

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E
BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA

STEFANIE NOLTE DYKSTRA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRITERPENO 3B,6B,16B-TRIHIDROXILUP-
20(29)-ENO (TTHL) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS
HUMANOS (HACAT)**

PONTA GROSSA

2013

STEFANIE NOLTE DYKSTRA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRITERPENO 3B,6B,16B-TRIHIDROXILUP-
20(29)-ENO (TTHL) SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS
HUMANOS (HACAT)**

Dissertação desenvolvida como requisito Parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

PONTA GROSSA

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

D996 Dykstra, Stefanie Nolte
Investigação do efeito do Triterpeno
3B,6B,16B-Trihidroxilup-20(29)-eno
(TTHL) sobre a proliferação de
queratinócitos humanos (Hacat)/ Stefanie
Nolte Dykstra. Ponta Grossa, 2013.
74f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biocências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith
Otuki.

1. *Combretum leprosum*. 2. TTHL.
3. Psoríase. 4. Hiperproliferação
epidermal. I. Otuki, Michel Fleith. II.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências Farmacêuticas. III.
T.

CDD: 615.5

TERMO DE APROVAÇÃO

STEFANIE NOLTE DYKSTRA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO TRITERPENO 3B,6B,16B-TRIHIDROXILUP-
20(29)-ENO (TTHL) SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT)**

Dissertação aprovada em 21 de fevereiro de 2013 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



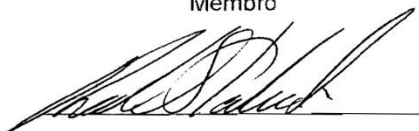
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki - UEPG

Orientador/Presidente



Profa. Dra. Cibele Campos Cardoso – UFPR

Membro



Profa. Dra. Katia Paludo - UEPG

Membro

PONTA GROSSA – PR

2013

"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."

Galileu Galilei

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter guiado meus passos, me conservado com saúde, me dado sabedoria, força e perseverança durante esses dois anos. Por ter me dado esta oportunidade e colocado pessoas tão queridas em meu caminho durante esse período.

Aos meus pais, Frederico e Helena, pelo amor, apoio, incentivo e paciência. Por sempre estarem ao meu lado e por acreditarem no meu potencial. Vocês são exemplos de luta e perseverança, e são as pessoas nas quais busco me espelhar. Amo vocês.

Ao meu marido Robert pela sua enorme paciência, compreensão, e pelo seu imenso amor, todos os dias. Eu tenho tanto pra te falar, mas com palavras não sei dizer, como é grande o meu amor por você.

Ao meu orientador Michel Otuki pela oportunidade, orientação, pelos ensinamentos, dedicação e paciência durante o mestrado.

Aos meus colegas de laboratório da UFPR e UEPG. Camila, Priscila, Cíntia, Andressa, Bruna, Luise, Verlaine, Graziela, Daniel, Arthur, Bruno e Daniela, pela ajuda, pela paciência, pelos ensinamentos, troca de conhecimentos e pela amizade. Compartilhar momentos com vocês foi de extrema importância e aprendizado.

Aos meus colegas de mestrado, pela força durante esse período, pela troca de conhecimentos e pela amizade que desenvolvemos. Foi um prazer estudar e trabalhar com vocês: Yvanna, Thais, Francine, Débora, Willian, Anelise, Antonio, Daniela, Gisele, Fernanda, Martinha.

RESUMO

Introdução: A psoríase é uma doença inflamatória cutânea caracterizada pela hiperproliferação e diferenciação incompleta de queratinócitos na epiderme. O tratamento tem como objetivo reduzir a formação de placas psoriáticas, porém muitos regimes terapêuticos não produzem resultados satisfatórios. Buscando alternativas, este trabalho avaliou o possível efeito do composto TTHL, isolado do extrato etanólico de *Combretum leprosum*, sobre a proliferação de HaCaT.

Métodos: A viabilidade celular foi avaliada 24 horas após o tratamento com diferentes concentrações de TTHL, através do método de MTT e vermelho neutro. Para avaliar a atividade antiproliferativa, as células foram tratadas com diferentes concentrações de TTHL, em dias alternados e analisadas através do método de MTT e Cyquant. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo. A possível toxicidade pela aplicação tópica do TTHL foi avaliada *in vivo*, pelo ensaio de atrofia cutânea, através da medida da espessura da orelha dos animais e histologia.

Resultados: No ensaio de MTT, após 24 horas, o TTHL, apresentou atividade citotóxica nas células HaCaT, nas concentrações de 5, 7, 9 e 10 μM , diminuindo, respectivamente em 53,54, 89,53, 89,69 e 90,30 $\pm$ 5,84% a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle. No ensaio de vermelho neutro, essas mesmas concentrações diminuíram 39,83%, 48,67%, 47,78% e 50,44 $\pm$ 4,42%, respectivamente. No ensaio de proliferação celular, nas concentrações de 5, 7 e 10 μM , observou-se diminuição de 24,27%, 59,25% e 82,30% $\pm$ 5,96% no número de células, conforme o método de MTT e 30,30%, 59,59% e 90,90% $\pm$ 6,03% conforme o método de Cyquant. No ensaio de ciclo celular observou-se que nas concentrações de 5, 7 e 10 μM o número de células não viáveis foi maior e estatisticamente significante quando comparado com o grupo controle. Através do ensaio de atrofia cutânea foi possível concluir que o TTHL não causa atrofia.

Conclusão: O TTHL é capaz de diminuir a viabilidade celular. Esses dados sugerem que o TTHL possa ser uma possível ferramenta para o tratamento de doenças hiperproliferativas, dentre elas, a psoríase. Entretanto, estudos adicionais são necessários para verificar o mecanismo de ação e segurança do triterpeno.

Palavras-chave: *Combretum leprosum*, TTHL, psoríase, hiperproliferação epidermal.

ABSTRACT

Introduction: Psoriasis is a skin inflammatory disease characterized by keratinocytes hyperproliferation and their incomplete differentiation in the epidermis. Treatment aims to reduce the psoriatic plaques formation; however, many therapeutic regimens do not produce satisfactory results. Searching for new alternatives, this study evaluated the possible effect of the TTHL compound, isolated from the ethanolic extract of *Combretum leprosum*, on HaCaT proliferation.

Methods: The cellular viability was assessed 24 hours after the treatment with different concentrations of TTHL through MTT and neutral red methods. To evaluate the TTHL anti-proliferative activity, the cells were treated with different concentrations of TTHL, in alternate days (96 hours) and analyzed through MTT and Cyquant methods. The cell cycle was evaluated by flow cytometry. The possible toxicity by the topical application of the TTHL (0.3 mg/ear) was assessed *in vivo*, through skin atrophy, by measuring ear thickness of animals and histology.

Results: The MTT assay showed, after 24 hours, that TTHL presents cytotoxic activity in HaCaT cells, at the concentrations of 5, 7, 9 and 10 μ M, decreasing, respectively, 53.54, 89.53, 89.69 and $90.30 \pm 5.84\%$ the cellular viability compared to the control group. The neutral red assay, in the same concentrations, decreased 39.83%, 48.67%, 47.78% and $50.44 \pm 4.42\%$, respectively. In the cellular proliferation assay, the 5, 7 and 10 μ M concentrations decreased 24.27%, 59.25% and $82.30\% \pm 5.96\%$ the cells number, as showed in the MTT method, and 30.30%, 59.59% e $90.90\% \pm 6.03\%$ as showed in the Cyquant method. The cell cycle assay showed that, at the concentrations of 5, 7 and 10 μ M, the non-viable cells number was higher and statistically significant when compared to the control group. Through the skin atrophy assay was possible to conclude that TTHL does not cause atrophy.

Conclusion: TTHL is capable of reducing cell viability. These data suggest that TTHL might be a possible tool for the treatment of hyperproliferative diseases, among them, psoriasis. However, additional studies are needed to verify the action mechanism and triterpene safety.

Key words: *Combretum leprosum*, TTHL, psoriasis, epidermal hyperproliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele	12
Figura 2. Estratos da epiderme	14
Figura 3. Esquema da proliferação e diferenciação dos queratinócitos e seus marcadores biológicos	17
Figura 4. Placa psoriática no cotovelo.....	20
Figura 5. Evolução da lesão psoriática no curso da psoríase	24
Figura 6. Comparação da expressão dos marcadores de proliferação e diferenciação dos estratos da epiderme na pele normal (A) e na psoríase (B)	27
Figura 7. <i>Combretum leprosum</i> (Mofumbo). Planta inteira (A) e partes aéreas (B) ..	31
Figura 8. Estrutura molecular do triterpeno TTHL.	33
Figura 9. Atividade citotóxica do TTHL em células HaCaT (MTT).....	43
Figura 10. Atividade citotóxica do TTHL em células HaCaT (Vermelho Neutro)	44
Figura 11. Atividade antiproliferativa do TTHL em células HaCaT (MTT)	45
Figura 12. Atividade antiproliferativa do TTHL em células HaCaT (Cyquant)	46
Figura 13. Avaliação das fases do ciclo celular após o tratamento com o TTHL – 96 horas	47
Figura 14. Representação do ciclo celular no programa WinMDI 2.8 (96 horas)	48
Figura 15. Avaliação da porcentagem de células não viáveis após o tratamento com o TTHL	49
Figura 16. Avaliação da porcentagem de células presentes na fase G0/G1 do ciclo celular após o tratamento com o TTHL	49
Figura 17. Avaliação da porcentagem de células presentes na fase S/G2/M do ciclo celular após o tratamento com o TTHL	50
Figura 18. Avaliação das fases do ciclo celular após o tratamento com o TTHL – 48 horas	51
Figura 19. Avaliação da porcentagem de células não viáveis após o tratamento com o TTHL	52
Figura 20. Avaliação da porcentagem de células presentes na fase G0/G1 do ciclo celular após o tratamento com o TTHL	52
Figura 21. Avaliação da porcentagem de células presentes na fase S/G2/M do ciclo celular após o tratamento com o TTHL	53
Figura 22. Espessura das orelhas dos camundongos.....	54
Figura 23. Análise histológica da espessura da derme	54

Figura 24. Fotos representativas dos cortes histológicos de orelha de camundongo corados com Tricômico de Masson.....	55
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPs: Peptídeos antimicrobianos

APCs: Células apresentadoras de antígenos

CDKs: Quinases dependentes de ciclinas

Cip: Inibidor das quinases dependentes de ciclinas

EGF: Fator de crescimento epidermal

FGF-7: Fator de crescimento de fibroblastos-7

HLA: Antígeno leucocitário humano

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

IL: Interleucina

INF- γ : Interferon-gama

INF- α : Interferon-alfa

K (1, 2, 5, 10, 14, 16, 17): Queratina

KGF: Fator de crescimento de queratinócitos

Kip: Inibidor das quinases dependentes de ciclinas

LFA-1: Antígeno associado à função leucocitária-1

LFA-3: Antígeno associado à função leucocitária-3

MHC I: Complexo Principal de Histocompatibilidade I

MHC II: Complexo Principal de Histocompatibilidade II

PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular

RB: Proteína retinoblastoma

SALT: Tecido linfóide associado à pele

SFB: Soro fetal bovino

TCR: Receptor de células T

TGF- α : Fator de crescimento transformante-alfa

TGF- β : Fator de crescimento transformante-beta

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol acetato

TTHL: Triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup- 20(29)-eno

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 Pele	12
1.2 Proliferação e diferenciação celular	15
1.3 Psoríase	19
1.4 Tratamento da Psoríase	28
1.5 Plantas medicinais	30
1.6 <i>Combretum Leprosum</i> Mart. & Eich (Combretaceae)	31
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Drogas e reagentes	36
3.2 Material botânico	36
3.3 Obtenção do Extrato etanólico e isolamento, purificação e identificação química do composto	36
3.4 Cultura celular	37
3.5 Ensaio de citotoxicidade – MTT	37
3.6 Ensaio de citotoxicidade – Vermelho Neutro	38
3.7 Protocolo de Proliferação	39
3.8 Ensaio de Cyquant	39
3.9 Avaliação do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	40
3.10 Animais e Manutenção	40
3.11 Ensaio de atrofia cutânea em camundongos	41
3.12 Análise Histológica	41
3.13 Análise Estatística	42
4. RESULTADOS	43
4.1 Atividade citotóxica do TTHL – MTT	43
4.2 Atividade citotóxica do TTHL – Vermelho Neutro	44
4.3 Atividade antiproliferativa do TTHL	44
4.4 Avaliação do ciclo celular – 96 horas	46
4.5 Avaliação do ciclo celular – 48 horas	50

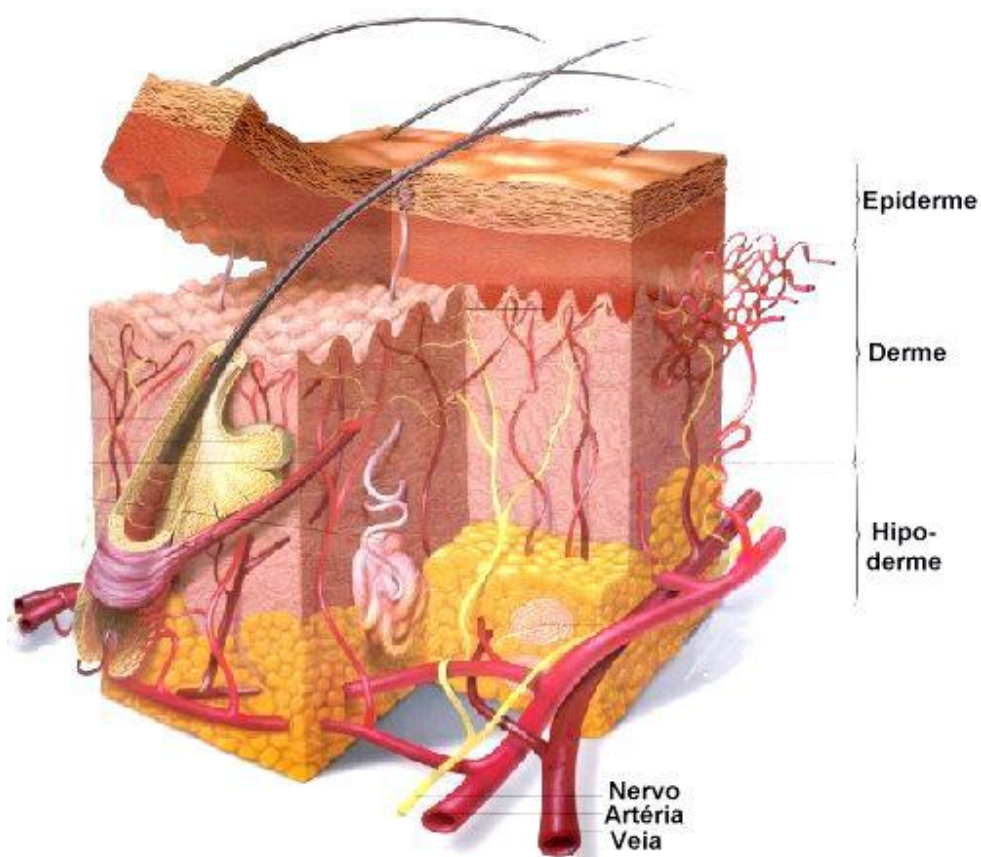
4.6 Ensaio de atrofia cutânea em camundongos	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Pele

A pele, com sua área aproximada de $1,8 \text{ m}^2$, é o maior órgão do corpo humano e reveste todo nosso organismo. Por apresentar contato direto com o ambiente externo, a pele está frequentemente sujeita a lesões e invasão por patógenos (Di Meglio *et al.*, 2011). Este órgão é dividido estruturalmente e funcionalmente em três camadas distintas: externamente encontra-se a epiderme a qual está separada por uma membrana basal (junção dermo-epidérmica) da camada intermediária, a derme. Abaixo da derme encontra-se a camada mais interna da pele, chamada hipoderme ou tecido adiposo subcutâneo (Fig. 1) (Proksch *et al.*, 2008).

Figura 1. Camadas da pele

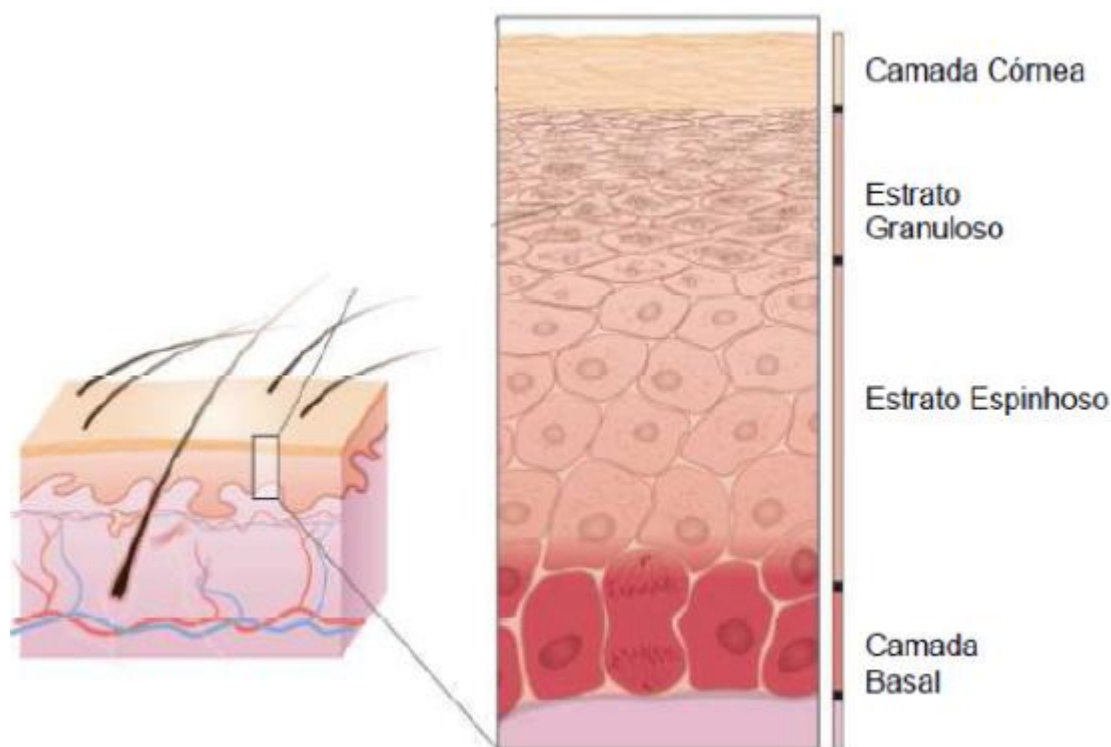


A pele é dividida em três camadas: a epiderme (camada mais externa), derme (camada intermediária) e hipoderme (camada mais interna).

O fato de estar constantemente exposta a riscos potenciais exige da pele a execução de numerosas funções com o objetivo de manter a homeostase, essencial para nossa saúde (Di Meglio *et al.*, 2011). A pele atua como uma importante barreira física, bioquímica e imunológica contra insultos patogênicos. A barreira física consiste, principalmente, de estrato córneo composto por queratinócitos, os quais produzem a proteína impermeável queratina. Os queratinócitos presentes neste estrato formam uma barreira física contra traumas e estresse mecânico. Além disso, essa barreira evita a perda de água e entrada de toxinas solúveis em água, e protege o organismo contra infecções por bactérias e outros patógenos (Denning, 2004). A barreira biológica inclui lipídeos, ácidos, enzimas hidrolíticas, peptídeos antimicrobianos (AMPs) e macrófagos. E por fim, a barreira imunológica, ou sistema imune da pele (originalmente conhecida como tecido linfóide associado à pele - SALT) (Bos e Kapsenberg, 1993; Streilein, 1983), que é composta por constituintes humorais e celulares do sistema imune (Nestle, Di Meglio *et al.*, 2009). Desta forma, a pele proporciona respostas imunes adequadas contra traumas, toxinas, infecções e mantém a autotolerância, prevenindo alergias e inibindo a autoimunidade. A pele protege, inclusive, os tecidos mais profundos do organismo, além disso, garante adequada hidratação, regula a temperatura corporal e permite a síntese de vitaminas e hormônios (Di Meglio *et al.*, 2011).

A epiderme é uma camada estratificada de células epiteliais escamosas que sofre um processo contínuo de auto-renovação e é composta por quatro estratos (camadas) (Fig. 2): estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo, que são formados por queratinócitos com diferentes características e que se diferenciam à medida que vão do estrato basal para o estrato córneo (Proksch *et al.*, 2008; Freinkel e Woodley, 2001). Além dos queratinócitos, estão presentes na epiderme os melanócitos (produtores de melanina), as células de Langerhans (células imunes), linfócitos T (principalmente CD8+), e as células de Merkel (células de terminações nervosas) (Di Meglio *et al.*, 2011).

