarkers and LDL oxidisability in normo-and hyperlipidaemic humans. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 3, p. 190-197, 2011b.

ARÇARI, D. P. et al. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809-815, 2013.

BALZAN, S. et al. Lipid-lowering effects of standardized extracts of *Ilex paraguariensis* in high-fat-diet rats. **Fitoterapia**, v. 86, p. 115-122, 2013.

BANFI, G.; IORIO, E. L.; CORSI, M. M. Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 11, p. 1550-1555, 2008.

BASTOS, D. H. M. et al. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. **Med Aromat Plant Sci Biotechnol**, v. 1, n. 1, p. 37-46, 2007.

BERTÉ, K. A. S. et al. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) extract as obtained by spray drying. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523-5527, 2011.

BHATNAGAR, A. Biochemical mechanism of irreversible cell injury caused by free radical-initiated reactions. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 137, n. 1, p. 9-16, 1994.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of botany**, v. 91, n. 2, p. 179-194, 2003.

BOAVENTURA, B. C. B. et al. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 3, p. 1057-1064, 2013.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of bone and mineral research**, v. 26, n. 2, p. 229-238, 2011.

BONEWALD, L. F.; JOHNSON, M. L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 606-615, 2008.

BORGES, M. C. et al. The effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on metabolic and inflammatory parameters in high-fat diet-fed Wistar rats. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 64, n. 5, p. 561-569, 2013.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.

BRITO, V. G. B. et al. Soluble yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) extract enhances in vitro osteoblastic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 244, p. 112131, 2019.

BRUN, L. R. et al. Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on histomorphometry, biomechanics, and densitometry on bones in the rat. **Calcified tissue international**, v. 97, n. 5, p. 527-534, 2015.

CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 43-49, 1996.

CAZZOLA, M. et al. Green tea polyphenols coupled with bioactive titanium alloy surface: in vitro characterization of osteoinductive behavior through a KUSA A1 cell study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2255, 2018.

CHANDRA, S.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to

mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, 2004.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta medica**, v. 70, n. 12, p. 1103-1114, 2004.

CLOUGH, B. H. et al. Theobromine upregulates osteogenesis by human mesenchymal stem cells in vitro and accelerates bone development in rats. **Calcified tissue international**, v. 100, n. 3, p. 298-310, 2017.

CONFORTI, A. S.; GALLO, M. E.; SARAVÍ, F. D. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. **Bone**, v. 50, n. 1, p. 9-13, 2012.

CORTIZO, A. M. et al. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. **Toxicology**, v. 147, n. 2, p. 89-99, 2000.

CORTIZO, A. M. et al. Advanced glycation end-products (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK). **Molecular and cellular biochemistry**, v. 250, n. 1-2, p. 1-10, 2003.

CROES, M. et al. Proinflammatory mediators enhance the osteogenesis of human mesenchymal stem cells after lineage commitment. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132781, 2015.

DA SILVA BRASILINO, M. et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves bone formation in the alveolar socket healing after tooth extraction in rats. **Clinical oral investigations**, v. 22, n. 3, p. 1449-1461, 2018.

DA VEIGA, D. T. A. et al. The yerba mate intake has a neutral effect on bone: A case–control study in postmenopausal women. **Phytotherapy research**, v. 32, n. 1, p. 58-64, 2018.

DE MEJÍA, E. G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316-8324, 2009.

DE OLIVEIRA, S. P. Changes in food consumption in Brazil. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 47, n. 2 Suppl 1, p. 22, 1997.

DOMAZETOVIC, V. et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 209, 2017.

FERRAZ, E. P. et al. Bioactive-glass ceramic with two crystalline phases (BioS-2P) for bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v. 12, n. 4, p. 045018, 2017.

FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FILIP, R.; DAVICINO, R.; ANESINI, C. Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. **Phytotherapy Research: An International**

Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, v. 24, n. 5, p. 715-719, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239, 2000.

FLANDRIN, J-L.; MONTANARI, M. História da Alimentação. **São Paulo: Estação Liberdade**, p. 16, 1998.

