

ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM QUERATINÓCITOS DE
UMA PLANTA MILENAR: *Malva sylvestris* L.

CURITIBA

2013

ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM QUERATINÓCITOS DE
UMA PLANTA MILENAR: *Malva sylvestris* L.

Tese desenvolvida no Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná durante o Curso de Pós-graduação em Farmacologia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof^a Dra Daniela de Almeida Cabrini

Co-orientadora: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

CURITIBA

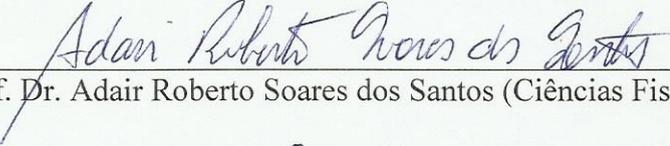
2013

PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada "UMA INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE QUERATINÓCITOS DE UMA PLANTA MILENAR: *Malva sylvestris* L.", de autoria do pós-graduando **ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE**, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini e banca composta pelos professores: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (Ciências Fisiológicas – UFSC), Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (Farmacologia – UFSM), Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia – UFPR), e Prof. Dr. Silvio Marques Zanata (Patologia Básica – UFPR), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi Aprovado. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 19 de novembro de 2013.



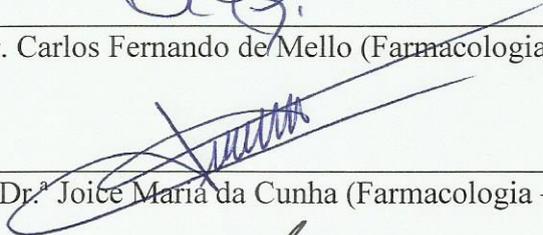
Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Presidente - Farmacologia - UFPR)



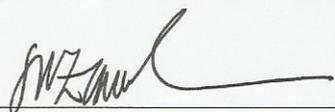
Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (Ciências Fisiológicas – UFSC)



Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (Farmacologia – UFSM)



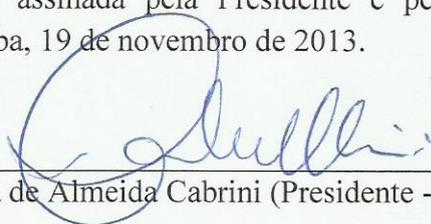
Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia – UFPR)



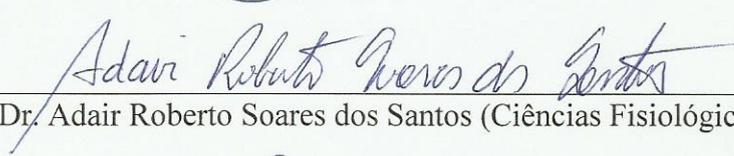
Prof. Dr. Silvio Marques Zanata (Patologia Básica – UFPR)

1 **ATA DO JULGAMENTO DA 22ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

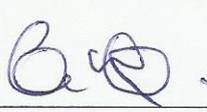
2 Ao décimo nono dia do mês de novembro do ano de dois mil e treze, às quatorze horas,
3 no Auditório do Departamento de Farmacologia, Anexo I, do Setor de Ciências Biológicas
4 da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de
5 Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de autoria do pós-graduando
6 **ARTHUR DA SILVEIRA PRUDENTE**, intitulada "UMA INVESTIGAÇÃO DA ^{DE USO}
7 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE QUERATINÓCITOS DE UMA PLANTA
8 MILENAR: *Malva sylvestris* L.", sob orientação da Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini
9 e banca composta pelos professores: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (Ciências
10 Fisiológicas – UFSC), Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (Farmacologia – UFSM), Prof.^a
11 Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia – UFPR), e Prof. Dr. Silvio Marques Zanata
12 (Patologia Básica – UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos e o candidato teve
13 quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguido
14 durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para
15 responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte
16 parecer: Aprovado. De acordo com o Regimento Interno do Programa
17 de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi aprovado. Para a publicação o
18 trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por sua orientadora.
19 Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a
20 presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais membros da banca
21 examinadora, em Curitiba, 19 de novembro de 2013.



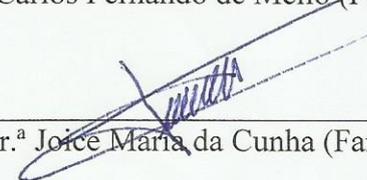
Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (Ciências Fisiológicas – UFSC)



Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (Farmacologia – UFSM)



Prof.^a Dr.^a Joice Maria da Cunha (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Silvio Marques Zanata (Patologia Básica – UFPR)

*Percebi que o objetivo de escrever é inflar
idéias fracas, disfarçar a argumentação
pobre e inibir a clareza. Com um pouco
de pratica o texto pode se tornar uma
neblina intimidante e impenetrável!
Academia, aí vou eu!*

Calvin

RESUMO

Na busca por melhora na qualidade de vida dos seres humanos, o tratamento de doenças de pele, como a psoríase (doença hiperproliferativa cutânea), se faz válido, por causar enorme desconforto social ao paciente. Neste contexto estudos anteriores demonstram que a *Malva sylvestris* L., possui atividade anti-inflamatória em modelos animais de inflamação tópica, tornando uma planta promissora para o aprofundamento de seus efeitos. O presente estudo buscou verificar a ação do extrato etanólico de *M. sylvestris* (EEMS) sobre a resposta inflamatória crônica e hiperproliferativa na pele de camundongos causada pela múltipla aplicação de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). A aplicação tópica de EEMS foi capaz de reduzir o edema, a migração leucocitária (mono e polimorfonucleares) e a proliferação de queratinócitos avaliados por imunohistoquímica para PCNA e histologia. Foi verificado que os efeitos anti-inflamatórios do EEMS é independente do sistema glicocorticoide e a aplicação continuada do EEMS não foi capaz de causar alterações nos órgãos analisados (baço, timo, linfonodo auricular e glândulas adrenais). A incubação do EEMS em queratinócitos HaCaT causou uma redução na proliferação celular por indução de apoptose. Além disso, foi determinado que alguns compostos presentes no EEMS (escopoletina, quercetina, malvidina 3-glucosídio e malvidina 3,5-glucosídio) tem propriedade anti-inflamatória tópica, sendo a malvidina 3-glicosilada o composto mais potente e com efeito semelhante ao extrato. Assim, o EEMS se mostrou eficaz para utilização como um anti-psoriático, com a capacidade de impedir a proliferação dos queratinócitos *in vitro* e *in vivo*, com uma baixa toxicidade na sua utilização tópica.

ABSTRACT

In the search for an improved quality of life, the treatment of skin diseases like psoriasis (hyperproliferative disease) is valid, since it causes huge social discomfort to the patient. In this context earlier studies demonstrate that *Malva sylvestris* L. has antiinflammatory activity demonstrated by animal models of skin inflammation, become a promising target for further studies. The present investigation aimed to verify the effect of on ethanol extract of *M. sylvestris* (EEMS) on the chronic inflammatory and hyperproliferative response caused by multiple application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on mice ear. Topical application of EEMS reduced edema, leukocyte migration (mono and polymorphonuclear cells) and proliferation of keratinocytes, confirmed by histology and immune histochemistry for PCNA. It was found that the antiinflammatory effects of the EEMS do not involve the glucocorticoid system. The incubation of EEMS with HaCaT keratinocytes caused low toxicity and reduced cell proliferation by inducing apoptosis. In addition, it was determined that some compounds present in EEMS (scopoletin, quercetinmalvidin3-glucoside and malvidin 3,5-glucoside) have topical anti-inflammatory property, being malvidin-3-glucoside the most potent compound with similar effect to the extract. Thus, EEMS proved to be effective for use as an anti-psoriatic, with the ability to prevent hyperproliferation of keratinocytes *in vitro* and *in vivo*, suggesting a low toxicity with its topical usage.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Malva sylvestris.....	27
3.2. Preparação do Extrato Etanólico.....	27
3.3. Cromatografia Líquida Acoplada a um Espectro de Massa (LC-MS)	28
3.4. Animais.....	29
3.5. Avaliação do Edema de Orelha.....	29
3.5. Edema de Orelha Induzido por TPA.....	30
3.6. Edema de Orelha Induzido pela Múltipla Aplicação de TPA.....	31

3.7. Avaliação da Atividade Enzimática da MPO	32
3.8. Avaliação da Atividade Enzimática da NAG	33
3.9. Avaliação da Atrofia Cutânea	34
3.10. Análise Histológica	35
3.11. Avaliação dos Níveis da Proteína PCNA por Imunohistoquímica	35
3.12. Ensaio de Reversão por Antagonista Corticóide (RU486 – Mifepristona).....	37
3.13. Ensaio de Ligação Específica ao Receptor de Glicocorticóide	38
3.14. Cultivo Celular	39
3.15. Ensaio de Viabilidade Celular	39
3.15.1. Ensaio de MTT	39
3.15.2. Ensaio do Vermelho Neutro	40
3.16. Ensaio de Proliferação Celular.....	41
3.17. Ensaio de Ciclo Celular e Apoptose	42
3.18. Análises Estatística	42
3.19. Drogas e Reagentes	42
4. RESULTADOS.....	44

4.1. Efeito do EEMS Sobre o Modelo da Múltipla aplicação de TPA	44
4.1.1. Avaliação do Edema de Orelha.....	44
4.1.2. Efeito do EEMS Sobre a Atividade da MPO e NAG.....	47
4.1.3. Análise histológica e imunohistoquímica.....	49
4.2. Avaliação do EEMS Sobre a Atividade Celular.....	53
4.2.1. Viabilidade Celular	53
4.2.2. Avaliação da Atividade Antiproliferativa do EEMS.....	55
4.2.3. Avaliação do Ciclo Celular e da Apoptose	56
4.3. Avaliação da Atrofia Cutânea.....	59
4.4. Avaliação da Interação do EEMS Sobre Receptores de Corticóides	62
4.5. Análise do EEMS por Cromatografia Líquida Acoplada a um Espectro de Massa (LC-MS)	65
4.6. Efeito dos Compostos Isolados do EEMS na Inflamação Aguda	67
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS.....	84

LISTA DE ABREVIATURA

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
BSA	Albumina de soro Bovino
CD106	Cluster de diferenciação 106
CD11c+	Cluster de diferenciação 11c+
CD54	Cluster de diferenciação 54
CD62E	Cluster de diferenciação 62E
CDK2	Quinase dependente de ciclina2
COX-2	Ciclo-oxigenase2
DE ₅₀	Dose efetiva 50%
DMEM	Meio Dubelcco Modificado por Eagle
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EEMS	Extrato Etanólico das folhas de <i>Malva sylvestris</i>
EPM	Erro Padrão da Media
ESI	Ionização por Eletrospray

GR	Receptor de Glicocorticóide
GRE	Elementos Glicocorticóides Responsivos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho Acoplado a Massa
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular – 1
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1 α	Interleucina1 α
IL-1 β	Interleucina1 β
IL-2	Interleucina2
IL-20	Interleucina 20
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
JNK	Proteína quinaseJun
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitose
MHC-II	Complexo de Histocompatibilidade de Classe II
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrofago1 β
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3 -(4, 5 –dimetil-tiazol-2-il) -2, 5-difenil tetrazólio
NAG	n-acetil- β -D-glucosaminidase
NF-KB	Fator de transcrição nuclear KB
ODM	Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
ONU	Organização das Nação Unidas
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCNA	Antígeno Nuclear De Proliferação Celular
PEG400	Polietilenoglicol 400
PKC	Proteína Quinase C
SFB	Soro Fetal Bovino

STAT-1	Fator de transcrição envolvido no processo inflamatório 1
STAT-3	Fator de transcrição envolvido no processo inflamatório 3
STAT5	Fator de transcrição envolvido no processo inflamatório 5
Tc	Linfócito T citotóxico
TGF- β 1	Fator Transformante De Membrana Do Tipo Beta 1
Th	Linfócito T auxiliar
Th1	Linfócito T do tipo 1
Th17	Linfócito T do tipo 17
Th2	Linfócito T do tipo 2
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
UVA	Radiação Ultravioleta A
UVB	Radiação Ultravioleta B
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular – 1
VN	Vermelho neutro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Oito jeitos de mudar o mundo	03
Figura 2: Esquema representativo das camadas da pele	07
Figura 3: Subcamadas da epiderme e etapas da diferenciação	09
Figura 4: Fatores que desencadeariam a psoríase	16
Figura 5: <i>M. sylvestris</i> L. ilustrada por Johann Georg Sturm	25
Figura 6: Efeito do EEMS no modelo de múltipla aplicação de TPA	45
Figura 7: Peso das orelhas no modelo de múltipla aplicação de TPA	46
Figura 8: Efeito do EEMS sobre a atividade da MPO e NAG	48
Figura 9: Medidas da espessura das epidermes	50
Figura 10: Cortes histológicos	51
Figura 11: Quantificação da imunomarcção para PCNA	52
Figura 12: Avaliação da viabilidade celular através do vermelho neutro	54
Figura 13: Avaliação da viabilidade celular através do MTT	54
Figura 14: Avaliação do efeito do EEMS sobre a proliferação celular	55

Figura 15: Dot-plots representativos do tratamento com EEMS	57
Figura 16: Avaliação do efeito do EEMS sobre a apoptose celular	58
Figura 17: Efeito do tratamento com EEMS na espessura da orelha	60
Figura 18: Efeito do tratamento com EEMS sobre o peso de órgãos linfóides	61
Figura 19: Efeito do EEMS na presença ou ausência do RU-486	63
Figura 20: Efeito do EEMS sobre a ligação específica ^3H -dexametasona	64
Figura 21: Análise LC-ESI-MS do EEMS	66
Figura 22: Efeito dos compostos derivados do EEMS	68
Figura 23: Efeito dos compostos derivados do EEMS sobre a atividade da MPO	69

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, uma grande preocupação com o bem estar e com a saúde é presente de forma marcante em nossa sociedade e entidades, como a Organização das Nações Unidas (ONU), elegem como prioridades: acesso a educação, comunicação, saúde e tecnologia para que pessoas ao redor do mundo tenham uma melhora na sua qualidade de vida. Essas conclusões foram atingidas na Conferência Internacional sobre População e Desenvolvimento realizado em 1994 na cidade do Cairo (ONU, 1997).

Com essas conclusões, novas prioridades foram se acumulando e hoje temos os Objetivos do Desenvolvimento do Milênio (ODM) ou também conhecidos como os “8 jeitos de mudar o mundo” (Figura 1), que são um conjunto de metas, pactuadas pelos governos dos 191 países-membros da ONU com a finalidade de tornar o mundo um lugar mais justo, solidário e melhor para se viver. O compromisso foi firmado durante a Cúpula do Milênio, em setembro de 2000, após uma análise dos maiores problemas global, e prevê um conjunto de oito macros objetivos (voltados basicamente para as áreas de saúde, renda, educação e sustentabilidade) a serem alcançados pelas nações até 2015 (MDG, 2008).

Apesar de doenças de pele geralmente não causar risco à vida, é bem conhecido que essas patologias afetam a qualidade de vida dos pacientes em uma grande escala e, na maioria das vezes, são de caráter crônico. Diversos são os fatores que contribuem para a diminuição da qualidade de vida como: os problemas de lidar

com uma doença crônica que não só causa desconforto físico, mas também tem que ser compartilhada com o público, a influência na autoimagem, o tempo gasto em tratamentos locais e o efeito sobre o ambiente criado por esses medicamentos com manchas em roupas e muitos pacientes até precisam de ajuda com o seu tratamento, na maioria das vezes tópico, devido à localização de lesões (Maroti et al., 2006).

Dentre esta grande gama de doenças dermatológicas, inclui doenças hiperproliferativas, como a psoríase. Assim, a psoríase está associada a problemas psicossociais significativos com redução na qualidade de vida relacionada com a saúde, o que é importante para a visualização da psoríase como uma doença grave e capaz de gerar grandes impactos sobre o bem-estar do paciente (Basavaraj et al., 2011; Otuki et al., 2011). A incapacidade experimentada por estes indivíduos é comparável ao de pacientes com outras doenças crônicas, como doenças cardíacas, diabetes, câncer e depressão, e uma intervenção agressiva é necessária, a fim de melhorar a qualidade de vida do paciente e diminuir o potencial de sequelas psicossociais (Choi & Koo, 2003).

A psoríase é uma doença inflamatória crônica, mediada pelo sistema imunológico, que se manifesta principalmente por lesões cutâneas e, em alguns casos, comprometem as articulações (Nestle et al., 2009). Essa é uma doença cutânea bastante comum, com prevalência entre 1-3% da população mundial, sendo que a variação na prevalência e incidência da doença parece ser fortemente influenciada por fatores climáticos e étnicos, com maior prevalência nas populações norte americanas e canadenses (4,6% e 4,7%, respectivamente), comparados com 0,4%-0,7% de

africanos, afro-americanos e as populações asiáticas, embora o entendimento dessas relações seja ainda bastante complexo (Jacobson et al., 2011).



Figura 1: Oito jeitos de mudar o mundo. Metas pactuadas pelos governos membros da ONU com a finalidade de tornar o mundo um lugar mais justo, solidário e melhor para se viver. <http://www.un.org/millenniumgoals/> acessado dia 16/07/2013.

Devido a diferentes formas de manifestação desta patologia e de acordo com sintomas clínicos, a psoríase é subdividida em variantes clínicas e subconjuntos são

correlacionados pelas alterações histopatológicas semelhantes observadas na pele de cada paciente, principalmente na espessura da placa (Christensen et al., 2006). A psoríase vulgar, a forma mais comum da psoríase, é caracterizada por placas elevadas de cor avermelhada e escamosas. Embora possa ocorrer em crianças, na maioria das vezes ocorrem no final da adolescência e/ou início da idade adulta, e geralmente persistem por toda a vida. O tipo vulgar da psoríase tem uma predileção por áreas determinadas como cotovelos, joelhos e couro cabeludo, podendo permanecer localizada ou generalizar-se ao longo do tempo (Lowes et al., 2007).

Pacientes podem apresentar-se com as formas agudas como a psoríase gutata caracterizada por pequenas pápulas dispersas e potencialmente ligada a infecções estreptocócicas. A psoríase pustulosa, generalizada de Von Zumbusch, normalmente surge em pacientes, após traumas ou cirurgias, chamada de fenômeno de Koebner, a qual é resultado de um stress psicológico ou de uma série de associações. Um notável subgrupo de pacientes com psoríase desenvolve a artrite psoriática, uma doença potencialmente debilitante, sendo que a sua prevalência da artrite psoriática da população em geral, é entorno de 0,04% a 1,2%, enquanto que em pacientes com psoríase é estimada em 25% até 34% (Lew et al., 2004; Perera et al., 2012).

Uma maneira alternativa de classificar fenótipos de psoríase é de acordo com estado de antígeno leucocitário humano (HLA), que determina a psoríase de tipo I e II. O uso de tal classificação é reforçado pelos resultados dos estudos de associações amplas do genoma. A psoríase do tipo I (aproximadamente 65% da população com psoríase) é positiva para HLA e está associada a pacientes mais jovens (com menos de 30 anos), com uma história familiar positiva para a psoríase, uma precedente

infecção estreptocócica e as lesões do tipo gutata (Bowcock & Krueger, 2005). O tipo II (35% dos pacientes com psoríase) parece estar associado com uma população com idade superior a 40 anos, sem história familiar de psoríase e correlação infecciosa anterior, clinicamente apresenta placas crônicas e está associado à unha e ao envolvimento articular (Gudjonsson et al., 2002).

Histologicamente, a psoríase tem se caracteriza por um intenso espessamento da epiderme, devido à proliferação de queratinócitos epidérmicos e interfoliculares, e as ondulações epidérmicas se alteram e formam projeções longas e finas em direção a derme, denominadas de acantoses (Abdou et al., 2013). Outras características histológicas que definem a psoríase incluem a presença de pequenos focos de neutrófilos no interior do estrato córneo e um infiltrado de células mononucleares significativo na epiderme, facilmente destacados pela imunomarcagem. Além disso, existe uma grande infiltração de leucócitos mononucleares (células T e células dendríticas) na derme e a presença de vasos sanguíneos alongados/hiperplásicos na região papilar da derme. A dilatação marcante desses vasos provoca a vermelhidão visível das lesões de pele psoriática e os muitos linfócitos, monócitos e neutrófilos são claramente aderidos às células endoteliais que adquirem características de vênulas endoteliais elevadas, que são normalmente encontrados nos nódulos linfáticos (Krueger & Bowcock, 2005; Lowes et al., 2007).

A pele, além de ser um dos principais locais para a invasão de bactérias, fungos, parasitas e vírus, devido à grande exposição, também é um local importante para a indução de tumores. Todos esses processos são influenciados pela resposta imunológica adquirida, que inclui células dendríticas especializadas (ex.: células de

Langerhans) e linfócitos T auxiliares (Th1 e Th2). Nesse contexto, a pele é muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas também uma extensão do sistema imunológico (Norris, 2004; Williams & Kupper, 1996).

Por si só, a pele é um órgão de extrema complexidade com funções muito específicas de isolamento. Além de recobrir toda a superfície corporal que possui aproximadamente 2 m² e representa 15% do peso corporal sendo constituída por três camadas de estrutura e propriedades distintas: a epiderme, derme e hipoderme (Figura 2), dispostas e inter-relacionadas de modo a adequar-se de maneira harmônica ao desempenho de suas funções (Freinkel & Woodley, 2001). Existe uma considerável variação na estrutura, propriedades e composição da pele relacionada com a idade e região do corpo que ela recobre e juntamente com seus derivados epidérmicos desempenha várias funções como: proteção física, química e biológica, impedindo perda de água para o meio, promover as sensações, pressão, tato e variações de temperatura, síntese de hormônios (diidrotestosterona) e vitaminas (vitamina D), regulação térmica, metabolização de xenobióticos e excreção de substâncias através das glândulas sudoríparas (Chuong et al., 2002; Haass & Herlyn, 2005).

