

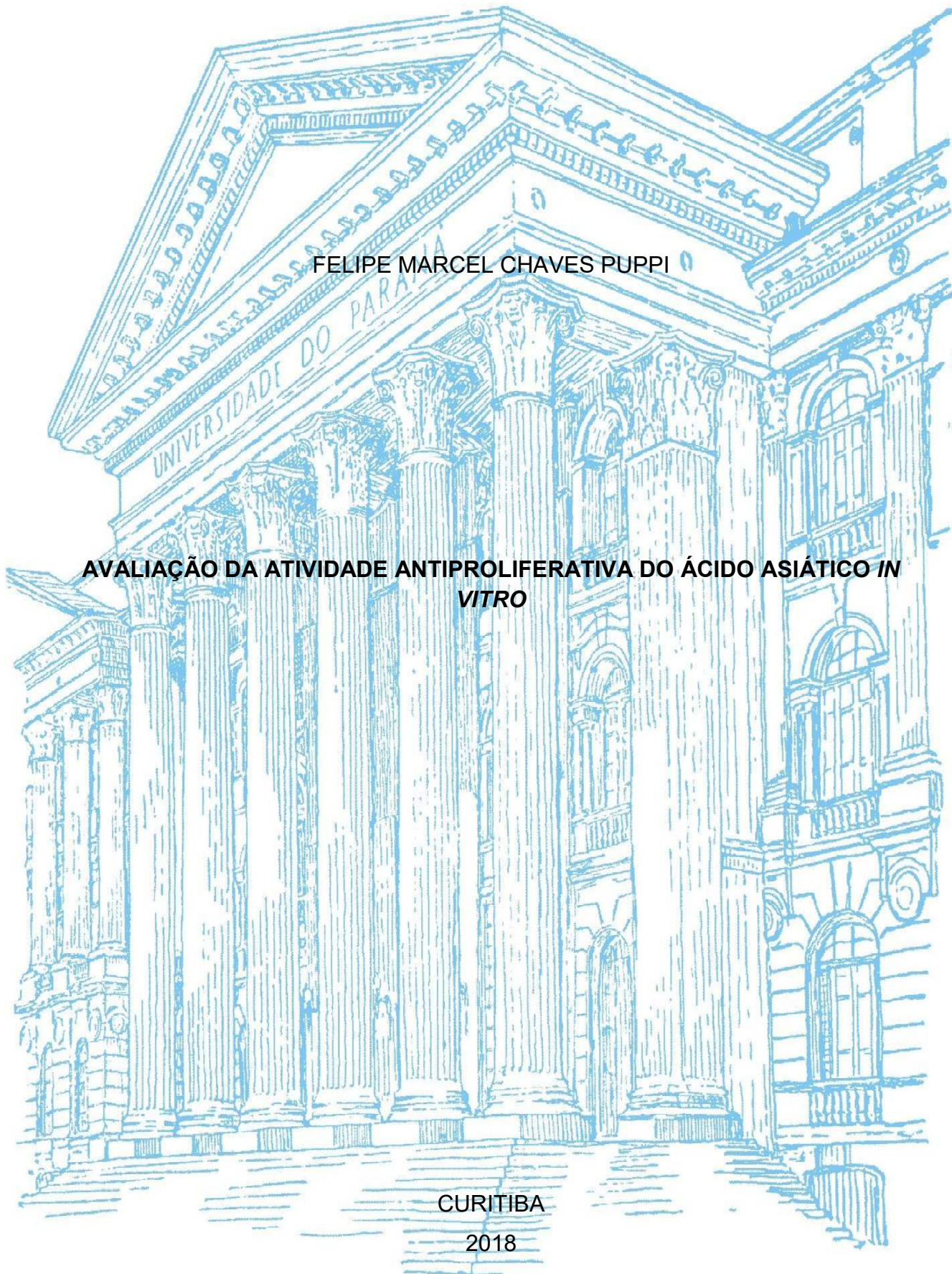
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FELIPE MARCEL CHAVES PUPPI

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÁCIDO ASIÁTICO *IN VITRO*

CURITIBA

2018



FELIPE MARCEL CHAVES PUPPI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DO ÁCIDO ASIÁTICO *IN*
*VITRO***

Monografia apresentada 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-orientadora: Bruna da Silva Soley

CURITIBA
2018

TERMO DE APROVAÇÃO

FELIPE MARCEL CHAVES PUPPI

Monografia apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção de título de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca avaliadora:

Profa. Dra. Daniela Cabrini de Almeida
Orientadora - Departamento de Farmacologia, UFPR.

Profa. Dra. Joice Maria da Cunha
Departamento de Farmacologia, UFPR.

MSc. Priscila Pawloski
Departamento de Farmacologia, UFPR.

Curitiba, 2018

AGRADECIMENTOS

À minha família, que conhece minha trajetória até aqui, principalmente à minha mãe, que teria ficado orgulhosa.

A todos os educadores e educadoras que participaram da minha formação, principalmente as Professoras Dinny e Jucélia, que me instigaram o amor à Biologia, e à minha orientadora, Daniela de Almeida Cabrini, que me concedeu a oportunidade de praticar ciência e me apaixonar novamente pela Biologia, além de ter tido muita paciência comigo.

À minha amiga e co-orientadora, Bruna da Silva Soley, que dedicou muito do seu tempo, conhecimento e esforço para ajudar a mim e a tantos outros nos momentos de sorte e azar.

À minha saudosa amiga, Caroline Dadalt Silva, que pacientemente me ensinou o beabá do cultivo celular e algumas das técnicas empregadas neste estudo, além de boas risadas.

À minha companheira bióloga e amiga, Angélica Hillman, que compartilhou comigo das piadas e lamúrias estudantis, além das contaminações que eventualmente ocorriam em nossos experimentos.

Às amigas Priscila Pawloski e Ana Clara, que gentilmente souberam me orientar a ter boas práticas de laboratório.

À toda a equipe LAFFPEL, que forneceu um ambiente de trabalho interessante, amigável, descontraído e tranquilo.

Ao Departamento de Farmacologia e à Universidade Federal do Paraná que me concederam os meios para desenvolver e concluir este trabalho.

RESUMO

A planta *Vochysia bifalcata*, conhecida popularmente como Guaricica, é uma árvore nativa brasileira encontrada nas regiões Sul e Sudeste. Tem forte valor socioeconômico e ambiental, sendo largamente usada em marcenaria e em reflorestamento. Além disso, resultados obtidos recentemente por nosso grupo de pesquisa, demonstraram que esta espécie apresenta forte potencial terapêutico. Uma vez que, o extrato bruto obtido das folhas apresentou atividade anti-inflamatória tópica em modelo animal de inflamação cutânea. Com isso, este trabalho visa avaliar a atividade antiproliferativa de compostos isolados da *V. bifalcata* em queratinócitos humanos *in vitro*. Uma vez que, é de grande interesse a investigação de possíveis alternativas para serem aliadas ou substituir os tratamentos convencionais, os quais estão associados a diversos efeitos colaterais. Nesse contexto, é de grande interesse a avaliação da ação antiproliferativa e segurança da planta *Vochysia bifalcata*, bem como de seu composto isolado, o Ácido Asiático, pois este pode tornar-se uma possível alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias da pele com características hiperproliferativas, como, por exemplo, a psoríase. Isto se respalda pela inexistência da citotoxicidade do composto nas concentrações utilizadas em queratinócitos humanos (HaCaT), além da ação antiproliferativa causada pelo Ácido Asiático, observada neste estudo: pelo teste de MTT, foi obtida redução, em relação ao veículo, de $41,98 \pm 5,81\%$ da proliferação na maior concentração de Ácido Asiático (10 $\mu\text{g/ml}$). Pelo teste de CyQuant, houve redução da densidade celular nas duas concentrações maiores (3 e 10 $\mu\text{g/ml}$), sendo que na maior a redução foi de $64,36 \pm 3,78\%$ em relação ao veículo. O mesmo se deu pelo teste de DAPI, no qual as maiores concentrações, quando comparadas ao veículo, levaram à redução de $39,44 \pm 5,70\%$ e $64,36 \pm 3,78\%$ na celularidade, respectivamente. Os tratamentos com 3 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ de Ácido Asiático foram capazes de aumentar em $22,49 \pm 2,35\%$ e $30,34 \pm 0,68\%$ o número de células apoptóticas em relação ao veículo, respectivamente, sendo este o provável mecanismo de ação antiproliferativa do Ácido Asiático.

Palavras-chave: *Vochysia bifalcata*, Ácido Asiático, queratinócitos, atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

The plant *Vochysia bifalcata*, popularly known as Guaricica, is a native Brazilian tree found in the South and Southeast regions. It has strong socioeconomic and environmental value, being widely used in carpentry and reforestation. In addition, results recently obtained by our research group have demonstrated that this species presents strong therapeutic potential. Since the crude extract obtained from the leaves presented a topical anti-inflammatory activity in an animal model of cutaneous inflammation. Therefore, this study aims to evaluate the antiproliferative activity of a compound isolated from *V. bifalcata*, asiatic acid, in human keratinocytes in vitro. Since, it is very interest to investigate possible alternatives to be allied or to replace conventional treatments, which are associated with several side effects. In this context, we need to evaluate the antiproliferative action and safety of the *Vochysia bifalcata* plant, as well as it isolated compound, asiatic acid as these may become possible alternatives for the treatment of inflammatory skin diseases with hyperproliferative characteristics, as psoriasis. This is supported by the antiproliferative action in keratinocytes, caused by Asiatic Acid, later tests allowed to elucidate the occurrence of this mechanism by apoptotic induction. This is supported by the lack of cytotoxicity of this compound at the concentrations used in this study in human keratinocytes (HaCaT), in addition to the antiproliferative action caused by Asiatic Acid observed here: by the MTT test, a proliferation's reduction was obtained in relation to the vehicle of $41.98 \pm 5.81\%$ in the highest concentration of Asiatic Acid (10 $\mu\text{g/ml}$). By the CyQuant test, there was a reduction of the cell density in the two highest concentrations (3 and 10 $\mu\text{g/ml}$), and the largest reduction was $64.36 \pm 3.78\%$ in relation to the vehicle. The DAPI test, in which the highest concentrations, when compared to the vehicle, led to the reduction of $39.44 \pm 5.70\%$ and $64.36 \pm 3.78\%$ in cellularity, respectively. Treatments with 3 $\mu\text{g/ml}$ and 10 $\mu\text{g/ml}$ Asiatic Acid were able to increase the number of apoptotic cells in relation to the vehicle by $22.49 \pm 2.35\%$ and $30.34 \pm 0.68\%$ respectively, this being the probable mechanism of antiproliferative action of Asiatic Acid.