Figura 2. Estratos da epiderme



A epiderme é formada pelos estratos: Basal, Espinhoso, Granuloso e Córneo

Fonte: Adaptado de Segre, 2006

A epiderme não possui vasos sanguíneos, entretanto, o fato de estar intimamente apoiada à derme através da membrana basal, permite que esta receba suporte sanguíneo e nutrientes da derme (Makrantonaki e Zouboulis, 2007).

A derme encontra-se abaixo da epiderme, e pode ser dividida em duas camadas distintas. A primeira delas é a derme papilar, localizada em contato direto com a epiderme e constituída por tecido conjuntivo frouxo contendo pequenas fibras de elastina e colágeno, bem como vasos sanguíneos e vasos linfáticos. A outra camada é a derme reticular, localizada entre a derme papilar e o tecido celular subcutâneo, constituída por tecido conjuntivo denso, composto por fibras colágenas grossas, tornando-se assim uma zona responsável pela absorção de choques mecânicos. As fibras colágenas oferecem uma barreira mecânica e uma estrutura que acolhe vasos sanguíneos e células imunes, como, células dendríticas dérmicas, células T, células natural killer (NK), células B, mastócitos e macrófagos (Di Meglio *et al.*, 2011). A derme é drenada por canais linfáticos e vasculares, pelos quais as células migratórias podem trafegar (Nickoloff, 1993). Na derme também são

encontrados os fibroblastos, os quais produzem a matriz extracelular, colágeno e elastina, conferindo à pele elasticidade e tonicidade (Junqueira *et al.*, 2008).

Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, a parte mais profunda da pele. Esta camada é composta por tecido conjuntivo que envolve células gordurosas, os adipócitos, e age como isolante térmico e tecido de reserva de energia (Rook *et al.*, 2004). Subdivide-se a hipoderme em duas camadas: uma superficial, caracterizada por fibras de reticulina perpendiculares ao plano cutâneo e uma profunda, com fibras de reticulina paralelas (Proksch *et al.*, 2008).

1.2 Proliferação e diferenciação celular

Na epiderme, os queratinócitos sofrem dois processos: proliferação e diferenciação (queratinização). Esse fenômeno começa no estrato basal e progride para o estrato córneo, levando aproximadamente 30 dias para ser concluído. Em cada estrato, os queratinócitos sofrem alterações fisiológicas e morfológicas e expressam diferentes queratinas (proteínas do citoesqueleto), que são marcadores específicos necessários para levá-los para a camada superior (Latkowski *et al.*, 1995; Proksch *et al.*, 2008; Freinkel e Woodley, 2001; Tobin, 2006).

Um balanço controlado e coordenado entre o sistema imune e os processos de proliferação e diferenciação celular é importante para a reparação de feridas. Os queratinócitos são importantes no processo de reepitelização da pele, uma vez que são as células predominantes na epiderme. Durante a reparação de feridas, os queratinócitos executam processos complexos que desencadeiam a inflamação e também a proliferação celular para manter a estrutura e a função da epiderme (Eckert *et al.*, 2002).

O que define a estrutura e força do citoesqueleto dos queratinócitos são as queratinas, que são proteínas de filamentos intermediários. Existe cerca de 30 queratinas identificadas, que pertencem a duas famílias, a família com proteínas básicas e neutras (tipo I) e a família com proteínas ácidas (tipo II) (Latkowski *et al.*, 1995). As diferentes camadas da epiderme contêm quantidades variadas de queratina, variando de 30% na camada basal, a 80% na camada córnea. Cada tipo celular expressa no mínimo um par de queratinas: uma queratina Tipo I junto com uma queratina Tipo II. Quando uma queratina é expressa, seu par também é

expresso, caso ocorra uma inibição da expressão de um par de queratinas, o outro par também será inibido (Tobin, 2006).

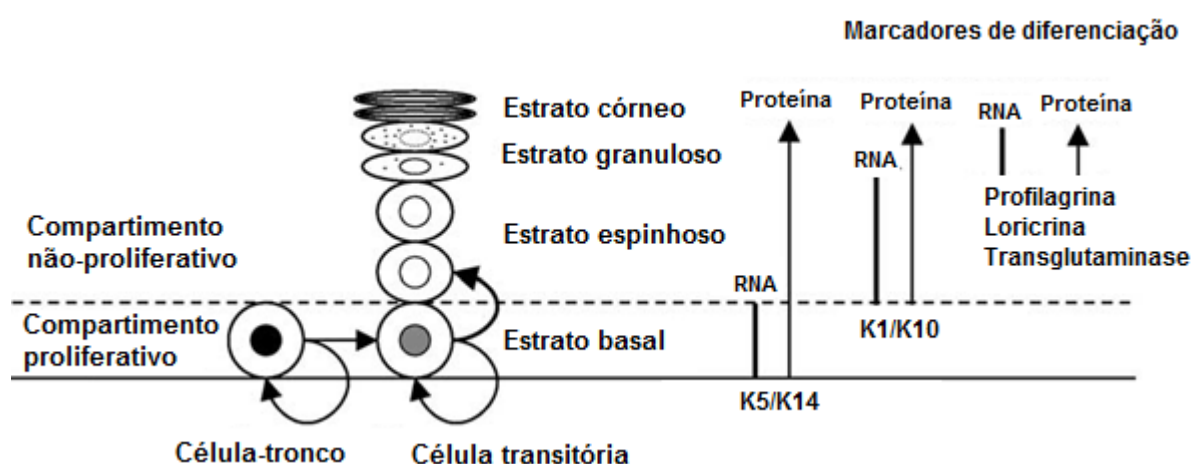
A proliferação dos queratinócitos é regulada por marcadores celulares. Esse controle é realizado na fase G1 do ciclo celular, principalmente por quinases dependentes de ciclinas (cdks); cdk2, cdk4 e cdk6; que são ativadas pela ligação com ciclinas apropriadas. As ciclinas D (D1, D2 e D3) ativam as cdk4/6, enquanto que as ciclinas E e A ativam a cdk2. A atividade das cdks é modulada pelos inibidores das quinases dependentes de ciclinas, Cip1 e Kip1. Quando as quinases dependentes de ciclinas são ativadas, ocorre progressão do ciclo celular (Gniadecki, 1998).

A proliferação celular ocorre no estrato basal, a camada mais profunda da epiderme, e contém apenas uma camada de células epidérmicas indiferenciadas, conhecidas como queratinócitos basais, que se dividem frequentemente. Este estrato é composto por *stem cells* (células-tronco) e células transitórias. O estrato basal interage com a membrana basal que exerce influência sobre a taxa de proliferação. Essas células caracterizam-se pela presença da queratina 5 (K5) e 14 (K14), marcadores de proliferação. À medida que o queratinócito migra da camada basal, adquire gradualmente quantidades crescentes de queratina, e torna-se gradativamente mais achatado (Proksch *et al.*, 2008; Freinkel e Woodley, 2001). Quando os queratinócitos deixam o compartimento basal e param de proliferar, inicia-se, no estrato seguinte, o espinhoso, o processo de diferenciação (Denning, 2004).

No estrato espinhoso, devido ao grande número de desmossomos, essas células mudam da forma colunar para poligonal. Neste estrato, os queratinócitos começam a sintetizar queratinas distintas das queratinas do estrato basal, passam a expressar marcadores bioquímicos do processo de diferenciação. As células do estrato espinhoso expressam queratina 1 (K1) e 10 (K10). Em seguida, essas células movem-se para o estrato granuloso, onde são caracterizados por aglomerados escuros do material citoplasmático e produzem queratina, proteínas e lipídeos. Nos queratinócitos do estrato granuloso são expressas proteínas associadas com os estágios posteriores da diferenciação, como a profilagrina, filagrina, transglutaminase-I e precursores do envelope de cornificação como a involucrina e loricrina (Tu *et al.*, 2004; Proksch *et al.*, 2008).

Finalmente, estas células movem-se para o estrato córneo, produto final dos queratinócitos maduros. Este é o estrato mais externo da epiderme e é o grande responsável pela função de barreira da pele, que exclui diversos agentes tóxicos e previne a desidratação. As células nesta camada, conhecidas como corneócitos, são queratinócitos mortos, desprovidos de organelas e núcleo. Estas células anucleadas contêm no seu interior filamentos de queratina, que contribuem para a formação do citoesqueleto celular, e são circundadas por um envelope celular composto de proteínas com ligações cruzadas, o envelope cornificado (Proksch *et al.*, 2008; Tobin, 2006). O balanço entre a proliferação e a diferenciação dos queratinócitos é essencial para que ocorra a construção de uma barreira funcional apropriada (Eckert *et al.*, 1997) (Fig. 3).

Figura 3. Esquema da proliferação e diferenciação dos queratinócitos e seus marcadores biológicos



Fonte: Denning, 2004.

Além das queratinas, o cálcio também apresenta um papel regulatório importante na proliferação e diferenciação dos queratinócitos, separando as células do estrato basal e movendo-as de um estrato para outro. A elevação da concentração de cálcio leva a mudanças morfológicas características como a formação de desmossomos, estratificação e cornificação. A adição de cálcio *in vitro* leva a um aumento da proliferação e diferenciação celular e a expressão de diferentes marcadores, como K1/K2, filagrina, involucrina e loricrina (Tu *et al.*, 2004; Denning, 2004; Tobin, 2006). Desta forma, o cálcio é essencial para a manutenção

da homeostase da epiderme e, além disso, está profundamente envolvido com a restauração da camada córnea danificada (Denda *et al.*, 2000).

A diferenciação dos queratinócitos pode, também, ser modulada por hormônios e vitaminas que agem como ligantes nos receptores que são expressos no núcleo celular. A ocupação desses receptores influencia a expressão de múltiplos genes envolvidos na diferenciação celular (Tobin, 2006).

Fatores de crescimento também são capazes de regular a expressão do gene da queratina. O fator de crescimento transformante-alfa (TGF α) e o fator de crescimento epidermal (EGF) induzem especificamente os genes que codificam K6 e K16, enquanto o fator de crescimento transformante-beta (TGF β) induz K5 e K14 e o Interferon gama (INF- γ) induz especificamente o gene K17. Esses moduladores também tem um efeito intenso na proliferação dos queratinócitos, uma vez que EGF e TGF α estimulam a proliferação enquanto TGF β inibe. Tanto EGF quanto TGF β são capazes de ativar os queratinócitos através da via parácrina e autócrina, visto que são secretados tanto por fibroblastos quanto por queratinócitos. O fator de crescimento de queratinócito (KGF) também chamado de fator de crescimento de fibroblasto (FGF-7) é um modulador, que tem considerável efeito na proliferação de queratinócitos e caracteriza-se por ser um modulador parácrino. Ele é liberado por fibroblastos da derme e demonstrou ser um potente mitógeno específico em queratinócitos epidérmicos (Latkowski *et al.*, 1995).

Outro fenômeno envolvido na manutenção da homeostase das células da pele é a apoptose. A apoptose é um processo fisiológico ativo que regula a proliferação dos queratinócitos, o crescimento epidérmico, além de permitir a eliminação de células disfuncionais sem envolver a resposta inflamatória. Esse processo é altamente regulado por múltiplos reguladores positivos e negativos e por diversos transdutores que supervisionam cautelosamente a progressão celular adequada. A indução da apoptose pode ocorrer por duas vias: a via intrínseca ou mitocondrial e a via extrínseca ou via receptores de morte (Lerman *et al.*, 2011). Evidências mostram que anormalidades no fenômeno de apoptose tem um papel importante na patogênese de diversas doenças autoimunes (Kurrer *et al.*, 1997).

Os queratinócitos, além de formar uma barreira mecânica, exercem um papel dinâmico e crítico na iniciação, manutenção e regulação das respostas imunes da pele (Denning, 2004). Estas células fazem parte do sistema imune inato e respondem a estímulos antigênicos de maneira rápida e não específica. Apesar de

não serem clássicas células apresentadoras de antígenos, eles são capazes de processar e apresentar antígenos às células T (Perera *et al.*, 2012).

Desta forma, para que ocorra um bom funcionamento da pele, é necessário que haja tanto um balanço pró- e anti-apoptótico quanto pró-mitótico e pró-diferenciação. Assim, é possível manter uma pele saudável. Entender a regulação da proliferação e diferenciação dos queratinócitos é importante uma vez que distúrbios no crescimento e maturação dos queratinócitos podem causar muitas doenças comuns de pele, como psoríase, feridas cutâneas crônicas, queratose actínica e câncer de pele (Gniadecki, 1998).

1.3 Psoríase

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele, que afeta cerca de 1 a 3% da população mundial (Jacobson *et al.*, 2011), variando conforme raça e localização geográfica e comprometendo a qualidade de vida dos pacientes (Bhalerao e Bowcock, 1998). Inicialmente acreditava-se que era uma variante da lepra (De Jong, 1997) e foi apenas em 1841 que von Hebra identificou-a como uma doença única (Schon e Boehncke, 2005).

Diversos fatores têm sido associados com surtos de psoríase, como estresse físico e psicológico, fatores metabólicos, tabagismo, administração de algumas drogas, como: lítio (Bakker e Peppinkhuizen, 1976), betabloqueadores (Abel *et al.*, 1986) e antiinflamatórios não esteroidais (Tsankov *et al.*, 2000); infecções e traumas (Cassano *et al.*, 2011). Acredita-se que alguns fatores ambientais possam desencadear, em indivíduos geneticamente predispostos, alterações imunológicas que dão origem a doença (Gladman *et al.*, 1998). Aproximadamente 20 regiões cromossômicas foram associadas a psoríase (Lowe *et al.*, 2007), incluindo o locus PSORS1 (Griffiths e Barker, 2007). Esse locus é o mais amplamente estudado, e localiza-se na região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), no cromossomo 6p21, que contém genes que codificam proteínas relacionadas à função do sistema imune, entre eles, os genes do HLA (Antígeno Leucocitário Humano) (Krueger e Ellis, 2005). HLA-Cw6 é considerado o maior determinante genético da psoríase. Porém, outros estudos mostram diversos genes de risco não relacionados com HLA, como por exemplo, IL-12B e IL-23R (Li e Begovich, 2009).

A psoríase pode começar em qualquer idade, porém durante dois períodos da vida é mais comum aparecer: entre os 15 e 25 anos e entre os 50 e 60 anos de idade (Feingold e Grunfeld, 2012). Uma das características desta doença é a formação, em grande escala, de placas eritematosas acentuadamente demarcadas que ocorrem principalmente, em locais de grande tensão, por exemplo, onde a pele é esticada ou apresenta dobras (Fig. 4). Os cotovelos, joelhos e couro cabeludo estão envolvidos na maioria dos pacientes (Griffiths e Barker, 2007). A formação dessas cascas, e a ruptura da barreira protetora, são causadas pela diferenciação anormal dos queratinócitos e pela falha destes em se empilharem normalmente, secretarem lipídios extracelulares e aderir uns aos outros (Lowe *et al.*, 2007). As manifestações cutâneas levam a considerável morbidade e a carga emocional da psoríase severa mostra-se similar a aquelas vistas em pacientes com câncer, diabetes e problemas de coração (Feingold e Grunfeld, 2012).

Figura 4. Placa psoriática no cotovelo



Fonte: Clarke, 2011.

Apesar das lesões psoriáticas exibirem características específicas, elas podem manifestar-se de diferentes formas, o que permitiu dividi-las em diferentes tipos. Essas diferentes formas podem ser localizadas ou dispersas e desenvolverem um curso variável apresentando-se como agudas ou crônicas (Langley *et al.*, 2005). A psoríase vulgar é o tipo mais comum, sendo responsável por 90% dos casos da

doença. Esta forma se manifesta com placas clássicas bem delimitadas principalmente nos locais acima citados (Griffiths e Barker, 2007). Quando surgem lesões brilhantes, avermelhadas, úmidas e normalmente desprovidas de escamas, nas regiões de flexão (como as axilas e atrás dos joelhos) a psoríase é definida como flexural ou inversa (Van De Kerkhof *et al.*, 2007).

A psoríase gutata normalmente é associada a processos infecciosos prévios, e acomete principalmente crianças e adolescentes. Esta forma da doença manifesta-se como pequenas lesões, de aproximadamente um centímetro, em forma de gotas espalhadas por todo o tronco (Potok *et al.*, 2011). Outra forma é a psoríase pustular, que geralmente surge como evolução da psoríase vulgar, desencadeada pelo uso de determinados medicamentos ou pela interrupção abrupta do tratamento. Nas suas lesões aparecem pústulas dolorosas especialmente nas mãos e nos pés (Irla *et al.*, 2012). A forma eritematosa é a mais severa da psoríase, onde a maior parte da superfície corporal é acometida por lesões eritemato-escamosas e pode estar associada com sintomas graves como insuficiência cardíaca, representando risco de morte ao paciente (Zattra *et al.*, 2012). Quando a psoríase atinge as unhas é chamada psoríase ungueal, onde aparecem depressões puntiformes ou manchas amareladas principalmente nas unhas das mãos (Griffiths e Barker, 2007).

Um grande número de pacientes com psoríase desenvolve a artrite psoriática (Lebwohl, 2003). A artrite psoriática é uma doença articular inflamatória progressiva, na qual ocorrem, além das manifestações cutâneas, lesões articulares dolorosas e debilitantes, entesite e dactilite. A incidência de artrite psoriática entre os pacientes com psoríase varia entre 7 a 42% (Haroon *et al.*, 2012).

A psoríase não está presente apenas na pele e nas articulações dos pacientes, mas tem também um impacto sistêmico. Evidências indicam que os pacientes apresentam maior risco de comorbidades significativas, incluindo patologias cardiovasculares, metabólicas, gastrointestinais, oculares e psiquiátricas (Kimball *et al.*, 2008). Como a psoríase é uma doença crônica e desfigurativa, os pacientes podem, inclusive ter um prejuízo na qualidade de vida (Van Voorhees e Fried, 2009).

Ao longo dos últimos 20 anos se têm discutido continuamente se as lesões psoriáticas surgem de uma alteração primária nos queratinócitos ou no sistema imune. Acredita-se que as células T infiltrantes iniciam e mantêm a psoríase. As citocinas liberadas pelas células T e outros componentes inflamatórios (como células

dendríticas, macrófagos e neutrófilos) provocariam a hiperproliferação dos queratinócitos (Krueger, 2002).

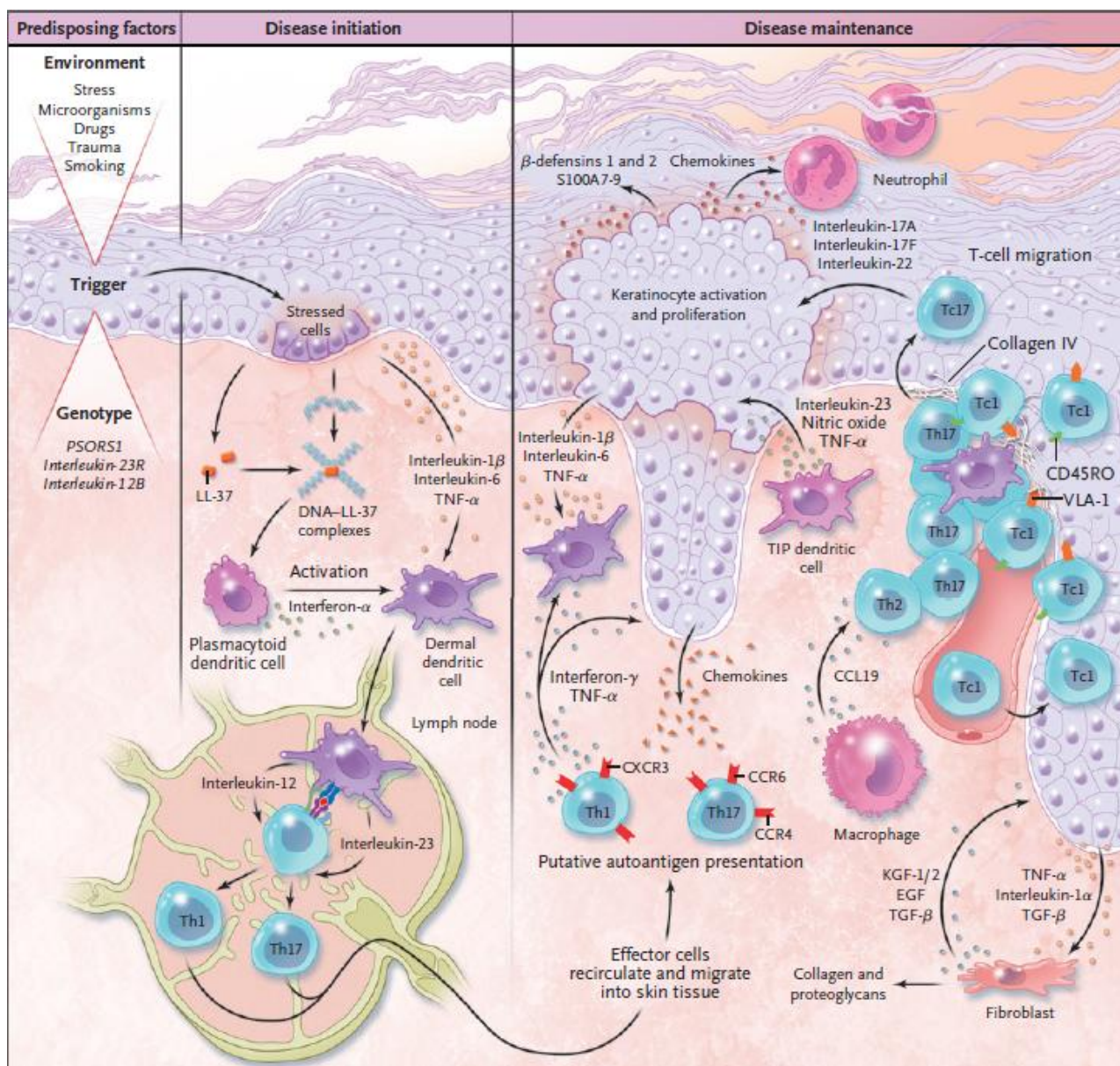
A imunopatogênese da psoríase está associada à resposta T helper 1 (Th1) e Th17, com superprodução de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina (IL) IL-2, IL-12, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- γ e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (Cassano *et al.*, 2011). Esses mediadores são capazes de produzir nocicepção, aumentar a permeabilidade vascular e aumentar a migração de leucócitos, três características importantes do processo inflamatório (Lucena *et al.*, 2007; Smiderle *et al.*, 2008; Zeashan *et al.*, 2009). Interações celulares complexas entre queratinócitos, leucócitos mononucleares, neutrófilos, células dendríticas e células T ativadas, juntamente com fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, estão envolvidas no desenvolvimento da psoríase (Nickoloff, 2007; Lowes *et al.*, 2007). Além disso, a psoríase apresenta características anti-apoptóticas (Wrone-Smith *et al.*, 1997).

