

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MAYLA SABRINA BALADELLI MERCURIO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DA
PLANTA *Sapium glandulatum* IN VITRO**



CURITIBA
2017

MAYLA SABRINA BALADELLI MERCURIO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DA
PLANTA *Sapium glandulatum* IN VITRO**

Monografia apresentado à disciplina de Estágio Supervisionado em Biologia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dr.^a. Daniela de Almeida Cabrini

Co-orientador: Bruna da Silva Soley

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Guilherme Kluber Mercurio, por ser o melhor coach que alguém poderia ter, pelo amor e companheirismo, além de toda dedicação à nossa família. Eu te amo.

Aos meus pais, Maria Salette Clemente Baladelli e Ivo Baladelli, pelo incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida.

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Daniela de Almeida Cabrini, pela oportunidade e orientação.

À minha co-orientadora, Msc. Bruna da Silva Soley, pela disposição, auxílio e paciência em me ensinar e orientar. Minha eterna gratidão.

Aos amigos do LAFFPEL por todo o auxílio e por dividirem comigo seus conhecimentos.

À Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Farmacologia pelo apoio técnico e por proporcionar todas as condições para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

Estudos etnobotânicos do gênero *Sapium* revelam que diversas espécies são amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diferentes doenças, incluindo a inflamação da pele. Contudo, são poucos os estudos realizados com o objetivo de comprovar a atividade terapêutica destas plantas. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu propriedades antiinflamatórias e antiproliferativas do extrato hidroalcoólico da espécie *Sapium glandulatum* (EHSG) *in vivo*. Com isso, este trabalho objetiva investigar o efeito do EHSG *in vitro*, ou seja, avaliar a atividade direta desta planta sobre linhagem de fibroblastos (3T3). Os resultados mostraram que a incubação, por 24h, com diferentes concentrações do EHSG não promoveu alterações significativas na viabilidade celular dos fibroblastos, indicando ausência de citotoxicidade. A incubação por 72h com a *Sapium glandulatum* (1000mg/mL) foi capaz de reduzir de maneira significativa a proliferação de fibroblastos murinos, sendo esta redução igual a $84,90 \pm 5,70\%$. No entanto, não foram observadas alterações nos processos de motilidade celular. Assim, em virtude de sua capacidade de controlar a hiperproliferação de fibroblastos, é possível inferir que o EHSG poderia ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de quelóides, os quais são caracterizados pela proliferação descontrolada de fibroblastos e, conseqüente, acúmulo de matriz extracelular, devido à excessiva produção de colágeno. Mais dados são necessários, contudo, os resultados preliminares obtidos são de grande importância, pois auxiliam na validação científica das propriedades terapêuticas da planta *S. glandulatum* e no desenvolvimento de alternativas para o tratamento de cicatrizes hipertróficas e quelóides, por exemplo.

Palavras-chave: *Sapium glandulatum*, pele, fibroblastos, quelóides.

ABSTRACT

Ethnobotanical studies of the *Sapium* genus reveal that several species are widely used in folk medicine for the treatment of different diseases, including inflammation of the skin. However, few studies have been carried out to verify the therapeutic activity of these plants. Recently, our research group described the anti-inflammatory and antiproliferative properties of the hydroalcoholic extract *Sapium glandulatum* (EHSG) in vivo. Thus, this work aims to investigate the effect of EHSG in vitro, that is, to evaluate the direct activity of this plant on fibroblast (3T3) lineage. The results showed that incubation for 24h with different concentrations of EHSG did not promote significant changes in the cellular viability of fibroblasts, suggesting an absence of cytotoxicity. In addition, it was observed that incubation with *Sapium glandulatum* (1000mg/mL) for 72h was able to significantly reduce the proliferation of murine fibroblasts in $84.90 \pm 5.70\%$. However, no changes were observed in cell motility processes. Thus, because of its ability to control hyperproliferation of fibroblasts, it is possible to infer that EHSG could be a therapeutic alternative for the treatment of keloids, which are characterized by the uncontrolled proliferation of fibroblasts and, consequently, accumulation of extracellular matrix due to excessive production of collagen. More data are needed, however, the results are of great importance, as they aid in the scientific validation of the therapeutic properties of *S. glandulatum* and in the development of alternatives for the treatment of hypertrophic and keloid scars, for example.

Key words: *Sapium glandulatum*, skin, fibroblasts, keloids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Imagem das folhas da <i>Sapium glandulatum</i>	13
FIGURA 02 - Avaliação da citotoxicidade da <i>S. glandulatum</i> em fibroblastos (3T3). 22	
FIGURA 03 - Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da planta <i>S. glandulatum</i> sobre fibroblastos in vitro.	24
FIGURA 04 - Avaliação do efeito do extrato da planta <i>S. glandulatum</i> na proliferação celular de fibroblastos (3T3) por <i>CyQuant</i>	26
FIGURA 05 - Avaliação da ação do extrato hidroalcoólico da <i>S. glandulatum</i> na motilidade celular	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3t3	Linhagem de fibroblastos murinos
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de soro bovino
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EHS	Extrato Hidroalcoólico da <i>Sapium glandulatum</i>
E.P.M	Erro padrão da média
HeLa	Linhagem celular humana de Henrietta Lacks
MRC-5	Linhagem de fibroblastos de pulmão
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NIQFAR	Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
RNA	Ácido ribonucleico
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos murinos
SFB	Soro Fetal Bovino
SGFA	Fração Acetato de Etila das folhas de <i>Sapium glandulatum</i>
SGFD	Fração Diclorometano das folhas de <i>Sapium glandulatum</i>
SPVS	Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental
UNIVALI	Universidade do Vale do Itajaí
VN	Vermelho Neutro
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
°GL	Grau Gay Lussac
±	Mais ou menos
cm	Centímetro
g	Grama
mg/mL	Miligrama por mililitro
h	Horas
m	Metro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
nm	Nanograma
p/v	Peso/Volume
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade universal
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos.....	14
3. JUSTIFICATIVA	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Material Botânico	16
4.2. Obtenção do Extrato	16
4.3. Cultivo Celular.....	17
4.4. Ensaio de Viabilidade Celular	17
4.5. Protocolo de Proliferação Celular	18
4.6. Quantificação de DNA por <i>CyQuant</i>	19
4.7. Ensaio de Motilidade Celular	19
4.8. Análise Estatística.....	20
5. RESULTADOS	21
5.1. Avaliação da citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da planta <i>S. glandulatum</i> em fibroblastos <i>in vitro</i>	21
5.2. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da planta <i>S. glandulatum</i> sobre a proliferação de fibroblastos (3T3)	23
5.3. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da planta <i>S. glandulatum</i> na proliferação celular de fibroblastos (3T3) por <i>CyQuant</i>	25
5.4. Avaliação da ação do extrato hidroalcoólico da <i>S. glandulatum</i> na motilidade celular através do método <i>scratch</i>	26
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÕES	31