Key words: *Vochysia bifalcata*, asiatic acid, keratinocytes, antiproliferative action.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - GUARICICA (V. <i>BIFALCATA</i> WARM.) (IMPA) | 13 |
| FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA <i>VOCHYSIA BIFALCATA</i> | 18 |
| FIGURA 3 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASIÁTICO SOBRE A VIABILIDADE DE QUERATINÓCITO (HACAT) <i>IN VITRO</i> . | 31 |
| FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO ASIÁTICO SOBRE PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS <i>IN VITRO</i> | 33 |
| FIGURA 5 - ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO ASIÁTICO SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE QUERATINÓCITOS HUMANOS <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DO MÉTODO DE CYQUANT | 34 |
| FIGURA 6 - ANÁLISE DO EFEITO DO ÁCIDO ASIÁTICO SOBRE A CELULARIDADE DE QUERATINÓCITOS HUMANOS <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DO MÉTODO DO DAPI | 36 |
| FIGURA 7 - ANÁLISE DO EFEITO APOPTÓTICO DO ÁCIDO ASIÁTICO EM QUERATINÓCITOS HUMANOS <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DO MÉTODO DO DAPI E ANEXINA | 38 |

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *VOCHYSIA* 16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| Ácido Asiático | Ácido Asiático |
| ANOVA | Análise de variância |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| E.P.M | Erro padrão da média |
| MTT | Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| VN | Vermelho Neutro |
| WHO | World Health Organization |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-------|----------------------------|
| °C | Graus Celsius |
| ± | Mais ou menos |
| cm | Centímetro |
| g | Gramma |
| mg/ml | Miligramma por mililitro |
| µg/ml | Microgrammas por mililitro |
| h | Horas |
| m | Metro |
| M | Molar |
| mg | Miligramma |
| ml | Mililitro |
| min | Minuto |
| nm | Nanogramma |
| U | Unidade universal |
| µg | Microgramma |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrômetro |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 4 |
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1 <i>Vochysia bifalcata</i> | 11 |
| 1.1.1 Classificação botânica | 11 |
| 1.1.2 Espécie de interesse à pesquisa | 13 |
| 1.1.3 Fitoquímica | 14 |
| 1.2 Vantagens do uso de plantas como estratégia terapêutica | 16 |
| 1.2.1 Fitoterápicos na inflamação cutânea | 18 |
| 2 OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 Objetivo Geral | 21 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 21 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 22 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1 Cultivo Celular | 23 |
| 4.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT | 23 |
| 4.3 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Vermelho Neutro | 24 |
| 4.4 Protocolo de Proliferação Celular | 24 |
| 4.5 Quantificação de DNA por CyQuant | 24 |
| 4.6 Avaliação da celularidade por DAPI | 25 |
| 4.7 Análise Estatística | 26 |
| 5 RESULTADOS | 27 |
| 5.1 Avaliação da Atividade Citotóxica do Ácido Asiático sobre Queratinócitos | 27 |
| 5.2 Avaliação da Ação Antiproliferativa do Ácido Asiático sobre Queratinócitos | 29 |
| 5.3 Avaliação da Atividade Pró-Apoptótica do Ácido Asiático sobre Queratinócitos | 34 |
| 6 DISCUSSÃO | 36 |
| 7 CONCLUSÕES | 40 |
| 8 REFERÊNCIAS | 41 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 VOCHYSIA BIFALCATA

A *Vochysia bifalcata*, chamada popularmente de Guaricica, é uma árvore nativa brasileira encontrada nas regiões Sul e Sudeste do país. Além das conhecidas importâncias socioeconômica e ambiental, apresenta forte potencial terapêutico, demonstrado pela atividade antiinflamatória tópica do extrato bruto de suas folhas (HORINOUCI, 2013).

Essa espécie é usada principalmente em atividades econômicas por sua lenha de boa qualidade, entre elas para a produção de energia, papel, celulose, artesanato, caixotaria e tábuas, sendo a madeira bastante apreciada para a produção de laminados. Seu plantio ambiental destaca-se para a finalidade de reflorestamento, sendo recomendada pelo Ministério Brasileiro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a revegetação e recuperação de terrenos erodidos e de encostas degradadas, além do uso ornamental, por suas flores amarelas e vistosas, na arborização urbana e de parques, comum na cidade de Curitiba, capital do Estado do Paraná (CARVALHO, 2008).

1.1.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

Hierarquicamente, a posição taxonômica da *Vochysia bifalcata* é divisão Angiospermae, clado Rosidae, ordem Myrtales (segundo The Angiosperm Phylogeny Group (APG) II), família Vochysiaceae, gênero *Vochysia* (CARVALHO, 2008).

Quanto à descrição, sua forma biológica é arbórea (árvore), de caráter sempre verde ou perenifólio, atingindo dimensões próximas a 25 m de altura e 100 cm de DAP (diâmetro à altura do peito, medido à 1,30 m do solo), na idade adulta (Fig. 1). Tronco reto e de seção cilíndrica, ramificação dicotômica ou racemosa, copa densifoliada e umbeliforme, casca externa de coloração acinzentada com manchas brancas e fissuras longitudinais e descamação em placas irregulares, casca interna branco-amarelada, folhas verticiladas, com três folhas por verticilo, subcoriáceas, margem inteira, glabras, brilhantes, verde-amarelada. Florescem de

dezembro a março, com flores de coloração amarela e vistosas, em inflorescências reunidas em cachos terminais. O fruto é uma cápsula lenhosa de coloração marrom, coriácea, trígona, com deiscência loculicida dorsal de 2,5 a 4 cm de comprimento, com três sementes em cada lóculo, sendo a semente alada, de coloração marrom-escura, com núcleo seminal basal, medindo até 3 cm de comprimento, incluindo a asa (CARVALHO, 2008).

Ecologicamente é uma espécie secundária inicial de extrema importância para o estabelecimento de florestas secundárias onde forma agrupamentos densos na fase de capoeira e se mantém dominante até a fase de capoeirão. Quando cultivada para regeneração natural, apresenta crescimento rápido em altura e diâmetro, o que explica seu emprego no reflorestamento. Com idade média de até 30 anos, há poucas informações sobre seu crescimento em viveiros, mas diversos estudos têm sido conduzidos em busca do melhoramento das suas formas de propagação para otimização da espécie para esse fim (DANNER *et al.*, 2010; RICKLI, 2012)

A sinonímia botânica é *Vochysia laurifolia* Warm. e outros nomes vulgares encontrados para esta espécie são: morici e murici (Minas Gerais), guaricica, pau-amarelo e vinheiro (Paraná), murici vermelho (Rio de Janeiro), caixeta-do-interior, pau-amarelo, pau-de-vidro, pau-de-vinho e vinheiro (São Paulo). As nomenclaturas que remetem ao vinho se dão pelo uso comum da seiva como bebida *in natura*, denominada “vinho de guaricica” pelos habitantes da planície litorânea e Serra do Mar, no Paraná (CARVALHO, 2008).

A família Vochysiaceae possui oito gêneros, somando aproximadamente 200 espécies, características das Américas do Sul e Central. O gênero *Vochysia* conta com cerca de 100 espécies, que ocorrem desde o sul do México até o Sul do Brasil, sobretudo na Região Amazônica, encontradas também em regiões de floresta subtropical e savanas. No Brasil, são encontradas aproximadamente 80 espécies de *Vochysia* distribuídas entre as regiões Guiano-Amazônica, Planalto Central e Mata Atlântica (VIANNA, 2006). Além da *V. bifalcata* Warm, mais duas espécies de *x* são encontradas no Paraná: *V. magnifica* Warm. e *V. tucanorum* Mart., povoando florestas ombrófilas densas, frequentemente encontradas nas encostas de morros, em maior parte nos municípios de Antonina, Guaraqueçaba, Morretes e Paranaguá (WENIGER *et al.*, 2005; GOMES RDE *et al.*, 2009; NETO, 2011).



Figura 1: Guaricica (*V. bifalcata* Warm.) (IMPA).

1.1.2 ESPÉCIE DE INTERESSE À PESQUISA

O que promove o interesse na pesquisa do gênero *Vochysia* para fins farmacológicos é o uso destas plantas por comunidades da América do Sul para aliviar os sintomas de doenças inflamatórias, como lesões cutâneas, asma, congestão pulmonar e ainda distúrbios do trato gastrintestinal (CARVALHO, 2008). Relatos da literatura científica tem sustentado esse uso popular e comprovado atividades biológicas e farmacológicas das espécies de *Vochysia*. A caracterização fitoquímica tem atribuído as atividades biológicas descritas aos metabólitos secundários identificados, destacando-se triterpenos, esteróides e polifenóis como flavonoides e derivados do ácido elágico (NETO, 2011). A tabela 1 mostra dados fitoquímicos sobre espécies de *Vochysia*:

TABELA 1: ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *VOCHYSIA*

| Produto | Efeito | Modelo | Referência |
|---|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| <i>V. divergens</i> | | | |
| Ext. cascas β-sitosterol Ácido betulínico Ácido serícico | Antibacteriano | <i>Staphylococcus aureus</i> | Hess et al., 1995 |
| Ácido tormêntico | Antinociceptivo | CFA; ligadura nervo ciático | Bortalanza et al., 2002 |
| <i>V. tucanorum</i> | | | |
| Ext. folhas | Antiulcerogênico Antioxidante | HCl/etanol; etanol; piroxicam | Gomes R et al., 2009 |
| <i>V. pacífica</i> | | | |
| Ext. cascas | Anti-inflamatório | Atividade PDE4 | Weninger et al., 2005 |

FONTE: HORINOUCI, 2013

1.1.3 FITOQUÍMICA

Recentemente, foi realizada a análise fitoquímica da *V. bifalcata* pelo Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí- SC, pela Profa. Dra. Christiane Meire Bittencourt, que isolou e classificou quimicamente quatro triterpenos pentacíclicos de interesse biológico das folhas de *Vochysia bifalcata* (resultados não publicados). Os triterpenos isolados da *Vochysia bifalcata* são: Ácido Asiático, ácido 19α-hidroxiásiático, ácido arjunólico e trachelosperogenina.

Terpenos formam o maior grupo de compostos naturais presente no reino vegetal originários do metabolismo secundário de plantas e compreendem a maior classe de produtos naturais utilizados na atualidade, com uma variedade de papéis na mediação antagonista e interações benéficas entre organismos. O diterpeno taxol e os alcalóides derivados dos monoterpenos vincristina e camptoricina, por exemplo, são utilizados na clínica para o tratamento do câncer. Existem mais de 30 mil terpenos isolados já descritos, distribuídos amplamente na natureza e encontrados em abundância nas plantas superiores, número muito mais elevado ao de qualquer outro grupo de produtos obtidos de fontes naturais (OTUKI *et al.*, 2005;

SALVADOR *et al.*, 2012).

