

EQUISETUM ARVENSE: AVALIAÇÃO DAS POSSIBILIDADES DE APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA

Maria Pia Ferraz

Professora Auxiliar
Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
mpferraz@ufp.pt

Ana Catarina Pereira

Faculdade de Ciências - UP
catbessa@gmail.com

Maria Ascensão Lopes

Professora Auxiliar
Faculdade de Engenharia - UP
malopes@fe.up.pt

Maria Helena Fernandes

Professora Catedrática
Faculdade de Medicina Dentária - UP
mhfernandes@fmd.up.pt

RESUMO

A procura de produtos naturais para o tratamento de doenças específicas tem aumentado muito nos últimos anos, nomeadamente aquelas direccionadas para doenças do tecido ósseo como por exemplo a osteoporose. A utilização de fitoestrogéneos, dehidroepiandrosterona (DHEA) e vitamina K2 não só é segura como tem havido resultados clínicos preliminares estatisticamente controlados que suportam a vantagem da utilização de produtos naturais no tratamento da osteoporose. Há vários produtos de medicina tradicional Chinesa utilizados em ortopedia alegadamente com resultados satisfatórios. Neste trabalho extractos de *Equisetum arvense*, uma planta que cresce em solo português, foram estudados de forma a avaliar a possibilidade de serem usados como factores indutores de crescimento ósseo.

PALAVRAS-CHAVE: Regeneração óssea; Cavalinha; Culturas celulares.

ABSTRACT

Consumers are increasingly looking to natural health products to manage specific diseases like bone tissue diseases such as osteoporosis. The safety of phytoestrogens, dehydroepiandrosterone (DHEA) and vitamin K2 and the preliminary positive results from randomized controlled trials, provides some support for the use of Natural Health Products (NHP) in the prevention of osteoporosis. There are several traditional Chinese medicines commonly used to manage disorders of orthopaedics and were alleged to have obtained satisfactory results. *Equisetum arvense* a plant present in Portuguese soil was studied in order to evaluate the possibility of being used as an osteogenesis stimulator factor.

KEY-WORDS: Bone regeneration; *Equisetum arvense*; Cell culture.

1. INTRODUÇÃO

Os problemas que afectam os ossos estão tornar-se progressivamente mais prevalentes à medida que a população vai envelhecendo. As fracturas decorrentes da osteoporose são, inclusivamente, consideradas um problema de saúde pública que implicam elevados custos, pelo que a procura de tratamentos efectivos que aumentem a massa óssea, melhorem os defeitos na microestrutura óssea e acelerem o processo de cura da fractura são urgentemente necessários.

Infelizmente, existem poucas terapias disponíveis para tratar ou prevenir a osteoporose e ajudar a reparação do osso, e todas apresentam desvantagens significativas. Por exemplo, os bisfosfonatos (ex. risedronato), medicamentos usados para tratar a osteoporose, incluem diversos efeitos secundários tais como reacções alérgicas, náusea, ulcerações pépticas entre outros. Adicionalmente, as hormonas de terapia de substituição com estrogénios naturais ou sintéticos aumentam o risco de embolia pulmonar e cancro da mama. (Putnam e Scutt *et al.*, 2007). Assim, devido à insatisfação com a medicina convencional nos países desenvolvidos, que não apresenta respostas satisfatórias a diversos problemas de saúde e à crença generalizada de que as preparações herbais como são “naturais”, são inócuas, em contraste com medicina convencional, o interesse pelas ervas medicinais tem aumentado (Capasso e Izzo *et al.*, 2000).

As culturas indianas, japonesas e chinesas e muitas outras utilizam, actualmente, diversas fórmulas tradicionais contendo combinações de ervas e especiarias no tratamento da osteoporose. Por exemplo, o ‘*Shu Di Shan Zha*’ é uma formula tradicional recomendada para a saúde do osso, cujos efeitos foram investigados por Xu e Lawson em 14 mulheres em menopausa. A fórmula administrada durante 4 meses foi capaz de diminuir os níveis de desoxipiridinolina (marcador de reabsorção), e tinha um efeito positivo na estrutura e função do osso (Xu e Lawson, 2004). Kassi *et al.* avaliaram os efeitos de quatro plantas gregas: *Sideritis euboica*, *Sideritis clandestina*, *Matricaria chamomilla* e *Pimpinella anisum* numa série de experiências *in vitro* e verificaram que todos os extractos estimulavam a diferenciação osteoblástica (Kassi e Papoutsis *et al.*, 2004). Os efeitos das ervas medicinais são devidos às características e concentrações dos seus múltiplos constituintes activos, pelo que a sua análise química e o estudo da sua acção biológica é essencial para a compreensão dos efeitos benéficos e despiste de possíveis efeitos tóxicos, e assim, tirar vantagens desta medicina alternativa.