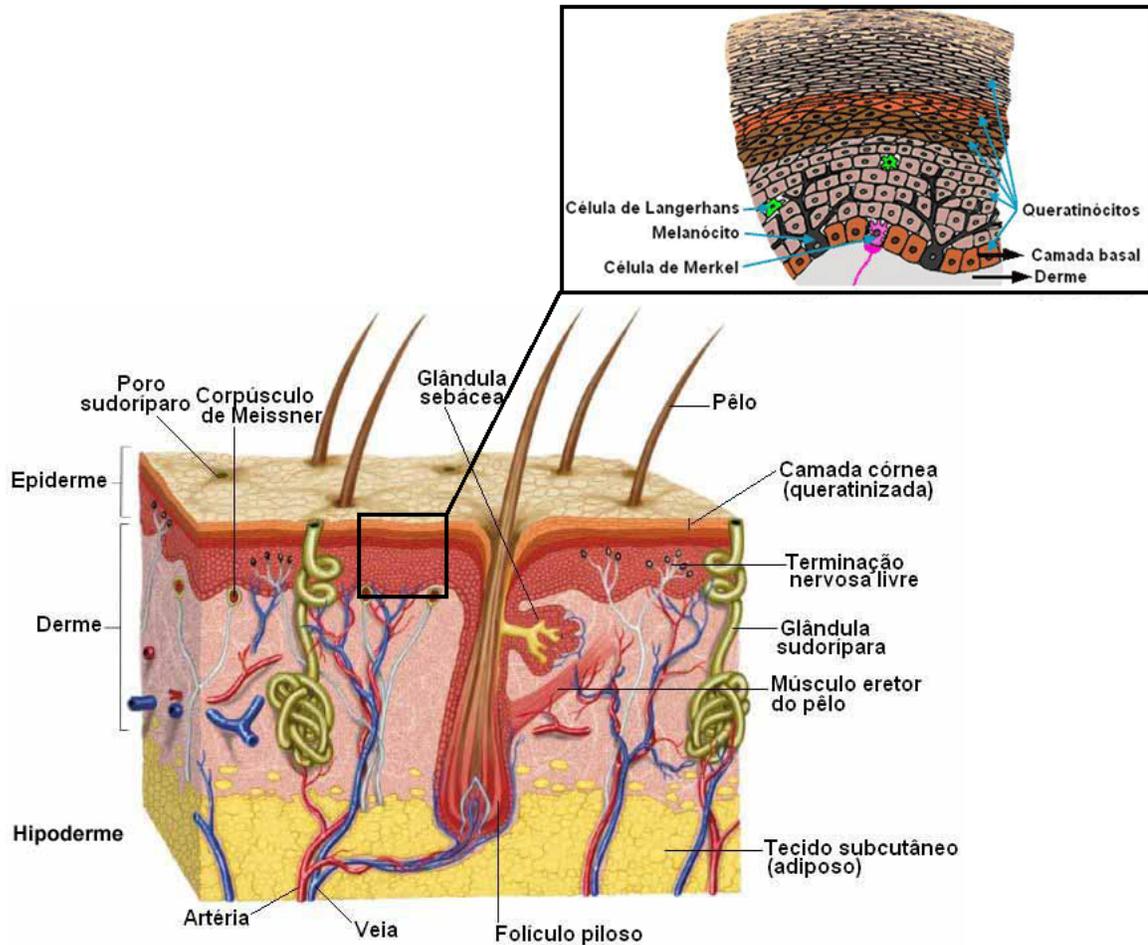


Figura 2: Esquema representativo das camadas da pele, suas células e anexos (Adaptado de Freinkel & Woodley, 2001).

A camada superior da pele é chamada de epiderme e a camada diretamente em contato com o meio externo sendo constituída por um epitélio estratificado pavimentoso cuja espessura apresenta variações topográficas ao longo do organismo (Candi et al., 2005). Subdividida e classificada basicamente em quatro camadas (Figura 3), a epiderme humana apresenta funções distintas que são observadas em cada uma destas camadas (Norris, 2004):

Estrato córneo – Região mais externa da pele atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, prevenindo também a perda de água;

Estrato granuloso – Camada na qual se inicia o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose e diferenciando-se em corneócitos;

Estrato espinhoso – Formada por queratinócitos que são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina (queratinização) interagindo entre eles através dos desmossomos, além da síntese de agentes antioxidantes (glutathione redutase, peroxidase, catalase), citocinas, quimiocinas, etc;

Estrato basal – camada mais profunda responsável pela proliferação celular dos queratinócitos e renovação da epiderme. Esta camada possui uma grande resistência ao processo apoptótico.

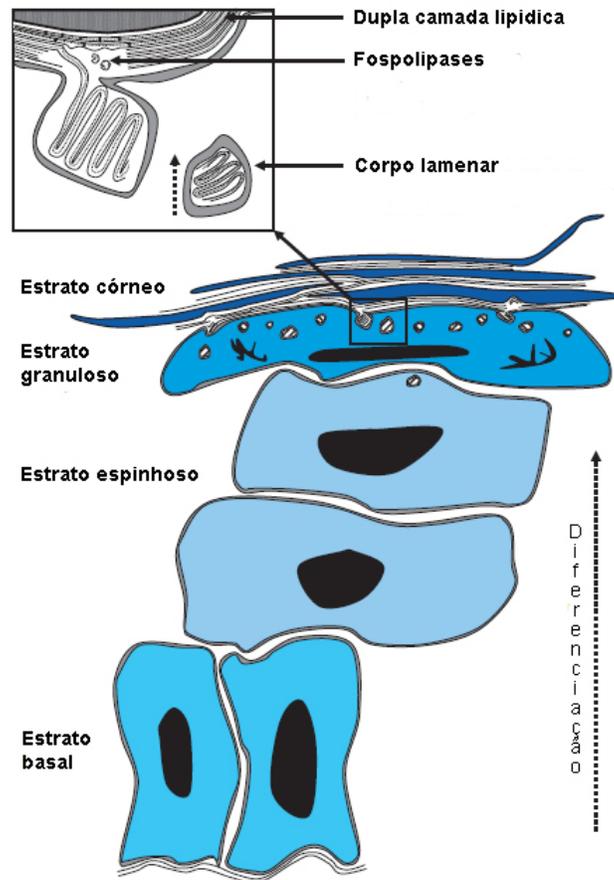


Figura 3: Subcamadas da epiderme e etapas da diferenciação, esquema simplificado(Adaptado de Proksch et al., 2008).

Além dos queratinócitos (80 – 85%), a epiderme é constituída de outros múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 10-13 % são de melanócitos, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merckel (Freinkel & Woodley, 2001; Koster & Roop, 2004).

A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre a proliferação e morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos. Esse processo

é governado pela comunicação parácrina e autócrina através de hormônios, fatores de crescimento e citocinas ou por comunicação intercelular via célula-célula e célula-matriz de adesão ou ainda, pela comunicação intercelular pelas “gap junctions” (Haake et al., 2001; Haass & Herlyn, 2005). A capacidade de auto renovação da epiderme é dependente tanto de condições homeostáticas como condições nocivas, devido à presença de uma população celular mitoticamente ativa na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície da pele e observando uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação e a partir da camada basal, se tem uma proliferação constante em direção a superfície e ao meio externo (Candi et al., 2005; Fuchs & Raghavan, 2002).

Os queratinócitos, o principal tipo celular presente na epiderme, são responsáveis para a manutenção da integridade da estrutura epidérmica, também estando envolvidos na resposta imune do tecido cutâneo, uma vez que expressam diferentes citocinas, quimiocinas e também moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC-II) (Chan et al., 2004).

No processo de diferenciação celular os queratinócitos passam a produzir a queratina, uma proteína resistente e impermeável que preenche as células mais superficiais da epiderme (corneócitos) e concedem força mecânica mantendo a estrutura dos queratinócitos e contribuindo na adesão celular (Chan et al., 2004).

Já as células de Langerhans estão localizadas nas camadas supra basais da epiderme, tanto na pele quanto das mucosas, local em que estas células

desempenham um importante papel na resposta imunológica cutânea (Chan et al., 2004). As células de Langerhans são tanto residentes quanto migratórias e possuem vários receptores de membrana envolvidos no processo imunológico (ex.: MHC classe II, IgG, fator do complemento C3), sendo responsáveis pelo reconhecimento, captação, processamento e apresentação de antígenos solúveis e haptenos aos linfócitos T. Em certas doenças inflamatórias cutâneas, como na dermatite de contato e em processos alérgicos, verifica-se que as células de Langerhans se tornam mais abundantes (Haake et al., 2001; Norris, 2004).

Tanto as células da epiderme (queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel), assim como outras células também residem e/ou migram para a epiderme em resposta aos mais variados estímulos nas quais incluem: os linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, sendo essas células elementos da resposta de defesa inata ou adquirida e se encontram em maiores quantidades em processos inflamatórios agudos e crônicos como a psoríase (Nickoloff & Nestle, 2004; Perera et al., 2012).

A derme, região logo abaixo da epiderme, consiste num tecido conectivo, cuja espessura é superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior. Esta estrutura confere à pele elasticidade, força tênsil e resistência mecânica. Além disso, a derme interage com a epiderme através da junção dermo-epidérmica, garantindo assim as trocas de elementos nutritivos e metabólicos entre essas camadas (Haake et al., 2001). A derme é dividida em camada papilar, que é a camada mais próxima da epiderme, e a camada reticular, que é formada por um tecido conectivo denso e constitui a maior parte da derme. Na sua constituição observa o envolvimento de

polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares), receptores sensoriais (ex.: corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos (Proksch et al., 2008).

Os fibroblastos, principal célula dérmica, sintetizam diferentes macromoléculas que entram na constituição da matriz celular, como por exemplo, o colágeno e a elastina. Durante um processo inflamatório ocorre o aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos devido à ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-1 α (IL-1 α) e interleucina-1 β (IL-1 β) (Debenedictis et al., 2001; Freinkel & Woodley, 2001; Haake et al., 2001; Nestle et al., 2009).

Os vasos sanguíneos presentes na derme permitem que ocorra a infiltração de células migratórias, importantes no processo de resposta de defesa inata ou adquirida e de cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, entre outros (Ryan, 2004). A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda, pronta e efetivamente, a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta, extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (Chuong et al., 2002; Freinkel & Woodley, 2001; Perera et al., 2012).

É cada vez mais reconhecido que mesmo a pele normal contém abundantes estoques de linfócitos T, bem como as populações residentes de células dendríticas,

sugerindo que a pele pode ser um local em potencial para desencadear respostas imunológicas. Trabalhos em que a pele não lesionada de pacientes com psoríase foi transplantada para camundongos imunodeficientes, foi possível se estabelecer um princípio importante em que as populações de células T e células dendríticas residentes podem ser um estímulo suficiente, quando expandidas, para induzir a psoríase (Boyman et al., 2004).

A diferenciação dos queratinócitos é amplamente alterada na psoríase com uma maturação regenerativa em paralelo e um programa de diferenciação celular alternativa que está transitoriamente expressa durante o reparo de feridas (Bowcock & Krueger, 2005).

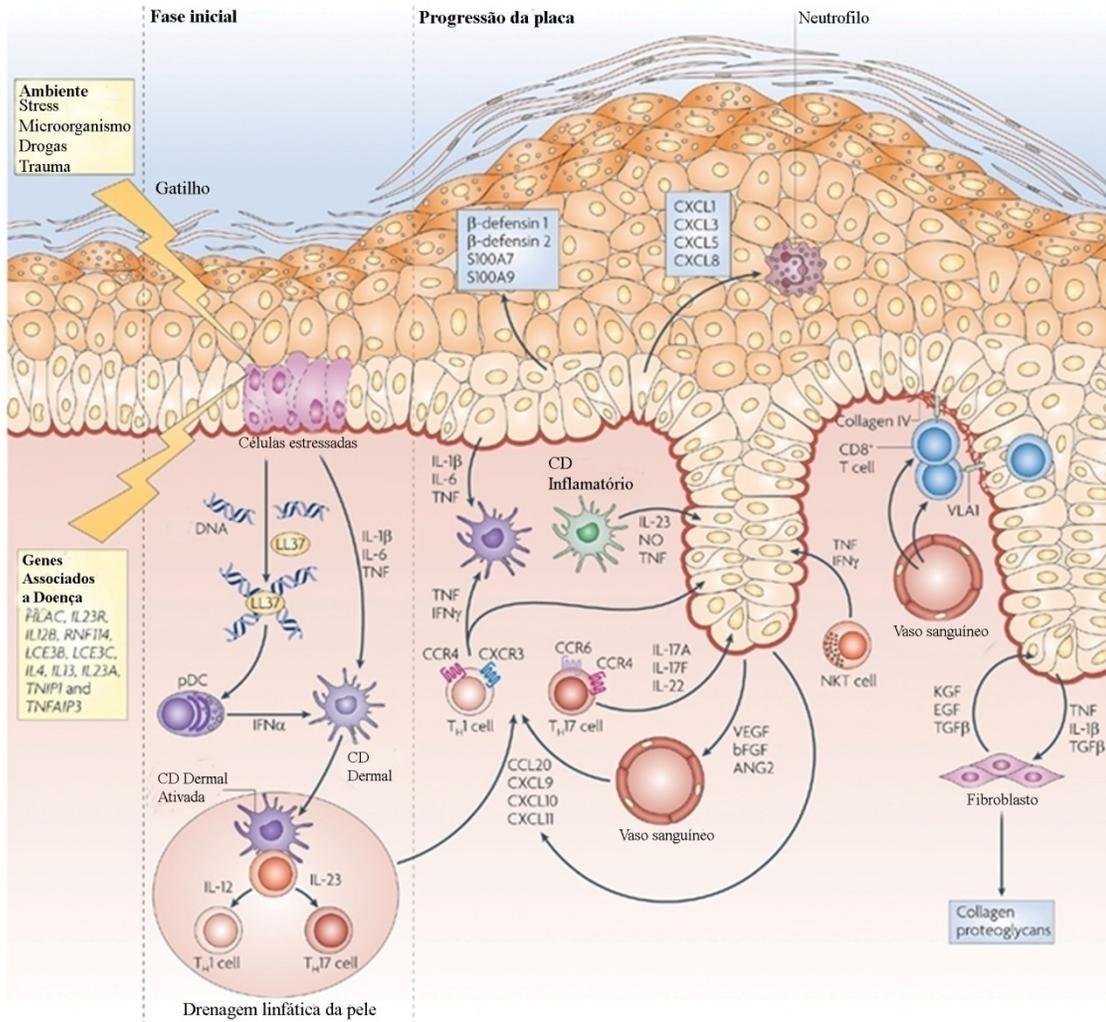
A taxa mitótica dos queratinócitos é drasticamente aumentada enquanto o processo de maturação é reduzido. Por essas alterações, a epiderme psoriática apresenta muito mais camadas de células. A camada granulosa é ausente e é possível observar queratinócitos ainda nucleados na camada córnea e as típicas placas psoriáticas surgem das alterações patológicas em praticamente todas as células da pele, sendo a principal característica histopatológica, a hiperproliferação dos queratinócitos epidérmicos com hiperqueratose (Schon, 2008). O dimensionamento e a consequente ruptura da barreira de proteção e descamação constante da pele psoriática na lesão, são causadas por insuficiência de corneócitos (queratinócitos completamente diferenciados), que normalmente secretam lipídios extracelulares o que favorece a adesão entre eles (Lowe et al., 2007).

Nas lesões psoriáticas, as células endoteliais se encontram expressando moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1, também conhecido como CD54), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1, ou CD106) e E-selectina (CD62E). Os leucócitos ganham entrada para o parênquima da pele por transmigração através de vasos que se encontram com moléculas de adesão ativadas e os leucócitos residentes também podem expandir-se para criar um denso infiltrado celular visto nas lesões da psoríase (Krueger, 2002).

O principal tipo de célula dendrítica encontrada nas lesões psoriáticas é a mielóide (CD11c+) a qual, além de atuar como célula apresentadora de antígeno, libera IL-20 que estimula a proliferação dos queratinócitos e também óxido nítrico, que promove vaso dilatação. Células dendríticas na psoríase secretam IL-23 e TNF- α e com este aumento no local, maior a expansão clonal de Th17, com consequente aumento na produção de IL-22 e IL-6 (que estimulam a proliferação dos queratinócitos). Enquanto isso, o TNF- α estimula os queratinócitos a produzir IL-8 e IL-10 (proteínas quimiotáticas para neutrófilos e LT respectivamente), IL-1 e o próprio TNF- α , além de fatores de crescimento que favorecem a angiogênese. Assim, a ativação de Th17 leva a liberação de citocinas que estimulam a proliferação e a produção de inúmeros componentes inflamatórios em queratinócitos. Além disso, IFN- γ também é produzido principalmente por Th1 e promove a produção e liberação de IL-12, IL-8, IL-10, IL-23 e a expressão de iNOS em queratinócitos e em células dendríticas. Ainda, IFN juntamente com TNF e IL-20 são ativadores de fatores de transcrição envolvidos no processo inflamatório como STAT-1, STAT-3 e fator nuclear- κ B (NF- κ B). Portanto, na psoríase

ocorre a interação entre o sistema imunológico inato e adquirido, de forma a sustentar o processo inflamatório cutâneo crônico (Lima & Lima, 2011).

Quando estimulados, os queratinócitos secretam citocinas como IL-1 e TNF- α , as quais ativam as células dendríticas como as células de Langerhans. Essas células por sua vez migram até o linfonodo mais próximo onde sinaliza linfócitos T, iniciando assim a ativação do sistema imunológico adaptativo. Na psoríase observa-se principalmente a ativação de linfócitos T tipo 1 (Th1) que secretam Interferon (IFN)- γ , TNF- α e Interleucina (IL)-2; Linfócito T tipo 17 (Th17) secretores de IL-17, TNF- α , IL-6 e IL-22; e linfócitos T CD8+ tipo 1 (Tc1). Uma vez ativados, os linfócitos migram dos linfonodos para a pele onde os Tc1 concentram-se na epiderme enquanto as células Th na derme, ativando células dendríticas e macrófagos, sustentando assim a ativação do sistema imunológico inato. As células dendríticas e macrófagos ativados secretam IL-12 e IL-23 que estimulam a proliferação de Th1 e Th17, respectivamente, estabelecendo assim, um ciclo vicioso de ativação do sistema imune (Figura 4) (Sabat et al., 2007).



Nature Reviews | Immunology

Figura 4: Fatores que desencadeariam a psoríase em indivíduos predispostos geneticamente, portadores alelos de susceptibilidade de genes associados à doença e seus mecanismos. Figura adaptada de Nestle e colaboradores (Nestle et al., 2009b).

O ciclo de proliferação dos queratinócitos psoriáticos é curto. Na epiderme normal o tempo entre a divisão celular e a total maturação e cornificação dos queratinócitos leva 26 dias. No entanto na epiderme psoriática isso ocorre em 4 dias,

atingindo as camadas superiores sem uma sua completa diferenciação (Das et al., 2009; Yang et al., 2013).

A psoríase tem ganho status de enfermidade sistêmica crônica e recorrente, associada particularmente a doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas, e requer o tratamento por um longo prazo. Existem várias opções de tratamento tópico e sistêmico para a psoríase. Os corticosteróides tópicos permanecem como o principal medicamento de escolha para o tratamento usado como monoterapia ou em combinação com outras modalidades de tratamento (Sitter et al., 2013).

Assim como a sua patogênese, o tratamento da psoríase pode ser tão complexo quanto, e normalmente é selecionado de acordo com o tipo e a gravidade do quadro. Apesar de existirem diversas medidas terapêuticas disponíveis, o tratamento ideal ainda não foi descrito, sendo que os principais problemas encontrados são a baixa efetividade ou o aparecimento de efeitos adversos que prejudicam a adesão pelo paciente. Em casos de quadros leves, o tratamento de escolha é a aplicação tópica de corticóides com ou sem associações, porém seu uso prolongado pode causar efeitos adversos cutâneos como atrofia da pele, aparecimento de estrias e telangiectasias (Murphy & Reich, 2011; Villasenor-Park et al., 2012).

Nos casos de psoríase refratária ao tratamento tópico ou quadros mais graves a escolha é a exposição à radiação ultravioleta B (UVB), com um efeito imunossupressor e interferindo na proliferação e diferenciação dos queratinócitos. Outra opção é aplicação de psoraleno associada a exposição à luz UVA possibilitando uma penetração mais profunda na pele, porém o emprego destes tratamentos deve haver

cautela com pacientes de pele clara com predisposição a queimaduras, pacientes em uso de substâncias fotossensibilizantes, pacientes com históricos de câncer de pele e também com pacientes que já estejam imunossuprimidos por outros fatores, gerando também efeitos de longo prazo como foto envelhecimento e o surgimento de lentigos (Villasenor-Park et al., 2012).

Pacientes com psoríase grave, os quais normalmente apresentam mais que 5% da superfície corporal comprometida, na maioria das vezes necessitam de terapia oral com medicamentos sistêmicos. Nestes casos os medicamentos de primeira escolha são os imunossupressores, como metotrexato e ciclosporina. O grande problema, entretanto, são os efeitos colaterais importantes que acabam surgindo, além da baixa eficácia (Nestle et al., 2009).

Contudo, atualmente os grandes protagonistas entre os medicamentos sistêmicos têm sido os chamados agentes biológicos, os quais interferem diretamente com os mecanismos imunobiológicos da doença. Anticorpos seletivos às bases protéicas dos principais alvos e mediadores inflamatórios têm sido adicionados às abordagens de tratamento para a psoríase, sendo que o primeiro agente biológico desenvolvido especificamente para a psoríase, foi o alefacept. Após a publicação de Krueger (2002) abordando as bases imunológicas da psoríase com destaque para novos alvos terapêuticos, uma infinidade de oportunidades para o desenvolvimento de novas drogas foi destacada. As terapias biológicas no tratamento da psoríase são altamente eficazes e podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, tendo duas principais classes de agentes biológicos, os destinados a células T e agentes biológicos contra citocinas. No entanto, a segurança dos agentes biológicos é

uma questão não resolvida e será abordada de forma satisfatória somente se houver uma utilização otimizada e de investimento na vigilância pós-comercialização, incluindo o desenvolvimento de registros abrangentes de fármacos biológicos (Krueger, 2002; Nestle et al., 2009).

Estes agentes e principalmente os corticóides, exercem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores através da estimulação ou inibição de fatores envolvidos em vias inflamatórias, incluindo a inibição da produção de citocinas e de redução de tais mediadores da inflamação como as prostaglandinas e leucotrienos, inibição da proliferação de células T e da imunidade dependente destas células, supressão de fibroblastos e as funções das células endoteliais. Além disso, apresentam também efeitos antiproliferativos, por retardar a síntese de DNA, diminuindo a taxa mitótica (Sitter et al., 2013).

Porém, muitos são os efeitos colaterais causados, o que enfatiza a busca por tratamentos com eficácia semelhante, mas com baixa toxicidade devido à necessidade de longos períodos de tratamento (Tabolli et al., 2009). Além do mais, doenças dermatológicas afetam a qualidade de vida em uma grande escala, já que os tratamentos existentes são responsáveis por uma enorme gama de efeitos adversos e levam ao abandono do tratamento pela maioria dos pacientes. Assim, a busca por um tratamento que possa favorecer a taxa de adesão permitir aos pacientes lidar melhor com sua doença e com isso gerar uma melhora sua qualidade de vida (Maroti et al., 2006).