Triterpenos, mais especificamente, são descritos como agentes anti-inflamatórios e têm sido cada vez mais estudados pelos resultados promissores (DZUBAK *et al.*, 2006). Essa atividade vem sendo atribuída a diversos mecanismos de ação, incluindo inibição da produção de eicosanóides e citocinas, peroxidação lipídica e interação com proteínas quinases (CALIXTO, 2003; OTUKI *et al.*, 2005).

O Ácido Asiático é o composto da *Vochysia bifalcata* com maior número de estudos publicados sobre sua atividade biológica. É um triterpeno pentacíclico encontrado também em plantas medicinais como *Centella asiatica* (família Apiaceae) e *Ugni molinae* (Myrtaceae) (ZHANG, J. *et al.*, 2013a). Os principais efeitos farmacológicos descritos estão relacionados à atividade anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, neuroproteção, antifotoenvelhecimento e na cicatrização de feridas (HUANG *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2012; ZHANG, J. *et al.*, 2013a). Tem sido apontado também como agente hepatoprotetor via mecanismos que incluem efeitos antiestresse mitocondrial e antioxidante celular em cultura de hepatócitos e células de Kupffer (TANG *et al.*, 2012), e como agente antitumoral induzindo apoptose em células cancerosas (HSU *et al.*, 2005). Ainda, estudos adicionais destacam sua atividade na inibição da proliferação celular em mielomas (ZHANG, J. *et al.*, 2013b), regulação do metabolismo de carboidratos por modulação enzimática em ratos diabéticos (RAMACHANDRAN; SARAVANAN, 2013), inibição de fibrose hepática (TANG *et al.*, 2012) e inibição da adesão bacteriana a células uroteliais (DOROTA *et al.*, 2013). Em particular, com relação à sua atividade anti-inflamatória, esta pode ser resultado de inibição de iNOS, COX-2, IL-6, IL-1 β , e expressão de TNF- α através da sub-regulação de NF- κ B ativada por supressão de IKK e fosforilação MAP quinase (p38, ERK1 / 2, e JNK) em células RAW 264.7 (YUN *et al.*, 2008).

Além do Ácido Asiático, o ácido arjunólico e a trachelosperogenina também são compostos da *Vochysia bifalcata* que apresentam atividade farmacológica (GHOSH *et al.*, 2010a; GHOSH *et al.*, 2010b; HEMALATHA *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011; AL-GAYYAR *et al.*, 2014; MANNA *et al.*, 2010; SHERIF *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 1998; WENIGER *et al.*, 2005). Por fim, o composto 19 α -hidroxiasiático é um derivado do Ácido Asiático sem descrição de atividade biológica ou farmacológica na literatura até o momento.

A Figura 1 mostra a estrutura química de triterpenos pentacíclicos: do

núcleo comum e dos isolados da *Vochysia bifalcata*.

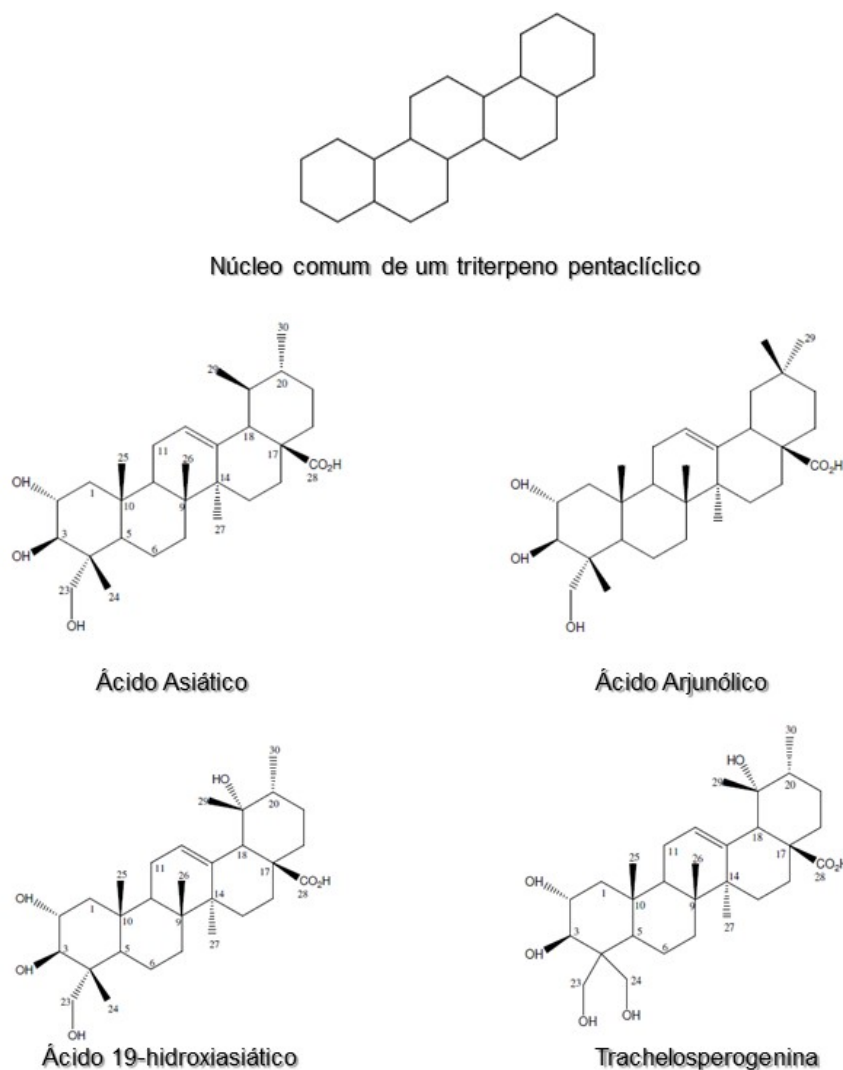


Figura 2: Estrutura química dos compostos isolados da *Vochysia bifalcata* adaptado de Otuki et al. (2005) (OTUKI *et al.*, 2005) e relatório fitoquímico (HORINOUCI, 2013).

1.2 VANTAGENS DO USO DE PLANTAS COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

Compostos derivados de plantas, historicamente são protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. O uso de substâncias naturais como tática no tratamento de doenças é feito pela humanidade há milhares de anos, mas especialmente nas últimas décadas o interesse na atividade biológica de substâncias desse tipo tem aumentado, permitindo o surgimento de novos grupos

de medicamentos e intervenções terapêuticas (CRAGG *et al.*, 2014; HARVEY *et al.*, 2015).

Começando no início de 1800, os avanços no conhecimento científico levaram à descoberta de compostos biologicamente ativos, comumente referidos como produtos naturais. Entre os primeiros exemplos relatados estão a estricnina, morfina, atropina, a quinina, e colchicina. O isolamento destes foi seguido por aquilo que pode ser considerado como o desenvolvimento do primeiro produto natural puro comercial, a morfina por E. Merck em 1826, e o primeiro semi-sintético, droga pura com base num produto natural, a aspirina, em 1899 pela Bayer. Este foi o início de uma nova era na medicina, onde as drogas poderiam ser purificadas a partir de plantas e administradas em dosagens precisas (CRAGG *et al.*, 2014). Com o advento de técnicas modernas, instrumentação e automação em isolamento e caracterização estrutural, a ciência tem hoje em mãos um enorme repositório de compostos naturais para estudo (DEV, 2010).

Segundo WHO 2013, o uso de plantas como medicina complementar e alternativa tem aumentado diariamente. A Organização Mundial de Saúde relata que quase 60% da população do mundo usam produtos naturais no tratamento de doenças e, em alguns países elas são incorporadas extensivamente nos sistemas de saúde pública. Isso reflete o grande aumento do consumo mundial de medicamentos fitoterápicos. No ano 2000, o mercado mundial de remédios à base de plantas movimentou cerca de 60 bilhões de dólares, números que aumentaram para 83 bilhões de dólares em 2008, com uma taxa de crescimento constante variando entre 3% e 12% ao ano (ZHANG *et al.*, 2012). Cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo atualmente vêm de plantas e 60% dos medicamentos anti-infecciosos existentes no mercado ou em investigações clínicas são da mesma origem (ZHANG, A. *et al.*, 2013a).

Esse fenômeno pode ser explicado porque apesar da evolução da química combinatória e da síntese de moléculas, as plantas têm a capacidade de produzir estruturas químicas raras com grande diversidade molecular devido a inúmeros genes que controlam a produção de enzimas responsáveis por esta biossíntese. Além disso, estes compostos são produzidos por organismos que têm sistemas homólogos aos dos mamíferos, conferindo assim uma alta chance de atividade biológica a estes compostos (DEV, 2010; ZHANG, A. *et al.*, 2013; CRAGG *et al.*, 2014).

1.2.1 FITOTERÁPICOS NA INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

A proteção está entre as principais funções da pele, o tecido epitelial que reveste a superfície externa corpo humano. Ela tem é capaz de se auto reparar ao sofrer lesões externas, papel vital à sobrevivência que desempenha por toda a vida. Para isso, após sofrer injúria, passa por um processo de reparo classicamente dividido em hemostasia e inflamação, seguidos por proliferação e remodelamento. Cada estágio se caracteriza por complexos eventos fisiológicos moleculares e celulares, orquestrados em grande parte pela sinalização entre células hematopoiéticas, imunológicas e residentes do tecido. Imediatamente após a lesão de pele, múltiplas respostas fisiológicas ocorrem para parar a perda de sangue, como a contração das células musculares lisas dos vasos locais, formação de um coágulo hemostático através de plaquetas e cascata de fatores de coagulação que serve também como suporte para a migração de células, incluindo os leucócitos, os queratinócitos, e fibroblastos para o local do dano (SUN *et al.*, 2014)

A fase inflamatória é crucial nesse processo e inicia logo após a lesão, alimentado por mediadores derivados de plaquetas, subprodutos bacterianos e quimiocinas secretadas. As primeiras células a se infiltrarem no local da lesão são os neutrófilos, matando as bactérias e degradando proteínas da matriz danificadas, seguidos dos monócitos que chegam cerca de 24 horas depois e transformam-se em macrófagos para matar bactérias, remover detritos de tecido, destruir neutrófilos restantes e preparar o caminho para a angiogênese e tecido de granulação. Os macrófagos também ajudam na transição para a fase de proliferação, um processo no qual células recém-produzidas preenchem o local da lesão através da libertação uma série de fatores de crescimento e quimiocinas, que induzem migração celular, proliferação celular, e a formação da matriz. Após estes eventos, o tecido de granulação toma lugar ao tecido danificado e o processo de reparo se finaliza principalmente com o remodelamento das fibras de colágeno da pele (LEVENSON *et al.*, 1965; ROSS; ODLAND, 1968; MEDDAHI *et al.*, 1996; CLARK, 2001; TOMASEK *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2005; GILL; PARKS, 2008; GURTNER *et al.*, 2008; KOH; DIPIETRO, 2011; BLANPAIN; FUCHS, 2014; SUN *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2015).