A *Equisetum arvense* (Equisetaceae, nome tradicional: cavalinha) é uma planta com um caule aéreo principal ramificado com verticilos. Na sua extremidade terminal e nas ramificações apresenta uma estrutura de reprodução, denominada de estróbilo, onde se dá a produção de esporos. A cavalinha cresce em diversas regiões da Europa e na América do Norte, Central e do Sul, sendo utilizada na medicina tradicional como um agente anti-inflamatório. Diversos estudos associam ainda uma actividade hipoglicémica, diurética e antioxidante a diversos constituintes da *E. arvense* (Santos e Blanco *et al.*, 2005). Análises fitoquímicas de extractos hidroalcoólicos de *E. arvense* revelaram a presença de flavonóides (isoquercitina, campferol), esteróis (β -sitosterol, campesterol, isofucoesterol), taninos, saponinas e alcalóides (equispermina, palustina).

A cavalinha é a planta terrestre com maior quantidade de sílica, o que lhe permite ter diversas aplicações na medicina. Os investigadores acreditam que as propriedades medicinais anti-bacterianas e antisépticas associadas à planta são devidas ao elevado teor de sílica. A sílica, termo que se refere aos compostos de dióxido de silício, SiO_2 , é depositada nos caules sob a forma de uma fina camada superficial. O silício sob a forma de ácido ortossilícico $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ é absorvido pela planta e depositado sobre a forma amorfa $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, ficando imóvel e não sendo redistribuído. Existe uma relação indiscutível entre o Si e a formação óssea. Por exemplo a suplementação com silício em mulheres com osteoporose não só inibe a reabsorção óssea, como também aumenta o volume do osso trabecular e a densidade mineral do osso.

Do mesmo modo, o Si sob a forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ promove a formação óssea em modelos animais e celulares. O Si estimula os osteoblastos a segregarem colagénio do tipo I e outros marcadores envolvidos na maturação da célula e formação óssea (Rico e Gallego-Largo *et al.*, 2000; Reffitt e Ogston *et al.*, 2003).

Estas observações fazem da *E. arvense* um alvo de estudo potencial na procura de novas alternativas para o tratamento dos problemas ósseos. Neste trabalho foi avaliado o efeito dos extractos de uma planta endémica, a *Equisetum arvense* na proliferação osteoblástica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. EXTRACTO HIDROMETANÓLICO (HM) DE *EQUISETUM ARVENSE*

A *E. arvense* foi adquirida numa ervanária portuguesa sob a forma de partes aéreas secas, grosseiramente fragmentadas. As partes aéreas secas da *E. arvense* foram inicialmente trituradas para se obterem partículas vegetais de menores dimensões de modo a que a extracção fosse mais eficiente e menos demorada. De seguida, a *E. arvense* moída (2155,4 g) foi introduzida num recipiente lixiviador em vidro e compactada de modo a que as partículas ficassem uniformemente distribuídas e com um aspecto compacto. Posteriormente, adicionou-se o líquido extractor, 7,5 L de uma solução metanol-água (1:1) de modo a embeber e cobrir totalmente o macerado, que foi deixado em repouso durante 3 dias para permitir a extracção das substâncias para a fase líquida, um processo denominado maceração. O líquido extractor foi recolhido e evaporado em evaporador rotativo de forma a obter-se o extracto seco. A evaporação foi efectuada a pressão reduzida (bomba de vácuo) num evaporador rotativo a 50 °C. A recuperação da mistura hidrometanólica conseguida por condensação dos vapores num refrigerante de serpentina com fluído de refrigeração água a 10 °C recolhido era reutilizado como líquido extractor ao adicionar-se novamente ao recipiente lixiviador. Este processo decorreu de modo contínuo durante cerca de 20 dias até extracção completa da parte aérea de *E. arvense*. Após a extracção obteve-se um extracto viscoso distribuído pelos balões 1 e 2 respectivamente recolhido nos dias 4-10 e 10-26.