FONTANI, F. et al. Glutathione, N-acetylcysteine and lipoic acid down-regulate starvation-induced apoptosis, RANKL/OPG ratio and sclerostin in osteocytes: involvement of JNK and ERK1/2 signalling. **Calcified tissue international**, v. 96, n. 4, p. 335-346, 2015.

FRAGA, C. G. et al. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular aspects of medicine**, v. 31, n. 6, p. 435-445, 2010.

FRANÇA, F. C. Oliveira et al. Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro. **I Seminário Alimentação e Cultura na Bahia, Bahia**, 2012.

FRANT, M.; CZAJKA, M.; PADUCH, R. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) effect on human colon normal and tumor cells. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 12, p. 4730, 2012.

GAO, H. et al. Beneficial effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 6, p. 572-578, 2013.

GOSMANN, G. et al. Phenolic compounds from mate (*Ilex paraguariensis*) inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Plant foods for human nutrition**, v. 67, n. 2, p. 156-161, 2012.

GREGORY, C. A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77-84, 2004.

GRIGIONI, G. et al. Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 5, p. 427-432, 2004.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant Effects of *Ilex Paraguariensis*: Induction of Decreased Oxidability of Human LDLin Vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 339-344, 2009a.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D. H. M. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v. 80, n. 2, p. 138-142, 2009b.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, v. 72, n. 3, p. 279-292, 2002.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

GUO, A. J. et al. Kaempferol as a flavonoid induces osteoblastic differentiation via estrogen receptor signaling. **Chinese medicine**, v. 7, n. 1, p. 10, 2012.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 476, n. 2, p. 107-112, 2008.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of food science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HENRIKSEN, K. et al. Local communication on and within bone controls bone remodeling. **Bone**, v. 44, n. 6, p. 1026-1033, 2009.

IKEDA, M. et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 2, p. 393-399, 1999.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071, 2009.

JAISWAL, R. et al. Profiling and characterization by LC-MS n of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in mate (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5471-5484, 2010.

JAVED, F.; ROMANOS, G. E. Impact of diabetes mellitus and glycemic control on the osseointegration of dental implants: a systematic literature review. **Journal of periodontology**, v. 80, n. 11, p. 1719-1730, 2009.

JEONG, H. M. et al. Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* stimulate osteoblast differentiation via p38 MAPK-and ERK-dependent RUNX2 activation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3362-3368, 2010.

JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 264-271, 2013. BAI, Xiao-chun et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 314, n. 1, p. 197-207, 2004.

JIMENEZ-GARCIA, S. N. et al. Current approaches for enhanced expression of secondary metabolites as bioactive compounds in plants for agronomic and human health purposes—a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 63, n. 2, p. 67-78, 2013.

JUN, J. H. et al. N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 1246-1255, 2008.

JUNIOR, E. L. C.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.

KALLAPURA, G. N. R. P. et al. Mechanisms involved in lipopolysaccharide derived ROS and RNS oxidative stress and septic shock. **Journal of Microbiology Research and Reviews**, v. 2, n. 1, p. 6-11, 2014.

KATCHBURIAN, E.; ARANA CHAVEZ, V. E. **Histologia e Embriologia Oral**. 4.ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 2017.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 4, 2003.

KWAK, S-C. et al. Chlorogenic acid inhibits of osteoclast differentiation and bone resorption by down-regulation of receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand-induced nuclear factor of activated T cells c1 expression. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, p. b13-00430, 2013.

LEE, D. H. et al. Effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. **Cell biology and toxicology**, v. 22, n. 1, p. 39-46, 2006.

LI, X-D. et al. Panax notoginseng saponins promotes proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 268-274, 2011.

LOPEZ-VARELA, S.; GONZALEZ-GROSS, M.; MARCOS, A. Functional foods and the immune system: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. S3, p. S29, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. 2008.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419-427, 2005.

MA, Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 53, p. 401-426, 2013.

MAJORS, A. K. et al. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 4, p. 546-557, 1997.