Estímulos externos que podem desenvolver o início da psoríase em indivíduos geneticamente predispostos à doença, promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) pelos queratinócitos, que ativam células dendríticas mielóides. Esses estímulos também promovem a liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como o LL-37, ocorrendo a formação de um complexo LL-37-DNA que ativa as células dendríticas plasmocitóides (presentes em grande quantidade na psoríase), e a secreção de INF- α por estas. INF- α também ativa células dendríticas mielóides (Nestle, Kaplan *et al.*, 2009).

Essas células capturam, internalizam e processam o antígeno apresentando-o na sua superfície. Com isso, essas células adquirem um número de receptores em sua superfície e moléculas de adesão. Posteriormente, essas células migram para os linfonodos, onde liberam IL-23 e IL-12 e induzem a diferenciação de células T virgens em células T efectoras: células T auxiliares 17 (Th17) ou T citotóxicas 17 (Tc17) e células T auxiliares 1 (Th1) ou T citotóxicas 1 (Tc1). A ativação inicial das células T requer estimulação do receptor de células T (TCR) pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC I ou II) nas células apresentadoras de antígenos (APCs). A adesão das células T com as APCs é facilitada pela interação de moléculas de superfície como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), antígeno associado à função leucocitária tipo 1 (LFA-1) na APC e LFA-3 e CD2 nas células T (De Rie *et al.*, 2004). Assim, as células T são induzidas pelas células

dendríticas a diferenciarem-se em células T efectoras e de memória. Uma vez ativadas, essas células são liberadas dos linfonodos, dirigem-se a pele, infiltram a derme e epiderme através de diapedese, facilitada por selectinas e integrinas. Em seguida liberam citocinas pró-inflamatórias, que estimulam os queratinócitos e mudanças epidermais típicas, como a formação da placa psoriática primária (Bowcock e Krueger, 2005) (Fig. 5). Essas lesões da pele podem ser resolvidas posteriormente de maneira espontânea ou com tratamentos terapêuticos específicos (Tonel e Conrad, 2009).

Figura 5. Evolução da lesão psoriática no curso da psoríase



Após sofrerem um estímulo, os queratinócitos liberam mediadores inflamatórios e peptídeos antimicrobianos que ativam células dendríticas. Estas células migram para os linfonodos onde ativam células T. Uma vez ativadas, as células T migram para a pele onde liberam mediadores pró-inflamatórios e ativam queratinócitos. Estes queratinócitos ativados tornam-se hiperproliferativos e também liberam mediadores pró-inflamatórios.

Fonte: Nestle, Kaplan *et al.*, 2009.

Nos estágios iniciais da psoríase, o IFN- γ é importante, uma vez que aumenta o número de células que migram para a pele e ativa monócitos/macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. Esta citocina também inibe a apoptose em queratinócitos, contribuindo em parte para a hiperproliferação destas células, observada em lesões psoriáticas, além de estimular a proliferação de células

epidermais (Fierlbeck *et al.*, 1990). O IFN- γ é secretado pelas células Th1, dendríticas e natural killer (NK). A transcrição do IFN- γ e de outra citocina, TNF- α , são reguladas por IL-2, produzida pelas células T, e IL-12, produzida pelas células de Langerhans. IL-2 é também responsável pela diferenciação, proliferação e maturação de células T virgens em células T de memória e efetoras. Além disso, uma citocina importante na adesão celular, a IL-18, sinergiza o estímulo da liberação de IFN- γ (Fantuzzi *et al.*, 1999).

O TNF- α , outra citocina da via Th1, influencia a proliferação, ativação e diferenciação de diversos tipos celulares, aumenta a síntese de algumas citocinas e a expressão de algumas moléculas de adesão (Ogilvie *et al.*, 2006). Essa citocina é crucial para a proliferação local de células T. Acredita-se que o desenvolvimento da psoríase é mediado por TNF- α , e a proliferação das células T locais é dependente de sua produção local (Kastelan *et al.*, 2006). Essa citocina é conhecida por induzir a expressão de diversas citocinas, particularmente, IL-6 e mediadores inflamatórios, como a proteína C reativa, enquanto sua neutralização parece diminuir os níveis destas (Popa *et al.*, 2005). Os níveis de IL-6, aumentados na psoríase, medeiam a ativação de células T e a resposta de fase aguda, e estimulam a proliferação de queratinócitos (Arican *et al.*, 2005). TNF- α também aumenta a expressão de IL-8, que promove um sinal quimiotático forte, para o recrutamento de neutrófilos (Puren *et al.*, 1998). TNF- α e IFN- γ aumentam a expressão de ICAM-1, promovendo a infiltração na pele de células T e outras células inflamatórias, como monócitos (Coimbra *et al.*, 2012).

Foi demonstrado que IL-23, envolvida com a célula Th17, tem o papel principal na psoríase (Park *et al.*, 2005). Cada vez mais, sugere-se que a psoríase é causada por uma interação entre queratinócitos e o sistema imune e que um possível candidato ligando o sistema imune aos queratinócitos é a IL-22, uma citocina produzida pelas células Th17 que são estimuladas por IL-23, mas que age nos queratinócitos induzindo acantose e diferenciação para um fenótipo psoriático (Danilenko, 2008).

A ativação dos queratinócitos eleva sua própria proliferação e altera sua maturação. Esses queratinócitos ativados também produzem diversos mediadores que podem causar futura migração de células imunes, células estromais ativadas na derme e induzir a angiogênese. Eles produzem fatores de crescimento para células endoteliais e quimiocinas que atraem neutrófilos, como, IL-6, IL-8, TGF- α , TGF- β e

anfiregulina (Wilmer *et al.*, 1994). TGF- α e anfiregulina estimulam a hiperproliferação em queratinócitos, e são, juntamente com TGF- β , ligantes de IL-1 e do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF), cuja expressão está aumentada na psoríase (Coimbra *et al.*, 2012).

Como é possível observar, na psoríase, o balanço entre a proliferação e diferenciação celular está perturbado, e os queratinócitos são orientados a entrar em um programa regenerativo semelhante ao observado durante a resposta a lesões e ferimentos (Bata-Csorgo *et al.*, 1993).

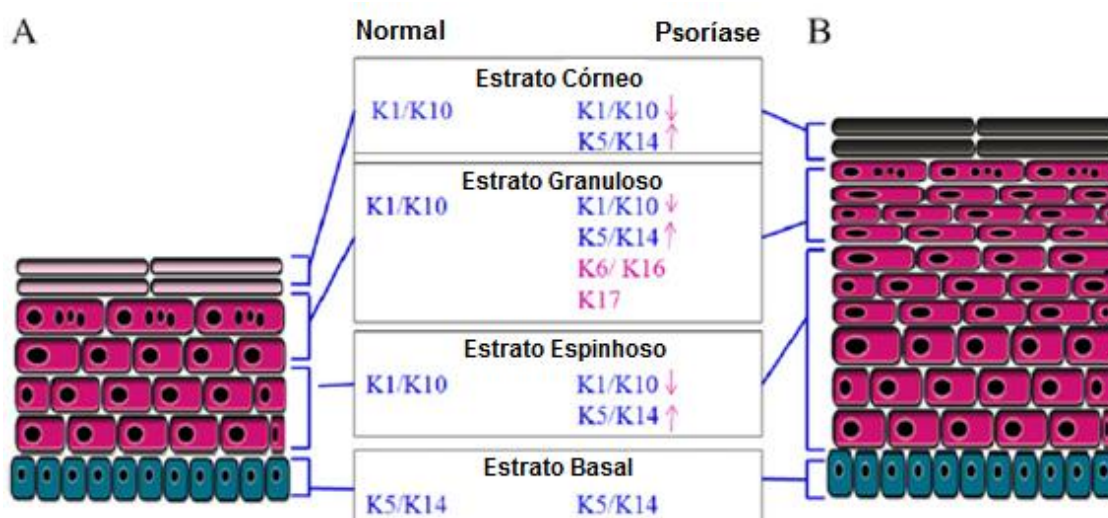
As mudanças histopatológicas mais específicas que distinguem a psoríase de outras doenças inflamatórias são: hiperplasia (aumento do número de queratinócitos) na epiderme (acantose), com diminuição ou perda do estrato granular, alongamento e engrossamento do estrato córneo (hiperqueratose) e disfunção do processo de cornificação, com queratinócitos contendo núcleo no estrato córneo (paraqueratose) e infiltração de diferentes leucócitos na derme e epiderme. No mesmo momento, é observado um aumento na quantidade e dilatação de capilares na papila dérmica, vasos superficiais que facilitam a migração de células imunes (Bowcock e Krueger, 2005). Os queratinócitos e as células endoteliais vasculares são participantes ativos do processo inflamatório na psoríase, via secreção de citocinas e fatores de crescimento, e pelo aumento na sinalização de moléculas de adesão nas suas superfícies (Krueger e Bowcock, 2005; Lowes *et al.*, 2007).

A hiperproliferação anormal dos queratinócitos é resultado da expressão aberrante de diversas moléculas regulatórias associadas a proliferação. Outro processo relacionado com a patogênese da psoríase é o desequilíbrio entre a expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas (Tomkova *et al.*, 1997). Foi demonstrado que ocorre diferença na expressão de proteínas envolvidas na apoptose, entre a pele normal e psoriática. A proteína anti-apoptótica mais abundante nos queratinócitos é Bcl-xL. Esta proteína é superexpressa em queratinócitos psoriáticos quando comparado a células da pele normais ou não envolvidas nas lesões. A expressão aumentada desta proteína pode contribuir para o aumento da resistência a apoptose observada nestas células, através do bloqueio do processo apoptótico normal envolvido no programa de diferenciação terminal dos queratinócitos (Lerman *et al.*, 2011).

Como já mencionado, o controle do crescimento de queratinócitos é mediado por uma variedade de fatores de crescimento, como: KGF, TGF- α , anfiregulina e TGF- β . Na psoríase, estas vias estão alteradas e KGF promove hiperplasia nos queratinócitos (Albanesi *et al.*, 2007).

Em lesões psoriáticas, a diferenciação dos queratinócitos é incompleta, o que leva a uma ativação preferencial e proliferação das células que não amadurecem adequadamente. Essas mudanças estão associadas com a expressão alterada de diversos marcadores celulares. Na psoríase, a queratina, o principal componente dos filamentos intermediários dos queratinócitos, é expressa de forma aberrante. Na pele em condições normais, as células basais expressam duas queratinas, K5 e K14, enquanto as células suprabasais expressam queratinas relacionadas a diferenciação, K1 e K10. Na psoríase, a mudança da expressão da queratina inclui a redução de K1 e K10 e a indução de queratinas associadas a hiperproliferação, K6, K16 e K17 (Fig. 6). Entre queratinas expressas anormalmente, K17 é notável, pois ela não é expressa normalmente na epiderme saudável, mais é altamente expressa em lesões psoriáticas (Fu e Wang, 2012).

Figura 6. Comparação da expressão dos marcadores de proliferação e diferenciação dos estratos da epiderme na pele normal (A) e na psoríase (B)



Na pele normal, ocorre a expressão de K5 e K14 no estrato basal, enquanto que nos estratos suprabasais são expressos K1 e K10. Já na psoríase, ocorre a expressão de K5 e K14 em todos os estratos e diminuição da expressão de K1 e K10 nos estratos suprabasais. Além disso, na psoríase, são expressos marcadores de hiperproliferação no estrato granuloso: K6, K16 e K17.

Fonte: Fu e Wang, 2012

1.4 Tratamento da Psoríase

A psoríase é, provavelmente, a desordem cutânea hiperproliferativa imunomediada mais prevalente, e não tem cura. Seu tratamento tem como objetivo diminuir as lesões e prolongar o tempo de recidivas melhorando desta forma a qualidade de vida do paciente e o seu convívio social. Devido sua natureza complexa, muitos regimes terapêuticos frequentemente não produzem resultados satisfatórios, em grande parte devido a tolerância a droga, a associação de efeitos adversos indesejáveis (Linden e Weinstein, 1999), toxicidade (no caso de tratamentos sistêmicos) e inconveniência (terapia tópica e fototerapia) (Gottlieb, 2005a). A escolha da terapia a ser utilizada vai depender da extensão e severidade da doença, dos agentes terapêuticos disponíveis, da acessibilidade ao tratamento, viabilidade econômica, qualidade de vida e vontade do paciente em relação ao tipo de terapia (Galadari *et al.*, 2005).

Atualmente, muitos tratamentos estão disponíveis para aliviar as lesões psoriáticas. As opções de tratamento tradicionais para a psoríase incluem, para os casos mais leves, terapias tópicas (corticosteróides, análogos da vitamina D e retinóides) e fototerapia (ultravioleta B (UVB), PUVA e climatoterapia) e para casos mais severos, terapias sistêmicas (metotrexato retinóides e ciclosporina A). A maioria desses agentes terapêuticos tem um papel importante no tratamento da psoríase, porém, sua toxicidade pode limitar seu uso por tempo prolongado (Tonel e Conrad, 2009).

Uma nova geração de agentes terapêuticos, chamados biológicos, tem sido desenvolvida nos últimos anos. Esses agentes, derivados da tecnologia de DNA recombinante, ligam-se especificamente as células T ou citocinas responsáveis pela natureza inflamatória da doença. Uma vez que os agentes biológicos inibem componentes específicos do sistema imune, esses compostos não afetam células ou outros órgãos, o que limita seus efeitos colaterais. As drogas biológicas que já estão no mercado para o tratamento da psoríase incluem: Alefacept (o primeiro tratamento biológico aprovado para o tratamento de psoríase moderada a severa, tem como alvo células T), Etanercept (inibidor de TNF- α), Efalizumab (tem como alvo células T) e Infliximab (inibidor de TNF- α). Porém, o alto custo dos biológicos torna seu uso limitado (Tonel e Conrad, 2009). Além disso, pacientes tratados com inibidores de

TNF- α apresentaram um aumento no risco de infecção, o que pode limitar seu uso em alguns casos (Dommasch *et al.*, 2011). Pelo fato de os agentes biológicos serem recentes, são necessários estudos a longo prazo para avaliar o risco da utilização destas drogas por um período prolongado de tempo (Lee e Cooper, 2006). Deve-se ter cautela em relação a sua toxicidade, seja renal, hepática ou para a medula óssea, além da imunossupressão, teratogenicidade e carcinogênese (Gottlieb, 2005a).

Embora se acredite que as citocinas inflamatórias sejam iniciadoras da psoríase, a hiperproliferação e a diferenciação aberrante dos queratinócitos estão intimamente envolvidas no processo da doença. Desta forma, compostos que inibem a proliferação e modulam a diferenciação dos queratinócitos são potencialmente úteis no tratamento da psoríase, uma vez que o controle do balanço homeostático do crescimento e diferenciação dos queratinócitos é essencial para a recuperação da epiderme psoriática. De fato, muitas drogas antipsoriáticas comumente prescritas, como o ditranol, metotrexato e análogos da vitamina D3 exercem sua ação terapêutica diminuindo a hiperproliferação dos queratinócitos e/ou modulando a diferenciação destas células. Apesar disso, identificar agentes antiproliferativos e moduladores de diferenciação mais seguros, eficazes e efetivos continua sendo uma área de intensa pesquisa (Lee e Cooper, 2006).

Como já mencionado, a apoptose tem um papel crucial na manutenção da homeostase, renovando continuamente os tecidos, como a pele (Lee e Cooper, 2006). Em queratinócitos presentes em lesões psoriáticas, a redução da apoptose observada nos queratinócitos resulta inevitavelmente na sua hiperproliferação (Kastelan *et al.*, 2009).

Desta forma, agentes que são capazes de inibir a proliferação de queratinócitos e induzir a apoptose nos mesmos, também teriam um bom potencial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento da psoríase, promovendo um balanço na homeostase da epiderme (Lin *et al.*, 2010).

Produtos naturais derivados de plantas têm sido muito usados na medicina popular para o tratamento de diversas patologias cutâneas, o que torna compostos derivados destas, bons candidatos para novas estratégias terapêuticas (Cordell e Colvard, 2005; Kobayashi *et al.*, 2010; Padmavathi *et al.*, 2005).

1.5 Plantas medicinais

As plantas medicinais têm sido usadas há muito tempo para o tratamento de doenças e ainda desenvolvem papel fundamental para a saúde da população mundial. A diversidade química das plantas faz com que estas representem uma das principais fontes para o isolamento de compostos orgânicos bioativos (Basso *et al.*, 2005).

Conforme estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 80% da população de países em desenvolvimento depende da medicina tradicional ou de medicamentos a base de plantas como fonte primária de cuidados com a saúde (Corrêa *et al.*, 2006).

Atualmente, de todos os fármacos disponíveis na terapêutica, em torno de 25 a 30% são produzidos a partir de produtos naturais (plantas, animais e microorganismos) ou são derivações destes produtos. Entretanto, nas últimas décadas, devido aos avanços na química combinatória, as pesquisas da indústria farmacêutica na área de produtos naturais têm apresentado lento declive. Contudo evidências recentes de companhias farmacêuticas mostram que, para algumas doenças complexas, os produtos naturais ainda representam uma fonte extremamente valiosa para produção de novas entidades químicas, visto que são compostos por estruturas químicas privilegiadas, selecionadas por milhões de anos de evolução (Boldi, 2004; Clardy e Walsh, 2004; Koehn e Carter, 2005; Newman *et al.*, 2003).

Estudos têm demonstrado que drogas derivadas de plantas e muitas preparações vegetais são capazes de alterar funções do sistema imune possuindo uma incrível gama de efeitos imunomodulatórios, e com a vantagem de não possuir efeitos imunossupressores, como ocorre com drogas utilizadas na clínica como os corticóides. Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que plantas medicinais podem afetar a secreção de citocinas, liberação de histamina, proliferação de linfócitos e possuir atividade citotóxica (Saklani e Kutty, 2008; Plaeger, 2003). Tanto no Brasil, como em outros países da América Latina, tem-se dado muita atenção à fitomedicina, tanto do ponto de vista da comunidade acadêmica, como das companhias farmacêuticas (Calixto, 2000).