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

Segundo a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), a medicina tradicional é “a soma total dos conhecimentos, habilidades e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, explicáveis ou não, utilizadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais”, e esta por sua vez abrange o uso de plantas, partes de animais e minerais (WHO, 2001).

Com relação ao uso de plantas medicinais, grande parte da comercialização é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, em geral não possuem certificação de qualidade e são produzidas de plantas cultivadas, descaracterizando a medicina tradicional, que em sua maioria utiliza plantas de flora nativa. Além disso, as propriedades farmacológicas são divulgadas pelos comerciantes ou usuários com pouca ou nenhuma comprovação científica, representando um grave problema de saúde pública (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Sabe-se que as plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e desenvolvimento de drogas, pois são utilizadas como matérias-primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998).

Pesquisas etnobotânicas demonstraram que plantas do gênero *Sapium* são utilizadas em todo o mundo para diversos tipos de tratamentos (AL MUQARRABUN et al., 2014), como, por exemplo, para o tratamento de lombalgia, problemas gastrointestinais e até mesmo doenças cutâneas como eczema, dermatites, sarna e herpes (LAI et al., 2004; SHIMIZU et al., 2006; Fu et al., 2013).

Além disso, pesquisas recentes demonstraram que plantas deste gênero possuem atividade citotóxica. O trabalho de Sowemimo et al. (2009) realizado com a espécie *Sapium ellipticum* verificou uma atividade citotóxica elevada desta planta quando incubada com células de câncer (HeLa), a partir de extratos etanólicos de folhas da planta, e baixa citotoxicidade a partir do extrato etanólico obtido da casca do caule. Já o trabalho de Mesia et al. (2007) verificou a citotoxicidade do extrato metanólico da casca do caule da espécie *Sapium cornutum* em protozoários da espécie *Plasmodium falciparum*, suportando parcialmente o uso tradicional da planta no tratamento de doenças parasitárias. Desta forma, dada a extensa utilização na

medicina popular, o número de estudos relacionados às propriedades terapêuticas deste gênero vem crescendo (SOWEMIMO et al., 2009; MESIA et al., 2007).

O gênero *Sapium* é pertencente à família *Euphorbiaceae*, e possui grande dispersão nas Américas, incluindo o Brasil, e também na África. No Brasil ocorrem 72 gêneros compreendendo cerca de 1.100 espécies as quais possuem hábito e habitats diferentes (BARROSO, 1984). A altura da planta atinge cerca de 10-18m, possui o tronco cilindro, reto ou um pouco tortuoso e nodoso. A casca externa possui cor acinzentada, sendo algumas vezes esbranquiçada (SMITH et al., 1988).

Atualmente existem diversos estudos que já caracterizaram propriedades farmacológicas deste gênero, além da identificação de compostos isolados. São muitos os compostos fitoquímicos pertencentes aos grupos dos carotenóides, flavonóides, terpenóides e alcalóides que apresentam um grande potencial para uso terapêutico, devido às propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antioxidantes (MISHRA e TIWARI, 2011; CRAGG e NEWMAN, 2013).

Por este motivo foi despertado o interesse pelo estudo da espécie *Sapium glandulatum*, a qual é nativa da região sul e sudeste do Brasil. Além disso, são poucos os estudos que reportam a atividade biológica desta espécie, o que motiva a investigação objetivando a busca por novos compostos com atividade terapêutica no tratamento de desordens cutâneas.



Figura 1. Imagem das folhas da planta *Sapium glandulatum*.
Fonte: www.cnip.org.br/banco_img/Burra%20Leiteira/sapiumglandulatumhuber8.html
(Acessado em Novembro, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade do extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Sapium glandulatum* (EHSG) em modelos *in vitro*, utilizando linhagem de fibroblastos murinos (3T3);

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* na viabilidade celular de fibroblastos murinos (3T3);
- Averiguar a ação do extrato da planta *S. glandulatum* sobre a proliferação de fibroblastos murinos (3T3);
- Avaliar o efeito antiproliferativo do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum in vitro*;
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum*, sobre a motilidade das linhagens imortalizadas de fibroblastos (3T3);

3. JUSTIFICATIVA

Recentemente, a atividade anti-inflamatória e antiproliferativa tópica do extrato bruto hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* foi demonstrada em modelo animal de inflamação cutânea aguda e crônica (MENDES et al., 2017). Assim, houve o interesse de investigar o efeito direto da planta sobre células que compõem a pele. Nesse contexto, foram utilizadas linhagens imortalizadas de fibroblastos (3T3).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Botânico

As folhas da *S. glandulatum* (Vell.) Pax. foram coletadas na Reserva Natural do Rio Cachoeira, protegida pela Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS), no município de Antonina, Estado do Paraná, Brasil, em janeiro de 2009, no período da manhã. A espécie foi identificada pela Dra. Kátia Christina Zuffellato-Ribas (Universidade Federal do Paraná, Curitiba) e um exemplar encontra-se catalogado sob o número CFC 9204 no Herbário da Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná.