MALTA, D. C. et al. Fatores de risco e proteção para doenças crônicas não transmissíveis entre beneficiários da saúde suplementar: resultados do inquérito telefônico Vigitel, Brasil, 2008. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, 2011.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MAO, X. et al. Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81649, 2017.

MCKINNON, P. J. DNA repair deficiency and neurological disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 100, 2009.

MENINI, T. et al. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. **Planta medica**, v. 73, n. 11, p. 1141-1147, 2007.

MIRANDA, D. D. C. et al. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 261-265, 2008.

MOMBELLI, A.; CIONCA, N. Systemic diseases affecting osseointegration therapy. **Clinical oral implants research**, v. 17, n. S2, p. 97-103, 2006.

MOREIRA, R, M. et al. O artigo "Qualidade de vida, saúde e política pública de idosos no Brasil: uma reflexão teórica" foi removido por solicitação do primeiro autor devido a problemas de ordem pessoal. **Revista Kairós: Gerontologia**, v. 16, n. 1, p. 27-38, 2013.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, v. 26, n. 1, p. 59-70, 2006.

MOSMANN, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

OLTHOF, M. R. et al. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 3, p. 532-538, 2001.

PARTRIDGE, N. C. et al. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. **Cancer Research**, v. 43, n. 9, p. 4308-4314, 1983.

PEREIRA, C. S. et al. Ilex paraguariensis decreases oxidative stress in bone and mitigates the damage in rats during perimenopause. **Experimental gerontology**, v. 98, p. 148-152, 2017.

PINHEIRO, K. História da Alimentação. **Universitas Ciências da saúde**, v. 3, p. 173-190, 2001.

RICHARDSON, C.; YAN, S.; VESTAL, C. G. Oxidative stress, bone marrow failure, and genome instability in hematopoietic stem cells. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 2, p. 2366-2385, 2015.

RICORDI, C.; GARCIA-CONTRERAS, M.; FARNETTI, S. Diet and inflammation: possible effects on immunity, chronic diseases, and life span. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 34, n. sup1, p. 10-13, 2015.

ROMAGNOLI, C. et al. Role of GSH/GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like Sa OS-2 cells. **The FEBS journal**, v. 280, n. 3, p. 867-879, 2013.

SCHINELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCULLY, C.; HOBKIRK, J.; D DIOS, P. Dental endosseous implants in the medically compromised patient 1. **Journal of oral rehabilitation**, v. 34, n. 8, p. 590-599, 2007.

SEVERINO, J. F. et al. Free radicals generated during oxidation of green tea polyphenols: electron paramagnetic resonance spectroscopy combined with density functional theory calculations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1076-1088, 2009.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.

SMALL, E.; CATLING, P. M. Blossoming treasures of biodiversity: 3. Mate (*Ilex paraguariensis*)-better than Viagra, marijuana, and coffee?. **Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 26-27, 2001.

SOUZA, M. D. C. A.; HARDT, P. P. Evolução dos hábitos alimentares no Brasil. **Revista Brasil Alimentos**, v. 15, p. 32-39, 2002.

STEIN, F. L. Paganini et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research for Nursing**, v. 7, n. 2, p. 146-156, 2005.

TAM, V. K.; SCHOTLAND, S.; GREEN, J. Inflammatory cytokines (IL-1 α , TNF- α) and LPS modulate the Ca²⁺ signaling pathway in osteoblasts. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 274, n. 6, p. C1686-C1698, 1998.

TILMAN, D.; CLARK, M. Global diets link environmental sustainability and human health. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 518, 2014.

VARGAS, B. K. et al. Ação antioxidante in vivo de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) livre e microencapsulados. 2019.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Yousef A. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutrition Research**, v. 18, n. 6, p. 1067-1075, 1998.

WANG, Y.; CHEN, H.; ZHANG, H. Kaempferol promotes proliferation, migration and differentiation of MC3T3-E1 cells via up-regulation of microRNA-101. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 1050-1056, 2019.


WOWERN, N. V. General and oral aspects of osteoporosis: a review. **Clinical oral investigations**, v. 5, n. 2, p. 71-82, 2001.