O extracto HM do balão 1 (372,8 g) foi solubilizado com 200 mL da solução metanol-água (1:1). O mesmo processo foi usado para solubilizar o extracto HM do balão 2 (89,5 g), com a excepção de que para além dos 200 mL da mistura hidrometanólica foi necessário adicionar mais 50 mL de água para a sua solubilização. Seguidamente, retiraram-se 2,7 mL da solução do balão 1 para um balão de fundo cónico 1 e 14 mL da solução do balão 2 para um balão de fundo cónico 2 equivalente a 5 g de cada um dos extractos HMs.

Adicionalmente, preparou-se uma mistura M dos dois extractos HMs 1 e 2, num balão de fundo cónico M, numa proporção 1:4, já que a quantidade do extracto HM 1 obtido foi 4 vezes superior à quantidade do extracto HM 2. As soluções nos balões de fundo cónico 1, 2 e M foram levadas ao evaporador rotativo à temperatura de 50 °C e sob vácuo para que ocorresse a evaporação do solvente. Seguidamente, deixou-se o extracto HM contido nos diferentes balões exposto parcialmente ao ar durante 5 dias e à temperatura ambiente até se obter um peso constante (pesaram-se diariamente os balões de fundo cónico). Finalmente, solubilizaram-se os extractos HMs contidos nos balões de fundo cónico com dimetilsulfóxido (DMSO para espectroscopia, MERCK) de forma a obterem-se três soluções de extractos HM distintas: 1, 2 e M, com a concentração de 100 mg/mL. Para facilitar a solubilização dos extractos HMs em DMSO recorreu-se a um aparelho de ultra sons e a agitação constante com vareta de vidro. Os extractos HMs 1, 2 e M dissolvidos em DMSO foram aliquoteados e guardados em eppendorfs a -20 °C.

2.2. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS

A linha celular MG63 (ATCC) obtida de osteosarcoma humano foi cultivada em α -Minimum Essential Medium (α -MEM, GIBCO) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal, 1% (v/v) de penicilina – estreptomicina (100UI e 100 mg/mL, respectivamente), 1% (v/v) de ácido ascórbico (50 μ g/mL) e 1% (v/v) de anfotericina B (2,5 μ g/mL) até atingirem a confluência. As células aderidas foram enzimaticamente libertadas (tripsina 1:250, Sigma), contadas usando um hemocítmetro e cultivadas a duas densidades diferentes 5×10^3 células/cm² em placas de cultura de 96 poços conforme as condições experimentais detalhadas (Ferraz e Knowles *et al.*, 2000)

Após uma noite de incubação, a 37 °C em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂, adicionaram-se os extractos 1, 2 e M nas concentrações 0,05%, 0,1%, 0,5% e 1% (v/v) (preparadas em meio de cultura). A proliferação celular ao longo dos dias foi avaliada com base no método de colorimétrico de MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio]. Adicionalmente, foi realizado um estudo do efeito do dimetilsulfoxido (DMSO) na proliferação celular das MG63, que teve como objetivo servir de controlo nas experiências realizadas com os extractos de *E. arvense*, que se encontravam dissolvidos neste solvente. O meio de cultura foi mudado duas vezes por semana nas experiências com duração superior a três dias (duas exposições aos extractos por experiência) e a monitorização das culturas foi feita diariamente usando o microscópio de contraste de fase. A morfologia das culturas foi caracterizada ao longo do tempo por microscopia de contraste de fase (MCF), ensaios histoquímicos e microscopia confocal.