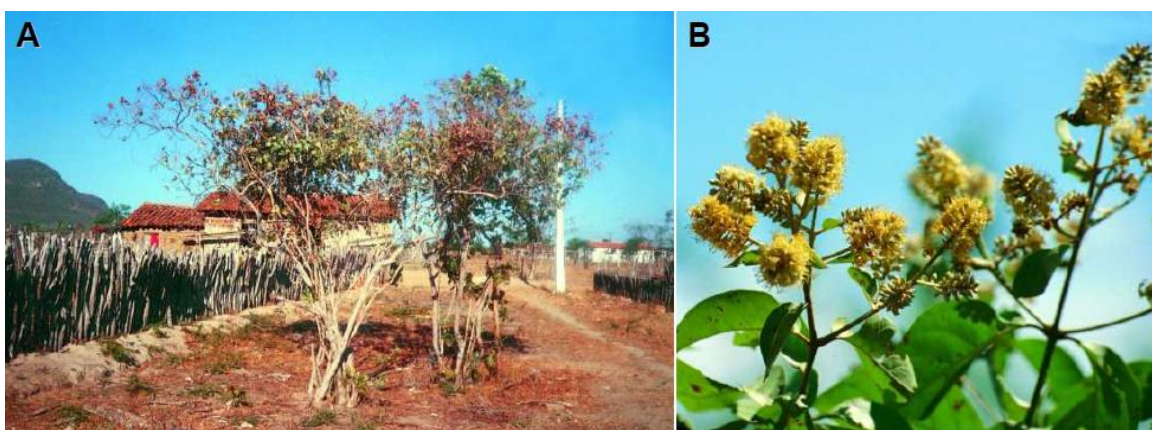
A ideia básica é utilizar plantas medicinais para desenvolver fitoterápicos padronizados com eficácia (avaliado por estudos pré-clínicos e clínicos), segurança

e alta qualidade comprovados. São necessários milhões de dólares para o desenvolvimento de uma nova droga por síntese ou até mesmo a partir de um protótipo de uma fonte natural, além de vários anos de investigação. Já o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados necessita de fundos consideravelmente mais baixos e aparenta ser perfeitamente viável em países subdesenvolvidos (Calixto, 2000).

1.6 *Combretum Leprosum* Mart. & Eich (Combretaceae)

Combretum leprosum Mart & Eich (Combretaceae) é uma planta encontrada no nordeste do Brasil onde é conhecida como *mufumbo*, *mofumbo* ou *cipoaba* (Lira et al., 2002) e é a principal espécie de árvore relatada no habitat natural do estado do Ceará (Facundo et al., 1993) (Fig. 7). As plantas da família Combretaceae compreendem 20 gêneros com aproximadamente 600 espécies, das quais 370 pertencem ao gênero *Combretum* e 200 ao gênero *Terminalia* (McGaw et al., 2001; Katerere et al., 2003). Essas espécies são bastante utilizadas para fins medicinais, especialmente as do gênero *Combretum* (McGaw et al., 2001). Estudos fitoquímicos de algumas espécies deste gênero demonstraram a ocorrência de várias classes de constituintes, incluindo triterpenos, flavonóides, lignanas, aminoácidos não-protéicos, entre outros (Facundo et al., 1993; Masika e Afolayan, 2002; Katerere et al., 2003; Chowdhury e Islam, 2004).

Figura 7. *Combretum leprosum* (Mofumbo). Planta inteira (A) e partes aéreas (B)



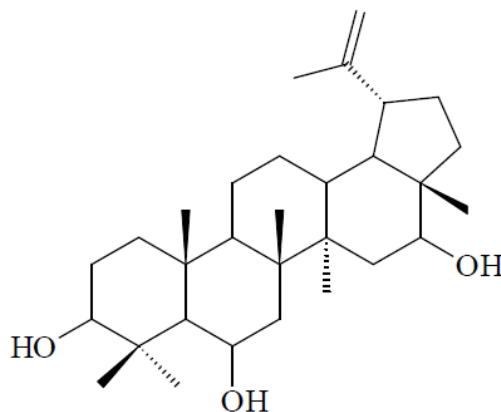
Fonte: CNIP/APNE (2008).

Na medicina popular, infusões preparadas com a parte aérea (folhas, caule e flores) e raízes de *C. leprosum*, são utilizadas para a cura de feridas como hemostáticas, sedativas e no tratamento de sangramento uterino (Facundo *et al.*, 1993; Pietrovski *et al.*, 2006). Além disso, em alguns extratos e princípios ativos de variadas espécies de *Combretum* observou-se atividade biológica de amplo espectro, incluindo atividade antimicrobiana (Fyhrquist *et al.*, 2002; Martini *et al.*, 2004), antiprotozoária (Asres *et al.*, 2001; Ancolio *et al.*, 2002), anticancerígena (Nam, 2003; McGaw *et al.*, 2001; Griggs *et al.*, 2001), citotóxica (Ali *et al.*, 2002), analgésica (Lira *et al.*, 2002), antiinflamatória (Olajide *et al.*, 2003), hepatoprotetora (Adnyana *et al.*, 2001) e antiviral (Bessong *et al.*, 2005).

Porém, apesar de ser utilizada popularmente, ainda existem poucos dados sobre as possíveis atividades farmacológicas da maioria dos compostos e frações obtidas de diferentes partes desta planta. Contudo, estudos conduzidos por Lira *et al.* (2002), demonstraram atividade antinociceptiva em dois modelos de dor aguda em camundongos, utilizando o extrato etanólico da casca e das folhas, e um triterpeno isolado das flores de *C. leprosum* (Lira *et al.* 2002). Pietrovski *et al.* (2006) demonstraram que o extrato etanólico obtido das flores de *C. leprosum* apresenta atividade antinociceptiva em diversos modelos de dor química e térmica através de mecanismos que envolvem uma interação com os sistemas opióide e serotoninérgico (Pietrovski *et al.*, 2006).

Das folhas e raízes de *Combretum leprosum* foram isolados alguns compostos como ácido arjunólico, ácido móllico, ácidos graxos, o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup- 20(29)-eno (TTHL) (Fig. 8), flavonóides glicosilados 3-O-metilquercetina e quercetina. Análises do extrato etanólico das folhas demonstraram que os monossacarídeos são os principais componentes (80%), os triterpenos representam 10%, estando entre eles o ácido arjunólico e TTHL que são triterpenos pentacíclicos. O TTHL é um triterpeno inédito isolado dessa espécie, o qual ainda possui poucos dados científicos acerca de sua atividade biológica. O extrato ainda contém 5% de oligossacarídeos e 3% de ácidos graxos (Facundo *et al.*, 2005; (Facundo *et al.*, 1993).

Figura 8. Estrutura molecular do triterpeno TTHL.



Fonte: Pietrovski *et al.*, 2006.

Estudos conduzidos por Pietrovski *et al.* demonstraram que o TTHL, quando dado por via oral, produz inibição significativa da nocicepção induzida por glutamato (Pietrovski *et al.*, 2006). Em 2009, foi demonstrado que o TTHL apresenta efeitos antinociceptivos que envolvem o sistema glutamatérgico (Longhi-Balbinot *et al.*, 2009). Outra descoberta interessante foi a demonstração da atividade antinociceptiva do TTHL quando administrado oralmente contra resposta à dor neurogênica (fase precoce) e inflamatória (fase tardia) induzida pela injeção de formalina em camundongo (Longhi-Balbinot *et al.*, 2011). O composto isolado TTHL apresentou atividade antiinflamatória e reduziu a migração de leucócitos e a liberação de citocinas induzidas por carragenina, a saber, TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β) em camundongos (Longhi-Balbinot *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos nestes estudos fornecem evidências experimentais para o uso de *Combretum leprosum* no tratamento de doenças associadas à inflamação e dor, e sugerem que o TTHL pode representar um novo composto terapeuticamente útil para o tratamento clínico (Longhi-Balbinot *et al.*, 2012).

Desta forma, o TTHL pode ser uma importante opção na medicina popular para o tratamento de problemas dermatológicos e lesões na pele, e apesar de existirem alguns trabalhos investigando suas atividades biológicas, existem poucos dados científicos que comprovem sua eficácia antiinflamatória e antiproliferativa.

Observando os resultados já obtidos do composto TTHL, este trabalho visa contribuir na busca de novos medicamentos com atividade antiproliferativa contra afecções hiperproliferativas cutâneas, como substitutivos nacionais, com menor custo, mas com qualidade. Dando continuidade aos estudos com a espécie

Combretum leprosum realizados pelo Laboratório de Farmacologia e Fisiopatologia da Pele da Universidade Federal do Paraná, tendo como finalidade estudar uma nova possibilidade do uso da planta para o tratamento da psoríase, através de estudos farmacológicos do composto isolado TTHL, *in vitro*, a proposta do presente estudo se insere no contexto de caracterização das ações e o estudo dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antiproliferativa deste composto isolado da planta *Combretum leprosum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* do composto isolado 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL) do extrato de *Combretum leprosum* Mart & Eich em queratinócitos humanos (HaCaT) e camundongos, respectivamente.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade citotóxica do composto TTHL frente à linhagem celular HaCaT.
- Verificar a atividade antiproliferativa do composto TTHL frente à linhagem celular HaCaT.
- Avaliar as fases do ciclo celular da linhagem celular HaCaT após o tratamento com diferentes concentrações de TTHL.
- Avaliar a toxicidade do composto TTHL *in vivo* quando aplicado topicamente na orelha de camundongos durante 7 dias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Drogas e reagentes

Os reagentes utilizados neste estudo incluem: MTT (SIGMA-Aldrich), Vermelho Neutro (Cultilab), Cyquant (Invitrogen), Iodeto de Propídio (PI) (SIGMA-Aldrich), Ribonuclease (RNase) (Amresco), Triton X-100 (Cultilab). Fenol (Merck Biosciences, Germany), acetona, formaldeído, ácido acético glacial (Merck Biosciences, Germany), álcool absoluto, xilol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

3.2 Material botânico

As flores de *Combretum leprosum* foram coletadas em Cocalzinho- Viçosa, Estado do Ceará, Brasil em maio de 2007. A espécie foi identificada pelo Prof. Afrânio Fernandes (Universidade Federal do Ceará) em maio de 2007 e um exemplar encontra-se catalogado (n. 12446) no Herbário Prisco Bezerra no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

3.3 Obtenção do Extrato etanólico e isolamento, purificação e identificação química do composto

A obtenção do extrato etanólico assim como o isolamento, a purificação e a identificação do composto isolado de *C. leprosum* foram realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Alves Facundo do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de Rondônia. Primeiramente as flores foram secas e trituradas, e então submetidas à extração com etanol a temperatura ambiente. Foram realizadas três extrações sucessivas utilizando 5 litros de etanol em cada extração, e então o produto foi submetido à destilação do solvente sob pressão reduzida fornecendo 58,3 g de extrato.

Parte do extrato etanólico obtido nessa primeira etapa foi submetido a um fracionamento em coluna filtrante, utilizando como adsorvente sílica gel e tendo como fases solventes, hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se

assim as respectivas frações. A fração clorofórmio foi então submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel tendo como fase fixa gel H (artigo 7761) da Merck e como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila em polaridade crescente. Em quatro frações (27-30), extraídas com hexano: acetato de etila (3:7) foi observada a presença de um precipitado branco, através de recristalização com éter etílico foi feita a purificação da substância identificada por métodos químicos e espectroscópicos como sendo o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL) (Facundo et al., 1993).

3.4 Cultura celular

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular HaCaT, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr. da Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo. A célula HaCaT é uma linhagem imortalizada do epitélio da pele humana, que exhibe diferenciação normal de queratinócitos, tornando-a útil para a determinação de mecanismos regulatórios durante a diferenciação celular da epiderme, em modelos *in vitro* (Boukamp et al., 1988).

As células foram mantidas rotineiramente, em meio DMEM (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 10 μ g/ml de estreptomicina e 10 U/ml de penicilina (Cultilab), em atmosfera umidificada com 5% CO₂ à 37°C, até subconfluência, quando foram subcultivadas com o uso de tripsina. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

3.5 Ensaio de citotoxicidade – MTT

Para verificar a viabilidade celular, o ensaio de MTT foi realizado de acordo com o método previamente descrito por Mosmann et al. (Mosmann, 1983). O MTT é um sal de tetrazólio que pode ser clivado pela enzima succinato desidrogenase, na mitocôndria ativa de células viáveis, formando o complexo formazan, o qual apresenta uma coloração violeta que pode ser medida colorimetricamente (Tse et al., 2008).

Foram plaqueadas 7x10³ células em placas de 96 poços. No dia seguinte, as células foram tratadas com diferentes concentrações de TTHL (0,01; 0,1; 1; 3; 5; 7;

9; 10 μ M) em meio suplementado com 1% SFB. Como controle (C) as células foram tratadas apenas com meio suplementado com 1% de SFB e como veículo (V) as células foram tratadas com 0,1% de etanol 99% em meio 1% de SFB, para observar se o mesmo interferiria na viabilidade celular.

O meio contendo o TTHL foi retirado dos poços após 24 horas e foram adicionados 200 μ L de MTT (0,5 mg/mL em PBS) (Sigma Aldrich) por poço. Posteriormente, a placa foi incubada por 3 horas a 37°C/5% CO₂. O MTT foi então removido e foram adicionados 200 μ L de etanol por poço, para solubilizar os cristais de formazan formados. As placas foram homogeneizadas por 5 minutos e a absorbância foi determinada a 570 nm utilizando um leitor de microplaca EL800 (Biotek).

3.6 Ensaio de citotoxicidade – Vermelho Neutro

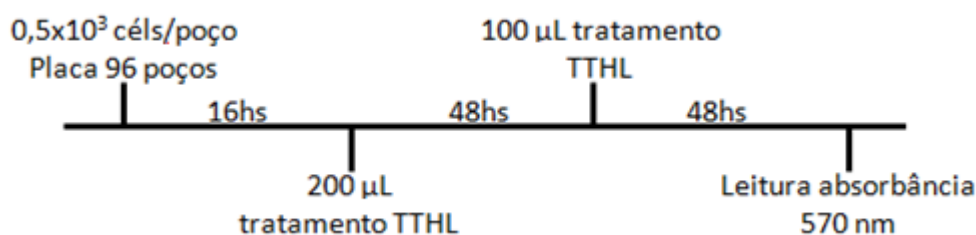
O protocolo do vermelho neutro foi realizado da mesma forma que o ensaio de MTT. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra prontamente na membrana celular e se acumula intracelularmente nos lisossomos, onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica (Griffon *et al.*, 1995). Este ensaio é um teste de viabilidade baseado na incorporação do corante vermelho neutro nos lisossomos de células viáveis, o qual é medido colorimetricamente (Borenfreund e Puerner, 1985).

Após 24hs de incubação, o meio contendo TTHL foi retirado dos poços e foram adicionados 200 μ L da solução de vermelho neutro/poço (Cultilab). A placa foi incubada por 3 horas a 37°C/5% CO₂. Após esse tempo, o vermelho neutro foi removido dos poços e estes foram lavados com uma solução de CaCl₂ 1% formaldeído 0,5%. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de ácido acético 1% etanol 50%. As placas foram homogeneizadas durante 5 minutos e a absorbância foi determinada a 540 nm utilizando um leitor de microplaca modelo EL800 (Biotek).

3.7 Protocolo de Proliferação

Para o ensaio de proliferação celular, foram plaqueadas $0,5 \times 10^3$ células por poço em placa de 96 poços. No dia seguinte, as células foram tratadas com 200 μ l de diferentes concentrações de TTHL (0,01; 0,1; 1; 3; 5; 7; 10 μ M) em meio suplementado com 10% de SFB. Como grupo branco (B), as células foram tratadas com meio 0,1% de SFB, para que não proliferassem, ao passo que como controle (C), as células foram tratadas com meio 10% de SFB para que proliferassem. Desta forma seria possível observar se o TTHL interfere na proliferação de HaCaT.

A placa foi incubada durante 48 horas. Após esse tempo, foram retirados 100 μ l de cada poço e adicionados 100 μ l do tratamento anteriormente realizado, e a placa foi incubada por mais 48 horas. Foi realizada então a quantificação celular através dos seguintes protocolos: MTT e Cyquant.



3.8 Ensaio de Cyquant

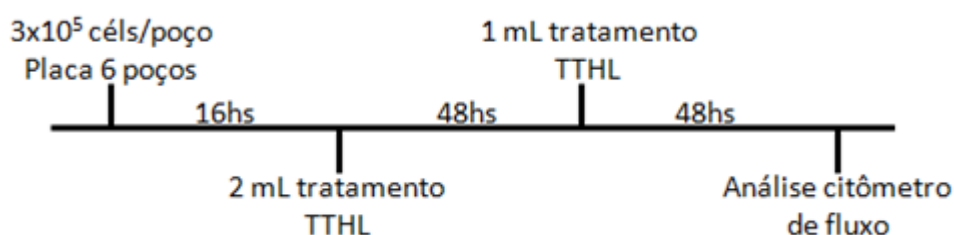
Após o ensaio de proliferação, o meio foi retirado dos poços e estes foram lavados com PBS. A placa foi então congelada a -70°C até a hora do uso (importante para que ocorra lise celular eficiente). A proliferação celular foi avaliada utilizando o Kit de ensaio de fluorescência de ácido nucléico - CyQuant (Invitrogen).

A base do Kit de CyQuant é o uso de um corante verde fluorescente, o CyQuant GR, que exibe uma fluorescência forte quando ligada aos ácidos nucleicos celulares, possibilitando medir a quantidade total de DNA e RNA.

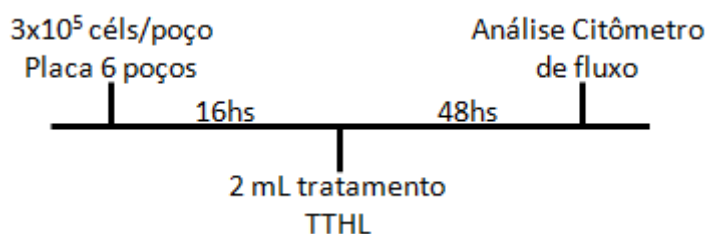
No momento de uso, as células foram descongeladas a temperatura ambiente e foram adicionados 200 μ l de tampão de lise celular/corante CyQuant GR em cada poço. A placa foi incubada de 2 a 5 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. A fluorescência foi medida utilizando um leitor de placa de fluorescência modelo Synergy HT (Biotek) (480 nm de excitação e 520 nm de emissão).

3.9 Avaliação do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

Foram realizados dois protocolos para avaliar o ciclo celular. No primeiro, foram plaqueadas 5×10^4 células por poço em placa de 6 poços, e o tratamento foi realizado conforme protocolo de proliferação celular (96 horas). Posteriormente, as células foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas com álcool 70% por pelo menos 1 hora a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e após a lavagem, foram incubadas com uma solução de RNase (10 mg/ml) (Amresco), Iodeto de Propídio (2 mg/ml) (SIGMA-Aldrich) e Triton X-100 1% (Cultilab) em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram analisadas em citômetro de fluxo, modelo FACScalibur (BD Biosciences). A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi avaliada através do programa WinMDI 2.8.



No segundo protocolo, foram plaqueadas 3×10^5 células por poço em placa de 6 poços. No dia seguinte as células foram tratadas com as diferentes concentrações do TTHL (C, 0,1, 1, 3, 5, 7,10 μ M) em meio 1% SFB e no controle (C) as células foram tratadas com meio 1% SFB. Após 48 horas, as células foram coletadas, fixadas e analisadas da mesma forma que o protocolo anterior.



3.10 Animais e Manutenção

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25-35 g) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFPR. Os animais foram

mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. Os animais foram mantidos na sala de experimento durante pelo menos uma hora antes da realização dos testes, para adaptação. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (CEUA, 2003) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal do Paraná sob o número 296.

3.11 Ensaio de atrofia cutânea em camundongos

Para avaliar a possível toxicidade da aplicação tópica do TTHL, os animais foram tratados com o composto TTHL ou dexametasona (controle positivo) durante 7 dias, a cada 12 horas. Os animais foram separados em 4 grupos ($n = 5$): TTHL (0,3 mg/orelha) diluído em etanol:acetona (1:1), Dexametasona (0,01 mg/orelha) em acetona, Veículo (acetona) e Controle (naive). Essas doses foram definidas por dados preliminares obtidos em experimentos anteriores pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). A espessura da orelha dos animais foi medida antes de iniciar o tratamento, e no oitavo dia. A espessura (μm) foi medida próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi registrada com o auxílio de um micrômetro digital (Eletronic Outsidsse Micrometer 0-25mm 0.001mm, Digimess). Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

No oitavo dia, os animais foram sacrificados e biópsias das orelhas foram coletadas para análise histológica.

3.12 Análise Histológica

As amostras do tecido de orelhas (círculos de 6 mm) coletadas dos camundongos foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) num período de 16 horas, sendo em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 μm em um micrótomo e coradas com a coloração de Tricômico de

Masson. Essa coloração cora o colágeno em azul, os núcleos em preto e a queratina em vermelho. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico, e a espessura da derme foi avaliada no programa Image J, em áreas representativas com aumento de 20x.

