

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA**

**EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Dichorisandra thyrsiflora* Mik
(Commelinaceae) SOBRE CÉLULAS PIGMENTARES DE ANFÍBIOS E
MAMÍFEROS: ESTUDOS PRELIMINARES PARA FUTURO EMPREGO
TERAPÊUTICO EM DESORDENS DE PIGMENTAÇÃO HUMANA**

Acadêmica: Mariana de Sá Carneiro

Orientadora : Prof^a. Ana Maria Caliman Filadelfi¹

Colaboradores: Prof^a. Ana Maria de Lauro Castrucci²

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Visconti²

Prof. Dr. Cid Aimbiré M. dos Santos³

Dr. Paulo Cordeiro Caiana⁴

1. Departamento de Fisiologia, SCB, UFPR.
2. Departamento de Fisiologia, IB, USP.
3. Departamento de Farmácia, UFPR.
4. Consultório médico da FUNAI (regional de Curitiba).

Monografia apresentada ao Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como parte dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Curitiba

1997

Dedicatória:

À minha família pelo exemplo de sucesso, pelos valores, amor e apoio.

Ao Dr. Hugo pelo tratamento que me curou do vitiligo.

Aos Índios Guaranis pela sabedoria.

Aos portadores de vitiligo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos especialmente à Fundação Nacional do Índio (FUNAI - regional de Curitiba), nas pessoas do Sr. Sérgio de Campos e do Dr. Paulo Cordeiro Caiana, por toda a atenção dispensada.

Ao Sr. Marcos Pedro e à comunidade indígena de Cotinga por permitirem nossa entrada na ilha e a coleta dos exemplares de *D. thyrsiflora* que foram trazidos para Curitiba.

À Sandra Mara, pelo empenho pessoal em nos ajudar neste trabalho.

Ao Prof. Sandro M. da Silva, do Departamento de Botânica da UFPR, pela pronta identificação taxonômica dos exemplares de *D. thyrsiflora*.

À Prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Marques, do Departamento de Farmacologia da UFPR, pelas relevantes informações iniciais sobre a preparação do extrato da citada espécie e sobre os testes de toxicidade que costumam ser realizados nos trabalhos científicos com produtos naturais farmacologicamente ativos.

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré dos Santos pelo empenho em realizar a coleta e a preparação dos extratos de *D. thyrsiflora* e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao grupo do Laboratório de Fisiologia da Célula Pigmentar (IB-USP), por proporcionar uma experiência de trabalho em laboratório equipado para realização dos experimentos necessários, pela oportunidade de conhecer pesquisadores experientes e produtivos nesta área, pelos valiosos ensinamentos, pela atenção, acompanhamento e auxílio dos estagiários, pós - graduandos e professores.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** - Vitiligo vulgar com evidente distribuição simétrica.....17
- Fig. 2** - Vitiligo universal em mulher negra com pigmentação residual na área central da face.....17
- Fig. 3** - Vitiligo misturado: segmentar (manchas acrômicas na porção esquerda do abdômem) associado ao vulgar (outras manchas acrômicas).....17
- Fig. 4** - Exemplares de *Dichorisandra thyrsoiflora* (Commelinaceae).....18
- Fig. 5** - Forma de aplicação do sumo do caule de *Dichorisandra thyrsoiflora* sobre as manchas acrômicas presentes na pele do indivíduo A19
- Fig. 6** - Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Dichorisandra thyrsoiflora* em peles de *Bufo ictericus*.....28
- Fig. 7** - Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Dichorisandra thyrsoiflora* sobre a proliferação de células de melanoma amelanótico metastático humano C32TG.....29
- Fig. 8** - Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Dichorisandra thyrsoiflora* sobre a atividade tirosinásica de células de melanoma amelanótico metastático humano C32TG.....30
- Fig. 9** - Efeito citostático do extrato de *Dichorisandra thyrsoiflora* (1000µg/ml) em linhagem celular de melanoma amelanótico metastático humano C32TG.....31

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
1. INTRODUÇÃO	1
1.1) Pele, melanócitos e melanogênese	1
1.1.1) Pele.....	1
1.1.2) Melanócitos e melanogênese.....	2
1. 2) Distúrbios de pigmentação	5
1.2.1) Vitiligo.....	6
1.2.1.1) Características gerais.....	6
1.2.1.2) Classificação ou tipos de vitiligo.....	8
1.2.1.3) Hipóteses etiológicas e distúrbios associados ao vitiligo.....	9
1.2.1.4) Tratamentos utilizados.....	12
1.3) <i>Dichorisandra thyriflora</i>	15
1.3.1) Classificação taxonômica.....	15
1.3.2) Usos terapêuticos / justificativa do trabalho.....	15
2. OBJETIVOS	20
2.1) Objetivo geral.....	20
2.2) Objetivos específicos.....	20

3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1) Coleta do vegetal e preparação do extrato hidroalcoólico.....	21
3.2) Bioensaios <i>in vitro</i> : preparações de peles isoladas de <i>Bufo ictericus</i>	22
3.3) Obtenção e manutenção das linhagens de células em cultura.....	23
3.3.1) Parâmetros analisados.....	23
3.3.1.1) Proliferação celular.....	24
3.3.1.2) Atividade tirosinásica.....	24
3.3.1.3) Citotoxicidade.....	24
3.4) Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS	26
4.1) Peles isoladas de <i>Bufo ictericus</i>	26
4.2) Células da linhagem de melanoma amelanótico metastático humano C32TG.....	26
4.2.1) Sobre a proliferação celular.....	26
4.2.2) Sobre a atividade tirosinásica.....	26
4.2.3) Sobre a citotoxicidade.....	27
5. DISCUSSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1) Pele, melanócitos e melanogênese

1.1.1) Pele

Epitélios são tecidos formados por células normalmente poliédricas, justapostas e muito coesas, apresentando pouca substância intercelular. Comunicam-se com o tecido conjuntivo geralmente através de uma lâmina basal composta por proteínas e glicoproteínas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974).

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

A pele constitui-se num epitélio do tipo estratificado pavimentoso com função de revestimento da superfície externa do corpo. Divide-se numa porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme e, numa porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Servindo de suporte à derme com mesma origem e morfologia, existe a hipoderme que, contudo, não faz parte da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974).

A epiderme diferencia-se no segundo mês de gestação embrionária, chegando, ao fim do quarto mês, à sua formação definitiva, que inclui quatro camadas, da derme até a superfície (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974):

- *camada basal* ou *germinativa*: células com intensa atividade mitótica, responsáveis pela constante renovação da epiderme;
- *camada espinhosa*: células com desmossomos que desempenham papel importante na coesão característica da epiderme. Denomina-se epitélio malpighiano ou *camada de Malpighi*, o conjunto, camada basal e camada espinhosa;
- *camada granulosa*: células com grânulos de queratohialina em seu citoplasma, talvez associados ao processo de queratinização.
- *camada lúcida*: delgada camada de células anucleadas.

- *camada córnea*: de espessura variável, constitui-se por células achatadas, mortas e anucleadas, cujo citoplasma contém queratina. É responsável pela relativa impermeabilidade da pele.

Abaixo da epiderme encontra-se a derme, formada por tecido conjuntivo, com fibroblastos, colágeno e elastina, que diferencia-se no decorrer do terceiro e quarto mês de gestação. Alcança a espessura máxima de 3 mm e apresenta, ainda, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e estruturas derivadas da epiderme como pêlos, glândulas sebáceas, sudoríparas e unhas. É composta por duas camadas: reticular (tecido conjuntivo denso) e papilar (tecido conjuntivo frouxo, com papilas que se projetam na epiderme; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974).

1.1.2) Melanócitos e melanogênese

A partir do terceiro mês de desenvolvimento embrionário, a epiderme é invadida por melanócitos, células que provêm da crista neural / melanoblastos. Os melanócitos encontram-se geralmente entre a camada basal da epiderme e a lâmina basal. Apresentam citoplasma globoso e prolongamentos que se dirigem à superfície da epiderme, passando entre e dentro das células (queratinócitos; THODY & SHUSTER, 1989) das camadas basal e espinhosa. De modo geral, encontram-se melanócitos na camada basal da epiderme, no bulbo dos folículos pilosos, na cóclea (BENNETT, 1993), na coróide, na íris, no corpo papilar e nas leptomeninges (POPOWSKI, 1997).

Entre as células epiteliais, mais frequentemente na camada espinhosa, encontram-se, também, células ramificadas denominadas células de Langerhans, cuja função é controvertida. Alguns autores admitem que sejam melanócitos que perderam a capacidade de sintetizar melanina (THODY & SHUSTER, 1989), outros acreditam que sejam células distintas, devido às diferenças observadas ao microscópio eletrônico (DEMIS, 1978).

Os melanócitos em geral produzem melanina que pode ser do tipo eumelanina, feomelanina e tricocromo. A eumelanina, tipo mais comum na pele humana, é um dos fatores que determinam a sua coloração. Pode ser preta ou

marrom e constitui-se num polímero regular formado por repetidas condensações oxidativas de indol-5,6-quinona (THODY & SHUSTER, 1989).

A síntese de melanina ou melanogênese ocorre no interior dos melanócitos, a partir de tirosina e depende inicialmente da ação da enzima tirosinase (isoformas T1, T2 e T3; BENETT, 1993). A tirosina é sintetizada em nível de retículo endoplasmático granular e é acumulada em vesículas formadas no aparelho de Golgi, os melanossomos (POPOWSKI, 1997). Os primeiros passos biossintéticos da melanogênese são a hidroxilação da tirosina à 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) e a oxidação da DOPA a dopaquinona. Ambas as etapas são catalisadas pela tirosinase. Uma vez formada a dopaquinona, seguem-se uma série de reações complexas envolvendo ciclizações e polimerizações oxidativas que resultam na eumelanina e envolvem outras enzimas. Estas e a tirosinase parecem localizar-se na face interna da membrana do melanossomo (THODY & SHUSTER, 1989).

O acúmulo de melanina nos melanossomos torna-os maduros. Uma vez repleto de melanina, os melanossomos perdem sua atividade tirosinásica e recebem o nome de grânulo de melanina. Estes, depois de formados, migram pelos prolongamentos dos melanócitos e são transferidos para o interior de células epiteliais circundantes, os queratinócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974; THODY & SHUSTER, 1989). O conjunto de células epidérmicas associadas a um melanócito constitui-se numa unidade funcional de pigmentação (HADLEY, 1988).

A pigmentação dos pêlos é devida à presença de melanócitos entre a papila dérmica e o epitélio da raiz, os quais fornecem melanina às células da raiz e do córtex do pêlo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974).

