UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e
contenção da invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele
artificial

Carla Abdo Brohem

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Silvy Stuchi Maria Engler

São Paulo
2010

Carla Abdo Brohem

Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e
contenção da invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele
artificial

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a Silvy Stuchi Maria Engler
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2010

*Aos meus pais,
Lohengrin Brohem e Josélia Brohem,
por todo amor e compreensão, sem os quais esse trabalho seria impossível.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente devo dizer que muitas pessoas contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Sem essas pessoas que colaboraram de alguma forma, seja direta ou indiretamente, o meu doutorado não teria significado metade do que significa hoje para mim. Para todos vocês, muito obrigada!

Agradeço especialmente à minha orientadora Dr^a Silvy Stuchi Maria Engler. Só posso dizer que tive e tenho muita sorte de ter a Sil como chefe (quantas pessoas podem chamar seus orientadores pelo apelido?). Digo sorte, porque ela não somente orientou meu projeto de forma a desenvolver um trabalho da melhor forma possível, mas porque ela sempre quis o meu crescimento profissional e pessoal. Sil, você sabe o quanto você me ajudou em todos esses anos de convivência, nos quais eu cresci muito em vários aspectos da minha vida e eu devo muito a você. Então, muito obrigada por ter me dado a oportunidade de ir ao exterior desenvolver parte do doutorado, por conduzir meu projeto, pela confiança depositada em mim e por toda a cumplicidade e amizade neste longo trajeto.

À Prof^a Dr^a Silvia Berlanga de Moraes Barros que também foi uma peça essencial para esse trabalho, acreditando em mim e me dando a oportunidade de trabalhar com o 4-NC. Obrigada Profa pelo colo, pelas broncas, pelas oportunidades, por sempre me escutar quando entro na sua sala inesperadamente (geralmente para pedir ou reclamar de algo), por fazer do nosso laboratório um ambiente familiar e gostoso de passar a maior parte das horas do nosso dia.

Aos meus colegas de laboratório que acompanharam parte ou o total desenvolvimento deste trabalho. Aos que já passaram e seguiram seus rumos profissionais: Tânia Sawada, Cristina Röpke, Vanessa Vitoriano, Rafael Paes, Tatiana Corrêa, Clarissa Kera, Fabriciano Pinheiro, Juliana Sellis, Kaio Vitzel e Mariana Moura. Aos que ainda estão na longa jornada da pós graduação: Renato Massaro, Laura Cardeal, Rebeca Almeida, Diogo Rivelli, Manoela Tiago, Érika Matheus e Marina Gutierrez.

À Camila Marinho, técnica do laboratório e amiga para todas as horas. Obrigada, Camis, por toda ajuda e cumplicidade destes anos de convivência.

À Laura Cardeal, minha “chefinha” na iniciação científica. A Lau não só me ensinou inúmeras técnicas, mas acabou transmitindo um pouquinho do seu amor e fascinação pela ciência para mim. Minha querida amiga que sempre me ajudou e me protegeu profissional e pessoalmente, muito obrigada!

Ao Renato Massaro. Só posso dizer que ele é essencial para mim. O que seria de mim sem o Renato para tornar a minha vida mais emocionante em todos os aspectos? Agradeço por acreditar em mim, me agüentar e continuar sempre ao meu lado independentemente do que aconteça, sendo meu amigo para todos os momentos e ocasiões.

À Rebeca Almeida, que apesar de me escutar reclamar e pedir para ela 4-NC todos os dias, continua a ser mais do que minha colega. Obrigada por me aturar, pelas caronas e por tornar minhas noites e finais de semana no lab (e fora dele) mais agradáveis.

Ao Diogo Rivelli, que atura a todos do laboratório com muito humor e paciência, e que ainda vai isolar 4-NC para eu realizar os meus experimentos *in vivo*, não é mesmo?

À Dr^a Marisol Soengas e todos do seu laboratório em Madrid (CNIO): Érica Riveiro, Estela Cañon, Damià Tormo, Lionel Larribel, Agnieszka Checinska, Direna Alonso, Tonan Calvo e Eva Perez. E também aos amigos: Paulina Alina, Pilar Sancho, Evelina Mocci e Laura Doglio. Eles foram essenciais para o meu crescimento profissional e me acolheram como se eu pertencesse às suas vidas por muitos anos, tornando a minha estadia na Espanha inesquecível.

A todos do laboratório de Bioquímica Clínica da Prof^a. Dr^a Ana Campa pelo companheirismo e amizade e, especialmente à Sabrina Okada pela ajuda com os experimentos de EROs. A todos do laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Prof. Dr Mário Hirata e da Prof^a. Dr^a Rosário Hirata, especialmente a André Lucchesi e Vivian Silbiger pela ajuda com os experimentos. A Prof^a. Dr^a Ana Paula de Melo Loureiro e seu aluno Tiago Franco de Oliveira pela realização de experimentos de lesões ao DNA.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas por nos disponibilizarem seus laboratórios para alguns experimentos, e aos seus alunos pela disposição em nos ajudar.

Às Prof^a. Dr^a Ana Paula de Melo Loureiro e Prof^a. Dr^a Miriam Jasiulionis por terem participado da minha banca de qualificação, lido de forma crítica e contribuído muito para essa forma final da tese.

Aos professores membros da minha banca de defesa, por lerem minha tese e fazerem comentários que certamente ajudarão na elaboração de sua versão final.

Aos meus amigos tão queridos: Danilo Miguel, Daniele Niza, Gabriela Ferreira, Mariana Vassoler, Renato Massaro e Tatiana Takiishi. Embora muitas vezes distantes, eles fizeram e fazem com que meus dias sejam mais felizes e sei posso sempre contar com eles.

E em especial à minha família, meus amores. Aos meus pais, Lohengrin W. A. Brohem e Josélia M. S. A. Brohem, que desde o princípio me apoiaram na decisão de ser “cientista”, me dando a liberdade de escolher a profissão que eu amo e me incentivando em todos os passos desta carreira. Agradeço por toda estrutura familiar que sempre me proporcionaram, e por transmitirem seus valores de cumplicidade, responsabilidade, respeito e amizade. Vocês são meus exemplos de vida, por serem pessoas exemplares e especiais. Pelo carinho, amor e dedicação: eu serei eternamente grata e parte deste título eu devo a vocês.

Às minhas irmãs Bruna e Renata pelas conversas, brigas, broncas, viagens, pizzas, risadas. Sem vocês eu não seria o que sou hoje. Fico muito feliz por ver que as minhas irmãs mais novas são mulheres brilhantes e especiais e que fazem da minha vida mais feliz. Minhas irmãs e minhas amigas, muito obrigada!

Aos meus avós, Raphael Brohem (em memória) e Alice Brohem (em memória) e a José Sales e Camélia Sales, por serem meus exemplos e por sempre me apoiarem e se orgulharem de mim.

Enfim, a FAPESP, CNPq, CAPES e PRP-USP pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

“La vida no es la que uno vivió, sino
la que uno recuerda y cómo la recuerda
para contarla.”

Gabriel García Márquez

ALUNA: Carla Abdo Brohem

e-mail: carlabrohem@usp.br

ORIENTADORA: Silvy Stuchi Maria Engler

NÍVEL: Doutorado

TÍTULO: Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e contenção da invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele artificial

VOLUME: 01

NÚMERO DE PÁGINAS: 235

RESUMO

O melanoma é a forma mais mortal de câncer de pele, origina-se de células produtoras de pigmentos, os melanócitos. Esses podem ser cutâneos ou não-cutâneos (encontrados no revestimento da membrana coróide do olho, nas meninges, e nos tratos gastrointestinal e geniturinário). O aumento da incidência de melanomas malignos nas últimas décadas, e sua alta taxa de mortalidade e grande resistência a maior parte das terapias, tem sido um enorme desafio para a comunidade científica. Particularmente, a falta de habilidade de indução à morte por apoptose em resposta à quimioterapia e outros estímulos externos permitem uma vantagem seletiva para progressão tumoral, formação de metástase e resistência à terapia em melanomas. O estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (EROs) vêm sendo, há muito tempo, reconhecidos como importantes desencadeadores e moduladores da apoptose. Porém o exato papel do estresse oxidativo no processo apoptótico ainda é uma questão de debate. Antioxidantes tendem a possuir propriedades regulatórias de tradução de sinais que devem ou não estar ligadas às suas capacidades de inativar oxidantes. Porém em certas condições, um forte ambiente oxidante onde há falta de suporte para regenerar (reduzir) antioxidantes oxidados, permite que alguns antioxidantes assumam características de um pró-oxidante. Foi demonstrada a capacidade citotóxica de um potente antioxidante, 4-nerolidilcatecol (4-NC), extraído da planta *Pothomorphe umbellata* L. Miq, sobre linhagens tumorais de melanoma e sobre fibroblastos humanos normais. Esse composto foi capaz de induzir a parada do ciclo celular em G1, bem como diminuir a atividade de MMPs e em outras linhagens de melanoma foi capaz de induzir a morte celular por apoptose. Estudos subsequentes mostraram que o mecanismo de ação deste composto inicia-se com a formação e acúmulo de EROs, além da inibição da enzima catalase. O 4-NC foi capaz de induzir a morte por apoptose via mitocondrial, aumentando os níveis das proteínas p53, Noxa, Mcl-1, clivando Bax e Bid e induzindo a clivagem das caspases 3 e 9. Além disso, em modelo de pele artificial contendo melanoma, o 4-NC foi capaz de conter a invasão do melanoma para a estrutura dérmica da pele reconstituída. Foram utilizadas como controle de diferenciação as proteínas Queratina 10 e 14, Involucrina e, como marcador do melanoma, a proteína S100. Parte desta invasão é contida devido à inibição da ativação das MMP-2 e -9 e ativação de TIMP-2 pelo 4-NC. Sendo assim, esse composto se mostra como um potencial quimioterápico no tratamento do melanoma humano.

Palavras chave: 4-nerolidilcatecol. Melanoma. Apoptose. Invasão. Pele artificial.

STUDENT: Carla Abdo Brohem

e-mail: carlabrohem@usp.br

SUPERVISOR: Silvy Stuchi Maria Engler

LEVEL: Doctorate

TITLE: Mechanism of action of 4-nerolidylcatechol: induction of apoptosis via ROS accumulation and inhibition of invasion in melanoma and skin reconstructs model

VOLUME: 01

PAGES: 235

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer, it arises from the pigment-producing cells, melanocytes. These may be cutaneous or non-cutaneous (found in the lining membrane of the eye choroid, the meninges, and gastrointestinal and genitourinary tracts). The increased incidence of malignant melanomas in recent decades, its high mortality rate and high resistance to most therapies has been a major challenge to the scientific community. It's particularly difficult to induce cell death by apoptosis in response to chemotherapy and other external stimuli, which may provide a selective advantage for tumor progression, metastasis formation and resistance to therapy in melanoma. Oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) have been recognized for a long time as important triggers and modulators of apoptosis, but the exact role of oxidative stress in the apoptotic process is still a matter of discussion. Antioxidants tend to possess properties to regulate transduction signals that may not be related to their ability to inactivate oxidants. Under certain conditions, in a strong oxidizing environment where there is lack of support to regenerate (reduce) oxidized antioxidants, some antioxidants can assume characteristics of pro-oxidant. The 4-nerolidylcatechol (4-NC) is a potent antioxidant that is extracted from the plant *Pothomorphe umbellata* L. Miq. Its cytotoxic potential has been demonstrated on melanoma tumor cell lines and on normal human fibroblasts. This compound was able to induce cell cycle arrest in G1, decrease the activity of MMPs and cell death by apoptosis. Subsequent studies showed that the mechanism of action of this compound starts with the formation and accumulation of ROS, and inhibition of the enzyme catalase. The 4-NC was able to induce apoptosis via mitochondria, increasing the levels of p53, Noxa, Mcl-1, cleaving Bax and Bid and inducing cleavage of caspases 3 and 9. Furthermore, in a model of artificial skin containing melanoma 4-NC was able to contain the invasion of melanoma to the dermal part of the skin. Proteins keratin 10 and 14, involucrin and S100 were used as control of differentiation. Part of this invasion is restrained due to TIMP-2 activation and the inhibition of MMP-2 and -9 activation by 4-NC. Concluding, this compound can be used as a potential chemotherapeutic agent in the treatment of human melanoma.

Key words: 4 -nerolidylcatechol. Melanoma. Apoptosis. Invasion. Artificial Skin.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-NC	4-nerolidilcatecol
ADP	Adenosina difosfato
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APAF-1	<i>Apoptotic activator 1</i>
ARF	<i>ADP Ribosylation Factors</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bfl-1/A1	BCL2-related protein A1
BID	Proteína de domínio <i>BH3 only</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
CB	Carcinoma basocelular
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CE	Carcinoma espinocelular
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cyt c	citocromo c
DiCO6 (3)	<i>3,3' - Dihexyloxacarbocyanine iodide</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM-M	<i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>
DNS	<i>Dysplastic nevus syndrome</i>
EC	Envelope Cornificado
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FHN	Fibroblasto humano normal
FLICE	<i>FADD-like ICE</i>
FS	Fosfatidilserina
HU	Hospital Universitário
IP	Iodeto de propídio
LPC	lisofosfatidilcolina
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC1R	receptor de melanocortina 1
Mcl-1	<i>Myeloid leukemia cell differentiation protei</i>
MDM2	<i>murine doble minute 2</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MEC	Matriz extraxelular

MES	Melanoma expansivo superficial
MM	Melanoma metastático
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MnSOD	<i>Manganês- Superóxido Dismutase</i>
MOMP	<i>Mithochondrial outer membrane permeabilization</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
Noxa	Proteína de domínio <i>BH3 only</i>
p53	supressor de tumor. Proteína que participa em diversas vias de sinalização como ciclo celular
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PSI	<i>Proteasome inhibitor</i>
PU	<i>Pothomorphe umbellata</i> L. Miq
Puma	<i>p53 upregulated modulator or apoptosis</i>
RECK	<i>Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs</i>
RGP	<i>Radial growth phase</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TBT	<i>Tri-n-butylin</i>
Tiron	<i>Disodium 1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
UVB	Raios Ultravioleta B
VGP	<i>Vertical growth phase</i>
zVAD-fmk	<i>carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Curva Padrão de 4-nerolidilcatecol dissolvido em etanol Licrosolv [®]	108
Tabela 2 – Relação entre os grupos estatisticamente diferentes quanto à atividade de MMP-2, sendo $p < 0,05$ para todos	129
Tabela 3 - Concentrações utilizadas de 4-NC em $\mu\text{g/mL}$ e suas concentrações correspondentes em μM	159
Tabela 4 – Anticorpos utilizados na técnica de Western blotting.....	169
Tabela 5 - Formulações empregadas nos estudos <i>in vivo</i>	174

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das folhas e inflorescência de <i>Pothomorphe umbellata</i> L. Miq. (pariparoba) e a fórmula estrutural do princípio ativo isolado 4-nerolidilcatecol (4-NC).....	17
Figura 2 – Efeitos citotóxicos do 4-NC sobre as células de melanoma (SK-Mel- 28, 103 e 147) e fibroblastos humanos normais (FHN). Curvas de dose resposta indicam a viabilidade das linhagens celulares após a incubação com 4-NC após 24h (A) e 48h (B) como obtido por ensaio de exclusão de azul de tripan. Cada barra representa a média e desvio padrão de três experimentos separados.	25
Figura 3 – Representação das alterações fenotípicas das linhagens estudadas na ausência (Controle) ou presença (30 e 50 µM) de 4-NC após 24 h de tratamento. Aumento 20x. As porcentagens representam a quantificação do número de células mortas em relação ao controle pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripan.....	26
Figura 4 – Fotomicrografia de células normais de melanócitos humanos (FM305) e queratinócitos humanos (FK282) quando NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (5 e 10µM) por 24 horas.	27
Figura 5 – Fotomicrografia de culturas primárias de fibroblastos de diferentes preparações (282, 284, 287 e HNF). Sendo, NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (10 e 30µM) por 24 horas.	28
Figura 6 – Fotomicrografia de linhagens de melanoma humano NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (30µM) por 24 horas.....	29
Figura 7 – Porcentagem de células com membrana plasmática rompida (A), e fragmentação de DNA (B), após 24h de tratamento com concentrações crescentes de 4-NC (30, 40 e 50 µM). resultados foram obtidos por análise de citometria de fluxo de 10.000 eventos usando iodeto de propídio. Valores estão presentes como a média ± desvio padrão de três experimentos separados, realizados em triplicata (a -P < 0.05; b -P < 0.01 e c -P < 0.001 comparados ao controle sem tratamento).	30
Figura 8 - Indução de apoptose nas linhagens de melanoma SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, após 24 horas de tratamento com 50 µM de 4-NC. Histogramas representam a análise da fragmentação de DNA. O DNA contido nas células vivas possui um alto sinal de fluorescência (M2), enquanto pequenas porções de DNA resultantes da fragmentação emitem baixa fluorescência (M1). Histogramas são representativos de três experimentos separados, feitos em triplicata.	32
Figura 9– Análise Citométrica da externalização da fosfatidilserina das linhagens de melanoma tratadas com 4-NC. Células foram analisadas após 24 h de tratamento com 0 ou 50 µM de 4-NC. (A) Pontos mostrando a intensidade de fluorescência do conjugado Anexina-FITC no eixo X e fluorescência do IP no eixo Y. (B) Porcentagem de células vivas (Anexina negativas/ IP negativas), células apoptóticas (Anexina positivas) e células necróticas (Anexina/IP positivas) após a análise por citometria de fluxo. *P < 0.05 para comparação das células controle (não tratadas) e células tratadas com 4-NC (50 µM). (C) Avaliação da condensação da cromatina por coloração com Hoescht 33342. Sendo células controle (x e y, SK-Mel-28 e 103 respectivamente) e células tratadas (x' e y') com coloração mais forte devido a condensação da cromatina, uma das características da apoptose. (D) Coloração de TUNEL em SK-Mel-103 demonstrando a morte por apoptose após o tratamento com 4-NC.	33
Figura 10 – Porcentagem de células em senescência após 24h de tratamento com 4-nerolidilcatecol em células de melanomas humanos (Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, Sk-Mel-147). Resultados obtidos pelo ensaio com β-galactosidase.	34