ZERNIK, J.; TWAROG, K.; UPHOLT, W. B. Regulation of alkaline phosphatase and alpha2 (I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. **Differentiation**, v. 44, n. 3, p. 207-215, 1990.

ZHOU, R. P. et al. Chlorogenic acid prevents osteoporosis by Shp2/PI3K/Akt pathway in ovariectomized rats. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0166751, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A - ESTUDO PILOTO APRESENTADO NO 19º CONIC - UNAERP




EFEITO DA *ILEX PARAGUARIENSIS* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E O POTENCIAL OSTEOGÊNICO EM CULTURA DE CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS

*Martorano, A. S.¹, Fernandes, R.R.², Bighetti Trevisan, R.L.², Sanchez, P.K.V.², De Almeida, A.L.², De Oliveira, P.T.², Castro-Raucci, L.M.S.¹

1- Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, Ribeirão Preto, SP, Brasil;
2- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - FORP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Palavras chave: *Ilex paraguayensis*. Citotoxicidade. Diferenciação celular. Osteoblastos.



antonioartora@gmail.com

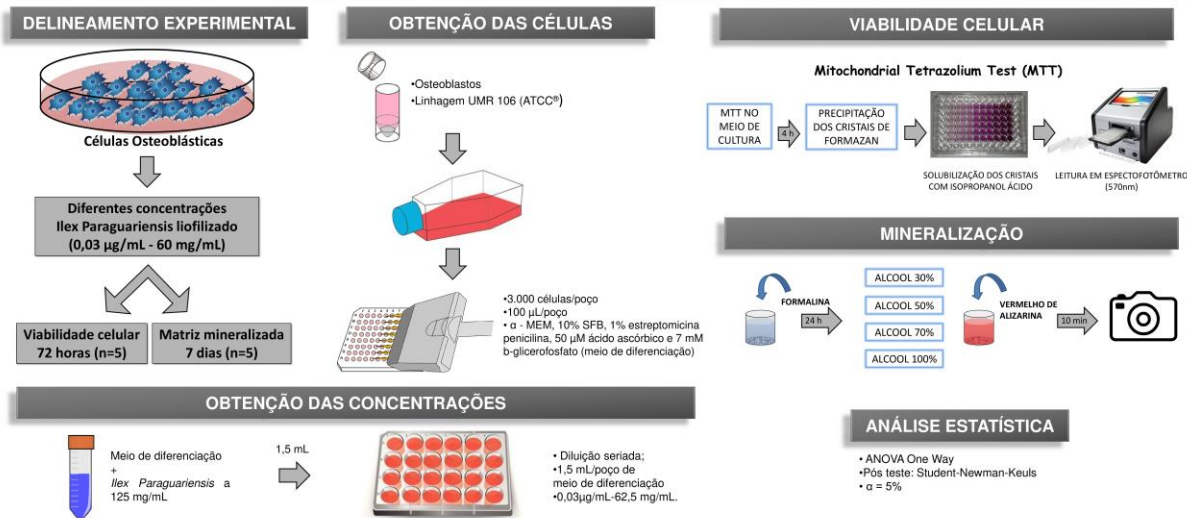
INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguayensis*, popularmente conhecida como erva mate¹, é uma bebida nutritiva muito consumida nos países da América do Sul, produzida e comercializada principalmente no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina². No final do século passado, os primeiros trabalhos que demonstram a atividade antioxidante do chá mate in vitro e in vivo foram publicados³⁻⁵. Estudos realizados posteriormente demonstraram a capacidade antioxidante equivalente ou superior as das vitaminas C e E, consideradas padrões ouro para essa propriedade⁶⁻⁹. Contudo, seus efeitos sobre o tecido ósseo não são conhecidos.