Falhas na sinalização para o término do processo inflamatório, como sinais pró-inflamatórios gerados pela resposta imune não contidos pelos mecanismos de resolução ou mesmo resposta imune insuficiente, a homeostasia do tecido não é atingida, levando a quadros patológicos de distúrbios inflamatórios cutâneos. Uma série de doenças inflamatórias crônicas da pele é descrita, com diferentes componentes cutâneos afetados e sintomas desenvolvidos. Nessas doenças ocorre a interrupção da barreira com conseqüente perda da função de proteção, processo inflamatório constante e alterações no padrão de proliferação e diferenciação das células da pele. Os mecanismos ainda não são totalmente elucidados, mas sabe-se que tanto estímulos endógenos como mutações gênicas, quanto estímulos exógenos como a exposição a agentes irritantes são capazes de desencadear desordens inflamatórias crônicas na pele (WILLIAMS; KUPPER, 1996; BUCKLE; HEDGECOCK, 1997; PROKSCH *et al.*, 2008; NESTLE *et al.*, 2009).

Doenças inflamatórias crônicas não infecciosas da pele são muito comuns. Essas condições crônicas não curáveis frequentemente têm um curso recidivante, como o eczema, que atinge até 20% da população em determinados grupos de idade e a psoríase, que afeta de 2-4%. Além do impacto socioeconômico, essas doenças prejudicam significativamente a qualidade de vida dos pacientes, pelo aparecimento de lesões cutâneas que incluem perda de cabelo, cicatrizes, eritema e lesões escamosas, contribuindo para a baixa auto-estima dos pacientes, além do prurido, sintoma que ainda carece de terapia eficaz. (REICH *et al.*, 2014; WITTMANN *et al.*, 2014)

Apesar dos avanços na terapêutica das inflamações cutâneas, as terapias atuais para estas doenças têm várias limitações e em muitos casos os medicamentos existentes são ineficazes. Os glicocorticóides são os principais fármacos empregados e apresentam uma gama de efeitos indesejáveis. Alguns pacientes apresentam melhorias no quadro, mas muitas vezes deixam de responder ao tratamento, como no caso da resistência aos anticorpos monoclonais. Muitos pacientes também não respondem a nenhuma dos medicamentos disponíveis (MAN *et al.*, 2008).

Logo, as plantas e metabólitos secundários são importantes alternativas no tratamento da inflamação cutânea. Diversos produtos dermatológicos têm em sua composição terpenos isolados ou como componentes de extratos de plantas (DATTNER, 2004). A pesquisa com plantas permite também o desenvolvimento de

novos fármacos para esse fim, contribuindo para o aumento do arsenal terapêutico disponível e possível minimização de efeitos adversos (DEV, 2010; ZHANG, A. *et al.*, 2013; CRAGG *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antiproliferativa do Ácido Asiático, triterpeno isolado da *Vochysia bifalcata*, em modelos *in vitro* com queratinócitos humanos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do Ácido Asiático na viabilidade celular de queratinócitos humanos *in vitro* (HaCaT);
- Avaliar a ação antiproliferativa do Ácido Asiático em queratinócitos *in vitro* (HaCaT);
- Elucidar o possível mecanismo de ação envolvido no efeito *in vitro* do Ácido Asiático;

3 JUSTIFICATIVA

A atividade anti-inflamatória e antiproliferativa tópica do extrato bruto da planta *Vochysia bifalcata* foi demonstrada em modelos animais de inflamação cutânea aguda e crônica (HORINOUCI, 2013). Com o intuito de elucidar os possíveis efeitos do Ácido Asiático relacionados à atividade anti-proliferativa da *V. bifalcata*, foi realizada a análise fitoquímica deste triterpeno ativo encontrado no extrato bruto desta planta. Nesse contexto e no contexto da preservação e reflorestamento da espécie vegetal em questão, fez-se necessária a investigação isolada da atividade antiproliferativa desse composto sobre queratinócitos em cultura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). 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 penicilina (10 U/ml), em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Para manutenção das células, o meio foi trocado a cada 48 horas. No momento em que a monocamada celular tornava-se confluenta, as células eram lavadas com PBS e incubadas durante 10 min com EDTA 2 mM, em seguida as células eram incubadas com 1 ml de tripsina 0,25% durante 10 min à 37°C. Após o desprendimento do tapete celular, as células eram homogeneizadas com DMEM acrescido de 10% de SFB, e a suspensão celular obtida era dividida em várias garrafas para subcultivo (GEORGE et al., 2010).

4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE THYAZOLYL BLUE TETRAZOLIUMBROMIDE (MTT)

Com o intuito de verificar a viabilidade celular, o método de MTT foi utilizado. Este é um método em que o anel tetrazólio do MTT é reduzido a cristais de formazan púrpura, pela ação de redutases mitocondriais de células vivas. A solubilização dos cristais pelo etanol absoluto gera uma solução colorida, que pode ser quantificada. Sendo o aumento da intensidade da cor (absorbância) diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; REILLY et al., 1998). As células HaCaT foram semeadas em placa de 96 poços (3,5x10³ células/poço). Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por 200 µl de meio contendo diferentes concentrações do Ácido Asiático (1, 3 e 10 µg/ml) diluído em etanol 1%, que é o veículo. Após 24 horas de exposição, o meio foi substituído por uma solução de MTT (0,5 mg/mL) e a placa incubada durante 3 horas a 37 °C. Ao final, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan formados foram dissolvidos com o acréscimo de 200 µL de etanol. Posteriormente, a absorbância foi verificada

em leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) a 570 nm.

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE VERMELHO NEUTRO

O ensaio de vermelho neutro permite verificar o acúmulo de corante nos lisossomos das células viáveis. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra na membrana celular e se acumula nos lisossomos, onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica (GRIFFON et al., 1995). Após a lise celular por uma solução de extração, o corante pode ser quantificado por medida de absorvância, e assim avaliar a capacidade de fagocitose celular (BORENFREUND; PUERNER, 1985; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). As células HaCaT foram semeadas em placa de 96 poços ($3,5 \times 10^3$ células/poço). Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído por 200 μ l de meio contendo diferentes concentrações do Ácido Asiático (1, 3 e 10 μ g/ml). Após 24 h de exposição, o meio foi substituído por uma solução de Vermelho Neutro (100 μ g/ml) e incubado por 3h a 37 °C e 5% de CO₂. Ao final, o volume todo da placa foi retirado, lavado com Solução de Lavagem (CaCl₂/formaldeído, 1%/0,5%) e adicionado 100 μ l de Solução de Extração (etanol/ácido acético, 50%/1%) em cada poço, homogeneizado lentamente até a completa dissolução e então foi feita a leitura da absorvância em leitor de microplaca (Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader) a 540 nm.

4.4 PROTOCOLO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para avaliar a proliferação celular dos queratinócitos (HaCaT), as células foram cultivadas à $3,5 \times 10^3$ células/poço com meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 16 horas do plaqueamento (semeadura), com as células aderidas e estabilizadas na placa de cultura, o meio foi retirado e substituído por DMEM 0% de SFB por 6 horas antes do tratamento. Esse período de carência é importante para que todas as células entrem na mesma fase do ciclo celular (G₀). Após esta etapa, as células tratadas com meio 0% têm proliferação basal e células tratadas com meio 10% de SFB apresentam aumento significativo da proliferação, uma vez que o SFB é sabidamente um estimulador da proliferação celular. As células foram incubadas

com diferentes concentrações do Ácido Asiático (1, 3 e 10 µg/ml), diluídas em meio 10% de SFB por 72 horas, e em seguida foram procedidos os ensaios para avaliar a proliferação celular: MTT (72h), CyQuant e DAPI .

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR CYQUANT

Após 72 horas de exposição às diferentes concentrações do triterpeno, o meio foi retirado dos poços e estes foram lavados com PBS. A placa foi congelada à -70°C para lise celular. A proliferação celular foi avaliada utilizando kit CyQuant (Invitrogen). A base do kit CyQuant é o corante verde fluorescente CyQuant GR, que exibe forte fluorescência quando ligado a ácidos nucleicos celulares, permitindo mensurar a quantidade de DNA e RNA na amostra. No momento do uso, as células foram descongeladas a temperatura ambiente e foram adicionados 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 foi medida utilizando leitor de placa de fluorescência (480 nm de excitação e 520 de emissão).

4.6 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE POR DAPI E DA APOPTOSE POR MARCAÇÃO DE ANEXINA

O DAPI (fluorógeno 4',6-diamidino-2-fenilindol) é uma proteína que se intercala em regiões ricas em A-T no DNA dupla-fita, emitindo raios ultravioleta e azuis, que podem ser analisados por microscopia de fluorescência, fornecendo uma análise quantitativa de DNA na amostra, evidenciando o material genético e possibilitando a contagem das células (KAPUSCINSKI, 1995). Após terem sido expostos às diferentes concentrações Ácido Asiático (1, 3 e 10 µg/ml), os queratinócitos foram lavados com PBS, fixados e corados com 4',6-diamidino-2-fenilindol por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, lavados com PBS novamente e submetidos à microscopia de fluorescência (MIRZA *et al.*, 2018). A celularidade (células/campo) foi obtida através da contagem de células marcadas por DAPI.

Os queratinócitos foram novamente submetidos ao protocolo de DAPI, com adição de 5µL de anexina V-FITC por 15min à temperatura ambiente no escuro.

Posteriormente, após a incubação, as células foram analisadas em microscopia de fluorescência para contagem de células apoptóticas.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm S.E.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (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 GraphPad Prism versão 6.0c, São Diego, La Jolla California, EUA.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO ÁCIDO ASIÁTICO SOBRE QUERATINÓCITOS

Os queratinócitos humanos (HaCaT) foram expostos a diferentes concentrações de Ácido Asiático (1, 3 e 10 µg/ml) diluídas em meio DMEM acrescido de SFB 10% e posteriormente foi avaliada a citotoxicidade celular deste composto, como apresentado na Figura 3.

Pelos experimentos de MTT e Vermelho Neutro, os resultados mostraram que nenhuma das concentrações avaliadas de Ácido Asiático diluídas em etanol 1% (veículo) foram capazes de promover alterações estatisticamente significativas na viabilidade dos queratinócitos humanos *in vitro*, após 24h de incubação (Figura 3A e 3B).