Os melanócitos costumam ser evidenciados histoquimicamente, incubando-se fragmentos de epiderme com a DOPA, o que resulta na formação de depósitos pretos no interior dessas células. Tal processo é conhecido como reação DOPA-positiva. O número de melanócitos na pele é relativamente semelhante nas diferentes raças humanas, que diferem principalmente devido à maior ou menor produção de melanina. Esta, que costuma ser intensificada pela exposição da pele à luz solar, é reduzida quando da ausência de atividade tirosinásica no melanócito, o que resulta nos casos de albinismo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974).

A quantidade de melanina produzida pela pele está principalmente sob controle do Hormônio Estimulante de Melanócitos - alfa (α -MSH), que estimula não só a melanogênese, como também a proliferação dos melanócitos (HADLEY, 1988). No homem, que não possui *Pars Intermedia* da Hipófise (sítio de produção de α -MSH nos vertebrados), o α -MSH é produzido localmente na pele, pelas células de Langerhans, queratinócitos e pelos próprios melanócitos. Esse hormônio é um tridecapeptídeo linear, cujo sítio ativo compreende a sequência de aminoácidos 6 a 9 (-His, -Phe, -Arg, -Trp; HADLEY, 1988) e faz parte da porção inicial da molécula do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH - 39 aminoácidos), ambos derivados da mesma molécula precursora, a Pró-opiomelanocortina (POMC). Assim, nos casos de hipoadrenalismo associados a altos níveis de ACTH no plasma (por ausência de retro-alimentação negativa), é comum haver hiperpigmentação da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974).

A ação de α -MSH nos melanócitos requer a presença de íons cálcio e ocorre via receptores de membrana plasmática altamente seletivos e pertencentes à família dos receptores-ligados-a-proteína G. A ativação desses receptores desencadeia aumento dos níveis intracelulares de AMPcíclico, que ativa a tirosinase pré-existente, possivelmente através da inativação de um inibidor de tirosinase ou estimula a síntese de mais tirosinase. Atualmente, propõe-se também uma ação pós-tirosinase para esse hormônio, além do já citado efeito sobre a proliferação dos melanócitos (THODY & SHUSTER, 1989).

Tem-se ainda que fatores adicionais podem interferir na regulação da melanogênese e/ou na proliferação de melanócitos, como por exemplo: melatonina, fatores de crescimento, metabólitos de Vitamina D, retinóides, radiação ultravioleta, análogos de diacilglicerol, antagonistas de calmodulina, ácidos graxos de cadeia longa e outros (MACNEIL et al., 1992).

1.2) Distúrbios de pigmentação

Dentre as inúmeras doenças que afetam a pele estão as desordens de pigmentação. Estas, por sua vez, podem estar relacionadas a um aumento (hiperpigmentação) ou a uma redução (hipopigmentação) da quantidade de melanina na pele. Distúrbios de hiperpigmentação incluem os nevos (manchas ou placas castanhas, castanho-escuro ou azuladas, geralmente benignos) e o melanoma maligno, além de outros (LAWLEY & YANCEY, 1995).

De maneira geral, classificam-se os distúrbios de hipopigmentação em difusos ou localizados. O exemplo mais comum de hipopigmentação difusa é o albinismo oculocutâneo (AOC) que é resultante de uma depressão em maior ou menor grau na atividade da tirosinase. O resultado é uma redução na pigmentação do corpo como um todo, cujo grau é função da origem racial do indivíduo. A ausência de pigmentação acarreta distúrbios oculares, geralmente associados ao AOC, tais como, reduzida acuidade visual, fotofobia, etc. Outras causas mais raras da hipopigmentação difusa são o vitiligo generalizado (**vide** item 1.2.2) e a fenilcetonúria. No vitiligo generalizado não há melanócitos na pele afetada, ao passo que no AOC eles estão presentes, mas com atividade reduzida (LAWLEY & YANCEY, 1995).

No que se refere aos distúrbios de hipopigmentação localizados, os tipos mais comuns são: vitiligo, leucodermia química (manchas despigmentadas originadas por produtos químicos), piebaldismo (um tipo de albinismo parcial), nevo acrômico (hipomelanose circunscrita e estável presente desde o nascimento), micoses e hipomelanose pós-inflamatória (LAWLEY & YANCEY, 1995).

Dentre tais distúrbios, é de relativa importância o nevo acrômico, definido como a seguir: uma mancha hipopigmentada, embora não totalmente despigmentada, congênita, e estável em tamanho e distribuição ao longo da vida do indivíduo. Os pêlos próximos podem também ser hipopigmentados. Apesar de presente desde o nascimento, a área hipopigmentada pode não ser notada nos primeiros meses de vida, mas torna-se nítida sob o exame da lâmpada de Wood. São consideradas basicamente três formas (isolada, segmentar, sistêmica) de nevo acrômico em função da localização das lesões

na superfície corporal. Ambos os sexos são igualmente afetados e não há nenhum padrão hereditário descrito para o nevo acrômico, sugerindo a possibilidade de que tais lesões resultem de um defeito esporádico no desenvolvimento embrionário. O número de melanócitos nas manchas acrômicas pode ser normal ou reduzido. Os melanossomos são normais em tamanho, forma e conteúdo de melanina, mas parecem estar presentes em número reduzido e agregados dentro de vacúolos nos melanócitos, onde podem ser degradados (PINTO & BOLOGNA, 1991).

Nas várias hipomelanoses, as áreas de comprometimento da pele apresentam-se como manchas, com diminuição ou ausência de pigmentação não havendo, normalmente, alterações secundárias como escamas ou crostas. É frequente a ocorrência de distúrbios auto-imunológicos sistêmicos ou não associados a esses casos de hipopigmentação, especialmente o vitiligo. Fatores como o local e época de origem, o tamanho, a evolução e os tipos de doenças associadas a essas hipopigmentações é que permitem o diagnóstico diferenciado de um tipo em relação ao outro (LAWLEY & YANCEY, 1995).

1.2.1) Vitiligo

1.2.1.1) Características gerais

O termo vitiligo é possivelmente derivado da palavra latina *vitium* (mancha; FITZPATRICK et al., 1991). O vitiligo é uma anomalia pigmentar ou leucodermia adquirida, caracterizada por manchas despigmentadas ou acrômicas na pele, circundadas por uma região normal ou hiperpigmentada (DOMONKOS et al., 1982; SAMPAIO et al., 1989). As regiões despigmentadas, que variam em tamanho, de poucos milímetros até muitos centímetros, sempre com bordas bastante distintas (GRIMES, 1990), são normais na maioria dos outros aspectos (DOMONKOS et al., 1982). O tratamento histológico com hematoxilina e eosina revela uma ausência de melanócitos, sendo a dopa reação para os mesmos negativa na região despigmentada (FITZPATRICK et al., 1991). Ocasionalmente, podem ser identificados linfócitos e queratinócitos próximos às margens das manchas despigmentadas e a análise pela

microscopia eletrônica revela dois tipos de células dendríticas nas manchas: células de Langerhans e indeterminadas (FITZPATRICK et al., 1991).

O vitiligo afeta cerca de 1 a 2 % da população mundial, de qualquer raça, sexo e idade (FITZPATRICK et al., 1991; SAMPAIO et al., 1989). Contudo a incidência da doença pode variar desde 0.14 a 8.8 % em algumas populações (FITZPATRICK et al., 1991); costuma ser maior nos trópicos do que nas regiões frias, em pessoas de pele escura do que de pele clara e em mulheres do que em homens (DOMONKOS et al., 1982), exceção feita, neste último caso, ao vitiligo segmentar (**vide** abaixo; GRIMES, 1990). A incidência familiar do vitiligo, geralmente está em torno de 30% (DOMONKOS et al., 1982; GRIMES, 1990; SAMPAIO et al., 1989), evidenciando um fator genético, transmitido como característica autossômica dominante com expressividade variável (DOMONKOS et al., 1982). Uma outra hipótese sugere a interação de alelos recessivos em loci autossômicos não ligados, interagindo epistaticamente (NATH et al., 1994).

As causas imediatas do vitiligo são ainda controvertidas, mas a doença frequentemente instala-se após trauma emocional (por exemplo, perda de emprego, morte na família, etc) ou pode ocorrer como resultado de alguma injúria local na pele, o chamado fenômeno de Koebner (DOMONKOS et al., 1982; FITZPATRICK et al., 1991). Após o surgimento da doença, o quadro pode permanecer estacionário por anos, regredir ou evoluir até uma situação generalizada (SAMPAIO et al., 1989). Pacientes com vitiligo muitas vezes são ativos e tensos, alguns até agressivos e, normalmente, enfrentam problemas de adaptação social, seja em função de sua personalidade e/ou da aberração estética causada pela doença (DEMIS, 1978).

Há uma certa tendência para a distribuição bilateral e simétrica das manchas despigmentadas (**Fig. 1**; DEMIS, 1978; SAMPAIO et al., 1989) e predileção por áreas como periorbital, pescoço, axilas, punhos, dorso das mãos, faces ântero-laterais das pernas e genitália. No couro cabeludo, pode haver despigmentação dos cabelos (SAMPAIO et al., 1989) e a leucotriquia ou despigmentação dos pêlos do corpo também é comum nas manchas de vitiligo. Raramente verifica-se inflamação e prurido nas bordas das manchas despigmentadas, o que caracteriza o chamado vitiligo inflamatório (FITZPATRICK et al., 1991).

1.2.1.2) Classificação ou tipos de vitiligo

O vitiligo é subclassificado em diferentes tipos baseado na extensão e na distribuição das lesões na pele. Contudo tal classificação é ligeiramente diferente para os vários autores conforme descrito a seguir. De forma geral, assim como FITZPATRICK e col. (1991) o fizeram, o vitiligo é classificado em:

- *localizado focal*: uma ou mais manchas em área única, não segmentar;
- *localizado segmentar*: uma ou mais manchas com distribuição em dermatómos (unidades de inervação de pele);
- *generalizado acrofacial*: manchas nas extremidades e faces;
- *generalizado vulgar*: manchas distribuídas simetricamente (forma mais clássica; **Fig. 1**) ou assimetricamente;
- *generalizado universal*: todo o corpo ou quase todo comprometido (**Fig. 2**);
- *misturado*: associação dos tipos segmentar ao vulgar (**Fig. 3**) ou ao acrofacial.