Foi utilizado o método colorimétrico MTT que consiste em medir indirectamente a viabilidade celular pela actividade enzimática mitocondrial das células vivas. Este método mede a redução do sal amarelo tetrazólio num produto insolúvel de formazano pelas mitocôndrias das células viáveis. Com efeito, as células foram incubadas com 10 μ L de MTT (0,5 mg/mL) durante 3 horas em estufa humidificada a 37°C e contendo 5% de CO₂. Após incubação, removeu-se o meio e adicionou-se 200 μ L de DMSO para lisar as células e solubilizar os cristais coloridos. A absorvância foi posteriormente determinada num leitor de microplacas a 600 nm. Segundo este método intensidade de cor produzida é directamente proporcional ao número de células viáveis.

Os resultados foram expressos como a media \pm desvio padrão. O significado estatístico foi analisado pelo teste-t de Student bi-caudal e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. O rácio de estimulação de crescimento (REC) foi calculado segundo a equação: $REC\% = [(M_{culturas na presença de extracto} - M_{controlo}) / M_{controlo}] \times 100$, em que M é a média das aborvâncias de pelo menos 5 réplicas.

2.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CULTURAS

Ensaio histoquímico. Para corar as células histoquimicamente, as culturas foram inicialmente fixadas. A coloração foi efectuada com os corantes hematoxilina e eosina, que permitem visualizar o núcleo e o citoplasma.

Microscopia confocal. Para observação das células por microscopia confocal, as culturas foram inicialmente fixadas com formaldeído a 10%. Para a coloração dos filamentos de actina e DNA permeabilizaram-se as células com a solução de Triton 0,1% em (Phosphate Buffer Solution) PBS, adicionou-se albumina (10 mg/mL BSA) com 1 μ g/mL de RNAase em PBS durante uma hora. Adicionou-se *phalloidina* (100 nM) após 1 hora e adicionou-se iodeto de propídeo (10 μ L stock/10 mL PBS). As imagens foram obtidas num microscópio Laser Scanning Confocal Microscope Leica SP2 AOBS SE (Leica Microsystems, Germany).

3. RESULTADOS

3.1. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DA LINHA MG63

No dia 5 houve um aumento da proliferação celular nas culturas expostas a 0,05% e 0,1% (v/v) do extracto HM 1 e M. O aumento foi de 54% e 29%; e de 37% e 29%, respectivamente (Fig. 1 a e c). As culturas expostas a 0,5% (v/v) de extracto HM 1 e M não apresentaram diferenças na sua proliferação estatisticamente significativas quando comparadas com o controlo. Em relação ao extracto HM 2 verificou-se que culturas expostas a 0,5% (v/v) de extracto apresentaram um decréscimo de 74% em relação às culturas controlo ($p < 0,01$) e que não ocorreu estimulação da proliferação em nenhuma cultura (Fig.1b). Na presença de 1% (v/v) dos extractos HM 1, 2 e M manteve-se o padrão de morte celular em todas as culturas ($p < 0,01$) (Fig 1).

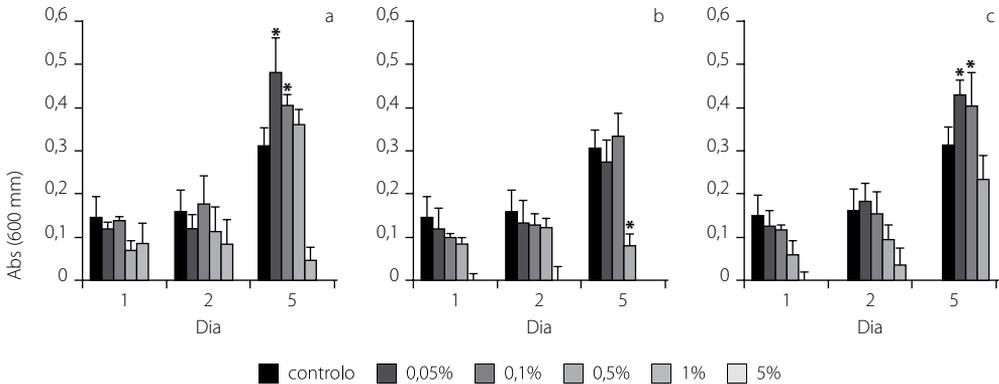


Figura 1. Proliferação celular da linha MG63 com sementeira inicial de $5,0 \times 10^3$ cél/cm² na presença de a) extracto HM 1, b) extracto HM 2 e c) extracto HM M. A proliferação celular foi determinada usando o ensaio colorimétrico MTT (média \pm desvio padrão, $n = 6$, * $p < 0,05$ teste t de Student). Controlo (Verde água), 0,05% (Laranja), 0,1% (Amarelo), 0,5% (Azul), 1% (Rosa) e 5% (Lilás).

