

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II

**Avaliação de espécies de *Baccharis* sobre a viabilidade, proliferação e
diferenciação de células-tronco mesenquimais**

Lucimara Nardi Comunello

Porto Alegre, novembro de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II

**Avaliação de espécies de *Baccharis* sobre a viabilidade, proliferação e
diferenciação de células-tronco mesenquimais**

Lucimara Nardi Comunello

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para a
obtenção do título de Farmacêutico, pelo
curso de Farmácia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof. Dra. Grace Gosmann
Co-orientadora: Prof. Dra. Nance Nardi

Porto Alegre, novembro de 2011.

“O verdadeiro heroísmo está
em transformar os desejos em realidades,
e as idéias em feitos”

(Alfonso Rodríguez Castelao)

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof. Dra. Grace Gosmann, por ter me aberto as portas do laboratório e me possibilitado viver inúmeras experiências que me fizeram crescer muito. Obrigada pela confiança, pelas oportunidades e pela orientação no meu longo período de Iniciação Científica.

À Prof. Dra. Nance Nardi, pela co-orientação, disponibilidade e inúmeros ensinamentos. À minha tia Nance, por me aguçar a curiosidade e me fazer sonhar com a pesquisa como profissão.

À Prof. Melissa Camassola e a doutoranda Cristiane Bernardes de Oliveira por aceitarem fazer parte da banca examinadora do meu trabalho de conclusão.

Às alunas do Laboratório de Fitoquímica pela convivência e apoio.

À Raquel Ayres, pela paciência e muito auxílio durante a execução dos experimentos.

À Cris, minha MESTRE, pela paciência, pelos ensinamentos, pela amizade... Não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeste por mim!

À Mônica, Soraia e Cíntia, amigas do coração, pelo apoio, incentivo, compreensão, trocas e convívio essencial para mim.

Aos meus pais pelo incentivo, apoio, educação e amor, aspectos essenciais que me fizeram chegar até aqui. Dedico essa realização a vocês!

À toda a minha família, por entenderem as minhas ausências.

Ao Felipe, meu esposo, pelo exemplo de trabalho árduo e dos pés no chão! Por entender mais do que ninguém todas as dificuldades e alegrias que passei durante a graduação... E por ter me segurado nas inúmeras vezes em que pensei em desistir! É contigo, em especial, que divido esta conquista!

Este trabalho foi escrito em formato de artigo científico, seguindo as normas para submissão de artigo da revista *Phytomedicine*, as quais estão contidas no anexo 1.

Avaliação de espécies de *Baccharis* sobre a viabilidade, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais

Lucimara Nardi Comunello¹, Raquel Ayres², Pedro Cesar Chagastelles², Nance Nardi², Grace Gosmann¹

¹Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS - Brasil.

²Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética; Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS - Brasil.

Autor correspondente: Grace Gosmann, Fone: (51) 33085526, E-mail: grace.gosmann@ufrgs.br

Resumo

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são conhecidas por sua capacidade de se diferenciar em diversos outros tipos celulares, como adipócitos, osteoblastos e condrócitos. Em razão desta característica de plasticidade, as CTMs podem ser utilizadas na recuperação de diversos tipos de lesão tecidual, como a osteoporose, através de engenharia de tecidos. Quercetina, um flavonóide presente em diversos tipos de plantas, frutas e vegetais, já demonstrou afetar a diferenciação osteogênica em muitos estudos, demonstrando ser um importante

alvo de investigação. *Baccharis articulata* e *Baccharis trimera* são conhecidas popularmente como carqueja e possuem diversos estudos relatando atividades como antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Em suas composições químicas destaca-se a presença de terpenóides e polifenóis, como a quercetina (*B. trimera*) e a cirsimarina (*B. articulata*). Proliferação, análise morfológica e diferenciação osteogênica de CTMs; e citotoxicidade frente a células mononucleares humanas foram avaliados após tratamento com extratos bruto hidroetanólico de *B.articulata* e *B.trimera* e frações de terpenóides e polifenóis obtidas a partir de *B.trimera*, assim como o flavonóide quercetina, utilizado neste estudo como padrão de comparação. As amostras citadas acima foram testadas e obtiveram diferentes efeitos sobre a proliferação e diferenciação celular, após 13 dias de análise, assim como nas diferenças morfológicas apresentadas após o tratamento. Efeitos citotóxicos também foram avaliados. Os resultados apresentados no presente trabalho mostram que compostos químicos presentes em *B. articulata* e *B. trimera* podem representar novas ferramentas farmacológicas para o tratamento de diversas lesões em tecidos, como a osteoporose, através de estudos de química medicinal.

Palavras-chave: terpenóides, polifenóis, quercetina, células-tronco mesenquimais, diferenciação osteogênica.

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são caracterizadas pela sua capacidade de auto-regeneração e diferenciação em células de múltiplas linhagens, como adipócitos, condrócitos, mioblastos e osteoblastos (Nardi e Meirelles, 2006; Kim et al., 2006). Esta definição de multipotência lhes confere uma identificação funcional, pois os extensivos estudos de sua morfologia e marcadores moleculares e de superfície mostram que estas características não são específicas deste tipo celular (Nardi e Meirelles, 2006).

Célula-tronco mesenquimal é um dos tipos mais interessantes de célula-tronco adulta, pois são de fácil isolamento, cultivo e manipulação em cultura *ex vivo*, podendo ser isoladas a partir da medula óssea, do tecido adiposo e de qualquer outro tecido no organismo, conforme demonstrado há alguns anos por este grupo de pesquisa (Nardi e Meirelles, 2006; Nardi, 2005). Esta facilidade de isolamento se dá por sua marcante característica de aderência em superfícies plásticas. Além disso, em condições ideais de cultura, estas células podem ser mantidas por tempo indeterminado, mantendo suas características fenotípicas e funcionais similares àquelas exibidas em seu nicho. Esta característica de imortalidade *in vivo* pode ocorrer por múltiplos fatores. Uma das hipóteses é uma diminuição da senescência (encurtamento do telômero) pela atividade da telomerase, que se encontra em níveis elevados nestas células (Nardi, 2005; Verfaillie et al., 2002).

A ótima plasticidade apresentada por este tipo celular o torna um alvo interessante para o uso em terapia gênica e celular. Elas apresentam uma enorme capacidade de restituição de tecidos lesados como osso, cartilagem, tendão e

ligamento, podendo ser utilizadas para inúmeras aplicações terapêuticas. As terapias convencionais que têm sido utilizadas neste tipo de lesão incluem enxertos ósseos autógenos, aloenxertos e implantes protéticos. Entretanto esses métodos são limitados tanto por questões de fornecimento quanto de potencial de diferenciação. Avanços recentes na biologia celular e molecular têm mostrado a utilização de terapia gênica e celular na engenharia de tecido ósseo (Lieberman et al., 2002). Outro alvo de interesse para este tipo de terapia inovadora é a osteoporose, que é uma doença caracterizada por uma redução da massa óssea, resultando em um aumento da fragilidade e risco de fraturas. Esta doença tem se tornado um problema de saúde cada vez maior, em razão do incremento da expectativa de vida da população, afetando principalmente mulheres após a menopausa (Prouillet et al., 2004). Assim, o screening de compostos químicos capazes de induzir a diferenciação osteogênica pode servir para expandir o uso de células-tronco mesenquimais neste tipo de procedimento clínico.