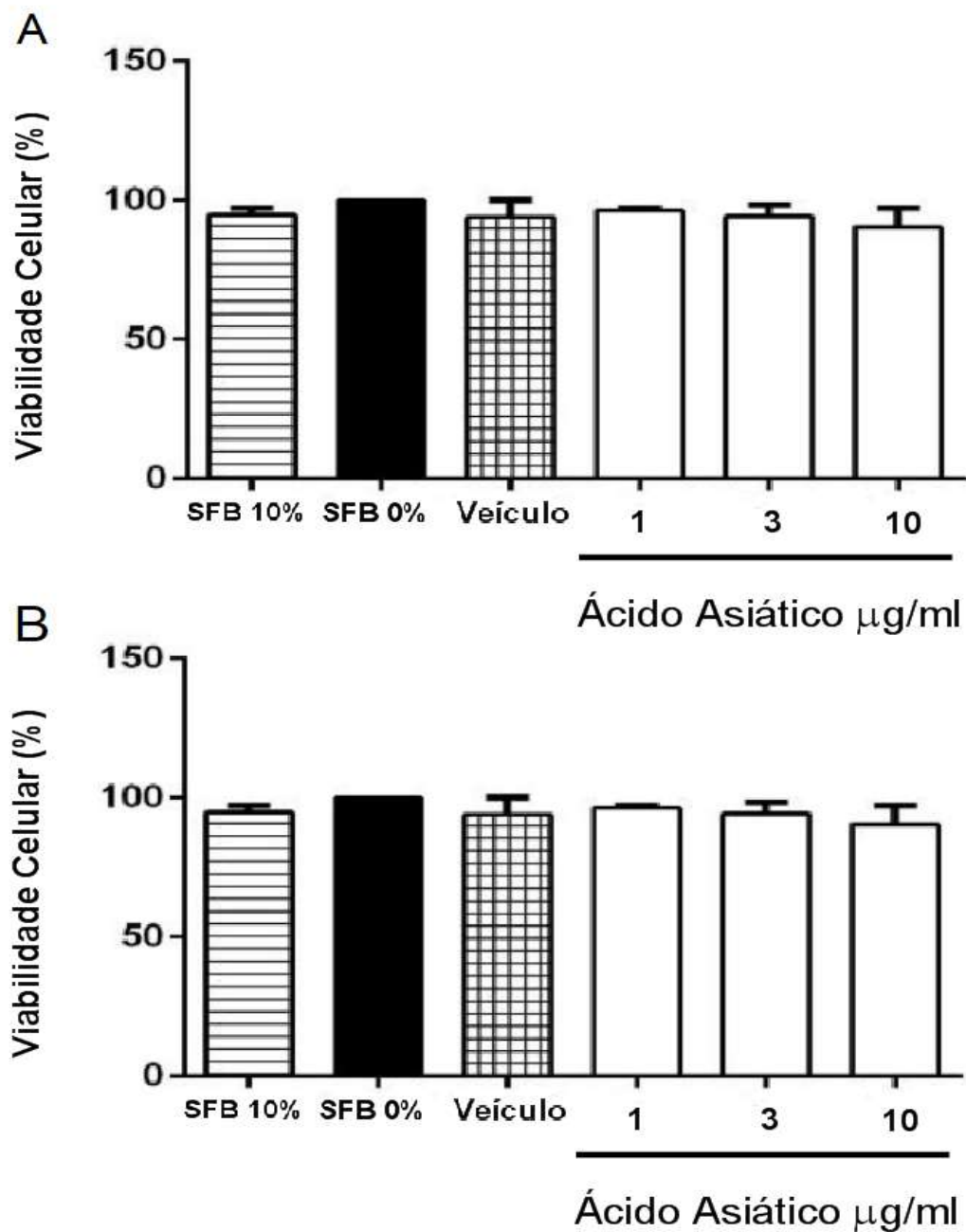


FIGURA 3 – Avaliação do efeito do Ácido Asiático sobre a viabilidade de queratinócito (HaCaT) *in vitro*. Queratinócitos humanos (HaCaT) foram semeadas em placa de 96 poços ($3,5 \times 10^3$ células/poço), após 24h as células foram expostas ao Ácido Asiático (1-10 µg/ml), e incubados por 24 h. Para avaliar a viabilidade celular, as HaCaT foram submetidas aos métodos de MTT (A) e Vermelho Neutro (B). Os resultados estão expressos como a porcentagem em relação ao grupo controle SFB 0% (células incubadas a apenas meio DMEM, não contendo SFB). As barras verticais representam a média \pm EPM (n= 3 experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DO ÁCIDO ASIÁTICO SOBRE QUERATINÓCITOS *IN VITRO*

Uma vez que, os resultados mostraram que as concentrações de Ácido Asiático avaliadas não apresentaram atividade citotóxica, os ensaios seguintes tiveram como objetivo investigar a ação deste triterpeno sobre a proliferação de queratinócitos humanos *in vitro*. Para isso, o ensaio de MTT foi realizado após 72 horas da exposição ao Ácido Asiático (1-10 µg/ml), em meio acrescido de 10% de SFB, sendo este último utilizado como indutor de proliferação celular (Figura 4).

Os resultados obtidos através do método de MTT mostraram que a incubação com 10% de SFB aumentou a taxa de proliferação dos queratinócitos em $77,01 \pm 2,49\%$, após 72h de incubação, quando comparado ao grupo que apresenta níveis basais de proliferação, SFB 0% ($22,98 \pm 2,49\%$) (Figura 4).

A incubação com a concentração de 10 µg/ml de Ácido Asiático foi capaz de reduzir a proliferação celular dos queratinócitos quando comparado ao veículo (etanol 1%) ($41,98 \pm 5,81\%$), após 72h de incubação. No entanto, não foram observadas alterações significativas nas demais concentrações analisadas, tampouco no veículo (Figura 4).

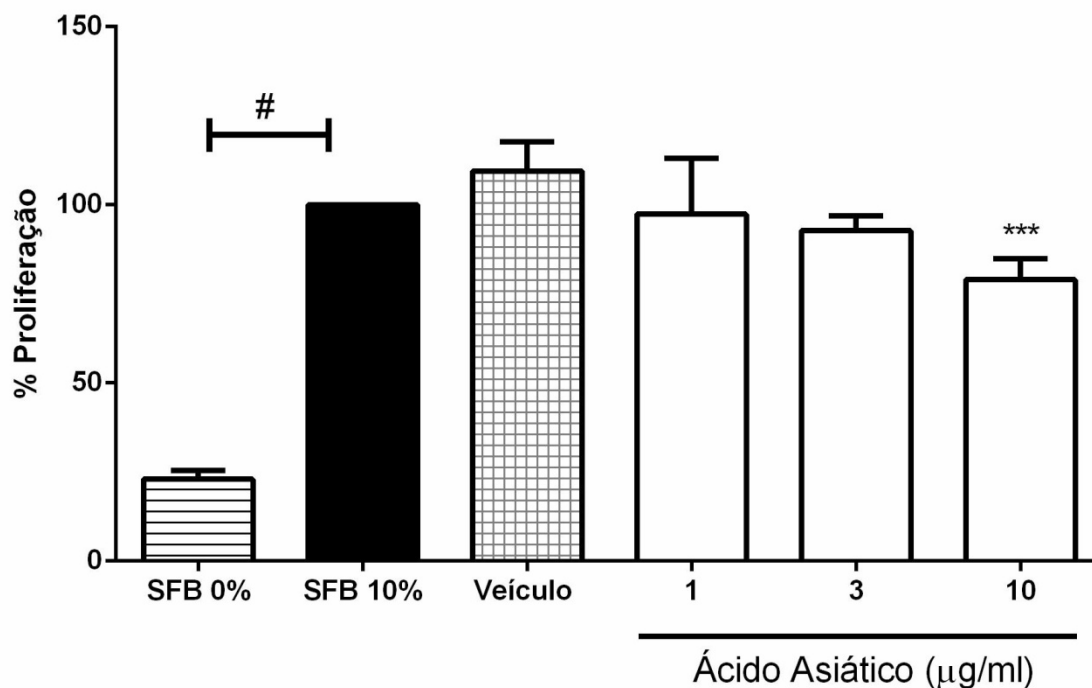


FIGURA 4 – Avaliação do efeito do Ácido Asiático sobre proliferação de queratinócitos *in vitro*. Com o intuito de avaliar a proliferação celular, as HaCaT foram cultivadas à $3,5 \times 10^3$ células/poço com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente, as células foram expostas a diferentes concentrações do Ácido Asiático (1-10 µg/ml), diluídas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB e diluído em etanol 1%, e incubadas por 72 h. Após estes períodos as células viáveis foram quantificadas pelos ensaios de MTT em 72 h. As barras verticais representam a média \pm EPM ($n= 3$ experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. O símbolo # representa o nível de significância em relação ao veículo, *** $P<0,001$. # representa indicativo de diferença estatística entre os grupos 0% SFB e 10% SFB.

Para confirmar a atividade antiproliferativa do Ácido Asiático, foi realizada a quantificação de DNA, através do ensaio de *CyQuant*. Como representado na Figura 5, a incubação por 72h com 10% de SFB promoveu aumento de $80 \pm 5,96\%$ na proliferação de queratinócitos humanos (HaCaT) *in vitro*, quando comparado ao grupo exposto a 0% de SFB (Figura 5). As avaliações da densidade celular pelo método de *CyQuant* mostraram que o Ácido Asiático foi capaz de reduzir, significativamente, a proliferação dos queratinócitos, induzida pela incubação com meio de cultura suplementado com 10% de SFB, nas concentrações de 3 $\mu\text{g/ml}$ ($-39,44 \pm 5,70\%$) e de 10 $\mu\text{g/ml}$ ($-64,36 \pm 3,78\%$), quando comparadas ao veículo, como observado na Figura 5.