<p>Figura 11 – Análise Citométrica da externalização da fosfatidilserina das linhagens de melanoma SK-Mel-28 (A), SK-Mel-103 (B) e Sk-Mel-147 (C) tratadas com 4-NC. Porcentagem de células vivas (Anexina negativas/IP negativas), células apoptóticas (Anexina positivas) e células necróticas (Anexina/IP positivas) após a análise por citometria de fluxo. Células foram analisadas após 6, 12 e 24 h de tratamento com 0 ou 50 μM de 4-NC.</p>	36
<p>Figura 12 – Efeitos do 4-NC na progressão do ciclo celular. Após incubação com 4-NC (30 μM) por 24 h as linhagens celulares foram coradas com IP e o seu DNA foi analisado por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos após a contagem de 10.000 eventos e apresentados como a porcentagem de células nas fases G1, S e G2. Os valores representam a média $\pm$ Desvio padrão de nove determinações de três experimentos. *P<0.05, **P<0.01 quando comparadas ao controle (não tratadas). Resultado é indicativo de parada de ciclo em G0/G1 nas linhagens SK-Mel-147 e FHN.</p>	37
<p>Figura 13 – Efeitos do 4-NC na invasão em Transwell. As linhagens celulares (SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147) foram cultivadas sobre Matrigel plaqueado em câmeras de Boyden. Após 24h de tratamento com 4-NC (0, 10, 20, ou 30 μM), o número de células presente no lado de baixo do filtro foi quantificado e expresso como porcentagem do controle (sem tratamento). Os valores são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos em triplicata. *P<0.05 comparado ao controle.....</p>	38
<p>Figura 14 - Efeitos do 4-NC sobre a atividade de gelatinases. (A) Zimografia de gelatina da linhagem SK-Mel-147 incubada por 24 h na ausência (OP e OC) e presença de 20 μM e 30 μM de 4-NC. Sendo P=plástico e C=colágeno. Note que apenas a MMP-2 ativa (68 kDa) foi inibida na presença do 4-NC. Esse composto não alterou a atividade das pró-MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa) em nenhuma das concentrações utilizadas. P= cultivo sobre plástico, C= cultivo sobre colágeno tipo I, S= padrão de peso molecular, R= MMP-2 e MMP-9 recombinantes. (B) Histogramas representam a porcentagem de MMP-2 ativa na ausência (OP e OC) e na presença de 10, 20, ou 30 μM 4-NC comparado ao controle (sem tratamento). *P<0.05 comparado ao controle.</p>	39
<p>Figura 15 – Atividade das enzimas Catalase e SOD em fibroblastos (FF287) e linhagem de melanoma metastático (SK-Mel-103).</p>	40
<p>Figura 16 – Detecção da produção de radical superóxido (O_2^-), após a adição de 4-NC (20, 30, 40, 50 e 100μM) pelas linhagens tumorais de melanoma humano: SK-Mel-28 (A), SK-Mel-103 (B) e Sk-Mel-147 (C). A análise foi feita por 30 minutos de exposição das células ao composto.</p>	42
<p>Figura 17 – Detecção da produção de peróxido de hidrogênio com a sonda DCFH-DA por citometria de fluxo. Microscopia óptica das linhagens FF287, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 após a adição de 4-NC (10 e 30μM), Tiron (1mM) e a combinação de ambos (30μM de 4-NC e 1mM de Tiron). Sendo: Controle= não tratada e porcentagens entre parênteses indicando a viabilidade celular na presença ou não de cada tratamento.</p>	43
<p>Figura 18 – Gráficos representando a quantidade de EROs produzida pelas linhagens analisadas, segundo às condições descritas acima. Detecção da produção de peróxido de hidrogênio com a sonda DCFH-DA por citometria de fluxo das linhagens FF287, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 após a adição de 4-NC (10 e 30μM), Tiron (1mM) e a combinação de ambos (30μM de 4-NC e 1mM de Tiron). Sendo: Controle= não tratada e porcentagens entre parênteses indicando a viabilidade celular na presença ou não de cada tratamento. Como controle da reação utilizamos H_2O_2. * p<0,05 e **p<0,001.</p>	44

<p>Figura 19 – (A) Avaliação da expressão protéica de p53 em células normais FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μM). O quimioterápico Doxorrubicina (0,8 μg/mL) foi utilizado como controle. A proteína actina foi utilizada como controle de quantificação protéica. Sendo: wt=selvagem e mut=gene com mutação. As proteínas foram quantificadas mostrando a indução de p53 por 4-NC e doxorrubicina - gráfico ao lado direito. (B) Validação dos clones obtidos com a inibição de p53 por vetores lentivirais contendo a sequência para shRNA de p53. Sendo C= controle, células sem lentivírus; K= células infectadas com vetor KH1 contendo sequência aleatória; 1 e 2= células infectadas com vetor KH1 contendo seqüências diferentes de shRNA de p53. (C) Microscopia ótica da linhagem SK-Mel-103, infectadas com KH1 e células infectadas com vetor KH1 contendo sequência de shRNA de p53. Porcentagens indicando viabilidade obtida com Azul de tripan. Sendo NT=não tratado, E=etanol, tratadas com 10 e 30μM de 4-NC. 46</p>
<p>Figura 20 – Avaliação da expressão protéica de Bcl-2 e Bcl-XL em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. Sendo D= doxorrubicina, utilizada como controle. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica. 48</p>
<p>Figura 21 – Avaliação da expressão protéica e clivagem das proteínas Bax e Bid em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. Sendo B= Bortezomibe, droga utilizada como controle. A proteína Tubulina foi utilizada como controle de quantificação protéica. 49</p>
<p>Figura 22 – Avaliação da expressão protéica das proteínas Noxa e Mcl-1 em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. Sendo B= Bortezomibe, droga utilizada como controle. A proteína Tubulina foi utilizada como controle de quantificação protéica. Os gráficos representam a qualificação das proteínas. 49</p>
<p>Figura 23 – (A) Avaliação protéica de Mcl-1, Bcl-xL e Noxa em células normais: FM305 (melanócitos), FK282 (queratinócitos) e melanomas: SK-Mel-28 e SK-Mel-147. NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (5 e 10μM) por 24 horas. Bortz= tratada com Bortezomibe 50nM por 24 horas. (B) Quantificação da proteína Mcl-1, a proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica. 50</p>
<p>Figura 24 – (A) Alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$m) com o tratamento com 4-NC (10 e 30 μM), verificação pela sonda DiCO6(3) por citometria de fluxo (leitura em FITC). Note a maior alteração na linhagem de melanoma SK-Mel-103. (B) Avaliação protéica de cyt c em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas: SK-Mel-28 e SK-Mel-147. NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. Bortz= tratada com Bortezomibe 50nM por 24 horas. A proteína Tubulina foi utilizada como controle de quantificação protéica. 52</p>
<p>Figura 25 – Avaliação da expressão protéica das Caspases 9 (A) e Caspase-3 (B) em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μM) por 24 horas. E= controle etanol 1%, D= tratada com doxorrubicina 0,5μg/mL por 24 horas. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica. 53</p>
<p>Figura 26 – (A) Microscopia ótica da linhagem SK-Mel-103, tratadas com 4-NC 10 e 30μM, na presença e ausência do pan-inibidor de caspases, zVAD-fmk. Porcentagens indicando viabilidade obtida com Azul de tripan. (B) Avaliação da expressão protéica das Caspases 9 e Caspase-3 em SK- SK-Mel-103, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μM), na ausência (-) ou presença (+) de zVAD por 24 horas. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica. 55</p>

<p>Figura 27 – Efeitos do 4-NC sobre a contração do equivalente dérmico (fibroblastos humanos normais (FHN) embebidos em gel de colágeno tipo I). (A) Os equivalentes foram submetidos ao tratamento com 4-NC (1, 10 e 30 μM) por 2, 6, 24, 48 e 72 h; e o diâmetro da contração foi comparado ao controle (sem tratamento) (B) Medida das áreas referentes à contração do gel de colágeno tipo I em relação ao tempo e a concentração de 4-NC. Nota-se que não há diferença entre o controle e o tratamento com as diferentes concentrações do composto.</p>	57
<p>Figura 28 – Inibição da invasão em pele artificial de melanomas metastáticos após o tratamento por 72hrs com 4-NC. Sendo, Controle – pele artificial na ausência de melanomas; NT – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, porém sem tratamento; 10μM e 30μM – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, e tratadas nas concentrações de 10 e 30μM respectivamente. Aumento 40xs.</p>	60
<p>Figura 29 – Marcadores de diferenciação epitelial. Queratina 10 – não há marcação nos melanomas, mas somente nas camadas supra-basais do epitélio da pele artificial sem melanoma. Queratina 14 – marcação nas camadas basais da pele artificial e nos melanomas. S100 – marcação da melanina na pele artificial e melanoma. Involucrina – presente nas camadas espinosas da pele. Observe a inibição da invasão em pele artificial de melanomas metastáticos após o tratamento por 72hrs com 4-NC. Sendo, Pele Artificial – pele artificial na ausência de melanomas; NT – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, porém sem tratamento; 10μM e 30μM – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, e tratadas nas concentrações de 10 e 30μM respectivamente. Aumento 40xs.</p>	61
<p>Figura 30 – Marcadores de transição epitélio mesênquima. β-catenina – marcação na pele artificial e melanomas. E-caderina – marcação apenas na pele artificial, sendo perdida no melanoma. Observe a inibição da invasão em pele artificial de melanomas metastáticos após o tratamento por 72hrs com 4-NC. Sendo, Pele Artificial – pele artificial na ausência de melanomas; NT – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, porém sem tratamento; 10μM e 30μM – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, e tratadas nas concentrações de 10 e 30μM respectivamente. Aumento 40xs.</p>	62
<p>Figura 31 – Expressão e localização da proteína MMP-9 no modelo de pele artificial. Sendo, Controle – pele artificial na ausência de melanomas; NT – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, porém sem tratamento; 10μM e 30μM – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, e tratadas nas concentrações de 10 e 30μM respectivamente. Note a diminuição da marcação na presença de 4-NC. Aumento 40xs.</p>	63
<p>Figura 32 – Avaliação da expressão protéica das MMP-2 (A) e MMP-9 (B) em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica.</p>	64
<p>Figura 33 – Avaliação da atividade de (A) MMP-2; (B) MMP-9 e expressão protéica de (C) TIMP-2 – em fibroblasto (FF287) e melanoma metastático (SK-Mel-103), quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μM) por 24 horas.</p>	65
<p>Figura 34 – Avaliação da expressão protéica de ERK, ERK fosforilada, p38 MAPK e p38MAPK fosforilada, c-fos e c-jun em células normais melanomas metastáticos: SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. E= controle etanol 1%, D= tratada com doxorubicina 0,8μg/mL por 24 horas. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica.</p>	66

Figura 35 – Esquema do modo de ação do 4-NC. O 4-NC é capaz de induzir o acúmulo de EROs pela inibição da enzima Catalase. O aumento de EROs induz ao aumento de p53, que também é capaz de ativar vias de sinalização de indução de EROs. Com o aumento de p53, há indução/clivagem de proteínas da família Bcl-2 (Noxa, Mcl-1, Bax e Bid) e, conseqüentemente, há alteração do potencial de membrana mitocondrial, que levará a indução de caspases e morte por apoptose. O 4-NC também é capaz de inibir a ativação da MMP-9 diminuindo a invasão dos melanomas em modelo de pele artificial.	92
Figura 36 - Curva de calibração de 4-NC. Pelo cálculo da regressão linear dos dados da tabela 1, foi obtida a equação da reta ($y=2521919x + 12095$, $R^2= 0,9995$).	109
Figura 37 - CCD das amostras EN - extrato de raiz de <i>P. umbellata</i> solubilizado em etanol Lichrosolv; 4-NC - composto isolado a partir do extrato de raiz de <i>P. umbellata</i> e EE1 e EE2 - extrato de raiz de <i>P. umbellata</i> liofilizado solubilizado em meio de cultura DME + 0,5%SBF. Leitura de comprimento de onda em 365nm.	110
Figura 38 – Cromatogramas por CLAE - UV 282nm. (A) extrato de <i>P.umbellata</i> e (B) 4-NC. Amostras de 250 µg/mL. Espectros de RMN (C) 4-NC referente ao C13 (carbono ¹³) e (D) 4-NC referente ao H1 (hidrogênio ¹).	112
Figura 39 - Representação da curva de crescimento de fibroblastos humanos de pele em função do tempo. .	113
Figura 40 – Gráfico de citotoxicidade de <i>Pothomorphe umbellata</i> através do ensaio de MTT. Os fibroblastos foram incubados com extrato em DME + 0,5% de SFB em concentrações crescentes (de 1 a 500 µg/mL de extrato).	114
Figura 41 – Microscopia óptica onde é possível observar a morfologia de fibroblastos humanos de pele, sem a ação do composto (controle) e quando incubados com 200 µg/mL de extrato de <i>P.umbellata</i> . Observe a granulação quando as células são incubadas com altas concentrações de extrato. Aumento 40x.	115
Figura 42 – (A) Citotoxicidade do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> em DME + 0,5% de SFB após 24, 48 e 72 horas de incubação com o composto; (B) Citotoxicidade do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> em DME + 10% de SFB após 24, 48 e 72 horas de incubação com o composto. Sendo a – $p<0,001$ e b - $p<0,05$ em relação ao controle.	116
Figura 43 – Citotoxicidade do 4-nerolidilcatecol (4-NC) após 24 e 48 horas de incubação com o composto. Sendo * – $p<0,001$ em relação ao controle.	118
Figura 44 - Cortes de feridas cutâneas após 13 dias da realização da lesão (coloração hematoxilina-eosina), sendo Lesão (ausência de tratamento), Gel Carbopol (ausência de extrato), Pu 0,1% 4NC (tratados com gel de carbopol contendo extrato de raiz com 0,1% de 4-NC), Pu 0,4% 4NC (tratados com gel de carbopol contendo extrato de raiz com 0,4% de 4-NC). tg- tecido de granulação.	120
Figura 45 - Áreas referentes ao tamanho das lesões observadas nos dias 1,4,6,8,10 e 13 de tratamento dos grupos: Lesão (ausência de tratamento), Gel (ausência de extrato), Folha (tratados com gel de carbopol contendo extrato de folha com 0,4% de 4-NC), Raiz (tratados com gel de carbopol contendo extrato de raiz com 0,4% de 4-NC). * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$	122
Figura 46 - Gel de acrilamida demonstrando a atividade das gelatinases (MMPs 2 e 9) e suas formas inativas (pró e intermediárias) com relação aos grupos: controle, lesão, e tratados com gel de carbopol, extrato de raiz e folha. Sendo, MMP-R: padrão de MMPs recombinantes.	124
Figura 47 – Atividade das Pró MMP-9 e MMP-9 ativa (A) e pró-MMP-2, MMP-2 intermediária e MMP-2 ativa(B) e suas pró-formas. Sendo, C-controle, L-lesão, G-tratado com gel de carbopol, R- tratados com extrato de raiz e F – tratados com extrato de folha. Observe que não houve diferença significativa para maioria dos grupos, somente entre os grupos controle e gel de carbopol ($p<0,05$).	125
Figura 48 – Áreas referentes ao tamanho das lesões observadas nos dias 1, 4 ,8 ,10 ,12 e 14 de tratamento dos	

grupos: Lesão (ausência de tratamento), Gel Creme, Creme (ausência de extrato), GC PU– gel creme (tratados com gel creme contendo extrato de folha com 0,4% de 4-NC), Cr PU – creme PU (tratados com creme contendo extrato de raiz com 0,4% de 4-NC). * - $p < 0,01$	127
Figura 49 - Gel de acrilamida demonstrando a atividade das gelatinases (MMPs 2 e 9) e suas formas inativas com relação aos grupos: Gel Creme – grupo tratado com veículo gel creme; Creme – grupo tratado com veículo creme; Gel Creme + extrato de pariparoba (Gel creme PU) – grupo tratado com gel creme contendo extrato de <i>P. umbellata</i> e Creme + extrato de pariparoba (Creme PU) – grupo tratado com creme contendo extrato de <i>P. umbellata</i> . Sendo, MMP-R: padrão de MMPs recombinantes.	128
Figura 50 - Atividade das MMP-9 (A) e MMP-2(B) e suas pró-formas. Observe que não houve diferença significativa para maioria dos grupos, somente entre os grupos controle e gel de carbopol (*a, b, c - $p < 0,05$, ver Tabela 2). C =controle, L =lesão; GC=grupo tratado com gel creme; Cr = grupo tratado com creme. PU GC= grupo tratado com gel creme contendo extrato de <i>P.umbellata</i> e PU Cr = grupo tratado com creme contendo extrato de <i>P.umbellata</i>	128
Figura 51 – Fotomicrografia de corte histológico das lesões realizadas em camundongos sem pêlos. Representação das fibras elásticas (seta -->), observado à microscopia de luz com coloração de Resorcina-Fucsina de Weigert Sendo grupo lesão (pele sem tratamento), gel creme (tratamento com veículo gel creme), PU (tratamento com extrato de PU contendo 0,4% de 4-NC). Aumentos de 4x e 20x.	131
Figura 52 – Fotomicrografia de corte histológico das lesões realizadas em camundongos sem pêlos. Representação das fibras colagênicas, observado à microscopia de luz (NP) ou microscopia de polarização (P) com coloração de picrosirius. Sendo grupo controle (pele sem lesão), lesão (pele sem tratamento), gel creme (tratamento com veículo gel creme), PU (tratamento com extrato de PU contendo 0,4% de 4-NC). Aumentos de 4x e 20x.	132
Figura 53 - Representação da análise morfométrica para contagem das fibras colagênicas e elásticas. Foram contados os 130 pontos que se encontravam sobre o vértice do L da máscara sobre a imagem. Aumento de 20.	133
Figura 54 – Quantificação das fibras elásticas e colagênicas. Nota-se que não há diferença estatística entre os grupos analisados (lesão, gel creme e tratados com PU 0,4% de 4-NC) em relação aos elementos de matriz. (Outros representam elementos como glândulas sebáceas, epiderme, vasos, artefatos da técnica, etc.).....	134
Figura 55 – Técnica de separação epiderme-derme. Após o recebimento da pele de prepúcio, este passa por uma fase de Lavagem, onde é lavado com etanol 90% e solução salina (PBS) estéril. Logo á o processo de Limpeza, onde são retirados o tecido adiposo e vasos sanguíneos presentes e, então a pele é cortada em pedaços de aproximadamente 3x3mm. Após 16-18hrs de incubação, ocorre a Separação entre epiderme e derme com o auxílio de pinças.	153
Figura 56 – Obtenção da cultura primária de queratinócitos e melanócitos humanos. A epiderme é colocada em um tubo contendo meio específico para queratinócitos e, então, é centrifugada replaqueada em placa de petri contendo meio Epilife®. Acompanha-se ao longo dos dias o crescimento das células provenientes da epiderme, ou seja, queratinócitos e melanócitos. Quando a confluência é atingida, inicia-se o processo de separação das células por meio de tripsinização. Após 1 ou 2 passagens, as culturas estão “puras”, ou seja, não contaminadas com outras células.	155
Figura 57 – Obtenção da cultura primária de fibroblastos humanos. A derme é colocada em solução de collagenase tipo I por 4 a 12 horas em agitação. Após esse período a derme é centrifugada e o tecido é, então, ressuspensionado e colocado em placa de petri contendo 10mL de meio D-MEM com 10% SFB. Após 3-4 dias há obtenção de uma placa com aproximadamente 90% de confluência.	156

Figura 58 - Modelo de preparação da pele artificial. Primeiramente a preparação do equivalente dérmico constituído de colágeno tipo I e fibroblastos. Após a polimerização desse, há o plaqueamento de queratinócitos (K) e melanócitos e/ou melanoma (M). 24 h após o plaqueamento e após a contração do gel de colágeno, a estrutura é passada para uma grelha de aço formando a interface ar-líquido. Após 2 semanas na interface há a formação da pele artificial. Coloração HE. Aumento 40x. 183

ÍNDICE

PREFÁCIO	1
-----------------	----------

Capítulo 1 - Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e contenção da invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele artificial	3
--	----------