As espécies do gênero *Baccharis*, membro da família ASTERACEAE, são importantes na descoberta de novos produtos de origem natural com potencial terapêutico e os estudos farmacológicos envolvendo estas plantas são em sua maioria baseados nas suas propriedades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (Abad e Bermejo, 2007). *Baccharis trimera* (Less.) DC (Mobot, 2011) e *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon (Barroso e Bueno, 2002), espécies nativas do sul da América, são conhecidas popularmente como carqueja e suas partes aéreas são utilizadas na medicina popular para problemas hepáticos e digestivos (Zardini, 1984; De Oliveira et al., 2003; De Oliveira, 2004; Gosmann et al., 2010). Estudos fitoquímicos demonstram que em sua composição química

destaca-se a presença de terpenóides e compostos fenólicos, como flavonóides, que variam entre as espécies, como por exemplo a quercetina (*B. trimera*) e a cirsimaritina (*B. articulata*) (Verdi et al., 2005).

Flavonóides, que são compostos encontrados em uma vasta variedade de plantas, têm demonstrado afetar o metabolismo ósseo em diversos estudos. Alguns destes, já mostraram os efeitos do flavonóide quercetina, o representante majoritário desta classe, na diferenciação osteogênica de diversos tipos de células osteoblásticas (Woo et al., 2004; Prouillet et al., 2004; Notoya et al., 2004; Kim et al., 2006). Estes estudos mostram que a quercetina inibe a reabsorção óssea em humanos, podendo assim ser aplicada na prevenção de doenças ósseas como a osteoporose pós-menopausa.

Nesse estudo, foi avaliado o efeito do extrato bruto hidroetanólico de *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata*, das frações de polifenóis e terpenóides de *B. trimera* e do o flavonóide quercetina na viabilidade, proliferação e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas de rim de camundongo.

MATERIAS E MÉTODOS:

Material vegetal

Baccharis articulata e *B. trimera* foram coletadas na cidade de Guaíba, no Rio Grande do Sul, Brasil e identificadas pelo Prof. Dr. Nelson Matzenbacher da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). O material testemunho foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (*Baccharis trimera*: ICN

152107 e *Baccharis articulata*: ICN 143957). Após secagem em estufa de ar circulante em temperatura não superior a 40°C, as partes aéreas foram moídas e utilizadas para obtenção do extrato bruto hidroetanólico e das frações, como descrito abaixo.

Obtenção do extrato bruto hidroetanólico e das frações

As partes aéreas de *B. articulata* (EBH 1) e *B. trimera* (EBH 2) (1 kg) foram extraídas por maceração com etanol 96% (planta:solvente, 1:10, p/v, 2 x 15 dias). O extrato bruto hidroetanólico foi obtido após filtração, evaporação do etanol em evaporador rotatório e liofilização.

As partes aéreas (50 g) de *B. trimera* foram também extraídas exaustiva e sucessivamente em extrator Soxhlet resultando nas frações acetato de etila (4%) e butanol (3%). As frações acetato de etila e butanol foram posteriormente agrupadas e submetidas à cromatografia de permeação molecular utilizando Sephadex LH-20 (GE Healthcare) e eluídas com etanol 96% para obtenção de frações enriquecidas de polifenóis (19%) e terpenóides (63%). Os extratos brutos hidroetanólicos de ambas espécies e as frações de *B. trimera* foram quimicamente estudados e utilizados para os ensaios biológicos citados abaixo (todos foram solubilizados em DMSO 1% + meio de cultura e filtrados com membrana de poro 0,45 µm).

Análise cromatográfica

O perfil fitoquímico de *B. trimera* e *B. articulata* foi analisado através de cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel (GF₂₅₄, Fluka)

utilizando como fase móvel clorofórmio:etanol:ácido acético (60:40:6, v/v/v) e dois agentes cromogênicos: anisaldeído sulfúrico para detectar terpenóides e reagente natural para visualizar os compostos fenólicos (De Oliveira et al., 2006).

Avaliação preliminar da citotoxicidade

As células (CTMs) foram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo 10^4 células / poço, na presença das amostras testadas (EBH 1, EBH 2, terpenóides, polifenóis e quercetina), nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, durante 3 dias. Neste ensaio, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi aquela mais alta que não causou nenhum efeito na viabilidade após tratamento com os extratos bruto hidroetanólico de *Baccharis*, frações de polifenóis e terpenóis de *Baccharis trimera* e quercetina. As células foram tripsinizadas e coradas com 0,4% de azul tripan (Sigma). O número total de células e a proporção de células mortas foram estimados utilizando contagem em câmara de Neubauer, após a coloração (Kim et al., 2006). Este experimento foi realizado em triplicata.

Cultura de célula-tronco mesenquimal

As células-tronco mesenquimais utilizadas no presente trabalho foram isoladas a partir de rim de camundongos machos C57BL/6 e mantidas em cultura conforme protocolos já estabelecidos pelo grupo de pesquisa (Nardi e Meirelles, 2006). Estas culturas podem ser mantidas por períodos variáveis, dependendo da espécie e órgão de origem, através de passagem e repicagem das células aderentes que são destacadas através de tripsinização. O meio mais frequentemente empregado nas culturas de CTMs é o Dulbecco's modified Eagle's

medium + HEPES (HDMEM), apesar de outros meios também serem apropriados (Otto e Rao, 2004). Foram utilizadas células em passagem 3 a 5.

Avaliação da proliferação e viabilidade celular

Para determinação da taxa de proliferação, as células (CTMs derivadas de rim) foram destacadas usando *Hank's balanced salt solution* (HBSS) contendo 0,5% de tripsina e 0,02% de EDTA. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, contendo 10^4 células / poço, na presença das amostras testadas (EBH 1, EBH 2, terpenóides, polifenóis e quercetina), na concentração de 100 µg/mL. Após 3, 5, 7, 10 e 13 dias, as células foram tripsinizadas e coradas com 0,4% de azul tripan (Sigma). O número total de células e a proporção de células mortas foram estimados utilizando contagem em câmara de Neubauer, após coloração com azul tripan (Kim et al., 2006). Este experimento foi realizado em triplicata.

Análise morfológica e fotografias

As culturas de CTMs foram observadas rotineiramente com um microscópio de fase-contraste invertido (Axiovert 25; Zeiss, Hallbergmoos, Germany). As células foram lavadas com tampão fosfato (PBS). Fotomicrografias foram tiradas com uma câmera digital (AxioCam MRc, Zeiss), utilizando AxioVision 3.1 software (Zeiss) (Meirelles et al., 2006).

Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica foi induzida através de culturas confluentes cultivadas em DMEM contendo 10% (vol./vol.) de soro fetal bovino, 10 mmol/L de

β -glicerofosfato, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido ascórbico e 10 nmol/L de dexametasona. Culturas de CTMs derivadas de rim foram mantidas em meio de diferenciação e as amostras (EBH 1, EBH 2, terpenóides, polifenóis e quercetina) foram analisadas na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 3 semanas, com duas trocas de meio por semana. A diferenciação celular foi analisada através de coloração com Alizarin Red S, como descrito em protocolos já estabelecidos (Kim et al., 2006; Rackham et al., 2011). Este experimento foi realizado em triplicata, e a quantificação da diferenciação osteogênica foi realizada por determinação da densidade e área da coloração com alizarin red S utilizando um programa de análise de imagens (ImageJ) (Viero et al., 2011).

Ensaio de citotoxicidade

As amostras (terpenóides, polifenóis e quercetina) foram diluídas em meio RPMI 1640 (Sigma) imediatamente antes do uso, nas concentrações de 12.5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Células humanas mononucleares foram separadas a partir do sangue de três doadores. Sangue venoso heparinizado foi diluído (4:3) com meio Hank's (Sigma). As células mononucleares foram isoladas por centrifugação com gradiente Ficoll-Paque® (Amersham), centrifugadas e lavadas duas vezes com solução de Hank's. Células viáveis foram contadas utilizando azul tripan em uma câmara de Neubauer. As células mononucleares foram lavadas e ressuspensas em RPMI em uma concentração de 10^6 células viáveis por mL. Essa suspensão de células foi plaqueada/dispensada em uma placa de 96 poços (100 μL em cada poço) e cada amostra foi adicionada imediatamente (100 μL em cada poço). Os

experimentos foram feitos em triplicata e contendo controles (meio e meio + DMSO). As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂, por 24 e 72 horas. A viabilidade celular foi determinada por citometria de fluxo após adição de iodeto de propídio. Análises foram conduzidas em citômetro FACSCalibur® equipado com laser de argônio 488 nm (Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA) e utilizando o software CellQuest®. The WinMDI 2.8 (software) foi usado para obtenção dos resultados finais (Mendez et al., 2008; Paim et al., 2011). São consideradas citotóxicas as amostras que apresentam uma redução mínima de 50% da viabilidade celular (Mendez et al., 2008; Paim et al., 2011). Este experimento foi realizado em triplicata.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos em triplicata. A análise estatística foi feita utilizando Análise da Variância (ANOVA), seguido de *post test* Tukey ou Bonferroni. $P < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância.

RESULTADOS

Análise cromatográfica

A análise por cromatografia em camada delgada demonstrou que os extratos brutos hidroetanólico de *B. articulata* e *B. trimera* apresentaram terpenóides e polifenóis como principais constituintes, de acordo com a coloração e fluorescência observadas após revelação com anisaldeído sulfúrico e reagente natural (Figura 1 e 2)

Efeito sobre a proliferação e viabilidade celular de CTMs

CTMs sofrem expansão clonal mitótica após exposição ao meio de diferenciação (Kim et al., 2006; Zuk et al., 2001). Como a expansão clonal mitótica pode afetar as características de diferenciação, o objetivo deste ensaio foi avaliar os efeitos dos extratos e das frações sobre a proliferação e viabilidade celular, além da capacidade de adesão na placa. Após tratamento com EBH 1, EHB 2, terpenóides, polifenóis e quercetina, todos na concentração de 100 µg/mL, as células foram analisadas nos dias 3, 5, 7, 10 e 13 e demonstraram resultados tempo-dependente, como mostra a Figura 3. Os polifenóis induziram diminuição estatisticamente significativa da viabilidade após o 5º dia de tratamento (dias 7 e 10 = $P < 0,01$; dia 13 = $P < 0,001$). As outras amostras analisadas não demonstraram resultados estatisticamente significativos quando comparadas com o controle (células tratadas somente com meio), mostrando assim, não afetarem a viabilidade celular.

A possibilidade de as células estarem se soltando do poço, por efeito do extrato em sua adesão à placa, foi testada através da análise dos sobrenadantes. Estes apresentaram poucas células e a maioria presente estava corada com azul tripan, caracterizando morte celular. Este resultado nos indica que as células estão tendo uma diminuição de sua viabilidade celular após o tratamento com os extratos, excluindo assim a hipótese de interferência na adesão das células à superfície da placa.

Indução da diferenciação osteogênica de CTMs

Com o objetivo de observar os efeitos do tratamento com EBH 1, EHB 2, terpenóides, polifenóis e quercetina sobre a diferenciação celular, as células foram cultivadas por 3 semanas em contato com estas amostras, na concentração de 100 µg/mL. Observou-se durante este tempo de tratamento, que as células tratadas com polifenóis apresentaram uma notável diminuição da viabilidade celular, de acordo com os ensaios de proliferação e análise da viabilidade, apresentados na Figura 3. Os EBH 1 e 2, a fração de terpenóides e o flavonóide quercetina apresentaram um significativo aumento da diferenciação osteogênica de CTMs, comparando com o controle contendo células cultivadas somente com o meio de diferenciação, como mostra a Figura 4.

Análise morfológica

As culturas foram observadas ao longo do tratamento com os extratos por 13 dias, em microscópio de fase-contraste invertido, para análise da morfologia das células. As células tratadas com polifenóis, na concentração de 100 µg/mL, apresentaram notáveis alterações morfológicas (Figura 5), apresentando formas mais alongadas, com perda da visibilidade da membrana celular, diminuição do citoplasma e núcleo pouco visível.

Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade utilizando células mononucleares humanas foi realizado com o objetivo de avaliar o provável potencial citotóxico dos polifenóis nas concentrações de 12,5 a 200 µg/ml. Foram testados também os terpenóides e

a quercetina, apesar de não terem apresentado uma diminuição significativa da viabilidade de CTMs. Somente os polifenóis na concentração de 200 µg/ml apresentaram uma inibição significativa da viabilidade das células em questão, após 72 horas de incubação, mas estes valores não chegam a diminuir em 50% a viabilidade celular, o que caracterizaria um perfil citotóxico (Figura 6).

DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de extratos e frações de espécies de *Baccharis*, que possuem como componentes majoritários terpenóides e polifenóis como, por exemplo, a rutina e sua aglicona (quercetina), ambos presentes em *B. trimera*.

Os resultados obtidos mostram a propensão de culturas de CTMs de responder a estímulos de diferentes extratos e frações de origem natural na diferenciação osteogênica. A diferenciação de CTMs em osteoblastos, células formadoras de osso, envolve uma série de eventos complexos, que incluem proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, que resultam na formação de mineralização da matriz extracelular (Notoya et al., 2004). Esta mineralização, que é quantificada como descrito nos materiais e métodos, foi visualizada em nossos ensaios, mostrando que o flavonóide quercetina, os EBH 1 e 2, e a fração de terpenóides de *B. trimera* induziram diferenciação, na concentração testada. Os polifenóis de *B. trimera*, neste ensaio, apresentaram marcante diminuição da viabilidade desta linhagem celular (Figura 3), que provavelmente está interligada com as alterações morfológicas observadas nas

células tratadas com esta fração (Figura 5). Percebemos claramente na Figura 6 que as poucas células vivas presentes após o tratamento com esta fração estão coradas, ou seja, diferenciadas. Os outros extratos e frações não demonstraram inibição da viabilidade celular, inclusive a quercetina, dado este que está de acordo com os resultados já reportados anteriormente, que mostram que ela induz inibição da proliferação celular, sem afetar a viabilidade (Kim et al., 2006).