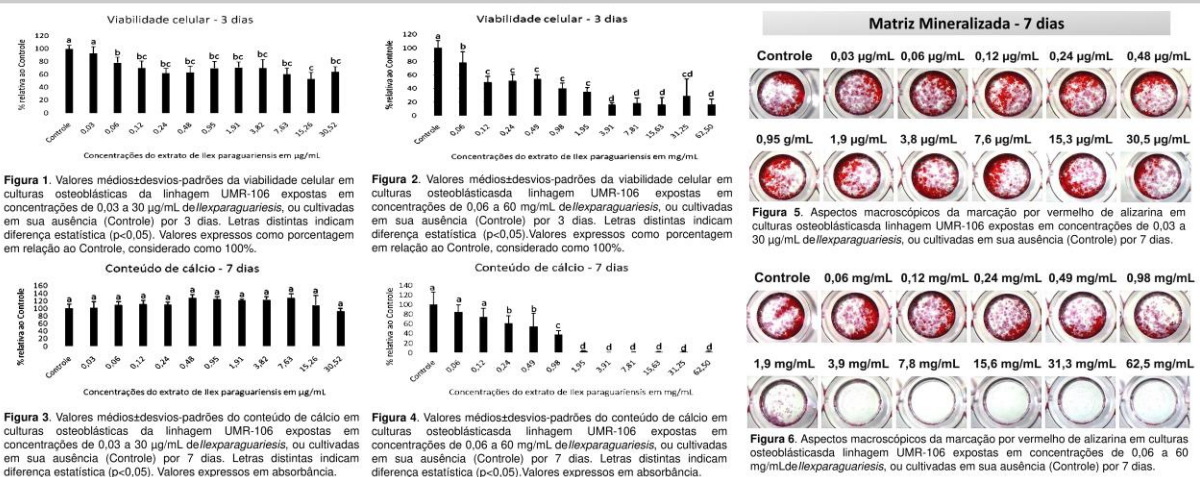
OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da *Ilex paraguayensis* sobre a viabilidade celular e a formação de matriz mineralizada em osteoblastos.

MATERIAL E MÉTODOS



RESULTADOS



CONCLUSÃO

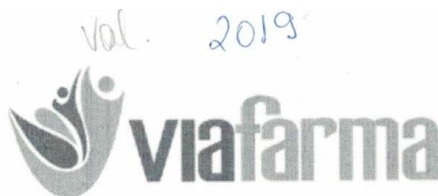
Conclui-se que concentrações de *Ilex paraguayensis* até 15 µg/mL suportam a viabilidade celular e o desenvolvimento do fenótipo osteogênico in vitro.

REFERÊNCIAS

- LORENZI H, MATOS FJA. Plantas Medicinais no Brasil, nativas e exóticas. 2ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA; 2008: 90-91.
- BRACESCO A, SANCHEZ AG, CONTRERAS V, MENINI T, GUGLIUCCI A. Recent advances on *Ilex paraguayensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 136: 378-384.
- GUGLIUCCI A, STANI, A. J. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguayensis*. *Biochemistry and molecular biology international*, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.
- CAMPOS, M. A., ESCOBAR, J., LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and redwin. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.7, n.1, p. 43-49, 1996.
- GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguayensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 224, n. 2, p. 338-344, 1996.
- VINSON, J. A., DABBAKH, Yousef A. Test phenolic antioxidant effectiveness of *Ilex* components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, v. 18, n. 6, p. 1027-1075, 1998.
- GUGLIUCCI, A., MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureioides* and *Ilex paraguayensis* prevent methylglucosyl-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. *Life Sciences*, v. 72, n. 3, p. 279-292, 2002.
- CHANDRA, Sonu; GONZALEZ DE MEJIA, Elvia. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguayensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, 2004.
- SCHNELLA, G. R. et al. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguayensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