Contudo, GRIMES (1990) iguala os tipos generalizado e vulgar e separa o localizado do segmentar, adotando a seguinte classificação:

- *vitiligo vulgar*: manchas simétricas com distribuição ao acaso;
- *vitiligo acrofacial*: idem à classificação anterior;
- *vitiligo localizado*: idem ao tipo localizado focal descrito acima;
- *vitiligo segmentar*: idem à classificação anterior.

Por sua vez, DOMONKOS e col. (1982) adotam uma classificação semelhante à primeira descrita quanto ao vitiligo localizado, embora separem o vitiligo generalizado do universal e incluam uma quarta classe, a do *vitiligo perinéxico* ou associado ao nevo com halo.

PRIETO (1961) sugere, ainda, uma *variedade reticular* para o vitiligo, na qual persistem pequenas ilhotas pigmentadas nas manchas acrómicas.

Quanto à evolução da doença, o vitiligo pode ainda ser classificado em *ativo* (em progressão) ou *estacionário* (tamanho e distribuição das manchas inalterados por um longo tempo; SCHWARTZMANN-SOLON et al., 1994).

1.2.1.3) Hipóteses etiológicas e distúrbios associados ao vitiligo

As causas do vitiligo são motivo de muita controvérsia. Basicamente, associadas à predisposição genética já citada, três hipóteses, não mutuamente exclusivas são propostas: neurogênica, autodestrutiva e imunológica (SOUZA FILHO, 1991).

A *hipótese neurogênica* associa o surgimento do vitiligo à elaboração, pelas células nervosas, de algum mediador químico despigmentante e/ou à alguma anormalidade na função neurotransmissora, que desencadeie a destruição dos melanócitos da pele. Tal hipótese apóia-se nos seguintes fatos (SOUZA FILHO, 1991):

- as células pigmentares e as nervosas têm a mesma origem, na crista neural embrionária, e exibem uma razoável afinidade bioquímica. Por exemplo, ambas utilizam a tirosina como substrato biossintético, seja na melanogênese (melanócitos), seja na síntese de catecolaminas (neurônios);
- os locais onde o vitiligo se apresenta podem estar confinados a regiões cutâneas providas por um segmento nervoso, como por exemplo, no vitiligo segmentar;
- o vitiligo costuma surgir após determinados traumas emocionais que afetam regiões do Sistema Nervoso Central;
- as áreas despigmentadas podem apresentar maior temperatura, sudorese e tempo de sangramento, em relação à pele normal adjacente. Isto sugere um aumento local de atividade adrenérgica ou colinérgica, talvez relacionado a disfunções do Sistema Nervoso Autônomo;
- algumas áreas de vitiligo podem estar associadas a lesões degenerativas e regenerativas de axônios e células de Schwann;
- a atividade da enzima catecol-orto-metiltransferase (COMT) costuma estar aumentada na pele com vitiligo. Tal aumento, que está associado a uma maior secreção de catecolaminas na pele, ao mesmo tempo impede a incorporação de um precursor da melanina. Isto resulta em diminuição do processo de melanogênese (LEPOOLE et al., 1994);

- no nevo acrômico, a pele exibe resposta vascular aumentada a catecolaminas e no vitiligo segmentar também há aumento no metabolismo de catecolaminas processado pelas terminações sinápticas (BOSE, 1994);
- em áreas marginais às lesões de vitiligo pode haver aumento de reatividade ao Neuropeptídeo Y (NPY) e ao Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP; ALABADIE et al., 1994).

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPA

Na hipótese autodestrutiva, sugere-se a destruição dos melanócitos por compostos intermediários ao processo de melanogênese. A DOPA a dopaquinona e outras substâncias intermediárias deste processo, todas derivadas de fenóis ou catecóis, são seletivamente tóxicas (ação melanocitolítica ou de distúrbio na eliminação dos melanossomos) aos melanócitos se acumuladas e podem competir com a tirosina na ligação com a tirosinase. Além disso, pode ocorrer: (1) a formação, por oxidação parcial dos radicais fenólicos, de uma semiquinona doadora de elétrons com ação melanocitotóxica; (2) a exaustão dos melanócitos, após proliferação inicial, através de aumento na oxidação de ácido araquidônico a leucotrienos; (3) a ausência de um gene responsável pela síntese de uma enzima que remove metabólitos inibitórios da melanogênese, o que leva à acromia. Outros subsídios para a hipótese autodestrutiva são (SOUZA FILHO, 1991):

- o estímulo excessivo para a síntese de melanina pode aumentar o risco de leucodermia. É o que ocorre, por exemplo, no vitiligo desencadeado pelo sol;
- há uma alta ocorrência de vitiligo em pessoas e regiões da pele muito pigmentadas. É possível que nestas áreas ocorra maior formação de radicais livres difusíveis e tóxicos aos melanócitos;
- na doença de Addison (hipoadrenalismo), a hiperpigmentação pode se seguir ao vitiligo;
- em relação à pele humana normal, os queratinócitos da pele portadora de vitiligo contêm menor quantidade de tioredoxina redutase, enzima que reduz radicais livres na membrana plasmática;
- o mecanismo de hipopigmentação pós-inflamatória (hipomelanose) pode ser devido à deficiência de agentes anti-oxidantes, especialmente a catalase;
- a acromia geneticamente programada encontrada na linhagem amelanótica de *Gallus domesticus* ("DAM-delayed amelanotic chicken") ocorre por destruição de melanócitos, embora envolva também alterações imunológicas.

Relacionado ainda aos efeitos tóxicos que o acúmulo de compostos fenólicos têm sobre o processo de melanogênese, estão os casos de leucodermia ocupacional ou química. Nestes, a formação de manchas acrômicas é devida à ingestão ou inalação dos citados compostos, contidos em borrachas, resinas, plásticos, óleos industriais e materiais utilizados por cortidores de couro. Também aí, parece haver uma susceptibilidade hereditária aos fenóis (SOUZA FILHO, 1991).

Curiosamente, entretanto, PICARDO e col. (1994) verificaram que a lesão melanocítica no vitiligo não está associada a um estresse oxidativo geral, visto que não há alteração significativa nos níveis plasmáticos de vitamina E, glutathione peroxidase, superóxido desmutase, dentre outros, nos pacientes com vitiligo em relação a indivíduos saudáveis.

Na *hipótese imunológica*, por sua vez, sugere-se que uma alteração na homeostase imunológica possa causar disfunção ou destruição dos melanócitos. Tal idéia apóia-se fortemente em evidências clínicas, devido às inúmeras doenças geralmente associadas ao vitiligo. Dentre as evidências para a hipótese imunológica estão as seguintes (FITZPATRICK et al., 1991; GRIMES, 1990; SOUZA FILHO, 1991):

- pacientes com melanoma podem desenvolver vitiligo; tais pacientes e portadores de vitiligo sem melanoma podem apresentar nevos com halo (manchas pigmentadas centrais com halos periféricos de pele despigmentada e às vezes eritematosa; KWAN & MIHM, 1983). Em ambos os casos, ocorre destruição dos melanócitos normais e neoplásicos (MERIMSKY et al., 1994). A própria presença do halo acrômico perinevico parece ser o início da destruição do nevo, possivelmente, associada a anticorpos formados contra estruturas necessárias à pigmentação. O melanoma maligno é uma das mais importantes doenças associadas ao vitiligo: este ocorre em 20% dos pacientes com melanoma.

- há vários distúrbios imunológicos comumente associados ao vitiligo: patologias da glândula Tireóide (hiper- e hipotireoidismo, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto - ocorrem em até 30% dos pacientes com vitiligo); doença de Addison (hipoadrenalismo); diabete mellitus (ocorre em 1 a 7,1% dos pacientes com vitiligo); doenças cutâneas (candidíase mucocutânea/micose, alopecia areata/calvície - 16% dos pacientes com vitiligo);

lupo eritematoso), anemia perniciosa (função reduzida de medula óssea), artrite reumatóide, miastenia grave, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), síndromes poliglandulares auto-imunológicas, síndrome de Vogt Koyanagi-Harada (alterações oculares e sistêmicas). Normalmente, também estão aumentados os níveis de anticorpos órgão-específicos (principalmente contra tireóide) e antimelanocíticos;

- é comum a presença ocasional de infiltrado linfocítico dérmico nas bordas das áreas acrômicas;

- o tratamento de disfunção hepática fulminante associada a doença de Wilson com substâncias imunossupressoras, pode aumentar severamente quadros prévios de vitiligo (SALLIE et al., 1994).

Favorecendo a hipótese imunológica, estudos realizados com linhagens modelos para vitiligo (camundongo Vit/Vit) evidenciam, de fato, aberrações de respostas imunológicas, além de defeitos intrínsecos aos melanócitos. Contudo, atualmente tem sido proposta, ao invés de uma causa única, uma etiologia complexa para o vitiligo, resultante da interação de fatores genéticos, neurais, imunológicos e mecanismos ainda desconhecidos (GRIMES, 1990). Isto realmente parece estar de acordo com a variabilidade de resultados dos tratamentos utilizados.

1.2.1.4) Tratamentos utilizados

Vários métodos têm sido empregados na tentativa de curar o vitiligo, como por exemplo, os tratamentos: com psoralenos associados à radiação ultravioleta tipo A (PUVA), corticosteróides, inibidores de prostaglandinas, fenilalanina, 5-fluoracil, melagenina, mini-enxertos etc. Infelizmente, nenhum deles têm se mostrado 100% efetivos em todos os pacientes (SCHWARTZMANN-SOLON et al., 1997).

Alguns resultados favoráveis são obtidos pelo uso tópico de derivados furocumarínicos, como o bergapteno encontrado na bergamota. Tal aplicação deve ser seguida de exposição ao sol ou à luz ultravioleta, em doses crescentes (SAMPAIO et al., 1989).

A partir da raiz de *Brosimum guadchaudii*, planta comum no Brasil Central, conhecida como “mamica de cadela”, é extraído o Viticromim, encontrado em pomada ou solução a 20% ou, ainda, em comprimidos. O uso tópico sempre inclui exposição à luz solar, que não deve ser muito prolongada e pode estar associada à proteção da periferia das lesões com cremes antiactínicos, a fim de evitar hiperpigmentação ou queimadura nessas regiões (SAMPAIO et al., 1989).

Também pode ser adotada a camuflagem das manchas acrômicas com cosméticos, embora isso esteja restrito em pacientes com pequeno comprometimento da pele (GRIMES, 1990).