Apesar da diminuição da viabilidade das CTMs após tratamento com a fração de polifenóis de *B. trimera*, estes compostos não apresentaram citotoxicidade frente à células mononucleares humanas, o que mostra que eles podem vir a ser considerados compostos naturais seguros para a utilização na engenharia de tecidos. Porém mais estudos ainda são necessários, como avaliação de sua capacidade de induzir a diferenciação celular em concentrações menores, que não afetem a viabilidade das células em questão.

O flavonóide quercetina já demonstrou atividade osteoblástica por vias ER dependentes (vias dependentes de receptor de estrogênio), podendo assim representar novas ferramentas farmacológicas para o tratamento da osteoporose (Prouillet et al., 2004). Já os estudos de Kim et al., 2006, mostraram que o pré-tratamento com quercetina resultou em um aumento da diferenciação osteogênica de células do tecido adiposo humano derivadas do estroma (hADSC) e regeneração óssea *in vivo*, e que estes efeitos não estão associados ao receptor de estrogênio, o que mostra que este composto pode ser útil para engenharia de tecido ósseo *in vivo*, utilizando células-tronco mesenquimais (hCTM).

Os resultados apresentados neste trabalho são importantes, visto que plantas medicinais podem servir como instrumentos para o incremento do arsenal

terapêutico, e os resultados obtidos neste trabalho mostram que compostos químicos presentes em *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata* podem ser utilizados na descoberta de novos protótipos para o tratamento de diversas lesões, como por exemplo, a osteoporose, através de estudos de química medicinal.

REFERÊNCIAS

ABAD M.J., and BERMEJO M. *Baccharis* (Compositae): a review update, **Arkivoc**, 76-96, 2007.

BARROSO G.M., and BUENO O.L. Compositas-5 Subtribo: Baccharidinae. In: R.Reitz, ed., **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. P.810-815, 2002.

De OLIVEIRA S.Q., BARBON G., GOSMANN G. Differentiation of South Brazilian *Baccharis* Species by TLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 29: 2603-2609, 2006.

De OLIVEIRA S.Q., DAL-PIZZOL F., GOSMANN G., GUILLAUME D., MOREIRA J.C.F., SCHENKEL E.P. Antioxidant Activity of *Baccharis articulata* Extracts: Isolation of a New Compound with Antioxidant Activity. **Free Radical Research**, 37 (5): 555-559, 2003.

De OLIVEIRA S.Q., DAL-PIZZOL F., MOREIRA J.C.F., SCHENKEL E.P. and GOSMANN G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. **Acta Farm. Bonaer.**, 23 (3): 365-368, 2004.

GOSMANN G., De OLIVEIRA, C.B., COMUNELLO, L.N. Baccharis trimera (Less.) DC. Carqueja. **RPMP – Ethnomedicine: Source and Mechanism**, 28: 115-128. Studium Press L.L.C. USA. 2010.

KIM Y.J., BAE Y.C., SUH K.T. and JUNG J.S. Quercetin, a flavonoid, inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells. **Biochemical Pharmacology**, 72: 1268-1278, 2006.

LIEBERMAN J.R., GHIVIZZANI S.C. and EVANS C.H. Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage. **Mol Ther**, 6: 141-147, 2002.

MEIRELLES L.S., CHAGASTELLES P.C. and NARDI N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science** 119: 2204-2213, 2006.

MENDEZ A., CHAGASTELLES P.C., PALMA E., NARDI N.B. and SHAPOVAL E. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics** 350: 95-102, 2008.

MOBOT www.tropicos.org (Acessado em Agosto de 2011).

NARDI N.B. All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cells pools. **Medical Hypotheses**, 64: 811-817, 2005.

NARDI N.B. and MEIRELLES L. da SILVA. Mesenchymal Stem Cell: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, 174: 249-282, 2006.

NOTOYA M., TSUKAMOTO Y., NISHIMURA H., WOO J.T., NAGAI K., LEE I.S. and HAGIWARA H. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation,

and mineralization of osteoblasts in vitro. **European Journal of Pharmacology**, 485: 89-96, 2004.

OTTO W.R. and RAO J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. **Cell Prolif.** 37: 97-110, 2004.

PAIM C.S., FÜHR F., BARTH A.B., GONCALVEZ C.E.I., NARDI N.B., STEPPE M., SCHAPOVAL, E.E.S. Gemifloxacin mesylate (GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and in vitro cytotoxic study. **Talanta** 83: 1774-1779, 2011.

PROUILLET C., MAZIÈRE J.C., MAZIÈRE C., WATTEL A., BRAZIER M. and KAMEL S. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. **Biochemical Pharmacology**, 67: 1307-1313, 2004.

RACKHAM C.L., CHAGASTELLES P.C., NARDI N.B, HAUGE-EVANS A.C., JONES P.M. and KING A.J.F. Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organization and morphology in mice. **Diabetologia** 54: 1127-1135, 2011.

VERDI L.G., BRIGHENTE I.M.C., and PIZZOLATTI M.G. Gênero Baccharis (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova** 28 (1): 85-94, 2005.

VERFAILLIE C.M., PERA M.F. and LANSDORP P.M. Stem cells: hype and reality. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)** 369-391, 2002.

VIERO C, CAMASSOLA M, BELLAGAMBA B, IKUTA N, CHRISTOFF AP, MEIRELLES LD, AYRES R, MARGIS R, NARDI NB. Molecular Analysis of the

Differentiation Potential of Murine Mesenchymal Stem Cells from Tissues of Endodermal or Mesodermal Origin. **Stem Cells Dev.** 2011

ZARDINI E.M. Etnobotanica de Compuestas Argentinas com especial referencia a su uso farmacologico (primera parte). **Acta Farm. Bonaer.**, 3 77-99. 1984.

ZUK, P.A., ZHU, M., MIZUNO, H., HUANG, J., FUTRELL, J.W., KATZ, A.J., ET AL. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, 7: 211-27, 2001.

WOO J.T., NAKAGAWA H., NOTOYA M., YONEZAWA T., UDAGAWA N., Lee I.S., OHNISHI M., HAGIWARA H. e NAGAI K. Quercetin Suppresses Bone Resorption by Inhibiting the Differentiation and Activation of Osteoclasts. **Biol. Pharm. Bull.** 27(4): 504-509, 2004.

Legendas das figuras

Figura 1. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos bruto hidroetanólico de *B. articulata* e *B. trimera*. Si gel GF₂₅₄, fase móvel: CHCl₃:EtOH:AcOH (100:40:6 v/v/v). Agente cromogênico: reagente natural e anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 100°C.

Figura 2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do fracionamento da fração butanólica (BU) + acetato de etila (AE) com comparação com padrão quercetina (Q). Final (porção final da coluna). Si gel GF₂₅₄ Fase móvel: CHCl₃:EtOH:AcOH (100:40:6 v/v/v). Agente cromogênico: reagente natural e anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 100°C.