4.2 Obtenção do Extrato

A obtenção do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *S. glandulatum* (EHSG 90%), assim como as frações Acetato de Etila (SGFA) e Diclorometano (SGFD) foram realizadas pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí-SC. Para a preparação do extrato, as folhas foram secas em estufa de secagem a 37 °C, posteriormente trituradas e submetidas à extração com etanol 50, 70 e 90 °GL. Para tanto, 20g do material vegetal foi colocado em contato com o líquido extrator na proporção 1:20 (p/v) e extraído sob agitação (330 rpm) a temperatura ambiente durante 4h. Então, o produto foi filtrado em papel filtro e submetido a evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Após a eliminação do solvente, o extrato concentrado foi liofilizado e armazenado em frascos de cor âmbar, sendo conservado em temperatura média de 5 °C até a utilização.

4.3 Cultivo Celular

Para a realização dos experimentos foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos murinos (3T3), cedidas pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr. da Universidade de São Paulo (USP). As células foram mantidas rotineiramente em garrafas de cultivo contendo meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 µg/mL de estreptomicina e 10 U/mL de penicilina, em atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Para manutenção das células o meio foi trocado a cada 48h.

No momento em que a monocamada celular tornou-se subconflente, as células foram incubadas com 1,5 mL de tripsina 0,25% durante 5 min à 37 °C. Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com DMEM acrescido de 10% de SFB, e a suspensão celular obtida dividida em várias garrafas para subcultivo.

4.4 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células, após o tratamento com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* (3- 1000 mg/mL), foi determinada através de dois ensaios: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e Vermelho neutro (VN).

- **Vermelho neutro**

O ensaio de viabilidade celular, através da incorporação do vermelho neutro (VN), baseia-se na habilidade de lisossomos de células viáveis em absorver o corante. Os fibroblastos foram plaqueados na densidade de 7×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24h, o meio foi removido, as células lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), e as diversas concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* (3-1000mg/mL) em meio DMEM (1% SFB), adicionadas. Após 24h, o meio foi removido, os poços lavados com PBS e a solução de VN (50 mg/mL) adicionada em cada poço (200 µL). Após 4h, o meio foi removido e 100 µL do fixador

formaldeído (1%) adicionado em cada poço. Após a remoção do fixador, 200 µL de uma solução composta por 10 mL de ácido acético glacial, 500 mL de etanol e 490 mL de água destilada foi adicionada em cada poço, seguido de agitação. Posteriormente, a avaliação através de absorbância foi realizada no comprimento de onda de 540 nm usando o leitor de microplaca (EL808B, BioTechInstruments, Inc., Winooski, VT, USA)

- **Ensaio de MTT**

O método fundamenta-se em processos enzimáticos mitocondriais, onde a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial faz com que sejam formados complexos com o MTT (formazan), levando a formação de um produto capaz de ser mensurado através de análise colorimétrica. De forma semelhante ao ensaio de Vermelho Neutro, 7×10^3 células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24h, o meio foi removido, os poços lavados com PBS, e as diversas concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *Sapium glandulatum* (3-1000mg/mL), preparadas em meio DMEM com 1% de SFB, adicionadas. Após 24h, o meio foi removido e os poços lavados com PBS, e a solução de MTT (0,5 mg/mL) adicionada em cada poço (200 µL). Passadas 4h, a solução de MTT foi removida e 200 µL de etanol 70° adicionado em cada poço. A absorbância foi lida a 570 nm em leitor de microplacas (EL808B, BioTechInstruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.5 Protocolo de Proliferação Celular

Para avaliar a proliferação celular de fibroblastos (3T3) foram cultivadas à $3,5 \times 10^3$ células/poço com meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 24h, as células foram incubadas com as diversas concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* (3-1000mg/mL), diluídos em meio 10% de SFB por 72h, e em seguida procedidos os ensaios para avaliar a proliferação celular: MTT e CyQuant.

De maneira semelhante, as células de fibroblastos (3T3) foram cultivadas como descrito anteriormente, e após 24h foram incubadas com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* (3-1000 mg/mL),

diluídos em meio 0,1% de SFB por 72h. Sendo em seguida submetidos à avaliação da proliferação celular através do método de MTT.

4.6 Quantificação de DNA por CyQuant

Após 72h de exposição às diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *Sapium glandulatum* (3-1000mg/mL), o meio de cultivo foi retirado dos poços, e estes lavados com PBS. A placa foi congelada à -70°C para lise celular. A proliferação dos fibroblastos foi avaliada utilizando kit CyQuant (Invitrogen). A metodologia do kit CyQuant baseia-se na utilização de um intercalante fluorescente (CyQuant GR), que exhibe forte fluorescência quando ligado a ácidos nucléicos celulares, permitindo mensurar a quantidade de DNA e RNA na amostra. No momento do uso, as células foram descongeladas a temperatura ambiente, e foi adicionado 200µL de tampão de lise celular/corante CyQuant GR em cada poço. A placa foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. A fluorescência (480 nm de excitação e 520 de emissão) foi mensurada utilizando leitor de multiplacas (EL808B, BioTechInstruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.7 Ensaio de Motilidade Celular

Para avaliar se o extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* estaria influenciando a migração e/ou a proliferação de fibroblastos, foi realizado o teste de motilidade celular (“*scratching assay*”). Para tanto as células foram cultivadas em placas de 12 poços até a subconfluência em meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10%. Após 24h, a “lesão” (“*scratching*”) foi realizada com o auxílio da ponta de uma ponteira (200 µL), para fazer um risco no meio da cultura de células. Em sequência, os poços foram incubados com as diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* (3-1000mg/mL). As “lesões” foram fotografadas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, e a taxa de fechamento do *scratching* avaliada com o auxílio do *software Image J*.