As plantas são uma importante e grande fonte de produtos biologicamente ativos. Isso se dá devido à grande diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas que podem servir como modelo para a síntese de inúmeros fármacos (Nodari, 2000). Um grande exemplo, dentre muitos, é o ácido acetilsalicílico, um fármaco utilizado amplamente na medicina, sendo que o mesmo tem origem de estudos de uma planta, o salgueiro (*Salix Alba*). Isto mostra que o estudo de plantas como busca de uma nova terapêutica é de grande valia (Farinacci et al., 2008).

Problemas como desmatamentos para exploração da madeira, expansão de áreas cultivadas ou em transformações de áreas verdes em áreas de pastagem, vêm ocasionado uma imensa redução da biodiversidade e tem despertado um enorme interesse pelas espécies que ora existem, mas que poderão estar extintas dentro de pouco tempo, trazendo uma discussão sobre as perdas que estas práticas acarretam e a necessidade de procedimentos que tenham como meta o desenvolvimento sustentável. A indústria de medicamentos percebeu nos produtos naturais uma grande oportunidade de desenvolvimento em vários segmentos da cadeia produtiva, seja na industrialização dos fitoterápicos, na distribuição de matérias-primas ou na produção de plantas medicinais, etc (Fonte, 2004).

Estima-se que 50% do total dos fármacos mundialmente utilizado na clínica são derivados de produtos naturais (Gurib-Fakim, 2006), apesar do percentual de crescimento do mercado de fitoterápicos ser bastante significativo, apenas 8% da flora mundial apresenta estudos científicos que comprovam sua utilização, sendo a maioria das indicações ainda baseadas na tradição popular e na observação de efeitos com o relato de alguns casos (Nodari, 2000).

Um fator a ser levado em consideração como incentivo as pesquisas com produtos naturais é a adesão do paciente ao tratamento que é um dos maiores problemas para alcançar o sucesso de tratamentos de longa duração. Esta adesão ao tratamento pode ocorrer com o aumento na oferta de produtos naturais/plantas medicinais, possibilitando a reunião de um número maior de simpatizantes, reduzindo significativamente a morbidade/mortalidade. Assim, o aumento do consumo de drogas naturais é uma atividade comum da população em países em desenvolvimento (Calixto, 2000). Portanto, o aumento da pesquisa com produtos naturais pode levar ao desenvolvimento de novos produtos com potencial para serem novos fármacos como substituição ou como adjuvantes na terapêutica.

Dentre estas plantas utilizadas na cultura popular, uma grande quantidade de espécie muitas vezes não possui evidências científicas que comprovam utilização popular, a *M. sylvestris* é uma dessas espécies que tem relatos do seu uso datado dos gregos e romanos, porém estudos demonstrando sua atividade biológica e segurança são relativamente recentes quando comparado com a sua utilização popular (Farina et al., 1995; Muschietti et al., 2001; Esteves et al., 2009; DellaGreca et al., 2009; Gasparetto et al., 2012; Prudente et al., 2013).

Malva sylvestris é uma espécie da família Malvaceae, natural na Europa, Norte da África e na Ásia, onde seu uso é relatado historicamente por gregos e romanos devido a suas propriedades emolientes e laxantes. Na medicina popular a *M. sylvestris* é amplamente utilizada para diferentes condições inflamatórias (Guarrera, 2005), além de ser encontrada em formulações farmacêuticas para diferentes aplicações (por exemplo, Malvatricin[®]).

Conhecida popularmente como malva, a *M. sylvestris* é uma herbácea anual, amplamente dispersa, frequente nos campos, caminhos e entulhos (Gasparetto et al., 2012). Planta ereta, pubescente, com sua raiz principal (Figura 5) perpendicular, grossa, fusiforme, branca, carnuda, e de raízes secundárias finas. O caule ereto ou ascendente, ramoso, de 60 a 90 cm de altura. As folhas da malva são verdes, moles, macias ao tato, pubescentes, cordiforme-orbiculares, com cinco a sete lóbulos pouco profundos levemente crenados, palminérveas; pecíolo comprido e duas estípulas auxiliares. As flores são pediceladas com numerosos pêlos patentes; epicálise formado por três bractéolas pequenas, lanceoladas, livres; cálice gamossépalo campanulado (Figura 5b), corola de cinco pétalas livres, maiores que o cálice, cuneiformes, chanfradas, coradas de rosa-violáceo, raiadas de vermelho, prefloração contorcida; estames numerosos (Figura 5c e d), monodelfos, ligados na base às pétalas e formando tubo por onde emergem os estiletes (Figura 5e) aderentes na base. Ovário súpero formado de 10 a 20 carpelos dispostos em círculo, num verticilo em volta do carpóforo e que na maturação originam aquênios (Figura 5). As folhas e flores são inodoras e possuem sabor mucilaginoso (Costa, 2002).

No exame microscópico da *M. sylvestris* verifica-se a existência de numerosos tricomas contendo mucilagem, distribuídos em toda a planta de uma enorme abundância no parênquima foliar, além de sépalas e pétalas. Os pelos parecem isolados ou em fascículos, divergentes, principalmente sobre as nervuras. Ao lado destes observam-se, ainda nas duas epidermes, pelos glandulosos, curtamente pedicelados (Farina et al., 1995).

A sua constituição química é bem estudada e dentre seus constituintes estão os polissacarídeos, encontrados em concentrações de 5-10% semelhantes aos encontrados para as demais espécies da mesma família (Malvaceae). Para as flores é relatada a presença de flavonóides, antocianidinas e leucoantocianidinas e nas folhas foram detectados flavonóides sulfatados. As mucilagens encontradas nas folhas (8,2%) e nas flores (6,1%) contêm ácido D-galacturônico, D-galactose, glucose, L-arabinose, xilose e L-ramnose e as quantidades destes constituintes nas duas mucilagens são semelhantes. Na planta identificaram-se ainda taninos e vitaminas A, B1, B2, B9 e C, a cor das flores resulta de um antocianósido, o malvósido, e a presença de diversos óleos essenciais (Farina et al., 1995; Gasparetto et al., 2012). Outros autores como Cutillo e colaboradores (2006) também descreveram a ocorrência de terpenóides como sesquiterpenos, diterpenos e monoterpenos (Cutillo et al., 2006).

Estudos farmacológicos realizados com infusões de malva são raros, tomando-se como referência a característica dos constituintes encontrados em toda a planta. Preparações das folhas e flores dessecadas de malva, especialmente na forma de infusos, são empregadas apenas para suas propriedades emolientes, que se devem às mucilagens na redução e/ou alívio da produção do catarro nas vias respiratórias aéreas superiores em estados inflamatórios das mucosas e faringe (Farina et al., 1995).

Nos últimos anos, estudos com a utilização e a eficácia de flores e folhas da *M. sylvestris* tem sido descrito, porém são poucos em relação ao tempo de utilização da planta. Um dos primeiros estudos mostra a identificação de mucilagens e polissacarídeos comprovando a sua utilização popular (Gonda et al., 1990; Tomoda et al., 1989). No entanto, um dos primeiros estudos farmacológicos demonstrando um

efeito biológico do extrato da *M. Sylvestris* foi publicado tempos depois, sendo que Talbourdet e colaboradores (2007) demonstram a propriedade antienvhecimento do extrato e compostos (Talbourdet et al., 2007). Em modelos animais, o extrato hidroalcoólico de *M. sylvestris* apresentou efeito antinociceptivo (Esteves et al., 2009) e anti-inflamatório tópico no edema de pata induzido pela carragenina e como agente cicatrizante em modelo de queimadura (Gasparetto et al., 2012).

Dentre as publicações mais recentes as propriedades antioxidantes e sequestradora de radicais livres *in vitro* da *M. sylvestris* foram apresentadas por DellaGreca e colaboradores (2009) e também foi relatado que alguns componentes, como escopoletina, malvina e malvidina são eficazes em modelos de inflamação da pele (DellaGreca et al., 2009; Muschietti et al., 2001). Finalmente, a atividade anti-inflamatória tópica do extrato da *M. sylvestris* foi demonstrada por Prudente, A. S. (2010), comprovando a atividade anti-inflamatória e de algumas frações em modelo de inflamação aguda na pele, como também sua eficácia em modelo de dermatite alérgica (parte desses resultados estão publicados por Prudente e colaboradores; 2013).

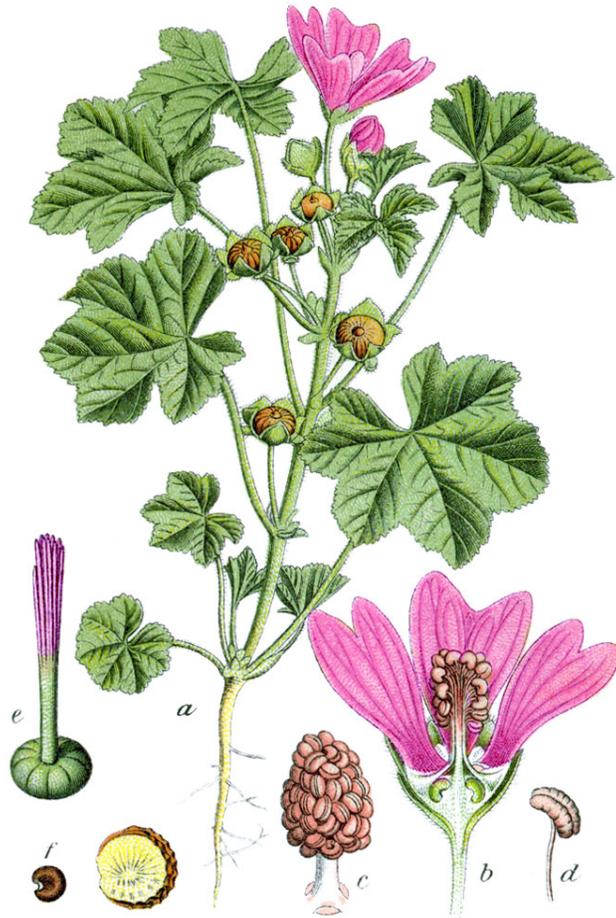


Figura 5: *M. sylvestris* L. ilustrada por Johann Georg Sturm em 1796 e pintada por Jacob Sturm (livro: *Deutschlands Flora in Abbildungen.*) p 883. (a) Raiz principal e secundarias; (b) cálice; (c) estames; (d) estame isolado; (e) estilete; (f) fruto. Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Malva_sylvestris_Sturm63.jpg acessado em 15/09/2013

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a atividade anti-inflamatória e antiproliferativa e o possível mecanismo de ação do extrato etanólico das folhas de *Malva sylvestris* (EEMS), através da utilização em modelos animais, ensaios bioquímicos e cultivo celular de queratinócitos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antiproliferativa do EEMS em modelo animal de múltipla aplicação tópica de TPA;
- Elucidar a ação antiproliferativa do EEMS em cultivo celular;
- Avaliar a toxicidade sistêmica da administração tópica do EEMS;
- Avaliar a interação do EEMS com receptores de glicocorticóides em animais;
- Demonstrar o perfil fitoquímico do EEMS;
- Analisar a atividade anti-inflamatória de compostos presentes no EEMS em modelo inflamatório agudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Malva sylvestris*

{Prudente, 2013 #5642}

3.2. Preparação do Extrato Etanólico

As folhas secas de *M. sylvestris* (3 kg) foram trituradas e expostas à extração exaustiva por maceração em etanol a 96%, com um volume de etanol três vezes superior ao volume de folhas secas em temperatura ambiente e sob o abrigo de luz durante o período de uma semana (Cutillo et al., 2006). Após a extração exaustiva o macerado foi mantido em repouso durante uma semana a 4° C. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50 °C a 1/3 do seu volume original. O extrato etanólico obtido foi liofilizado e mostrou um rendimento de 200,6 g (6,68%).

Para a análise de HPLC-MS, uma solução do extrato etanólico foi preparada em metanol na concentração de 65,55 mg/ml. A solução de trabalho foi obtida a partir de uma solução mãe por meio de diluições em série, com água-acetonitrila (50:50, v/v) para a concentração final de 300 µg/mL. Padrões moleculares foram utilizados na identificação fitoquímica do extrato. As soluções de malvidina 3-glicosídeo, quercetina e escopoletina foram diluídas em solução de água-acetonitrila (50:50, v/v), resultando numa concentração final de 10 µg/mL para a malvidina 3-glucósido e de 5 µg/mL para a quercetina e escopoletina. Todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração a

-40° C. Estas soluções foram filtradas através de filtro 0,45 µm de PVDF da Millipore, antes da utilização.

3.3. Cromatografia Líquida Acoplada a um Espectrômetro de Massa (LC-MS)

As análises do EEMS foram realizadas por espectrometria de massas em um triplo quadrupolo da Applied Biosystems modelo API 3200 equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus e fonte de ionização por eletrospray (ESI). O sistema foi acoplado a um cromatógrafo líquido Agilent 1100 (Wilmington, DE, EUA), bomba quaternária G1311A, desgaseificador G1379A e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager. Os dados obtidos foram processados através do software Analyst, versão 1.4.2 (ABI / Sciex).

O sistema de HPLC foi operado utilizando um gradiente de condições e uma coluna X-Bridge C18 (150 mm x 4,6 milímetros, ID, 5 µm de tamanho de partícula), termo indicado a 35° C e ligado a uma coluna de proteção C18 X-Bridge (10 mm x 4,6 milímetros, ID, 5 µm tamanho de partícula). A fase móvel consistiu de água com 0,05% de ácido fórmico ou formato de amônio 5 mM (canal D) e acetonitrila com 0,05% de ácido fórmico ou formato de amônio 5 mM (canal B) em um gradiente de eluição que se iniciou partir de 95% a 70% no canal B durante 30 min, 70% a 60% no canal B durante 10 min, 60% a 95% no mesmo canal durante 10 min, com uma taxa de fluxo constante mantida a 0,450 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. Uma sonda de pulverização Turbo-Ion (ESI) no modo positivo e negativo de íons foi utilizada para estas análises. O

azoto utilizado como cortina para o nebulizador foi produzido por um gerador de azoto de elevada pureza (PEAK Scientific Instruments, Chicago, IL) (Prudente et al., 2013).

3.4. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (25-35 g) proveniente do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (Curitiba), todos os animais foram mantidos em temperatura de 22 ± 2 °C, respeitando uma fase claro/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração. Antes do início de cada experimento os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 24 horas para aclimação, não sendo estes animais reutilizados em testes posteriores. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios. O presente projeto foi submetido à avaliação do comitê de ética em experimentação animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob o numero 299.

3.5. Avaliação do Edema de Orelha

Para a realização de estudos sobre os processo inflamatório cutâneo é utilizado o modelo de indução de edema na orelha de camundongos. Este modelo consiste em um método rápido e simples e requer pouca quantidade de substâncias e permite resultados reprodutíveis.

A aplicação farmacológica deste modelo é de grande relevância, uma vez que diferentes agentes flogísticos (ex.: TPA, radiação UVB, ácido araquidônico e

oxazolona), que permitem uma variedade de modelos de inflamação cutânea que podem avaliar tanto ação tópica como sistêmica de diferentes drogas em teste como agentes de uso sistêmicos ou tópicos, sendo estes agentes extratos de plantas bem como suas substâncias isoladas e agentes sintéticos (Gabor, 2000).

Esta metodologia é empregada inicialmente com o objetivo de verificar a formação de edema induzido pelo agente flogístico e posteriormente analisar de outros parâmetros do processo inflamatório, que é realizada com retirada de biopsias (círculos de 6 mm de diâmetro da orelha do camundongo) após a eutanásia. O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos, em μm . A espessura da orelha foi medida antes e após a indução do processo inflamatório com a utilização de um micrômetro digital (Great MT-04513). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha direita e registrando a sua espessura através da diferença entre a medida inicial (basal) e a medida feita após a aplicação do agente flogístico. Para minimizar variações de medida na técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador. Os agentes flogísticos foram dissolvidos em 20 μL de acetona e aplicados na orelha direita dos camundongos (Otuki et al., 2005).

3.5. Edema de Orelha Induzido por TPA

O 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) é um dos constituintes ativos do óleo da *Croton tiglium* L.. A aplicação tópica de ésteres de forbol, como o TPA, induz inflamação cutânea e respostas hiperproliferativas se aplicado repetidas vezes nos animais, assemelhando-se sob muitos aspectos aos sinais de algumas doenças de

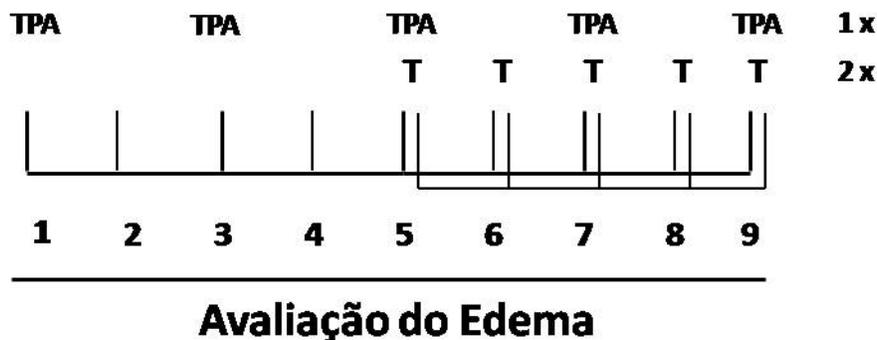
pele como a psoríase (Gabor, 2000). O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg) na orelha direita de camundongos sobre um volume de 20 µL de acetona. A malvidina 3-glucosido, malvidina 3,5-glucosido, quercetina, escopoletina e a dexametasona (utilizada como controle positivo) foram administrados na orelha dos animais logo após a aplicação do TPA. Assim como o TPA, as drogas testadas também foram dissolvidas em 20µL de acetona. A variação da espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do agente flogístico (TPA) (De Young et al., 1989). Foram coletadas biópsias das orelhas dos camundongos 24 horas após a indução do edema, para realização da avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

3.6. Edema de Orelha Induzido pela Múltipla Aplicação de TPA

Para avaliar o efeito anti-inflamatório cutâneo pré-estabelecido e a atividade antiproliferativa do EEMS, foi utilizado o modelo da múltipla aplicação de TPA, o qual mimetiza aspectos clínicos e histopatológicos de psoríase. A inflamação da pele neste modelo é persistente e tem sido útil para avaliar se os compostos aplicados topicamente são capazes de resolver uma lesão inflamatória existente (De Vry et al., 2005). O processo inflamatório foi estabelecido pela múltipla aplicação de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados, durante 9 dias. A partir do quinto dia de indução do processo inflamatório o EEMS (1 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) (controle positivo) foram administradas pela via tópica, durante 4 dias consecutivos (2 vezes ao dia) e o edema foi avaliado diariamente (Mendes et al., 2012; Stanley et al., 1991). Tanto o TPA como o extrato em teste e a dexametasona foram diluídos em acetona e aplicados 20 µL de na orelha direita dos animais, cada um na sua dose

citada anteriormente. 6 h após a última aplicação de TPA e os tratamentos em questão, amostras (círculos de 6 mm) da orelha dos animais foram removidas, pesadas, congeladas para posterior análise do conteúdo de MPO e atividade enzimática da n-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) ou fixadas para avaliação histológica bem como para determinação dos níveis de expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular).

O decorrer do experimento foi realizado de acordo com o esquema abaixo onde TPA = indução do edema com TPA e T = tratamentos com as drogas em teste duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas.



3.7. Avaliação da Atividade Enzimática da MPO

A avaliação da atividade enzimática de MPO, foi realizada utilizando a metodologia de Bradley et al. (1982) modificada por De Young et al. (1989). Biopsias de orelha (fragmentos de 6 mm de diametro) oriundas do modelo da múltipla aplicação de TPA, foram adicionadas a 750 μ L de tampão fosfato de sódio 80 mM e pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB e homogeneizadas por aproximadamente 45 segundos a 0°C. Aos homogeneizados foram adicionados 750 μ L do tampão descrito anteriormente. As

amostras (1500 μ L) então foram centrifugadas a 11200 g a 4°C por 20 min. Triplicatas de 30 μ L do sobrenadante foram adicionados em placas de 96 poços, com posterior adição de 200 μ L de uma solução contendo 100 μ L de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, 85 μ L de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,22M pH 5,4 e 15 μ L de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 μ L de TMB 18,4 mM dissolvido em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8% promoveu o início da reação colorimétrica. A placa foi incubada a 37 °C por 3 min, e a reação foi interrompida pela adição de 30 μ L de acetato de sódio 1,46 M pH 3,0 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada usando leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) com comprimento de onda de 620 nm e o resultado foi expresso em mili densidade óptica por orelha (mDO/orelha) (Bradley et al., 1982; De Young et al., 1989).

3.8. Avaliação da Atividade Enzimática da NAG

A avaliação da atividade da enzima NAG é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares e foi realizada, assim como a MPO, a partir de amostras de orelhas de camundongos oriunda do modelo da múltipla aplicação de TPA, seguindo a metodologia de Sanchez & Moreno (1999). As biópsias das orelhas (fragmentos de 6 mm de diâmetro de tecido da orelha dos camundongos) foram adicionadas a 750 μ L de solução de fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizados por cerca de 45 s a 0°C. Aos homogeneizados foram adicionados 750 μ L do tampão anteriormente descrito. As amostras (1,5 mL) foram adicionadas em microtubos e centrifugadas a 12000 xg a 4°C por 15 min. Triplicatas de 25 μ L do sobrenadante foram colocadas em placas de 96

poços e posteriormente foi adicionado 100 μ L de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 μ L da solução de p-nitrofenil-acetamida- μ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) em água ultra pura (miliQ – Millipore). A seguir o meio reacional foi incubado a 37°C por 1 h e a reação foi interrompida pela adição de 30 μ L de tampão glicina 200 nM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada por colorimetria usando um leitor de placas (BioTek Ultra Microplate reader EL 808), cuja leitura foi realizada na absorvância de 405 nm e os resultados expressos como mDO/biópsia (Sanchez & Moreno, 1999).

3.9. Avaliação da Atrofia Cutânea

Um dos efeitos colaterais promovido por corticóides quando utilizados em tratamentos tópicos é a atrofia cutânea, promovendo uma diminuição do colágeno produzido por fibroblastos da derme (Schoepe et al., 2010). Para avaliarmos este parâmetro os animais foram expostos por um período de sete dias ininterruptos ao EEMS (1,0 mg/orelha), a dexametasona (0,05 mg/orelha) ou acetona, sendo aplicados 2 vezes ao dia. A espessura da orelha foi avaliada no primeiro dia antes a primeira exposição e no oitavo dia de experimento. A atrofia foi expressa como a diferença da medida do último dia com a do primeiro dia, como descrito no item 3.5. Amostras da orelha e os órgãos linfóides (timo, baços, adrenais e linfonodo auricular) foram coletados no último dia de experimento e pesados a fim de avaliar o efeito sistêmico da aplicação tópica do EEMS (1,0 mg/orelha) e Dexametasona (0,05 mg/orelha).