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Melanoma: forma mais mortal do câncer de pele	4
1.2. Melanoma, apoptose e quimiorresistência	8
1.3. O poder terapêutico das espécies reativas de oxigênio na indução da apoptose	12
1.4. 4-nerolidilcatecol: ações antioxidantes e citotóxicas	16
1.5. Antioxidantes e MMPs	19
2. OBJETIVOS	22
3. RESULTADOS	24
3.1. – Avaliação da citotoxicidade e tipo de morte celular induzida por 4-NC	24
3.1.1. - Avaliação da citotoxicidade induzida por 4-NC em melanomas e fibroblastos humanos: exclusão por azul de tripan	24
3.1.2. Avaliação da atividade do 4-NC sobre células normais: fibroblastos e queratinócitos	26
3.1.3. – Identificação do tipo de morte induzida (apoptose, necrose ou senescência) pela ação do 4-NC isolado em linhagens de melanomas humanos (Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, Sk-Mel-147), fibroblastos humanos normais (FHN).	30
3.1.4.- Avaliação da morte celular por apoptose/necrose após 6, 12 e 24 horas de tratamento	34
3.1.5. – Efeito do 4-NC sobre o ciclo celular	36
3.1.6. – 4-NC reduz a capacidade invasora das linhagens celulares através do Matrigel	37
3.1.7.– Efeitos do tratamento com 4-NC na atividade das gelatinases	38
3.2. Avaliação do mecanismo de ação do 4-NC	40
3.2.1. - Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	40
3.2.2. - Avaliação da modulação protéica dos elementos envolvidos na sinalização de morte celular por apoptose (p53, caspases 3 e 9)	45
3.3. Inibição da invasão tumoral e inibição de MMPs em monocamada e modelo tridimensional	56
3.3.1. Diminuição de invasão de melanomas metastáticos em modelo de pele artificial	56
3.3.2. - Avaliação da modulação protéica dos elementos envolvidos na ativação de MMPs (ERK, MAPK, c-jun e c-fos)	62
4. DISCUSSÃO	68
4.1. Avaliação da citotoxicidade induzida por 4-NC em fibroblasto e melanomas humanos	68
4.2. Mecanismo de ação do 4-NC	72
4.2.1- Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	72
4.2.2- 4-NC e indução de apoptose	77
4.2.3.- Diminuição de invasão de melanomas metastáticos em modelo de pele artificial	83
4.2.4.- 4-NC e inibição das MMPs	88
5. CONCLUSÕES	92

Capítulo 2 - Ação do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> nos componentes da matriz extracelular no processo de cicatrização da pele: modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.	93
---	-----------

1.	RESUMO	94
2.	INTRODUÇÃO	96
2.1.-	Deposição e remodelamento da Matriz Extracelular no processo de cicatrização da pele	96
2.1.2.-	Metalo proteinases de Matriz (MMPs) no Processo de Cicatrização	99
2.1.3.-	Pothomorphe <i>umbellata</i> e sua atividade inibidora de MMPs	102
2.1.4.-	Justificativa	104
3.	OBJETIVOS	106
3.1.	Objetivo geral	106
3.2.	Objetivos específicos	106
4.	RESULTADOS	108
4.1.	Modelo <i>in vitro</i>	108
4.1.1.	Padronização do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> em meio de cultura DME	108
4.1.2.	Curva de crescimento da cultura de fibroblastos humanos de pele	112
4.1.3.	Citotoxicidade do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>	114
4.1.4.	Citotoxicidade do composto 4-nerolidilcatecol (4-NC)	117
4.1.5.	Contração de Gel de Colágeno tipo I	118
4.2.	Modelo <i>in vivo</i>	119
4.2.1.	Estudo dose-dependente da concentração do extrato de <i>P. umbellata</i> e avaliação histopatológica da pele	119
4.2.2.	Contração das lesões tratadas e não tratadas com extrato de <i>P.umbellata</i>	121
4.2.3.	Atividade das MMP-2 e MMP-9 pelo ensaio de zimografia	123
4.2.4.	Escolha de uma nova formulação: Gel creme e Creme	126
4.2.5.	Avaliação dos efeitos do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> sobre as fibras elásticas e colagênicas	130
4.3.	Modelo <i>in vitro</i>	135
5.1.1.	<i>Pothomorphe umbellata</i> e fibroblastos humanos	135
5.1.2.	4-nerolidilcatecol: contração de Gel de Colágeno tipo I	139
4.4.	Modelo <i>in vivo</i>	140
5.2.1.	Estudo dose-dependente da concentração do extrato de <i>P. umbellata</i> e avaliação histopatológica da pele	140
5.2.2.	Contração das lesões tratadas e não tratadas com extrato de <i>P.umbellata</i>	142
5.2.3.	Atividade das MMP-2 e MMP-9 pelo ensaio de zimografia	144
5.2.4.	Escolha de uma nova formulação: Gel creme e Creme	145
5.2.5.	Avaliação dos efeitos do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> sobre as fibras elásticas e colagênicas	148
Capítulo 3- Materiais e Métodos		150
1.	Obtenção e padronização dos extratos das raízes e de folhas de <i>P. umbellata</i>	151
2.	Modelo <i>in vitro</i>	152
2.1. –	Obtenção de cultura primária queratinócitos, melanócitos e fibroblastos obtidos a partir de pele humana	152
2.2. -	Cultura de células	157
2.3. -	Curva de crescimento	157
2.4. -	Padronização do extrato de <i>P. umbellata</i> para utilização em cultura celular	158
2.5. -	Tratamento das células	158
2.6. -	Tratamento das células	159
2.7. -	Testes de Citotoxicidade	159

2.8. - Quantificação de integridade de membrana, fragmentação do DNA e ciclo celular por citometria de fluxo	161
2.9. - Externalização da fosfatidilserina (FS)	161
2.10. - Ensaio de senescência associada a β -galactosidase (pH 6.0)	162
2.11. - Ensaio de invasão em câmaras de Boyden ("transwell")	162
2.12. - Zimografia: Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9	163
2.13. - Determinação de Espécies reativas de oxigênio	164
2.14. - Análise da atividade das enzimas envolvidas no sistema antioxidante celular	165
2.13 - Análise protéica por ensaio de Western Blot	167
2.14. Inibição e/ou superexpressão do gene p53 em células de melanoma por lentivírus	170
2.15. Determinação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo	171
2.16. Determinação da atividade das MMP-2 e MMP-9 e expressão de TIMP-2.	171
3. Modelo <i>in vivo</i>	173
3.1. - Animais	173
3.2. - Preparação das formulações de uso tópico	174
3.3. - Efeito dose-dependente da aplicação tópica de formulação contendo extrato de <i>P. umbellata</i> em camundongos sem pêlo no processo de cicatrização	175
3.4. - Criação e tratamento das feridas	175
3.5. - Avaliação histopatológica da pele	176
3.6. - Parâmetros de cicatrização no estudo dose-dependente de concentração de extrato de <i>P. umbellata</i>	176
3.7. - Avaliação sobre a atividade de MMP das frações (<i>in vitro</i>) por Zimografia	176
3.8. - Método de Resorcina-Fucsina de Weigert (segundo Fullmer, 1974)	177
3.9.- Método de Picrossirius-Polarização (segundo Montes, 1996)	178
4. Modelo de Pele Artificial	180
Capítulo 4 - Referências Bibliográficas	186
Capítulo 5 - Anexos	202

PREFÁCIO

Esta tese é composta de dois capítulos, sendo o capítulo 1 denominado “Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e contenção da invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele artificial” e o capítulo 2 nomeado “Ação do extrato de *Pothomorphe umbellata* nos componentes da matriz extracelular no processo de cicatrização da pele: modelos *in vivo* e *in vitro*”.

Cronologicamente, a proposta inicial desta tese constituiu-se na análise do extrato de *Pothomorphe umbellata* no processo de cicatrização em modelos *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, no capítulo 2, será mostrado no modelo *in vitro* de cicatrização que a utilização do extrato de *Pothomorphe umbellata* demonstrava baixa reprodutibilidade, essencialmente por problemas em sua solubilidade, trazendo uma enorme variação nos experimentos realizados. Logo, optamos por conduzir o estudo utilizando o princípio ativo isolado 4-nerolidilcatecol (4-NC) nos experimentos subseqüentes.

No modelo *in vivo*, verificamos que o extrato de pariparoba contendo 0,4% de 4-NC não foi capaz de modular a morfologia e a quantidade de fibras colagênicas e elásticas, quando comparado aos grupos controle (lesão sem tratamento) e gel creme (veículo utilizado para formulação), o que indicou a ausência de efeito no processo de cicatrização.

A utilização do extrato de *P.umbellata* bem como de seu princípio ativo isolado, 4-NC em modelos de fotoenvelhecimento de pele humana, nos fizeram avaliar a citotoxicidade deste composto em linhagens de melanoma de pele humana. Logo, no capítulo 1, será demonstrado como verificamos que o 4-NC possui maior atividade citotóxica sobre as linhagens de melanoma quando comparada às culturas de fibroblastos humanos.

Avaliamos o tipo de morte celular induzida pelo 4-NC em duas linhagens de melanoma estudadas, SK-Mel-28 e SK-Mel-103, e concluímos que este composto é indutor de apoptose. Já nas demais linhagens (SK-Mel-147 e FHN), onde observamos a morte por necrose, também verificamos a parada do ciclo celular em G0/G1. Além disso, uma atividade modulatória do 4-NC inibindo a atividade da MMP-2 ativa da linhagem SK-Mel-147 também pôde ser observada. Também serão apresentados dados sobre o mecanismo de ação do 4-NC sobre melanomas humanos e células normais da pele: fibroblastos, melanócitos e queratinócitos. Bem como o desenvolvimento de uma nova tecnologia desenvolvida em nosso laboratório: a pele artificial.

Concluindo, o extrato de *Pothomorphe umbellata* e o seu princípio ativo 4-NC não se mostraram efetivos na modulação do processo de cicatrização nos *modelos in vitro* e *in vivo*. Contudo, resultados interessantes quanto à citotoxicidade do composto 4-NC em linhagens de melanomas humanos foram concluídos e publicados (Brohem *et al.*, 2009), e dados sobre o mecanismo de ação deste composto estão descritos nesta tese.

Capítulo 1

Desenvolvimento do projeto:

Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e contenção da
invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele artificial

1. INTRODUÇÃO

1.1. Melanoma: forma mais mortal do câncer de pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo os cânceres associados a esse órgão os mais freqüentes no mundo todo. No Brasil, os cânceres de pele correspondem a 25 % de todos os tumores malignos registrados (INCA, 2010).

São reconhecidos histologicamente 3 tipos de câncer de pele: carcinoma basocelular (CB), carcinoma espinocelular (CE) e melanoma maligno (MM), sendo o melanoma o tipo mais agressivo e freqüente na população branca em todo o mundo e, sua incidência é vertiginosa ao longo dos anos. O principal fator de risco para a indução de câncer de pele é conhecido: a radiação UV. Embora possua, em geral, baixa mortalidade o câncer de pele é reconhecido como um problema de saúde pública em muitos países aumentando os encargos financeiros para os sistemas de saúde (Greinert, 2009).

O estudo realizado por Greinert, em 2009, mostra que para tumores de pele não melanocíticos (CB e CE) a incidência é de 1.000.000 novos casos/ano nos Estados Unidos, e cerca de 100.000 novos casos/ano na Alemanha, sendo que oitenta por cento destes são encontrados em áreas expostas ao sol do corpo humano. Para MM (a forma mais mortal do câncer de pele, onde 20-25% dos pacientes diagnosticados morrem), a incidência vem aumentando de forma mais acentuada do que para qualquer outro tipo de câncer, são cerca de 62.000 novos casos/ano nos Estados Unidos, e cerca de 15.000 na Alemanha. A maioria dos melanomas ocorre em áreas do corpo expostas ao sol. No Brasil, o CB é responsável por

70% dos diagnósticos de câncer de pele, o CE é encontrado em 25% dos pacientes e o MM, detectado em 4% dos casos (INCA, 2010).

Como já dito, o melanoma é a forma mais mortal de câncer de pele. Indivíduos com antecedentes familiares de melanoma possuem um risco de desenvolver a doença de 30 - a 70 vezes maior do que o restante da população. Melanoma cutâneo é a forma mais prevalente em regiões ensolaradas e ricas, povoadas por indivíduos de pele branca, em especial Austrália, Sul da Europa, África do Sul, e sul dos Estados Unidos (Ibrahim & Haluska 2009).

Historicamente, a primeira descrição do melanoma foi de um paciente de 35 anos que possuía uma massa celular recorrente em seu maxilar inferior. O caso foi relatado em 1787, por John Hunter, porém a doença não foi descrita como melanoma. Em 1806, René Laennec foi o primeiro a descrever a entidade melanoma como uma doença e, em 1812, aplicou a palavra grega que significava negro *-melanosis-* para esta doença. Em 1857, William Norris percebeu a correlação entre pintas ou manchas na pele, cor de cabelo mais clara, disposição hereditária, com a presença do melanoma (Ibrahim & Haluska 2009).

O melanoma se origina de células produtoras de pigmentos, os melanócitos, na pele. Os melanócitos surgem da crista neural, derivados de células progenitoras que migram para a pele a partir do sistema nervoso central. Estas células são distribuídas na junção da epiderme - derme da pele e nos folículos capilares, e sua homeostase é regulada pelos queratinócitos epidermais (Gray-Schopfer *et al.*, 2007, Ibrahim & Haluska 2009). A quantidade de melanina produzida por melanócitos dita o grau de pigmentação da pele. Melanomas podem também surgir de melanócitos não-cutâneos encontrados no

revestimento da membrana coróide do olho, nas meninges, e nos tratos gastrintestinal e geniturinário (Ibrahim & Haluska 2009).

Mutações em genes críticos para a regulação do crescimento, produção de fatores de crescimento autócrino e perda de receptores de adesão contribuem com a mudança da sinalização intracelular em melanócitos, permitindo-lhes escapar da sua rígida regulação por queratinócitos. Conseqüentemente, os melanócitos podem proliferar e disseminar, levando à formação de um ou mais *nevus* (ou nevo) ou uma mancha comum. A proliferação de melanócitos pode ser restrita a epiderme (*nevus* juncional), a derme (*nevus* dérmico) ou sobreposição de ambos os componentes (*nevus* composto). *Nevi* (plural de *nevus*) são geralmente benignos, mas podem evoluir para a fase de crescimento radial (RGP - *radial-growth-phase*), uma lesão intra-epidérmica que pode envolver alguns locais de microinvasão na derme. Células de RGP podem evoluir para a fase de crescimento vertical (VGP - *vertical-growth phase*), uma etapa mais avançada na qual as células têm potencial metastático, com nódulos ou ninhos de células invadindo a derme. Nem todos os melanomas passam por cada uma destas diferentes fases (RGP ou VGP), podendo se desenvolver tanto diretamente a partir de melanócitos isolados ou *nevus*, e ambos podem progredir diretamente para melanoma metastático maligno (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Existem quatro principais subtipos histológicos de melanoma cutâneo: melanoma expansivo superficial (MES), melanoma nodular, melanoma acral lentiginoso, e melanoma lentigo maligno. MES é o mais comum, compreendendo cerca de 70% de todos os casos. Ele é caracterizado por uma fase de crescimento lateral (radial) que pode durar de 1 a 5 anos antes da invasão (fase de crescimento vertical). As características clínicas de assimetria e variação de cor tornam-se mais evidentes quando a lesão se expande para 1 cm de intervalo.

Quando a lesão começa a invadir, o prognóstico piora. Além disso, o MES pode se desenvolver a partir de um *nevus* pré-existente como uma área de pigmentação profunda que pode ser difícil de detectar, escapando assim, da detecção precoce e da excisão. A maioria dos melanomas ocorre como lesões solitárias em qualquer parte da pele. Os pulmões, o fígado e cérebro são os locais preferenciais para metástases (Ibrahim & Haluska 2009).

O Mola-Melanoma Múltiplo Atípico Familiar, síndrome descrita por Lynch *et al.* em 1983 e também conhecido como a síndrome do nevo displásico (DNS – *dysplastic nevus syndrome*), é caracterizada pelo início do desenvolvimento de um grande número de nevos atípicos que estão amplamente distribuídos através da pele. Mutações nos genes de susceptibilidade ao câncer variam em seu grau de penetrância. Quatro genes de pré-disponibilidade ao melanoma foram identificados com base na descoberta de mutações germinativas em múltiplos casos familiares, três são de alta penetrância e um é uma baixa penetrância. O gene melhor caracterizado de alta penetrância é CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor2A* - inibidor de quinase dependente de ciclina 2A). Ele está localizado no cromossomo 9p21 e codifica duas proteínas distintas de pré-disponibilidade ao melanoma, p16 e p14. A proteína produto de p16 é INK4a, e a proteína produto de p14 é ARF. Vinte e cinco a 40% dos casos de melanoma familiar possuem uma mutação inativadora em CDKN2A. A quinase dependente de ciclina 4 (CDK4), localizada em 12q14, é o terceiro gene de pré-disponibilidade ao melanoma. Finalmente, o receptor melanocortina-1 (MC1R) é o gene de baixa penetrância implicado na melanomagenese (Ibrahim & Haluska 2009).

Quando detectado precocemente o melanoma pode ser curado pela ressecção cirúrgica, e cerca de 80% dos casos são tratados desta forma (Hersey *et al.*, 2001, Soengas &

Lowe, 2003, Gray-Schopfer *et al.*, 2007, Ibrahim & Haluska 2009). No entanto, melanoma metastático maligno é amplamente refratário a terapias existentes e tem um péssimo prognóstico, com uma taxa de sobrevida mediana de 6 meses e, 5 anos de taxa de sobrevida para menos de 5% dos casos, portanto, novas estratégias terapêuticas são extremamente necessárias (Hersey *et al.*, 2001, Soengas & Lowe, 2003; Gray-Schopfer *et al.*, 2007, Irahun *et al.*, 2009).

1.2. Melanoma, apoptose e quimiorresistência

A apoptose é um processo de morte celular autônomo que exige a participação ativa de enzimas celulares endógenas para a degradação celular. Morfologicamente, este processo é caracterizado por uma fase dramática de execução que inclui a perda de volume celular, “blebbing” (prolongamentos) de membrana plasmática e condensação da cromatina, seguido por empacotamento do conteúdo celular em vesículas envoltas por membranas chamadas de corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitadas por células vizinhas (Kerr *et al.*, 1972; Villa *et al.*, 1997, Kerr, 2002;).

Os executores apoptóticos primários são uma série de cisteína-aspartil proteases (caspases) que atuam em cascata levando a clivagem de substratos que produzem as mudanças características da apoptose. A organização específica de programas de morte celular é extremamente dependente de estímulos e do tipo celular, e de fato não existem vias de morte celular definidas e unicamente lineares. No entanto, pela simplicidade elas são freqüentemente atribuídas a duas grandes categorias. A chamada “via intrínseca” é principalmente ligada à função mitocondrial (Green & Reed, 1998) e a “via extrínseca” onde

ocorrem eventos que envolvem "receptores de morte" ligados à membrana (Ashkenazi & Dixit, 1998).

A **via intrínseca ou mitocondrial** da apoptose é definida por um evento essencial no processo de morte celular: a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP - : *mitochondrial outer membrane permeabilization*). Proteínas seqüestradas no espaço intermembranas, entre as membranas mitocondriais internas e externas ganham acesso a outras proteínas no citosol, resultando na morte por apoptose. A via mitocondrial diz respeito às causas e conseqüências da MOMP. Antes de ocorrer a permeabilização da membrana ocorre o controle pelos membros da família Bcl-2, dividida entre aqueles que são antiapoptóticos (evitam a MOMP) e aqueles que são pró-apoptóticos (promovem a MOMP) (Hersey *et al.*, 2001; Spierings *et al.*, 2005). A superexpressão de Bcl-2 bloqueia a via intrínseca, porém não inibe a apoptose que em alguns tipos de células pode resultar diretamente da ativação da cascata de caspases (Hersey *et al.*, 2001).

Após o evento de MOMP, o principal evento é a liberação do citocromo c (cyt c), um elemento essencial na cadeia respiratória mitocondrial, que é liberado da mitocôndria e atua como um indutor crítico da morte celular programada. Uma vez no citosol, cyt c se liga ao ativador apoptótico 1 (APAF-1 - apoptotic activator 1) e na presença de ATP coordena uma série de mudanças conformacionais que permitem a oligomerização de APAF-1 em um complexo em forma de anel, referido como "Apoptossomo". O apoptossomo se liga e ativa caspase 9, que por sua vez recruta e ativa as caspases 3 e/ou -6 e -7, iniciando uma série de eventos proteolíticos que irão culminar com a desintegração coordenada da célula. Assim, as caspases 3, 6 e 7 são consideradas como 'executoras', enquanto a caspase 9 atua como uma 'reguladora' apoptótica. A regulação da via mitocondrial é complexa. Os indutores incluem

oncogenes, baixo nível de oxigênio (hipóxia), privação de fator de crescimento, falta de adesão célula-célula (*anoikis*) e outros sinais de estresse. Curiosamente, muitos desses estímulos são encontrados durante o desenvolvimento tumor. Um dos principais sensores neste percurso é o "Guardião do genoma", a proteína p53. Uma vez ativado, p53 irá induzir a expressão de múltiplos alvos transcricionais, incluindo membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, tais como BAX, Puma e Noxa. Estes fatores contribuem para mudanças na fisiologia das mitocôndrias que favorecem a liberação do cyt c. Opostamente a essa função encontram-se os fatores antiapoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1, entre outros) (Hersey *et al.*, 2001, Soengas & Lowe, 2003; Gray-Schopfer *et al.*, 2007, Ibrahim & Haluska 2009).