4.8 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via ou duas vias (ANOVA), seguida do teste de múltiplas comparações de *Newman-Keuls*. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPadPrism versão 6.0, São Diego, La Jolla California, EUA.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PLANTA *S. glandulatum* EM FIBROBLASTOS *IN VITRO*

Inicialmente, foram adicionadas diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* (3-1000mg/mL) sobre fibroblastos murinos da linhagem 3T3, e avaliada a citotoxicidade desta planta como apresentado na Figura 2. Após 24h de incubação, os resultados obtidos através dos métodos de MTT (Figura 2A) e Vermelho Neutro (Figura 2B) demonstraram que nenhuma das concentrações avaliadas de *S. glandulatum* promoveram alterações estatisticamente significativas na viabilidade celular dos fibroblastos, quando comparados ao grupo controle (SFB 1%) (Figura 2). De maneira semelhante, os métodos de MTT e VN mostraram que o veículo (DMSO 0,2%) não apresentou citotoxicidade na concentração utilizada (Figura 2 A e B)

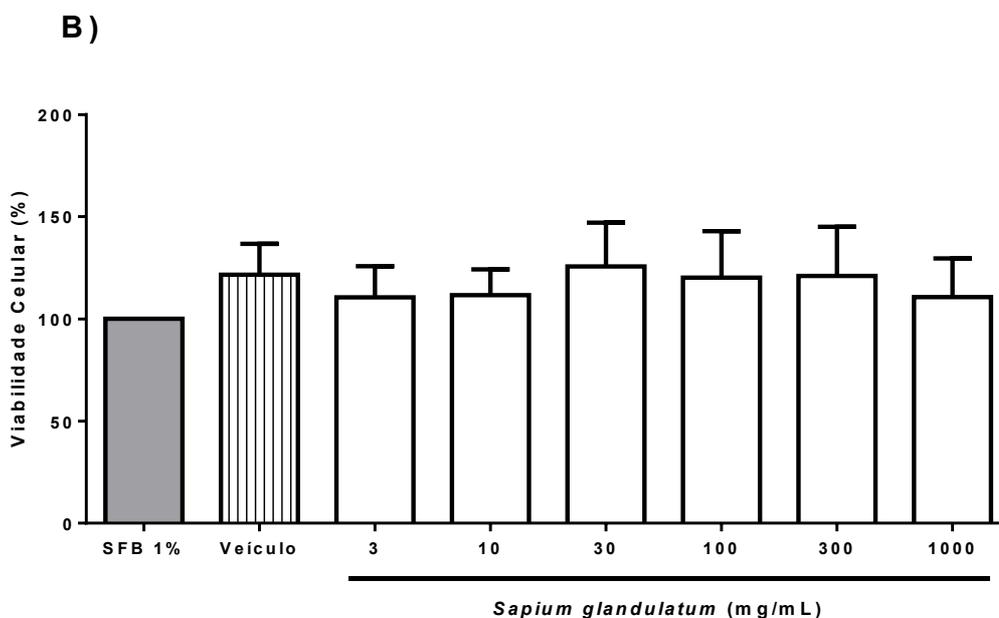
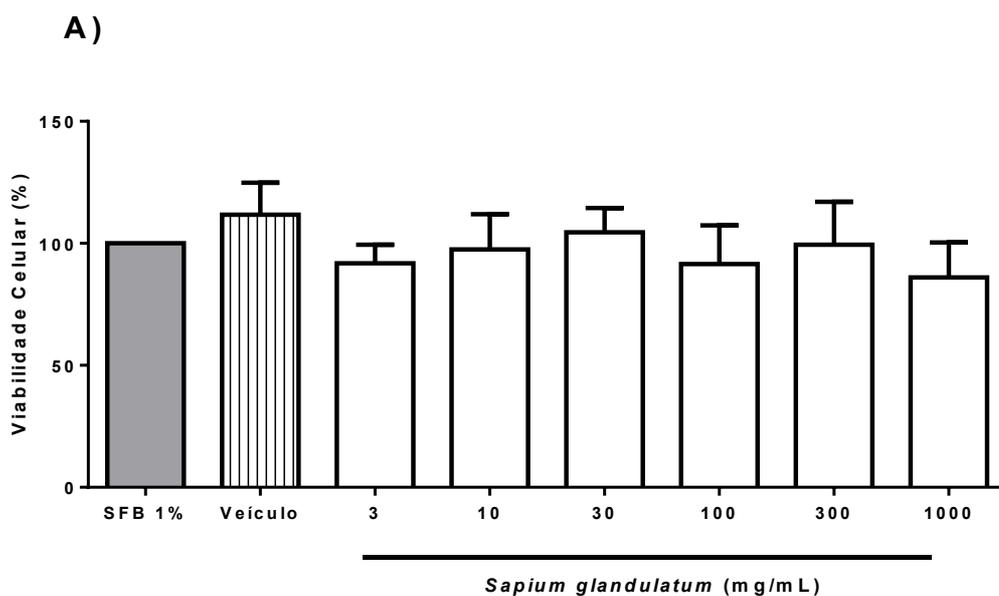


Figura 2. Avaliação da citotoxicidade da *S. glandulatum* em fibroblastos (3T3). As células foram expostas às diferentes concentrações de *S. glandulatum* (3-1000 mg/mL), ou apenas com o veículo (DMSO 0,2%), e incubadas por 24h. Para avaliar a viabilidade celular, as células foram submetidas aos métodos de MTT (A) e Vermelho Neutro (B). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle (SFB 1%). Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PLANTA *S. glandulatum* SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS (3T3)