Um tratamento que costuma ter sucesso na repigmentação de alguns tipos de vitiligo baseia-se na técnica dos micro-enxertos. Assim, pequenas áreas de pele, de cerca de 1,5 mm de diâmetro, são extraídas de regiões pigmentadas da pele do paciente, comumente a região retroauricular e enxertadas em manchas acrômicas, das quais retirou-se previamente uma área equivalente de pele. A recuperação das regiões enxertadas costuma ocorrer em poucos meses e a repigmentação é bastante eficiente, mas principalmente nos casos de vitiligo segmentar estável (GRIMES, 1990; SCHWARTZMANN-SOLON et al., 1994).

Recentemente, SCHWARTZMANN-SOLON e col. (1997) tentaram associar a técnica dos micro-enxertos à aplicação tópica de [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH, um agonista mais potente que o hormônio α -MSH em melanócitos de mamíferos e, ainda, resistente à inativação por enzimas plasmáticas e incapaz de desencadear qualquer tipo de efeito tóxico em camundongos. Contudo, embora tenha sido confirmada a absorção do análogo pela pele dos pacientes, o resultado em termos de repigmentação foi muito reduzido e não superou aquele trazido exclusivamente pelos micro-enxertos (SCHWARTZMANN-SOLON et al., 1994).

Atualmente, um dos tratamentos para vitiligo mais utilizados é o método PUVA. Inicialmente, era comum a aplicação tópica de uma solução ou a ingestão de comprimidos à base de psoralenos naturais, extraídos da espécie *Ammi majus*. Contudo, no método PUVA, os psoralenos empregados podem ser sintéticos, como o trimetilpsoraleno, e há a exposição do paciente a pelo menos duas horas de radiação ultravioleta tipo A, o que parece levar à

hipertrofia e proliferação dos melanócitos da borda das lesões. O psoraleno mais empregado no método PUVA é o 8-metoxipsoraleno (8-MOP) e os resultados, embora favoráveis em alguns casos, podem ocasionar efeitos colaterais como o aparecimento de catarata e o envelhecimento da cútis. Em crianças, o método PUVA não é recomendado, pelo menos até que a região anterior do olho esteja suficientemente madura para proteger a retina (FITZPATRICK et al., 1991; SAMPAIO et al., 1989). A aplicação tópica de esteróides costuma substituir o método PUVA em crianças (GRIMES, 1990) e é efetiva em alguns casos, embora exija cuidados quanto às consequências sobre os níveis hormonais do paciente.

Efeitos colaterais advindos dos tratamentos para vitiligo não são exclusivos do método PUVA e podem incluir náuseas, vômito, prurido, edema, hiperpigmentação difusa, câncer de pele, envelhecimento precoce, entre outros. Salienta-se então, que antes e durante qualquer terapia, os pacientes devem ter sido submetidos não só à avaliação clínica e histológica das lesões, mas também a exames de rotina que caracterizem as disfunções orgânicas associadas ao vitiligo ou às suas formas de tratamentos, especialmente, a fotoquimioterapia. Neste contexto, tais exames devem ser repetidos semestralmente nos pacientes sob tratamento (GRIMES, 1990).

Em formas de vitiligo com lesões muito extensas e disseminadas, resistentes à terapia, pode-se tentar a despigmentação total com o uso de descorantes como o monobenzil éter de hidroquinona que destrói os melanócitos irreversivelmente, mas também pode causar efeitos colaterais, principalmente, dermatites (GRIMES, 1990; SAMPAIO et al., 1989).

Finalmente, sendo o vitiligo uma doença de etiologia que inclui fatores genéticos, neurais, imunológicos e ambientais, faz sentido que praticamente todos os métodos terapêuticos adotados apresentem respostas tão variáveis por parte dos pacientes (SCHWARTZMANN-SOLON et al., 1997). Assim, isso não só mantém aberto o campo de pesquisa sobre o vitiligo, como reforça a necessidade de investigações científicas relativas a outras possíveis formas de tratamento da doença.

1.3) *Dichorisandra thyrsiflora*

1.3.1) Classificação Taxonômica

Divisão: Angiosperma

Classe: Monocotiledônea

Subclasse: Commelinidae

Ordem: Commelinales

Família: Commelinaceae

Gênero: *Dichorisandra*

Espécie: *Dichorisandra thyrsiflora* (Fig. 4; FOCKO & SCHWANTES, 1986)

Lima, R.X., 402º coletor de *D. thyrsiflora*, planta nº 27172, catalogada no Herbário UPCB, em 1995, relata na ficha de identificação que trata-se de uma planta herbácea que vive tipicamente em banhados, apresentando folhas oblongo-lanceoladas e panículas de 12 cm com flores azuis de base branca. Esta espécie recebe os nomes populares de cana-ponga e cana-do-brejo no município de Paranaguá-PR. Em Salvador-BA corresponde a cana-de-macaco e marianinha (CORREA, 1984).

1.3.2) Usos terapêuticos / justificativa do trabalho

Segundo Lima, R.X. a seiva de *D. thyrsiflora* é utilizada na medicina popular para micose da pele, causando ardor.

A todas as *Dichorisandra* são atribuídas virtudes medicinais, sendo consideradas úteis no tratamento das hidrópsias e anginas e empregadas como emoliente, diuréticas e anti reumáticas (CORREA, 1984).

A partir do conhecimento popular de pescadores e índios Guaranis da Ilha de Cottinga, Paranaguá, PR, um enfermeiro da Fundação Nacional do Índio (FUNAI - regional de Curitiba) soube da possibilidade de utilizar o sumo do caule da espécie *Dichorisandra thyrsiflora*, existente na ilha, no tratamento de

manchas acrômicas na pele humana. Um exemplo de relato de casos tratados com esse sumo está descrito a seguir.

Um indivíduo A, 50 anos, possuía manchas acrômicas em seu corpo (braços, especialmente) e utilizou o sumo do caule de *D. thyrsoiflora*, aplicado tópica- (**Fig. 5**) e regularmente sobre as manchas, por cerca de 4 a 6 meses.

Um indivíduo B (pai do indivíduo A), em época diferente, com 65 anos, também desenvolveu manchas acrômicas na pele (pernas, especialmente), as quais foram tratadas com um macerado de *D. thyrsoiflora* (em etanol, para possibilitar o transporte a outro local). Neste caso, a aplicação mais uma vez foi tópica, regular e durante período semelhante. É importante acrescentar que, atualmente, com 75 anos, este indivíduo B apresenta diabetes mellitus.

Em ambos os casos, a aplicação do sumo do caule na pele, ou do macerado com etanol causou uma repigmentação quase total das manchas acrômicas do indivíduo A (com diâmetro menor que 1 cm), ou uma diminuição da extensão das lesões, durante o período de uso, no caso de seu pai. Para o indivíduo A, após 1 ano, a repigmentação foi mantida, mesmo com a supressão total da aplicação do sumo de *D. thyrsoiflora*. Contudo esta aplicação tinha o inconveniente de desencadear uma sensação de ardor ou queimação.

A filha do indivíduo A, atualmente com 15 anos também apresenta, desde os 5 anos, uma lesão acrômica nas costas, com diâmetro de aproximadamente 10 cm. Esta lesão foi diagnosticada clinicamente como vitiligo, indicando ser este também o diagnóstico das manchas acrômicas dos indivíduos A e B. A provável hereditariedade das manchas acrômicas citadas aliada ao diagnóstico clínico de vitiligo, sugere a possibilidade de estarmos diante de um vegetal com possível potencial terapêutico para tratamento de vitiligo. Desse breve relato, tem-se a noção da importância de alguns testes científicos que precisem os efeitos e o potencial terapêutico de *D. thyrsoiflora* na pele humana.

O presente trabalho visa embasar portanto, um possível futuro uso terapêutico desse vegetal sobre desordens de pigmentação humana, como por exemplo, o vitiligo. Pretende-se, secundariamente, de um ponto de vista social, incentivar o resgate da cultura indígena nacional, uma vez que a informação desse vegetal no tratamento de manchas acrômicas na pele, é proveniente de uma comunidade indígena.

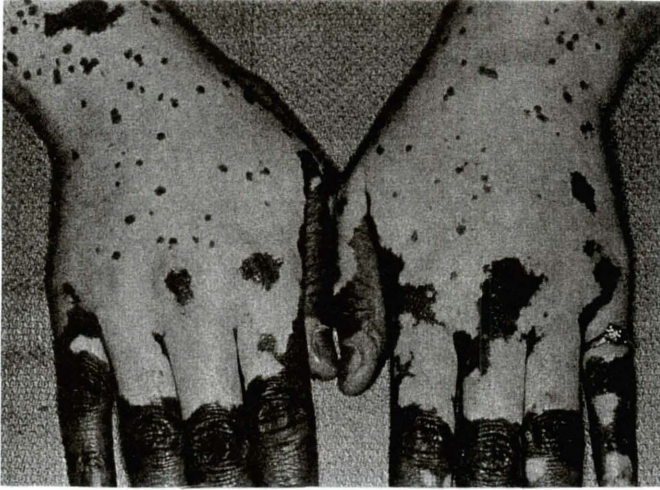
***FIGURAS**

Fig. 1 – *Vitiligo vulgar*
Com evidente
distribuição
simétrica
[DOMONKOS et al.,
1982 – p.1057].



**Fig. 2 – *Vitiligo universal* em mulher
Negra com pigmentação residual
na área da face [DEMIS,
1978 – p.11-33/8].**



**Fig. 3 – *Vitiligo misturado*: segmentar
(manchas acrômicas na porção
esquerda do abdômem) associado
ao *vulgar* (outras manchas acrômicas)
[DEMIS, 1978 – p.11-33/5].**



Fig. 4 - Exemplar de *Dichorisandra thyrsiflora* Mik (Commelinaceae). A inflorescência é de coloração azulada o que não se percebe nesta foto.



Fig. 4 - Exemplar de *Dichorisandra thyrsiflora* Mik (Commelinaceae – 1,50 m).