Já a **via Extrínseca** da apoptose é iniciada pela ligação de citocinas como TNF- α , TRAIL ou FasL aos seus respectivos receptores na membrana plasmática da célula alvo. Essa ligação induz a trimerização e ativação do receptor. Uma vez ativado, o domínio citoplasmático do receptor (denominado "domínio da morte") irá vincular uma série de proteínas adaptadoras que, por sua vez, recrutarão a pró-forma inativa da pró-caspase 8 (anteriormente chamada FLICE). Neste complexo multimérico de sinalização de indução de morte, Disc (death-inducing signaling complex), a caspase 8 é ativada pela autoproteólise e, subsequentemente cliva e ativa as caspases efetoras *downstream* na via de sinalização. Este percurso também é controlado em diversos níveis, como por exemplo, a DISC pode recrutar reguladores positivos e negativos da caspase 8. Em células com baixos níveis de caspase 8 a formação da DISC não é suficiente para induzir diretamente a ativação da caspase 3. Nestas situações, a caspase 8 ativa e cliva um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 denominado BID, que se transloca à membrana mitocondrial e ali ativa a "via intrínseca" da apoptose. Assim, a via

mitocondrial e do receptor da morte estão estreitamente interligadas (Hersey *et al.*, 2001, Soengas & Lowe, 2003).

O aumento da incidência de melanomas malignos nas últimas décadas, e sua alta taxa de mortalidade e grande resistência a maior parte das terapias, tem sido um enorme desafio para a comunidade científica (La Porta, 2007; Lorigan *et al.*, 2008). Particularmente, a falta de habilidade de indução a morte por apoptose em resposta à quimioterapia e outros estímulos externos permitem uma vantagem seletiva para progressão tumoral, formação de metástase e resistência à terapia em melanomas (Hersey *et al.*, 2001, Soengas & Lowe, 2003, La Porta, 2007).

Os agentes que são comumente utilizados como quimioterápicos para o tratamento do melanoma agem por danificarem componentes celulares, por exemplo, por metilação de guanina (dacarbazine /temozolomide), intercalantes de DNA (cisplatina) ou por danificarem microtúbulos (vinblastina) - a tal ponto que a apoptose é induzida. Por isso, neste tipo de tumor, a resistência aos medicamentos provavelmente não é uma consequência primária de alterações genéticas adquiridas selecionadas durante ou após a terapia, mas sim inerente ao comportamento maligno das células do melanoma (Hersey *et al.*, 2001, Soengas & Lowe, 2003, La Porta, 2007).

Supressores de tumor como p53 ativam vias apoptóticas para impedir o acúmulo de células mutadas ou transformadas oncogeneticamente. De fato, estes programas apoptóticos dependentes de p53 são ativados em resposta a agentes nocivos ao DNA, como carcinogênese, UV, irradiação e, como mencionado anteriormente, drogas quimioterápicas (Hersey *et al.*, 2001; Soengas & Lowe, 2003). Mutações no TP53 (o gene que codifica a proteína p53) são comuns em alguns cânceres e conduzem a resistência a agentes nocivos

ao DNA. Mutações em TP53 não são comuns em melanoma, mas a via de p53 pode ser prejudicada por mutações na via de ativação de p53 ou em *ARF*, que ativa a p53 através da ligação a MDM2 (Hersey *et al.*, 2001, Soengas & Lowe, 2003).

O desenho racional da melhor terapêutica tem sido dificultado pela complexidade das alterações genéticas adquiridas durante a progressão do melanoma. Hiperativação de bombas de efluxo, enzimas de desintoxicação, alterações multifatoriais de sobrevivência e vias apoptóticas têm sido propostas para mediar o fenótipo das células de melanoma de multi-resistência às drogas (MDR - multidrug-resistant). No entanto, nenhum fator tem sido constantemente identificado como um marcador de progressão padrão-ouro ou manutenção do melanoma (Fernández *et al.*, 2005).

Como exemplo, a maioria dos melanomas humanos alcança uma auto-suficiência em seu crescimento através da aquisição de mutações ativadoras na proteína B-Raf quinase, que emite sinais de proliferação através da via MEK/ERK. No entanto, uma questão chave que permanece aberta é como as células do melanoma adaptam seu metabolismo de glicose para sustentar o crescimento nas condições estressantes do microambiente tumoral. A literatura sugere que o gene B-Raf, mutado em aproximadamente 70% dos melanomas, regularia diretamente os sinais metabólicos para tal adaptação (Martin *et al.*, 2009).

1.3. O poder terapêutico das espécies reativas de oxigênio na indução da apoptose

O estresse oxidativo, ou seja, o desequilíbrio entre anti e pró-oxidantes, e espécies reativas de oxigênio (EROs) vêm sendo, há muito tempo, reconhecidos como importantes desencadeadores e moduladores da apoptose. Porém, o exato papel do estresse oxidativo

no processo apoptótico ainda é uma questão de debate. Há evidências que suportam o envolvimento direto das EROs na morte celular, uma vez que o tratamento de células diretamente com peróxido de hidrogênio induz a apoptose em algumas culturas de células, enquanto antioxidantes, como a catalase, podem impedir a morte celular por apoptose induzida pelas EROs (Li *et al.*, 2003).

Condições fisiológicas celulares exigem equilíbrio entre as condições pró-oxidante e antioxidante. O rompimento do estado estacionário em favor da condição pró-oxidante, com a formação EROs, favorece injúrias celulares, sendo a condição denominada de estresse oxidativo, tendo como conseqüências danos às biomoléculas como o DNA, os lipídios, as proteínas e os carboidratos (Sies, 1993; Ribeiro *et al.*, 2005).

Alguns autores defendem que as EROs parecem desempenhar um papel central na regulação da apoptose em numerosos casos. Dado que taxas reduzidas de apoptose talvez contribuam para a carcinogênese, a regulação da produção celular de EROs pode ser uma variável importante no desenvolvimento de neoplasias. Estudos têm sugerido também um papel potencial para EROs na supressão tumoral. Por exemplo, a proteína p53 ativa a expressão de proteínas geradoras de EROs que aumentam a produção celular de EROs e, eventualmente desencadeiam a apoptose (Li *et al.*, 2002; Pani *et al.*, 2009a).

É sabido que o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($O\cdot H$) em quantidades além da capacidade de “seqüestro” dos sistemas de defesa antioxidante podem levar ao estresse oxidativo. Essas EROs podem posteriormente oxidar ligações insaturadas de membranas lipídicas, desnaturar proteínas e atacar ácidos nucléicos. Esta situação pode

constituir a base molecular de muitas doenças, incluindo o processo inflamatório, alterações cardiovasculares e também contribuir para a carcinogênese (Er *et al.*, 2007).

As EROs podem ser consideradas moléculas com funções de segundo mensageiros, podendo regular expressão de genes sensíveis aos sinais redox, e alterar a homeostase celular, através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas (Nelson *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005). Entre as moléculas reguladas por EROs encontram-se algumas quinases, como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), descrita por possuir um papel pró-apoptótico, bem como fatores de transcrição, como AP-1, que está relacionado a produtos de oncogenes (c-fos e c-jun).

No caso da apoptose intrínseca, a ativação de JNK, proteína quinase relacionada ao estresse, por EROs é necessária para a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol (Qanungo *et al.*, 2005).

Também foi demonstrado que o estresse oxidativo pode aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial, resultando na ruptura do potencial transmembrana mitocondrial e, portanto, a liberação do cyt c das mitocôndrias, que poderia, por sua vez, ativar a caspase 3 do citosol, e causar a clivagem de uma variedade de moléculas importantes, como PARP (um substrato endógeno da caspase) (Li *et al.*, 2003).

Um fato apontado por Meyskens e colaboradores (2001) é que células de melanoma humano possuem sua capacidade antioxidante deprimida, com diminuição de atividade da catalase, glutathiona-S-transferase, e Manganês Superóxido Dismutase (MnSOD) enzimática e baixos níveis de glutathiona e α -tocoferol quando comparados aos melanócitos. Este achado é surpreendente, visto que a maioria das células tumorais apresenta um fenótipo antioxidante. Os melanócitos conseguem rapidamente sequestrar EROs, evitando assim um

recrutamento significativo de fatores de transcrição sensíveis ao sistema redox – iniciando a apoptose. Como as EROs são importantes mensageiros celulares, este mecanismo de controle é provavelmente central para a eficaz repressão da proliferação indevida dos melanócitos. Em contraste, os autores sugerem que células de melanoma possuem altos níveis intracelulares do ânion radical superóxido, resultando em um estresse oxidativo intracelular que leva à facilitação de uma resposta constitutiva ao estresse em células de melanoma mediada pela via NF-kB (Meyskens *et al.*, 2001).

Antioxidantes tendem a possuir propriedades regulatórias de tradução de sinais que devem ou não estar ligadas as suas habilidades em inativar oxidantes. Porém em certas condições, um forte ambiente oxidante onde há falta de suporte para regenerar (reduzir) antioxidantes oxidados, permite que alguns antioxidantes assumam características de um pró-oxidante (Chandan *et al.*, 2002; Nakazato *et al.*, 2005).

Esse é o caso da epigallocatequina-3-galato (EGCG) presente no chá verde, que embora seja muito bem conhecida como um potente antioxidante, pode se comportar como um pró-oxidante em certas condições (Nakazato *et al.*, 2005). Como pró-oxidante, é capaz de induzir a formação de EROs, levando a parada de ciclo celular, liberação de cyt c mitocondrial e ativação de uma série de quinases e fatores de transcrição envolvidos no processo apoptótico de inúmeros tipos de tumores, como pancreático, tumores de colo, em linfoblastos e leucemia. Além disso, outros autores demonstram que mesmo a atividade antioxidante da EGCG pode ser a responsável pela indução da apoptose em melanomas, uma vez que as células de melanoma não têm habilidade em lidar com estresse oxidativo quando comparadas à melanócitos normais, o que pode ser atribuído a anormalidades constitutivas em seus melanossomos (Meyskens *et al.*, 2001; Nihal *et al.*, 2005). Os autores

sugerem que a regulação anormal do sistema redox em células de melanoma poderia ser aproveitada para a elaboração de novas abordagens para o controle da doença (Meyskens *et al.*, 2001; Nihal *et al.*, 2005).

Outro importante antioxidante extremamente conhecido, a vitamina E e seus análogos, que também foram descritos como possíveis antitumorais por induzirem apoptose via acúmulo de EROs em células endoteliais, atua prevenindo a formação de novos vasos (Dong *et al.*, 2007).

Um inibidor proteassomal, denominado Bortezomibe (Velcade®, Janssen), vem sendo estudado como um possível quimioterápico no tratamento do melanoma. Esse composto induz a produção de EROs pelas células tumorais, induzindo a apoptose, em sua via intrínseca, nas células tratadas, com a ativação de p53, Noxa, Mcl-1, e outros elementos da família Bcl-2 (Fernández *et al.*, 2005; 2006). Esse composto está em testes clínicos em associação com demais compostos no tratamento de pacientes com melanoma (Su *et al.*, 2010).

Sendo assim o estresse oxidativo e, portanto a formação de EROs, vem sendo apontado como um dos mecanismos representativos que levam à apoptose (Nakazato *et al.*, 2005).

1.4. 4-nerolidilcatecol: ações antioxidantes e citotóxicas

A presença e o isolamento do 4-nerolidilcatecol (4-NC), o principal composto presente nas raízes e folhas de *Pothomorphe umbellata* (PU), foram primeiramente descritos por Kijjoa e colaboradores (1980), que também descreveram sua fórmula molecular

(C₆H₃(OH)₂C₁₅H₂₅) (Figura 1). O 4-NC também pode ser isolado do outro gênero de *Pothomorphe*, *P. peltata*. Dentre os demais efeitos já estudados para este composto estão: citotoxicidade (Mongelli *et al.*, 1999), atividades inseticidas e antimaláricas (Mongelli *et al.*, 2002, Pinto *et al.*, 2006, de Andrade Neto, 2007) e atividade inibitória de miotoxinas em cobras (Nunez *et al.*, 2005).

Figura 1 - Representação das folhas e inflorescência de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (pariparoba) e a fórmula estrutural do princípio ativo isolado 4-nerolidilcatecol (4-NC).

A primeira atividade do 4-NC foi descrita por Barros e colaboradores (1996), que mostraram o alto potencial antioxidante deste composto. O 4-NC mostrou uma alta atividade antioxidante quando comparado α -tocopherol que é descrito como um dos antioxidantes mais ativos, interferindo em um ou mais passos de propagação do processo de peroxidação lipídica. Esse potencial foi também avaliado por outros autores em diferentes modelos (Desmarchelier *et al.*, 1997; Freitas *et al.*, 1999, revisado por Almeida *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que PU e sua atividade antioxidante possuem um papel significativo na prevenção dos danos causados pelo estresse oxidativo na pele, sugerindo sua aplicação em formulações cosméticas (Röpke *et al.*, 1999; 2000). Em 2002, Röpke e colaboradores demonstraram a alta absorção percutânea de 4-NC pela formulação em gel (0.1% 4-NC) levando a altos níveis do composto na pele. Além disso, também verificaram a inibição de metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 na presença de PU e 4-NC em modelo de fotoenvelhecimento de pele em camundongos (Röpke *et al.*, 2002).

Os efeitos protetores do 4-NC no caso da genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (um agente genotóxico clássico) também foram testados. Os resultados demonstraram que o 4-NC não mostrou nenhum efeito mutagênico nas células da medula óssea de camundongos, mas sim houve um efeito protetor de forma dose-dependente contra a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (Valadares *et al.*, 2007).

Muitos estudos mecanísticos têm demonstrado explicações para a altíssima quimiorresistência dos melanomas, sugerindo novas estratégias de tratamento direcionadas a indução de respostas pró-apoptóticas. Além disso, a quimioprevenção de tumores por produtos naturais e seus derivados tem sido extremamente investigada, com a finalidade de conhecer atividades inibitórias destes compostos em células tumorais (Hwang *et al.*, 2007). Foi demonstrada a capacidade citotóxica do princípio ativo isolado, 4-nerolidilcatecol (4-NC), extraído da planta *Pothomorphe umbellata* L. Miq, sobre linhagens tumorais de melanoma e sobre fibroblastos humanos normais. Em melanomas, esse composto foi capaz de induzir a parada do ciclo celular em G1, bem como diminuir a atividade de MMPs e em outras linhagens foi capaz de induzir a morte celular por apoptose (Brohem *et al.*, 2009, Anexo 1). Porém, o mecanismo pelo qual 4-NC é capaz de induzir essas ações ainda deve ser elucidado.

1.5. Antioxidantes e MMPs

A matriz extracelular (MEC) é definida como uma rede complexa de componentes protéicos, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas secretadas que mantêm as células unidas e, assim, formando a estrutura tridimensional de tecidos e órgãos. A MEC proporciona, portanto, suporte mecânico para as células e integridade estrutural para os tecidos (Cox & O'Byrne, 2001; Pupa *et al.*, 2002, Itoh & Nagase, 2002).

Além do papel estrutural, o microambiente extracelular possui sinais regulatórios que afetam importantes processos como adesão celular, diferenciação, divisão e apoptose. Quando há alteração dessas funções devido a proteinases, a interação célula-célula e célula-matriz muda e novos sinais são gerados para superfície celular, levando a célula a expressar genes que podem atuar na diferenciação, sobrevivência, proliferação e motilidade celular. (Sternlicht & Werb, 2001; Bissell *et al.*, 2002; Egeblad & Werb, 2002; Hojilla *et al.*, 2003; DeClerck *et al.*, 2004, Kessenbrock *et al.*, 2010).

Para que ocorra invasão tumoral e metástase, é necessária extensiva degradação da lâmina basal e da MEC, que funcionam como uma barreira física para a migração celular (Itoh & Nagase, 2002). Durante o processo de metástase, uma célula tumoral, ou uma massa de células, se separa das demais, penetra na lâmina basal, atravessa o estroma e finalmente entra na circulação sanguínea (Brummer *et al.*, 2002; Nabeshima *et al.*, 2002).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de proteinases zinco-dependentes estruturalmente relacionadas que, de acordo com a especificidade do substrato, foram historicamente subdivididas em collagenases, gelatinases, elastases e estromelisinases (Benaud *et al.*, 1998; Sternlicht & Werb, 2001; Brummer *et al.*, 2002; Egeblad

& Werb, 2002). Atualmente, as 25 MMPs conhecidas são classificadas de acordo com sua estrutura. Existem oito classes estruturais de MMPs: cinco são secretadas e três são MMPs tipo-membrana (MT-MMPs). As MT-MMPs são ligadas covalentemente à membrana celular, enquanto as MMPs secretadas localizam-se na superfície celular através de ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV (Sternlicht & Werb, 2001; Egeblad & Werb, 2002; Itoh & Nagase, 2002; Hojilla *et al.*, 2003).

As MMPs possuem um papel principal na remodelação do tecido conjuntivo que ocorre em muitos processos fisiológicos normais, tais como o crescimento e o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, o crescimento ósseo e a involução uterina (Benaud *et al.*, 1998; Sternlicht & Werb, 2001; Brummer *et al.*, 2002; Egeblad & Werb, 2002, Wu *et al.*, 2002). Além desses processos, a expressão anormal destas proteinases pode contribuir a uma variedade de processos patológicos caracterizados pela degradação da matriz, incluindo a artrite reumatóide, a aterosclerose e a invasão e metástase em tumores (Wu *et al.*, 2002). Cada vez mais o papel das MMPs como reguladoras do microambiente tumoral, vem sendo enaltecido uma vez que a proteólise alterada permite um crescimento tumoral não regulado, remodelamento tecidual, inflamação, invasão tecidual e metástase (Kessenbrock *et al.*, 2010)

Nos últimos anos têm ficado mais claro que as EROs possuem papel importante como moléculas sinalizadoras, regulando muitos genes, entre eles as MMPs. Membros da família das MMPs respondem às cascatas de sinalização como do gene Ras e da proteína quinase mitógeno ativadas (MAPK), que são alvos de EROs, bem como elementos abaixo da cascata como PI3K (fosfatidilinositol-3' quinase) e ERK (quinase regulada extracelularmente) (Fujisawa *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2004).

Fatores de transcrição das cascatas de sinalização acima descritas, como Jun e Fos, e logo AP-1 também podem ser diretamente ativados por EROs. Além disso, as próprias MMPs podem ser ativadas por EROs. Isso porque a conformação dos zimógenos é mantida pelos resíduos de cisteína no pró-domínio e o átomo de zinco presente no sítio catalítico de todas MMPs. As espécies reativas são capazes de modificar esse resíduo de cisteína, e desfazer essa ligação iniciando o processo de auto-ativação das MMPs (Fujisawa *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2004).

Sendo assim, antioxidantes capazes de regular a produção de EROS são extremamente importantes na regulação da expressão e atividade das MMPs, evitando invasão e metástase de células tumorais que possuem uma expressão e atividade alteradas destas enzimas.