Uma vez que não foram observadas alterações significativas na viabilidade celular dos fibroblastos (3T3) nas concentrações testadas do extrato, os ensaios seguintes tiveram como objetivo investigar a ação da *S. glandulatum* sobre a proliferação de fibroblastos *in vitro*. Para isso, foram realizados ensaios de MTT após 72h de incubação das células em meio acrescido com 0,1% ou 10% de SFB, sendo este último utilizado como indutor de proliferação celular (Figura 3). Os resultados obtidos através do método de MTT mostraram que a incubação dos fibroblastos com meio contendo SFB (10%) foi capaz de aumentar a taxa de proliferação de maneira significativa ($48,76 \pm 2,15\%$), quando comparado com os níveis basais de proliferação deste tipo celular (SFB 0,1%). O tratamento com as diferentes concentrações de *S. glandulatum* quando incubadas durante 72h junto ao meio de cultura suplementado com SFB 0,1% (Figura 3A) ou SFB 10% (Figura 3B) não promoveram alterações significativas na proliferação de fibroblastos (3T3) (Figura 3).

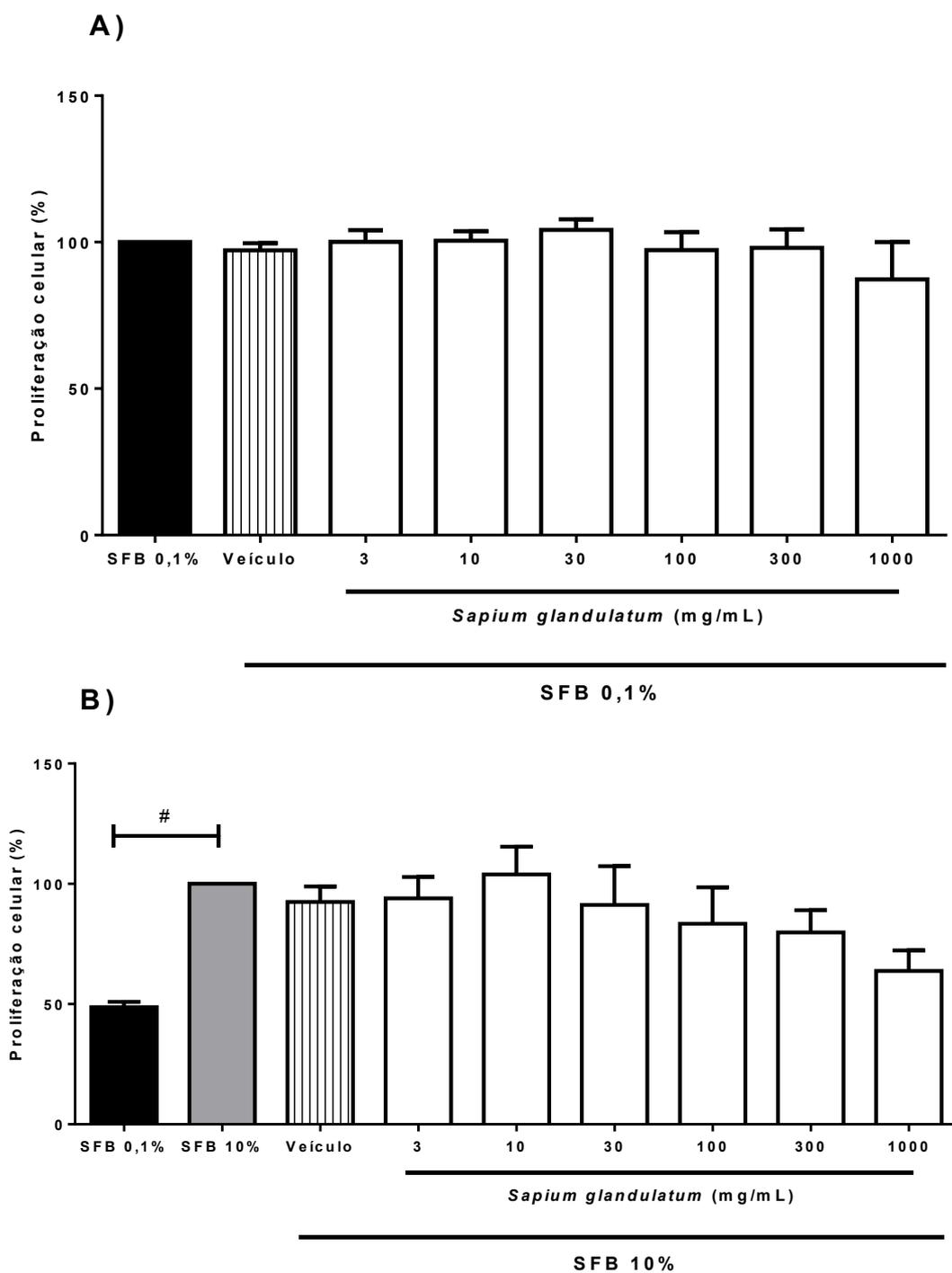


Figura 3. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* sobre fibroblastos *in vitro*. Os fibroblastos foram expostos a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da planta *S. glandulatum* (3-1000 mg/mL) e incubados por 72h. Posteriormente, as células foram submetidas ao método de MTT. (A) Células incubadas com meio de cultura acrescido com SFB 0,1% (B) Células incubadas com meio de cultura acrescido com SFB 10%. Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. de três experimentos separados. # $P < 0,01$ é estatisticamente significativo quando comparado o grupo SFB 10% e SFB 0,1%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PLANTA *S. glandulatum* NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FIBROBLASTOS (3T3) POR CyQUANT

Objetivando aprofundar a análise quanto à atividade do extrato da planta *S. glandulatum* sobre a proliferação celular de fibroblastos, foram realizadas quantificações de DNA, através do ensaio de *CyQuant* (Figura 4). A avaliação da densidade celular pelo método de *CyQuant* mostrou que houve diferença estatística significativa em relação aos grupos que receberam meio de cultivo com 0,1% de SFB e os grupos tratados com meio 10% de SBF, sendo observado aumento da proliferação celular neste último ($56 \pm 17,24\%$). A presença do extrato da *S. glandulatum* (1000mg/mL) promoveu redução na proliferação dos fibroblastos murinos induzida pelo SFB (10%), sendo esta igual a $84,90 \pm 5,70\%$, quando comparada ao grupo veículo (Figura 4).