3.2. MORFOLOGIA DAS CÉLULAS MG63

Para se detectar possíveis alterações na morfologia das células MG63, expostas aos diferentes extractos, recorreu-se à observação das imagens obtidas por MCF (células coradas pelo método eosina-hemoxilina) (Fig 2-3) e microscopia confocal (Fig 4), não se verificando qualquer alteração da morfologia nas culturas expostas aos extractos HM de *E. arvensis*.

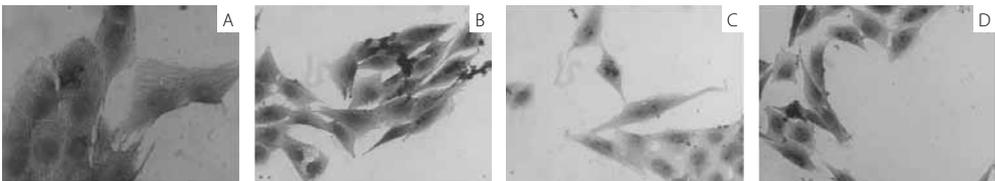


Figura 2. Coloração histoquímica das células MG63 cultivadas em situação controlo e na presença de extractos HM de *E. arvensis* após um dia de incubação a) células controlo, b) células expostas a 0,05% de extracto HM 1, c) células expostas a 0,1% de extracto HM 1, d) células expostas a 0,05% de extracto HM 2. Não se verificaram quaisquer alterações da morfologia nas culturas expostas aos extractos HM de *E. arvensis*.

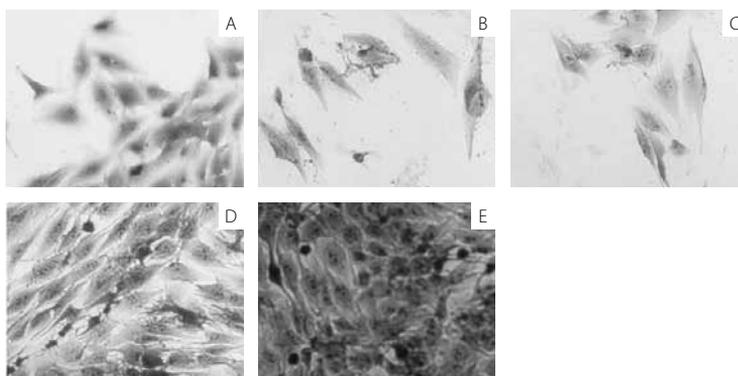


Figura 3. Coloração histoquímica das células MG63 cultivadas em situação controlo e na presença de extractos HM de *E. arvense* após três dias de incubação a) células controlo, b) células expostas a 0,05% de extracto HM 1, c) células expostas a 1% de extracto HM 1, d) células expostas a 0,05% de extracto HM 2 e e) células expostas a 0,05% de extracto HM M.

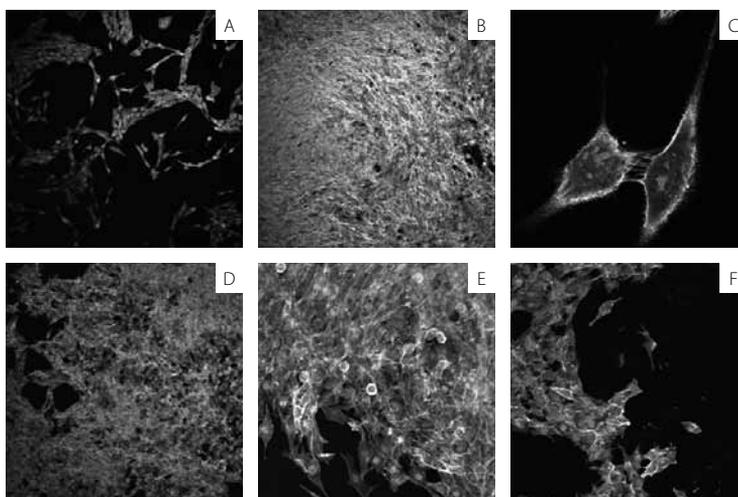


Figura 4. Coloração dos filamentos de actina e DNA das células MG63 cultivadas na ausência de extracto HM (100x) após a) 1 dia de incubação, b) 4 dias de incubação; c) 1 dia de incubação (800x); d) 3 dias de incubação na presença de 0,5% de extracto, e) 4 dias de incubação (200x) na situação controlo e f) 4 dias de incubação na presença do extracto HM de *E. arvense*.