2. OBJETIVOS

O objetivo desta tese foi caracterizar o mecanismo de ação do composto 4-nerolidilcatecol em linhagens de melanoma humano e também células normais da pele: fibroblastos, melanócitos e queratinócitos.

Para tanto, seguem os objetivos detalhados:

1. Determinação do tipo de morte celular induzida por 4-NC em um painel de linhagens de melanoma e em culturas primárias de fibroblastos, melanócitos e queratinócitos.
2. Elucidação do efeito do 4-NC no processo de invasão de linhagens de melanoma.
3. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, especificamente ânion superóxido (através da técnica de quimioluminescência com a marcação com a sonda lucigenina) e peróxido de hidrogênio (através da técnica de fluorescência com a marcação com a sonda diacetato de diclorofluoresceína).
4. Determinação da regulação da apoptose através da avaliação protéica por western blotting das proteínas p53, membros da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bid, Bax, Noxa), Mcl-1 e caspases (-3 e -9).
5. Verificação da alteração do potencial de membrana na presença de 4-NC
6. Determinação da regulação das MMP-2 e -9 através da avaliação protéica por western blotting das proteínas c-jun, c-fos, ERK, phospho-ERK, p38MAPK e phospho-p38MAPK.
7. Avaliação da atividade de MMP-9, MMP-2 e TIMP-2 por ensaio de ELISA.
8. Efeitos do 4NC em modelos biomiméticos tridimensionais: contração do gel de colágeno tipo I em equivalente dérmico e em pele artificial.

9. Caracterização do modelo de pele artificial contendo melanoma na presença de 4-NC quanto a marcadores de diferenciação epitelial e melanoma: Queratina 10, 14, Involucrina e S100.
10. Determinação da presença de MMP-9 no tratamento com 4-NC no modelo de invasão de pele artificial contendo melanoma.

3. RESULTADOS

3.1. – Avaliação da citotoxicidade e tipo de morte celular induzida por 4-NC

Primeiramente avaliamos a citotoxicidade do 4-NC e seus efeitos sobre linhagens de melanoma humano (SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel- 147) e fibroblastos humanos normais (FHN). Essa primeira avaliação resultou no conjunto de dados a seguir, publicados recentemente (Brohem *et al.*, 2009)

3.1.1. - Avaliação da citotoxicidade induzida por 4-NC em melanomas e fibroblastos humanos: exclusão por azul de tripan

Para avaliarmos os efeitos do tratamento com 4-NC em células tumorais (SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel- 147) e normais (FHN), tratamos as linhagens estudadas com concentrações crescentes de 4-NC por um máximo de 48 horas. Como indicado pelo ensaio de exclusão por azul de tripan na Figura 2, o 4-NC exerceu um efeito citotóxico dose-dependente em todas as linhagens estudadas (IC_{50} = 20-40 μ M, para as linhagens tumorais e 50 μ M para os fibroblastos normais, após 24 h de tratamento).

Figura 2 – Efeitos citotóxicos do 4-NC sobre as células de melanoma (SK-Mel- 28, 103 e 147) e fibroblastos humanos normais (FHN). Curvas de dose resposta indicam a viabilidade das linhagens celulares após a incubação com 4-NC após 24h (A) e 48h (B) como obtido por ensaio de exclusão de azul de tripan. Cada barra representa a média e desvio padrão de três experimentos separados.

Alterações fenotípicas provocadas pelo tratamento das células com 4-NC, também foram observadas. Após 24 h de tratamento com 20 μM de 4-NC todas as células apresentaram vacuolização intracelular moderada. Com 30 μM, houve uma retração das expansões citoplasmáticas, permitindo que as células apresentassem uma forma arredondada. Em concentrações maiores (50 μM) há o descolamento da placa de cultura, resultando em agregados celulares de tamanhos variáveis, contendo números crescentes de células mortas (Figura 3).

Figura 3 – Representação das alterações fenotípicas das linhagens estudadas na ausência (Controle) ou presença (30 e 50 μ M) de 4-NC após 24 h de tratamento. Aumento 20x. As porcentagens representam a quantificação do número de células mortas em relação ao controle pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripán.

3.1.2. Avaliação da atividade do 4-NC sobre células normais: fibroblastos e queratinócitos

No período de setembro de 2008 a março de 2009 foi realizado um estágio no laboratório da Dra María S Soengas (CNIO – Madri, Espanha), onde foi possível a verificação de alguns pontos desenvolvidos neste projeto.

Com o acesso a culturas primárias de melanócitos e queratinócitos foi possível avaliar os efeitos do 4-NC sobre as células normais. Sendo assim, foi possível observar que nas

concentrações de uso para melanomas e fibroblastos, o 4-NC possui um efeito citotóxico sobre melanócitos e queratinócitos (Figura 4). Também foi possível a verificação da citotoxicidade do composto sobre um maior número de culturas de fibroblastos (Figura 5) e sobre um painel de linhagens de melanomas metastáticos, constatando a ação citotóxica sobre todas as linhagens analisadas (Figura 6).

Figura 4 – Fotomicrografia de células normais de melanócitos humanos (FM305) e queratinócitos humanos (FK282) quando NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (5 e 10 μ M) por 24 horas.

Figura 5 – Fotomicrografia de culturas primárias de fibroblastos de diferentes preparações (282, 284, 287 e HNF). Sendo, NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μ M) por 24 horas.

Figura 6 – Fotomicrografia de linhagens de melanoma humano NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (30 μ M) por 24 horas.

O 4-NC apresentou citotoxicidade aos melanócitos, queratinócitos e melanomas, entretanto, houve uma resistência dos fibroblastos aos efeitos do 4-NC, o que demonstra um efeito seletivo deste composto. Passamos então, aos estudos com 4-NC, utilizando fibroblastos primários dérmicos como controle.

3.1.3. – Identificação do tipo de morte induzida (apoptose, necrose ou senescência) pela ação do 4-NC isolado em linhagens de melanomas humanos (Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, Sk-Mel-147), fibroblastos humanos normais (FHN).

A citotoxicidade do 4-NC foi também avaliada por análise citométrica usando iodeto de propídio (IP) para avaliarmos a integridade de membrana e fragmentação de DNA (Figura 7). Como mostrado na Figura 7A, concentrações crescentes de 4-NC induziram perda progressiva da integridade da membrana celular em FHN e SK-Mel-147. Porém, as linhagens SK-Mel- 28 e SK-Mel-147 não apresentaram ruptura de membrana celular no tempo avaliado.

Figura 7 – Porcentagem de células com membrana plasmática rompida (A), e fragmentação de DNA (B), após 24h de tratamento com concentrações crescentes de 4-NC (30, 40 e 50 µM). resultados foram obtidos por análise de citometria de fluxo de 10.000 eventos usando iodeto de propídio. Valores estão presentes como a média ± desvio padrão de três experimentos separados, realizados em triplicata (a -P < 0.05; b -P < 0.01 e c -P < 0.001 comparados ao controle sem tratamento).

A fragmentação de DNA, um marcador clássico de células apoptóticas também foi avaliado por citometria de fluxo (Figura 7B). O aumento da concentração de 4-NC induziu uma fragmentação de DNA crescente em todas as linhagens celulares estudadas. SK-Mel-28 e SK-Mel-103 apresentaram a porcentagem mais alta de células contendo DNA fragmentado na concentração de 50 μ M. Estas linhagens não apresentam nenhum sinal de ruptura de membrana celular, porém apresentam fragmentação no DNA (Figura 7A), dando indícios de efeitos apoptóticos.

Como mostrado na Figura 2, 4-NC foi menos citotóxico para os FHN do que para as linhagens de melanoma estudadas. Os altos valores de IC_{50} determinados para os fibroblastos indicam que deve haver algum efeito seletivo do 4-NC, visto que nas células tumorais o IC_{50} está ao redor de 30 μ M. Nas concentrações de 30-40 μ M, a porcentagem de células com membrana rompida também foi menor para FHN do que para as demais células estudadas (Figura 7A).

Os histogramas representados nas Figuras 8 e 9 representam os resultados da análise da fragmentação de DNA e externalização da FS (fosfatidilserina) em melanomas. As células vivas contendo DNA intacto exibem um sinal fluorescente (M2), enquanto pedaços de DNA fragmentado exibem baixa intensidade de fluorescência (M1).

Figura 8 - Indução de apoptose nas linhagens de melanoma SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, após 24 horas de tratamento com 50 μ M de 4-NC. Histogramas representam a análise da fragmentação de DNA. O DNA contido nas células vivas possui um alto sinal de fluorescência (M2), enquanto pequenas porções de DNA resultantes da fragmentação emitem baixa fluorescência (M1). Histogramas são representativos de três experimentos separados, feitos em triplicata.

Como mencionado anteriormente, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 apresentaram as mais altas porcentagens de células com fragmentação de DNA (50 μ M). Além disso, a Figura 9 indica que a grande maioria dessas células de melanoma estão marcadas positivamente com Anexina V devido ao tratamento com 4-NC. A alta fragmentação de DNA, baixa taxa de ruptura de membrana e grande externalização de FS observada nessas linhagens de melanoma, refletem a morte celular por apoptose. Contrariamente a esses resultados, a linhagem de estudo SK-Mel-147 apresentou ruptura em suas membranas celulares e fragmentação no DNA, e células negativas para Anexina V e positivas para IP. Logo, padrões de apoptose não são observados para SK-Mel-147 nesta concentração. A condensação da cromatina foi observada pela coloração com Hoescht 33342 (Figura 9C). Células controle, Sk-Mel-28 e Sk-Mel-103, sem tratamento, são fracamente coradas devido ao relaxamento da cromatina. Após 24 h de tratamento com 50 μ M de 4-NC, a apoptose pode ser observada. O

clássico ensaio de TUNEL também foi realizado e podemos observar a marcação das células tratadas com 4-NC (Figura 9D).

Figura 9– Análise Citométrica da externalização da fosfatidilserina das linhagens de melanoma tratadas com 4-NC. Células foram analisadas após 24 h de tratamento com 0 ou 50 μM de 4-NC. (A) Pontos mostrando a intensidade de fluorescência do conjugado Anexina-FITC no eixo X e fluorescência do IP no eixo Y. (B) Porcentagem de células vivas (Anexina negativas/ IP negativas), células apoptóticas (Anexina positivas) e células necróticas (Anexina/IP positivas) após a análise por citometria de fluxo. *P < 0.05 para comparação das células controle (não tratadas) e células tratadas com 4-NC (50 μM). (C) Avaliação da condensação da cromatina por coloração com Hoescht 33342. Sendo células controle (x e y, SK-Mel-28 e 103 respectivamente) e células tratadas (x' e y') com coloração mais forte devido a condensação da cromatina, uma das características da apoptose. (D) Coloração de TUNEL em SK-Mel-103 demonstrando a morte por apoptose após o tratamento com 4-NC.

Como os resultados aqui apresentados, indicam efeitos diferenciais em cada tipo celular, o ensaio de senescência associado a β -galactosidase (SA- β -Gal) foi realizado para examinar se o 4-NC induz a senescência prematura. Porém, nossos dados demonstram que o 4-NC não foi efetivo como um indutor de senescência como observado nas linhagens celulares de melanoma (Figura 10).

Figura 10 – Porcentagem de células em senescência após 24h de tratamento com 4-nerolidilcatecol em células de melanomas humanos (Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, Sk-Mel-147). Resultados obtidos pelo ensaio com β -galactosidase.

3.1.4.- Avaliação da morte celular por apoptose/necrose após 6, 12 e 24 horas de tratamento

Para verificar se a necrose apresentada era tardia ou primária, foi realizado o ensaio de Citometria de fluxo com a dupla marcação com IP e Anexina V. Como as células que estão sofrendo apoptose passam por mudanças na bicamada fosfolipídica de suas membranas

celulares, há a externalização do receptor fosfatidilserina (FS) para a membrana externa, nos eventos iniciais da apoptose. Sendo assim, células apoptóticas podem ser marcadas com AnexinaV-FITC, enquanto IP é excluído, visto que a membrana continua íntegra. Em contraste, células sofrendo necrose exibem tanto a exposição da FS na membrana externa e perda de integridade de membrana simultaneamente, portanto células necróticas podem ser marcadas tanto com IP quanto com Anexina V-FITC.

Como pode ser observado na figura 11, a morte celular observada após 6 ou 12 horas de tratamento com o composto é a morte por necrose para a linhagem SK-Mel-147 (dupla marcação), ou seja, a necrose observada após 24 ou 48hrs não corresponde a uma necrose tardia. Para as demais linhagens é observada a apoptose (marcação apenas com Anexina) após 6 e 12 horas de tratamento. Sendo assim, 4-NC é citotóxico para as diferentes linhagens, porém o seu modo de ação pode ser distinto para cada uma delas, nesta concentração utilizada.

Figura 11 – Análise Citométrica da externalização da fosfatidilserina das linhagens de melanoma SK-Mel-28 (A), SK-Mel-103 (B) e Sk-Mel-147 (C) tratadas com 4-NC. Porcentagem de células vivas (Anexina negativas/IP negativas), células apoptóticas (Anexina positivas) e células necróticas (Anexina/IP positivas) após a análise por citometria de fluxo. Células foram analisadas após 6, 12 e 24 h de tratamento com 0 ou 50 μM de 4-NC.

3.1.5. – Efeito do 4-NC sobre o ciclo celular

Por citometria de fluxo também foi possível verificar se houve alguma alteração no ciclo celular, das linhagens em questão, quando estas foram submetidas a tratamento com o 4-NC. Como mostrado na Figura 12, a presença do 4-NC permitiu a parada do ciclo celular na fase G0/G1 na SK-Mel-147 e FHN (**p<0,01). As outras linhagens de melanoma estudadas (SK-Mel-28 e SK-Mel-103) não apresentaram nenhuma diferença significativa na progressão do ciclo celular após o tratamento com 4-NC.

Figura 12 – Efeitos do 4-NC na progressão do ciclo celular. Após incubação com 4-NC (30 μ M) por 24 h as linhagens celulares foram coradas com IP e o seu DNA foi analisado por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos após a contagem de 10.000 eventos e apresentados como a porcentagem de células nas fases G1, S e G2. Os valores representam a média $\pm$ Desvio padrão de nove determinações de três experimentos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ quando comparadas ao controle (não tratadas). Resultado é indicativo de parada de ciclo em G0/G1 nas linhagens SK-Mel-147 e FHN.

3.1.6. – 4-NC reduz a capacidade invasora das linhagens celulares através do Matrigel

Neste ensaio a habilidade invasiva é indicada pelo número de células que migram através da camada reconstituída de Matrigel até a superfície abaixo da membrana porosa em um ensaio em câmara de Boyden ou *Transwell*. Como mostrado na Figura 13, todas as três concentrações estudadas de 4-NC (10 μ M, 20 μ M e 30 μ M) mostram uma redução no número de células na superfície mais abaixo de Transwell, indicando uma diminuição da invasividade das três linhagens de melanoma. Houve uma redução significativa na invasão

celular observada para SK-Mel-103 e SK-Mel-147 (* $p < 0.05$) quando cultivadas com 20 e 30 μM do composto.

Figura 13 – Efeitos do 4-NC na invasão em Transwell. As linhagens celulares (SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147) foram cultivadas sobre Matrigel plaqueado em câmaras de Boyden. Após 24h de tratamento com 4-NC (0, 10, 20, ou 30 μM), o número de células presente no lado de baixo do filtro foi quantificado e expresso como porcentagem do controle (sem tratamento). Os valores são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão de quatro experimentos em triplicata. * $P < 0.05$ comparado ao controle.

3.1.7.– Efeitos do tratamento com 4-NC na atividade das gelatinases

A zimografia, realizada com meio de cultura obtido após 24 horas de tratamento pela SK-Mel-147, revelou a presença das duas enzimas com maior atividade gelatinolítica, correspondente a MMP-2 (formas pró, intermediária e ativa) e MMP-9 (formas pró e ativa) como determinado por comparação com as enzimas recombinantes (Figura 14A).

Na concentração de 20 μM , apenas a MMP-2 ativa (68 kDa) foi regulada negativamente quando cultivada sobre colágeno tipo I ($p < 0,05$). Na concentração de 30 μM ocorreu uma regulação negativa da MMP-2 ativa quando cultivadas tanto em colágeno tipo I quanto em superfícies sem elementos de matriz (plástico). O 4-NC não alterou a atividade de pró MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa) em nenhuma concentração testada (Figura 14B).

Figura 14 - Efeitos do 4-NC sobre a atividade de gelatinases. (A) Zimografia de gelatina da linhagem SK-Mel-147 incubada por 24 h na ausência (0P e 0C) e presença de 20 μM e 30 μM de 4-NC. Sendo P=plástico e C=colágeno. Note que apenas a MMP-2 ativa (68 kDa) foi inibida na presença do 4-NC. Esse composto não alterou a atividade das pró-MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa) em nenhuma das concentrações utilizadas. P= cultivo sobre plástico, C= cultivo sobre colágeno tipo I, S= padrão de peso molecular, R= MMP-2 e MMP-9 recombinantes. (B) Histogramas representam a porcentagem de MMP-2 ativa na ausência (0P e 0C) e na presença de 10, 20, ou 30 μM 4-NC comparado ao controle (sem tratamento). * $P < 0.05$ comparado ao controle.

3.2. Avaliação do mecanismo de ação do 4-NC

Após a avaliação da citotoxicidade e da morte celular induzida por 4-NC iniciamos os estudos de seu mecanismo de ação. Devido ao seu alto poder antioxidante anteriormente descrito e ao fato de antioxidantes se comportarem como pró-oxidantes em certas condições, iniciamos o estudo mecanístico pela análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

3.2.1. - Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Realizamos a medição da atividade de duas enzimas envolvidas no sistema antioxidante das células: a catalase e a superóxido dismutase (SOD). Como podemos observar na Figura 15, o 4-NC foi capaz de inibir a ação da catalase tanto em fibroblastos quanto em melanomas. Contudo, podemos observar que para SOD há aumento da atividade desta somente para os fibroblastos e, não para os melanomas. Isso pode explicar a resistência dos fibroblastos a morte induzida pelo 4-NC.

Figura 15 – Atividade das enzimas Catalase e SOD em fibroblastos (FF287) e linhagem de melanoma metastático (SK-Mel-103).

Para a análise da produção intracelular de espécies EROs utilizou-se duas sondas marcadoras diferentes para detecção: lucigenina e diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate).

A lucigenina é uma sonda utilizada comumente para aumentar a sensibilidade celular em ensaios de quimioluminescência. Vem sendo demonstrado na literatura que a lucigenina reage quase que exclusivamente com ânion radical superóxido (O_2^-), quando as reações são realizadas nas condições corretas (Van Dyke *et al.*, 2003). Este ensaio foi realizado em colaboração com o laboratório coordenado pela Prof^a Ana Campa (FCF-USP).

Para padronizar as condições do ensaio de quimioluminescência, os primeiros experimentos foram realizados apenas com duas linhagens (SK-Mel-28 e SK-Mel-103). Ao detectar a produção de EROs em diferentes tempos observa-se que em $t=0$ (houve um grande aumento em relação a concentração de 4-NC adicionada às células. Porém nos demais tempos há uma grande variabilidade, que impossibilitava uma conclusão dos resultados obtidos. Sendo assim, os demais ensaios foram realizados integrando a área dos primeiros 30 minutos de tratamento com o 4-NC na presença de lucigenina (Figura 16).

Na figura 16, pode-se observar que a produção do ânion radical O_2^- pelas células aumenta dependentemente da concentração de 4-NC adicionada (20, 30, 40, 50 e 100 μM), porém cada linhagem responde de forma diferente. Ou seja, o composto possui uma atividade pró-oxidante dependente da concentração do composto adicionada. Podemos observar que a linhagem SK-Mel-28 (Figura 16A) mostra uma curva de produção de O_2^- mais acentuada quando comparada a linhagem SK-Mel-103 (Figura 16B) que possui uma tendência a um aumento de O_2^- , porém não é significativo. Já a linhagem SK-Mel-147 (Fig16C), embora também mostre esta mesma tendência demonstrou uma variação muito

acentuada quando se analisa as maiores concentrações (50 e 100 μM) e, portanto, não se pode concluir o mesmo que para as demais linhagens.