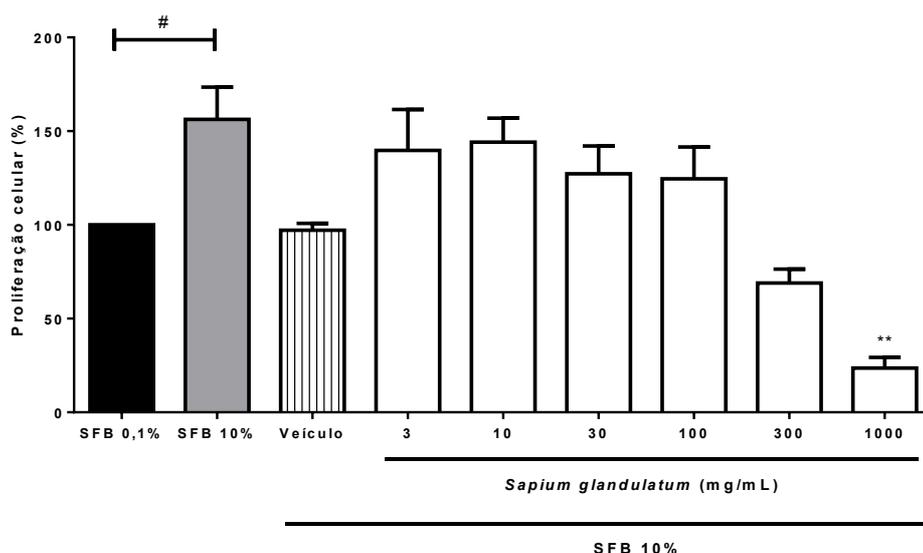


Figura 4. Avaliação do efeito do extrato da planta *S. glandulatum* na proliferação celular de fibroblastos (3T3) por *CyQuant*. As células 3T3 foram expostas ao extrato da *S. glandulatum* (3-1000mg/mL) em meio de cultura contendo 10% de SFB e incubadas durante 72h. A densidade celular foi medida pelo Ensaio de Proliferação Celular (*CyQuant*). * P <0,05, ** P <0,01 e *** P<0,001 apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo veículo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Sapium glandulatum* NA MOTILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO SCRATCH

O método *Scratch* permite avaliar, de maneira indireta, taxa de proliferação e migração celular *in vitro*. Assim, após a realização do “arranhão” (*scratch*) na monocamada celular, nomeado de tempo 0h, as células foram avaliadas em tempos regulares de 24, 48 e 72h, através de registros fotográficos e com o auxílio do *software Image J*. A partir dos resultados, é possível verificar que apenas o grupo que recebeu meio suplementado com 10% de SBF apresentou alterações significativas na área do *scratch*, isto é, foi o único grupo em que a distância do *scratching* foi significativamente menor, quando comparado ao grupo controle (SFB 0,1%). Sendo que, as diferentes concentrações do EHSB não foram capazes de alterar este parâmetro (Figura 5).