4. DISCUSSÃO

Nos ensaios com os extractos HM da *E. arvense* pretendeu-se estudar qual o efeito de cada um dos extractos HM (1, 2 e M) na proliferação celular da linha MG63. Por observação da Figura 1 verificou-se que os efeitos observados na proliferação celular na presença dos extractos HM 1 e M foram semelhantes, o que seria de esperar visto que o extracto M corresponde a uma mistura dos extractos HM 1 e 2, em que o extracto HM 1 está presente numa quantidade quatro vezes superior ao extracto HM 2. Por outro lado, o efeito do extracto HM 2 na proliferação da linha MG63 foram diferentes dos observados nas culturas

na presença dos extractos HM 1 e M. O facto de os diversos extractos possuírem um comportamento biológico diferente poderá ser explicado por possuírem constituintes químicos distintos ou presentes em concentrações desiguais. A explicação para isto tem a ver com a utilização durante o processo extractivo de uma mistura metanol:água (1:1) que era recuperada e reutilizada. Pelo facto de o metanol ter um ponto de ebulição mais baixo a solução extractora ia progressivamente ficando mais rica no componente menos volátil (água), o que diminuiu a sua capacidade extrair compostos mais apolares e aumentou a capacidade de extrair compostos mais polares. Assim, o balão 1 teria maior concentração de compostos apolares, contrariamente ao balão 2, onde estes compostos estariam mais diluídos. Por outro lado, a quantidade de extracto presente no balão 1 no final da extracção revelou ser 4x superior aquela do balão 2, pelo que o primeiro poderia conter, para além de uma maior concentração de alguns compostos bioactivos, outros que estando presentes na planta em menor quantidade já teriam sido totalmente extraídos não estando presentes no extracto 2. Na presença dos extractos HM 1 e M (Fig. 1) verificou-se uma estimulação da proliferação celular, o que não aconteceu nas culturas expostas ao extracto HM 2. Adicionalmente, como para o extracto HM 2 se observou inibição nas culturas expostas a quantidades pequenas de extracto pode-se sugerir que este seria mais rico em compostos com efeito inibidor da proliferação celular, já que, no último dia, concentrações inferiores de extracto 2 inibiram a proliferação – 0,1% e 0,5% nas culturas com densidade celular inicial de $1,0 \times 10^4$ cél/cm² e 0,5% nas culturas com densidade celular de $5,0 \times 10^3$ cél/cm², enquanto para o extracto 1 foi necessário 1% (v/v) para que ocorresse inibição. Por outro lado, a observação das imagens de MCF e confocal parecem sugerir que a morfologia das células não foi afectada pela presença do extracto (Fig. 2-4).

A estimulação da proliferação celular observada na presença dos extractos HM 1 e M da *Equisetum arvense* poderá ser explicada pela presença de substâncias com bioactividade. Pelo facto dos extractos serem matrizes muito complexas não nos é possível saber qual, ou quais, os compostos responsáveis por esta acção biológica. No entanto, uma pesquisa na literatura pode dar-nos algumas pistas sobre os compostos, ou tipo de compostos, hipoteticamente responsáveis por actividades biológicas apresentadas.