Figura 3. Análise da proliferação e viabilidade celular após tratamento com os extratos e frações de *B. trimera* e *B. articulata* na concentração de 100 µg/ml (Controle: controle com meio, Controle DMSO: controle com meio + 1% de DMSO). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni (p<0,05).

Figura 4. Efeitos dos extratos e frações de *B. trimera* e *B. articulata* na diferenciação osteogênica de CTMs na concentração de 100 µg/ml. O tratamento com as amostras realizado por um período de 3 semanas resultou em um aumento da diferenciação osteogênica de CTMs. (A) a diferenciação osteogênica foi determinada através da coloração dos depósitos de calcificação formados, com alizarin red S. x200. (B) A quantificação da diferenciação osteogênica foi realizada por determinação da densidade e área da coloração com alizarin red S utilizando um programa de análise de imagens (ImageJ). Os resultados estão apresentados como percentagem de controle (média ± desvio padrão, n=1). ***P<0,001 quando comparado com o controle (ANOVA seguido por Tukey).

Figura 5. Análise morfológica das células após tratamento com extratos e frações de *B. articulata* e *B. trimera* na concentração de 100 µg/ml. (1= controle, 2= EBH 1, 3= EBH 2, 4= terpenóides, 5= polifenóis, 6= quercetina). (A) 3 dias após tratamento, x100. (B) 13 dias após tratamento, x200.

Figura 6. Viabilidade celular após tratamento com a fração de polifenóis de *B. trimera* (C= grupo controle (somente meio), V= veículo (meio+DMSO 1%). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste de Tukey.**P<0,01, comparado com o grupo controle. Valores são expressos como média±desvio padrão. (n=3).

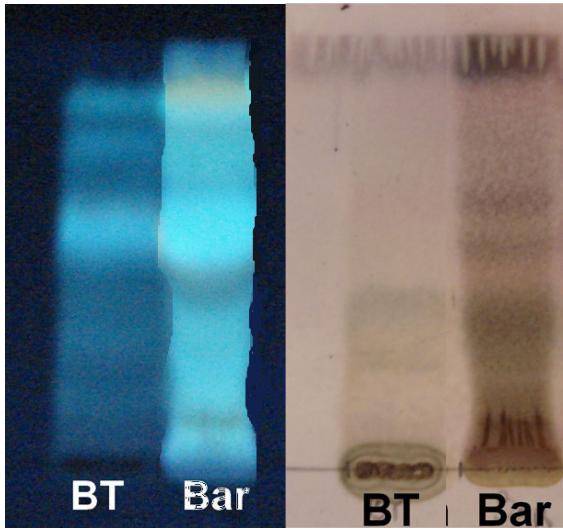


Figura 1

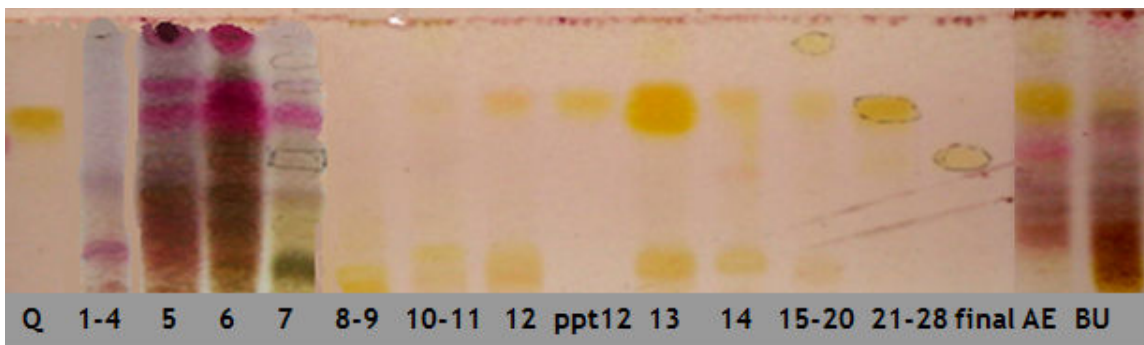


Figura 2

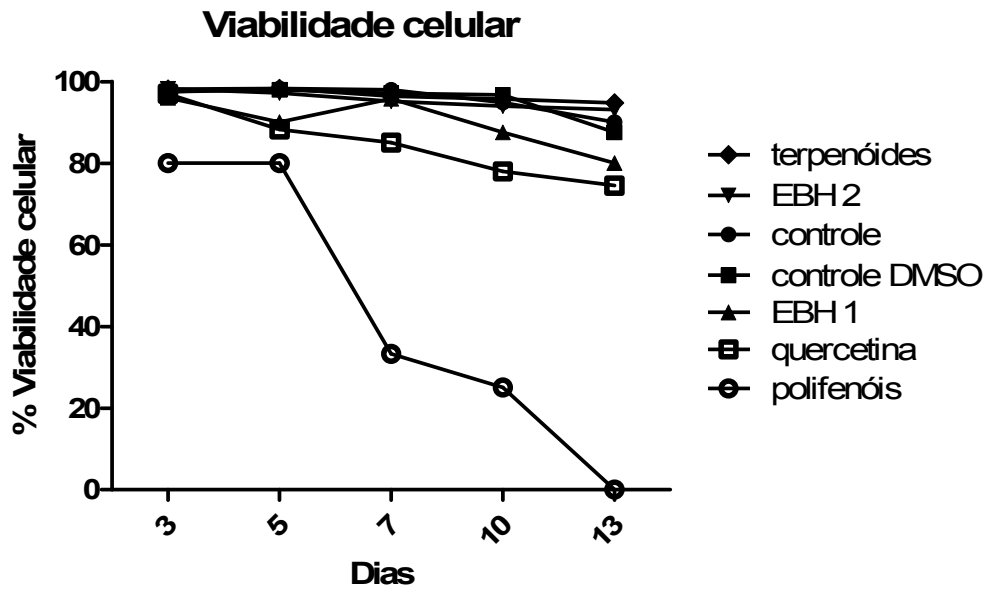
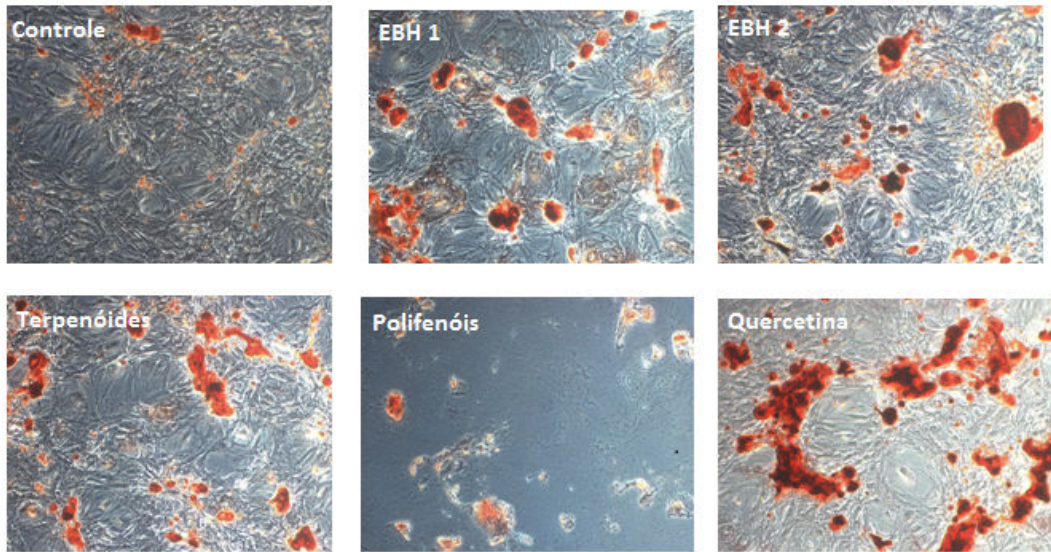