3.13 Análise Estatística

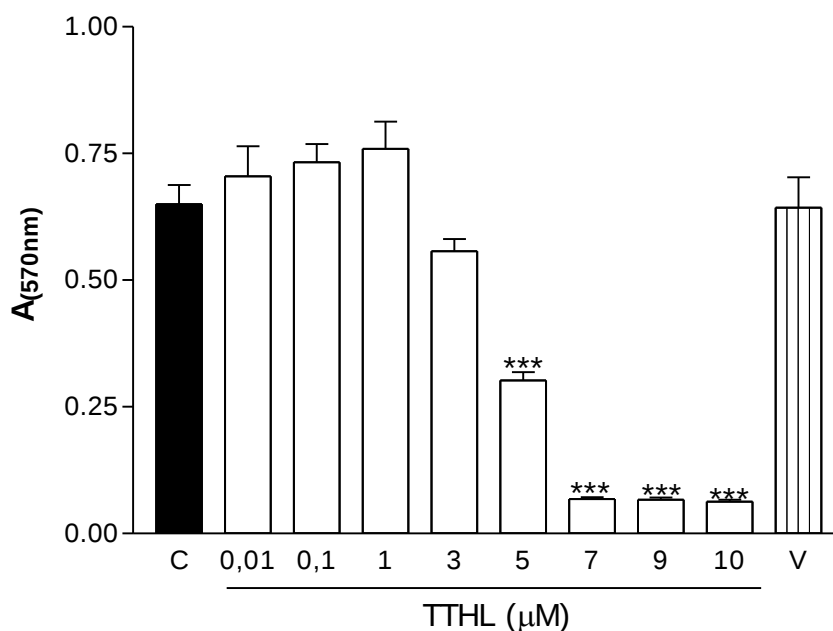
Os resultados foram apresentados como média $\pm$ E.P.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls. O nível de significância aceito para os testes é de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5.0, São Diego, Califórnia, EUA.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade citotóxica do TTHL – MTT

A atividade citotóxica do composto TTHL foi avaliada após a incubação das células com as diferentes concentrações do TTHL (0,01; 0,1; 1; 3; 5; 7; 9; 10 μM) por um período de 24 horas, através do ensaio colorimétrico MTT. Os resultados revelaram que após 24 horas, o composto TTHL, nas concentrações de 5, 7, 9 e 10 μM apresentou atividade citotóxica para as células HaCaT, diminuindo, respectivamente em 53,54%, 89,53%, 89,69% e 90,30 $\pm$ 5,84% a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (C). As outras concentrações utilizadas (0,01; 0,1; 1 e 3 μM) e o veículo (V) não demonstraram diminuição da viabilidade celular (Fig. 9).

Figura 9. Atividade citotóxica do TTHL em células HaCaT (MTT)

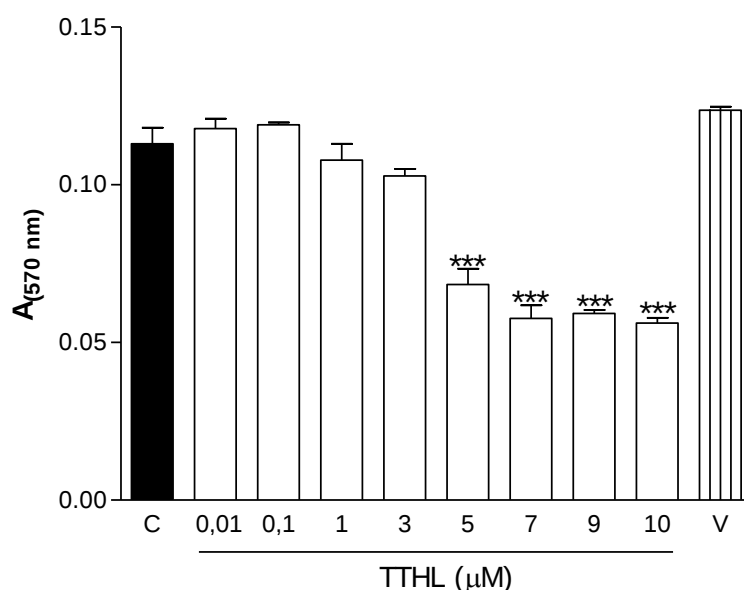


As células foram tratadas com diferentes concentrações do TTHL (0,01; 0,1; 1; 3; 5; 7; 9; 10 μM) por 24 horas. A quantidade de células viáveis foi determinada através do método de MTT. Diferença significativa com o controle, *** $p < 0,001$. Controle (C - 10% SFB) e Veículo (V - 0,01% etanol).

4.2 Atividade citotóxica do TTHL – Vermelho Neutro

A atividade citotóxica do composto TTHL também foi avaliada pelo ensaio colorimétrico vermelho neutro, no qual, da mesma forma que no MTT, as células foram incubadas com diferentes concentrações do TTHL (0,01; 0,1; 1; 3; 5; 7; 9; 10 μ M) por um período de 24 horas. Os resultados revelaram que após 24 horas, o composto TTHL, nas concentrações de 5, 7, 9 e 10 μ M, apresentou atividade citotóxica para as células HaCaT, diminuindo, respectivamente em 39,83%, 48,67%, 47,78% e $50,44 \pm 4,42\%$ a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (C). As outras concentrações utilizadas (0,01; 0,1; 1 e 3 μ M) e o veículo (V) não demonstraram diminuição da viabilidade celular (Fig. 10).

Figura 10. Atividade citotóxica do TTHL em células HaCaT (Vermelho Neutro)



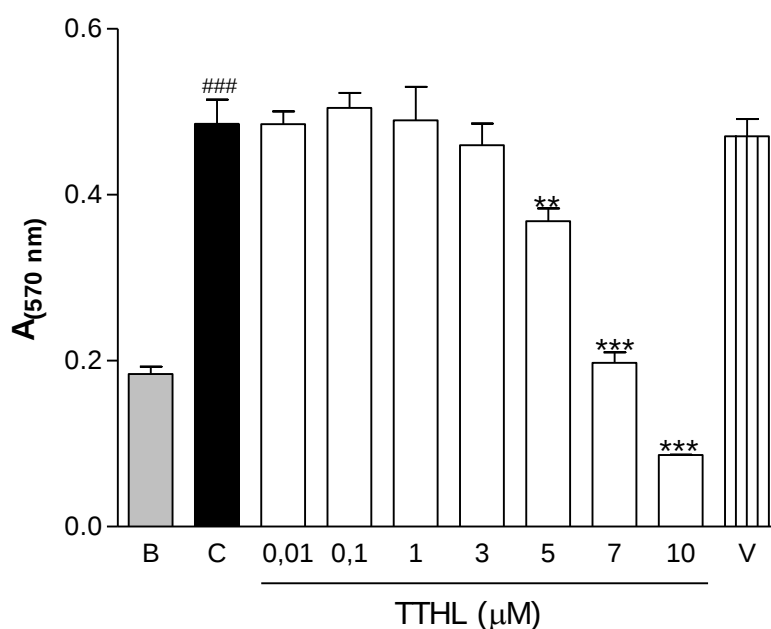
As células foram tratadas com diferentes concentrações do TTHL (0,01; 0,1; 1; 3; 5; 7; 9; 10 μ M) por 24 horas. A quantidade de células viáveis foi determinada através do ensaio de vermelho neutro. Diferença significativa com o controle, *** $p < 0,001$. Controle (C - 10% SFB) e Veículo (V - 0,01% etanol).

4.3 Atividade antiproliferativa do TTHL

A atividade antiproliferativa do TTHL foi avaliada, após 96 horas de tratamento das células HaCaT com diferentes concentrações do TTHL (0,01; 0,1; 1;

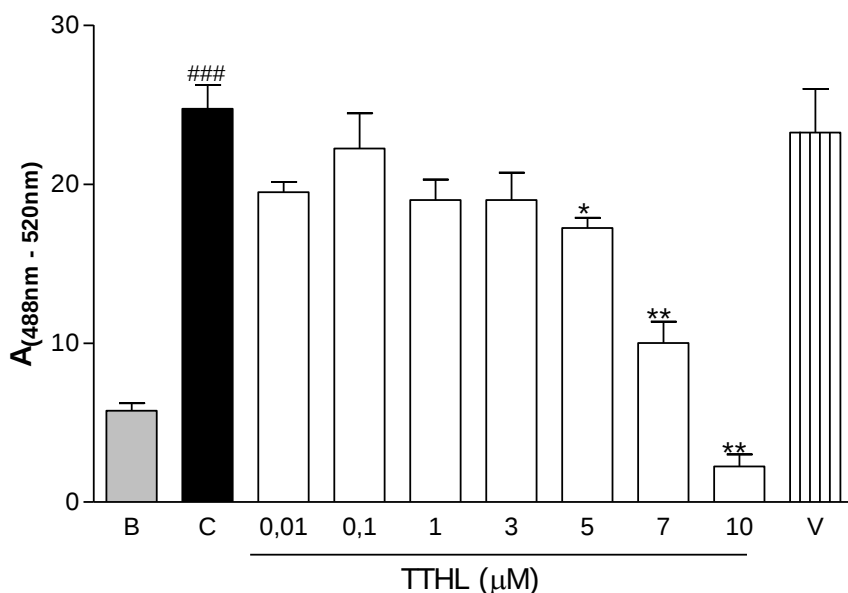
3; 5; 7; 10 μM) utilizando o método de MTT (Fig. 11) e Cyquant (Fig. 12). Através do método de MTT pode-se observar que houve diminuição de 24,27%, 59,25% e 82,30% $\pm$ 5,96% no número de células nas concentrações de 5, 7 e 10 μM , respectivamente. Para o método Cyquant, nestas mesmas concentrações houve diminuição de 30,30%, 59,59% e 90,90% $\pm$ 6,03% da proliferação celular, respectivamente. Da mesma forma que o ensaio de viabilidade celular, as outras concentrações (0,01; 0,1; 1 e 3 μM) e o veículo (V) não interferiram na proliferação celular.

Figura 11. Atividade antiproliferativa do TTHL em células HaCaT (MTT)



As células foram tratadas com diferentes concentrações do TTHL (0,01; 0,1; 1; 3; 5; 7; 10 μM) Após o ensaio de proliferação, o número de células viáveis foi determinado pelo método de MTT. Diferença significativa com o controle, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e ### $p < 0,001$. Branco (B – 0,1% SFB), Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

Figura 12. Atividade antiproliferativa do TTHL em células HaCaT (Cyquant)



As células foram tratadas com diferentes concentrações do TTHL (0,01; 0,1; 1; 3; 5; 7; 10 μ M) e após o ensaio de proliferação, o número de células viáveis foi determinado pelo método de Cyquant. Diferença significativa com o controle, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$. Branco (B – 0,1% SFB), Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

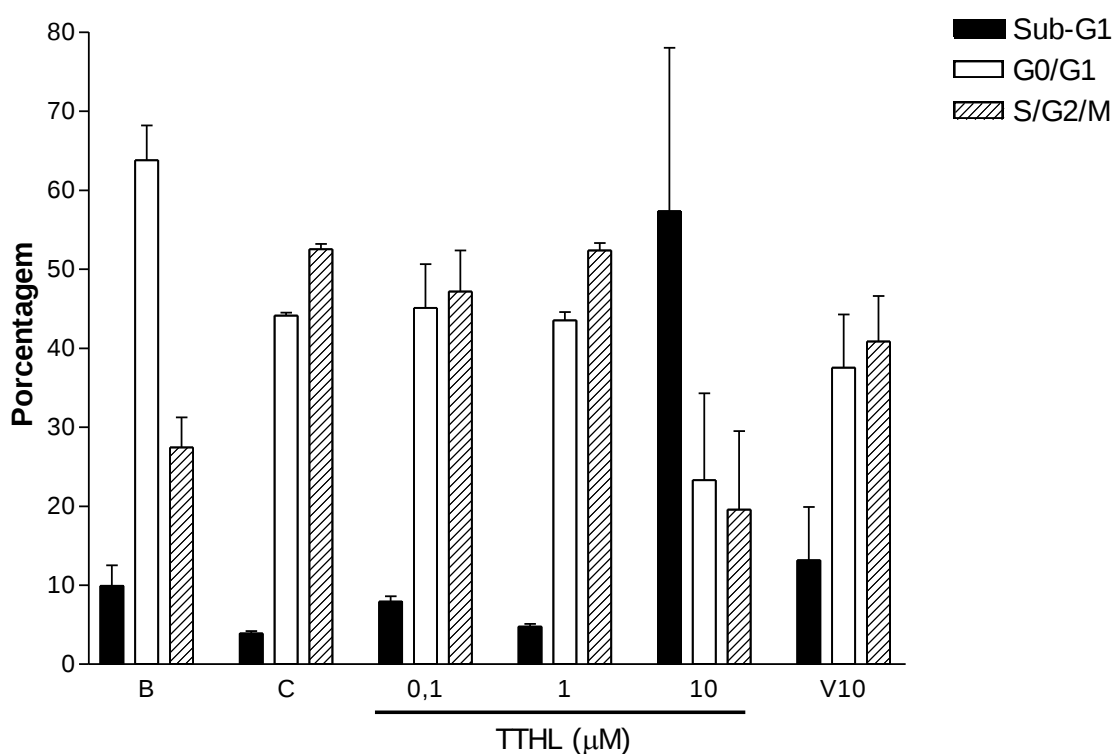
4.4 Avaliação do ciclo celular – 96 horas

A distribuição das fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo, após o tratamento (conforme protocolo de proliferação celular) das células HaCaT com diferentes concentrações do composto TTHL (0,1; 1; 10 μ M). Na figura 13 é possível observar a diferença da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular, nas diferentes concentrações de TTHL. As células foram tratadas com meio 10%, com o objetivo de avaliar se o composto TTHL era capaz de impedir a proliferação das células. No branco (B), as células permaneceram principalmente na fase G0/G1 (Fig. 13 e 16). No controle (C), como as células foram tratadas com meio 10%, houve um aumento de células nas fases S/G2/M, mostrando um maior número de células proliferando (Fig. 13 e 17). Observa-se que na concentração de 10 μ M houve uma porcentagem maior de células na fase Sub-G1 comparada às outras concentrações, caracterizando células que perderam a integridade do DNA e tornaram-se inviáveis (Fig. 13 e 15). Para a concentração de 10 μ M, o número de células não viáveis (fase Sub-G1) foi aproximadamente 14 vezes maior e

estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle (C). Consequentemente, houve uma porcentagem menor de células nas fases G0/G1 e G2/S/M.

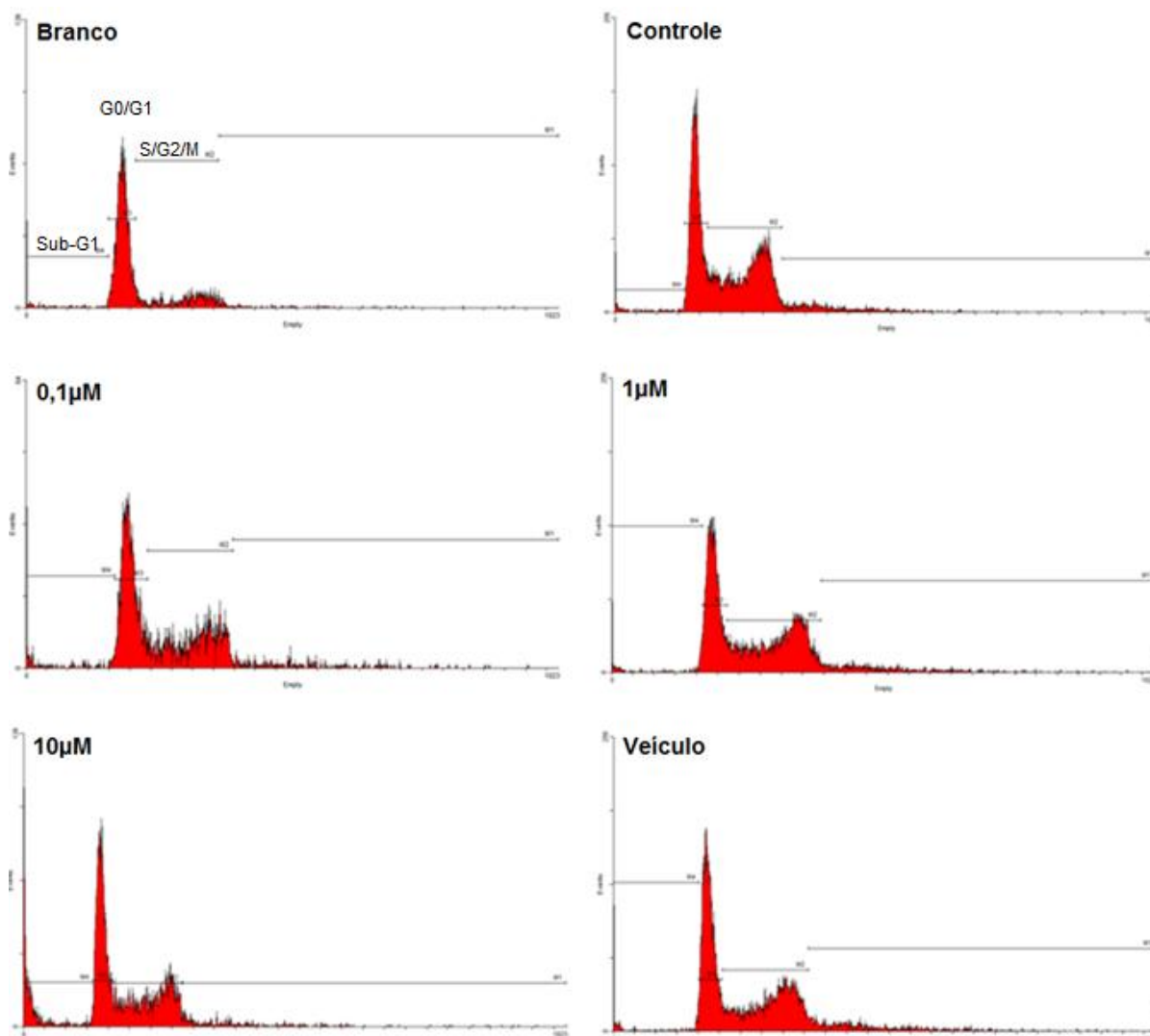
Na figura 14 é possível observar a representação gráfica do ciclo celular no programa WinMDI 2.8.

Figura 13. Avaliação das fases do ciclo celular após o tratamento com o TTHL – 96 horas



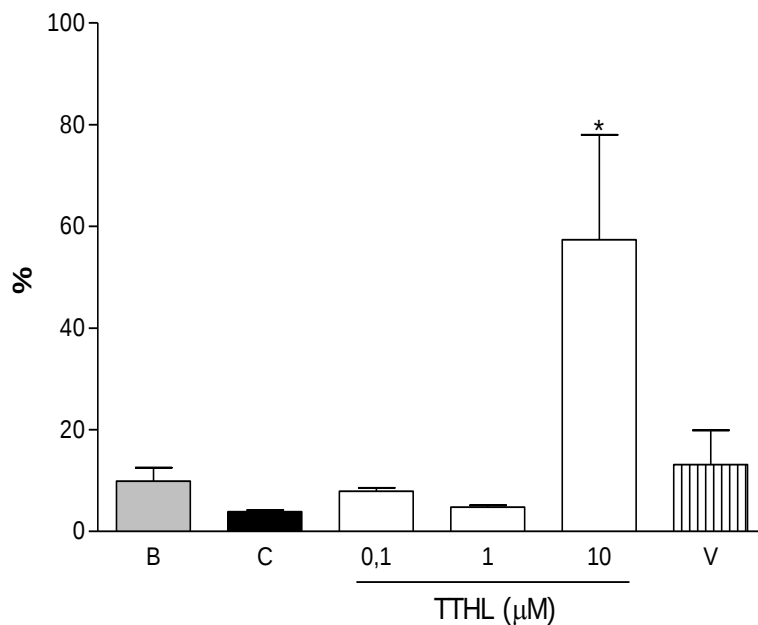
Representação das fases do ciclo celular de acordo com cada concentração do TTHL (0,1; 1; 10 µM). Na concentração de 10µM observa-se um aumento de células na fase Sub-G1, indicando células não viáveis. Branco (B – 0,1% SFB), Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

Figura 14. Representação do ciclo celular no programa WinMDI 2.8 (96 horas)



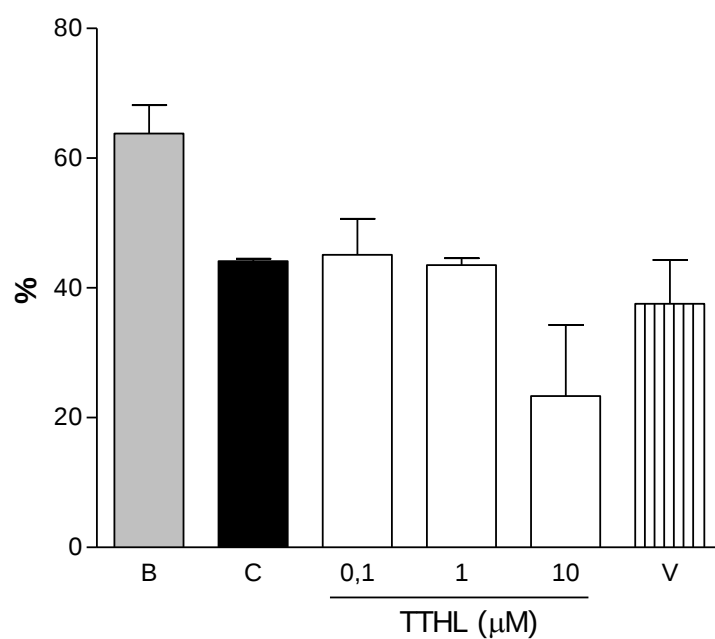
No branco (B) é possível observar que a maioria das células encontra-se na fase G0/G1 do ciclo celular. Já no controle (C), a maioria das células encontram-se na fase S/G2/M. As células tratadas com 0,1µM e 1µM de TTHL e o veículo (V) apresentaram o mesmo comportamento que o controle (C). Quando tratadas com 10µM de TTHL, a maioria das células encontrou-se na fase Sub-G1 do ciclo celular.