Assim, por exemplo Prouillet *et al.* (Prouillet e Maziereb *et al.*, 2004) mostraram que os flavonóis, quercitina e campferol na quantidade de 50 μ M, aumentavam a actividade da fosfatase alcalina (ALP) marcador fenotípico de diferenciação celular (Farley e Baylink, 1986), nas células MG63, sem que ocorresse efeito citotóxico significativo. De facto, muitos investigadores mostraram que os flavonóides, família que inclui as isoflavonas e flavonóis, têm actividade estrogénica, isto é, são capazes de ligar receptores de estrogénio, sendo denominados de fitoestrogénios. Assim, a quercitina e campferol que possuem a capacidade de ligar os receptores de estrogénio localizados na membrana plasmática dos osteoblastos, provavelmente aumentaram a expressão de ALP nas células MG63 por interacção com os receptores de estrogénio, o que activou a ERK (extracellular signal-regulated kinase) e estimulou a síntese nuclear de proteínas. Prouillet sugeriu, então que a quercitina e campferol podiam ser vistos como potenciais fitoquímicos para contrariar os efeitos da deficiência de estrogénio nos ossos. Adicionalmente, Wattel *et al.* (Wattel e Kamel *et al.*, 2003) demonstraram que a quercitina e o campferol diminuíam a actividade osteoclástica em células preparadas a partir de osso de coelho e induziam a apoptose osteoclástica em células purificadas (apoptose dependente da dose), o que diminuía a reabsorção óssea *in vitro*.

No entanto, outros investigadores mostraram que a quercitina, diminuía a proliferação, diferenciação e mineralização de células do tipo osteoblástico de rato calvariae (células ROB). Os autores deste estudo descobriram que a exposição a 50 μ M de quercitina provocava a acumulação de células ROB na fase G1 do ciclo celular via p21^{WAF1/CIP1}, inibidor de cdks, cuja expressão de mRNA aumentava (Notoyaa e Tsukamotoa *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram obtidos para a linha celular MC3T3-E1, onde o tratamento com a 10 μ M quercitina não induzia apoptose mas provocava inibição do crescimento por acumulação das células na fase G0/G1 do ciclo celular (Son e Kook *et al.*, 2006). Estes estudos que

levaram a conclusões contraditórias sobre a acção da quercitina em diferentes linhas celulares osteoblásticas alertam que é preciso ter cautela em relação a generalizações que tentem abranger a acção destes compostos *in vivo*.

Adicionalmente, os fitoesteróis campesterol e β -sitosterol, constituintes da cavalinha, também demonstram uma acção benéfica nas células ósseas. Em estudos com células osteoprogenitoras derivadas de ratos calvaria recém-nascidos, o campesterol promoveu a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos (aumento da actividade de ALP) e inibiu a actividade dos osteoclastos. Por outro lado, estudos com extractos alcoólicos de *Rehmannia glutinosa* (Oha e Kimb *et al.*, 2003), cujos principais constituintes são o β -sitosterol e o manitol mostraram um aumento da proliferação de células MG63 e na produção de ALP por células da linha celular humana HOS.

Os estudos anteriores demonstraram que certos constituintes orgânicos presentes na *E. arvense* têm um papel na actividade dos osteoblastos. Contudo, a *E. arvense* possui um elevado teor em silício, mineral que segundo a literatura poderá estar associado aos efeitos proliferativos verificados com os extractos HM 1 e M.

Carlisle (Carlisle, 1970) demonstrou a elevada importância deste mineral na formação do osso e calcificação, num estudo em que mostraram que o silício estava localizado em áreas de crescimento activo, como o osteóide, de ratos jovens, podendo representar cerca de 0,5% de peso total nessas áreas. Estudos adicionais mostraram que o Si aquoso induz a proliferação dos osteoblastos, diferenciação e produção de colagénio, e tem efeitos dependentes da dose em células osteoclasticas *in vitro*. Reffitt *et al.* observou que células MG63 expostas a concentrações de Si de 0-50 μ M (0-1.4 ppm Si) mostravam um aumento das actividades da ALP e da osteocalcina (Reffitt e Ogston *et al.*, 2003). Estudos mais antigos com culturas de osteoblastos humanos na presença de 0.1-100 ppm de Si aquoso por 48 horas mostraram que o Si levava a um aumento dependente da dose da proliferação dos osteoblastos e da diferenciação celular através da regulação do TGF- β (Transforming growth factor- β)(Keeting e Oursler *et al.*, 1992).

Futuramente, os efeitos benéficos que a *E. arvense* demonstrou na estimulação da proliferação celular podem ser aplicados à regeneração óssea no campo dos substitutos ósseos.