3.10. Análise Histológica

Foram realizados estudos histológicos para avaliar a modificação estrutural e celular da pele causada pela múltipla aplicação de TPA e alteração após tratamento com a *M. sylvestris*. As amostras de orelhas, coletadas dos camundongos submetidos aos modelos anteriormente citados, foram fixadas em solução de ALFAC (85% álcool 80° GL, 10% formaldeído 40% e 5% ácido acético) por um período de 16 h. As orelhas foram então desidratadas em uma bateria seriada de álcool (concentrações crescentes com variação de 10%) e diafanizadas em xilol, emblocadas em parafina e seccionados em cortes de 5 µm e colocados sob laminas de vidro. Os cortes foram então hidratados em xileno e uma sequência decrescente de etanol, em seguida, corados com hematoxilina e eosina (Recio et al., 2000). Para avaliar a espessura da epiderme, os cortes foram fotografados em um aumento de 200 e/ou 400x e as fotografias analisadas com o software Image J versão 1.41 (National Institute of Health, EUA). Para confirmar essas imagens as marcações foram contadas por um único experimentador de modo “cego”, na qual ele não sabia qual grupo o corte pertencia. A espessura da epiderme foi expresso, em µm

3.11. Avaliação dos Níveis da Proteína PCNA por Imuno-histoquímica

Esta é uma proteína nuclear, necessária para a síntese de DNA em células eucariotas. A sua síntese e expressão está relacionada com o estado de proliferação de células e do seu nível de expressão que reflete a atividade de proliferação de células de tumor e pré-cancerosas (Gambichler et al., 2008).

A imuno-histoquímica foi realizada pelo método indireto (revelação do complexo antígeno-anticorpo). As orelhas foram emblocadas previamente em parafina e cortadas em micrótomo com uma espessura de 5 µm. Os cortes foram desparafinados em xilol (três banhos com duração de dez minutos cada) e reidratados em concentrações de alcoóis decrescentes 100%, 95%, 80% e 70% (banhos com duração de cinco minutos cada) e banho em tampão fosfato (PBS), pH 7,4. Após o banho, a peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio em metanol a 3% por 10 min. Posteriormente, foi realizado o bloqueio de radicais aldeídos através de banhos de glicina 0,1 M (3 minutos), o bloqueio de peroxidase endógena utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% em metanol (15 minutos) e a inibição dos sítios antigênicos inespecíficos através da incubação das lâminas com soro de albumina bovina (PBS/BSA 1%, 30 min) em câmara úmida a temperatura ambiente. Em seguida foi feita incubação por 2 horas em câmara úmida com anticorpo primário anti-PCNA na temperatura ambiente, na proporção de 1:100 em solução de PBS/BSA a 1%. Neste momento foi selecionada uma lâmina para controle negativo que recebeu anticorpo isotípico (purified mouse IgG1 immunoglobulin isotype) ou omitindo-se o anticorpo primário. Após um banho de PBS/BSA a 1% e três banhos de PBS, todos os cortes foram incubados com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 h em câmara úmida e a temperatura ambiente, na proporção de 1:100 em solução de PBS/BSA 1%. Em seguida, foram feitos três banhos com PBS e incubação dos cortes com o cromógeno diaminobenzidina (Kit Substrato DAB, 10 min). O excesso de cromógeno foi retirado em água corrente. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina por 5 min, desidratadas, clareadas com xilol e montadas com Bálsamo do

Canadá (Athar et al., 2004). Para avaliação da marcação dos cortes foi utilizada lente ocular graduada. A marcação foi avaliada em áreas representativas em aumento de 200x e 400x. Além disso, foi realizada a quantificação da marcação da proteína PCNA em 5 diferentes áreas em aumento de 400x. Para esta análise, foram retiradas 5 fotos, de forma randomizada, de cada 3-5 cortes histológicos distintos, corados com o cromógeno diaminobenzidina e não contra corados com hematoxilina, para cada amostra de orelha. A quantificação foi realizada pela contagem de celular marcada utilizando o programa Image J. Para confirmar essas imagens as marcações foram contadas por um único experimentador de modo “cego”, na qual ele não sabia qual grupo o corte pertencia.

3.12. Ensaio de Reversão por Antagonista Corticóide (RU486 – Mifepristona)

Para verificar o possível envolvimento dos receptores de glicocorticóides, os animais foram pré-tratados com o antagonista farmacológico RU486 (mifepristona) (50mg/kg, s.c.) ou com veiculo Polietileno glicol 400 (PEG400) e após 30 minutos foi induzido o edema de orelha pela aplicação de TPA como descrito no item 3.5. e na sequência realizado o tratamento tópico com o EEMS (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,05 mg/orelha). A espessura da orelha foi utilizada como indicador do processo inflamatório e para avaliar a possível reversão causada pelo antagonista (Pinto et al., 2010).

3.13. Ensaio de Ligação Específica ao Receptor de Glicocorticóide

Para avaliar a existência da interação do EEMS com o receptor de glicocorticóide (GR) ocorre de forma direta, utilizamos a técnica de ligação específica, usada de forma bem ampla em estudos de interação fármaco-receptor. O ensaio de ligação foi realizado utilizando fígado de rato, homogeneizado com tampão HEM (10mM de HEPES, 1mM de EDTA, 2 mM, ditioneitol (DTT), 10 mg/mL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 20 mM de molibdato de sódio, 10% de glicerol, pH 7,2). Após centrifugação (30.000 x g, 30 min/4° C), o sobrenadante foi utilizado para a análise do ensaio de ligação específica através do deslocamento de ³H-dexametasona provocado pelo EEMS como descrito anteriormente (Kalimi & Hubbard, 1983), com algumas modificações. Então, o sobrenadante dos homogeneizados de fígado (50 µL) foram incubados com 25 µL de tampão de ensaio (25 nM, ³H-dexametasona, 10 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, 20 mM de molibdato de sódio, pH 7,5) e 25µL de uma solução contendo EEMS (0,1-30 µg/mL) ou dexametasona 10⁻⁵ M durante 18 horas a 0°C. Após a incubação, a reação foi interrompida e à ³H-dexametasona que sofreu deslocamento do receptor e/ou não sofreram ligação foram conjugados por dextrano e carvão ativado (150 µL 2% de carvão ativado, 0.2%, dextrano PM 70 kDa). Após agitação em vórtice e centrifugação a 10.000 xg durante 5 min, o sobrenadante foi separado e a radioatividade foi contada por cintilação líquida em contador beta (BeckmanCoulter, modelo: LS6500). A ligação não específica (não mais do que 20% da ligação total) foi determinado pela adição de 50 nm de dexametasona não radioativa. Os resultados são expressos como pmol de ³H-dexametasona ligada por mg de proteína (Ferreira et al., 2005).

3.14. Cultivo Celular

Para a realização dos experimentos *in vitro* foram utilizados queratinócitos humanos da linhagem imortalizada HaCaT, cedidas pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr. da Universidade de São Paulo (USP). As células foram mantidas em cultivo em meio nutritivo DMEM, suplementado com soro fetal bovino (SFB) em uma proporção de 10% além da adição de 10µg/mL de estreptomicina e 10 U/mL de penicilina sob uma atmosfera umidificada e controlada com 5% de CO₂ a 37° C. O EEMS foi diluído previamente em etanol PA em seguida diluições seriadas foram realizadas em meio de cultivo, sendo que a concentração final encontrada nos poços tratados foi de apenas 2% de etanol na maior concentração do EEMS. Para verificar se esta porcentagem de etanol interferia nos resultados foi realizado um grupo denominado Veículo.

3.15. Ensaio de Viabilidade Celular

3.15.1. Ensaio de MTT

A fim de avaliar um possível efeito citotóxico do EEMS em linhagem imortalizada de queratinócitos humanos (HaCaT) a metodologia de redução do sal de tetrazólio foi utilizada. O ensaio mede a redução de amarelo de 3-(4, 5 –dimetil-tiazol-2-il) -2, 5-difenil tetrazólio (MTT), através da succinato desidrogenase mitocondrial em células vivas. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 7x10³ células/poço. Após 16 horas o meio de cultivo suplementado foi substituído por meio

incompleto com diferentes concentrações de EEMS (0,03-100 µg/mL) e incubado por 24 horas. Ao final deste período o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,5 mg/mL) em meio incompleto e placa foi incubada em uma atmosfera umidificada e controlada com 5% de CO₂ a 37° C por 3 horas. A solução de MTT foi removida e os cristais de formazan formados foram dissociados em etanol PA e a absorbância foi verificada em leitor de placa (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) em um comprimento de onda de 570 nm e o resultado foi expresso em porcentagem da viabilidade celular (Pachauri et al., 2013).

3.15.2. Ensaio do Vermelho Neutro

O ensaio de absorção de vermelho neutro proporciona uma estimativa quantitativa do número de células viáveis em cultura celular. É um dos testes de citotoxicidade mais utilizados com muitas aplicações biomédicas e ambientais que se baseia na capacidade das células viáveis ligar e incorporar o corante vermelho neutro [(VN, cloridrato de 3-amino-7-dimetil-2-metilfenazina)], que é hidrossolúvel e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos de células viáveis (Repetto et al., 2008). Assim como ensaio do MTT, também consiste em um ensaio colorimétrico que permite quantificar o crescimento celular (proliferação celular) e determinar a citotoxicidade de agentes com potencial farmacológico.

As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 7×10^3 células/poço (37°C, tensão de 5% de CO₂). Após 16 horas o meio de cultivo suplementado foi substituído por meio incompleto com diferentes concentrações de extrato da *M. sylvestris* (0,03 – 100 µg/mL) e incubado por 24 horas. Após o tempo de exposição ao composto, retira-se o meio dos poços e adiciona-se 200 µL da solução

com o corante VN (40 µg/mL de meio de cultivo com 1% de soro fetal bovino). As células foram incubadas novamente por 3 horas (37°C, tensão de 5% de CO₂), tempo este necessário para a incorporação do corante nas células vivas. Após o meio ser retirado, uma lavagem foi realizada com uma mistura de 1% de CaCl₂ e 0,5% de formaldeído, para remover o corante externo. Então, foram adicionados 200 µL de uma solução de ácido acético 1% e etanol 50%. Após 10 minutos na temperatura ambiente e agitação moderada, a absorbância foi mensurada em 540 nm em leitor de placa ELISA (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808). A absorbância das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular.

3.16. Ensaio de Proliferação Celular

Com o intuito de verificar a participação do EEMS na proliferação celular de queratinócitos, células HaCaT (7x10³ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e em uma atmosfera umidificada, 37°C e uma tensão de 5% de CO₂. 16 horas após o meio foi substituído por 200 µL de meio contendo diferentes concentrações do EEMS (0,03 – 100 µg/mL). A placa foi incubada em condições padrão e a cada 48 horas o meio foi substituído por um novo meio contendo as mesmas concentrações anteriores do extrato. Ao final de 96 horas a proliferação foi avaliada através do ensaio de MTT de acordo com o item 3.15.1.

3.17. Ensaio de Ciclo Celular e Apoptose

Para verificar se o EEMS é capaz de interferir no ciclo celular ou promover morte celular por apoptose ou necrose celular HaCaT foram tratadas com EEMS (0,03 – 100 µg/mL) e as alterações celulares foram determinada por citometria de fluxo com auxílio do kit Anexina V-PE, 7-AAD (BD 559763, BIOPharmigen) para avaliar a viabilidade das células e conteúdo de DNA do ciclo celular de acordo com as instruções do fabricante.

3.18. Análises Estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), exceto para os valores das DE₅₀ (dose necessária para inibir em 50% da resposta dos grupos tratados em relação ao grupo controle), que foram representados como a média geométrica seguido de seu respectivo intervalo de confiança de 95%. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma ou duas via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman-Keuls quando necessário. Valores de p menores do que 0,05 (p < 0,05) foram considerados significativos. Os cálculos acima foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 3.00, San Diego Califórnia, EUA.

3.19. Drogas e Reagentes

Para a realização dos experimentos acima, os seguintes reagentes foram utilizados: malvidina 3-glicosídeo, malvidina 3,5-glicosídeo quercetina, escopoletina, 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), dexametasona, hexadeciltrimetilamônio (HTAB), Tetrametilbenzidina (TMB), p-nitrofenil-acetamida-µ-D-glicopiranosídeo,

fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ditioneitol (DTT), aprotinina, dimetilsulfóxido (DMSO), Tween 20, ácido n-2-hidroxi-etilpiperazina-n'-2'-etanossulfônico (HEPES), albumina de soro bovino (BSA), 3-(4, 5 -dimetil-tiazol-2-il) -2, 5-difenil tetrazólio (MTT), cloridrato de 3-amino-7-dimetil-2-metilfenazina (VN), gelatina, mifepristona e cloreto de benzetônio (Sigma ChemicalCo®, EUA). Etanol absoluto, polietilenoglicol 400, peróxido de hidrogênio, acetato de sódio, cloreto de sódio, hematoxilina, eosina, xilol, molibdato de sódio, glicerol, glicina, metanol, fosfato de sódio, cloreto férrico, dextrana, ácido clorídrico, ácido fosfomolibidico, ácido fosfotúngstico, Tris-HCl, bieberich Scarlet, fucsina ácida e azul de anilina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Acetona, N,N-dimetilformamida, citrato de sódio, etilenodiaminotetracético (EDTA), tolueno, carvão ativado, formol, formaldeído, ácido acético glacial e parafina (Merck Bioscience, Alemanha). Anticorpo policlonalanti-PCNA, anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP - horseradishperoxidase) (Santa Cruz Biotechnology®, EUA). Kit substrato DAB para peroxidase, kit Anexina V – PE, 7-AAD (BD BiosciencesPharmigen®, EUA). [³H]-dexametasona (Amersham, Buckinghamshire, UK). Meio Dulbecco Mem (DMEM), soro fetal bovino (SFB), tripsina (Cultilab, Campina, Brasil). Estreptomina/penicilina (Gibco, Life Technologies Corporation, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do EEMS Sobre o Modelo da Múltipla aplicação de TPA

4.1.1. Avaliação do Edema de Orelha

A aplicação de TPA promoveu aumento na espessura da orelha após múltipla aplicação e observamos o estabelecimento do edema, como demonstrado na figura 6. A partir do 5º dia de experimento os animais foram tratados com o EEMS (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa, 0,05 mg/orelha) duas vezes ao dia, até o final do experimento. O edema era avaliado 6 e 24 horas após a aplicação do TPA uma vez que o mesmo era aplicado em dias alternados e as medidas eram feitas diariamente. Dois grupos de animais não receberam TPA. No entanto, um deles recebeu o veiculo utilizado pra diluir os tratamentos (acetona), esses grupos são denominados de Naive e Veiculo, respectivamente. O EEMS foi capaz de reduzir o edema pré-estabelecido já no primeiro dia de tratamento, assim como a dexametasona. Esta inibição foi observada até o fim do experimento, atingindo efeito máximo de $64,7 \pm 4,5\%$ e $79,9 \pm 4,1\%$, respectivamente para EEMS e dexametasona (Figura 6).

A aplicação repedida de TPA na orelha dos animais causou extravasamento plasmático, alterando não só a espessura das orelhas dos animais como o peso (Figura 7). A múltipla aplicação de TPA aumentou o peso das orelhas em $17,6 \pm 1,4$ mgsendo que o tratamento com EEMS impediu esse aumento em $74,9 \pm 2,1 \%$. O fármaco de referência, usado como controle positivo (dexametasona), foi capaz de impedir esse aumento em $97,2 \pm 3,1 \%$.

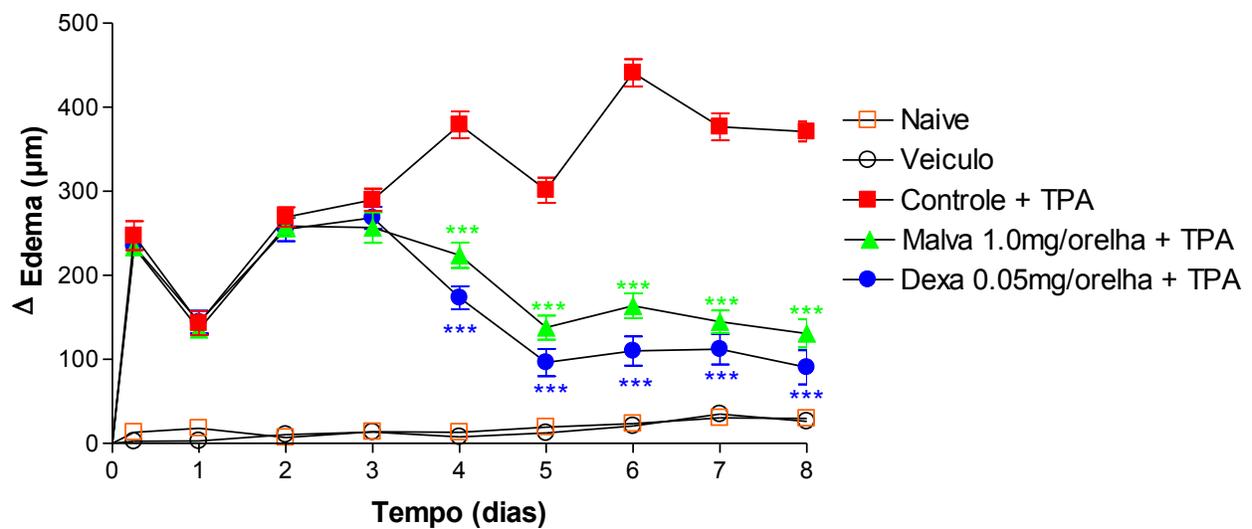


Figura 6: Efeito do EEMS e dexametasona (Dexa), administrados por via tópica duas vezes ao dia no modelo de edema de orelha induzido pela múltipla de TPA. No animal veículo somente acetona foi administrada. Amostras para demais análises foram coletadas no último dia de experimento Cada linha representa a média \pm EPM, para 5-8 animais e estes dados foram avaliados através de uma análise de variância de duas vias (ANOVA). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle sendo *** $p < 0,001$. Indução e tratamento conforme o esquema do item 3.6.

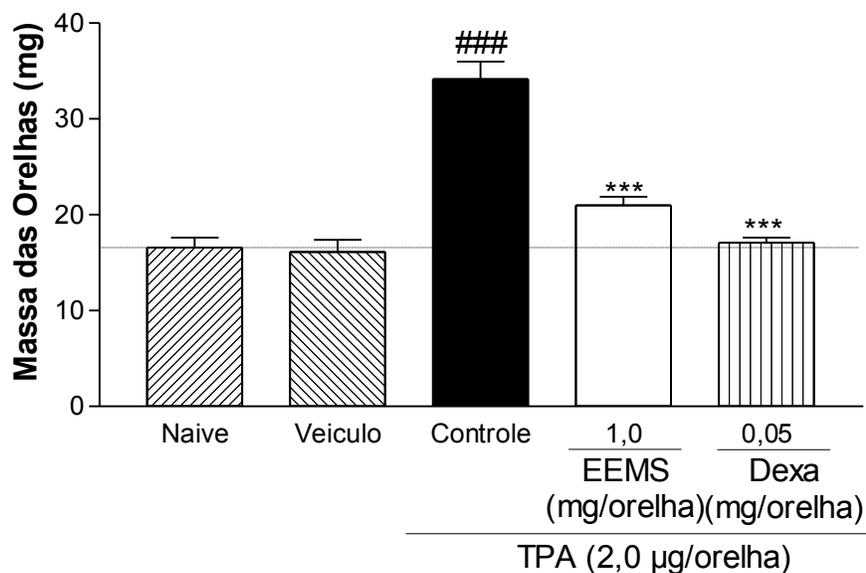


Figura 7: Efeito do EEMS e dexametasona (DEXA) sobre o peso das orelhas no modelo de aplicações múltipla de TPA. No grupo veículo somente acetona foi administrada. A amostra foi coletada no último dia de experimento. Cada linha representa a média \pm EPM, para 5-8 animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado com o grupo controle. O sinal de número denota o nível de significância quando comparado com o grupo veículo. Significativamente diferentes, ### e *** $p < 0,001$.

4.1.2. Efeito do EEMS Sobre a Atividade da MPO e NAG

Repetidas aplicações de TPA na orelha dos animais ocasionou reação inflamatória devido ao extravasamento plasmático e com intensa migração celular. Esta migração foi quantificada através da técnica colorimétrica e os leucócitos polimorfonucleares foram estimados pela atividade da enzima MPO e as células mononucleares através da atividade da enzima NAG. A múltipla aplicação de TPA gerou aumento de ambas as enzimas ao final de 9 dias e o tratamento com EEMS foi capaz de impedir esse aumento em $74,2 \pm 5,7$ % na atividade da enzima MPO (células polimormonucleares) e $47,8 \pm 2,4$ % na enzima NAG (mononucleares) (Figura 8). A dexametasona impediu em $92,8 \pm 3,4$ % e $60,0 \pm 3,4$ % o aumento da MPO e da NAG, respectivamente.

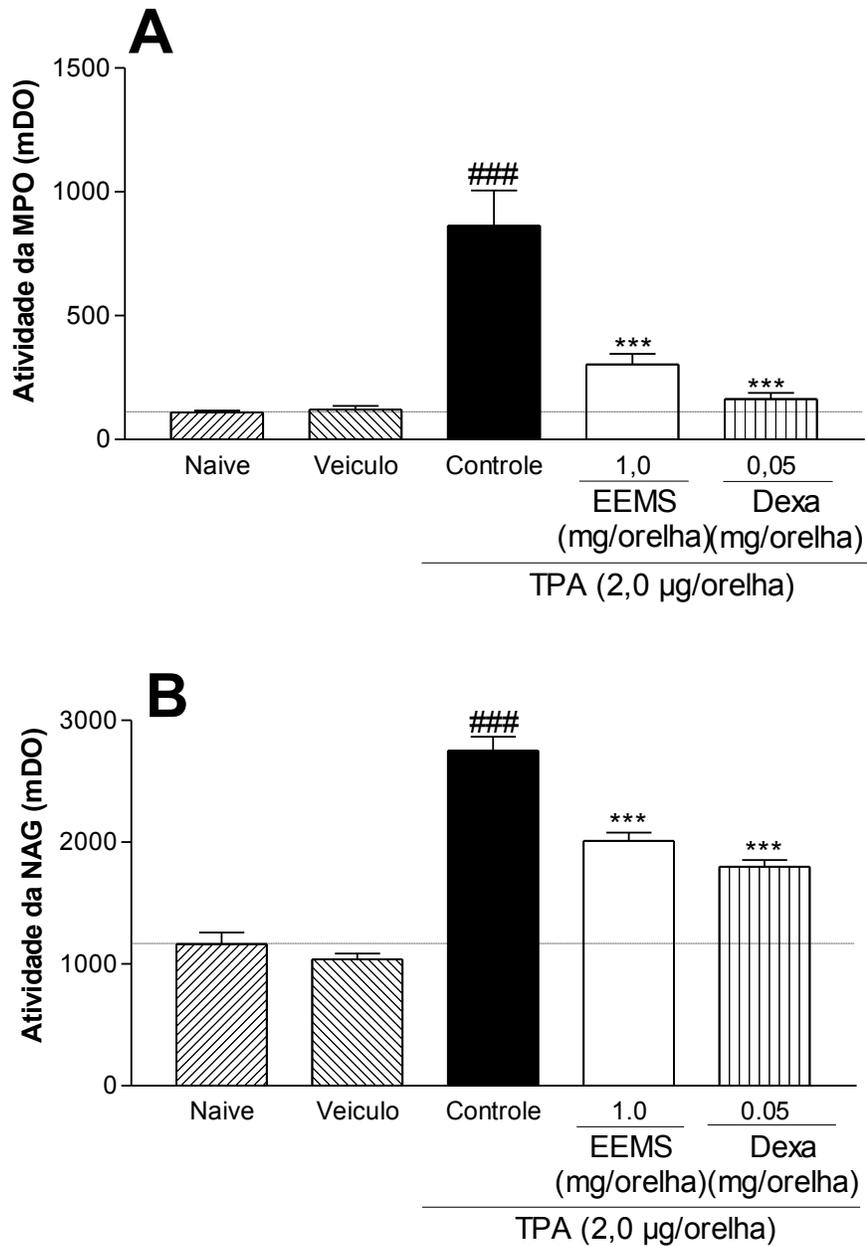


Figura 8: Efeito do EEMS e dexametasona (Dexa) sobre a atividade das enzimas MPO (A) e NAG (B) no modelo de edema de orelha induzido pela múltipla de TPA. No grupo veículo somente acetona foi administrada. Cada linha representa a média \pm EPM, para 5-8 animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle. O sinal de número denota o nível de significância quando comparado com o grupo veículo. Significativamente diferentes, # # # e *** $p < 0,001$.