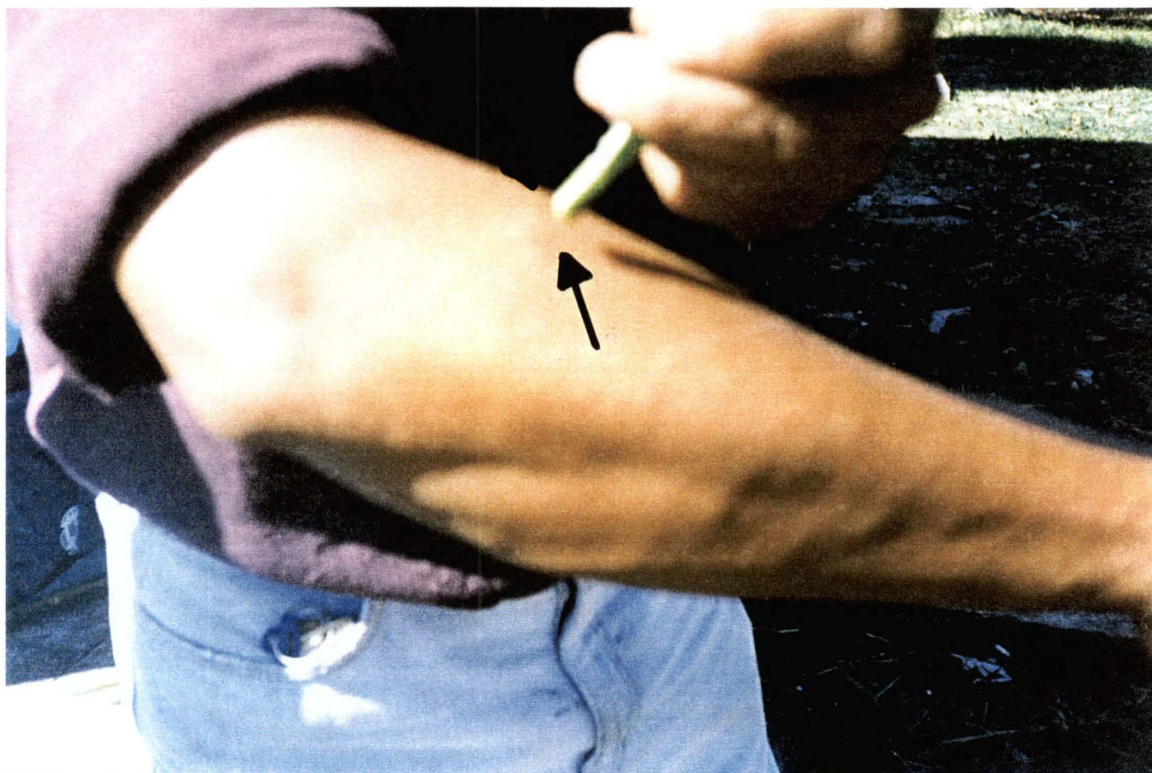


Fig. 5 - Forma de aplicação do sumo do caule de *Dichorisandra thyrsiflora* sobre as manchas acrômicas presentes na pele do indivíduo A.

2. OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral:

Determinar os efeitos de extratos hidroalcoólicos de *Dichorisandra thyrsiflora* sobre células pigmentares de anfíbios e mamíferos.

2.2) Objetivos específicos:

2.2.1) Determinar o efeito de extratos hidroalcoólicos de *Dichorisandra thyrsiflora* sobre o escurecimento / migração pigmentar (dispersão) de melanossomos em melanóforos de peles de *Bufo ictericus*.

2.2.2) Determinar o efeito de extratos hidroalcoólicos de *Dichorisandra thyrsiflora* sobre a proliferação e a melanogênese em melanoma amelanótico metastático humano C32TG, bem como testar a ocorrência de efeitos citotóxicos desses extratos sobre estas células.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Coleta do vegetal e preparação do extrato hidroalcoólico e derivados:

Exemplares de *Dichorisandra thyrsiflora* (Commelinaceae) foram previamente coletados na Ilha de Cotinga, Paranaguá, PR, acondicionados em sacos plásticos e trazidos para Curitiba no mesmo dia da coleta.

A seguir procedeu-se a identificação taxonômica e confecção de pequena amostra inicial de extrato bruto hidroalcoólico, realizada no Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

A preparação do extrato ocorreu, de forma geral, conforme descrito a seguir. Exemplares de *D. thyrsiflora* foram dessecados em estufa ventilada, resultando em 121,31g de peso seco do vegetal. A seguir, esse material foi submetido à extração bruta em etanol 70% por percolação, resultando em extrato que foi transportado (acondicionado em isopor com gelo) até São Paulo. Tal extrato foi submetido a liofilização, bomba a vácuo (0,5 mmHg) e concentrado finalmente em evaporador rotatório (40°C), resultando em 11,11g (aproximadamente 10% do peso seco inicial) de extrato seco. A partir desse extrato seco foi preparada uma solução estoque (100mg/ml de etanol), utilizada para confecção de três concentrações (10 µg/ml, 100µg/ml, 1000µg/ml) de extrato, as quais foram administradas nos seguintes modelos experimentais: bioensaios *in vitro* de peles isoladas de anfíbios (**vide** item 3.2) e melanoma amelanótico metastático humano C32TG em cultura (**vide** item 3.3). O extrato e/ou as soluções foram sempre acondicionados sob refrigeração.

3.2) Bioensaios *in vitro*: preparações de peles isoladas de *Bufo ictericus*
(CASTRUCCI et al., 1984; FERRONI & CASTRUCCI, 1987)

Exemplares machos de *B. ictericus* foram espinhalados e suas peles excisadas, sendo utilizadas as regiões: dorsal, das patas dianteiras e traseiras dos animais. Imediatamente, essas peles foram lavadas em solução fisiológica (em mM: NaCl 111,2; KCl 1,9; CaCl₂ 1,1; Na₂HPO₄ 6,5; KH₂PO₄ 1,5, pH=7,4) e cortadas em pedaços de aproximadamente 2,5 por 2,5 cm. Esses fragmentos permaneceram em solução fisiológica a 23°C (\pm 1,0) durante 60 a 120 minutos, para propiciar o equilíbrio das peles com o meio e para que os melanóforos atingissem o estado não estimulado de máxima agregação pigmentar (clareamento) (SHERBROOKE et al., 1988). As peles foram então montadas entre dois anéis de PVC, que foram colocados em béqueres de 25 ml contendo 10 ml de solução fisiológica, aos quais foram aplicadas, separadamente, as três citadas concentrações finais de extrato. Foram efetuados também controles correspondentes ao eluente (etanol 1%) presente nessas três soluções e um controle positivo com α -MSH ($2,5 \times 10^{-10}$ M - EC₅₀; FERRONI & CASTRUCCI, 1987) para confirmar a responsividade das peles.

Um reflectômetro Photovolt foi usado para medir a reflectância (indicativo de coloração) inicial de cada pele cuja face externa ficava voltada para o fotodetector desse aparelho. Já se sabe que: (1) a adição de α -MSH ao banho, por 60 minutos, resulta em escurecimento (dispersão de melanossomos) dose-dependente das mesmas, o que leva a uma diminuição dos valores de reflectância em relação aos valores basais iniciais; (2) a remoção do hormônio peptídico por lavagens sucessivas das preparações retorna as leituras aos valores iniciais de reflectância. As alterações de reflectância das peles foram calculadas em relação aos valores basais iniciais e expressas em porcentagem. O número amostral corresponde ao número de anéis de pele, provenientes de três animais diferentes. Os experimentos com pele isolada de *B. ictericus* foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Célula Pigmentar, no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os

exemplares de anfíbios foram mantidos em terrários durante os sete dias que antecederem os experimentos, submetidos a fotoperíodo CE 12:12, temperatura de 23°C ($\pm 1,0$) e alimentados com insetos.

3.3) Obtenção e manutenção das linhagens de células em cultura

As células de melanoma amelanótico metastático humano, linhagem C32TG, foram adquiridas da American Type Collection - ATCC pelo Laboratório de Fisiologia da Célula Pigmentar (Departamento de Fisiologia, IB-USP). A linhagem foi originalmente estabelecida por Chen e Shaw a partir de uma biópsia de melanoma metastático de íleo, obtida de um indivíduo branco do sexo masculino com 53 anos de idade, no ano de 1973. Essas células parecem apresentar baixo índice de melanogênese e não respondem à estímulos de α -MSH (PEREIRA, 1997).

A manutenção da linhagem C32TG ocorreu por acondicionamento a 37°C em frascos de cultura de 25cm² contendo meio RPMI (GIBCO Medium 1640) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), na ausência de antibióticos. A troca do meio foi feita a cada 1-2 dias.

3.3.1) Parâmetros analisados

Foram analisados os parâmetros proliferação celular, melanogênese (refletida pela atividade tirosinásica) e citotoxicidade em células tratadas com extrato de *D. thyriflora*, nas três concentrações citadas anteriormente. Tais concentrações e meios com o eluente dos extratos (etanol 1%), foram aplicados nos frascos de cultura. Quando da troca do meio a cada 1 - 2 dias, o extrato/álcool foram juntamente renovados nos frascos experimentais. Os ensaios foram realizados por 72 horas (tempo de exposição ao extrato e/ou eluente), e o número amostral corresponde ao número de frascos utilizados em cada condição, no total dos ensaios.

3.3.1.1) Proliferação celular

Para determinação da proliferação celular, as células foram destacadas dos frascos de cultura no término de cada experimento com solução de Tyrode / EDTA e a seguir contadas em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio. Os valores médios foram expressos como a média (10^6 células) \pm erro padrão.

3.3.1.2) Atividade tirosinásica (medida indireta)

Este método é baseado em Pomerantz (1966), com modificação (MENGEAUD & ORTONNE, 1994) e fundamenta-se na determinação de H_2O tritiada produzida pela hidroxilação enzimática de [3,5- 3H]-tirosina, catalisada pela tirosinase.

As células receberam meio com 1 $\mu Ci/ml$ de tirosina tritiada, 24 horas antes do término de cada experimento. Ao final destes, o meio de cada frasco foi recolhido e originou duas amostras (20 μl de meio), a cada uma das quais (com 3×10^5 células), foram acrescentados 980 μl de solução 20% de carvão ativo em ácido tricloroacético 10%. A mistura foi agitada, incubada por 20 minutos a 9°C e centrifugada a 7.000 rpm por 20 minutos. Alíquotas de 500 μl de cada sobrenadante foram recolhidas em frascos de vidro contendo 5 ml de líquido de cintilação. As amostras foram levadas a um contador de cintilação LKB, modelo Rackbeta e os dados obtidos foram convertidos em média de contagens de cintilação por minuto por 10^6 células (cpm / 10^6 células).

3.3.1.3) Citotoxicidade

Este teste foi realizado para a determinação de uma possível ação tóxica do extrato de *D. thyrsoiflora* sobre células de melanoma C32TG.

Após 72 horas de tratamento as células aderidas foram destacadas dos frascos de cultura e as suspensões (meio de cultura) com eventuais células receberam o corante vital "Tryplan Blue", a uma concentração de 0,05%, para diferenciar células vivas de células mortas (absorvem e mantêm o corante e geralmente desprendem-se da parede do frasco). Em seguida as

células foram contadas num procedimento semelhante ao da contagem realizada para determinar a proliferação celular. Os valores do número de células vivas e mortas foram expressos como a média (10^5 células) \pm erro padrão.