Figura 15. Avaliação da porcentagem de células não viáveis após o tratamento com o TTHL



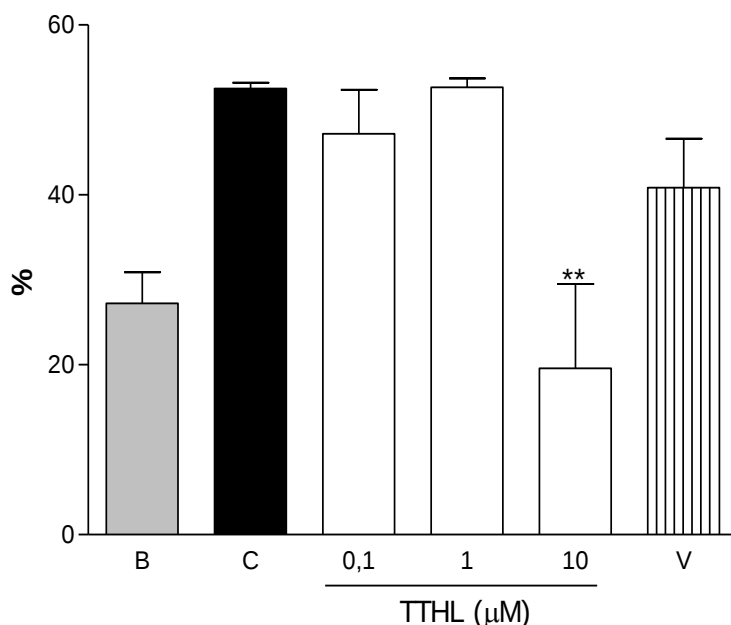
As células foram avaliadas por citometria de fluxo, após o ensaio de proliferação. Diferença significativa com o controle, * $p < 0,05$. Branco (B – 0,1% SFB), Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

Figura 16. Avaliação da porcentagem de células presentes na fase G0/G1 do ciclo celular após o tratamento com o TTHL



As células foram avaliadas por citometria de fluxo, após o ensaio de proliferação. Branco (B – 0,1% SFB), Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

Figura 17. Avaliação da porcentagem de células presentes na fase S/G2/M do ciclo celular após o tratamento com o TTHL

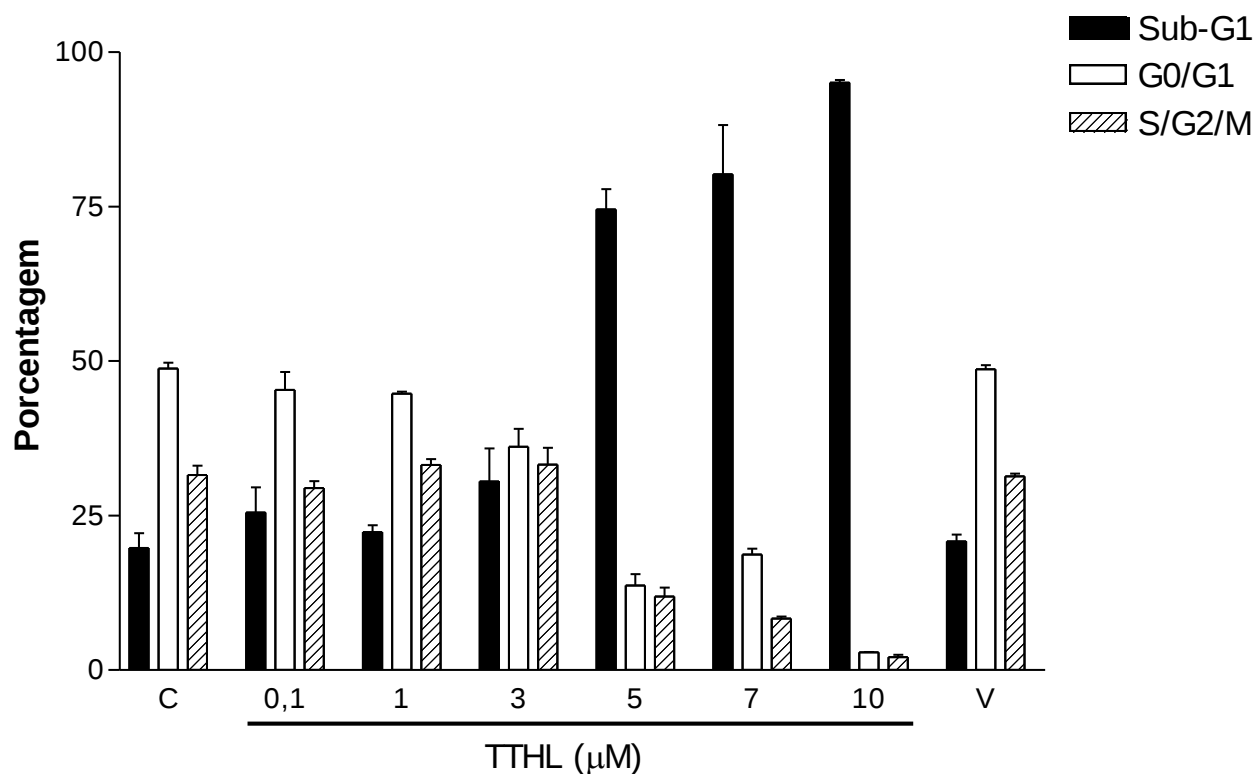


As células foram avaliadas por citometria de fluxo, após o ensaio de proliferação. Diferença significativa com o controle, ** $p < 0,01$. Branco (B – 0,1% SFB), Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

4.5 Avaliação do ciclo celular – 48 horas

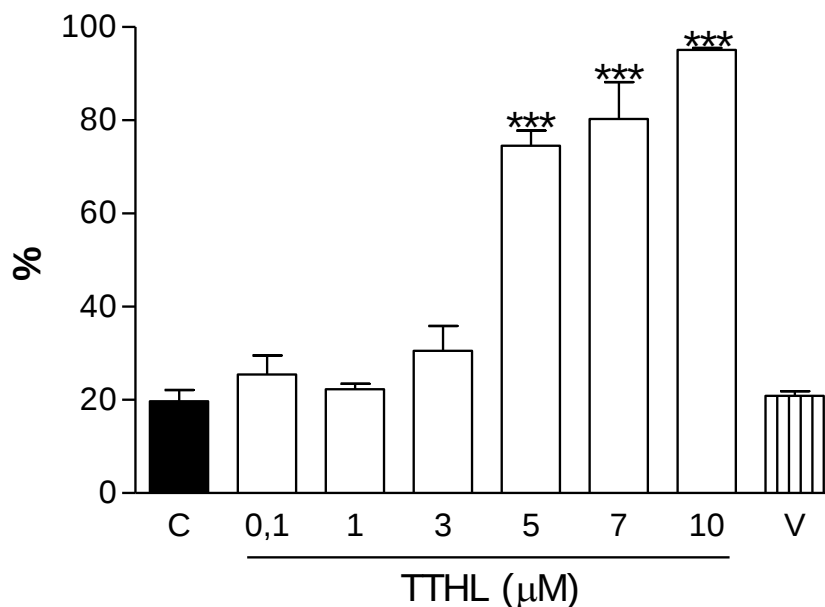
A distribuição das fases do ciclo celular também foi avaliada após um período de 48 horas de tratamento com o TTHL (0,1; 1; 3; 5; 7; 10 μM) (Fig. 16). Em ambos os protocolos realizados (96 horas e 48 horas) observa-se resultados semelhantes. No controle (C) é possível observar que um maior número de células encontra-se na fase G0/G1 e S/G2/M (Fig. 18), ou seja, proliferando. Já nas concentrações de 5, 7 e 10 μM observar-se um aumento no número de células na fase Sub G1 e uma diminuição destas nas outras fases, quando comparado ao controle (C), veículo (V) e outras concentrações (0,1; 1 e 3 μM) (Fig. 18 e 19). Ainda, nas figuras 20 e 21 é possível observar separadamente as fases G0/G1 e S/G2/M do ciclo celular, respectivamente.

Figura 18. Avaliação das fases do ciclo celular após o tratamento com o TTHL – 48 horas



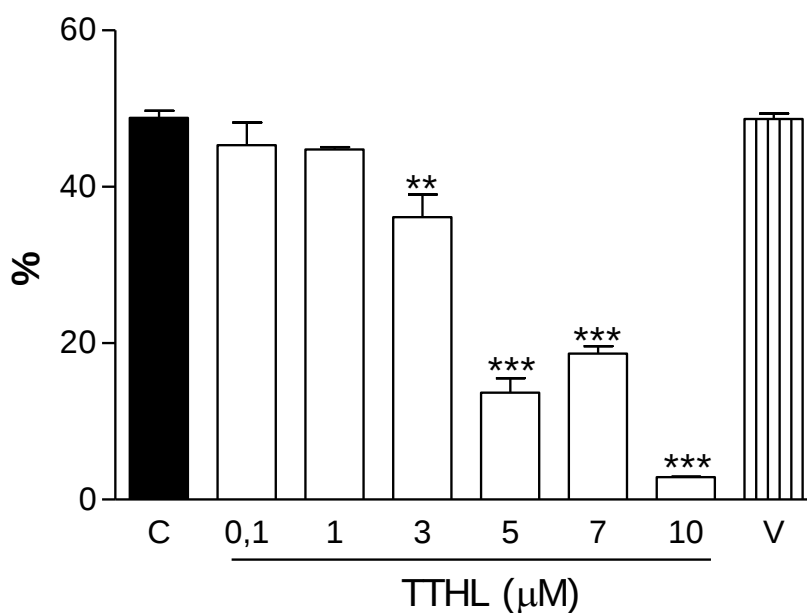
Representação das fases do ciclo celular de acordo com cada concentração do TTHL (0,1; 1; 3; 5; 7; 10 µM). Nas concentrações de 5, 7 e 10 µM observa-se um aumento de células na fase Sub G1, indicando células não viáveis. Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

Figura 19. Avaliação da porcentagem de células não viáveis após o tratamento com o TTHL



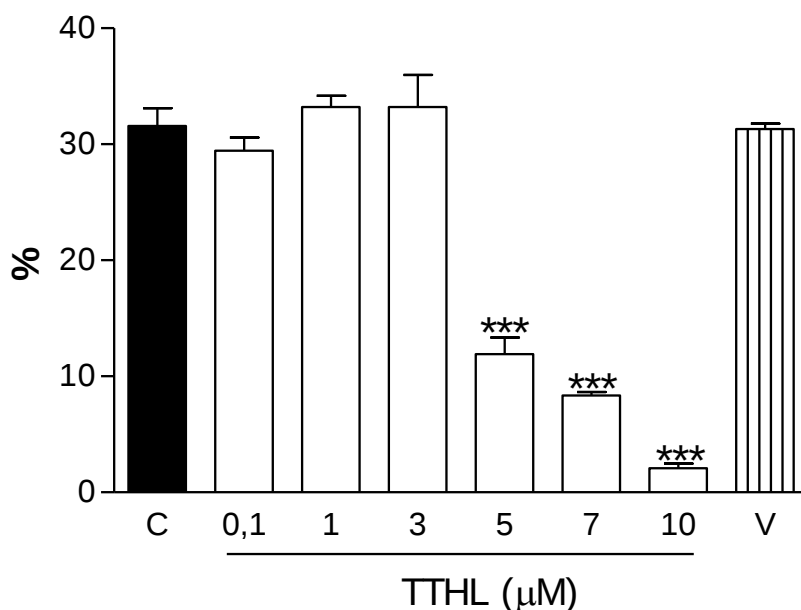
As células foram avaliadas por citometria de fluxo, após 48 horas de tratamento. Diferença significativa com o controle *** $p < 0,001$. Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

Figura 20. Avaliação da porcentagem de células presentes na fase G0/G1 do ciclo celular após o tratamento com o TTHL



As células foram avaliadas por citometria de fluxo, após 48 horas de tratamento. Diferença significativa com o controle, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

Figura 21. Avaliação da porcentagem de células presentes na fase S/G2/M do ciclo celular após o tratamento com o TTHL

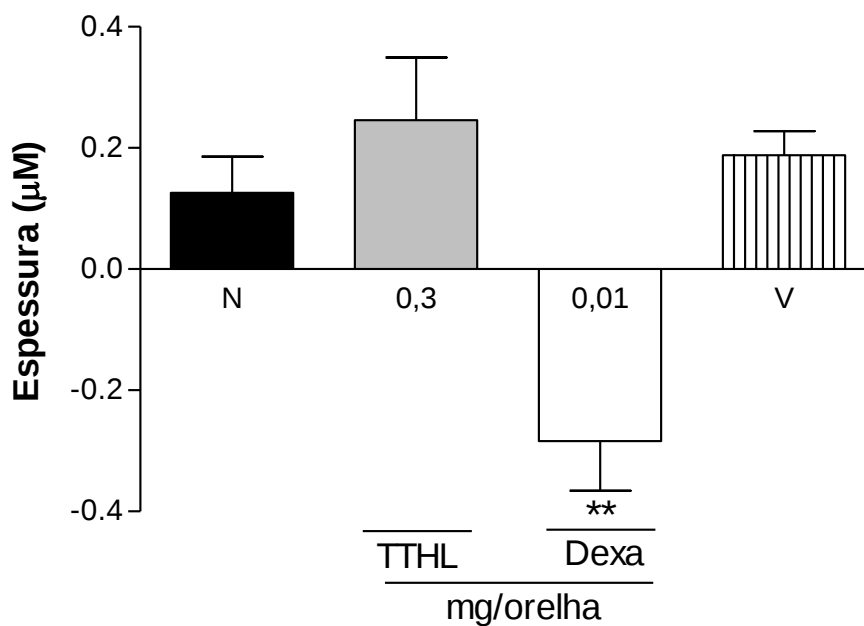


As células foram avaliadas por citometria de fluxo, após 48 horas de tratamento. Diferença significativa com o controle *** $p < 0,001$. Controle (C – 10% SFB) e Veículo (V – 0,01% etanol).

4.6 Ensaio de atrofia cutânea em camundongos

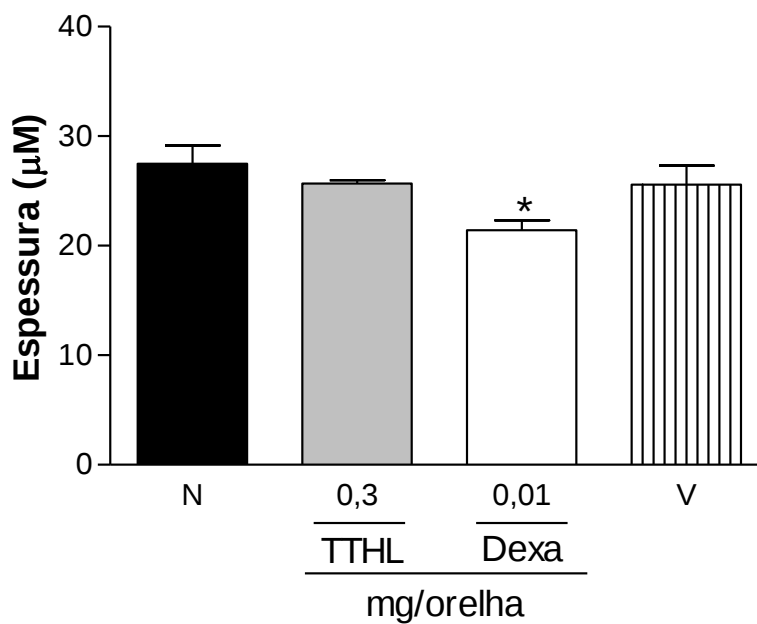
Este ensaio teve por objetivo avaliar a possível toxicidade do TTHL quando aplicado topicamente na orelha de camundongos. Após a realização do ensaio crônico, onde o TTHL, a Dexametasona e o Veículo foram aplicados topicamente a cada 12 horas, durante 7 dias, foi possível observar que o TTHL não diminuiu a espessura das orelhas dos animais como o controle positivo (Fig. 22), Dexametasona, quando comparado ao grupo controle (Naive – N). Para confirmar este resultado, foi realizada a análise histológica utilizando a coloração de Tricômico de Masson (Fig. 23 e 24). Nesta, observou-se que, da mesma forma que o ensaio anterior, o TTHL não diminuiu a espessura da derme da orelha dos animais como a Dexametasona. Sugerindo desta forma, que o mesmo não causa atrofia cutânea no modelo animal.

Figura 22. Espessura das orelhas dos camundongos



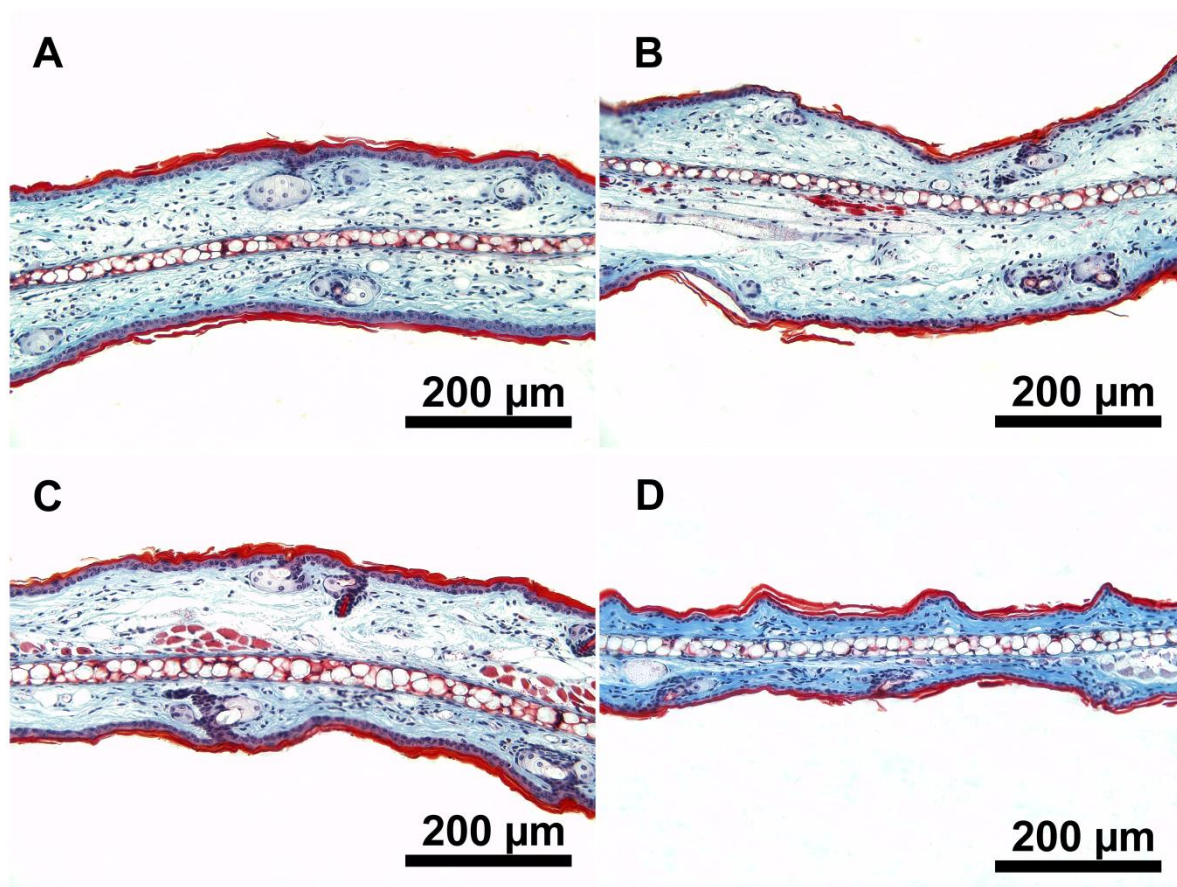
Avaliação da espessura das orelhas dos camundongos após a aplicação de TTHL (0,3mg/orelha) e Dexametasona (0,01mg/orelha). Diferença significativa com o grupo Controle (N), ** $p < 0,01$.

Figura 23. Análise histológica da espessura da derme



Avaliação histológica, através da coloração Tricômico de Masson, da derme das orelhas dos camundongos após a aplicação de TTHL (0,3mg/orelha) e Dexametasona (0,01mg/orelha). Diferença significativa com o grupo Controle (N), * $p < 0,05$.