4.1.3. Análise histológica e imuno-histoquímica

Análises microscópicas das orelhas no último dia de experimento revelaram intensa hiperplasia epidérmica (Figura 9) e o aumento na celularidade (Figura 10). A aplicação tópica de 1,0 mg/orelha de EEMS, bem como de 0,05 mg/orelha de dexametasona (Dexa), foram capazes de reduzir tanto a hiperplasia epidérmica como a formação do edema e a migração celular. Após o processamento histológico das amostras, foi possível avaliar a inibição da proliferação epidermal ocasionada pela múltipla aplicação do TPA, e o EEMS inibiu $59,3 \pm 7,1$ % a espessura da epiderme e a dexametasona, um corticóide conhecido, foi capaz de inibir em $65,9 \pm 4,7$ % em relação ao controle.

Cortes histológicos das orelhas submetidas ao modelo da múltipla aplicação de TPA, tratadas topicamente com 1 mg/orelha de EEMS, 0,05 mg/orelha de dexametasona, ou acetona também foram marcados com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Figura 10B, D, F, H e J e 11). Os tecidos do grupo controle (Figura 10F) mostram intensa marcação positiva para PCNA na região equivalente a epiderme causada pela aplicação múltipla de TPA. O tratamento com EEMS (Figura 10H) reduziu o número de células positivas para o PCNA, semelhante ao tratamento com dexametasona (Figura 10J), utilizado como controle positivo do experimento. Quando a imunomarcação foi quantificada, o EEMS foi capaz de reduzir a proliferação em $65,9 \pm 5,8$ % e o corticóide em $91,6 \pm 2,6$ % (Figura 11). Nos grupos Naive (Figura 10A e B) e Veículo (Figura 10C e D) observa-se um basal de marcação, pois a epiderme é um tecido em constante proliferação.

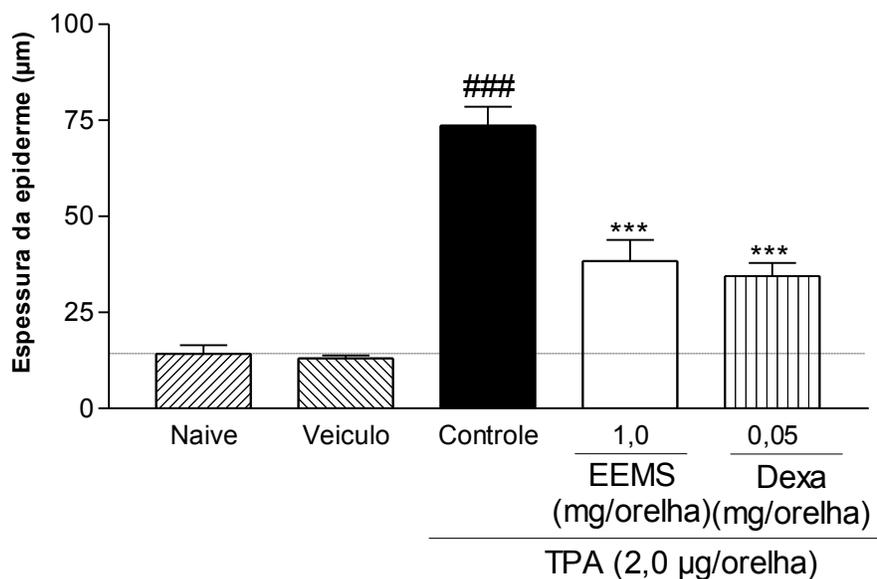


Figura 9: Ação do EEMS e da dexametasona (Dexa) sobre o aumento na espessura da epiderme causado por múltipla aplicação de TPA. A avaliação foi realizada no último dia de experimento. Os grupos correspondem aos resultados de tecidos obtidos de animais não tratados, tratados com veículo (acetona), somente TPA 2,0 µg/orelha (Controle), tratados com TPA e EEMS (1,0 mg/orelha) ou TPA e dexametasona (Dexa 0,05 mg/orelha). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle e do sinal de número denota o nível de significância de grupo controle quando comparado com o grupo veículo. Significativamente diferentes, ### e *** p<0,001.

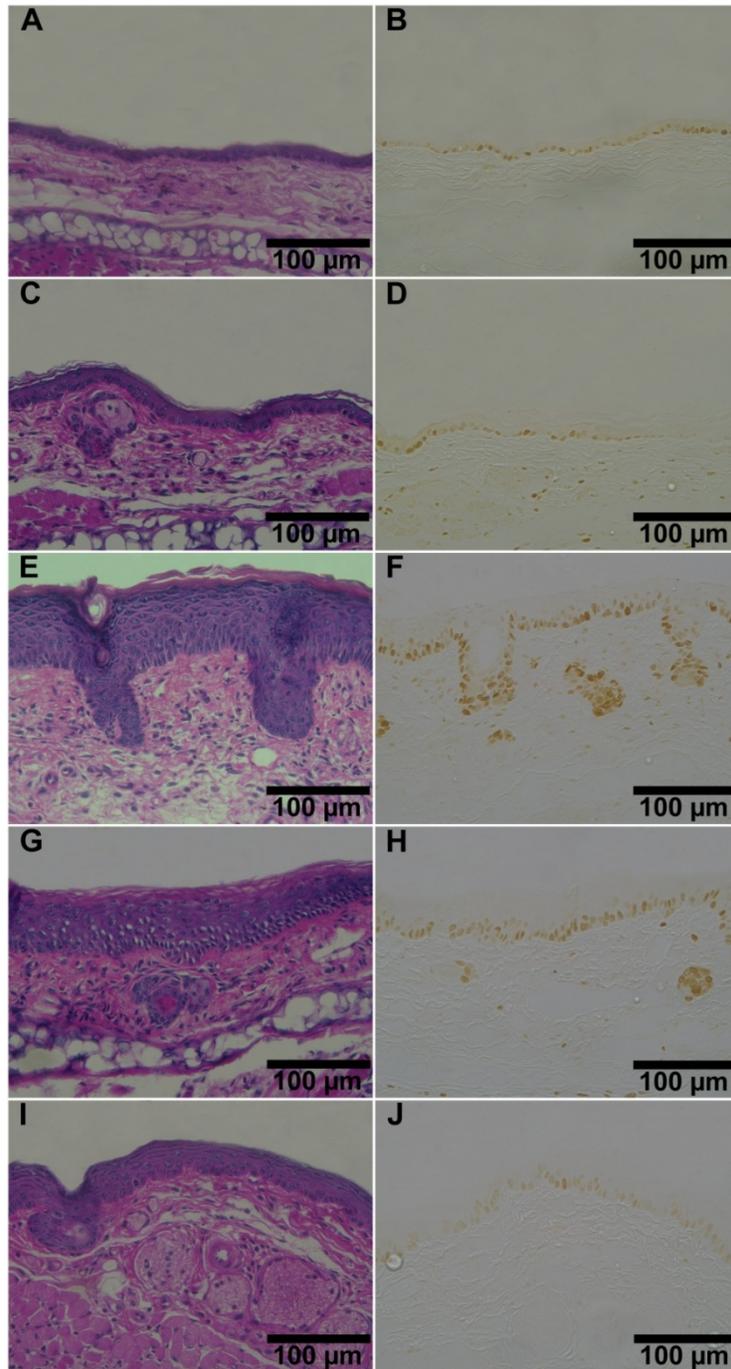


Figura 10: Cortes histológicos representativos de orelhas obtidas no último dia após múltipla aplicação de TPA, mostrando as orelhas não tratadas (naive, A e B), tratadas somente com veículo (C e D), controle (TPA, E e F), tratada com TPA e EEMS (G e H) ou TPA e dexametasona (I e J). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (A, C, E, G e I) e imunomarcados para PCNA (B, D, F, H e J) com ampliação de 400x em microscópio óptico.

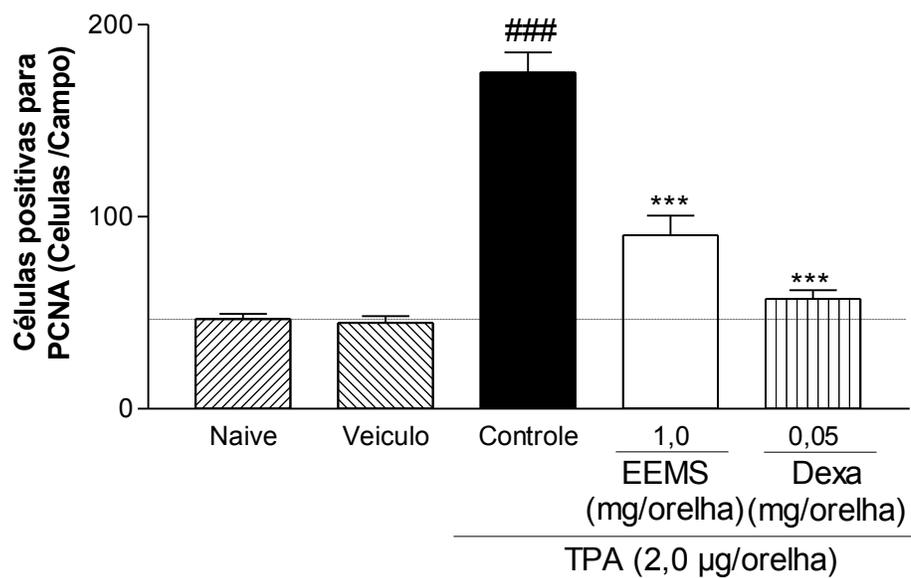


Figura 11: Quantificação da imunomarcagem para PCNA em cortes histológicos de orelhas tratadas com múltipla aplicação de TPA 2,0 µg/orelha (Controle), mais EEMS (1,0 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa 0,05 mg/orelha). O grupo Naive se refere a animais não tratados e o Veículo aos animais tratados somente com acetona. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle. O sinal de número denota o nível de significância quando comparado com o grupo veículo. Significativamente diferentes, ### e *** $p < 0,001$.

4.2. Avaliação do EEMS Sobre a Atividade Celular

4.2.1. Viabilidade Celular

Como primeira avaliação do EEMS sobre queratinócitos (HaCat) foi realizado o ensaio de viabilidade pelas metodologias de Vermelho Neutro e MTT. No teste do vermelho neutro, 24 horas após a exposição ao EEMS foi observado redução de $49,9 \pm 3,1$ % a partir da concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ na viabilidade celular, atingindo $73,1 \pm 0,9$ % na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ (Figura 12). Quando avaliado a viabilidade celular pela metodologia do MTT, verificamos redução de $35,8 \pm 5,7$ % na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ do extrato, alcançando morte total das células na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ (Figura 13). As células que não receberam tratamento nenhum foram consideradas como viabilidade de 100% (Controle). O grupo denominado Veículo recebeu meio contendo 0,1% de etanol.

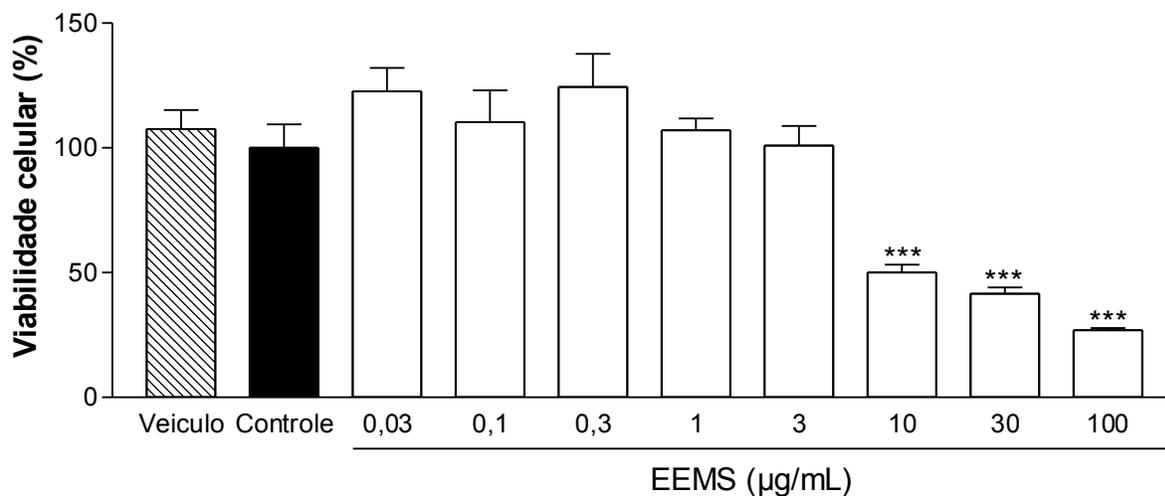


Figura 12: Efeito do EEMS sobre a viabilidade de células HaCat através do vermelho neutro. A avaliação foi feita 24 horas após a exposição ao EEMS em diferentes concentrações comparadas com as células que não foram expostas a nenhum tratamento (Controle) ou ao veículo (etanol 0,1%). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle. Significativamente diferentes, *** $p < 0,001$.

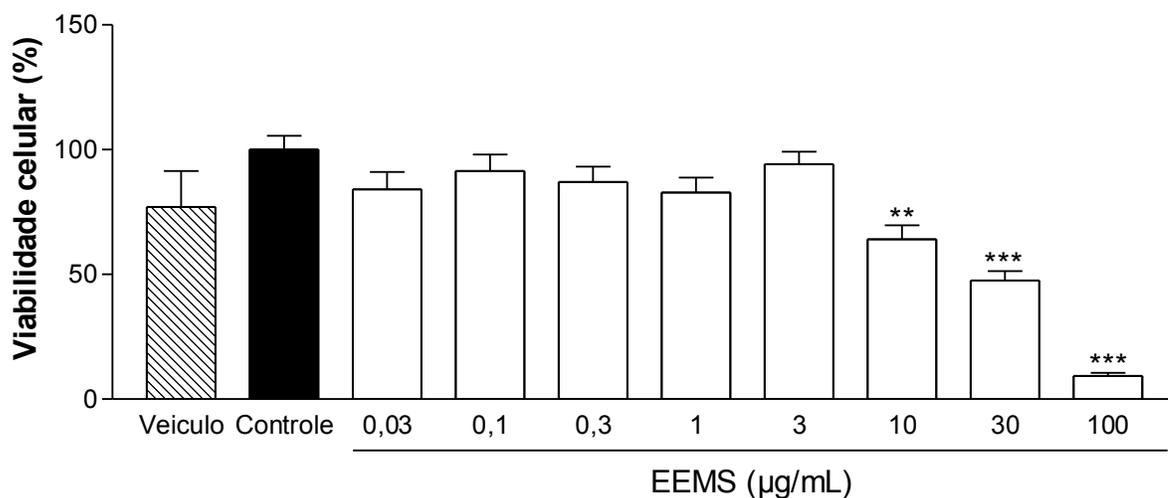


Figura 13: Avaliação do efeito da exposição de células HaCat ao EEMS sobre a viabilidade celular através do MTT. A avaliação foi feita 24 horas após a exposição ao EEMS em diferentes concentrações comparadas com as células que não foram expostas a nenhum tratamento (Controle) ou ao veículo (etanol 0,1%). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle. Significativamente diferentes, *** $p < 0,001$.

4.2.2. Avaliação da Atividade Antiproliferativa do EEMS

Para avaliar a atividade antiproliferativa do EEMS, células foram plaqueadas e mantidas em meio e estufa. Ao final de 96 horas as células foram submetidas ao protocolo de viabilidade celular pelo método de MTT. As células mantidas somente em meio foram consideradas com 100% de viabilidade denominadas de Controle. Os demais grupos receberam diferentes concentrações do EEMS (0,03-100 µg/mL) diluídos em meio de cultivo, o qual foi substituído por meio novo contendo as mesmas concentrações a cada 48 horas. Com isso, foi possível observar que ocorreu redução da proliferação celular nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL em 75,8 ± 0,9%, 79,2 ± 0,8% e 80,3 ± 2,4%, respectivamente (Figura 14). No grupo que foi realizado o tratamento apenas com o veículo (etanol 0,1%) os resultados mostram que este não interfere na proliferação celular.

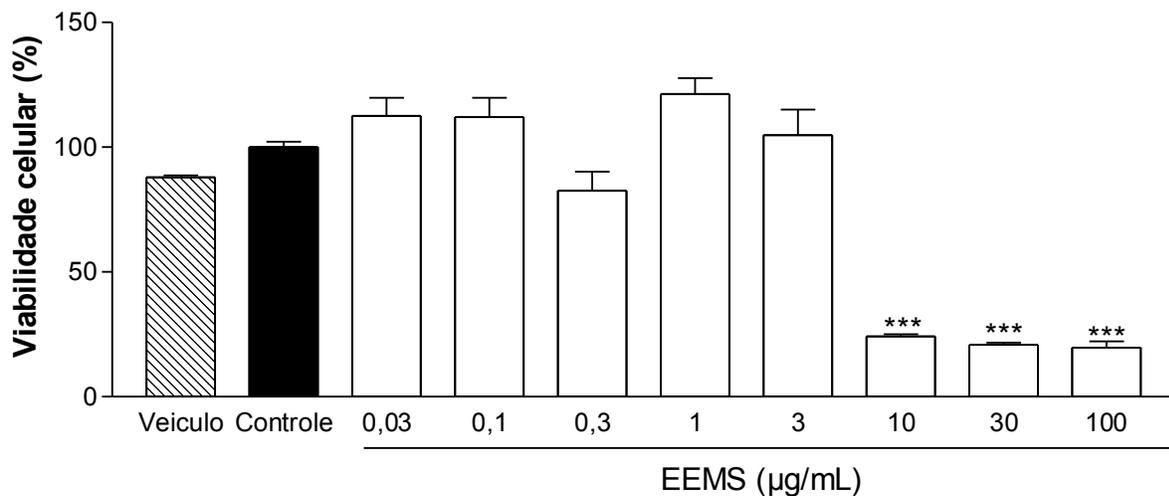


Figura 14: Efeito do EEMS sobre a proliferação celular. Células HaCat foram expostas ao EEMS por 96 h, sendo efetuado o mesmo tratamento a cada 48 horas, em diferentes concentrações comparadas com as células que não foram expostas a nenhum tratamento (Controle) ou somente ao veículo (etanol 0,1%). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle. Significativamente diferentes, *** p<0,001.

4.2.3. Avaliação do Ciclo Celular e da Apoptose

Após a realização do ensaio de proliferação celular foi possível identificar que o tratamento com o EEMS promoveu importante redução da proliferação de células HaCaT nas maiores concentrações, assim como observado na viabilidade celular. Logo, o passo seguinte foi verificar a forma como o EEMS esta causando morte celular. Após o tratamento, as células foram processadas de acordo com as especificações do fabricante e avaliadas em citômetro de fluxo utilizando uma dupla marcação com Anexina V-FITC/7-AAD. Células que se encontram em estágios iniciais de apoptose estão localizados no quadrante inferior direito do dot-plot, com a marcação positiva para a anexina V-FITC, uma vez que nesta etapa as membranas celulares ainda encontram-se intactas, não permitindo a entrada do 7-AAD. Nos estágios finais da apoptose, o 7-AAD entra na célula levando a uma dupla marcação com anexina VFITC/7-AAD, vista no quadrante superior direito do dot-plot. Células necróticas aparecem no quadrante superior esquerdo, com a marcação apenas para o 7-AAD e células viáveis são demonstradas no quadrante inferior esquerdo (Figura 15). Assim, as concentrações de 10, 30 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de EEMS causaram a morte celular por apoptose em $43,6 \pm 10,3 \%$, $48,9 \pm 10,2 \%$ e $81,3 \pm 4,8 \%$ respectivamente (Figura 16). O grupo denominado de Controle é o qual nenhum tratamento foi realizado e o grupo veículo recebeu somente meio contendo etanol 0,1%, o qual é a diluição da maior concentração do EEMS. Com tais resultados foi possível verificar que o EEMS causa morte celular por apoptose.