Neste experimento a concentração do extrato ministrado nas células foi a mais elevada ($1000\mu\text{g/ml}$) dentre as três concentrações citadas anteriormente, pois os resultados anteriores evidenciaram efeitos significativos apenas para esta concentração.

3.4) Análise estatística

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPE

Os dados dos ensaios de atividade biológica referentes à proliferação e atividade tirosinásica de células de melanoma amelanótico metastático humano C32TG foram tratados por análise de variância, ANOVA, seguida de teste de Student Newman Keuls (SNK) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$. O tratamento dos resultados referentes às peles isoladas de anfíbios e ao teste de citotoxicidade do extrato em melanoma C32TG foi feito utilizando-se o teste t de Student, considerando-se o mesmo nível de significância ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1) Peles isoladas de *Bufo ictericus*

O extrato de *D. thyrsoiflora* na concentração de 1000µg/ml desencadeou escurecimento significativo ($p \leq 0,05$) (dispersão de melanossomos) de peles isoladas de *B. ictericus* (**Fig. 6**). Seu efeito, entretanto, foi menor do que aquele desencadeado por α -MSH $2,5 \times 10^{-10}$ M (EC_{50} - FERRONI & CASTRUCCI, 1987), um efetivo agente escurecedor de peles de anfíbios. As concentrações menores do extrato (100µg/ml e 10µg/ml) e o eluente (álcool 10%) não desencadearam efeitos significativos nessa preparação (**Fig. 6**).

4.2) Células da linhagem de melanoma amelanótico metastático humano C32TG

4.2.1) Sobre a proliferação celular

O extrato de *D. thyrsoiflora* na concentração de 1000µg/ml reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) a proliferação de células da linhagem de melanoma amelanótico metastático humano C32TG (**Fig. 7**). Contudo nem as concentrações menores desse extrato (100µg/ml e 10µg/ml) nem a presença de álcool (1%) foram capazes de alterar significativamente a proliferação desta linhagem celular em cultura (**Fig. 7**).

4.2.2) Sobre a atividade tirosinásica

O extrato de *D. thyrsoiflora* na concentração de 1000µg/ml aumentou significativamente ($p \leq 0,05$) a atividade tirosinásica em linhagem de melanoma amelanótico metastático humano C32TG (**Fig. 8**). Contudo nem as concentrações menores desse extrato (100µg/ml e 10µg/ml) nem a presença de álcool (1%) foram capazes de alterar significativamente a atividade tirosinásica desta linhagem celular em cultura (**Fig. 8**).

4.2.3) Sobre a citotoxicidade

O extrato de *D. thyrsoiflora* apresentou atividade citostática em células de melanoma amelanótico metastático humano C32TG (**Fig. 9**), pois na concentração de 1000 μ g/ml esse extrato reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) o número de células vivas dessa linhagem nos frascos de cultura. O efeito do extrato não pode ser considerado citotóxico pois, nessa mesma concentração, não houve alteração do número de células mortas presentes nos mesmos frascos experimentais (**Fig. 9**). Assim sugere-se que a redução do número de células vivas desencadeada pelo extrato deve relacionar-se a um efeito inibitório sobre a proliferação celular, conforme verificado em resultado citado anteriormente. Ressaltamos que este é um resultado preliminar por impossibilidade de ampliarmos adequadamente a amostragem.

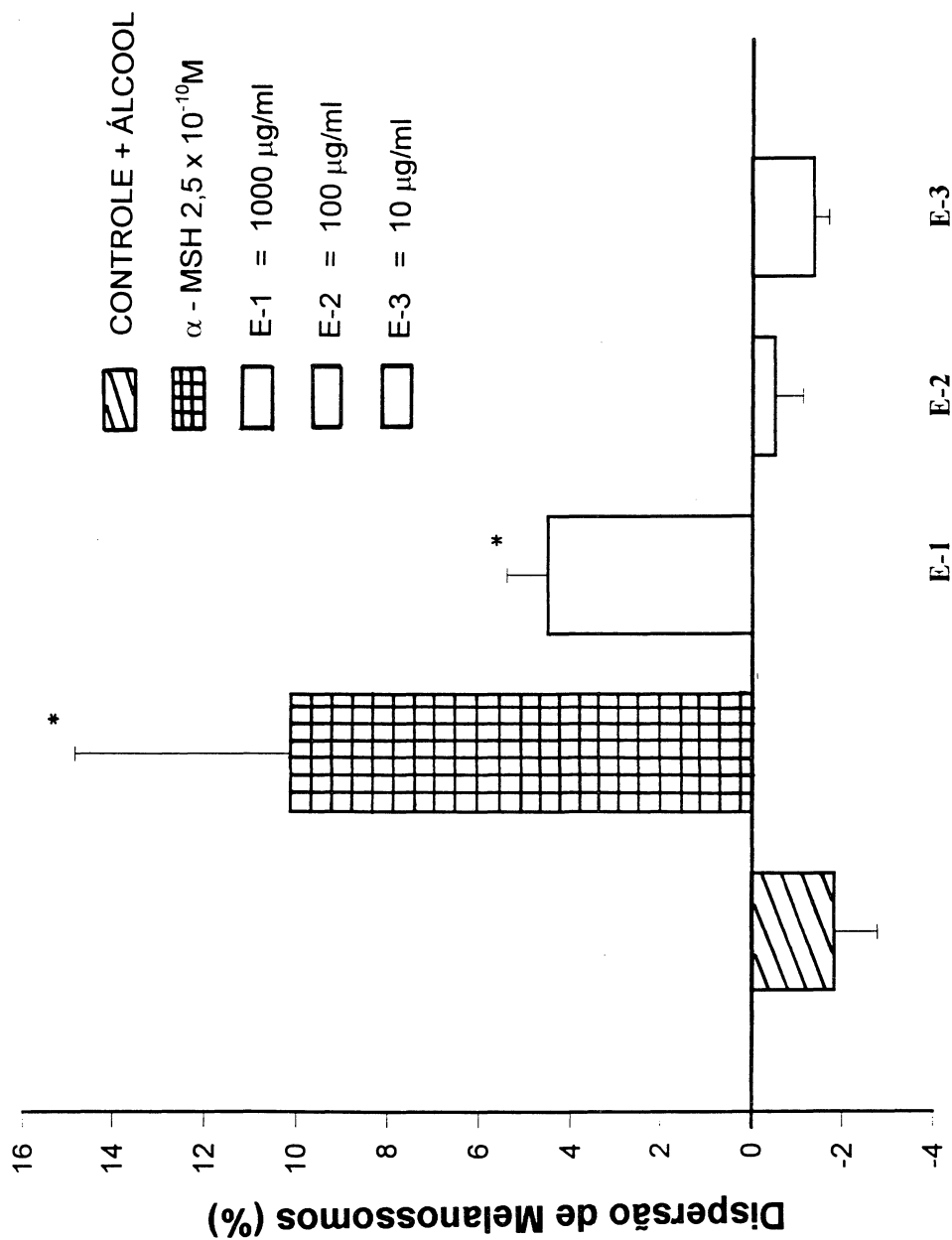


Fig. 6 - Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Dichorisandra thyrsiflora* em peles de *Bufo ictericus* (n = 6-8). A quantificação do escurecimento da pele é representada pela porcentagem de dispersão dos melanossomos nos melanóforos.

Esta e nas demais figuras a seguir: (I) o controle do eluente empregado nos testes foi feito com álcool a 1%; (II) asteriscos indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0,05$).

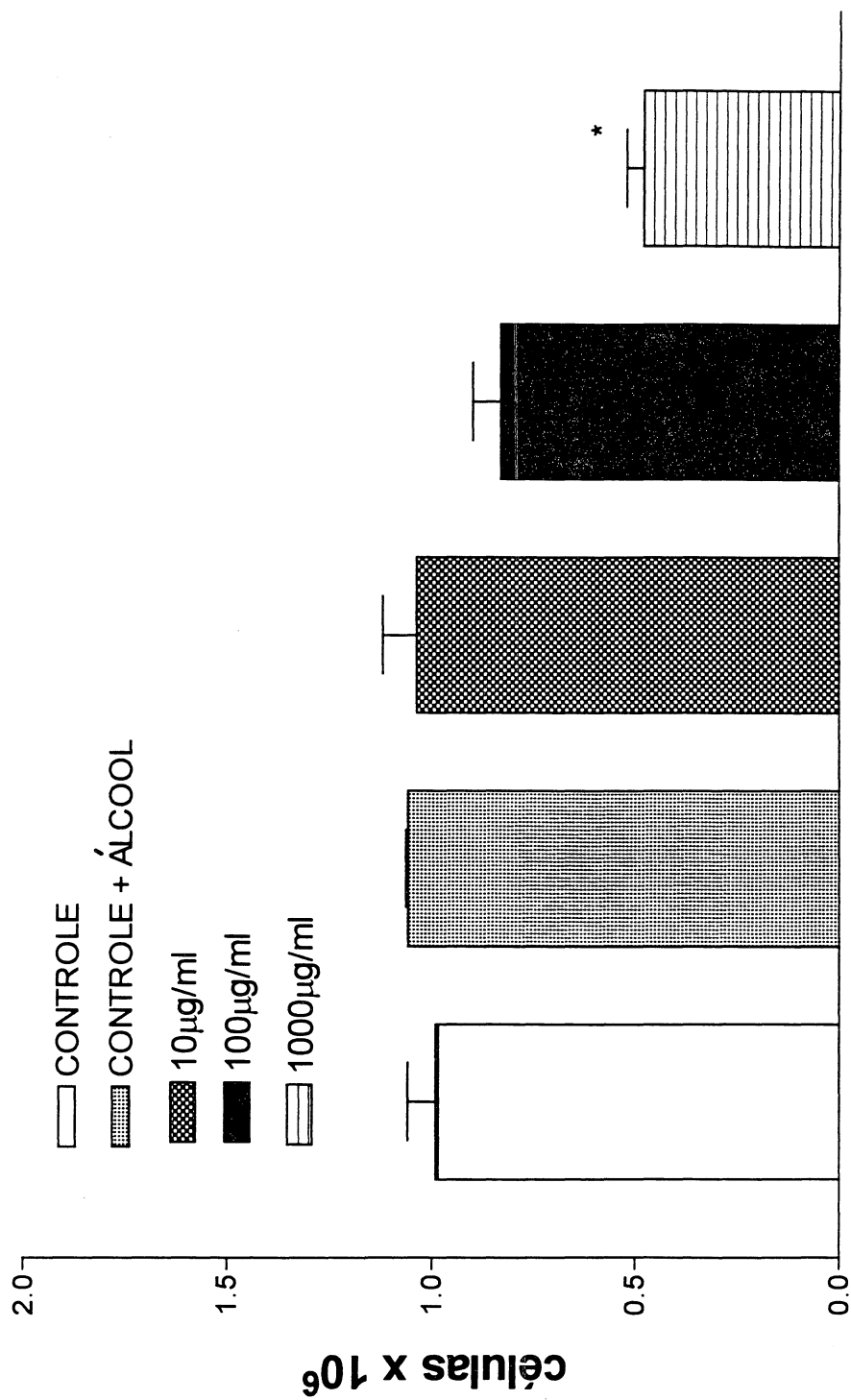


Fig. 7 - Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Dichorisandra thyrsoiflora* sobre a proliferação de células de melanoma amelanótico metastático humano C32TG em cultura ($n = 3$).