Figura 3

(A)



(B)

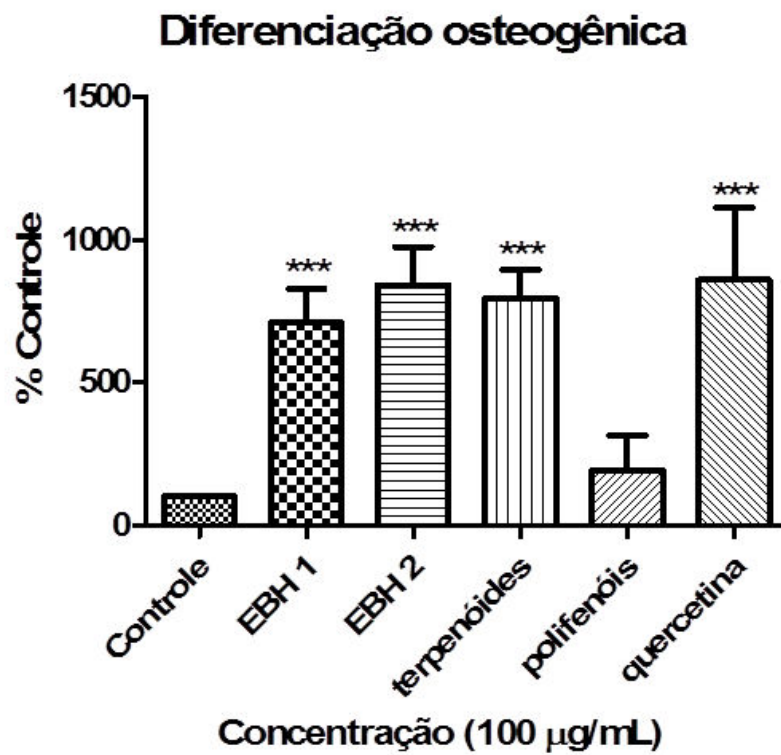
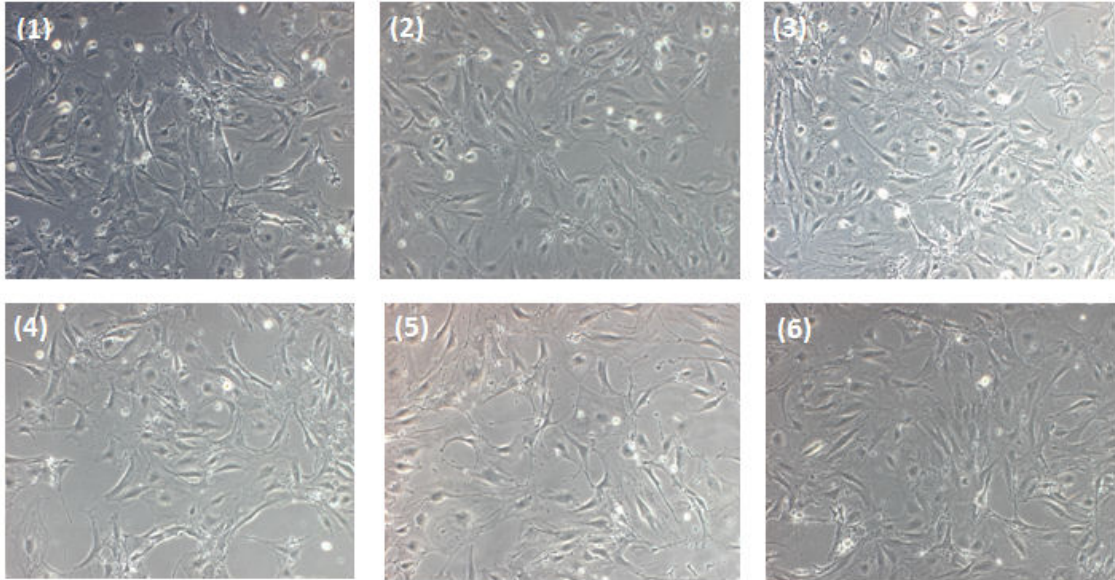


Figura 4

(A)



(B)

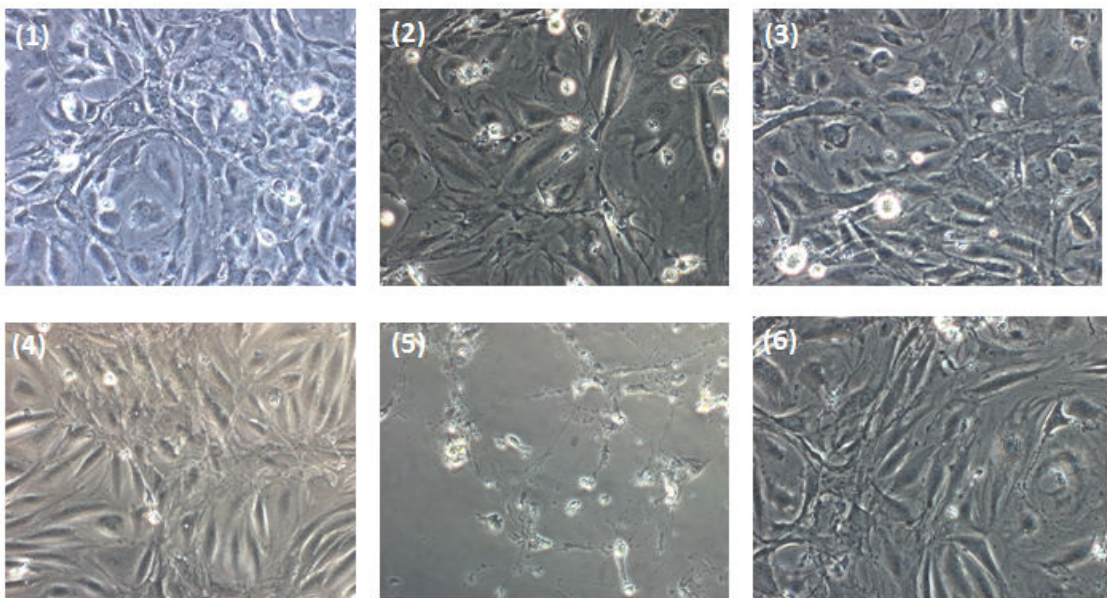


Figura 5

Viabilidade Celular (Polifenóis)