ANEXOS

ANEXO A - CERTIFICADO DE ANÁLISE DO *Ilex paraguariensis*



1

CERTIFICADO DE ANÁLISE

| | | | |
|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------|
| Insumo: | Ilex Paraguariensis Ext.Seco | Data de Análise: | 23-08-2017 |
| Lote Interno: | 17H15-B025-022325 | Lote Fabricante: | 057155 |
| Data de Fabricação: | 01-05-2017 | Data de Validade: | 01-05-2019 |
| Origem: | Brasil | Procedência: | Brasil |
| Condições de Armazenamento: | Temperatura Ambiente | Ordem de Fracionamento: | 022325 |

| | | | |
|---------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------------------------|
| DCB: | - | DCI: | - |
| CAS: | - | Peso Molecular: | - |
| Fórmula Molecular: | - | | |
| Observações 1: | Familia | Aquifolaceae | |
| | Nome Comum | Ilex Paraguariensis | |
| | Solvente/Excipiente | Etanol/Amido | |
| Observações 2: | Parte Utilizada: | Folhas | Nome Científico: Ilex paraguariensis |

| Testes | Especificações | Resultados | Unidade | Referências |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------|---------|-------------|
| Descrição * | Pó fino e higroscópico, preto, com odor aromático | Conforme | | Fabricante |
| pH (Solução 10% em água) * | 4,5 a 6,5 | 5,50 | | Fabricante |
| Perda por dessecação * | <= 5,0 (105°C/Peso constante) | 1,74 | % | Fabricante |
| Cinzas totais * | <= 5,0 | 1,93 | % | Fabricante |
| Cinzas insolúveis em ácidos * | <= 1,0 | 0,09 | % | Fabricante |
| Densidade aparente * | 0,450 - 0,990 | 0,573 | g/mL | Fabricante |
| Doseamento * | 3,0 a 10,0 de Cafeína | 5,72 | % | Fabricante |
| Doseamento * | 0,1 - 3,0 de Ác. Cafeoilquinico calculado como Ác. Clorogênico | 1,60 | % | Fabricante |
| Solubilidade * | Praticamente insolúvel em água fria, etanol e demais solventes orgânicos | Conforme | | Fabricante |
| Elementos Estranhos * | Ausentes | Ausentes | | Fabricante |
| Metais pesados * | <= 10 | < 10 | ppm | Fabricante |
| Testes Microbiológicos | | | | |
| Contagem Total de Bactérias * | <= 10000 | < 1000 | UFC/g | Fabricante |
| Fungos e leveduras * | <= 1000 | < 10 | UFC/g | Fabricante |
| Salmonella sp * | Ausente | Ausente | | Fabricante |
| Escherichia coli * | Ausente | Ausente | | Fabricante |
| Staphylococcus aureus * | Ausente | Ausente | | Fabricante |
| Pseudomonas aeruginosas * | Ausente | Ausente | | Fabricante |

6285

**CERTIFICADO DE ANÁLISE**

| | | | |
|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------|
| Insumo: | Ilex Paraguariensis Ext.Seco | Data de Análise: | 23-08-2017 |
| Lote Interno: | 17H15-B025-022325 | Lote Fabricante: | 057155 |
| Data de Fabricação: | 01-05-2017 | Data de Validade: | 01-05-2019 |
| Origem: | Brasil | Procedência: | Brasil |
| Condições de Armazenamento: | Temperatura Ambiente | Ordem de Fracionamento: | 022325 |

| | | | |
|---------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------------------------|
| DCB: | - | DCI: | - |
| CAS: | - | Peso Molecular: | - |
| Fórmula Molecular: | - | | |
| Observações 1: | Família | Aquifolaceae | |
| | Nome Comum | Ilex Paraguariensis | |
| | Solvente/Excipiente | Etanol/Amido | |
| Observações 2: | Parte Utilizada: | Folhas | Nome Científico: Ilex paraguariensis |

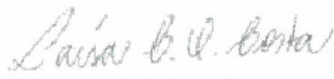
* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)
Reprovado ()


Responsável Técnico Substituto
Olívia Neiva Mesquita Mendes
CRF - GO Nº 5227


Responsável Técnico
João Paulo Sartin Mendes
CRF - GO Nº 7355


Farmacêutica Responsável
Laisa Caroline de Oliveira Costa - CRF - SP Nº 74.121
Dúvidas e informações complementares, favor ligar :
(11) 4785 - 5643

Fim do Documento