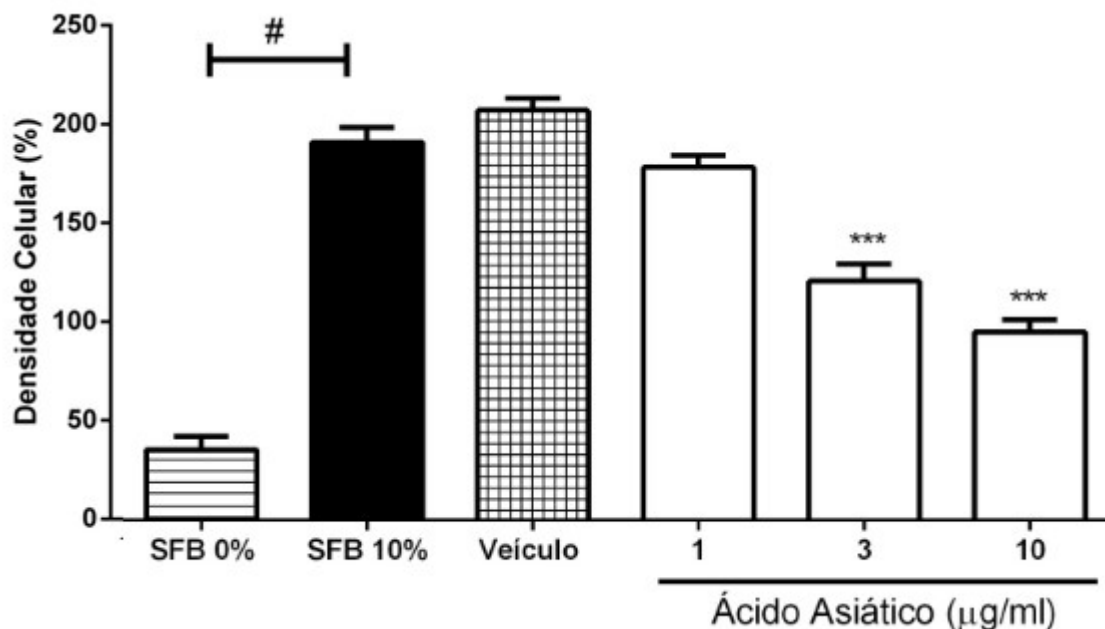


FIGURA 5 – Análise do efeito do Ácido Asiático sobre a proliferação celular de queratinócitos humanos *in vitro* através do método de *CyQuant*. Para avaliar a taxa de proliferação de queratinócitos humanos *in vitro* tratados com Ácido Asiático, as células HaCaT foram expostas a três concentrações do composto (1-10 $\mu\text{g/ml}$) em meio contendo 10% de SFB e etanol 1%. Após 72h de incubação, densidade celular foi medida através do método de *CyQuant*. As barras verticais representam a média \pm EPM (n= 3 experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. O símbolo representam o nível de significância em relação ao veículo: *** $P < 0,001$. # representa indicativo de diferença estatística entre o grupos 0% SFB e 10% SFB.

De maneira semelhante, a contagem de queratinócitos marcados por DAPI mostrou que a incubação por 72h com SFB 10% foi capaz de promover aumento de $58,97 \pm 5,96\%$ na proliferação de queratinócitos humanos (HaCaT) *in vitro*, quando comparado ao grupo exposto a 0% de SFB (Figura 6A). Por sua vez, o tratamento com Ácido Asiático foi capaz de reduzir em $35,3 \pm 5,96\%$ (3 $\mu\text{g/ml}$) e em $48,37 \pm 3,76\%$ (10 $\mu\text{g/ml}$) o número de células/campo, quando comparado ao veículo (etanol 1%). Em campos representativos selecionados, é possível observar o efeito antiproliferativo das maiores concentrações de Ácido Asiático, possibilitando perceber redução do número de núcleos fluorescentes (Figura 6B).

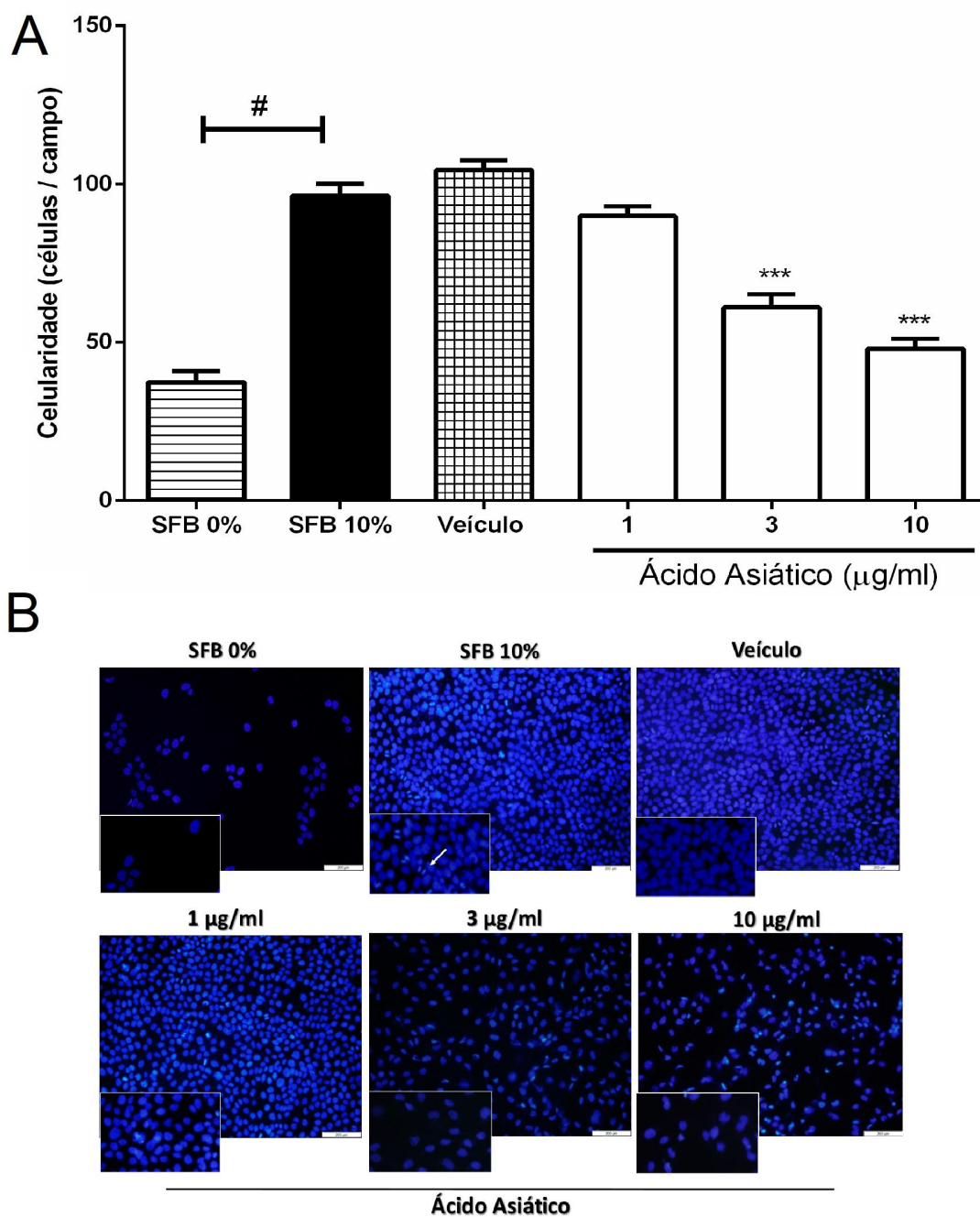
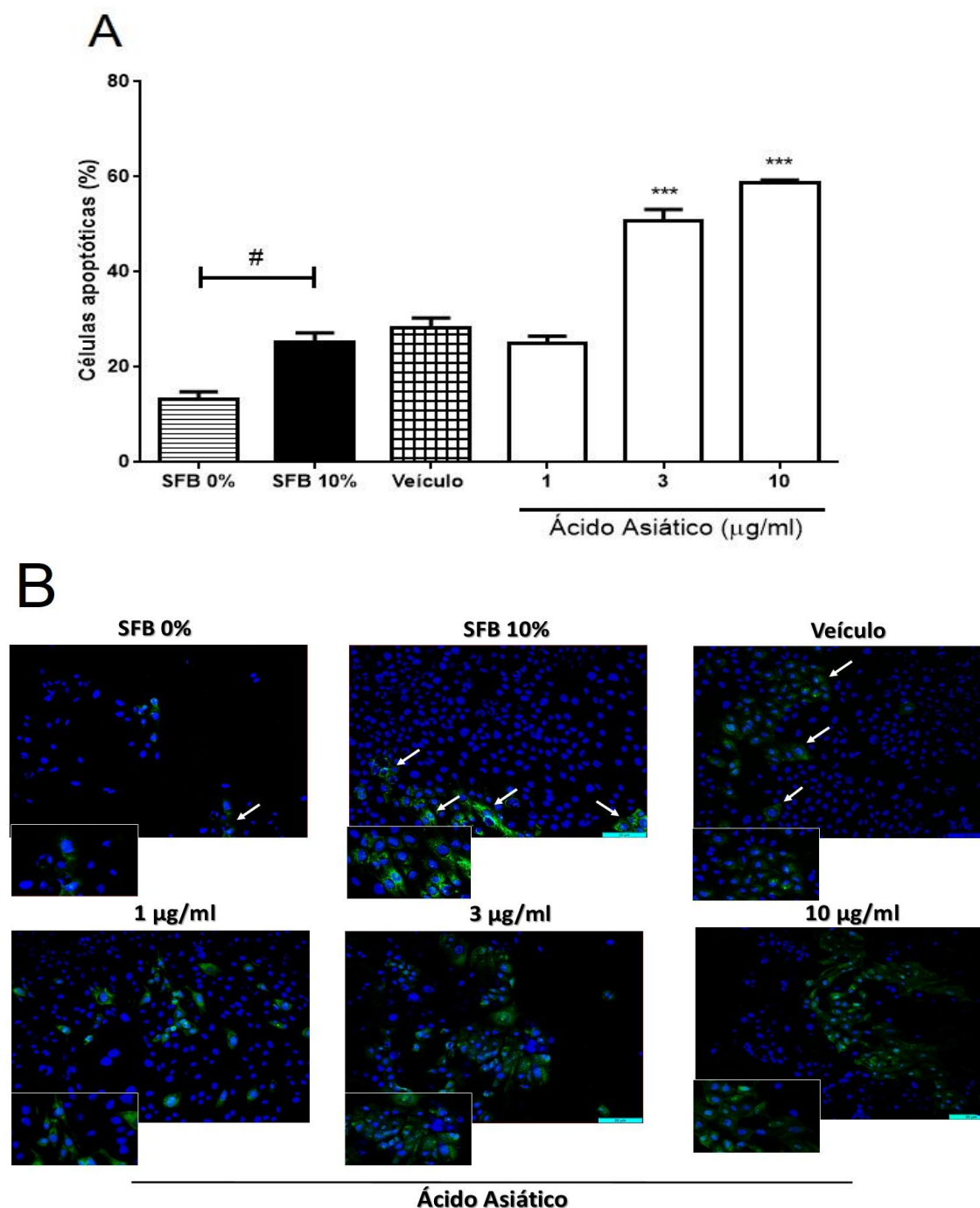


FIGURA 6 – Análise do efeito do Ácido Asiático sobre a celularidade de queratinócitos humanos *in vitro* através do método do DAPI. Para avaliar a taxa de proliferação de queratinócitos humanos *in vitro* tratados com Ácido Asiático, as células HaCaT foram expostas a três concentrações do composto (1-10 µg/ml) em meio contendo 10% de SFB e etanol 1%. Após 72h de incubação, celularidade foi medida através do método de DAPI (A) e a distribuição das células marcadas, por tratamento (B). As barras verticais representam a média \pm EPM (n= 3 experimentos). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os símbolos representam o nível de significância em relação ao veículo: *** P<0,001. # representa indicativo de diferença estatística entre o grupos 0% SFB e 10% SFB.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PRÓ-APOPTÓTICA DO ÁCIDO ASIÁTICO SOBRE QUERATINÓCITOS *IN VITRO*

Objetivando analisar a atividade pró-apoptótica das diferentes concentrações de Ácido Asiático (1- 10 $\mu\text{g/ml}$) sobre os queratinócitos humanos (HaCaT) *in vitro*, foi realizada a avaliação da Anexina V (Figura 7). Os resultados mostraram que a incubação com SFB 10% promove aumento das células apoptóticas em $12,07 \pm 1,92\%$ nos queratinócitos humanos (HaCaT) *in vitro*, quando comparado ao grupo exposto a 0% de SFB (Figura 7A). De maneira semelhante, os tratamentos com 3 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ de Ácido Asiático foram capazes de aumentar em $22,49 \pm 2,35\%$ e $30,34 \pm 0,68\%$ o número de células positivas para anexina V em relação ao veículo, respectivamente (Figura 7A).