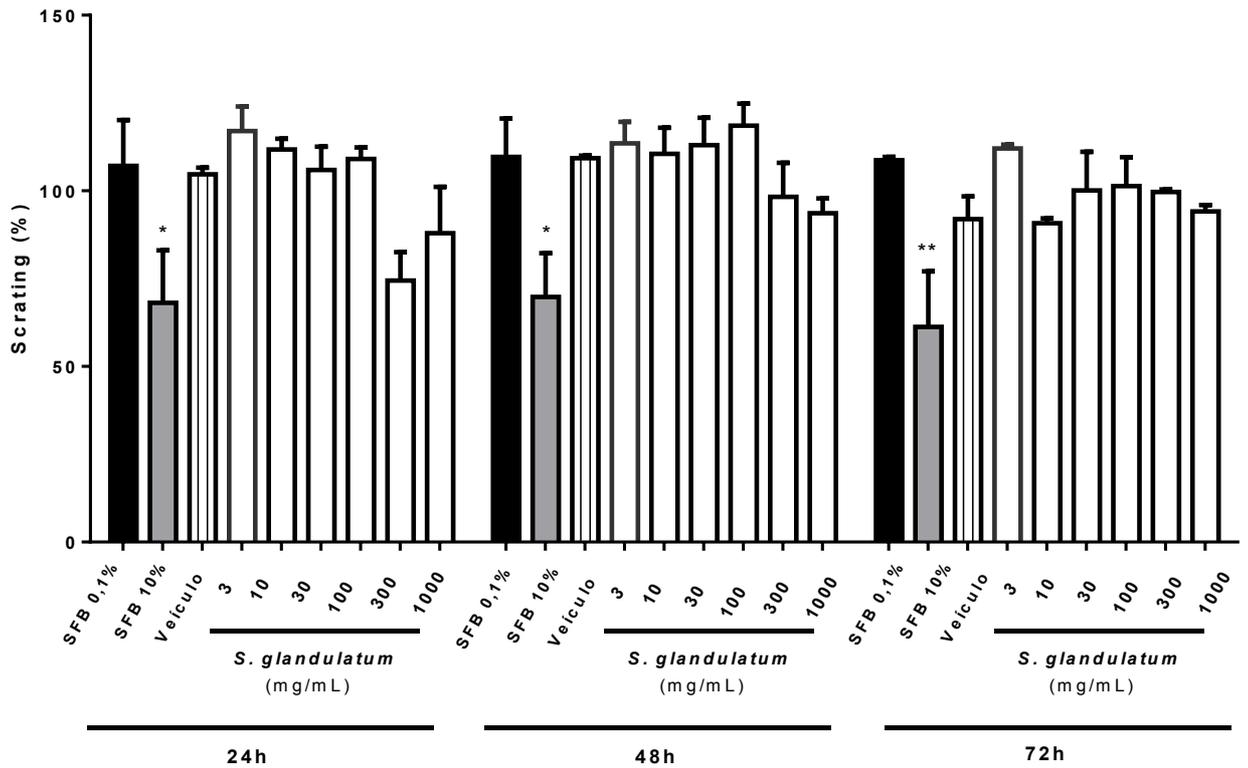


Figura 5. Avaliação da ação do extrato hidroalcoólico da planta *Sapium glandulatum* na motilidade celular. As células 3T3 foram expostas ao extrato da *S. glandulatum* (3-1000mg/mL) em meio de cultura contendo 0,1% de SFB e fotografadas em períodos regulares de 24, 48 e 72h. A motilidade celular foi avaliada com o auxílio do *software Image J*. * P < 0,05, ** P < 0,01 e *** P < 0,001 apresenta diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo veículo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6. DISCUSSÃO

Pertencente a um gênero amplamente utilizado na medicina tradicional, a planta *Sapium glandulatum* é uma espécie nativa do Brasil e não apresenta estudos prévios sobre sua atividade *in vitro*, com exceção dos estudos realizados por Mendes et al. (2016). Este estudo concluiu que o extrato hidroalcoólico da *S. glandulatum* não possui efeitos citotóxicos em queratinócitos da linhagem HaCat e em macrófagos da linhagem RAW 264.7, além de verificar que *in vivo* o extrato das folhas da planta apresenta atividade anti-inflamatória, uma vez que, foi capaz de reduzir significativamente a formação de edema de orelha induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).

Devido à escassez de estudos relacionados a esta espécie, criam-se oportunidades para novas pesquisas, as quais podem proporcionar o conhecimento de novas fontes de compostos que poderiam ser empregados para diversas aplicações, pois de acordo com a revisão bibliográfica de Al Muqarrabun et al. (2014), há uma grande chance para a descoberta de novos componentes químicos em plantas do gênero *Sapium*, uma vez que, apenas 6 das 23 espécies do gênero possuem estudos fitoquímicos até o momento.

Nesse contexto, inicialmente foram realizados testes de MTT e Vermelho Neutro para verificar se após 24h de exposição ao EHSg promoveria interferência na viabilidade celular da linhagem de fibroblastos 3T3. A partir dos resultados obtidos é possível observar que o extrato da planta *S. glandulatum* não possui atividade citotóxica nas concentrações testadas, uma vez que, todas as concentrações foram estatisticamente semelhantes ao controle (SFB 1%). Resultado semelhante foi obtido no trabalho de Mesia et al. (2007), o qual utilizou o extrato metanólico da casca da árvore da espécie *Sapium cornutum* e, após 24h de incubação, o ensaio MTT não identificou atividade citotóxica desta espécie do gênero *Sapium* em fibroblastos de pulmão da linhagem MRC-5.

Uma vez que não foi verificada interferência do EHSg na viabilidade celular na linhagem de fibroblastos, fez-se necessário analisar se o extrato promoveria alguma intervenção na atividade proliferativa deste tipo celular. Para isso as células foram expostas às diferentes concentrações (3-1000 mg/mL) do EHSg, tanto em meio 0,1% SBF quanto em meio 10% SBF, sendo o último um reconhecido indutor de proliferação. Na figura 3A, todos os grupos foram cultivados em meio contendo

0,1% SBF, e fica evidente que o EHSg não é capaz de induzir a proliferação celular de fibroblastos *in vitro*. Na figura 3B, os grupos foram mantidos em meio contendo 10% SBF, e também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa dos grupos tratados com as diferentes concentrações de EHSg em relação ao grupo controle, que recebeu apenas meio de cultura contendo 10% de SBF, nesse contexto, o extrato da planta *S. glandulatum* não teria capacidade de reduzir a proliferação deste tipo celular.

No entanto, com o intuito de confirmar os resultados obtidos através do ensaio de MTT, foi realizada a avaliação da atividade antiproliferativa do EHSg através do método de *CyQuant*. Uma vez que, este é um ensaio altamente sensível, pois quantifica diretamente o conteúdo de DNA presente em cada poço, além disso, é mensurado através de fluorescência. Este método oferece precisão aprimorada quando comparado com ensaio de proliferação celular ou de citotoxicidade que são baseados em atividade metabólica (MTT), pois estes podem ser influenciados por alterações celulares que não estão relacionadas diretamente com alterações no número de células, como estresse oxidativo, por exemplo. Desta forma, foi possível observar aumento da atividade proliferativa no grupo que recebeu 10% de SBF em relação ao grupo controle, o qual recebeu apenas 0,1% de SBF. Além disso, a maior concentração de EHSg (1000 mg/mL) promoveu reduções significativas no número de fibroblastos, indicando mais precisamente que em maiores concentrações o EHSg pode exercer controle sobre a atividade hiperproliferativa de fibroblastos. Segundo o trabalho de Mendes et al. (2016), o EHSg é capaz de interagir com receptores glicocorticóides, uma vez que, a administração do antagonista Mifepristona (RU-486) foi capaz de reverter as propriedades antiinflamatórias da planta, assim como, *in vitro* a *S. glandulatum* foi capaz de deslocar a ligação da [H₃]-dexametasona com o receptor glicocorticóide. Desta forma, esse poderia ser o possível mecanismo de ação do EHSg, uma vez que, os receptores glicocorticóides induzem a inibição da proliferação de várias células, inclusive fibroblastos (De Castro, 2005).