Figura 16 – Detecção da produção de radical superóxido (O_2^-), após a adição de 4-NC (20, 30, 40, 50 e 100 μM) pelas linhagens tumorais de melanoma humano: SK-Mel-28 (A), SK-Mel-103 (B) e Sk-Mel-147 (C). A análise foi feita por 30 minutos de exposição das células ao composto.

Já a utilização do diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) foi realizada por ser um composto bem conhecido quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido intracelularmente, e medida por citometria de fluxo.

Quando utilizada a sonda DCFH-DA há também perfil oxidante, com o aumento de produção de H_2O_2 para todas as linhagens analisadas (Figura 17 e 18). Para os fibroblastos essa produção se inicia após 12 h de tratamento, já para a linhagem de melanoma SK-Mel-28 a produção se inicia após 2hrs de tratamento e se mantém até 12 h (para a concentração de

30 μ M). Para as linhagens SK-Mel-103 e SK-Mel-147, a produção de EROs tem seu pico com 2 h de tratamento, 10 μ M e 30 μ M de 4-NC, diminuindo após esse período (Figura 18).

Figura 17 – Detecção da produção de peróxido de hidrogênio com a sonda DCFH-DA por citometria de fluxo. Microscopia óptica das linhagens FF287, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 após a adição de 4-NC (10 e 30 μ M), Tiron (1mM) e a combinação de ambos (30 μ M de 4-NC e 1mM de Tiron). Sendo: Controle= não tratada e porcentagens entre parênteses indicando a viabilidade celular na presença ou não de cada tratamento.

Figura 18 – Gráficos representando a quantidade de EROs produzida pelas linhagens analisadas, segundo às condições descritas acima. Detecção da produção de peróxido de hidrogênio com a sonda DCFH-DA por citometria de fluxo das linhagens FF287, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 após a adição de 4-NC (10 e 30 μ M), Tiron (1mM) e a combinação de ambos (30 μ M de 4-NC e 1mM de Tiron). Sendo: Controle= não tratada e porcentagens entre parênteses indicando a viabilidade celular na presença ou não de cada tratamento. Como controle da reação utilizamos H₂O₂. * p<0,05 e **p<0,001.

Utilizamos um potente antioxidante, o composto polihidroxil di-sódio 4,5-dihidroxibenzeno 1,3-dissulfonato (Tiron) (Yamada *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2006), para que esse fosse capaz de seqüestrar as espécies reativas induzidas pelo tratamento com o 4-NC (Figura 17). Assim, verificamos que a produção de EROs induzida pelo 4-NC é essencial para seu mecanismo de ação, uma vez que na presença do Tiron a citotoxicidade do 4-NC é reduzida em até 45% para as linhagens estudadas (Figura 17 e 18). A quantidade de espécies reativas induzidas pelo 4-NC é reduzida na presença do Tiron.

3.2.2. - Avaliação da modulação protéica dos elementos envolvidos na sinalização de morte celular por apoptose (p53, caspases 3 e 9)

Devido à importância da fosfoproteína nuclear p53 na manutenção da integridade do genoma e a sua relação com estresse oxidativo, que permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose, foi avaliado o efeito do 4-NC sobre a expressão protéica de p53 (Figura 19).

Figura 19 – (A) Avaliação da expressão protéica de p53 em células normais FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μM). O quimioterápico Doxorubicina (0,8 μg/mL) foi utilizado como controle. A proteína actina foi utilizada como controle de quantificação protéica. Sendo: wt=selvagem e mut=gene com mutação. As proteínas foram quantificadas mostrando a indução de p53 por 4-NC e doxorubicina - gráfico ao lado direito. (B) Validação dos clones obtidos com a inibição de p53 por vetores lentivirais contendo a sequência para shRNA de p53. Sendo C= controle, células sem lentivírus; K= células infectadas com vetor KH1 contendo sequência aleatória; 1 e 2= células infectadas com vetor KH1 contendo seqüências diferentes de shRNA de p53. (C) Microscopia ótica da linhagem SK-Mel-103, infectadas com KH1 e células infectadas com vetor KH1 contendo sequência de shRNA de p53. Porcentagens indicando viabilidade obtida com Azul de tripan. Sendo NT=não tratado, E=etanol, tratadas com 10 e 30 μM de 4-NC.

Pode ser observado que 4-NC é capaz de induzir um aumento de p53 nas linhagens de melanoma SK-Mel-103 e SK-Mel-147 que possuem p53 selvagem. Na linhagem Sk-Mel-28 (p53 mutado) e nos fibroblastos humanos não foi possível verificar essa modulação (Figura 19A, gráfico de quantificação).

Sendo p53 um alvo importante para entendermos o mecanismo de ação do 4-NC, foi realizada sua inibição através da infecção com plasmídeo lentiviral contendo seqüências de shRNA (*short hairpin* RNA) para p53 nas linhagens de melanoma. Como pode ser verificado na Figura 19B, utilizamos duas construções lentivirais que se mostraram eficientes na inibição de até 90% deste gene (SK-Mel-103), validando os clones obtidos. O plasmídeo KH1 foi utilizado como controle, uma vez que as seqüências de shRNA foram inseridas neste plasmídeo lentiviral.

Foi realizado o ensaio de exclusão por azul de tripan nas linhagens contendo ou não a inibição de p53, a fim de verificar a citotoxicidade do 4-NC. Assim como no controle tratado com Doxorrubicina (0,8 µg/mL), as células com deficiência na produção de p53, quando tratadas com 4-NC tem uma diminuição da viabilidade celular (Figura 19C). Para maior entendimento do papel do 4-NC sobre p53 outros experimentos serão realizados futuramente neste modelo.

A proteína p53 possui um papel apoptogênico direto quando é translocada para a mitocôndria, em resposta ao estresse celular, resultando na apoptose através da interação com proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-XL. Para tanto fomos verificar se o 4-NC também modularia essas proteínas antiapoptóticas (Figura 20). Como pode ser observado o 4-NC não parece regular essas proteínas nas linhagens de melanoma.

Figura 20 – Avaliação da expressão protéica de Bcl-2 e Bcl-XL em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μ M) por 24 horas. Sendo D= doxorubicina, utilizada como controle. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica.

Contanto, como podemos observar nas Figuras 21 e 22, o 4-NC foi capaz de modular outras proteínas da família Bcl-2 que estão diretamente envolvidas no processo de apoptose via intrínseca. Podemos observar a clivagem de Bax e Bid (Figura 21), que são em parte responsáveis pela liberação de cyt c e dano mitocondrial, bem como o aumento da expressão de Noxa e Mcl-1 (Figura 22), de forma muito semelhante ao Bortezomibe, droga utilizada como controle. O Bortezomibe é um quimioterápico, cuja ação no melanoma é a inibição do sistema proteassomal, esse tipo de droga é descrita como responsável pelo controle de progressão de ciclo celular, apoptose e resposta a estresse, levando ao aumento da expressão de proteínas como Noxa e Mcl-1 (Fernández *et al.*, 2005 e 2006).

Figura 21 – Avaliação da expressão protéica e clivagem das proteínas Bax e Bid em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. Sendo B= Bortezomibe, droga utilizada como controle. A proteína Tubulina foi utilizada como controle de quantificação protéica.

Figura 22 – Avaliação da expressão protéica das proteínas Noxa e Mcl-1 em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. Sendo B= Bortezomibe, droga utilizada como controle. A proteína Tubulina foi utilizada como controle de quantificação protéica. Os gráficos representam a qualificação das proteínas.

Utilizando-se menores concentrações, 5 e 10 μ M, de 4-NC incluímos como controles os melanócitos (FM305) e os queratinócitos (FK282). Foi avaliada a ativação de alguns elementos protéicos envolvidos no processo de apoptose mitocondrial como Mcl-1, Bcl-xL e Noxa (Figura 23).

Figura 23 – (A) Avaliação protéica de Mcl-1, Bcl-xL e Noxa em células normais: FM305 (melanócitos), FK282 (queratinócitos) e melanomas: SK-Mel-28 e SK-Mel-147. NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (5 e 10 μ M) por 24 horas. Bortz= tratada com Bortezomibe 50nM por 24 horas. (B) Quantificação da proteína Mcl-1, a proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica.

Pode-se observar que quando o 4-NC foi adicionado em concentrações mais baixas (5 e 10 μ M) nas células normais, melanócitos e queratinócitos, foi capaz de induzir o acúmulo protéico dos fatores anti-apoptóticos Mcl-1 e Bax-xL e, o pró-apoptótico Noxa. Pode-se observar que as linhagens de melanoma, mesmo quando tratadas com baixas concentrações do 4-NC (5 e 10 μ M) também possuem a expressão destas proteínas alteradas.

Uma vez que a clivagem de Bid e Bax e o aumento de Noxa e Mcl-1 contribuem para a alteração do potencial de membrana mitocondrial, utilizamos uma sonda, denominada 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3)), para a medição do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo (Figura 24A). Também verificamos uma possível alteração na proteína cyt c (Figura 24B). Pode-se verificar que o 4-NC foi capaz de induzir a alteração de membrana de forma dose-dependente e de forma mais acentuada na linhagem de melanoma, isso indica uma liberação do cyt c mitocondrial (Figura 24A). Porém não foi notada nenhuma diferença na quantidade de cyt c (Figura 24B), isso pode ser devido ao fato de utilizarmos o extrato protéico total e não mitocondrial para a realização do ensaio, uma vez que o que ocorre é a liberação do cyt c e não o aumento protéico do mesmo. Isso pode ser observado também na presença de Bortezomibe, controle positivo, onde não é observada nenhuma mudança na quantidade protéica.

Figura 24 – (A) Alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) com o tratamento com 4-NC (10 e 30 µM), verificação pela sonda DiCO6(3) por citometria de fluxo (leitura em FITC). Note a maior alteração na linhagem de melanoma SK-Mel-103. (B) Avaliação protéica de cyt c em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas: SK-Mel-28 e SK-Mel-147. NT (não tratadas) ou tratadas com 4-NC (10 e 30µM) por 24 horas. Bortz= tratada com Bortezomibe 50nM por 24 horas. A proteína Tubulina foi utilizada como controle de quantificação protéica.

Atualmente, há a descrição de dois principais caminhos que levam ao processo apoptótico: intrínseco ou mitocondrial, resultando na liberação do citocromo c e ativação da caspase-9, e extrínseco ou relacionado a receptores, como TNF ou FasL, com a ativação subsequente da procaspase-8 (Qanungo *et al.*, 2005). Para verificar por qual mecanismo o

composto 4-NC está atuando sobre as células verificamos a expressão e clivagem das caspases 3 e 9 (Figura 25).

Figura 25 – Avaliação da expressão protéica das Caspases 9 (A) e Caspase-3 (B) em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μM) por 24 horas. E= controle etanol 1%, D= tratada com doxorubicina 0,5μg/mL por 24 horas. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica.

A apoptose pode ser mediada por uma família de enzimas denominadas de caspases. Estas estão inativas no citosol e com a sua clivagem, se tornam ativas e, então, são capazes de clivar/degradar diversas proteínas necessárias para o funcionamento celular. Na figura 25A observamos que há a clivagem da caspase-9 (37, 35 e 17 kDa) nas linhagens de melanoma humano, quando tratadas com 30μM de 4-NC por 24 h. Pelo fato de os fibroblastos serem mais resistentes a ação do 4-NC essa clivagem não é observada quando

tratados com o composto. Como controle foi utilizada a droga doxorrubicina que possui uma larga descrição na literatura por induzir a morte por apoptose dependente de caspases.

A Figura 25B mostra que há ativação e clivagem da Caspase 3, proteína clivada (35 kDa) aparece quando as linhagens SK-Mel-103 e SK-Mel-147 são tratadas com 30 μ M de 4-NC por 24 h.

Para verificar se a apoptose induzida por 4-NC era realmente dependente de caspases utilizamos um pan inibidor de caspases denominado zVAD-fmk (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone). Como pode ser observado na figura 26, na presença de zVAD há o aumento da viabilidade celular mesmo quando as células são tratadas com 4-NC (Figura 26A). Além disso, pode-se observar pela avaliação protéica que há a diminuição da ativação das caspases com 4-NC no tratamento simultâneo com zVAD-fmk, indicando a dependência das caspases para a indução da apoptose provocada pelo tratamento com 4-NC (Figura 26B).

Figura 26 – (A) Microscopia ótica da linhagem SK-Mel-103, tratadas com 4-NC 10 e 30 μ M, na presença e ausência do pan-inibidor de caspases, zVAD-fmk. Porcentagens indicando viabilidade obtida com Azul de tripan. (B) Avaliação da expressão protéica das Caspases 9 e Caspase-3 em SK- SK-Mel-103, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μ M), na ausência (-) ou presença (+) de zVAD por 24 horas. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica.

3.3. Inibição da invasão tumoral e inibição de MMPs em monocamada e modelo tridimensional

3.3.1. Diminuição de invasão de melanomas metastáticos em modelo de pele artificial

Ensaio *in vivo*, que demandam grandes quantidades de composto isolado, não foram possíveis de serem realizados até a finalização desta tese , uma vez que a quantidade produzida de 4-NC não é suficiente para que possamos realizar experimentos com um número de animais adequados. Sendo assim, realizamos os ensaios em modelo *in vitro* de pele artificial. Desta forma, embora não possamos substituir totalmente os ensaios em animais, são obtidos resultados mais próximos ao real visto que esta plataforma permite estudar a ação do composto em um ambiente biomimético e não somente em células isoladas.

Sendo assim, primeiramente foi analisada a contração do equivalente dérmico que consiste em gel de colágeno tipo I contendo fibroblastos (modelo 3D), tratados ou não com 4-NC (Figura27).

Figura 27 – Efeitos do 4-NC sobre a contração do equivalente dérmico (fibroblastos humanos normais (FHN) embebidos em gel de colágeno tipo I). (A) Os equivalentes foram submetidos ao tratamento com 4-NC (1, 10 e 30 μM) por 2, 6, 24, 48 e 72 h; e o diâmetro da contração foi comparado ao controle (sem tratamento) (B) Medida das áreas referentes à contração do gel de colágeno tipo I em relação ao tempo e a concentração de 4-NC. Nota-se que não há diferença entre o controle e o tratamento com as diferentes concentrações do composto.

Pode-se observar que o composto 4-NC não foi capaz de inibir ou acelerar o processo de contração da matriz colagênica em fibroblastos nas diferentes concentrações testadas, mostrando que esse não foi citotóxico para os fibroblastos quando cultivados em equivalente dérmico, reforçando a baixa citotoxicidade do composto observada nos ensaios *in vitro* em monocamada.

Cultivamos uma linhagem metastática (sendo #9 igual a SK-Mel-103) em modelo de pele artificial. Podemos observar na Figura 28, quando essa linhagem de melanoma metastático é cultivada juntamente com os outros componentes da epiderme (melanócitos e queratinócitos) a diferenciação do epitélio não ocorre e após 15 dias de cultivo é observada a invasão do melanoma na derme (Figura 28, controle sem melanoma e NT). Quando a pele contendo melanoma foi tratada com 10 μ M de 4-NC, por 72 h, podemos observar uma pequena diminuição dos focos de invasão na derme. Já com 30 μ M de 4-NC quase não há mais focos de melanoma na derme e volta a ocorrer a diferenciação do epitélio (Figura 28, 10 μ M e 30 μ M).

Uma vez que se observou a contenção da invasão no tratamento com 4-NC, e uma possível reorganização do epitélio, caracterizamos a pele artificial, bem como a pele contendo melanoma quanto à presença e distribuição de marcadores epiteliais. Os anticorpos utilizados para imunohistoquímica refletem a presença de proteínas localizadas em diferentes estratos da pele como por exemplo, a queratina 10 (associada com a queratina 1 é observada em todas as camadas suprabasais da pele), queratina 14 (forma um heterotetrâmero com duas moléculas de queratina 5, marcando as camadas basais da pele), S100 (presente em quase todos os tipos de células melanocíticas) e involucrina (componente do envelope de rede cruzada dos queratinócitos, é encontrada no citoplasma das células

espinosas) (Figura 29). Alguns marcadores da transição epitélio mesênquima (EMT), como β -catenina e E-caderina, também foram utilizados (Figura 30). Com essas marcações podemos acompanhar a diminuição da invasão com o tratamento com 4-NC no modelo tridimensional, de acordo com os dados de transwell publicados anteriormente (ver item 3.1.6). As marcações nos controles positivos, amostras de pele humana de paciente doadas gentilmente pelo Dr. Gilles Landman, estão apresentadas no Anexo 2.

Foi interessante observar que na pele artificial contendo melanoma não foi verificada a presença de queratina 10, devido à perda da diferenciação do epitélio na presença do melanoma. A queratina 14, por marcar células basais e, portanto, menos diferenciadas, também marca as células de melanoma, destacando as mesmas ao longo do processo de invasão e a inibição do mesmo no tratamento com 4-NC (Figura 29).

O anticorpo anti-S100 marca exuberantemente as células de melanoma, sendo que a presença desta marcação é notavelmente menor nos tratamentos com 4-NC. A involucrina, que marca queratinócitos mais maduros, demonstra que na presença do melanoma existe uma desorganização dos estratos epiteliais que parecem ser recuperados, especialmente, ao se tratar com 30 μ M de 4-NC (Figura 29).

A β -catenina e E-caderina, em conjunto, denotam que a presença do melanoma diminui a expressão destas proteínas, indicando a aquisição de características mesênquimais dessas células obtidas durante o processo de EMT. Quanto à β -catenina, podemos observar que com o tratamento com 4-NC (30 μ M) há uma maior justaposição das células epiteliais, que se organizam de forma semelhante à pele artificial normal.

Figura 28 – Inibição da invasão em pele artificial de melanomas metastáticos após o tratamento por 72hrs com 4-NC. Sendo, Controle – pele artificial na ausência de melanomas; NT – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, porém sem tratamento; 10µM e 30µM – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, e tratadas nas concentrações de 10 e 30µM respectivamente. Aumento 40xs.

Figura 29 – Marcadores de diferenciação epitelial. Queratina 10 – não há marcação nos melanomas, mas somente nas camadas supra-basais do epitélio da pele artificial sem melanoma. Queratina 14 – marcação nas camadas basais da pele artificial e nos melanomas. S100 – marcação da melanina na pele artificial e melanoma. Involucrina – presente nas camadas espinosas da pele. Observe a inibição da invasão em pele artificial de melanomas metastáticos após o tratamento por 72hrs com 4-NC. Sendo, Pele Artificial – pele artificial na ausência de melanomas; NT – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, porém sem tratamento; 10 μ M e 30 μ M – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, e tratadas nas concentrações de 10 e 30 μ M respectivamente. Aumento 40xs.

Figura 30 – Marcadores de transição epitélio mesênquima. β -catenina – marcação na pele artificial e melanomas. E-caderina – marcação apenas na pele artificial, sendo perdida no melanoma. Observe a inibição da invasão em pele artificial de melanomas metastáticos após o tratamento por 72hrs com 4-NC. Sendo, Pele Artificial – pele artificial na ausência de melanomas; NT – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, porém sem tratamento; 10 μ M e 30 μ M – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, e tratadas nas concentrações de 10 e 30 μ M respectivamente. Aumento 40xs.