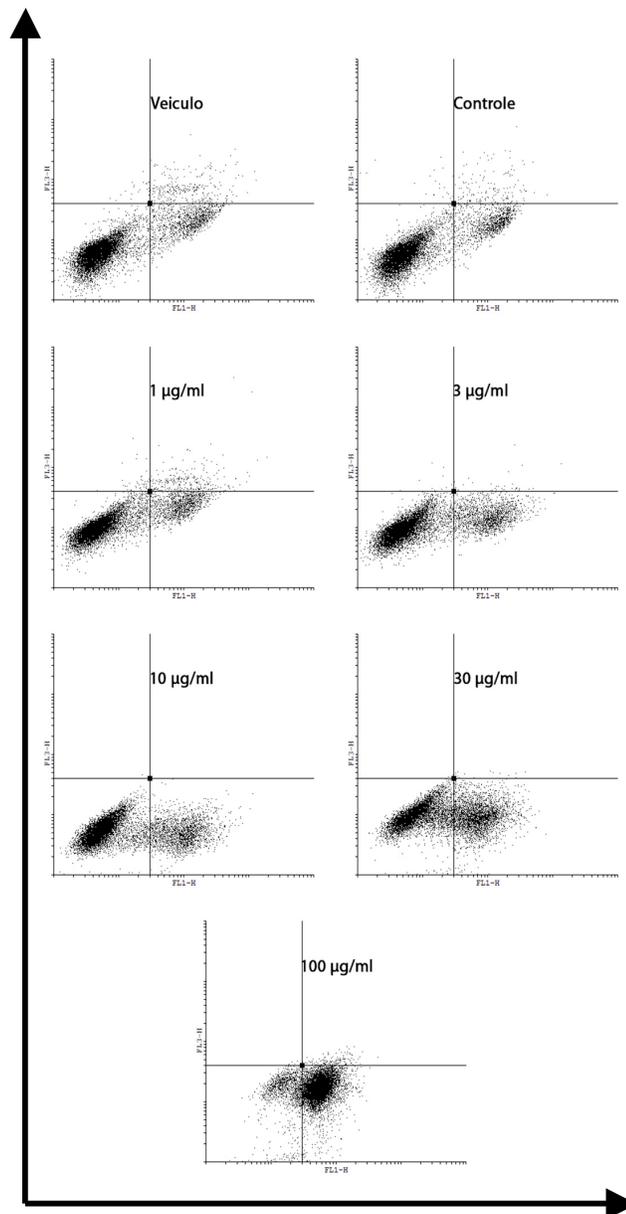


Figura 15: Dot-plots representativos da citometria de fluxo biviada entre Annexina V/7-AAD após o tratamento por 48 horas com o EEMS em diferentes concentrações comparadas com as células que não foram expostas a nenhum tratamento (Controle) ou somente ao veículo. O quadrante inferior esquerdo (Annexina V-/7-AAD-) mostra as células consideradas viáveis. O quadrante inferior direito (Annexina V+/7-AAD-) representa as células apoptóticas e o quadrante superior esquerdo (Annexina V+/7-AAD+) mostra as células necróticas.

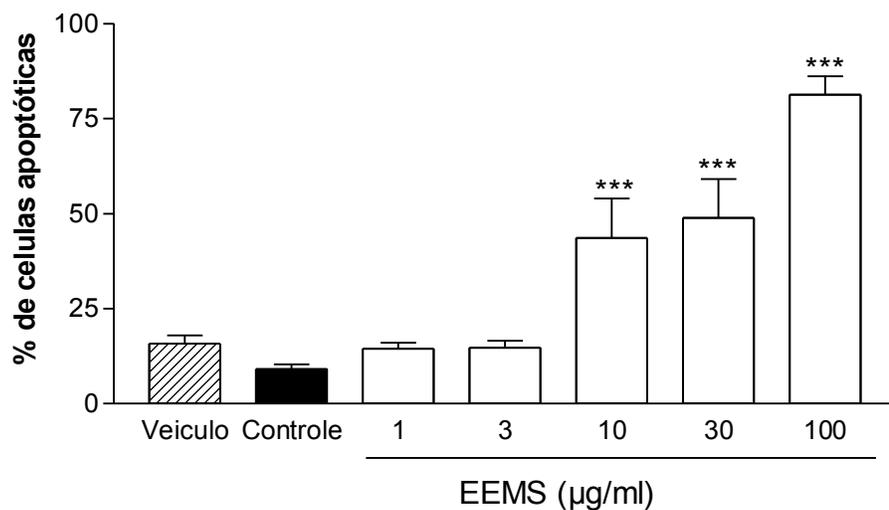


Figura 16: Avaliação do efeito do EEMS sobre a apoptose celular. O resultado foi avaliado 48 horas após a exposição do EEMS em diferentes concentrações comparadas com as células que não foram expostas a nenhum tratamento (Controle) ou somente ao veículo (etanol 0,1%). Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle. Significativamente diferentes,*** $p < 0,001$

4.3. Avaliação da Atrofia Cutânea

Para verificar possíveis efeitos colaterais provocado pela múltipla aplica de EEMS, foi realizado o modelo da atrofia cutânea. A atrofia cutânea é um efeito muito comum no tratamento crônico com os glicocorticóides e além de verificar a redução da espessura da orelha dos animais provocada pela diminuição das fibras de colágeno, também é capaz de verificar alterações em órgãos linfóides, os quais são os principais afetados pelos efeitos indesejados por drogas utilizadas para o tratamento de doenças como psoríase. Os animais receberam tratamento do EEMS (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha), além do veículo utilizado para diluir as respectivas doses (acetona). O tratamento foi realizado duas vezes ao dia em um período de sete dias, sendo que a espessura da orelha direta dos animais foi avaliada no 1º e último dia de experimento. O EEMS não foi capaz de alterar a espessura da orelha quando comparado com os animais que não receberam nenhum tipo de tratamento (Naive). No entanto, o corticóide dexametasona provocou uma redução significativa de $47,0 \pm 8,3$ μm na espessura das orelhas (Figura 17).

No último dia de experimento os animais foram eutanasiados e órgãos como timo, baço, linfonodo auricular e glândulas adrenais foram coletados e pesados para verificar se os tratamentos foram capaz de alterar esses órgãos (Figura 18). O tratamento com o EEMS não foi capaz de alterar a massa de nenhum desses órgãos quando comparado com os animais Naive. Já a dexametasona reduziu drasticamente o peso de todos os órgãos avaliados em $61,4 \pm 0,7$; $161,7 \pm 7,0$; $3,4 \pm 0,3$ e $0,7 \pm 0,2$ mg para o timo, baço, linfonodo auricular e adrenais, respectivamente (Figura 18). O veículo (acetona) não alterou nenhum parâmetro avaliado.

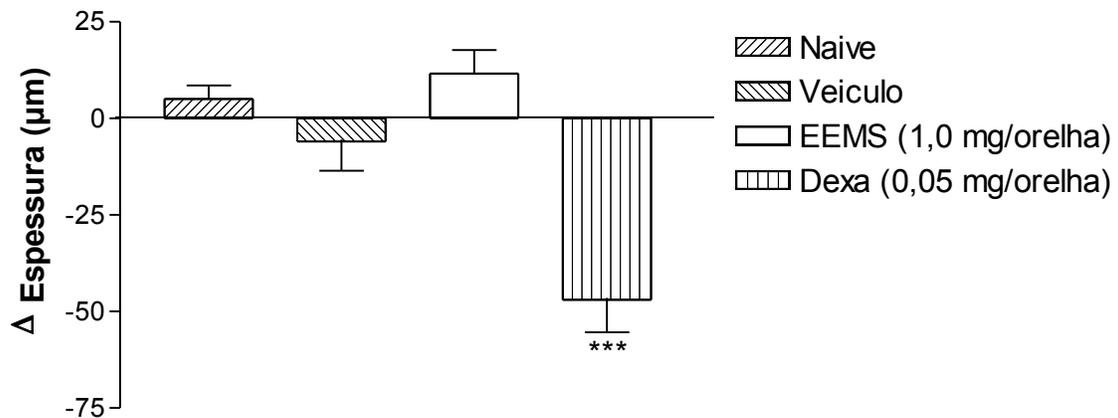


Figura 17: Efeito do EEMS e dexametasona (DEXA) sobre a espessura das orelhas no modelo da atrofia cutânea. No grupo veículo somente acetona foi administrada. A amostra foi coletada no último dia de experimento. Cada linha representa a média \pm EPM, para 6-8 animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado com o grupo controle. O sinal de número denota o nível de significância quando comparado com o grupo Naive. Significativamente diferentes, *** $p < 0,001$.

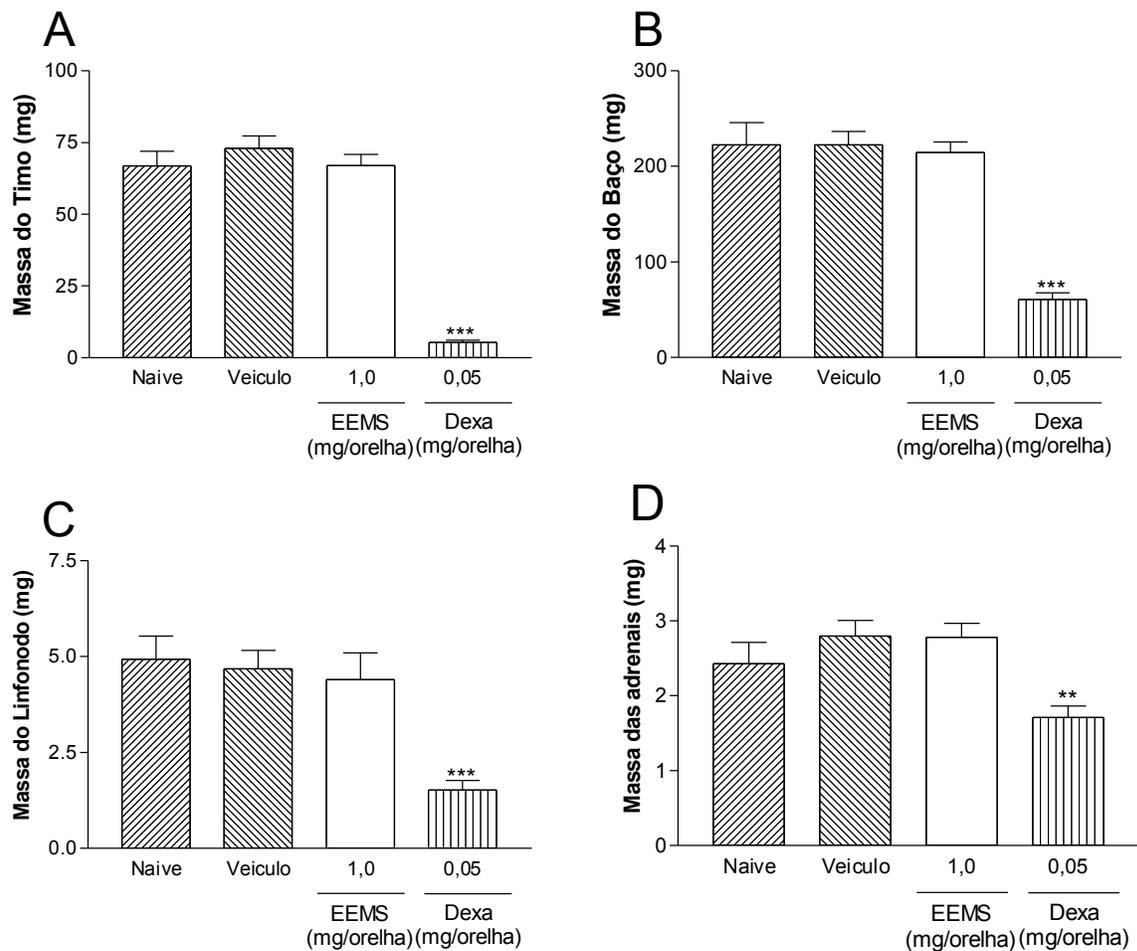


Figura 18: Efeito do EEMS e dexametasona (DEXA) sobre o peso de órgãos timo (A), baço (B), linfonodo auricular (C) e glândulas adrenais (D) no modelo da atrofia cutânea. No grupo veículo somente acetona foi administrada. A amostra foi coletada no último dia de experimento. Cada linha representa a média \pm EPM, para 6-8 animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado com o grupo controle. O sinal de número denota o nível de significância quando comparado com o grupo Naive. Significativamente diferentes, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.4. Interação do EEMS Com Receptores de Corticóides

Uma vez que o EEMS foi capaz de inibir a inflamação e a proliferação de queratinócitos semelhante a um corticóide (dexametasona), verificamos se o EEMS interage com esses receptores. Para essa avaliação dois modelos foram utilizados: o ensaio de reversão por antagonista de receptores de glicocorticóide (Figura 19) e o ensaio de ligação específica ao receptor de glicocorticóide (Figura 20). Na primeira avaliação, a administração previa do antagonista RU-486 (mifepristona, 50mg/kg, s.c.) 30 minutos antes da indução do edema pela aplicação única de TPA. A aplicação tópica do EEMS (1,0 mg/orelha) ou da dexametasona (0,05 mg/orelha) foi feita logo após o TPA. O tratamento com o EEMS foi capaz de impedir em $58,2 \pm 11,4$ % a formação do edema e o tratamento prévio com o antagonista mifepristona não reverteu o efeito do EEMS. Entretanto, o tratamento prévio com mifepristona causou reversão completa ($93,4 \pm 3,1$ %) da resposta inibitória do corticóide dexametasona sobre o edema (Figura 19). O tratamento com mifepristona ou com o veículo (PEG400) não alterou o edema causado pelo TPA.

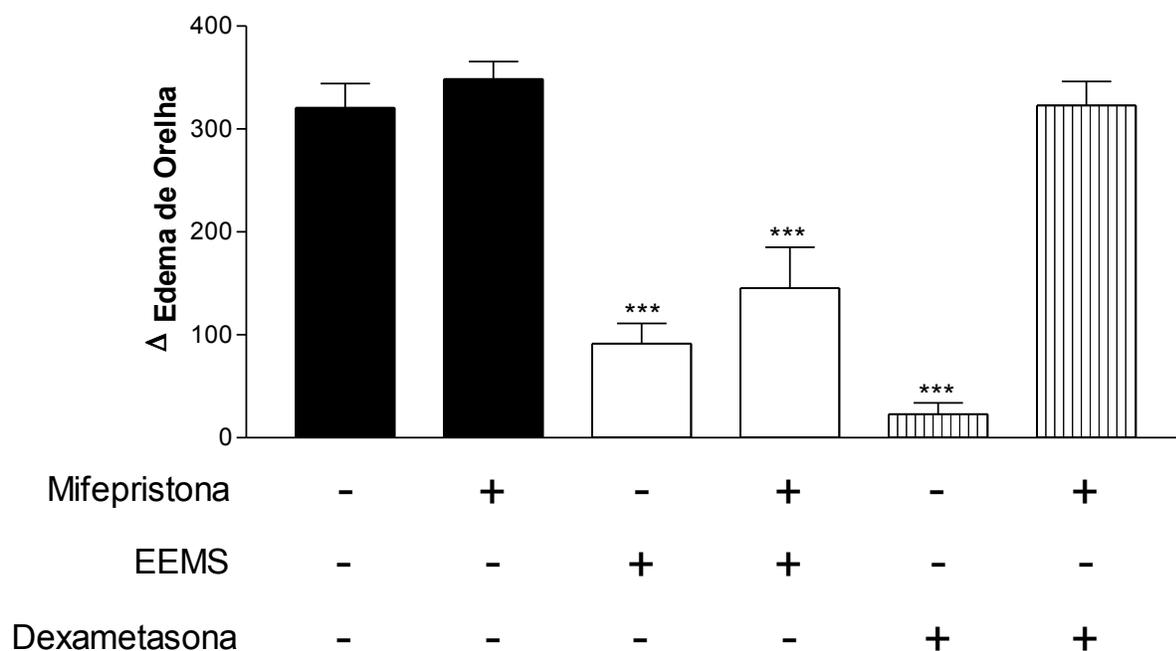


Figura 19: Efeito do EEMS (1,0 mg/orelha) e dexametasona (0,05 mg/orelha) administrado por via tópica sobre o edema da orelha induzido por TPA na presença ou ausência do antagonista RU-486 (mifepristona, 50 mg/kg, s.c.). Edema da orelha foi medido 6 horas após o tratamento com TPA. Cada linha representa a média \pm EPM, para 5-7 animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle. Significativamente diferentes, *** P <0,001

Para confirmar se de fato o EEMS não estaria se ligando ao receptor de glicocorticóide de forma direta, o ensaio de ligação específica foi realizado. A dexametasona fria (sem radioativo) foi capaz de promover deslocamento da ligação específica da $[H^3]$ dexametasona em $87,5 \pm 5,9 \%$, enquanto o EEMS em todas as concentrações testadas não interferiu na ligação da $[H^3]$ dexametasona (Figura 20).

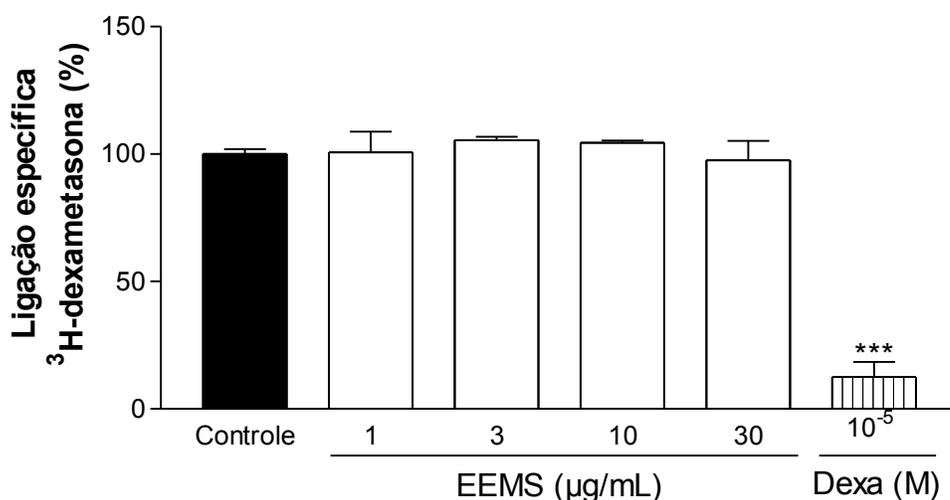


Figura20: Efeito do EEMS sobre a ligação específica 3H -dexametasona. No ensaio de ligação específica o EEMS (1-30 μ g/ml) ou a dexametasona (Dexa, 10^{-5} M) foram incubadas com as membranas obtidas de fígado de ratos na presença de 3H -dexametasona. Cada linha representa a média \pm EPM. N = 3 animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle. Significativamente diferentes, *** P <0,001.

4.5. Análise do EEMS por Cromatografia Líquida Acoplada a um Espectrômetro de Massa (LC-MS)

ESI-MS e análise por LC-ESI-MS foram realizadas pela exploração os íons representativos de padrões de malvidina 3-glucosido, quercetina e escopoletina, a fim de confirmar a presença ou ausência destes compostos no EEMS. Em primeiro lugar, as soluções de padrões foram injetadas por infusão direta na espectrometria de massa, com o objetivo de escolher o modo de ionização e concentração mais adequado para a análise destes compostos no EEMS. Análises de EEMS no modo positivo e negativo foram feitas para ajustar as condições de LC-MS. O cromatograma do EEMS foi analisado através de espectrometria de massa no mesmo tempo de retenção dos cromatogramas dos padrões com isso, foi possível observar a presença de íons *quasimolecular* $[M + H]$ nos m/z 193, m/z 303 e m/z 493, relativo a escopoletina, a quercetina e a malvidina 3-glucósido, respectivamente (Figura 21). Estes também foram confirmados nos experimento sem modo negativo, com exceção de malvidina 3-glicosídeo.

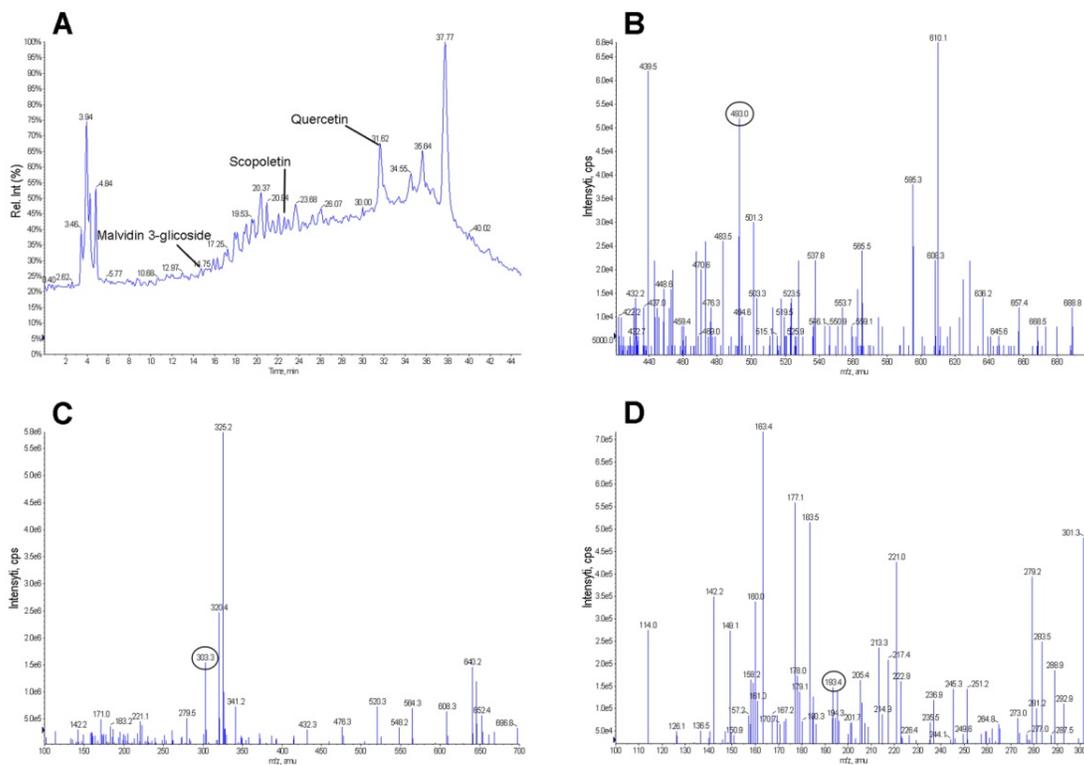


Figura 21: Análise LC-ESI-MS do EEMS, em modo positivo: **A** cromatograma do EEMS não fixo, **B** Espectro de massa extraída cromatograma do EEMS não fixado eluído em um tempo de retenção de 14,7 min (malvidina 3-glucósido), **C** espectro de massa extraído do cromatograma da EEMS não fixado, eluído em um tempo de retenção de 22,6 min (escopoletina), **D** Espectro de Massa extraído do cromatograma da EEMS não fixado, eluído em um tempo retenção de 31,7 min (quercetina).

4.6. Efeito dos Compostos Isolados do EEMS na Inflamação Aguda

Esta etapa procurou verificar se os compostos detectados no EEMS estão participando da atividade anti-inflamatória verificada anteriormente e estes resultados estão apresentados na figura 19. A aplicação tópica de TPA causou aumento na espessura da orelha quando avaliada após 6 h. O edema da orelha induzido pelo TPA foi inibido de forma dependente da dose pelo tratamento tópico com o composto malvidina 3-glucósido com valor de DI_{50} de 0,003 (0,002-0,004) $\mu\text{mol}/\text{orelha}$ e inibição de $90 \pm 3\%$ na dose de 0,2 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$ (Figura 22A). Os outros compostos (escopoletina, quercetina e malvidina 3,5-glucósido) também foram capazes de reduzir a formação de edema de forma dose dependente com um $r^2 = 0,92; 0,91$ e $0,91$ respectivamente. A escopoletina (0,5 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$) causou inibição de $39 \pm 3\%$, a quercetina (3,3 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$) reduziu $55 \pm 2\%$ e a malvidina 3,5-glucósido (0,1 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$) inibiu $28 \pm 4\%$ (Figura 22B, C e D) o edema causado pelo TPA. A dexametasona (0,05 mg/orelha), utilizada como um controle positivo, causou redução significativa do edema em todas os experimentos.