Figura 24. Fotos representativas dos cortes histológicos de orelha de camundongo corados com Tricômico de Masson



Fotos representativas dos cortes histológicos de orelha de camundongo corados com Tricômico de Masson (20x , escala 200µM), 8 dias após o tratamento. (A) Controle (Naive), (B), Veículo (acetona) (C) TTHL (0,3 mg/ orelha) e (D) Dexametasona (0,01 mg/orelha). A cor azul indica colágeno, a vermelha indica citoplasma e queratina e a preta indica núcleos.

5. DISCUSSÃO

A pele forma uma barreira física na interface com o ambiente externo. Este órgão nos protege de diversos insultos, dentre eles: desidratação, insultos mecânicos, químicos e microbiológicos. A manutenção da arquitetura epidermal normal é resultado de um delicado balanço entre a proliferação das células no estrato basal, diferenciação celular nos estratos espinhoso e granuloso, e a morte dos queratinócitos no estrato superficial (córneo) da epiderme, através de apoptose (Boehm, 2006).

Na psoríase, ocorrem dois eventos característicos que levam à perda desta homeostase: hiperplasia epidermal e queratinização anormal. A hiperproliferação dos queratinócitos é resultado da expressão aberrante de diversas moléculas regulatórias associadas à proliferação e diferenciação, além disso, acredita-se que defeitos na apoptose também são importantes na patogênese da psoríase (Boehm, 2006). Dados obtidos de estudos *in vitro* mostraram que os queratinócitos humanos derivados de lesões psoriáticas são resistentes à indução da apoptose quando comparados com queratinócitos derivados da pele normal (Wrone-Smith *et al.*, 1997).

Agentes terapêuticos capazes de inibir a proliferação aberrante, modular a diferenciação e induzir a apoptose em queratinócitos seriam potencialmente úteis no tratamento da psoríase, promovendo um balanço da homeostase epidermal (Lin *et al.*, 2010). A busca por esses agentes é, atualmente, foco de muitas pesquisas relacionadas à psoríase.

Inúmeras plantas medicinais são utilizadas popularmente para o tratamento de muitas doenças cutâneas. Um grande número destas plantas exhibe propriedades farmacológicas e tem um grande potencial fitoterapêutico, porém grande parte destas não tem comprovação científica.

Estudos envolvendo espécies do gênero *Combretum* vêm crescendo e já proporcionaram o isolamento e identificação de diversos compostos com propriedades biológicas conhecidas, como taninos, flavonóides, saponinas, cumarinas, triterpenos, derivados do ácido elágico, glicosídeos antracênicos e derivados de fenantreno. Compostos, provavelmente, responsáveis pelas diversas propriedades biológicas comprovadas em pesquisas (Fyhrquist, 2007). Espécies da família Combretaceae são utilizadas medicinalmente em todo o mundo, para o

tratamento de diversas doenças, dentre estas, doenças de pele (Fyhrquist *et al.*, 2002).

Um dos usos medicinais mais tradicionais das espécies de *Combretum* envolve o tratamento da dor, o que indica uma possível propriedade antiinflamatória desta planta. Em um estudo conduzido por McGaw *et al.* (2001), foi comparada a atividade antiinflamatória e a estabilidade de 20 espécies de *Combretum* crescendo sob mesmas condições ambientais. Foi observado que todos os extratos apresentavam atividade antiinflamatória com uma inibição média de 65% da atividade da ciclooxygenase-1 (McGaw *et al.*, 2001).

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi realizado um estudo utilizando modelo de edema de orelha induzido por éster de forbol, no qual observou-se que a aplicação tópica do extrato etanólico de *C. leprosum* promoveu inibição da indução de edema, reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase e os níveis de IL-6 nos tecidos, apresentando atividade semelhante à dexametasona. Além disso, análises histológicas e imunohistoquímicas revelaram que o extrato etanólico suprime a infiltração celular. No modelo de inflamação crônica de pele, no qual foram realizadas aplicações repetidas de óleo de cróton, o extrato alterou os parâmetros inflamatórios, diminuindo o edema de orelha, a hiperproliferação epidermal e a infiltração celular. Através das análises imunohistoquímicas foi possível observar diminuição na expressão de PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular) na epiderme (Horinouchi *et al.*, 2013).

O composto 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup- 20(29)-eno (TTHL), extraído do extrato etanólico de *C. leprosum*, apresenta poucas evidencias terapêuticas, mas alguns estudos já demonstraram atividade antinociceptiva e antiinflamatória deste composto (Longhi-Balbinot *et al.*, 2009; Longhi-Balbinot *et al.*, 2012; Facundo *et al.*, 2005; Pietrovski *et al.*, 2006). O TTHL apresenta, inclusive, os mesmos mecanismos que o extrato etanólico, frente à dor, resultando em um efeito antinociceptivo (Longhi-Balbinot *et al.*, 2009).

Outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que o TTHL, quando utilizado por via tópica em um modelo de inflamação crônica na orelha, induzida por aplicações repetidas de 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), apresentou atividade antiinflamatória, reduzindo o edema, a migração e a proliferação celular (dados não mostrados). Frente a esses resultados, procuramos

avaliar o efeito do composto TTHL *in vitro*, na proliferação da linhagem celular HaCaT.

Primeiramente avaliamos a citotoxicidade do TTHL em HaCaT. O conjunto de dados apresentados neste estudo revela, tanto através do ensaio de MTT quanto através do ensaio de vermelho neutro, que o TTHL diminuiu a viabilidade celular da linhagem de queratinócitos humanos, HaCaT.

Uma vez que o TTHL diminuiu a viabilidade celular e visto que *in vivo* o triterpeno diminui a proliferação celular, foi realizado um ensaio de proliferação *in vitro*, com o objetivo de observar se o mesmo aconteceria. Através dos resultados obtidos no ensaio de proliferação, pelos métodos de MTT e Cyquant, sugere-se que o TTHL diminuiu a proliferação celular, uma vez que foi observado diminuição do número de células após o tratamento com o composto.

Observando então, diminuição da viabilidade e da proliferação celular após o tratamento com o TTHL, procuramos avaliar de que forma a linhagem celular HaCaT se comportava no ciclo celular, após o tratamento com o triterpeno, e se o mesmo seria capaz de impedir a progressão das células no ciclo celular.

O ciclo celular caracteriza-se por um conjunto de eventos irreversível e ordenado que tem como objetivo a divisão celular (Malumbres e Barbacid, 2001). A regulação do ciclo celular tem um papel importante na manutenção da integridade celular, e a desregulação deste pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças hiperproliferativas, dentre elas, a psoríase (Collins *et al.*, 1997; Sherr, 1996).

A primeira fase do ciclo celular é a fase G₀, onde as células encontram-se quiescentes, ou seja, em repouso. Quando essas células atingem certo tamanho, ou recebem um estímulo para proliferarem, elas expressam marcadores de proliferação e entram na primeira fase (G₁). Na fase G₁ a célula prepara-se para a replicação do DNA, que ocorre na fase posterior, sintética (S). A fase S é seguida da fase G₂, onde a célula sintetiza RNA, proteínas e outras estruturas necessárias para a divisão celular. A última fase é conhecida como mitótica (M), na qual a célula se divide em duas células filhas, e essas duas entram ou na fase G₀ ou na G₁ (Malumbres e Barbacid, 2001).

A progressão do ciclo celular é controlada por pares de ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDKs). A progressão da fase G₀ para G₁ é dependente do complexo ciclina D-CDK4 ou ciclina D-CDK6, enquanto que, para a transição da fase G₁ para S é necessário o complexo ciclina E-CDK2. E finalmente, para a progressão

da fase G2 para M é necessário o complexo ciclina A e B-CDK1 (Sherr e Roberts, 2004).

Os membros da família da proteína retinoblastoma (Rb) associam-se ao fator de transcrição E2F e regulam negativamente a transcrição dependente de E2F. A fosforilação de RB pelo complexo ciclina-CDK resulta na ativação de E2F, uma vez que este é liberado da ação inibitória de Rb. A atividade de E2F é fundamental para a progressão do ciclo celular, uma vez que este regula a transcrição dos genes que contribuem para os processos de replicação do DNA e mitose (Wikenheiser-Brokamp, 2006).

A progressão do ciclo celular também está sob o controle de reguladores negativos, como os inibidores de quinases dependentes de ciclina (CKIs), que pertencem às famílias Ink4 ou Cip/Kip. Os membros da família Ink4, como por exemplo: p16Ink4a (p16), p15Ink4b (p15), p18Ink4c (p18), e p19Ink4d (p19), são inibidores específicos para CDK4 ou CDK6. Já os membros pertencentes a família Cip/Kip, que incluem: p21Cip1 (p21), p27Kip1 (p27), e p57Kip2 (p57), geralmente inibem CDK2 e CDK4/CDK6 (e CDK1 em algumas situações) (Sherr e Roberts, 1999).

O controle do ciclo celular permite o controle da proliferação dos queratinócitos, mantendo um balanço da homeostase epidermal. O conhecimento da regulação do ciclo celular permite-nos explorar a patofisiologia de diversas doenças cutâneas, inclusive pesquisar novas alternativas terapêuticas para o tratamento destas.

Pudemos constatar, através do ensaio de ciclo celular, que o composto TTHL foi capaz de diminuir a progressão das células no ciclo celular, uma vez que, a maioria das células encontrou-se na fase Sub-G1, ou seja, tornaram-se inviáveis. Além disso, foi possível observar uma redução na porcentagem de células nas fases G0/G1 e S/G2/M, havendo, consequentemente, redução da proliferação celular.

Estes resultados obtidos com o TTHL assemelham-se ao estudo conduzido por Zhou *et al.* (2011). Neste, os pesquisadores utilizaram um triterpeno isolado da erva *Celastrus orbiculatus*, o Celastrol. Através do ensaio de MTT, o composto celastrol também inibe a proliferação de células HaCaT, e no ensaio de ciclo celular, assim como o TTHL, o celastrol aumenta a população de queratinócitos HaCaT na fase sub-G1 do ciclo celular. O autor concluiu, através do ensaio de apoptose, utilizando um kit de detecção de apoptose “ApopNexin™ FITC”, que as células

presentes na fase sub-G1 eram células apoptóticas, e que o processo pelo qual as células entraram em apoptose incluem a apoptose extrínseca (receptor de morte) e intrínseca (rompimento mitocondrial) (Zhou *et al.*, 2011). Estudos mostram que diversos triterpenóides, como o ácido ursólico, ácido betulínico e pristimerina induziram apoptose em diversos tipos de células cancerígenas em cultura (Petronelli *et al.*, 2009).

O extrato etanólico de *Radix Rubiae* (Rubiaceae), uma erva comumente prescrita na medicina chinesa para o tratamento da psoríase, também demonstrou atividade antiproliferativa, de maneira concentração e tempo dependente, na linhagem celular HaCaT, através do método de MTT. Neste trabalho foi observado que *Radix Rubiae*, da mesma forma que o TTHL e o celastrol, aumenta a população de células HaCaT na fase sub-G1 do ciclo celular, reduzindo o número de células nas fases S/G2/M. O estudo sugere que esta erva induz parada no ciclo celular na fase G1, induzindo a apoptose nessas células, confirmada pela coloração de Hoechst e pelo ensaio utilizando o Kit de Anexina. Pela análise de Western Blot, o autor confirmou que a apoptose decorreu pela ativação de caspase-3 (Tse *et al.*, 2007).

Hsiao *et al.* (2009) demonstraram atividade citotóxica de maneira concentração e tempo dependente, do ácido láctico frente às células HaCaT, nas quais foi possível observar alterações morfológicas. As alterações nestas células foram decorrentes da indução de apoptose dependente e independente de caspase. Neste estudo, diferente do que foi observado para o TTHL, ocorreu parada das células no ciclo celular na fase G1/S. Os dados referentes ao ciclo celular, apresentados neste estudo, revelam que houve uma diminuição na expressão das ciclinas A, E e da quinase dependente de ciclina 2 (CDK2) e um aumento na expressão dos inibidores de quinase dependente de ciclina, P21 e P27. Essas alterações no ciclo celular impedem a progressão das células no ciclo celular e induzem a morte celular por apoptose, diminuindo, consequentemente, a proliferação celular (Hsiao *et al.*, 2009).

Li *et al.* (2012) conduziram um estudo utilizando Tanshinone II A, ingrediente extraído da raiz seca de *Salvia miltiorrhiza radix*, outra erva utilizada na medicina chinesa. Neste estudo observou-se um aumento do número de células HaCaT tratadas com essa erva, na fase S e G2/M do ciclo celular, através da coloração Krishan. E esse aumento de células nestas fases, ocasionadas pela parada no ciclo

celular, foram acompanhadas por uma diminuição das proteínas Cdk2 e ciclina A. Através da coloração de Hoechst/PI e do método Apo-BrdU, foi possível observar que Tanshinone II A induz apoptose nas células de maneira concentração e tempo dependente, através da via das caspases (Li *et al.*, 2012).

Um estudo conduzido por Lin *et al.* (2009) demonstrou a atividade antiproliferativa de *Indigo naturalis* frente à queratinócitos primários. Neste estudo foi observada uma diminuição da expressão de PCNA, um cofator da DNA polimerase, crítico para a progressão para a fase S do ciclo celular. Desta forma, a inibição de PCNA contribuiu para a atividade antiproliferativa do *Indigo naturalis*, bloqueando a proliferação dos queratinócitos. Além disso, foi observado neste estudo que *Indigo naturalis* pode aumentar a expressão do gene da involucrina, um marcador precoce de diferenciação terminal. Após o tratamento com o *Indigo naturalis*, os queratinócitos apresentaram aumento de tamanho, sugerindo que este composto promove mudança na natureza dos queratinócitos, de proliferação para diferenciação. O *Indigo naturalis*, e um composto isolado obtido a partir dele, chamado indirubina, regulam a expressão gênica do PCNA e involucrina. Como conclusão do estudo o autor sugeriu que a atividade antipsoriática observada, resulta, ao menos em parte, pela inibição da proliferação e pela promoção da diferenciação em queratinócitos humanos (Lin *et al.*, 2009).

Considerando que a apoptose é uma possível alternativa terapêutica para o tratamento da psoríase, um possível mecanismo pelo qual o TTHL impede a progressão das células no ciclo celular e torna estas inviáveis, seria a indução da apoptose nestas, assim como ocorreu nos compostos acima citados. Para tanto, é necessário realizar ensaios de morte celular, como por exemplo, avaliação da apoptose. Além disso, seria interessante observar se o TTHL reduz a proliferação, através da redução da expressão do PCNA *in vitro*, já que ele reduziu a expressão deste *in vivo*.

Visto que o TTHL apresenta atividade antiinflamatória semelhante à dexametasona (dados não mostrados), procurou-se avaliar a possível indução de atrofia cutânea deste composto *in vivo*, como é observado nos glicocorticoides.

Lembrando que os glicocorticoides são agentes antiinflamatórios e imunossupressores potentes. Estes agentes são largamente utilizados na prática clínica para tratar doenças sistêmicas autoimunes, asma, doenças de pele, reações alérgicas e outras doenças sistêmicas (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2012).

Os glicocorticoides exercem seus efeitos antiinflamatório e imunossupressor reduzindo a expressão de citocinas e moléculas de adesão, inibindo o tráfego de leucócitos e seu acesso ao local da inflamação e interferindo com a função dos leucócitos, fibroblastos e células endoteliais. Eles também reduzem o número de monócitos circulantes e macrófagos, diminuindo a mielopoiese e liberação da medula óssea. Também reduzem a expressão do MHC e receptores Fc assim como a síntese de citocinas pro-inflamatórias, como IL-2, IL-6, TNF- α e prostaglandinas. Tem também efeito sobre as células T, diminuindo a produção e ação sobre IL-2 e diminuindo a circulação de células T. Também atuam diminuindo a permeabilidade vascular, a expressão de moléculas de adesão e a produção de IL-1 e prostaglandinas. Além disso, afetam a função granulocítica através do aumento do número de neutrófilos circulantes e redução dos eosinófilos e basófilos. Por fim, os glicocorticoides diminuem a proliferação dos fibroblastos e a produção de fibronectinas e prostaglandinas (Buttgereit *et al.*, 2005).

As doenças inflamatórias cutâneas são tratadas, em sua maioria, com glicocorticoides tópicos, uma vez que apresentam propriedades antiinflamatórias excelentes. Porém, sua atividade é prejudicada pelos efeitos adversos ocasionados pelo uso contínuo. A atrofia da pele é o efeito adverso cutâneo irreversível mais proeminente, e envolve tanto a epiderme, quanto a derme (Schacke *et al.*, 2002). Na epiderme ocorre redução do tamanho e da proliferação dos queratinócitos (Delforno *et al.*, 1978; Lange *et al.*, 1997) e na derme ocorre diminuição na proliferação dos fibroblastos (Ponec *et al.*, 1977). Após a utilização de glicocorticoides, ocorre um aumento da fragilidade, de ruptura e de transparência cutânea, assim como um aumento de feridas e da transparência da pele (Kaya e Saurat, 2007). Foi demonstrado, a nível molecular, que os glicocorticoides modulam a síntese de colágeno na pele humana. Em diversos estudos observou-se que a aplicação de glicocorticoide diminui a síntese de colágeno do tipo I e tipo III (Oikarinen *et al.*, 1998; Nuutinen *et al.*, 2003; Schoepe *et al.*, 2006).

Após realizar um ensaio crônico, aplicando o TTHL a cada 12 horas durante 7 dias, observou-se que o composto TTHL não causa atrofia cutânea como a dexametasona e outros glicocorticoides. Isto é um fato bastante interessante, pois mostra que o TTHL, apesar de apresentar atividade antiinflamatória semelhante à dexametasona (dados não mostrados), não apresenta um dos efeitos colaterais por ela apresentado, a atrofia.

Visto que os tratamentos atualmente utilizados para o tratamento da psoríase são agressivos, não efetivos em todos os casos (Gottlieb, 2005b), e muitas vezes apresentam um alto custo para os pacientes (Calixto, 2000), vários estudos estão sendo desenvolvidos com o propósito de encontrar opções de tratamento melhores, com maior eficácia, menos efeitos colaterais e com um preço mais acessível. E muitos destes estudos têm por objetivo o desenvolvimento de medicamentos através do uso de plantas medicinais (Calixto *et al.*, 2003).

A partir dos dados obtidos com o TTHL neste trabalho, pode-se sugerir que compostos que diminuem a proliferação celular com um menor número de efeitos colaterais, seriam boas alternativas de tratamento para doenças hiperproliferativas, dentre elas, a psoríase.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, observamos que o composto TTHL, extraído da planta *Combretum leprosum*, é capaz de diminuir a viabilidade e a proliferação celular, impedindo a progressão das células no ciclo celular. Além disso, não causa atrofia cutânea, um efeito colateral observado nos glicocorticoides. Esses dados sugerem que o TTHL possa ser uma possível ferramenta para o tratamento de doenças hiperproliferativas, como a psoríase.

Entretanto, estudos adicionais são necessários para verificar o mecanismo de ação e segurança do triterpeno.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E. A.; DICICCO, L. M.; ORENBERG, E. K.; FRAKI, J. E. et al. Drugs in Exacerbation of Psoriasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 5, p. 1007-1022, 1986.

ADNYANA, I. K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; TRAN, K. Q. et al. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. **J Nat Prod**, v. 64, n. 3, p. 360-3, 2001.

ALBANESI, C.; DE PITA, O.; GIROLOMONI, G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 6, p. 581-8, 2007.

ALI, H.; KONIG, G. M.; KHALID, S. A.; WRIGHT, A. D. et al. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **J Ethnopharmacol**, v. 83, n. 3, p. 219-28, 2002.

ANCOLIO, C.; AZAS, N.; MAHIOU, V.; OLLIVIER, E. et al. Antimalarial activity of extracts and alkaloids isolated from six plants used in traditional medicine in Mali and Sao Tome. **Phytother Res**, v. 16, n. 7, p. 646-9, 2002.

ARICAN, O.; ARAL, M.; SASMAZ, S.; CIRAGIL, P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. **Mediators Inflamm**, v. 2005, n. 5, p. 273-9, 2005.

ASRES, K.; BUCAR, F.; KNAUDER, E.; YARDLEY, V. et al. In vitro antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. **Phytother Res**, v. 15, n. 7, p. 613-7, 2001.

BAKKER, J. B.; PEPPLINKHUIZEN, L. More about the relationship of lithium to psoriasis. **Psychosomatics**, v. 17, n. 3, p. 143-6, 1976.

BASSO, L. A.; DA SILVA, L. H.; FETT-NETO, A. G.; DE AZEVEDO, W. F., JR. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 475-506, 2005.

BATA-CSORGO, Z.; HAMMERBERG, C.; VOORHEES, J. J.; COOPER, K. D. Flow cytometric identification of proliferative subpopulations within normal human epidermis and the localization of the primary hyperproliferative population in psoriasis. **J Exp Med**, v. 178, n. 4, p. 1271-81, 1993.