3.3.2. - Avaliação da modulação protéica dos elementos envolvidos na ativação de MMPs (ERK, MAPK, c-jun e c-fos)

Uma vez comprovada a ação do 4-NC na inibição da invasão tumoral de melanomas, objetivou-se entender o mecanismo pelo qual o 4-NC estava atuando. Sendo assim, resolvemos aprofundar os estudos envolvidos com as MMPs. No tópico 4.1.7 foi demonstrada a capacidade do 4-NC em inibir a atividade protéica da MMP-2 ativa, que poderia estar relacionada à inibição da migração destas células também demonstrada

quando tratadas com este composto. Além disso, as MMPs podem ser ativadas por EROs e, passamos então, as análises da expressão protéica da MMP-9 no modelo de pele artificial, mostrando o grande aumento na presença dos melanomas e a grande diminuição das MMPs quando a pele contendo melanoma é tratada com 4-NC (Figura 31).

Figura 31 – Expressão e localização da proteína MMP-9 no modelo de pele artificial. Sendo, Controle – pele artificial na ausência de melanomas; NT – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, porém sem tratamento; 10µM e 30µM – pele artificial na presença da linhagem de melanoma SK-Mel-103, e tratadas nas concentrações de 10 e 30µM respectivamente. Note a diminuição da marcação na presença de 4-NC. Aumento 40xs.

Como comprovado por western blotting, 4-NC também foi capaz de inibir a expressão protéica da MMP-9, em modelo de monocamada (Figura 32).

Figura 32 – Avaliação da expressão protéica das MMP-2 (A) e MMP-9 (B) em células normais: FF287 (fibroblastos) e melanomas metastáticos: SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica.

Na Figura 32B, observa-se que o tratamento com 4-NC foi capaz de inibir a produção da proteína MMP-9 (zimógeno e forma ativa). Quanto a MMP-2 não foi possível detectar seus níveis protéicos, passamos às análises de atividade destas enzimas por ensaios de ELISA.

Uma vez que 4-NC é capaz de inibir a expressão protéica de MMP-9 realizamos o ensaio quantitativo de atividade de MMPs. Avaliamos a atividade de MMP-2 e MMP-9, pelo ensaio de atividade BioTrak e também a quantidade protéica de TIMP-2 por ELISA (Figura 33).

Figura 33 – Avaliação da atividade de (A) MMP-2; (B) MMP-9 e expressão protéica de (C) TIMP-2 – em fibroblasto (FF287) e melanoma metastático (SK-Mel-103), quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30 μ M) por 24 horas.

As MMPs respondem à cascatas de sinalização como da proteína quinase mitógeno ativadas (MAPK), que são alvos de EROs, bem como elementos abaixo da cascata ERK (quinase regulada extracelularmente). Fatores de transcrição das cascatas de sinalização acima descritas, como Jun e Fos podem ser diretamente ativados por EROs. Alguns desses elementos foram analisados, como visto na Figura 34.

Figura 34 – Avaliação da expressão protéica de ERK, ERK fosforilada, p38 MAPK e p38MAPK fosforilada, c-fos e c-jun em células normais melanomas metastáticos: SK-Mel-103 e SK-Mel-147, quando não tratadas (NT) ou tratadas com 4-NC (10 e 30μM) por 24 horas. E= controle etanol 1%, D= tratada com doxorubicina 0,8μg/mL por 24 horas. A proteína β actina foi utilizada como controle de quantificação protéica.

Como pode ser observado, não notamos nenhuma modulação destes elementos pelo tratamento das células com 4-NC. Embora esses ensaios ainda sejam preliminares, eles nos indicam que 4-NC poderia estar atuando no processo de ativação das MMPs nos melanomas, uma vez que é capaz de induzir o aumento da expressão de TIMP-2, que é um inibidor tecidual de MMPs e também regulador do processo de ativação destas proteínas (Figura 33C). Além disso, observamos a inibição da atividade de MMP-2 (Figura 33A) e MMP-9 (Figura 33B) na linhagem de melanoma.

4. DISCUSSÃO

4.1. - Avaliação da citotoxicidade induzida por 4-NC em fibroblasto e melanomas humanos

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e estágios avançados são inevitavelmente resistentes a agentes terapêuticos convencionais (Soengas & Lowe, 2003; La Porta, 2007; Lorigan, 2008). Particularmente, a falta de habilidade de indução a morte por apoptose em resposta à quimioterapia associada a outros estímulos externos permitem uma vantagem seletiva para progressão tumoral, formação de metástase e resistência a terapia em melanomas. Mutações em alguns genes envolvidos no mecanismo de apoptose estão diretamente correlacionados com a quimiorresistência dos melanomas, entre eles os oncogenes p53, Bcl2 e N-Ras (Soengas & Lowe, 2003, Eberle *et al.*, 2008, La Porta, 2007).

4-NC possui efeito citotóxico dose-dependente em todas as linhagens estudadas, sendo o IC₅₀ de 20 a 40 µM, para as linhagens tumorais e 50 µM para os fibroblastos normais, após 24 h de tratamento (Figura 2). O fato de o 4-NC se apresentar mais tóxico para os fibroblastos (Figuras 2 e 5) do que para as linhagens tumorais, é uma característica importante de novos compostos que freqüentemente favorece a eficácia do tratamento, privilegiando células normais a tumorais. Porém o 4-NC se mostrou tóxico para melanócitos e queratinócitos, sendo o IC₅₀ para essas células de 10 -20 µM, respectivamente (Figura 4).

Valadares *et al.* (2007) demonstraram que o extrato de PU e o 4-NC possuem efeitos protetores sobre a genotoxicidade induzida por ciclofosfamida em células de medula óssea

de camundongos. Eles também demonstraram que 4-NC possui efeito protetor contra a fragmentação cromossomal e/ou dano ao aparato mitótico induzido por ciclofosfamida, provavelmente devido à atividade antioxidante deste composto. Em nosso trabalho, diferentemente do observado por Valadares e colaboradores (2007), dependendo das concentrações de 4-NC, várias alterações fenotípicas ligadas à citotoxicidade do composto foram observadas nas células estudadas como: vacuolização intracelular moderada, retração das expansões citoplasmáticas, permitindo que as células apresentassem forma arredondada e em concentrações maiores (50 μ M) houve o descolamento das células da placa de cultura, resultando em agregados celulares de tamanhos variáveis, contendo números crescentes de células mortas (Figura 2)

A citotoxicidade do 4-NC foi também avaliada por análise citométrica com a marcação por iodeto de propídio (IP) para avaliarmos a integridade de membrana e fragmentação de DNA (Figuras 7 e 8). Uma das formas para distinguir a morte celular por apoptose são ensaios que identifiquem a presença da fragmentação de DNA através de citometria de fluxo (Okada & Mak, 2004; Krusko *et al.*, 2008).

Para a diferenciação precisa entre as células passando por necrose ou apoptose na morte celular induzida pelo 4-NC, essas foram analisadas por citometria de fluxo usando IP e o conjugado Anexina V - fluorocromo FITC. As células que estão sofrendo apoptose passam por mudanças na bicamada fosfolipídica de suas membranas celulares, há a externalização do receptor fosfatidilserina (FS) para a membrana externa, nos eventos iniciais da apoptose (Villa *et al.*, 1997; Kerr, 2002). Sendo assim, células apoptóticas podem ser marcadas com Anexina V-FITC, enquanto IP é excluído, visto que a membrana continua íntegra. Em contraste, células sofrendo necrose exibem tanto a exposição da FS na membrana externa e

perda de integridade de membrana simultaneamente, portanto células necróticas podem ser marcadas tanto com IP quanto com Anexina V-FITC (Lima *et al.*, 2007; Krysko *et al.*, 2008).

As linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-103 apresentaram as mais altas porcentagens de células com fragmentação de DNA (50µM), como observado na Figura 8. Essas linhagens estão marcadas positivamente com Anexina V devido ao tratamento com 4-NC (Figura 9). A alta fragmentação de DNA, baixa taxa de ruptura de membrana e grande externalização de FS observada nessas linhagens de melanoma, refletem a morte celular por apoptose. Contudo, a linhagem de estudo SK-Mel-147 apresentou ruptura em suas membranas celulares e fragmentação no DNA, e foram negativas para Anexina V e positivas para IP. Logo, padrões de apoptose não são observados para SK-Mel-147 nesta concentração.

Apoptose e necrose há muito tempo, vêm sendo considerados dois mecanismos distintos de morte celular, com diferenças bioquímicas, morfológicas, e características funcionais. Porém, recentemente está se tornando cada vez mais aceito que apoptose e necrose podem não ser necessariamente eventos independentes, mas sim compartilharem alguns eventos comuns pelo menos em alguns caminhos de transdução na sinalização celular e em fases iniciais do processo de morte celular (Jun *et al.*, 2007).

A indução de apoptose não é somente uma importante defesa contra o câncer, mas por outro lado, representa um caminho consolidado como novos alvos para a quimioprevenção do câncer. Neste contexto, muitos produtos naturais incluindo polifenóis, curcuminas, e quercertina tem mostrado induzir apoptose em modelos animais de quimioprevenção (Campbell, 2007).

Embora o 4-NC não tenha provocado a morte celular por apoptose na linhagem SK-Mel-147, e sim nas demais linhagens de melanoma, o composto foi capaz de induzir nesta linhagem celular a parada no ciclo celular em G0/G1 (Figura 12). Tendo efeito no ciclo celular, o composto nesta concentração pode também ter outros efeitos que reflete eventos intracelulares que deverão ser avaliados.

Outro mecanismo de morte, a senescência prematura, é discutido como um mecanismo chave de supressão de tumor, particularmente por estudos recentes que demonstraram a existência de células senescentes em linfomas, melanomas, câncer de mama, de pulmão, adenomas, entre outros tumores pré-malignos in vivo (Braig *et al.*, 2005; Campisi, 2005; Collado *et al.*, 2005; Narita & Lowe, 2005; Denoyelle *et al.*, 2006, Sarkisian *et al.*, 2007). Porém, nossos dados demonstram que o 4-NC não foi efetivo como um indutor de senescência como observado nas linhagens celulares de melanoma (Figura 10).

4-NC e o extrato de PU demonstraram efeitos inibitórios sobre as atividades de MMP-2 e MMP-9 em modelos de foto-envelhecimento de pele (Ropke *et al.*, 2006). A habilidade *in vitro* de inibição do extrato etanólico bruto de PU sobre as MMPs também foi demonstrada em modelo de córnea. O extrato de PU inibiu a atividade de MMP-2 (formas pró e ativas) e MMP-9 de maneira dose-dependente (Barros *et al.*, 2007).

Considerando esses autores, nossos resultados estão de acordo com o publicado, considerando o fato de o 4-NC inibir a atividade de MMP-2 na linhagem de melanoma SK-Mel-147 (Figura 14). Invasão celular e metástase são alvos críticos para o tratamento terapêutico de tumores malignos sólidos. As MMP-2 e MMP-9 tem sido consideradas as proteinases associadas à invasão tumoral. Suas expressões e atividades contra macromoléculas de matriz têm sido relacionadas ao desenvolvimento de fenótipos malignos

e mostram o desequilíbrio com seus inibidores endógenos (Donà *et al.*, 2004, Correa *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007).

4.2. Mecanismo de ação do 4-NC

4.2.1- Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Células de melanoma são descritas por não possuírem habilidade em lidar com estresse oxidativo quando comparadas à melanócitos normais, podendo ser atribuído à anormalidades constitutivas em seus melanossomos. Melanócitos e melanoma contêm melanina, um polímero complexo que modula alterações redox nestas células. Os níveis intracelulares relativos ao peróxido de hidrogênio são semelhantes nos dois tipos celulares, porém os níveis do ânion superóxido estão significativamente aumentados em células de melanoma (Meyskens *et al.*, 2001; Nihal *et al.*, 2005). Portanto, a regulação anormal do sistema redox em células de melanoma poderia ser aproveitada para a elaboração de novas abordagens para o controle da doença.

Antioxidantes tendem a possuir propriedades regulatórias de tradução de sinais que devem ou não estar ligadas à sua capacidade em inativar oxidantes. Porém sobre certas condições, com um forte ambiente oxidante onde há falta de suporte para regenerar (reduzir) antioxidantes oxidados, alguns antioxidantes podem assumir características de um pró-oxidante (Chandan, 2002).

O 4-NC foi descrito como um potente antioxidante (Barros *et al.*, 1996), e recentemente descrevemos a sua capacidade citotóxica sobre células de melanoma humano metastáticos (Brohem *et al.*, 2009). Sendo assim, hipotetizamos que em altas concentrações

o 4-NC poderia induzir ou inibir vias que induziriam a produção de EROs, sendo capaz de regular a morte por apoptose, e em baixas concentrações 4-NC teria seu papel antioxidante, inibindo a atividade destas enzimas. É possível hipotetizar que pelo fato de o desenvolvimento e progressão do melanoma também ser resultado do estresse oxidativo nos melanócitos cutâneos, as propriedades antioxidantes do 4-NC poderia revelar-se útil para o controle da progressão tumoral.

Para podermos afirmar a produção de EROs mediada direta ou indiretamente pelo 4-NC, observamos algumas enzimas envolvidas no sistema REDOX das células. Foi possível notar que o 4-NC foi capaz de inibir a enzima catalase (Figura 15) em fibroblastos e em melanomas humanos. A catalase é uma enzima bem conservada entre os organismos vivos, que detoxifica peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Nishikawa *et al.*, 2005). Estudos mecanísticos de compostos que possuem como mecanismo de ação a indução de EROs, demonstram a importância da inibição desta enzima para o acúmulo de EROs e, conseqüentemente, a morte celular por apoptose. Como exemplo, o trabalho publicado por Averill-Bates e colaboradores (2008), demonstram que seu objeto de estudo, as poliaminas, só são citotóxicas para a linhagem de melanoma murino B16-F10, quando é realizada a inibição da catalase, concomitantemente com o tratamento. Sendo assim, ele demonstra a importância do acúmulo de EROs para a indução de morte celular dos melanomas (Averill-Bates *et al.*, 2008).

Com relação à outra enzima do sistema antioxidante das células, a SOD (superóxido dismutase), o 4-NC foi capaz de induzir o aumento da sua atividade em fibroblastos. É sabido que o ânion radical superóxido pode resultar da atividade da cadeia respiratória mitocondrial. Uma vez que a mitocôndria contém a SOD ativa, há a dismutação do ânion

radical superóxido, ou seja, o $O_2^{\cdot-}$, que pode gerar H_2O_2 (Koch *et al.*, 2004). Sendo assim a SOD (mais especificamente a MnSOD) protege a mitocôndria dos danos causados pelos radicais livres (Pani *et al.*, 2009a). O aumento destas enzimas do sistema antioxidante estão sendo associados com a supressão da tumorigenicidade e habilidade metastática, quando o tumor tem como um de seus causadores as EROs (Rieber & Rieber, 1999). Uma vez que o 4-NC foi capaz de induzir o aumento desta enzima nos fibroblastos, isso talvez possa explicar a resistência destas células ao 4-NC, ou seja, não permitindo o acúmulo do ânion radical superóxido e, portanto, não provocando danos mitocondriais que levariam à apoptose.

Para mensurar a quantidade de EROs produzidas direta ou indiretamente pelo 4-NC utilizamos sondas químicas com diferentes métodos de detecção. Sondas químicas para radicais livres na biologia são ferramentas importantes, sendo que a fluorescência e a quimioluminescência oferecem alta sensibilidade na detecção. As sondas baseadas na redução de corantes perdem sensibilidade e podem precisar de um catalisador para a reação, apesar destes fatores, sondas como o DCFH-DA e dihidro-rodamina foram utilizadas em mais de 2000 estudos até então (Wardman *et al.*, 2007).

Além disso, a utilização destas sondas em sistemas celulares requer mínimas perdas, e uma vez que as EROs podem competir com antioxidantes intracelulares, mudanças na fluorescência ou luminescência podem refletir também mudanças na competição com esses antioxidantes, e não propriamente, a taxa de produção de radicais livres (Wardman *et al.*, 2007).

Devido à dificuldade de cada técnica foi verificada a produção de EROs em melanomas por duas metodologias com sondas distintas: lucigenina (quimioluminescente) para a detecção do radical superóxido (Figura 16) e DCFH-DA (fluorescente) na detecção de

peróxido de hidrogênio (Figura 17 e 18). O superóxido é produzido diretamente durante a auto-oxidação nas mitocôndrias ou por enzimas citoplasmáticas, como xantina oxidase, citocromo P-450 e outras. Este pode ser inativado espontaneamente ou mais rapidamente pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando o peróxido de hidrogênio.

Nos dois ensaios foi verificado um aumento na quantidade de EROs quando as células foram tratadas com 4-NC. Como controle foi utilizado conjuntamente com o 4-NC um potente antioxidante denominado Tiron. Este antioxidante foi escolhido porque, para as mesmas linhagens analisadas neste presente estudo, existem trabalhos publicados com que demonstram que Tiron exibe a capacidade de inibir a apoptose quando esta é provocada por EROs induzidas por outros compostos, como Bortezomibe (Fernández *et al.*, 2006).

Como pode ser observado na Figura 17, observamos a morfologia das células na associação do 4-NC com Tiron, demonstrando fenótipos celulares compatíveis com a morte celular observada. Demonstrando que o possível mecanismo de ação do 4-NC se inicia com a produção de EROs, levando à morte celular por apoptose.

Observando a quantificação do peróxido de hidrogênio, feito através da sonda DCFH-DA, vemos uma diferença de perfil entre as linhagens (Figura 18). Observamos que o aumento de EROs para os fibroblastos se inicia após 12 h de tratamento, enquanto que para os melanomas esse aumento começa após 2h de exposição ao 4-NC, o que em parte explica a resistência dos fibroblastos a esse composto. Entre os melanomas também observamos diferenças, pois para as linhagens SK-Mel-103 e SK-Mel-147 o perfil de indução de EROs possui um pico no ponto de 2h de tratamento e depois os níveis de peróxido de hidrogênio são reduzidos, enquanto que para a linhagem SK-Mel-28 há uma constante indução de EROs durante toda a exposição ao 4-NC.

Isso pode ser devido ao fato de a linhagem SK-Mel-28 possuir uma mutação pontual no códon 145 do gene p53, levando a uma superexpressão dessa proteína mutada (Haapajarvi *et al.*, 1999; Girnita *et al.*, 2000; Mousavi-Shafaei *et al.*, 2009). Foi demonstrado na linhagem SK-Mel-28 que um gene crucial para transformação tumoral e manutenção da tumorigenicidade em melanomas, denominado *insulin-like growth factor I* receptor (IGF-IR) é regulado positivamente pela proteína p53 mutada. Em células onde p53 é selvagem ocorre o oposto, ou seja, p53 inibe a regulação transcricional deste gene (Girnita *et al.*, 2000).

Também é sabido que p53 por si só é capaz de induzir vias de produção e acúmulo de EROs. O p53 é capaz de promover estresse oxidativo mitocondrial, induzindo a expressão da proteína p66shc, uma geradora mitocondrial de peróxido de hidrogênio (Pani *et al.*, 2009a; 2009b). Sendo assim, o fato de a linhagem SK-Mel-28 possuir mutação com ganho de função de p53, pode levar ao aumento e acúmulo de EROs, pela indução de estresse oxidativo mitocondrial.

4.2.2- 4-NC e indução de apoptose

A incapacidade de indução a morte por apoptose em resposta à quimioterapia e outros estímulos externos permitem uma vantagem seletiva para progressão tumoral, formação de metástase e resistência à terapia em melanomas. Mutações em alguns genes envolvidos no mecanismo de apoptose estão diretamente correlacionados com a quimiorresistência dos melanomas, entre eles estão p53, Apaf-1, Bcl2 e N-Ras (Soengas & Lowe, 2003, La Porta, 2007; Eberle *et al.*, 2008).