O tratamento tópico com os compostos foi capaz de inibir o aumento da atividade da MPO causada pelo TPA, e a malvidina 3-glicoside (0,2 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$), a escopoletina (0,5 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$), a quercetina (3,3 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$) e a malvidina 3,5-glucósido (0,1 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$) causaram redução de $70 \pm 5\%$, $38 \pm 10\%$, $71 \pm 5\%$ e $48 \pm 5\%$, respectivamente (Figura 23). A dexametasona (0,13 $\mu\text{mol}/\text{orelha}$), utilizado como controle positivo, também causou inibição significativa de $74 \pm 1\%$ para a atividade de MPO.

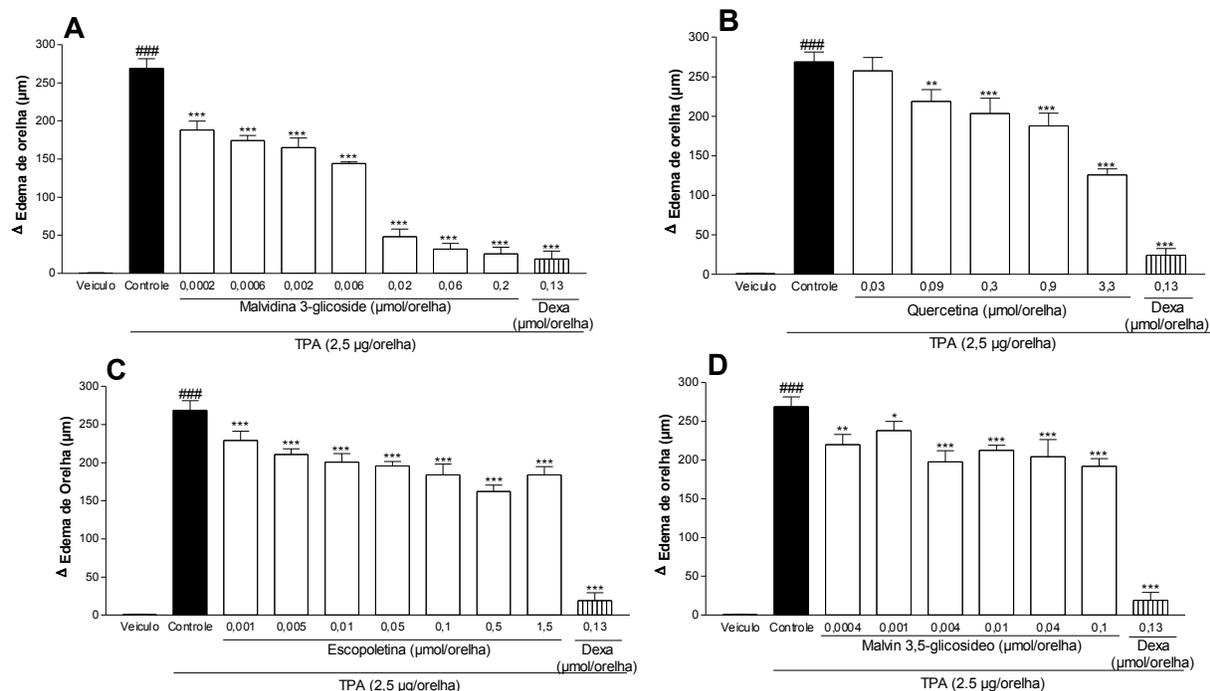


Figura 22: Efeito dos compostos malvidina 3-glicosídeo (A), a quercetina (B), escopoletina (C), malvidina 3,5-glicosídeo (D) e dexametasona (DEXA) administrado por via tópica sobre o edema da orelha induzido por TPA. Edema da orelha foi medida 6 horas após o tratamento com TPA. Cada linha representa a média \pm EPM, para 5-7 animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle e do sinal de número denotar o nível de significância de grupo controle quando comparado com o grupo veículo. Significativamente diferentes, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ### e *** $P < 0,001$.

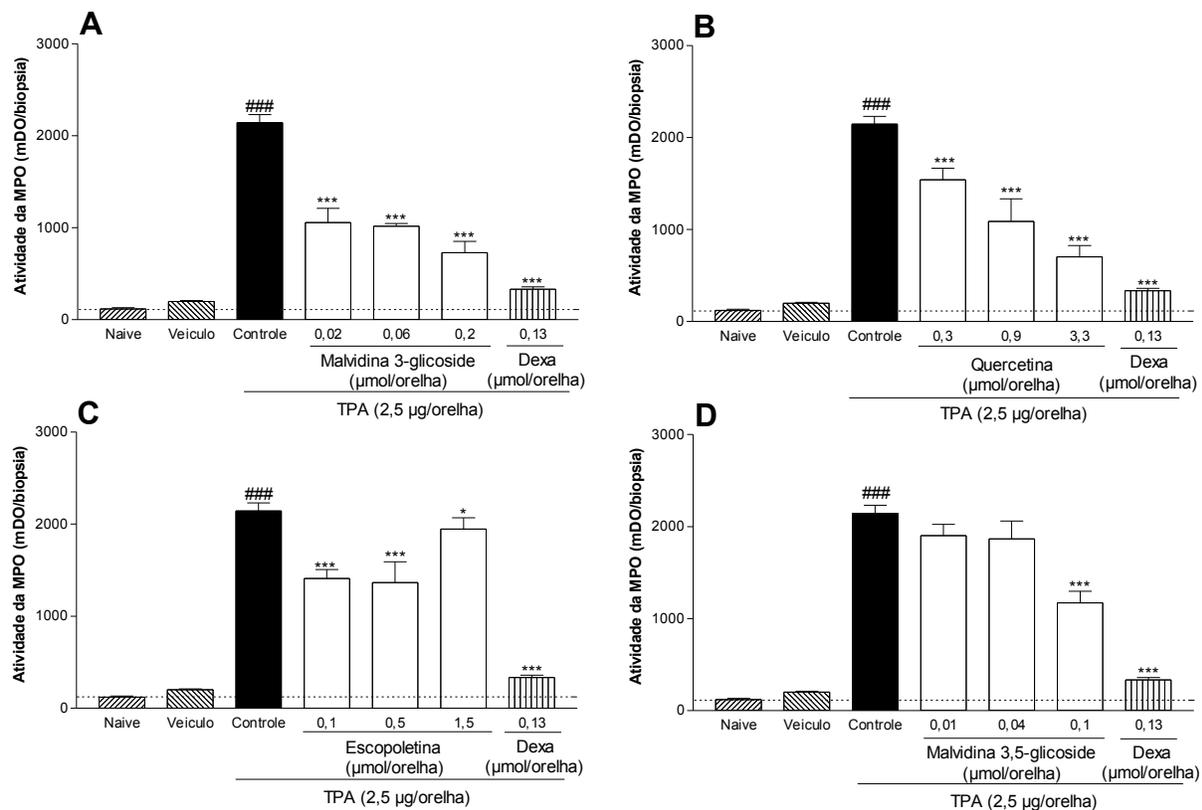


Figura 23: Efeito de malvidina 3-glicosídeo (A), a quercetina (B), escopoletina (C), malvidina 3,5-glicosídeo (D) e dexametasona (DEXA) administrado por via tópica sobre a atividade da MPO tecidual induzida pelo TPA. Atividade da MPO foi medida 24 h após tratamento com TPA. Cada linha representa a média \pm EPM, para 5-7 animais.. Os asteriscos denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle e do sinal de número denotar o nível de significância de grupo controle quando comparado com o grupo veículo. Significativamente diferentes, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, # # # e *** $P < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

Os queratinócitos representam a principal fonte de citocinas e da epiderme alvo da ação de citocinas. Fatores de crescimento de queratinócitos derivados e citocinas regulam as respostas imunes e inflamatória e desempenham papéis importantes na pele em condições patológicas (Shirakata, 2010). No presente trabalho foi avaliado o efeito do EEMS no processo hiperproliferativo de queratinócitos epidérmicos por métodos *in vivo* e *in vitro* devido a processos inflamatórios a fim de comprovar os efeitos observados anteriormente por Prudente (2010, dissertação).

A aplicação múltipla de TPA é um modelo que promove hiperproliferação da epiderme e alteração da diferenciação, com o surgimento de acantoses e intensa migração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, se assemelhando muito com patologias como a psoríase (Gabor, 2003; Stanley et al., 1991). No decorrer do estudo podemos observar a interferência do EEMS nestas variáveis dependentes, justificando a continuação do estudo. Este modelo é uma ferramenta viável para avaliar a resposta de compostos anti-inflamatórios e antiproliferativos em um processo inflamatório crônico da pele, caracterizado por um aumento na massa do tecido (orelhas), grande infiltração de leucócitos e hiperproliferação epidérmica (aumento na medida da epiderme com o desenvolvimento da acantose).

O TPA é um ativador da proteína quinase do tipo C (PKC), e desencadeia a ativação de proteínas quinases ativadoras de mitose (MAPKs), as quais fosforilam fatores de transcrição nuclear como NF- κ B e AP-1 promovendo a liberação de diversas

proteínas pró-inflamatórias, como citocinas (IL-1 e TNF- α), quimiocinas (IL-8 e MIP-1 β), moléculas de adesão (ICAM, VCAM e E-selectina), enzimas (iNOS e COX-2), entre outros (Calixto et al., 2004; Kolch, 2005; Pickart, 2004). A sua aplicação de forma repetida é considerada um método válido para avaliação de compostos com potencial anti-inflamatório e também de compostos com potenciais antiproliferativos, pois tem capacidade de promover uma hiperplasia epidérmica com uma intensa proliferação dos queratinócitos com aumento de fator transformante de membrana do tipo beta 1 (TGF- β 1) e leucotrieno B₄. Este, por sua vez, causa um aumento na permeabilidade vascular facilitando o influxo de neutrófilos (Murakawa et al., 2006). Outra vantagem da utilização deste modelo é que o tratamento se inicia em com um processo inflamatório já estabelecido. Nossos resultados mostraram que o EEMS foi eficaz em diminuir diversos parâmetros, como edema. Esse efeito do extrato foi significativo a partir do primeiro dia de tratamento e foi aumentado no decorrer do tratamento, de modo semelhante ao efeito do corticoide dexametasona, usado como droga de referência.

De modo importante, o tratamento com o EEMS não reduziu apenas o edema causado pela múltipla aplicação de TPA, mas também a migração celular, tanto de polimorfonucleares quanto mononucleares, avaliadas pela atividade enzimática da MPO e NAG, respectivamente. A migração leucocitária é um importante parâmetro inflamatório comum inclusive na psoríase, o que favorece a escolha do modelo (Calixto et al., 2004; Sanchez & Moreno, 1999).

Nosso grupo demonstrou anteriormente que o extrato de *M. sylvestris* é capaz de inibir a inflamação aguda promovida pelo TPA quando tratado de forma tópica com a redução da formação de edema, da atividade da enzima MPO, assim como a citocina

pró-inflamatória IL-1 β (Prudente, 2010). Esta é uma citocina responsável por iniciar o processo de proliferação dos queratinócitos, sendo este estado patológico mantido por outras citocinas, como IL-4, IL-6 e IL-8 (Gniadecki, 1998).

Somado a isso, DellaGreca e colaboradores (2009) comprovou a atividade antioxidante da *M. sylvestris* (DellaGreca et al., 2009). Esta atividade é de extrema importância, pois a migração celular e processo hiperproliferativo provocado pela múltipla aplicação de TPA geram de forma exacerbada ânions superóxido e outros radicais livres, favorecendo o processo inflamatório. O fato do EEMS reduzir a proliferação celular e a migração de células no local, mesmo que em um processo inflamatório já estabelecido (dados obtidos no presente trabalho) e a comprovação da sua atividade antioxidante observada por DellaGreca e colaboradores (2009) enfatiza a comprovação do efeito anti-inflamatório e anti hiperproliferativo do EEMS.

Juntamente com a migração leucocitária e a ativação de proteínas quinases também ocasionados pela múltipla aplicação de TPA (Stanley et al., 1991), diversos processos patológicos são desencadeados, como a hiperproliferação dos queratinócitos e uma diferenciação incompleta, evidenciado pela presença de células da camada córnea nucleadas, devido à sinalização de cascatas de proteínas quinases e por com uma fosforilação de NF-KB e AP-1 (Ravindran et al., 2009).

A fosforilação do NF-KB está ligada a expressão de genes que mantêm a proliferação celular e/ou proteção celular através da regulação de várias vias de sinalização celular, incluindo vias de proliferação celular (ciclina D1, c-myc), de sobrevivência (Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP, XIAP, c-IAP1), ativação de caspases (caspase-8,

3, 9), supressão de tumor (p53, p21) e de proteínas quinases (JNK, Akt e MAPK). Juntamente com o fator de transcrição ativado é o AP-1, que regula a expressão de genes em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo citocinas, fatores de crescimento, stress e infecções bacterianas e virais, controlam certo número de processos celulares como a diferenciação, proliferação e apoptose (Ravindran et al., 2009), nos permitindo a especular que o EEMS possa estar interferindo nesta resposta celular.

O tratamento repetido com o EEMS também se mostrou eficaz ao reduzir a proliferação de queratinócitos causada pela múltipla aplicação de TPA, visto através das análises histológicas e confirmados pela medida da espessura epidérmica. Estes resultados confirmam a presença das respostas hiperproliferativas pelo modelo e a redução pelo tratamento com a malva. Para melhor demonstrar este efeito do EEMS no processo de proliferação dos queratinócitos epidermais foi feita a imunomarcacão para a proteína PCNA. Esta é uma proteína nuclear, necessária para a síntese de DNA em células eucariotas. A sua síntese e expressão está relacionada com o estado de proliferação de células e do seu nível de expressão que reflete a atividade de proliferação de células de tumor e pré-cancerosas. A expressão de PCNA aumenta durante a fase G1, atinge um pico de expressão na fase S e declina durante as fases G2/M do ciclo celular. Estas características são analisadas por imunocoloração e permite a identificação de células nas diferentes fases do ciclo. O PCNA tem sido amplamente utilizado para a pesquisa básica e como uma ferramenta de prognóstico em patologia cirúrgica (Gambichler et al., 2008).

Os marcadores de proliferação mais utilizados incluem o Ki-67 e o PCNA. A expressão do antígeno Ki-67 é restrito a frações que proliferam, mas este desaparece rapidamente quando as células entram num estado de repouso. A proteína Ki-67 também apresenta alta imunopositividade nas doenças inflamatórias, mesmo na ausência em células malignas, sendo difícil a distinção entre micoses precoces e dermatoses inflamatórias crônicas (Brown & Gatter, 2002).

Semelhante ao Ki-67, o PCNA tem sido utilizado como um parâmetro laboratorial para correlacionar processos proliferativos com fases clínicas de doenças. No entanto, a detecção de células em proliferação por PCNA tem sido questionado devido os níveis detectáveis de PCNA consistentes que podem variar significativamente entre os diferentes tipos de células, entre as células no estado maligno versus normal em caso de tumores e dependendo dos agentes fixadores e soluções de recuperação de antígenos utilizados (Muskhelishvili et al., 2003).

Uma vez que as lesões psoriáticas são placas cobertas com escamas geradas pela hiperproliferação e diferenciação desordenada dos queratinócitos epidérmicos (Wolf et al., 2012), a eficácia do tratamento com EEMS em reduzir estes parâmetros sugere um uso potencial para o tratamento de doenças da pele, tais como psoríase e dermatite seborréica. Nossos resultados mostram a atividade antiproliferativa do EEMS. O fato deste apresentar eficácia semelhante ao corticóide usado como controle positivo (dexametasona), levou-nos a pensar se este extrato poderia interagir com receptores para glicocorticóides. Não é incomum encontrar extratos e compostos de plantas que possuem afinidade por receptores de glicocorticóides e efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos (Horinouchi et al., 2013).

Duas metodologias foram aplicadas para verificar esta possível interação do EEMS, a utilização de antagonista farmacológico (mifepristona) *in vivo* e o ensaio de ligação específica *in vitro*. Nas duas metodologias verificamos que o extrato não interage com o receptor glicocorticóide, excluindo este mecanismo da sua ação. Adicionado a estes dados, em trabalho anterior foi testado o mesmo extrato no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico, o qual foi possível observar uma inibição significativa por parte deste extrato (Prudente, 2010). Gabor (2000) mostrou que os corticóides, de modo geral, não são capazes de impedir a formação do edema induzido por ácido araquidônico (Gabor, 2000). A maioria dos efeitos dos glicocorticóides é mediado via receptores de glicocorticóides (GR), um membro amplamente expresso da superfamília de receptores nucleares. Após a ligação, a expressão do gene altera GR através de diversos modos de ação, incluindo a sua ligação como dímeros a elementos glicocorticóides responsivos (GRE) presentes no promotor de genes sensíveis a hormônios e interação do receptor monomérica, como fatores de transcrição de DNA ligados tais como o NF-kB, AP-1, IRF-3, ou STAT5. Acredita-se, que a supressão destes fatores de transcrição, em parte, são a base dos efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticóides. A dimerização do GR é a hipótese que contribui para os efeitos colaterais (Rauch et al., 2010).

Os resultados obtidos com o EEMS mostrando que não interagem com os GRs e confirmam a hipótese levantada anteriormente (Prudente, 2010) de que seu efeito independe dos GRs, mesmo que apresentem efeitos anti-inflamatórios semelhantes. Porém, estudos demonstram novas perspectivas sobre os mecanismos moleculares que promovem os efeitos anti-inflamatório mediados por corticóides e conduziram à

hipótese de que os efeitos terapêuticos são mediados, em larga escala, através de um processo de transrepressão de genes inflamatórios, enquanto os efeitos secundários são predominantemente mediados por transativação (Schacke et al., 2004).

Outra questão levantada com base na semelhança de efeito do EEMS com o controle positivo dexametasona, é quanto às reações adversas. O EEMS compartilha dos mesmos efeitos indesejáveis dos corticóides, tais como a diminuição da espessura da epiderme causada, pela aplicação local repetida, alteração de órgãos linfóides como atrofia do timo, baço e linfonodos, assim como a redução das supra-renais (Schoepe et al., 2010). O EEMS não apresentou este tipo de efeito colateral, destacando mais uma vantagem da sua utilização.

Após a confirmação que o EEMS foi capaz de reduzir a hiperproliferação de queratinócitos *in vivo*, comprovado por histologia e por imunohistoquímica, e que esse efeito é independente de receptores glicocorticóides, nós utilizamos uma linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) na tentativa de verificar de que modo este efeito antiproliferativo do EEMS acontece.

De acordo com Li e colaboradores (2010), antocianinas glicosiladas como a malvidina 3-glicosilada encontrada no EEMS, são citotóxicas para linhagem celular tumorigênica, diferente de linhagens não tumorais. A redução observada na viabilidade celular tanto no ensaio de MTT e VN nas maiores concentrações do extrato nos dá indícios de que este efeito deve estar ligado a alterações no ciclo celular (Li et al., 2009). Com a diminuição da viabilidade celular observada *in vitro* e a redução da proliferação de queratinócitos em modelos *in vivo*, fomos verificar se na cultura de

queratinócitos humanos de linhagem não tumorigênica esta proliferação também era reduzida. Com os resultados obtidos pudemos comprovar que, de fato, o EEMS reduz a proliferação celular com ação direta em queratinócitos.

Liu e colaboradores (2010) observaram que antocianidinas glicosiladas são capazes de alterar o ciclo celular favorecendo a apoptose celular. O ciclo celular é caracterizado por um conjunto de eventos irreversíveis e ordenados, que tem como objetivo a divisão celular (Liu et al., 2010; Malumbres & Barbacid, 2001). A regulação do ciclo celular tem um papel importante na manutenção da integridade celular e a desregulação deste pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças hiperproliferativas, dentre elas, a psoríase (Collins et al., 1997; Sherr, 1996). Logo, o controle do ciclo celular permite o controle da proliferação dos queratinócitos, mantendo um balanço da homeostase da epiderme. O conhecimento da regulação do ciclo celular permite-nos explorar a fisiopatologia de diversas doenças cutâneas, inclusive pesquisar novas alternativas terapêuticas para o tratamento destas.

Através do ensaio de proliferação por MTT, compostos de planta também inibem a proliferação de células HaCaT, e por ensaio de ciclo celular, aumenta a população de queratinócitos HaCaT na fase sub-G1 do ciclo, concluindo por meio do ensaio de apoptose que as células presentes na fase sub-G1 eram células apoptóticas e que o processo pelo qual as células entraram em apoptose incluem a apoptose extrínseca (receptor de morte) e intrínseca (rompimento mitocondrial) (Zhou et al., 2011). Diversos estudos mostram que antocianidinas glicosiladas e triterpenóides, induzem apoptose em diversos tipos de células cancerígenas e não cancerígenas em cultura (Li & Begovich, 2009; Petronelli et al., 2009). O extrato etanólico de uma Rubiaceae

(*Radixrubiae*), comumente utilizada na medicina chinesa para o tratamento de psoríase tem sua atividade antiproliferativa comprovada por apoptose celular e este evento ocorre por meio de ativação da caspase-3 (Tse et al., 2007). Os resultados observados no presente trabalho indicam que o EEMS também tem sua atividade antiproliferativa por causar apoptose celular.

A redução da proliferação obtida no modelo de múltipla aplicação de TPA também foi observada no ensaio de proliferação *in vitro* e confirmada pelo ensaio de ciclo celular e apoptose. Contudo, Hsiao e colaboradores (2009) demonstraram que a diminuição na expressão das ciclinas A e E, de quinases dependentes de ciclina2 (CDK2) e um aumento na expressão dos inibidores de quinase dependente de ciclina, p21 e p27, impedem a progressão das células no ciclo celular e induzem a morte celular por apoptose, diminuindo, conseqüentemente, a proliferação celular (Hsiao et al., 2009). Em outro estudo, extratos de plantas pararam o ciclo celular acompanhado por diminuição das proteínas Cdk2 e ciclina A, ocasionando apoptose de forma dependente da concentração devido a ativação das vias de caspases (Li et al., 2012). Lin e colaboradores (2009) comprovaram a atividade antiproliferativa de *Indigo naturalis* em queratinócitos primários. A indirubina, um composto isolado, regula a expressão gênica do PCNA e de involucrina, concluindo que a atividade antipsoriática observada, resulta, ao menos em parte, na inibição da proliferação e na promoção da diferenciação em queratinócitos humanos (Lin et al., 2009).