5. CONCLUSÃO

Com este trabalho experimental conclui-se que o extracto HM 1 da *E. arvense* possui componentes bioactivos que estimulam a proliferação celular da linha MG63 *in vitro*, podendo eventualmente ser utilizado em substitutos ósseos para uma mais rápida regeneração, após estudos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- CAPASSOA, R., Izzo, A.A., Pinto L., Bifulco T., Vitobell C., Mascol N. (2000). Phytotherapy and quality of herbal medicines. *In: Phytotherapy*, 71, pp. S58-S65.
- CARLISLE, E.M. (1970). Silicon: a possible factor in bone calcification. *In: Science*, 167(916), pp. 279-280.
- FARLEY, J.R., Baylink, D. (1986). Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index *in vitro*. *In: Metabolism*, 35, pp. 563-571.
- FERRAZ M. P., Knowles J. C., Olsen I., Monteiro F. J., Santos J. D. (2000). Flow cytometry analysis of the effects of pre-immersion on the biocompatibility of glass-reinforced hydroxyapatite plasma sprayed coatings. *In: Biomaterials*, 21 (8), pp. 813-820.
- KASSI, E., Papoutsis, Z., Fokialakis, N., Messari, I., Mitakou, S., Moutsatsou, P. (2004). Greek plants exhibit selective estrogen receptor modulator (SERM)-like properties. *In: J Agric Food Chem*, 52, pp. 6956-6962.
- KEETING, P., Oursler, M., Wiegand, K., Bonde, S., Spelsberg, T., Riggs, B. (1992). Zeolite A increases proliferation, differentiation and TGF-beta production in normal adult human osteoblast-like cells *in vitro*. *In: J Biomed Mater Res*, 7, pp. 1281-1289.
- NOTOYAA, M., Tsukamoto, Y., Nishimura, H., Woo, J.-T. (2004). Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts *in vitro*. *In: European Journal of Pharmacology*, 485, pp. 89-96.
- OHA, K.-O., Kimb, S.-W., Kimc, J.-Y., Kod, S.-Y., Kime, H.-M., Baekf, J.-H., Ryoog, H.-M., Kima J.-K. (2003). Effect of *Rehmannia glutinosa* Libosch extracts on bone metabolism. *In: Clinica Chimica Acta*, 334, 185-195.
- PROUILLET, C., Maziereb J.C., Maziereb, C., Wattela, A., Braziera, M., Kamela, S. (2004). Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *In: Biochemical Pharmacology*, 67, pp. 1307-1313.
- PUTNAM, S.E., Scutt, A.M., Bicknell, K., Priestley, C.M., Williamson, E.M. (2007). Natural products as alternative treatments for metabolic bone disorders and for maintenance of bone health. *In: Phytotherapy Research*, 21, pp. 99-112.
- REFFITT, D., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheug, H.F.J., Evans, B.A.J., Thompson, R.P.H., Powell, J.J., Hampson, G.N. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblast differentiation in human osteoblast-like cells *in vitro*. *In: Bone*, 32, pp. 127-135.
- RICO, H., Gallego-Largo, J.L., Hernandez, E.R., Villa LF, Sanchez-Atrio, A., Seco, C., Gervas, J.J. (2000). Effects of silicon supplementation on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *In: Calcif Tissue Int*, 66, pp. 53-55.
- SANTOS, G., Blanco, M., Monte, M. (2005). Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extracts of *Equisetum arvense*. *In: Phytotherapy*, 79, pp. 508-513.
- SON, Y.-O., Kook, S.-H., Choi, K.-C., Jang, Y.-S. (2006). Quercetin, a bioflavonoid, accelerates TNF- α induced growth inhibition and apoptosis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *In: European Journal of Pharmacology*, 529, pp. 24-32.
- WATTEL, A., Kamel, S., Mentaverri, R., Lorget, F., Prouillet, C., Petit, J.-P., Fardelonne, P., Brazier, M. (2003). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. *In: Biochem. Pharmacol*, 65, pp. 35-42.
- XU, H., Lawson, D. (2004). Effects of Chinese herbal medicine on bone structure and function. *In: J Tradit Chin Med*, 24, pp. 224-23.