De maneira semelhante, com o intuito de avaliar a atividade da planta *S. glandulatum* sobre a motilidade celular, foi realizado o ensaio de *Scratch*, o qual é baseado na criação de uma interrupção na monocamada contínua de células, o que *in vivo* se equipara a uma ferida. Para acompanhar o fechamento desta “ferida” se

faz necessário o uso de um microscópio invertido de fase (Liang et al., 2007). Os resultados do presente estudo mostraram que o grupo tratado com 10% de SBF foi o único que apresentou diferença estatística em relação ao fechamento do *Scratch*, sendo este resultado atribuído, principalmente, à maior atividade proliferativa (Figura 5).

Em virtude de sua capacidade de controlar a hiperproliferação de fibroblastos, é possível inferir de que o EHSB possui potencial para pesquisa de novas drogas para o tratamento de quelóides, os quais são caracterizados pela hiperproliferação de fibroblastos e consequente acúmulo de matriz extracelular, devido a excessiva produção de colágeno (Ferreira e D'Assumpção, 2006; Hochman et al., 2004). Algumas das opções atuais para o tratamento deste tipo de lesão são criocirurgia, excisão, radioterapia ou corticóides, os quais são métodos invasivos ou intervenções medicamentosas que podem promover diversos efeitos colaterais. O potencial é creditado, pois ainda não há consenso com relação ao tratamento mais apropriado de quelóides, com inúmeros métodos terapêuticos (Wolwacz et al., 2000), existindo um interesse crescente na busca de novos produtos para uso isolado ou até mesmo combinado para o tratamento destas desordens cutâneas (Butler et al., 2008; Shockman et al., 2010). Entretanto, são necessários mais estudos para confirmar esse efeito *in vivo* do extrato, bem como sua segurança na utilização clínica.

7. CONCLUSÕES

- O extrato hidroalcoólico das folhas da planta *S. glandulatum* (EHSG) não possuem atividade citotóxica sobre fibroblastos murinos da linhagem 3T3;
- O EHSG parece modular a atividade proliferativa de fibroblastos *in vitro*, conforme observado através da quantificação de DNA por *CyQuant*;
- O EHSG não é capaz de promover alterações significativas na motilidade de fibroblastos *in vitro*, uma vez que, não alterou os parâmetros avaliados através do *SCRATCH ASSAY*;
- Em virtude de sua capacidade de controlar a hiperproliferação de fibroblastos, é possível inferir de que o EHSG possui potencial para pesquisa de novas drogas para o tratamento de quelóides, os quais são caracterizados pela hiperproliferação de fibroblastos;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL MUQARRABUN, L.M.; AHMAT, N.; ARIS, S.R.A. A review of medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Sapium*. **J Ethnopharmacol**, v. 155, n. 1, p. 9-20, Aug 8 2014.

BARROSO, G. M. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: Imprensa Universitária, v.2, 1984. 377p.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **ToxicolLett**, v. 24, n. 2-3, p. 199-24, Feb-Mar 1985.

BUTLER, P. D.; LONGAKER, M. T.; YANG, G. P. Current progress in keloid research and treatment. **Journal of American College of Surgeons**, v. 2006, n. 4, p. 731-741, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **BiochimBiophys Acta**, v.1860, n.6, p.3670-95, Jun 2013.

DE CASTRO, M. Efeitos antiinflamatórios e antiproliferativos dos glicocorticóides: Concordância ou discordância? **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, p. 334–336, 2005.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **ToxicolLett**, v. 160, n. 2, p. 171-7, Jan 5 2016.

FU, R.; ZHANG, Y. T.; GUO, Y. R.; et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the phenolic extracts of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 517–524, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.058>>.

LAI, X.; YANG, Y.; SHAN, X. The investigation of Euphorbiaceous medicinal plants in Southern China. **EconomicBotany**, v.58, n.1, p. S307-S320, 2004/12/01 2004.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **NatureProtocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

MAYEAUX, E. J. J. Tratamento de Quelóide e Cicatriz Hipertrófica. In: MAYEAUX, E. J. J. *Guia Ilustrato de Procedimentos Médicos*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2011. 175-178.

MENDES, D. A. G. B.; SOLEY, B. DA S.; PRUDENTE, A. DA S.; et al. Hydroalcoholic extract of *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax displays potent anti-inflammatory activities through a glucocorticoid receptor-dependent pathway. **Phytomedicine**, v. 23, n. 13, p. 1610–1620, 2016. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2016.10.003>>.

MESIA, G. K.; TONA, G. L.; NANGA, T. H.; et al. Antiprotozoal and cytotoxic

screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 409–415, 2007.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur J MedChem**, v.46, n.10, p.4769-807, Oct 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **J ImmunolMethods**, v. 65, p. 55-63, Dec 16 1983.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H., 3RD; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **BiochemPharmacol**, v. 55, p. 803-10, Mar 15 1998.

SHIMIZU, K.; FUKUNAGA, S.; YOSHIKAWA, K.; KONDO, R. Screening of extracts of Japanese Woods for melanin biosynthesis inhibition, **Journal of Wood Science**, v. 53, n. 2, p. 153-160, 2007/04/01 2006.

SHOCKMAN, S.; PAGHDAL, K. V.; COHEN, G. Medical and surgical management of keloids: a review. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 9, n. 10, p. 1249-1257, 2010.

SOWEMIMO, A.; VAN DE VENTER, M.; BAATJIES, L.; KOEKEMOER, T. Cytotoxic activity of selected Nigerian plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 4, p. 526–528, 2009.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Mediciniais: cura segura? **Química Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva 1998.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva2000.

WOLWACZ, A.; CÉSAR, E. O.; CIUFO, M. R.; WOLWACZ JÚNIOR, I.;KUYVEN, C.R.; DEOS, M.F. Opções terapêuticas nas cicatrizes queloidianas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 15, n.1, p. 15-24, 2000.