Em campos representativos selecionados, é possível observar o efeito apoptótico das duas concentrações maiores de Ácido Asiático por identificação de anexina marcada em verde e núcleos celulares marcados em azul (Figura 7B).



6 DISCUSSÃO

Segundo Nagoor Meeran *et al* (2018), o Ácido Asiático é um composto capaz de afetar muitas enzimas, receptores, fatores de crescimento, fatores de transcrição, proteínas apoptóticas e cascatas de sinalização celular (NAGOOR MEERAN *et al.*, 2018).

O Ácido Asiático é um dos triterpenos presentes no extrato bruto da *Vochysia bifalcata*, sendo que este extrato apresentou efeito anti-inflamatório em aplicações tópicas, efeito antiproliferativo em células HaCaT (HORINOUCI, 2013) e redução de estresse oxidativo *in vitro* (WANG, 2014). Além disso, o composto demonstrou ser capaz de reverter as vias de sinalização induzidas por radiação UVA em HaCaT, que levam ao envelhecimento celular (fotoenvelhecimento), através da redução de espécies reativas de oxigênio e de metaloproteinases de matriz (SOO LEE *et al.* 2003).

Também foi capaz de reduzir edema cutâneo em inflamações causadas por carragenina e também alguns efeitos antitumorais (HUANG, 2011), como por exemplo em hepatocarcinomas, em que o mecanismo de ação é a indução da apoptose por aumento do Ca⁺ intracelular (LEE, 2002). Em contato com células de mieloma, é capaz de inibir a proliferação, regulando as proteínas quinases de adesão focal (ZHANG, 2013) e no melanoma de camundongos (B16F10) tem efeito antiproliferativo, além de reduzir a viabilidade celular e induzir a apoptose de células de melanoma humano *in vitro* (NAGOOR MEERAN *et al.*, 2018).

Em estudos anteriores, para avaliar a viabilidade celular de carcinomas tratados com Ácido Asiático, como o mieloma e o carcinoma de cólon, e também de queratinócitos (HaCaT), foram utilizados ensaios de Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromide (MTT) (ZHANG *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2018; WANG, 2014). No presente estudo, este método foi empregado em duas análises distintas: de viabilidade celular, juntamente com o experimento de Vermelho Neutro (24h de tratamento com Ácido Asiático) e de proliferação celular (72h de tratamento com Ácido Asiático). Nossos achados mostram que o Ácido Asiático não é citotóxico em nenhuma das três concentrações testadas (1, 3 e 10 µg/ml), tanto no ensaio por MTT, quando no ensaio por VN (Figura 3). Entretanto, após 72h de tratamento, o composto em sua maior concentração (10 µg/ml) foi capaz de reduzir

significativamente a proliferação celular em $20,98 \pm 5,81\%$ em comparação com o grupo controle SFB 10% (Figura 4).

Como o teste de MTT verifica mais especificamente a viabilidade mitocondrial das células (MOSMANN, 1983; REILLY et al., 1998), fizeram-se necessários outros experimentos que quantificassem o material genético presente nas amostras, uma vez que, as atividades mitocondriais poderiam estar apenas comprometidas por algum motivo, denotando um falso indicativo de redução da abundância celular. Isto se sustenta por evidências anteriores da atuação do Ácido Asiático na diminuição de espécies reativas de oxigênio (SOO LEE *et al.* 2003; WANG, 2014), haja visto a importância da mitocôndria no balanço oxidativo celular e na produção de espécies reativas de oxigênio (TREBERG *et al.*, 2018), o método MTT poderia estar apenas indicando redução da atividade desta organela e não redução da proliferação celular propriamente dita.

Os estudos aqui já mencionados que se utilizaram de queratinócitos humanos (HaCaT) no contexto do Ácido Asiático, observaram dados relativos, majoritariamente, à expressão proteica (como de caspases, interleucinas 1β e 6, $TNF\alpha$, etc.), mas não verificaram a proliferação sob o aspecto da quantificação de DNA, há confirmação disso, tendo como base a revisão bibliográfica mais recente da farmacologia do Ácido Asiático, publicada neste ano (NAGOOR MEERAN *et al.*, 2018).

Para quantificar o DNA celular dos queratinócitos (HaCaT) após exposição ao Ácido Asiático, a fim de obter dados mais sólidos sobre as evidências anteriores de proliferação, foram selecionados dois ensaios: por CyQuant e por DAPI. Estes dois marcadores de ácidos nucleicos nos permitiram obter dados quantitativos e gráficos, que afirmam o efeito antiproliferativo do Ácido Asiático em suas duas maiores concentrações, reduzindo a porcentagem de densidade celular (medida por CyQuant) e reduzindo a contagem de células/campo (celularidade, medida por DAPI), ambos por microscopia de fluorescência (Figuras 5 e 6).

Tendo em vista a redução do número de células decorrente da exposição ao Ácido Asiático e a frequência dos relatos publicados sobre apoptose causada pelo triterpeno em carcinomas diversos e ausência de publicações que mencionam o mecanismo apoptótico em queratinócitos humanos (NAGOOR MEERAN *et al.*,

2018), foi estipulada a verificação da ocorrência de apoptose, por marcação de anexina, após o tratamento das células com Ácido Asiático.

Os dados obtidos revelaram que tanto a indução da hiperproliferação por SFB 10%, quanto as duas maiores concentrações de Ácido Asiático, aumentam a porcentagem de células apoptóticas com anexina marcada (Figura 7). A suplementação do meio DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino é um estímulo que desencadeia a hiperproliferação dos queratinócitos, chegando a uma camada confluenta de células semeadas dentro dos poços. A inibição por contato é um fenômeno muito observado em culturas celulares de linhagens como melanoma e queratinócitos humanos, em que o contato entre as células leva a uma redução da proliferação celular e a ausência do contato propicia a formação tumoral (divisões celulares), logo, aumentando o número de células, aumentam-se os contatos por elas estabelecidos, retardando a proliferação (MORAIS, 2007). O aumento da apoptose causado por SFB 10% pode ser decorrente da inibição por contato, causada por limitação espacial, dada a riqueza de nutrientes do meio e a hiperproliferação.

Ademais, foram obtidos aumentos significativos da apoptose em células tratadas pelas duas maiores concentrações de Ácido Asiático em comparação com o grupo veículo (SFB 10% + etanol 1%) (Figura 7), levando a crer que o mecanismo antiproliferativo deste composto em queratinócitos humanos é a apoptose.

No contexto das inflamações crônicas de pele e das patologias decorrentes do desbalanço entre divisão e diferenciação celular, que causam hiperproliferação de queratinócitos, como a psoríase, que tem ocorrência multifatorial e possui 20 regiões cromossômicas associadas ao fenótipo, é interessante a procura de drogas alternativas que sejam capazes de reduzir a hiperproliferação de queratinócitos e dispensar os efeitos colaterais das terapias mais adotadas atualmente contra lesões psoriáticas, como as terapias tópicas (corticosteróides, análogos da vitamina D e retinóides) e fototerapias (ultravioleta B, PUVA e climatoterapia) para casos mais leves; e para casos mais severos, terapias sistêmicas (metotrexato, retinóides e ciclosporina A) (SILVA, 2017).

O desequilíbrio entre a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas é uma característica da psoríase (TOMKOVA *et al.*, 1997). A pele normal e a psoriática expressam de formas distintas as proteínas que regulam a apoptose. A proteína anti-apoptótica mais abundante nos queratinócitos é a Bcl-xL, super

expressa em queratinócitos psoriáticos, quando comparado a células normais ou não envolvidas nas lesões. É estabelecida uma resistência à apoptose nestas células, através do bloqueio do processo apoptótico normal envolvido no programa de diferenciação terminal dos queratinócitos (SILVA, 2017). Sendo assim, é interessante pensar em um composto como o Ácido Asiático, que reverta este quadro, induzindo a apoptose de queratinócitos hiperproliferados e favorecendo a homeostase tecidual da pele em lesões psoriáticas.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que:

- O Ácido Asiático não tem efeito citotóxico sobre queratinócitos humanos (HaCaT) *in vitro* nas concentrações analisadas;
- O Ácido Asiático é capaz de modular a proliferação celular de queratinócitos (HaCaT) *in vitro*, reduzindo a proliferação em algumas concentrações analisadas.
- Um dos mecanismos pelo qual o Ácido Asiático reduz a proliferação celular de queratinócitos (HaCaT) *in vitro* é a apoptose.

De acordo com a literatura, a psoríase é um quadro de hiperproliferação de queratinócitos e inibição da apoptose, levando estas conclusões em consideração, o Ácido Asiático pode ser encarado como uma possibilidade para o tratamento de distúrbios hiperproliferativos da pele, como as lesões psoriáticas.

REFERÊNCIAS

- AHN, S. K. *et al.* Effects of a multilamellar emulsion on glucocorticoid-induced epidermal atrophy and barrier impairment. **J Dermatol**, v.33, n.2, Feb, p.80-90. 2006.
- AL-GAYYAR, M. M. *et al.* Protective effects of arjunolic acid against cardiac toxicity induced by oral sodium nitrite: effects on cytokine balance and apoptosis. **Life Sci**, v.111, n.1-2, Aug 28, p.18-26. 2014.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. **Science**, v.344, n.6189, Jun 13, p.1242281. 2014.
- BRADLEY, P. P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v.78, n.3, Mar, p.206-9. 1982.
- BUCKLE, D. R.; HEDGECOCK, C. J. R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. **Drug Discovery Today**, v.2, n.8, p.8. 1997.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, p.37-39. 2003.
- CARVALHO, P. E. R. Guaricica (*Vochysia bifalcata*). 2008.
- CLARK, R. A. Fibrin and wound healing. **Ann N Y Acad Sci**, v.936, p.355-67. 2001.
- CRAGG, G. M. *et al.* New horizons for old drugs and drug leads. **J Nat Prod**, v.77, n.3, Mar 28, p.703-23. 2014.
- DANNER, M. A. *et al.* Semihardwood cuttings of *Vochysia bifalcata*. **Scientia Agraria**, v.11, n.6, p.487-91. 2010.
- DATTNER, A. M. Herbal and complementary medicine in dermatology. **Dermatol Clin**, v.22, n.3, Jul, p.325-32, vii. 2004.
- DE YOUNG, L. M. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v.26, n.3-4, Mar, p.335-41. 1989.
- DEV, S. Impact of natural products in modern drug development. **Indian J Exp Biol**, v.48, n.3, Mar, p.191-8. 2010.
- DOROTA, W. *et al.* Effect of asiatic and ursolic acids on morphology, hydrophobicity, and adhesion of UPECs to uroepithelial cells. **Folia Microbiol (Praha)**, v.58, n.3, May, p.245-52. 2013.
- DZUBAK, P. *et al.* Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat Prod Rep**, v.23, n.3, Jun, p.394-411. 2006.

GABOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó. 2000

GABOR, M. Models of acute inflammation in the ear. **Methods Mol Biol**, v.225, p.129-37. 2003.

GHOSH, J. *et al.* Acetaminophen induced renal injury via oxidative stress and TNF-alpha production: therapeutic potential of arjunolic acid. **Toxicology**, v.268, n.1-2, Jan 31, p.8-18. 2010a.

_____. Arjunolic acid, a triterpenoid saponin, prevents acetaminophen (APAP)-induced liver and hepatocyte injury via the inhibition of APAP bioactivation and JNK-mediated mitochondrial protection. **Free Radic Biol Med**, v.48, n.4, Feb 15, p.535-53. 2010b.

GILL, S. E.; PARKS, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. **Int J Biochem Cell Biol**, v.40, n.6-7, p.1334-47. 2008.

GOMES RDE, C. *et al.* Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. **J Ethnopharmacol**, v.121, n.3, Jan 30, p.466-71. 2009.

GRIFFON, G.; MARCHAL, C.; MERLIN, J. L.; MARCHAL, S.; PARACHE, R. M.; BEY, P. Radiosensitivity of multicellular tumour spheroids obtained from human ovarian cancers. **European Journal of Cancer** 31A: 85–91, 1995.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v.453, n.7193, May 15, p.314-21. 2008.

HAO, Y.; HUANG, J. *et al.* Asiatic acid inhibits proliferation, migration and induces apoptosis by regulating Pdc4 via the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signaling pathway in human colon carcinoma cells. 15: 8223-8230, **Oncology Letters**, 2018.

HARVEY, A. L. *et al.* The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, v.14, n.2, Feb, p.111-29. 2015.

HEMALATHA, T. *et al.* Arjunolic acid: a novel phytomedicine with multifunctional therapeutic applications. **Indian J Exp Biol**, v.48, n.3, Mar, p.238-47. 2010.

HORINOUCI, C. D. Atividade anti-inflamatória tópica de *Vochysia bifalcata* Warm.: Potencial terapêutico para uma espécie de reflorestamento. 2013.

HSU, Y. L. *et al.* Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v.313, n.1, Apr, p.333-44. 2005.

HUANG, S. S. *et al.* Antinociceptive activities and the mechanisms of anti-inflammation of asiatic Acid in mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2011, p.895857. 2011.

IMPA, L. Murici (*Vochysia bifalcata*), Rio Preto, MG. Disponível em: <http://luis.impa.br/photo/1412_varios/>. Acesso em: 03.2015

ITO, M. *et al.* Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. **Nat Med**, v.11, n.12, Dec, p.1351-4. 2005.

KAPUSCINSKI, J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe, **Biotechnic & Histochemistry**, 70:5, 220-233, 1995

KILKENNY, C. *et al.* Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. **Br J Pharmacol**, v.160, n.7, Aug, p.1577-9. 2010.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Rev Mol Med**, v.13, p.e23. 2011.

LEE, Y. S. *et al.* Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis through intracellular Ca²⁺ release and enhanced expression of p53 in HepG2 human hepatoma cells. **Cancer Letters**, 186(1), 83–91, 2002.

LEVENSON, S. M. *et al.* The Healing of Rat Skin Wounds. **Ann Surg**, v.161, Feb, p.293-308. 1965.

MAN, M. Q. *et al.* Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. **Exp Dermatol**, v.17, n.8, Aug, p.681-7. 2008.

MANNA, P. *et al.* Streptozotocin induced activation of oxidative stress responsive splenic cell signaling pathways: protective role of arjunolic acid. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.244, n.2, Apr 15, p.114-29. 2010.

MEDDAHI, A. *et al.* New concepts in tissue repair: skin as an example. **Diabetes Metab**, v.22, n.4, Jul, p.274-8. 1996.

MENDES, D. A. *et al.* In vivo participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. **Eur J Pharmacol**, v.687, n.1-3, Jul 15, p.1-8. 2012.

MIRZA, M. B., ELKADY, A. I., AL-ATTAR, A. M., SYED, F. Q., MOHAMMED, F. A., & HAKEEM, K. R. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by ethyl acetate fraction of *Phoenix dactylifera* L. (Ajwa dates) in prostate cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, 218, 35–44, 2018.

MORAIS, M. C. C. *et al.* Stochastic model of contact inhibition and the proliferation of melanoma in situ . **Scientific Reports**, 7(1), 2017.

MOSMANN, T. *et al.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation a cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n. 1-2, Dec 16, p. 55-63, 1983.

NAGOOR MEERAN, M. F. *et al.* Pharmacological Properties, Molecular Mechanisms, and Pharmaceutical Development of Asiatic Acid: A Pentacyclic Triterpenoid of Therapeutic Promise. **Frontiers in Pharmacology**, 9, 2018.

NESTLE, F. O. *et al.* Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.10, Oct, p.679-91. 2009.

NETO, F. C. Vochysiaceae: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. **Phytochemistry Reviews** v.10, p.16. 2011.

OTUKI, M. F. *et al.* Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur J Pharmacol**, v.507, n.1-3, Jan 10, p.253-9. 2005.

PIETROVSKI, E. F. *et al.* B1 and B2 kinin receptor participation in hyperproliferative and inflammatory skin processes in mice. **J Dermatol Sci**, v.64, n.1, Oct, p.23-30. 2011.

PROKSCH, E. *et al.* The skin: an indispensable barrier. **Exp Dermatol**, v.17, n.12, Dec, p.1063-72. 2008.

RAMACHANDRAN, V.; SARAVANAN, R. Efficacy of asiatic acid, a pentacyclic triterpene on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v.20, n.3-4, Feb 15, p.230-6. 2013.

REICH, K. *et al.* Development of an adherence-enhancing intervention in topical treatment termed the topical treatment optimization program (TTOP). **Arch Dermatol Res**, v.306, n.7, Sep, p.667-76. 2014.

RICKLI, H. C. **Propagação de Guaricica (*Vochysia bifalcata* Warm.) por sementes e estaquia caulinar**. 102 p. (Doutorado). Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ROSS, R.; ODLAND, G. Human wound repair. II. Inflammatory cells, epithelial-mesenchymal interrelations, and fibrogenesis. **J Cell Biol**, v.39, n.1, Oct, p.152-68. 1968.

SALVADOR, J. A. *et al.* Ursane-type pentacyclic triterpenoids as useful platforms to discover anticancer drugs. **Nat Prod Rep**, v.29, n.12, Dec, p.1463-79. 2012.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochem Pharmacol**, v.58, n.5, Sep 1, p.877-9. 1999.

SANTOS, E. N. *et al.* Anti-inflammatory, antinociceptive, and antipyretic effects of methanol extract of *Cariniana rubra* stem bark in animal models. **An Acad Bras Cienc**, v.83, n.2, Jun, p.557-66. 2011.

SHERIF, I. O. *et al.* Cisplatin-induced testicular toxicity in rats: the protective effect of arjunolic acid. **J Biochem Mol Toxicol**, v.28, n.11, Nov, p.515-21. 2014.

SILVA, C. D. Efeito antiproliferativo da inosina. (Dissertação de Mestrado). Curitiba, 2017.

SOO LEE, Y.; JIN, D.-Q.; BEAK, S.-M.; LEE, E.-S.; & KIM, J.-A. Inhibition of ultraviolet-A-modulated signaling pathways by asiatic acid and ursolic acid in HaCaT human keratinocytes. **European Journal of Pharmacology**, 476(3), 173–178, 2003.

STANLEY, P. L. *et al.* Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol**, v.4, n.4, p.262-71. 1991.

SUN, B. K. *et al.* Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v.346, n.6212, Nov 21, p.941-5. 2014.

TANG, L. X. *et al.* Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling in vivo and in vitro. **PLoS One**, v.7, n.2, p.e31350. 2012.

TOMASEK, J. J. *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, n.5, May, p.349-63. 2002.

TOMKOVA *et al.* Expression of the bcl-2 homologue bax in normal human skin, psoriasis vulgaris and non-melanoma skin cancers. [Eur J Dermatol](#). Jun;8(4):256-60, 1998

TREBERG, J. R.; BRAUN, K.; & SELSELEH, P. Mitochondria can act as energy-sensing regulators of hydrogen peroxide availability. **Redox Biology**, 20, 483–488, 2018.

VIANNA, M. C. Vochysiaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v.57, n.3, p.8. 2006.

WANG, Z.-H. . Anti-glycative effects of asiatic acid in human keratinocyte cells. **BioMedicine**, 4(3), p. 19-28, Aug 2014.

WENIGER, B. *et al.* Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytother Res**, v.19, n.1, Jan, p.75-7. 2005.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sci**, v.58, n.18, p.1485-507. 1996.

WITTMANN, M. *et al.* Cytokines as therapeutic targets in skin inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.25, n.4, Aug, p.443-51. 2014.

XIONG, H. *et al.* Glycyrrhizin Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Lesions in BALB/c Mice and Inhibits TNF-alpha-Induced ICAM-1 Expression via NF-kappaB/MAPK in HaCaT Cells. **Cell Physiol Biochem**, v.35, n.4, Feb 12, p.1335-1346. 2015.

YOUNG, M. C. *et al.* Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnioides*. **J Nat Prod**, v.61, n.7, Jul, p.936-8. 1998.

YUN, K. J. *et al.* Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. **Int Immunopharmacol**, v.8, n.3, Mar, p.431-41. 2008.

ZHANG, A. *et al.* Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. **Eur J Med Chem**, v.63, May, p.570-7. 2013a.

ZHANG, J. *et al.* Asiatic acid, a triterpene, inhibits cell proliferation through regulating the expression of focal adhesion kinase in multiple myeloma cells. **Oncol Lett**, v.6, n.6, Dec, p.1762-1766. 2013b.

ZHANG, J. *et al.* Quality of herbal medicines: challenges and solutions. **Complement Ther Med**, v.20, n.1-2, Feb-Apr, p.100-6. 2012.