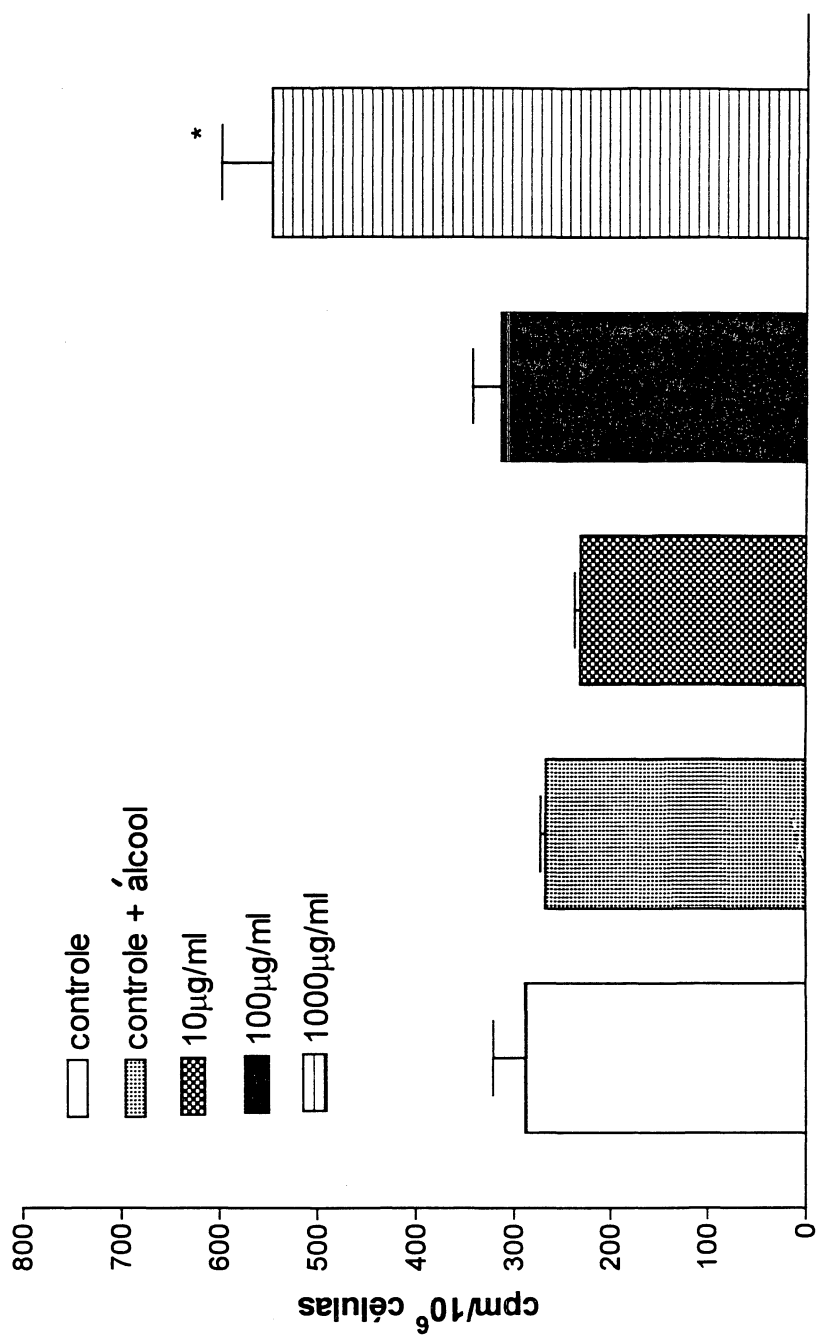


Fig. 8 - Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Dichorisandra thyrsiflora* sobre a atividade tirosinásica (medida indireta) em células de melanoma amelanótico metastático humano C32TG em cultura (n = 3).

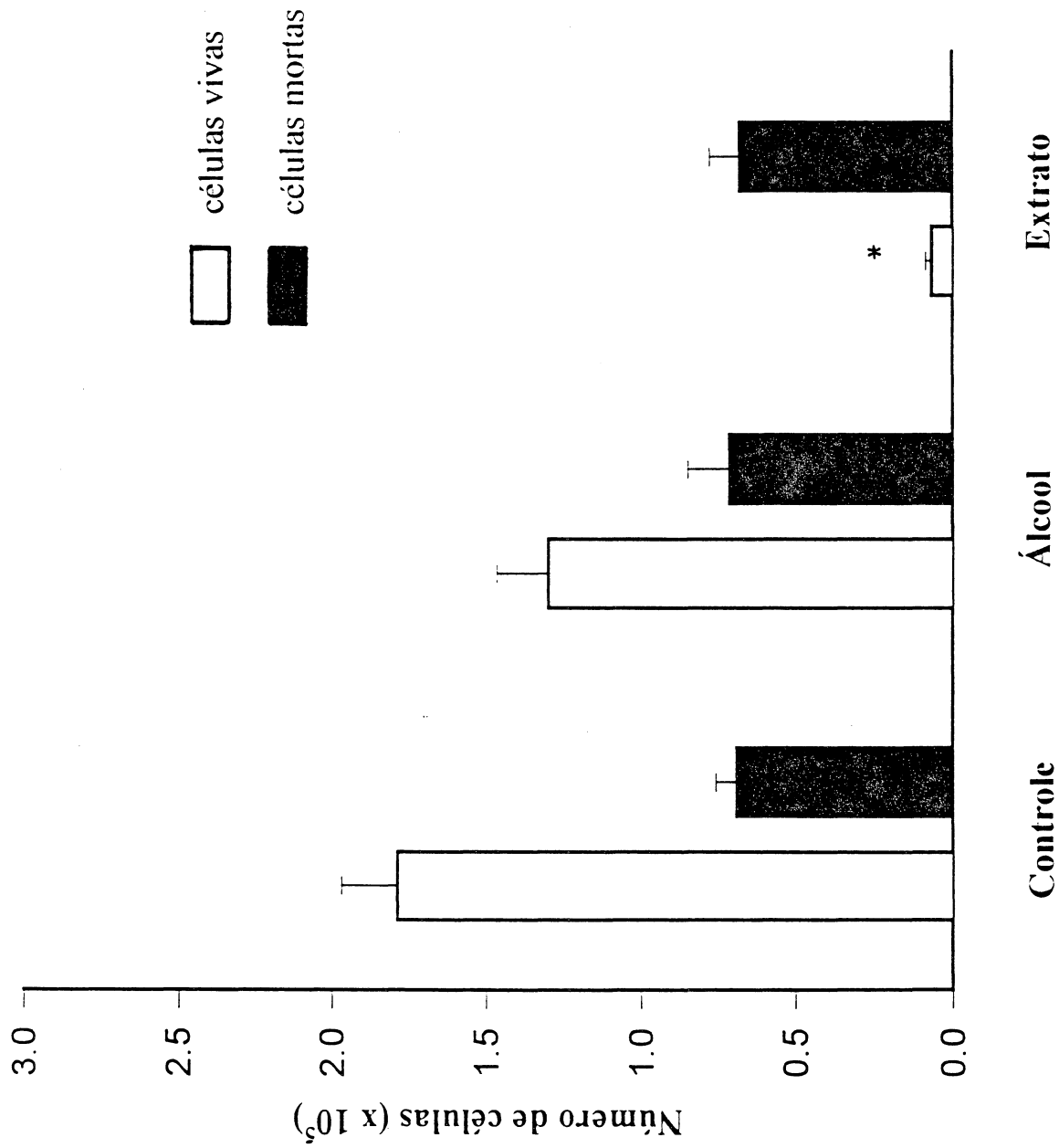


Fig. 9 - Efeito citostático do extrato (1000 μ g/ml) de *Dichorisandra thyrsoiflora* sobre a linhagem (número de células vivas e mortas) de melanoma amelanótico metastático humano C32TG em cultura (n = 3).

5. DISCUSSÃO

O extrato de *D. thyrsoiflora* em alta concentração desencadeou escurecimento significativo em peles isoladas de *B. ictericus* (**Fig. 6**), assim como aumento da atividade tirosinásica em células de melanoma amelanótico metastático humano C32TG em cultura (**Fig. 8**). Tais efeitos nos dois modelos experimentais correspondem aos mesmos efeitos do hormônio α -MSH e podem relacionar-se à ativação de uma única via de transdução de sinal biológico desse hormônio. Esta envolve aumento nos níveis intracelulares de AMPcíclico, levando à dispersão pigmentar (melanossomos em melanóforos) ou escurecimento em peles de anfíbios e à ativação da melanogênese (via aumento de atividade tirosinásica) em melanócitos de melanoma de mamíferos (HADLEY, 1988; THODY & SHUSTER, 1989).

Portanto verifica-se que tanto num modelo (peles isoladas de *B. ictericus*) de sensibilidade relativamente menor aos efeitos biológicos, mas também aos possíveis efeitos deletérios do extrato bruto, quanto num outro modelo com maior sensibilidade para ambos os tipos de ações do extrato, este agiu de maneira provavelmente semelhante: escurecimento / aumento da atividade tirosinásica (melanogênese). É importante considerar ainda que mesmo no modelo de células em cultura, onde a probabilidade de um efeito citotóxico do extrato deve ser maior, nossos resultados, mesmo que preliminares, sugerem ausência deste tipo de efeito, confirmando, apenas, o efeito inibitório sobre a proliferação celular (descrito abaixo). Isto porque o extrato é capaz de reduzir o número de células vivas presentes no meio de cultura, mas não de aumentar o número de células mortas aí presentes (**Fig.9**).