Desta maneira podemos afirmar que o EEMS tem atividade antiproliferativa, em parte por induzir apoptose nos queratinócitos epidérmicos, provavelmente por indução de caspases e proteínas ligadas a diferenciação celular. Além desse efeito, a aplicação

tópica do EEMS impede a migração de células inflamatórias e diminui a liberação de citocinas inflamatórias como IL-1 β (Prudente et al., 2013). Esses efeitos em conjunto se tornam alvos de grande interesse para o tratamento da psoríase.

Uma vez que o EEMS se mostrou eficaz na sua atividade antiproliferativa a identificação do seu principal ativo se faz necessário. As análises fitoquímicas do EEMS mostraram a presença de malvidina 3-glucosido, quercetina e escopoletina. Embora o método de LC-ESI-MS não foi submetido para a identificação estrutural completa dos constituintes químicos, ainda tem o mérito de ser um método simples e direto para a identificação rápida de antocianinas, flavonóides e cumarinas. Ele elimina procedimentos fastidiosos de separação e purificação e fornece informações suficientes para confirmação de compostos conhecidos e, pelo menos, para a tentativa de identificação de compostos desconhecidos pelo tempo de retenção, peso molecular e os fragmentos de íons característicos de compostos conhecidos. Portanto, este método é útil para as amostras que contêm certos constituintes químicos conhecidos, tais como as antocianinas, cumarinas e flavonóis, como no caso da *M. sylvestris*.

Quando os compostos detectados foram testados isoladamente no modelo de inflamação da pele através da aplicação tópica de TPA, a malvidina 3-glucosido, quercetina e escopoletina foram capazes de interferir com a formação do edema e com a atividade da MPO. Outro composto conhecido de *M. sylvestris*, malvidina 3,5-glicosídeo, também foi testado e também apresentou efeito sobre o edema e MPO, porém menos eficiente que os compostos anteriormente testados. Entre eles, malvidina 3-glucósido mostra ter atividade tópica muito potente, o que sugere que deve ser um dos responsáveis principais pelo efeito anti-inflamatório do EEMS. Além disso, estes

resultados sugerem que muitos compostos do EEMS fazem parte da sua eficácia anti-inflamatória tópica. Assim, torna necessária uma completa caracterização da composição química do extrato e/ou estudo de frações isoladas a partir do extrato bruto.

A literatura tem relacionado o isolamento e identificação de várias classes de metabólitos da *M. sylvestris* com ação anti-inflamatória comprovada (Wichtl, 2004). Metabólitos pertencentes à classe das antocianinas são conhecidos como agentes anti-inflamatórios, incluindo o marcador químico da *M. sylvestris*, a antocianina malvidina 3-glucósido (Gasparetto et al., 2012; Prudente et al., 2013), que provoca a inibição da liberação de IL-6 em cultura de esplenócitos (Lin et al., 2008). A escopoletina é capaz de interferir com a produção de citocinas inflamatórias por inibir a cascata do I κ B/NF- κ B em mastócitos humanos (Moon et al., 2007), enquanto que o flavonóide quercetina mostrar-se importante na redução do edema, nódulos e anquilose num modelo experimental de artrite em ratos (Guardia et al., 2001). Na verdade, Dreiseitl et al. (2009) revelam que uma antocianina (malvidina), também presente no extrato de *M. sylvestris* (Gasparetto et al., 2012), é capaz de inibir a atividade da fosfolipase A2, um fator importante em condições inflamatórias (Dreiseitel et al., 2009). Recentemente, DellaGreca e colaboradores. (2009) descreveram o efeito antioxidante e sequestrador de radicais para o extrato aquoso de *M. sylvestris* e onze compostos purificados a partir da fração de acetato de etila. Estes diversos mecanismos podem contribuir para a eficácia anti-inflamatória do extrato testado. Chunget al. (2001) relataram que a formação do edema no modelo TPA pode também ser regulada pela geração de H₂O₂,

como evidenciado pela atividade anti-inflamatória de vários compostos antioxidantes contra a inflamação induzida por TPA (Chung et al., 2001).

6. CONCLUSÕES

As avaliações realizadas no presente estudo foram capazes de demonstrar que a utilização do EEMS é capaz de:

Reduzir o processo inflamatório, por meio da inibição da migração celular e impedir a proliferação exacerbada provocada pela múltipla aplicação de TPA;

O EEMS quando utilizado de forma tópica não é capaz de promover toxicidade sistêmica;

Identificar que seu mecanismo de ação independe de receptores de glicocorticóides;

Demonstrar seu perfil fitoquímico através de análises cromatográficas;

Provar que dos metabolitos ativos presentes no EEMS, a mavidina 3-glicosilada é um de seus metabolitos secundários mais ativos;

Comprovar que, além de ser um excelente anti-inflamatório, também é capaz de reduzir a proliferação celular através da indução de apoptose.

Contudo, o EEMS se mostrou eficaz para utilização como um anti-psoriático, uma vez que é capaz de impedir a proliferação dos queratinócitos *in vitro* e *in vivo*, além de reduzir o processo inflamatório e de possuir um mecanismo diferente dos glicocorticóides, favorece a diminuição de efeitos colaterais e por se tratar de um produto natural, pode aumentar a aceitação pelo paciente melhorando sua qualidade

de vida. Este estudo reforça as conclusões obtidas anteriormente pelo autor e evidenciando o seu uso etnofarmacológico.

7. REFERÊNCIAS

Abdou, A.G., Maraee, A.H., Eltahmoudy, M., El-Aziz, R.A., 2013. Immunohistochemical Expression of GLUT-1 and Ki-67 in Chronic Plaque Psoriasis. *The American Journal of dermatopathology*.

Athar, M., An, K.P., Tang, X., Morel, K.D., Kim, A.L., Kopelovich, L., Bickers, D.R., 2004. Photoprotective effects of sulindac against ultraviolet B-induced phototoxicity in the skin of SKH-1 hairless mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 195, 370-378.

Basavaraj, K.H., Navya, M.A., Rashmi, R., 2011. Stress and quality of life in psoriasis: an update. *Int J Dermatol* 50, 783-792.

Bowcock, A.M., Krueger, J.G., 2005. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nature reviews. Immunology* 5, 699-711.

Boyman, O., Hefti, H.P., Conrad, C., Nickoloff, B.J., Suter, M., Nestle, F.O., 2004. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J Exp Med* 199, 731-736.

Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78, 206-209.

Brown, D.C., Gatter, K.C., 2002. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40, 2-11.

Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 33, 179-189.

Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R., 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70, 93-103.

Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 328-340.

Chan, K.S., Sano, S., Kiguchi, K., Anders, J., Komazawa, N., Takeda, J., DiGiovanni, J., 2004. Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J Clin Invest* 114, 720-728.

Choi, J., Koo, J.Y., 2003. Quality of life issues in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 49, S57-61.

Christensen, T.E., Callis, K.P., Papenfuss, J., Hoffman, M.S., Hansen, C.B., Wong, B., Panko, J.M., Krueger, G.G., 2006. Observations of psoriasis in the absence of therapeutic intervention identifies two unappreciated morphologic variants, thin-plaque and thick-plaque psoriasis, and their associated phenotypes. *J Invest Dermatol* 126, 2397-2403.

Chung, W.Y., Jung, Y.J., Surh, Y.J., Lee, S.S., Park, K.K., 2001. Antioxidative and antitumor promoting effects of [6]-paradol and its homologs. *Mutat Res* 496, 199-206.

Chuong, C.M., Nickoloff, B.J., Elias, P.M., Goldsmith, L.A., Macher, E., Maderson, P.A., Sundberg, J.P., Tagami, H., Plonka, P.M., Thestrup-Pederson, K., Bernard, B.A., Schroder, J.M., Dotto, P., Chang, C.M., Williams, M.L., Feingold, K.R., King, L.E., Kligman, A.M., Rees, J.L., Christophers, E., 2002. What is the 'true' function of skin? *Exp Dermatol* 11, 159-187.

Collins, K., Jacks, T., Pavletich, N.P., 1997. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2776-2778.

Costa, A.F., 2002. *Farmacognosia*, Lisboa.

Cutillo, F., D'Abrosca, B., Dellagreca, M., Fiorentino, A., Zarrelli, A., 2006. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. *Phytochemistry* 67, 481-485.

Das, R.P., Jain, A.K., Ramesh, V., 2009. Current concepts in the pathogenesis of psoriasis. *Indian journal of dermatology* 54, 7-12.

De Vry, C.G., Valdez, M., Lazarov, M., Muhr, E., Buelow, R., Fong, T., Iyer, S., 2005. Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model. *J Invest Dermatol* 125, 473-481.

De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.J., Young, J.M., 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26, 335-341.

Debenedictis, C., Joubert, S., Zhang, G., Barria, M., Ghohostani, R.F., 2001. Immune functions of the skin. *Clin Dermatol* 19, 573-585.

DellaGreca, M., Cutillo, F., D'Abrosca, B., Fiorentino, A., Pacifico, S., Zarrelli, A., 2009. Antioxidant and radical scavenging properties of *Malva sylvestris*. *Natural product communications* 4, 893-896.

Dreiseitel, A., Korte, G., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G., 2009. sPhospholipase A(2) is inhibited by anthocyanidins. *J Neural Transm* 116, 1071-1077.

Esteves, P.F., Sato, A., Esquibel, M.A., de Campos-Buzzi, F., Meira, A.V., Cechinel, V., 2009. Antinociceptive Activity of *Malva sylvestris* L. *Latin American Journal of Pharmacy* 28, 454-456.

Farina, A., Doldo, A., Cotichini, V., Rajevic, M., Quaglia, M.G., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., 1995. HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva sylvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 14, 203-211.

Farinacci, M., Colitti, M., Sgorlon, S., Stefanon, B., 2008. Immunomodulatory activity of plant residues on ovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 126, 54-63.

Ferreira, Z.S., Fernandes, P.A., Duma, D., Assreuy, J., Avellar, M.C., Markus, R.P., 2005. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res* 38, 182-188.

Fonte, N.N., 2004. A Complexidade das Plantas Medicinais: Enfoque Farmacêutico., *Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectivas*. EMATER, Curitiba, pp. 24 - 45.

Freinkel, R.K., Woodley, D., 2001. *The biology of the skin*. Parthenon Pub. Group, New York.

Fuchs, E., Raghavan, S., 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* 3, 199-209.

Gabor, M., 2000. *Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 24-37.

Gabor, M., 2003. Models of acute inflammation in the ear. *Methods Mol Biol* 225, 129-137.

Gambichler, T., Bischoff, S., Bechara, F.G., Altmeyer, P., Kreuter, A., 2008. Expression of proliferation markers and cell cycle regulators in T cell lymphoproliferative skin disorders. *J Dermatol Sci* 49, 125-132.

Gasparetto, J.C., Martins, C.A., Hayashi, S.S., Otuky, M.F., Pontarolo, R., 2012. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. *J Pharm Pharmacol* 64, 172-189.

Gniadecki, R., 1998. Regulation of keratinocyte proliferation. *Gen Pharmacol* 30, 619-622.

Gonda, R., Tomoda, M., Shimizu, N., Yamada, H., 1990. Structure and anticomplementary activity of an acidic polysaccharide from the leaves of *Malva sylvestris* var. *mauritiana*. *Carbohydrate research* 198, 323-329.

Guardia, T., Rotelli, A.E., Juarez, A.O., Pelzer, L.E., 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmaco* 56, 683-687.

Guarrera, P.M., 2005. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia* 76, 1-25.

Gudjonsson, J.E., Karason, A., Antonsdottir, A.A., Runarsdottir, E.H., Gulcher, J.R., Stefansson, K., Valdimarsson, H., 2002. HLA-Cw6-positive and HLA-Cw6-negative patients with Psoriasis vulgaris have distinct clinical features. *J Invest Dermatol* 118, 362-365.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine* 27, 1-93.

Haake, A., Scott, G.A., Holbrook, K.A., 2001. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. *The Biology of the Skin*.

Haass, N.K., Herlyn, M., 2005. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig Dermatol Symp Proc* 10, 153-163.

Horinouchi, C.D., Mendes, D.A., Soley Bda, S., Pietrovski, E.F., Facundo, V.A., Santos, A.R., Cabrini, D.A., Otuki, M.F., 2013. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. *J Ethnopharmacol* 145, 311-319.

Hsiao, Y.P., Huang, H.L., Lai, W.W., Chung, J.G., Yang, J.H., 2009. Antiproliferative effects of lactic acid via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in a human keratinocyte cell line (HaCaT). *J Dermatol Sci* 54, 175-184.

Jacobson, C.C., Kumar, S., Kimball, A.B., 2011. Latitude and psoriasis prevalence. *J Am Acad Dermatol* 65, 870-873.

Kolch, W., 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 827-837.

Koster, M.I., Roop, D.R., 2004. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *Eur J Cell Biol* 83, 625-629.

Krueger, J.G., 2002. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *J Am Acad Dermatol* 46, 1-23; quiz 23-26.

Krueger, J.G., Bowcock, A., 2005. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 2, ii30-36.

Lew, W., Lee, E., Krueger, J.G., 2004. Psoriasis genomics: analysis of proinflammatory (type 1) gene expression in large plaque (Western) and small plaque (Asian) psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 150, 668-676.

Li, F.L., Xu, R., Zeng, Q.C., Li, X., Chen, J., Wang, Y.F., Fan, B., Geng, L., Li, B., 2012. Tanshinone IIA Inhibits Growth of Keratinocytes through Cell Cycle Arrest and Apoptosis: Underlying Treatment Mechanism of Psoriasis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, 927658.

Li, L., Adams, L.S., Chen, S., Killian, C., Ahmed, A., Seeram, N.P., 2009. *Eugenia jambolana* Lam. berry extract inhibits growth and induces apoptosis of human breast cancer but not non-tumorigenic breast cells. *J Agric Food Chem* 57, 826-831.

Li, Y., Begovich, A.B., 2009. Unraveling the genetics of complex diseases: susceptibility genes for rheumatoid arthritis and psoriasis. *Seminars in immunology* 21, 318-327.

Lima Ede, A., Lima Mde, A., 2011. Reviewing concepts in the immunopathogenesis of psoriasis. *Anais brasileiros de dermatologia* 86, 1151-1158.

Lin, J.-Y., Li, C.-Y., Hwang, I.F., 2008. Characterisation of the pigment components in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var.) juice and their anti-inflammatory effects on LPS-stimulated murine splenocytes. *Food Chemistry* 109, 771-781.

Lin, Y.K., Leu, Y.L., Yang, S.H., Chen, H.W., Wang, C.T., Pang, J.H., 2009. Anti-psoriatic effects of indigo naturalis on the proliferation and differentiation of keratinocytes with indirubin as the active component. *J Dermatol Sci* 54, 168-174.

Liu, J., Zhang, W., Jing, H., Popovich, D.G., 2010. Bog bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability,

affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability. *J Food Sci* 75, H103-107.

Lowes, M.A., Bowcock, A.M., Krueger, J.G., 2007. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866-873.

Malumbres, M., Barbacid, M., 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222-231.

Maroti, M., Uiff, E., Wijma, B., 2006. Quality of life before and 6 weeks after treatment in a dermatological outpatient treatment unit. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20, 1081-1085.

MDG, 2008. Millennium Development Goals: 2008 Progress Chart. ONU, US.

Mendes, D.A., Horinouchi, C.D., Prudente Ada, S., Soley Bda, S., Assreuy, J., Otuki, M.F., Cabrini, D.A., 2012. In vivo participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. *Eur J Pharmacol* 687, 1-8.

Moon, P.D., Lee, B.H., Jeong, H.J., An, H.J., Park, S.J., Kim, H.R., Ko, S.G., Um, J.Y., Hong, S.H., Kim, H.M., 2007. Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I κ B/NF- κ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *Eur J Pharmacol* 555, 218-225.

Murakawa, M., Yamaoka, K., Tanaka, Y., Fukuda, Y., 2006. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem Pharmacol* 71, 1331-1336.

Murphy, G., Reich, K., 2011. In touch with psoriasis: topical treatments and current guidelines. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25 Suppl 4, 3-8.

Muschietti, L., Gorzalczany, S., Ferraro, G., Acevedo, C., Martino, V., 2001. Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta Med* 67, 743-744.

Muskhelishvili, L., Latendresse, J.R., Kodell, R.L., Henderson, E.B., 2003. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem* 51, 1681-1688.

Nestle, F.O., Kaplan, D.H., Barker, J., 2009. Psoriasis. *N Engl J Med* 361, 496-509.

Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J., 2009b. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9, 679-691.

Nickoloff, B.J., Nestle, F.O., 2004. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 113, 1664-1675.

Nodari, R.O.G., M.P., 2000. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos, *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2000, Porto Alegre/ Florianópolis.

Norris, A., 2004. Targeting mast cells. *Expert Opin Investig Drugs* 13, 739-741.

ONU, 1997. Statement of Ind. Comm. for Population & Quality of Life. ONU.

Otuki, M.F., Reis, R.C., Cabrini, D., Prudente, A.S., Horinouchi, C.D., Correr, C.J., 2011. Patient-reported outcomes in psoriasis research and practice. *Br J Dermatol* 165, 1361-1362.

Otuki, M.F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. *Eur J Pharmacol* 507, 253-259.

Pachauri, V., Srivastava, P., Yadav, A., Kushwaha, P., Flora, S.J., 2013. MiADMSA Protects Arsenic-Induced Oxidative Stress in Human Keratinocyte 'HaCaT' Cells. *Biol Trace Elem Res* 153, 396-402.

Perera, G.K., Di Meglio, P., Nestle, F.O., 2012. Psoriasis. *Annual review of pathology* 7, 385-422.

Petronelli, A., Pannitteri, G., Testa, U., 2009. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer Drugs* 20, 880-892.

Pickart, C.M., 2004. Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116, 181-190.

Pinto, N.B., Morais, T.C., Carvalho, K.M., Silva, C.R., Andrade, G.M., Brito, G.A., Veras, M.L., Pessoa, O.D., Rao, V.S., Santos, F.A., 2010. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine* 17, 740-743.

Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17, 1063-1072.

Prudente, A.S., 2010. O papel da *Malva sylvestris* em modelos inflamatórios de pele de camundongos, *Farmacologia*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 90.

Prudente, A.S., Loddi, A.M., Duarte, M.R., Santos, A.R., Pochapski, M.T., Pizzolatti, M.G., Hayashi, S.S., Campos, F.R., Pontarolo, R., Santos, F.A., Cabrini, D.A., Otuki, M.F., 2013. Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: *Malva sylvestris* L. *Food Chem Toxicol* 58C, 324-331.

Rauch, A., Seitz, S., Baschant, U., Schilling, A.F., Illing, A., Stride, B., Kirilov, M., Mandic, V., Takacz, A., Schmidt-Ullrich, R., Ostermay, S., Schinke, T., Spanbroek, R., Zaiss, M.M., Angel, P.E., Lerner, U.H., David, J.P., Reichardt, H.M., Amling, M., Schutz, G., Tuckermann, J.P., 2010. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell metabolism* 11, 517-531.

Ravindran, J., Prasad, S., Aggarwal, B.B., 2009. Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *The AAPS journal* 11, 495-510.

Recio, M.C., Giner, R.M., Uriburu, L., Manez, S., Cerda, M., De la Fuente, J.R., Rios, J.L., 2000. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci* 66, 2509-2518.

Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols* 3, 1125-1131.

Ryan, T., 2004. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. *Micron* 35, 161-171.

Sabat, R., Philipp, S., Hoflich, C., Kreutzer, S., Wallace, E., Asadullah, K., Volk, H.D., Sterry, W., Wolk, K., 2007. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol* 16, 779-798.

Sanchez, T., Moreno, J.J., 1999. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochem Pharmacol* 58, 877-879.

Schacke, H., Schottelius, A., Docke, W.D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., Asadullah, K., 2004. Dissociation of transactivation from

transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 227-232.

Schoepe, S., Schacke, H., Bernd, A., Zoller, N., Asadullah, K., 2010. Identification of novel in vitro test systems for the determination of glucocorticoid receptor ligand-induced skin atrophy. *Skin Pharmacol Physiol* 23, 139-151.

Schon, M.P., 2008. Animal models of psoriasis: a critical appraisal. *Exp Dermatol* 17, 703-712.

Sherr, C.J., 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.

Shirakata, Y., 2010. Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *J Dermatol Sci* 59, 73-80.

Sitter, B., Johnsson, M.K., Halgunset, J., Bathen, T.F., 2013. Metabolic changes in psoriatic skin under topical corticosteroid treatment. *BMC dermatology* 13, 8.

Stanley, P.L., Steiner, S., Havens, M., Tramposch, K.M., 1991. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society* 4, 262-271.

Tabolli, S., Alessandrini, L., Didona, B., Di Pietro, C., Gisondi, P., Rota, L., Sampogna, F., Abeni, D., 2009. A randomized controlled trial to evaluate short-term treatment with eosin vs. topical steroids in psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 34, 304-308.

Talbourdet, S., Sadick, N.S., Lazou, K., Bonnet-Duquennoy, M., Kurfurst, R., Neveu, M., Heusele, C., Andre, P., Schnebert, S., Draelos, Z.D., Perrier, E., 2007. Modulation of gene expression as a new skin anti-aging strategy. *Journal of drugs in dermatology : JDD* 6, s25-33.

Tomoda, M., Gonda, R., Shimizu, N., Yamada, H., 1989. Plant mucilages. XLII. An anti-complementary mucilage from the leaves of *Malva sylvestris* var. *mauritiana*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 37, 3029-3032.

Tse, W.P., Cheng, C.H., Che, C.T., Zhao, M., Lin, Z.X., 2007. Induction of apoptosis underlies the *Radix Rubiae*-mediated anti-proliferative action on human epidermal keratinocytes: implications for psoriasis treatment. *Int J Mol Med* 20, 663-672.

Villasenor-Park, J., Wheeler, D., Grandinetti, L., 2012. Psoriasis: evolving treatment for a complex disease. *Cleve Clin J Med* 79, 413-423.

Williams, I.R., Kupper, T.S., 1996. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* 58, 1485-1507.

Wolf, R., Orion, E., Ruocco, E., Ruocco, V., 2012. Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of psoriasis. *Clin Dermatol* 30, 323-328.

Yang, Y., Yang, H., Wang, Z., Okada, Y., Saika, S., Reinach, P.S., 2013. Wakayama symposium: dependence of corneal epithelial homeostasis on transient receptor potential function. *The ocular surface* 11, 8-11.

Zhou, L.L., Lin, Z.X., Fung, K.P., Cheng, C.H., Che, C.T., Zhao, M., Wu, S.H., Zuo, Z., 2011. Celastrol-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes involves the inhibition of NF-kappaB activity. *Eur J Pharmacol* 670, 399-408.