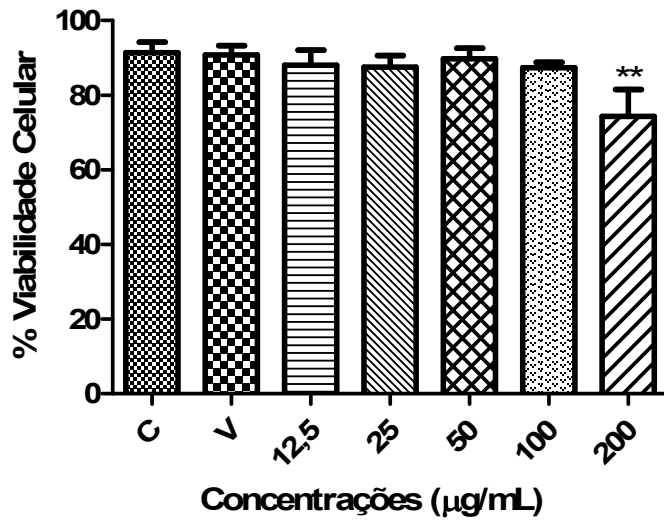


Figura 6

Phytomedicine

International Journal of Phytotherapy
and Phytopharmacology

Instructions to Authors

Aims and Scope

The following areas are covered:

Clinical, pharmacological, molecular/genomic, pharmacokinetic and bioavailability studies of standardized plant extracts, fractions, isolated constituents and phytopharmaceuticals thereof having significant bioactivities or could be promising candidates for further thorough pharmacological and clinical studies.

1. Basic and stringent Requirements for consideration of submitted papers:

The standardisation of all above listed plant materials used for the investigations, has to be carried out by means of HPLC, HPLC/MS or HPLC/NMR-fingerprinting inclusive the identification and quantitation of the main bioactive compounds which are or might be responsible for pharmacological activities. The methods have to be described in details: apparatus, columns, solvent systems, gradient, flow rate, detection etc. If the authors do not possess the required analytical equipment or expertise, they are asked to seek cooperation with a phytochemical laboratory. For all plant materials used in investigations stated as derived from cultivated plants or from their natural origin, voucher specimens must be deposited in a specific location with a voucher number. The site (GPS coordinates) and date of collection, with the part(s) used in the study, have to be documented.

Without phytochemical standardisation of the plant extracts, the results presented cannot be pharmacologically reproduced and are not acceptable for experimental and clinical studies.

Note: With immediate effect Phytomedicine will only accept two revisions of a manuscript.

2. The following areas have a restricted scope within Phytomedicine:

- Papers on the isolation and structure elucidation of novel bioactive compounds or the development of new analytical methods do not fall into the scope of Phytomedicine and should be reported elsewhere (e.g. Phytochemistry, Journal of Chromatography or Phytochemical Analysis). Extraordinary pharmacological and clinical studies of these novel natural products, however, are welcome.
- Screening results of a large number of plant extracts or plant constituents for antimicrobial or other pharmacological activities will not be considered unless they are focused on those plants or constituents which show extraordinary activities in comparison with internationally accepted positive (reference) compounds.
- “Dietary Supplements”, “Botanicals” or “Functional Food” are not within the scope of Phytomedicine unless they are standardized and pharmacologically investigated analogue to herbal drugs and if the evidences presented are comparable to therapeutic outcomes of a positive control.

Clinical Studies

- Clinical studies must be designed, implemented and analyzed in a manner to meet current standards for clinical trials (GCP = Good Clinical Practice), which are equivalent to those required for synthetic drugs.
- For guidelines and necessary information see the following internet address: www.consortstatement.org with the “Revised Recommendations for Improving the Quality of Reports of Parallel-Group Randomized Trials” which provides links for downloading the Consort Statement and a checklist as well as explanatory and elaboratory documents. Extensions of the Consort Statement for different types of trials including Herbal Medical Interventions are provided. (The Consort Statement is available in 10 different languages).
- Clinical studies must be approved by an Institutional Ethics Committee or its equivalent and it must be stated in the Method section that the research followed the guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans.

Pharmacological and molecular biological studies (*in vitro*, *ex vivo* or *in vivo*)

- Investigations with animals must state in the method section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care with stating the guidelines (e.g. European community guidelines/ EEC Directive of 1986 or the US guidelines/ NIH publication)
- Results have to be based on adequate statistics. Positive controls (reference/standard compounds) and at least three dose responses for conventional pharmacological experiments have to be included.
- Many polyphenolic- and terpenoids containing plant extracts exhibit polyvalent (pleiotropic) activities. Such extracts are of interest for further thorough pharmacological and therapeutic investigations only if one or two pharmacological activities are dominant and justify the therapeutic application for specified indications.
- Pharmacological studies with herbal drug combinations (e.g. 2–5 plants) will be accepted only if the single herbal extracts are HPLC finger printed and their major bioactive constituents are quantified before the single extracts are mixed

(combined) (see also as an example for the 3D-HPLC-analysis of multidrug combinations Amagaya S. et al., 2001, *Phytomedicine* 8, 338–342.).

□□Two plant extracts or a single constituent of these combined with a synthetic drug or antibiotic which are suggested to exhibit synergistic effects have to be investigated by the “isobol method” according to Berenbaum M. 1989, *Pharmacol.Rev.* 41: 93-141 (see also Wagner H. and Ulrich-Merzenich G. Synergy research: Approaching a new generation of phyto-Pharmaceuticals *Phytomedicine* 16: 97- 110 (2009).

□□Antimicrobial evaluation of plants are of scientific value only if these plant extracts show extraordinary biological activities in comparison with a synthetic or natural antimicrobial agent standard. It is not useful if the in vitro activity (MIC) of an extract exceeds 100µg/ml. For the correct determination of MIC values, see Eloff J.N., 2004, *Phytomedicine* 11: 3701.

□□Papers which describe classes of pharmacological activities such as flavonoids with antioxidative activity and isoflavones with estrogenic antiinflammatory activity, will be accepted only if the activities presented exceed those of standard substances and could be promising candidates for further pharmacological and clinical investigations.

□□All papers reporting gene expression profiling data

□□(microarray experiments) should comply with the Minimum Information about microarray experiments (MIAME) standard: (www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html). At least two **microarrays** should be provided for each experimental condition. Results of selected genes should be validated by a second method (e.g. RT-PCR) or protein data should be provided. In addition functional test (animal experiments/clinical data) undertaken simultaneously are desirable to allow an appraisalment of the biological/clinical relevance of the data. Alternatively, results of in vivo experiments with comparable dosages can be discussed. The presentation of a sole data collection is not acceptable. Biologically relevant information should be presented.