O extrato de *D. thyrsoiflora* (1000 μ g/ml) inibiu a proliferação de células em melanoma C32TG em cultura (**Fig. 7**). Discute-se a seguir este resultado e aquele sobre a atividade tirosinásica nessas células (**Fig. 8**), sob a perspectiva de um futuro emprego terapêutico do extrato de *D. thyrsoiflora* sobre distúrbios humanos de hipopigmentação.

Se o extrato de *D. thyrsiflora* realmente tem a capacidade de repigmentar manchas acrômicas na pele humana (conforme descrito no exemplo do item 1.3.2 da Introdução), poder-se-ia supor que ele causaria tanto um aumento de atividade tirosinásica como um aumento de proliferação de células do melanoma C32TG em cultura. Contudo, verificamos uma inibição desta proliferação, conforme já descrito. Poder-se-ia pensar, então, que isso se deva a um efeito do citado extrato sobre estágios mais diferenciados dos melanócitos, gerando nestes um aumento de atividade tirosinásica e do conteúdo de melanina, mas não da proliferação, pois este seria mais provável em melanócitos ainda em menor grau de diferenciação. A associação do aumento de atividade tirosinásica ao conteúdo de melanina foi sugerida pelo fato da tirosinase catalisar os primeiros passos da melanogênese nos melanócitos (BENNETT, 1993).

Por outro lado: se, de fato, o sumo do caule de *D. thyrsiflora* é capaz de repigmentar manchas acrômicas, segundo os resultados obtidos isto somente poderia estar relacionado ao efeito do extrato de aumentar a atividade tirosinásica em células de melanoma C32TG em cultura. Porém, devido à ausência de melanócitos nas manchas acrômicas dos portadores de vitiligo (reação dopa-negativa, FITZPATRICK et al., 1991) seria interessante investigar futuramente um possível efeito estimulatório do extrato sobre a migração de melanócitos dos folículos pilosos para as áreas acrômicas, ressaltando que este tipo de efeito, por sua vez, seria mais típico sobre melanócitos indiferenciados, diferentemente do que foi discutido no parágrafo anterior. Embora escassos, já existem experimentos envolvendo a migração melanocitária em cultura organotípica (LEPOOLE et al., 1994).

Reforçando a importância da continuidade desses estudos tem-se que outras substâncias de origem vegetal, como por exemplo alguns psoralenos, costumam ser utilizadas no tratamento de distúrbios de hipopigmentação, principalmente o vitiligo, embora associadas geralmente à exposição da pele à radiação ultravioleta (método da PUVA terapia; FITZPATRICK et al., 1991; SAMPAIO et al., 1989). Curiosamente, o 8-metoxipsoraleno (8-MOP) apresenta efeitos muito semelhantes ao que obtivemos com o extrato de *D. thyrsiflora* na mesma linhagem de células que utilizamos (melanoma C32TG):

causa redução da proliferação celular e aumento da atividade tirosinásica (Ana Maria de Lauro Castrucci, comunicação pessoal). Isto sugeriria que os efeitos que obtivemos com o extrato poderiam ser devidos à presença de psoralenos nesta espécie vegetal. A literatura científica consultada não apresentou registros de psoralenos nesta espécie.

Sugerimos que um ou mais compostos químicos presentes na espécie vegetal *D. thyrsiflora* podem vir a apresentar um potencial terapêutico relevante sobre distúrbios de hipopigmentação, como talvez o próprio vitiligo, desde que aplicados em concentrações razoáveis, pois os efeitos que obtivemos ficaram restritos à maior concentração de extrato testada. Dentre esses efeitos, seria bastante relevante nesse contexto o aumento da atividade tirosinásica verificado, o qual estaria mais diretamente relacionado a uma possível repigmentação cutânea. Também seria interessante considerar a ausência de um efeito citotóxico do citado extrato sobre as células pigmentares em cultura.

Acrescentamos, contudo, que efetivas conclusões só poderão ser obtidas a partir de fracionamentos do extrato bruto de *D. thyrsiflora* e purificação das substâncias químicas presentes no mesmo, as quais seriam testadas da mesma forma que o extrato hidroalcoólico original, com testes mais amplos sobre possíveis efeitos citotóxicos ou ainda em algum modelo experimental em que pudesse ser investigada uma influência das mesmas sobre a migração de melanócitos de áreas cutâneas saudáveis para aquelas que exibem manchas hipopigmentadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABADIE, M.S.K.; SENIOR, H.J.; BLEEHEN, S.S. et al. Neuropeptide and neuronal marker studies in vitiligo. **British Journal of Dermatology**, 131. p.160-165, 1994.
- BENNETT, D.C. Genetics, development and malignancy of melanocytes. **International Review of Cytology**, 146. p.191-260, 1993.
- BOSE, S.K. Segmental vitiligo, nevus anemicus and catecholamines - what's the relation. **Biogenic Amines**, 10. p.239-246, 1994.
- CASTRUCCI, A.M.L.; HADLEY, M.E.; HRUBY, V.J. Melanotropin bioassays: *in vitro* and *in vivo* comparisons. **General Comparative Endocrinology**, 55. p.104-111, 1984.
- CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, vol 6. p.270-271, 1984.
- DEMIS, J.; DOBSON, R.L.; McGUIRE, J. **Clinical Dermatology 2**. Hagerstown: Harper & Row Publishers, 1978.
- DOMONKOS, A.N.; ARNOLD Jr., H.F.; ODOM, R.B. et al. **Diseases of the skin - Clinical Dermatology**. 7. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1982.
- FERRONI, E.N.; CASTRUCCI, A.M.L. A sensitive *in vitro* toad skin bioassay for melanotropic peptides. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, 20. p.213-220, 1987.
- FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K. et al. **Dermatology in General Medicine**, vol. I. 3. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1991.

- FOCKO, W.; SCHWANTES, H.O. **Taxonomia vegetal**. São Paulo: E.P.U., 1986.
- GRIMES, P. E. Diseases of hypopigmentation. In: SAMS, J.W.M.; LYNCH, P.J. **Principles and Practice Dermatology**. New York: Churchill Livingstone Inc., 1990. p.821-833.
- HADLEY, M.E. **Endocrinology**. 2. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1988.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, I. **Histologia Básica**. São Paulo: EDUSP, 1974.
- KWAN, T.H.; MIHM JR, M.C. A pele. In: ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, 1983. p. 1177-1213.
- LAWLEY, T.J.; YANCEY, K.B. Alterações na pele - hipopigmentação. In: HARRISON, T.R. **Medicina Interna**, vol. I. 13. ed. Colonia Atlampa: Nueva Editorial Interamericana, 1995, p.285-329.
- LEPOOLE, I.C.; VANDENWIJNGAARD, R.M.J.G.J.; SMIT, N. P.M. et al. Catechol-O-methyltransferase in vitiligo. **Archives of Dermatological Research**, 286. p. 81-86, 1994.
- LEPOOLE, I.C.; VANDENWIJNGAARD, R.M.J.G.J.; WESTERHOF W. D. J. et al. Organotypic culture of human skin to study melanocyte migration. **Pigment Cell Research**, 7. p.33-43, 1994.
- MACNEIL, S.; BUFFEY, J.; HILL, S.E. et al. Intracellular signalling in the control of melanogenesis. **Pigment Cell Research**, 2. p.154-161, 1992.

- MENGEAUD, V.; ORTONNE, J.P. Regulation of melanogenesis induced by 5-methoxypsoralen without U.V. light in murine melanoma cells. **Pigment Cell Research**, 7. p.245-254, 1994.
- MERIMSKY, O.; SHOENFELD, Y.; YECHESKEL, G. et al. Vitiligo- and melanoma-associated hypopigmentation - a similar appearance but a different mechanism. **Cancer Immunology**, 38. p.411-416, 1994.
- NATH, S.K.; MAJUMDER, P.P.; NORDLUND, J.J. Genetic epidemiology of vitiligo - multilocus recessivity cross-validated. **American Journal of Human Genetics**, 55. p.981-990, 1994.
- PEREIRA, E. **A transformação maligna está associada à perda da resposta de melanócitos humanos ao α -MSH?** São Paulo, 1997. Dissertação de Mestrado, área de Fisiologia - Instituto de Biociências, USP.
- PICARDO, M.; PASSI, S.; MORRONE, A. et al. Antioxidant status in the blood of patients with active vitiligo. **Pigment Cell Research**, 7. p.110-115, 1994.
- PINTO, F.J.; BOLOGNA, J.L. **The Pediatric Clinics of North America** - Pediatric Dermatology, Vol. 38, Philadelphia: Saunders, 1991.
- POMERANTZ, S.H. The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. **Journal of Biology and Chemistry**, 241. p.161-168, 1966.
- POPOWSKI, P. **A Pele da Criança em Homeopatia**. São Paulo: Organização Andrei Editora LTDA, 1997.
- PRIETO, J.G. **Dermatología**. Barcelona: Editorial Científico Médica, 1961.
- SALLIE, R.; CHIYENDE, J.; TAN, K.C. et al. Fulminant hepatic failure resulting from coexistent Wilsons disease and hepatitis E. **Gut**, 35. p.849-853, 1994.

- SAMPAIO, S.A.P.; CASTRO, R.M.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia Básica**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989.
- SCHWARTZMANN-SOLON, A. M.; SOUZA-FILHO, L.B.C.; ARROYO, C. E. Tratamento do vitiligo através de minienxertos. **Medicina Cutanea Ibero-Latino Americana**, 22. p.127-131, 1994.
- SCHWARTZMANN-SOLON, A.M.; VISCONTI, M.A.; CASTRUCCI, A. M. L. Vulgar vitiligo, dermo-epidermal minigrafting and topical melanotropin application. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1997. No prelo.
- SHERBROOKE, W.C.; HADLEY, M.E.; CASTRUCCI, A.M.L. Melanotropic peptides and receptors: an evolutionary perspective in vertebrate physiological color change. In: HADLEY, M.E. **The Melanotropic Peptides**, vol. II. Boca Raton: CRC Press, 1988, p. 175-189.
- SOUZA FILHO, L.G. C. **Vitiligo**. Aspectos imunológicos e correlações com alterações oculares. São Paulo, 1991. Tese de Doutorado, área de Dermatologia - Faculdade de Medicina, USP.
- THODY, A.J.; SHUSTER, S. Melanophores, melanocytes and melanin; endocrinology and pharmacology. In: GREAVES, M.W.; SHUSTER, S. **Pharmacology of the Skin**, vol. I. Berlim: Springer-Verlag, 1989, p. 257-269.