BESSONG, P. O.; OBI, C. L.; ANDREOLA, M. L.; ROJAS, L. B. et al. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. **J Ethnopharmacol**, v. 99, n. 1, p. 83-91, 2005.

BHALERAO, J.; BOWCOCK, A. M. The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. **Hum Mol Genet**, v. 7, n. 10, p. 1537-45, 1998.

BOEHM, I. Apoptosis in physiological and pathological skin: implications for therapy. **Curr Mol Med**, v. 6, n. 4, p. 375-94, 2006.

BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Curr Opin Chem Biol**, v. 8, n. 3, p. 281-6, 2004.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett**, v. 24, n. 2-3, p. 119-24, 1985.

BOS, J. D.; KAPSENBERG, M. L. The skin immune system: progress in cutaneous biology. **Immunol Today**, v. 14, n. 2, p. 75-8, 1993.

BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNUNG, J. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J Cell Biol**, v. 106, n. 3, p. 761-71, 1988.

BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Getting under the skin: The immunogenetics of psoriasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2005.

BUTTGEREIT, F.; SAAG, K. G.; CUTOLO, M.; DA SILVA, J. A. et al. The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. **Scand J Rheumatol**, v. 34, n. 1, p. 14-21, 2005.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 2, p. 179-89, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Med**, v. 69, n. 11, p. 973-83, 2003.

CASSANO, N.; VESTITA, M.; APRUZZI, D.; VENA, G. A. Alcohol, psoriasis, liver disease, and anti-psoriasis drugs. **Int J Dermatol**, v. 50, n. 11, p. 1323-31, 2011.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-37, 2004.

CLARKE, P. Psoriasis. **Aust Fam Physician**, v. 40, n. 7, p. 468-73, 2011.

COIMBRA, S.; FIGUEIREDO, A.; CASTRO, E.; ROCHA-PEREIRA, P. et al. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. **Int J Dermatol**, v. 51, n. 4, p. 389-95; quiz 395-8, 2012.

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. The cell cycle and cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 2776-8, 1997.

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 5-14, 2005.

DANILENKO, D. M. Review paper: preclinical models of psoriasis. **Vet Pathol**, v. 45, n. 4, p. 563-75, 2008.

DE JONG, E. M. The course of psoriasis. **Clin Dermatol**, v. 15, n. 5, p. 687-92, 1997.

DE RIE, M. A.; GOEDKOOP, A. Y.; BOS, J. D. Overview of psoriasis. **Dermatol Ther**, v. 17, n. 5, p. 341-9, 2004.

DELFORNO, C.; HOLT, P. J.; MARKS, R. Corticosteroid effect on epidermal cell size. **Br J Dermatol**, v. 98, n. 6, p. 619-23, 1978.

DENDA, M.; HOSOI, J.; ASIDA, Y. Visual imaging of ion distribution in human epidermis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 272, n. 1, p. 134-7, 2000.

DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 7, p. 1141-6, 2004.

DI MEGLIO, P.; PERERA, G. K.; NESTLE, F. O. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. **Immunity**, v. 35, n. 6, p. 857-69, 2011.

DOMMASCH, E. D.; ABUABARA, K.; SHIN, D. B.; NGUYEN, J. et al. The risk of infection and malignancy with tumor necrosis factor antagonists in adults with psoriatic disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Am Acad Dermatol**, v. 64, n. 6, p. 1035-50, 2011.

ECKERT, R. L.; CRISH, J. F.; ROBINSON, N. A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. **Physiol Rev**, v. 77, n. 2, p. 397-424, 1997.

ECKERT, R. L.; EFIMOVA, T.; DASHTI, S. R.; BALASUBRAMANIAN, S. et al. Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. **J Invest Dermatol Symp Proc**, v. 7, n. 1, p. 36-40, 2002.

FANTUZZI, G.; REED, D. A.; DINARELLO, C. A. IL-12-induced IFN-gamma is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. **J Clin Invest**, v. 104, n. 6, p. 761-7, 1999.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Psoriasis: it's more than just the skin. **J Lipid Res**, v. 53, n. 8, p. 1427-9, 2012.

FIERLBECK, G.; RASSNER, G.; MULLER, C. Psoriasis induced at the injection site of recombinant interferon gamma. Results of immunohistologic investigations. **Arch Dermatol**, v. 126, n. 3, p. 351-5, 1990.

FU, M.; WANG, G. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. **J Dermatol Sci**, v. 67, n. 3, p. 161-5, 2012.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTROM, C. A.; VUORELA, H. et al. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. **J Ethnopharmacol**, v. 79, n. 2, p. 169-77, 2002.

FYHRQUIST, P. Traditional medicinal uses and biological activities of some plant extracts of African *Combretum* Loebl., *Terminalia* L. and *Pteleopsis* Engl. Species (Combretaceae). **Dissertação Acadêmica**. Universidade de Helsinki, Helsinki, 2007.

GALADARI, I.; SHARIF, M. O.; GALADARI, H. Psoriasis: a fresh look. **Clin Dermatol**, v. 23, n. 5, p. 491-502, 2005.

GLADMAN, D. D.; FAREWELL, V. T.; KOPCIUK, K. A.; COOK, R. J. HLA markers and progression in psoriatic arthritis. **J Rheumatol**, v. 25, n. 4, p. 730-3, 1998.

GNIADDECKI, R. Regulation of keratinocyte proliferation. **Gen Pharmacol**, v. 30, n. 5, p. 619-22, 1998.

GOTTLIEB, A. B. Psoriasis: emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 1, p. 19-34, 2005a.

GOTTLIEB, A. B. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. **J Am Acad Dermatol**, v. 53, n. 1 Suppl 1, p. S3-16, 2005b.

GRIFFITHS, C. E.; BARKER, J. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. **Lancet**, v. 370, n. 9583, p. 263-71, 2007.

GRIFFON, G.; MERLIN, J. L.; MARCHAL, C. Comparison of sulforhodamine B, tetrazolium and clonogenic assays for in vitro radiosensitivity testing in human ovarian cell lines. **Anticancer Drugs**, v. 6, n. 1, p. 115-23, 1995.

GRIGGS, J.; METCALFE, J. C.; HESKETH, R. Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A4. **Lancet Oncol**, v. 2, n. 2, p. 82-7, 2001.

HAROON, M.; KIRBY, B.; FITZGERALD, O. High prevalence of psoriatic arthritis in patients with severe psoriasis with suboptimal performance of screening questionnaires. **Ann Rheum Dis**, 2012.

HORINOUCI, C. D.; MENDES, D. A.; SOLEY BDA, S.; PIETROVSKI, E. F. et al. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): Potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **J Ethnopharmacol**, v. 145, n. 1, p. 311-9, 2013.

HSIAO, Y. P.; HUANG, H. L.; LAI, W. W.; CHUNG, J. G. et al. Antiproliferative effects of lactic acid via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in a human keratinocyte cell line (HaCaT). **J Dermatol Sci**, v. 54, n. 3, p. 175-84, 2009.

IRLA, N.; NAVARINI, A. A.; YAWALKAR, N. Alitretinoin abrogates innate inflammation in palmoplantar pustular psoriasis. **Br J Dermatol**, 2012.

JACOBSON, C. C.; KUMAR, S.; KIMBALL, A. B. Latitude and psoriasis prevalence. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, n. 4, p. 870-3, 2011.

KASTELAN, D.; KASTELAN, M.; MASSARI, L. P.; KORSIC, M. Possible association of psoriasis and reduced bone mineral density due to increased TNF-alpha and IL-6 concentrations. **Med Hypotheses**, v. 67, n. 6, p. 1403-5, 2006.

KASTELAN, M.; PRPIC-MASSARI, L.; BRAJAC, I. Apoptosis in psoriasis. **Acta Dermatovenerol Croat**, v. 17, n. 3, p. 182-6, 2009.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, n. 1, p. 81-8, 2003.

KAYA, G.; SAURAT, J. H. Dermatoporosis: a chronic cutaneous insufficiency/fragility syndrome. Clinicopathological features, mechanisms, prevention and potential treatments. **Dermatology**, v. 215, n. 4, p. 284-94, 2007.

KIMBALL, A. B.; GLADMAN, D.; GELFAND, J. M.; GORDON, K. et al. National Psoriasis Foundation clinical consensus on psoriasis comorbidities and recommendations for screening. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, n. 6, p. 1031-42, 2008.

KOBAYASHI, H.; ISHII, M.; TAKEUCHI, S.; TANAKA, Y. et al. Efficacy and Safety of a Traditional Herbal Medicine, Hochu-ekki-to in the Long-term Management of Kikyo (Delicate Constitution) Patients with Atopic Dermatitis: A 6-month, Multicenter, Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Study. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 7, n. 3, p. 367-73, 2010.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 3, p. 206-20, 2005.

KRUEGER, G.; ELLIS, C. N. Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 53, n. 1 Suppl 1, p. S94-100, 2005.

KRUEGER, J. G. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. **J Am Acad Dermatol**, v. 46, n. 1, p. 1-23; quiz 23-6, 2002.

KRUEGER, J. G.; BOWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Ann Rheum Dis**, v. 64 Suppl 2, p. ii30-6, 2005.

KURRER, M. O.; PAKALA, S. V.; HANSON, H. L.; KATZ, J. D. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 1, p. 213-8, 1997.

LANGE, K.; GYSLER, A.; BADER, M.; KLEUSER, B. et al. Prednicarbate versus conventional topical glucocorticoids: pharmacodynamic characterization in vitro. **Pharm Res**, v. 14, n. 12, p. 1744-9, 1997.

LANGLEY, R. G.; KRUEGER, G. G.; GRIFFITHS, C. E. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. **Ann Rheum Dis**, v. 64 Suppl 2, p. ii18-23; discussion ii24-5, 2005.

LATKOWSKI, J. M.; FREEDBERG, I. M.; BLUMENBERG, M. Keratinocyte growth factor and keratin gene regulation. **J Dermatol Sci**, v. 9, n. 1, p. 36-44, 1995.

LEBWOHL, M. Psoriasis. **Lancet**, v. 361, n. 9364, p. 1197-204, 2003.

LEE, M. R.; COOPER, A. J. Immunopathogenesis of psoriasis. **Australas J Dermatol**, v. 47, n. 3, p. 151-9, 2006.

LERMAN, G.; VOLMAN, E.; SIDI, Y.; AVNI, D. Small-interfering RNA targeted at antiapoptotic mRNA increases keratinocyte sensitivity to apoptosis. **Br J Dermatol**, v. 164, n. 5, p. 947-56, 2011.

LI, F. L.; XU, R.; ZENG, Q. C.; LI, X. et al. Tanshinone IIA Inhibits Growth of Keratinocytes through Cell Cycle Arrest and Apoptosis: Underlying Treatment Mechanism of Psoriasis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 927658, 2012.

LI, Y.; BEGOVICH, A. B. Unraveling the genetics of complex diseases: susceptibility genes for rheumatoid arthritis and psoriasis. **Semin Immunol**, v. 21, n. 6, p. 318-27, 2009.

LIN, Y. K.; LEU, Y. L.; YANG, S. H.; CHEN, H. W. et al. Anti-psoriatic effects of indigo naturalis on the proliferation and differentiation of keratinocytes with indirubin as the active component. **J Dermatol Sci**, v. 54, n. 3, p. 168-74, 2009.

LIN, Z. X.; JIAO, B. W.; CHE, C. T.; ZUO, Z. et al. Ethyl acetate fraction of the root of *Rubia cordifolia* L. inhibits keratinocyte proliferation in vitro and promotes keratinocyte differentiation in vivo: potential application for psoriasis treatment. **Phytother Res**, v. 24, n. 7, p. 1056-64, 2010.

LINDEN, K. G.; WEINSTEIN, G. D. Psoriasis: current perspectives with an emphasis on treatment. **Am J Med**, v. 107, n. 6, p. 595-605, 1999.

LONGHI-BALBINOT, D. T.; LANZMASTER, D.; BAGGIO, C. H.; SILVA, M. D. et al. Anti-inflammatory effect of triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 142, n. 1, p. 59-64, 2012.

LONGHI-BALBINOT, D. T.; MARTINS, D. F.; LANZMASTER, D.; SILVA, M. D. et al. Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihydroxylup-20(29)-ene in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 653, n. 1-3, p. 32-40, 2011.

LONGHI-BALBINOT, D. T.; PIETROVSKI, E. F.; GADOTTI, V. M.; MARTINS, D. F. et al. Spinal antinociception evoked by the triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihydroxylup-20(29)-ene in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic

system via NMDA and metabotropic glutamate receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 623, n. 1-3, p. 30-6, 2009.

LOWES, M. A.; BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 866-73, 2007.

LUCENA, G. M.; GADOTTI, V. M.; MAFFI, L. C.; SILVA, G. S. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 1, p. 19-25, 2007.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Exp Gerontol**, v. 42, n. 9, p. 879-86, 2007.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 3, p. 222-31, 2001.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R.; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 93, n. 2-3, p. 207-12, 2004.

MASIKA, P. J.; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. **J Ethnopharmacol**, v. 83, n. 1-2, p. 129-34, 2002.

MCGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JAGER, A. K. et al. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **J Ethnopharmacol**, v. 75, n. 1, p. 45-50, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAM, N. H. Combretastatin A-4 analogues as antimitotic antitumor agents. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 17, p. 1697-722, 2003.

NESTLE, F. O.; DI MEGLIO, P.; QIN, J. Z.; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 10, p. 679-91, 2009.

NESTLE, F. O.; KAPLAN, D. H.; BARKER, J. Psoriasis. **N Engl J Med**, v. 361, n. 5, p. 496-509, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 1022-37, 2003.

NICKOLOFF, B. J. Cracking the cytokine code in psoriasis. **Nat Med**, v. 13, n. 3, p. 242-4, 2007.

NUUTINEN, P.; RIEKKI, R.; PARIKKA, M.; SALO, T. et al. Modulation of collagen synthesis and mRNA by continuous and intermittent use of topical hydrocortisone in human skin. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 1, p. 39-45, 2003.

OGILVIE, A. L.; LUFTL, M.; ANTONI, C.; SCHULER, G. et al. Leukocyte infiltration and mRNA expression of IL-20, IL-8 and TNF-R P60 in psoriatic skin is driven by TNF-alpha. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 19, n. 2, p. 271-8, 2006.

OIKARINEN, A.; HAAPASAARI, K. M.; SUTINEN, M.; TASANEN, K. The molecular basis of glucocorticoid-induced skin atrophy: topical glucocorticoid apparently decreases both collagen synthesis and the corresponding collagen mRNA level in human skin in vivo. **Br J Dermatol**, v. 139, n. 6, p. 1106-10, 1998.

OLAJIDE, O. A.; MAKINDE, J. M.; OKPAKO, D. T. Evaluation of the anti-inflammatory property of the extract of Combretum micranthum G. Don (Combretaceae). **Inflammopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 293-8, 2003.

PADMAVATHI, B.; RATH, P. C.; RAO, A. R.; SINGH, R. P. Roots of Withania somnifera Inhibit Forestomach and Skin Carcinogenesis in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, n. 1, p. 99-105, 2005.

PARK, H.; LI, Z.; YANG, X. O.; CHANG, S. H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1133-41, 2005.

PERERA, G. K.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Psoriasis. **Annu Rev Pathol**, v. 7, p. 385-422, 2012.

PETRONELLI, A.; PANNITTERI, G.; TESTA, U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anticancer Drugs**, v. 20, n. 10, p. 880-92, 2009.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K. et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from the flowers of Combretum leprosum in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 1, p. 90-9, 2006.

PLAEGER, S. F. Clinical immunology and traditional herbal medicines. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 10, n. 3, p. 337-8, 2003.

PONEC, M.; DE HAAS, C.; BACHRA, B. N.; POLANO, M. K. Effects of glucocorticosteroids on primary human skin fibroblasts. I. Inhibition of the proliferation of cultured primary human skin and mouse L929 fibroblasts. **Arch Dermatol Res**, v. 259, n. 2, p. 117-23, 1977.

POPA, C.; NETEA, M. G.; RADSTAKE, T.; VAN DER MEER, J. W. et al. Influence of anti-tumour necrosis factor therapy on cardiovascular risk factors in patients with active rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 64, n. 2, p. 303-5, 2005.

POTOK, O.; PRAJAPATI, V.; BARANKIN, B. Dermacase. Can you identify this condition? Guttate psoriasis. **Can Fam Physician**, v. 57, n. 1, p. 55-7, 2011.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Exp Dermatol**, v. 17, n. 12, p. 1063-72, 2008.

PUREN, A. J.; FANTUZZI, G.; GU, Y.; SU, M. S. et al. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14⁺ human blood mononuclear cells. **J Clin Invest**, v. 101, n. 3, p. 711-21, 1998.

RUIZ-IRASTORZA, G.; DANZA, A.; KHAMASHTA, M. Glucocorticoid use and abuse in SLE. **Rheumatology (Oxford)**, v. 51, n. 7, p. 1145-53, 2012.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 3-4, p. 161-71, 2008.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHOEPE, S.; SCHACKE, H.; MAY, E.; ASADULLAH, K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. **Exp Dermatol**, v. 15, n. 6, p. 406-20, 2006.

SCHON, M. P.; BOEHNCKE, W. H. Psoriasis. **N Engl J Med**, v. 352, n. 18, p. 1899-912, 2005.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **J Clin Invest**, v. 116, n. 5, p. 1150-8, 2006.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1672-7, 1996.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev**, v. 13, n. 12, p. 1501-12, 1999.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. **Genes Dev**, v. 18, n. 22, p. 2699-711, 2004.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; BAGGIO, C. H. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)-linked beta-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **Eur J Pharmacol**, v. 597, n. 1-3, p. 86-91, 2008.

STREILEIN, J. W. Skin-associated lymphoid tissues (SALT): origins and functions. **J Invest Dermatol**, v. 80 Suppl, p. 12s-16s, 1983.

TOBIN, D. J. Biochemistry of human skin--our brain on the outside. **Chem Soc Rev**, v. 35, n. 1, p. 52-67, 2006.

TOMKOVA, H.; FUJIMOTO, W.; ARATA, J. Expression of bcl-2 antagonist bak in inflammatory and neoplastic skin diseases. **Br J Dermatol**, v. 137, n. 5, p. 703-8, 1997.

TONEL, G.; CONRAD, C. Interplay between keratinocytes and immune cells--recent insights into psoriasis pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 5, p. 963-8, 2009.

TSANKOV, N.; ANGELOVA, I.; KAZANDJIEVA, J. Drug-induced psoriasis. Recognition and management. **Am J Clin Dermatol**, v. 1, n. 3, p. 159-65, 2000.

TSE, W. P.; CHENG, C. H.; CHE, C. T.; LIN, Z. X. Arsenic trioxide, arsenic pentoxide, and arsenic iodide inhibit human keratinocyte proliferation through the induction of apoptosis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 326, n. 2, p. 388-94, 2008.

TSE, W. P.; CHENG, C. H.; CHE, C. T.; ZHAO, M. et al. Induction of apoptosis underlies the Radix Rubiae-mediated anti-proliferative action on human epidermal keratinocytes: implications for psoriasis treatment. **Int J Mol Med**, v. 20, n. 5, p. 663-72, 2007.

TU, C. L.; ODA, Y.; KOMUVES, L.; BIKLE, D. D. The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. **Cell Calcium**, v. 35, n. 3, p. 265-73, 2004.

VAN DE KERKHOF, P. C.; MURPHY, G. M.; AUSTAD, J.; LJUNGBERG, A. et al. Psoriasis of the face and flexures. **J Dermatolog Treat**, v. 18, n. 6, p. 351-60, 2007.

VAN VOORHEES, A. S.; FRIED, R. Depression and quality of life in psoriasis. **Postgrad Med**, v. 121, n. 4, p. 154-61, 2009.

WIKENHEISER-BROKAMP, K. A. Retinoblastoma family proteins: insights gained through genetic manipulation of mice. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 7-8, p. 767-80, 2006.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KANNO, J. et al. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **J Invest Dermatol**, v. 102, n. 6, p. 915-22, 1994.

WRONE-SMITH, T.; MITRA, R. S.; THOMPSON, C. B.; JASTY, R. et al. Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin. **Am J Pathol**, v. 151, n. 5, p. 1321-9, 1997.

ZATTRA, E.; BELLONI FORTINA, A.; PESERICO, A.; ALAIBAC, M. Erythroderma in the era of biological therapies. **Eur J Dermatol**, v. 22, n. 2, p. 167-71, 2012.

ZEASHAN, H.; AMRESH, G.; RAO, C. V.; SINGH, S. Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. **J Ethnopharmacol**, v. 122, n. 3, p. 492-6, 2009.

ZHOU, L. L.; LIN, Z. X.; FUNG, K. P.; CHENG, C. H. et al. Celastrol-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes involves the inhibition of NF-kappaB activity. **Eur J Pharmacol**, v. 670, n. 2-3, p. 399-408, 2011.