Gene nomenclature

Authors should use approved nomenclature for gene symbols. Please consult the appropriate nomenclature data bases for correct gene names and symbols. “Entrez Gene” is a useful resource. Approved human gene symbols are provided by HUGO Gene Nomenclature committee (HGNC):

www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature Approved Mouse symbols are provided by The Jackson Laboratory: www.informatics.jax.org/mgihome/nomen Approved C. elegans symbols are provided by Caenorhabditis Genetics Center:

<http://www.cbs.unmn.edu/CGC/Nomenclature/nomenguid.htm> For approved S. cerevisiae and S.pombe Symbols see:

<http://yeastgenome.org/help/yeastGeneNomenclature.shtml> and respectively: www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/SP_Name_FAQ.shtml

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving

requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit:

www.elsevier.com/fundingbodies

Conflict of interest A statement must be included as a footnote concerning any sources of financial support to the authors for the conduct of the studies being submitted. If any of the authors have received compensation from the sponsoring entities, it should be disclosed. Otherwise please state ‘no conflict to disclose’.

Prevention of Plagiarism

Contributions are accepted on the understanding that the authors have obtained the necessary authority for publication. Submission of multiauthored manuscripts implies the consent of each of the authors. The publisher will assume that the senior or corresponding author has specifically obtained the approval of all other co-authors to submit the article to this journal. Submission of an article is understood to imply that it is not being considered for publication elsewhere and that the author(s) permission to publish his/her article in this journal implies the exclusive authorization to the publisher to deal with all issues concerning copyright therein. Further information on copyright can be found on the Elsevier website.

Preparation and Format of manuscripts

Manuscripts submitted to Phytomedicine should be structured in the following manner:

Title: Full **author names** referenced by arabic superscripts with affiliation and addresses of all authors, e.g. A. Hymelea, T.H. Iversena, J. Rohloff^a*, B. Erhob^aDepartment of Biology, The Plant Biocentre, Norwegian University of Science and Technology N-7491 Trondheim, Norway ^bInstitute of Pathobiology, Addis Ababa University P.O. 1176; Addis Abeba, Ethiopia

*The phone, fax and email address of the corresponding author should be placed on the cover page.

An **Abstract** should contain brief information on purpose, methods, results and conclusions in no more than 1000 words.

Keywords: Not more than six words

A section of **abbreviations** should precede the manuscript with molecular biological content (see also section “microarray data”)

Introduction

Materials and Methods

Results

Discussion

A combined **Results and Discussion section** may also be appropriate.

Acknowledgement

Literature citations should appear parenthetically in the text as the last name of the author and year of publication, such as (Wagner, 1992), (Smith and Peters,

1991) or (Johnson et al., 1987). Citations should be presented in the bibliography alphabetically by author names and if two or more publications are used by the same authors and the same year of publication, lower case letters following the year of publication should distinguish them, e.g. (Smith, 1990a, b), (Gunter and Miller 1990b) etc. The correct citation in the bibliography is e.g. Brown, J.H., Tylor P., 1996. Muscarine receptor agonist and antagonists. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Eds.), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, New York, pp. 141–160. Liu, C.D., Kwan, D., Saxton, R.E., McFadden, D.W., 2000. Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J. Surgical Res.* 93, 137–143.

Nomenclature of plant materials have to be studied:

The most recent botanically accepted Latin binominal(s), with authorities, of the plant(s) used must be given, together with accepted synonymy, if appropriate. Vernacular names should also be given for plants used in the study. Data on plants not identified to the species level will not be accepted.

Abbreviations: See “Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals” (1991) *New England Journal of Medicine* 324:424–428.

Typewriting, Figures and Tables: The manuscript has to be written in the English language. Typewritten manuscripts should be double-spaced.

Text, including italics and bold characters, should be saved as Word or WordPerfect .rtf or .doc documents for Windows.

Figures and Tables: The maximum type area is 17 cm (6.7 inch) width and 22.5 cm (8.9 inch) height.

Figures must be clearly lettered and suitable for reproduction to fit either one column width (8.2 cm or 3.2 inch) or two-columns width (17 cm or 6.7 inch). In addition to the printed version figures and tables can be supplied in digital format (EPS, TIFF, JPG or PPT and XLS format, final resolution 300 dpi for halftones, 1270 dpi for black/white line drawings).

Colour: If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge that these figures will appear in colour on the web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the print version. Colour figures can be printed only if the costs are covered by the author (EURO 450.00 for one colour plate, EUR 350.00 for every following colour plate/ for more than one plate ask for a cost estimate). For further information on the preparation of electronic artwork, please see

www.elsevier.com/artworkinstructions

Label each figure with figure number. Figures

should be cited in the text as Fig. 1 or Figs. 1 and 2. Figures should be placed after the References (and Appendices, if any) in the manuscript. They should be preceded by the figure legends on a separate page. Indicate in the margins of the manuscript where figures should be placed. Tables should be prepared so that they can be printed in one column or full page width (see above). Tables should be submitted at the end of the manuscript, placed on separate pages, double spaced and numbered sequentially. Indicate in the margins of the manuscript where tables should be placed.

Tables should be cited in the text as Table 1 or Table 1 and 2. Tables containing a great amount of pharmacological data should be better presented as instructive graphs.

Graphical Abstract

Authors are requested to supply a graphical abstract for all types of articles at the time of the first submission. The graphic should be representative of the central message of the paper in a concise pictorial form. The dimension of the graphical abstract are: 5 cm by 17 cm and 200 x 500 pixels. Authors must supply the graphic separately as a digital file. For an example of a graphical abstract please click [here](#).

Language Editing

“Phytomedicine” publishes papers in clear and grammatically correct English, in as much as they are pertinent to the area of interest of the journal and conform to the specifications mentioned above. Authors who require information about language editing and copyediting services pre and post-submission please visit: www.elsevier.com/locate/languagepolishing or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>

Types of Manuscripts

Original Papers

The papers should contain not more than **12–15 typewritten pages** or up to **5,000 words**, including references, tables and figures. Previously reported methods should be referenced only. The number of references should not exceed 30 (except for review articles or reports on microarray data).

Short Communications

They should be condensed to **4–8 typewritten pages** or not more than **2,500 words** including references and a maximum of two illustrations.

Review Articles

Review articles will only be by invitation. Review articles can provide concise and critical updates on a subject of current interest. Herbal drug monographs are only acceptable if they contain the newest pharmacological and toxicological issues and an outlook on future directions.

Submission of Manuscripts

Please submit your manuscripts electronically to Elsevier Editorial System (EES): <http://ees.elsevier.com/phymed>

While submitting please select the type of article: Review, short communication, Letter to the editor or Original article. In order to allow readers to easily find articles of her/his special Interest, Phytomedicine has introduced for original articles the following subcategories:

- Cardiovascular System
- Diabetes/ Endocrinology
- Gastroenterology
- Immunology
- Infections
- Inflammation
- Oncology/ Hematology
- Neurology
- Urology
- Miscellaneous

For further details how to log into EES or questions on how to submit the manuscript, please see EESguide for authors: <http://support.elsevier.com>).

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Navigation

To view or download articles of interest, go to “Phytomedicine home”: www.phytomedicinejournal.com or “Science direct – Phytomedicine”: www.sciencedirect.com/science/journal/0944713 If starting from EES, please click “Journal Info” on the home page of “Phytomedicine”. This leads you to the general information of the journal. Here click “full text” to assess the recent published articles and the previous issues.