A fosfoproteína nuclear p53 participa da regulação do ponto de checagem do ciclo celular, denominado G1, possuindo fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose. Portanto, danos ao DNA promovem a superexpressão e conseqüente ativação da p53, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. Quando os danos ao DNA não são passíveis de reparo, ocorre a ativação da apoptose. Os níveis de p53 podem aumentar devido a diferentes estímulos, e não somente o dano ao DNA, como estímulo oncogênico, hipóxia e estresse oxidativo (Soengas & Lowe, 2003; Dhar *et al.*, 2009).

Na Figura 19, pode-se observar que 4-NC é capaz de induzir um aumento de p53 nos fibroblastos humanos, bem como nas linhagens de melanoma, SK-Mel-103 e Sk-Mel-147 (p53 selvagem), mas não na linhagem com p53 mutado (SK-Mel-28). Inúmeros antioxidantes derivados de produtos naturais como os já citados EGCG e seus derivados (Nihal *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2008; Harakeh *et al.*, 2008) e vitamina E (Dong *et al.*, 2007);

além de derivados do alho (Das *et al.*, 2009); da semente de uva (Kaur *et al.*, 2008), curcumina (Chiu *et al.*, 2008) entre outros, são capazes de ativar a proteína p53 em diversos tipos de tumores, incluindo melanoma.

O aumento de p53 vem sendo relacionado ao aumento de EROs. Lee e colaboradores, em 2009, apresentam resultados onde a Wogonin, um dos principais compostos ativos da *Scutellaria baicalensis*, parece ser eficaz na inibição do crescimento tumoral em uma série de tumores analisados. Os autores observaram que durante o tratamento com wogonin a apoptose relaciona a TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), citotoxicidade, clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase e ativação de caspases foram associados com um aumento de p53- por danos ao DNA e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A proteína p53 possui um papel apoptogênico direto quando é translocada para a mitocôndria, em resposta ao estresse celular, resultando na apoptose através da interação com proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-XL que alteram o potencial de membrana mitocondrial e induzem a liberação do citocromo c e SMAC / DIABLO para o citosol com conseqüente ativação de Caspases (Hersey *et al.*, 2001; Soengas & Lowe, 2003; Spierings *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009).

Mesmo após o fechamento desta tese, outros experimentos serão realizados com a utilização de shRNA (*short hairpin* RNA) para a proteína p53 nas linhagens de melanoma humano. Com os resultados obtidos até o momento foi verificado um aumento da toxicidade 4-NC quando a expressão protéica de p53 é inibida. Como controle foi utilizado um quimioterápico clássico, a doxorrubicina, que tem como mecanismo de ação o aumento da proteína p53, e em células contendo shRNA para p53 sua citotoxicidade também é

aumentada (Figura 19 C). Para verificarmos se p53 é realmente um alvo essencial para a morte celular induzida por 4-NC outros experimentos serão realizados, como a avaliação protéica de p53 e outras proteínas envolvidas na sua sinalização.

O proteassoma 26 S é uma protease multicatalítica responsável pela maior parte da degradação protéica intracelular não lisossomal. Curiosamente, múltiplos fatores pró-oncogênicos são controlados pelo proteassoma. Esses incluem fatores transcricionais, ciclinas, inibidores de quinases dependentes de ciclina, citocinas, e uma série de fatores pró e antiapoptóticos (incluindo Bim e Mcl-1, respectivamente), que podem funcionar como reostatos do destino celular. Portanto, a inibição do proteassoma é uma potente ferramenta celular para matar seletivamente células tumorais. Inibidores de proteassoma têm sido amplamente utilizados para endereçar análises mecanísticas de estabilidade de proteínas e regulação em uma variedade de processos celulares essenciais. Clássicos agentes baseados em aldeídos como MG-132 ou PSI tem sido importantes instrumentos na identificação dos principais mediadores da apoptose, progressão do ciclo celular, e de resposta ao estresse oxidativo em células normais e tumorais (Fernández *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2006).

O Bortezomibe é um inibidor de proteassoma capaz de ultrapassar as tradicionais barreiras de resistência dos melanomas por induzir uma proteína pró-apoptótica que possui um domínio homólogo a Bcl-2 (*Bcl-2 homology domain 3-only proapoptotic protein*), denominada NOXA. Além disso, induz o acúmulo da proteína antiapoptótica Mcl-1 e Bcl-xL, clivagem de Bid e Bax, bem como a geração de ROS. Interações entre membros pró e antiapoptóticos da superfamília Bcl-2 são essenciais para a despolarização mitocondrial. Noxa se liga seletivamente à Mcl-1 e Bfl-1/A1. Mesmo após o acúmulo de fatores antiapoptóticos, a liberação do citocromo c procede, porém em outros sistemas esse

acúmulo teria que ser inibido para que a apoptose pudesse ocorrer (Fernández *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2006, Pérez-Galán *et al.*, 2006).

O mecanismo responsável pela geração de ROS após a inibição do proteassoma não é conhecido. Foi proposto que a geração de ROS induzida por Bortezomibe pode ser devida à indução de superóxido e a alteração das vias metabólicas de oxidação-redução, interferências com sistema de transporte de elétrons mitocondrial, ou por estresse do retículo endoplasmático devido ao acúmulo de proteínas nesta organela (Pérez-Galán *et al.*, 2006).

Realizamos a avaliação protéica de alguns elementos envolvidos com a inibição de proteassoma e, conseqüente morte celular por apoptose via mitocondrial. Quanto à Bcl-2 e Bcl-xL, estes não parecem ser ativados pelo tratamento com 4-NC (Figura 20). Porém, o 4-NC induz a clivagem de outros elementos da família Bcl-2, Bax e Bid (Figura 21). Outra proteína de resposta primária à p53 é Noxa, uma proteína da família *BH3-only*. A superexpressão de Noxa em muitos tipos de câncer causa apoptose, que é associada a sua localização preferencial à mitocôndria. Noxa leva ao aumento da expressão de Mcl-1, levando a degradação proteassomal (Oda *et al.*, 2000; Ploner *et al.*, 2009). Além disso, a regulação e acúmulo de Noxa pode ocorrer até mesmo em linhagens com mutações em p53, como por exemplo, Bortezomibe, uma droga descrita por ser inibidor proteassomal, é capaz de induzir acúmulo de Noxa em SK-Mel-28 levando à morte celular (Fernández *et al.*, 2005). O 4-NC foi capaz de induzir o acúmulo de Noxa e Mcl-1 nas linhagens de melanoma estudadas (Figura 22).

Quanto à utilização de células normais, melanócitos e queratinócitos, apenas as baixas concentrações de 4-NC puderam ser utilizadas, sendo que 5µM corresponde a 10% de

morte e 10 μ M a aproximadamente 50% de morte, como observado na Figura 23. Utilizando-se concentrações maiores (30 μ M), as coletas de proteína e até mesmo de células eram praticamente impossíveis, devido à grande degradação celular. Sendo assim, o 4-NC em concentrações mais baixas foi capaz de induzir o acúmulo protéico dos fatores anti-apoptóticos Mcl-1 e Bax-xL e, pró-apoptótico Noxa. Como controle foi utilizado Bortezomibe. Pode-se observar que as linhagens de melanoma, mesmo quando tratadas com baixas concentrações do 4-NC (5 e 10 μ M) também possuem a expressão destas proteínas aumentadas.

Com o aumento e clivagem das proteínas ditas anteriormente há a alteração do MOMP, com a subsequente liberação do citocromo c. Na Figura 24, observamos que o 4-NC foi capaz de alterar o potencial de membrana mitocondrial de forma mais drástica nos melanomas quando comparados aos fibroblastos. Isso indica que está ocorrendo a liberação de cyt c da mitocôndria para o citoplasma, onde juntamente com Apaf-1 e caspase-9 há a formação do apoptossomo (Soengas & Lowe, 2003). Porém ao analisarmos a expressão do cyt c não observamos tais diferenças. Isso pode ser devido ao fato de não ocorrer um aumento dos níveis protéicos de cyt c, mas sim a sua liberação da membrana mitocondrial. Uma vez que utilizamos extrato protéico total das células, não observamos nenhuma diferença. Portanto, experimentos devem ser realizados somente com extrato protéico mitocondrial para a observação da liberação do cyt c.

As caspases estão inativas no citosol e quando clivadas, há ativação e estas, então, são capazes de clivar/degradar diversas proteínas requistas para o funcionamento celular. A Figura 25 mostra que há ativação da caspase 3 e caspase-9 nas linhagens de melanoma humano, quando tratadas com 30 μ M de 4-NC por 24 h. Pelo fato de os fibroblastos serem

mais resistentes a ação do 4-NC, essa clivagem não é observada quando tratados com essa concentração do composto.

Para podermos assegurar que a clivagem de caspases é necessária pela morte por apoptose induzida pelo 4-NC realizamos os ensaios com um pan-inibidor de caspases denominado Z-VAD-FMK (carbobenzoxy – valyl – alanyl – aspartyl - [O-methyl] - fluoromethylketone), como observado na Figura 26. Este composto é capaz de permear as células e se ligar irreversivelmente ao sítio catalítico das caspases, inibindo a indução de apoptose.

Concluindo, quanto à citotoxicidade do 4-NC e seu mecanismo de ação, este composto é capaz de induzir o acúmulo de EROs, indução e clivagem de algumas proteínas da família Bcl-2, alterar o MOMP e induzir a apoptose dependente de caspases. Esse mecanismo é muito similar a de inibidores proteassomais, porém essa afirmação ainda não pode ser realizada.

4.2.3.- Diminuição de invasão de melanomas metastáticos em modelo de pele artificial

O câncer não é uma doença homogênea, mas uma interação orquestrada entre diferentes tipos celulares, órgãos e tecidos específicos. Nos últimos anos, modelos de cultura 3-D se tornaram cada vez mais populares no estudo da biologia do tumor. O modelo 3-D está se tornando o modelo de escolha, pois fornece um sistema simples e de fácil manipulação que apresenta arquitetura semelhante ao tecido real e leva em conta interações célula-célula e célula-matriz (Chione & Grose, 2008).

A diversidade e a variação de tipos de células usando componentes da matriz permite o estudo das interações entre as células do tumor e seu estroma circundante, por exemplo, como tais interações regulamentam a migração e invasão celular (Chione & Grose, 2008). A ligação entre a perda de adesão célula-célula, a ativação da migração celular e o comportamento das células do tumor intra-epitelial durante os primeiros estágios de progressão do câncer de pele não são bem compreendidos. Um estudo caracterizou o comportamento migratório de uma linhagem celular de células escamosas (carcinoma HaCaT-II-4) e a supressão de E-caderina. Os autores foram capazes de mostrar a perda de adesão celular permitindo a migração de uma única célula tumoral entre queratinócitos normais, sendo essa suficiente para a invasão do estroma (Alt-Holland *et al.*, 2008).

Em um modelo de pele artificial normal, os melanócitos permanecem isolados e distribuídos na membrana basal que separa a epiderme e a derme, como na pele normal. Já na presença de linhagens de células de melanoma primário da fase de crescimento vertical, essas foram capazes de invadir a derme neste modelo e apenas uma membrana basal

irregular foi formada. Quando as peles artificiais contêm células de melanoma metastático, esses proliferaram tão rapidamente e de forma agressiva que são capazes de invadir profundamente a derme. Estudos têm demonstrado que os padrões de crescimento de células de melanoma em pele artificial correspondem aos *in vivo* e que o fator de crescimento de fibroblasto é fundamental para a progressão (Meier *et al.*, 2000; Haass *et al.*, 2005; Smalley *et al.*, 2006).

Logo, tais culturas representam excelentes modelos para testes de potenciais tratamentos e têm sido utilizados com sucesso para analisar o potencial terapêutico de algumas drogas ou terapias não convencionais. Esse tipo de modelo 3D, também conhecido como cultura organotípica já é estendido a outros modelos com diferentes tipos de tumores, incluindo mama, próstata e câncer de ovário (Chione & Grose, 2008).

A reconstrução da pele humana é um modelo muito útil para o estudo não só da progressão do melanoma em um microambiente 3D, mas da interação de células de melanoma com queratinócitos circundantes e fibroblastos. É provável que os fibroblastos circundantes sejam recrutados pelo melanoma inicial que fornece sinais de sobrevivência sob a forma de alteração da matriz extracelular (MEC), deposição e fatores de crescimento, bem como metaloproteinases, que são essenciais para a invasão de células tumorais (Haas *et al.* 2005 ; Smalley *et al.*, 2006). Fernandez *et al.* (2006) utilizaram a pele artificial humana para testar a eficácia do Bortezomibe, uma droga anti-tumoral, em um modelo tridimensional. Os autores utilizaram este modelo para obter uma melhor descrição do modo de ação do Bortezomibe no contexto de interações célula-célula e célula-matriz.

Boccardo e colaboradores (2004) utilizaram culturas organotípicas de queratinócitos humanos para avaliar os efeitos do TNF-alfa em células que expressam oncogenes de HPV.

Outro exemplo da utilização da cultura organotípicas em outros modelos de tumor epitelial, é encontrado no trabalho de Hoskins e colaboradores (2009) que estudou a anemia de Fanconi (FA) neste modelo. (Hoskins *et al.*, 2009).

Esse modelo foi muito importante para o entendimento do mecanismo de ação do 4-NC, visto a impossibilidade do tratamento *in vivo*. Como visto nas Figura 27 e 28, o composto 4-NC não foi citotóxico ao equivalente dérmico, porém foi capaz de induzir a inibição do melanoma na derme após 72hs de tratamento.

Utilizamos marcadores de diferenciação epidérmica para visualizar este processo no modelo utilizado. Esses marcadores são comumente encontrados em publicações que utilizam os modelos de pele reconstituída como objeto de estudo. Utilizamos: queratina 10 (Tjabringa *et al.*, 2008; Ganguli-Indra *et al.*, 2009, Pena *et al.*, 2010); queratina 14 (Tjabringa *et al.*, 2008; Ganguli-Indra *et al.*, 2009, Pena *et al.*, 2010) e S100 (Meier *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007) e involucrina (Pena *et al.*, 2010; Tharakan *et al.*, 2010).

A queratinização, ou seja, o processo de diferenciação terminal dos queratinócitos epidermais do estrato basal ao córneo, é essencial para a estabilidade mecânica dos tecidos epiteliais, formando uma rede tridimensional e um citoesqueleto altamente dinâmico (Arin, 2009; Ramot *et al.*, 2009). Durante esse processo, pares de queratinas são expressos de forma altamente específica para cada etapa da diferenciação dinâmica epitelial (Moll *et al.*, 2008; Arin, 2009).

Queratinas são as maiores proteínas estruturais sintetizadas pelos queratinócitos (Prokshk *et al.*, 2008). A família das queratinas são constituídas de 54 genes funcionais que possuem modos de expressão distintos em diferentes camadas epiteliais e em diferentes

órgãos, representando estados fisiológicos e patológicos de células epiteliais e da epiderme (Ramot *et al.*, 2009).

Na epiderme, a transição de queratinócitos da camada basal proliferativa para a camada espinosa supra-basal no processo de diferenciação terminal são caracterizados por mudanças na expressão da queratina. Isso envolve uma troca da expressão de queratinas basais (queratinas 5, 14 e 15) para as queratinas suprabasais (queratina 1 tipo II e, subsequente, queratina 10 tipo I) (Moll *et al.*, 2008; Arin *et al.*, 2009)

Smith e colaboradores (2002) afirmam que tumores melanocíticos são negativos para queratinas de forma geral. Não foi observada a marcação para queratina 10, porém observamos que a queratina 14 é capaz de marcar os melanomas neste modelo 3D e, assim, conseguimos acompanhar sua inibição pelo 4-NC (Figura 29).

A S-100 é uma proteína que possui sítios de ligação ao cálcio e foi primeiramente descoberta em células da glia, possuindo esse nome devido à sua solubilidade de 100% em solução saturado de sulfato de amônia. S-100 é extremamente utilizada para marcação de melanomas e lesões melanocíticas (Meier *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2007; Ohsie *et al.*, 2008; Hussein *et al.*, 2008). Como podemos observar, foi possível a marcação desta proteína nas peles contendo melanoma.

O envelope cornificado celular (EC), formado na camada mais externa da epiderme, possui um papel essencial porque providencia uma estrutura durável e flexível como uma barreira. O EC contém uma mistura insolúvel de proteínas, incluindo a involucrina. A involucrina foi a primeira proteína identificada como uma constituinte do EC, e é localizada na membrana superficial ou ao redor dela iniciando a formação do EC (Hitomi, 2005; Tharakan *et al.*, 2010). Assim como a queratina 14 e o S100, podemos observar que a

marcação por involucrina no modelo de pele artificial contendo melanoma e a inibição do 4-NC sobre os melanomas presentes na derme, restringindo-os à parte epitelial (Figura 29).

Também utilizamos marcadores do processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT): β -catenina e E-caderina (Figura 30). O EMT se refere à complexa reprogramação das células epiteliais que ocorre durante desenvolvimento embrionário, reparo tecidual e progressão tumoral. As células epiteliais funcionam como uma importante barreira e formam interações homotípicas muito fortes que contribuem para a formação de barreiras permeáveis. A E-caderina possui um papel central pela sua interação com a β -catenina, e a actina do citoesqueleto. A mudança mais familiar que ocorre durante o EMT é a diminuição da expressão da E-caderina da superfície, resultando na perda de adesões homotípicas (Meier *et al.*, 2000; Kreizenbeck *et al.*, 2008; McConkey *et al.*, 2009).

Como podemos observar na Figura 30, a expressão de β -catenina é diminuída na presença dos melanomas, enquanto a expressão de E-caderina é totalmente perdida na presença da linhagem de melanoma. Meier e colaboradores (2000) demonstraram em modelo de pele reconstituída que as células de melanoma não expressam E-caderina, crescendo independentemente dos queratinócitos. Observamos que o tratamento com 4-NC não afetou a expressão destas da E-caderina, entretanto, para β -catenina, observa-se que, quando a pele com melanoma é tratada com 30 μ M de 4-NC, as células epiteliais mais justapostas e organizadas semelhantemente ao observado na pele artificial normal. Indicando, assim, um resgate da organização tecidual na presença do 4-NC, possivelmente pela morte das células de melanoma.

4.2.4.- 4-NC e inibição das MMPs

As MMPs podem ser ativadas por EROs. Isso porque a conformação dos zimógenos é mantida pelos resíduos de cisteína no pró-domínio e o átomo de zinco presente no sítio catalítico de todas MMPs. As espécies reativas são capazes de modificar esse resíduo de cisteína, e desfazer essa ligação iniciando o processo de auto-ativação das MMPs (Nelson *et al.*, 2004). Antioxidantes capazes de regular a produção de EROS são extremamente importantes na regulação da expressão e atividade das MMPs, evitando invasão e metástase de células tumorais que possuem uma expressão e atividade alteradas destas enzimas.

No trabalho publicado anteriormente (Brohem *et al.*, 2009) observou-se que o 4-NC foi capaz de inibir a ativação da MMP-2 quando em baixas concentrações (10 e 20 μ M), nada pôde ser dito sobre a atividade da MMP-9 visto que a sua atividade era extremamente baixa, inclusive nas células não tratadas (controle), sendo difícil a visualização e quantificação por esse ensaio.

No modelo de pele artificial, observamos que o 4-NC foi capaz de inibir a invasão de melanomas e que essa está correlacionada com a inibição dos níveis de marcação de MMP-9 por imunohistoquímica (Figura 31).

Não foi possível a detecção dos níveis protéicos da MMP-2 (Figura 32A), porém podemos observar uma inibição da atividade desta enzima pelo ensaio de atividade enzimática visto na Figura 33A. O mesmo foi observado para MMP-9 (Figura 32B), observa-se que o tratamento com 4-NC foi capaz de inibir a produção desta proteína (zimógeno e forma ativa), além de inibir a atividade desta enzima (Figura 33B).

Membros da família das MMPs respondem à cascatas de sinalização como do gene Ras e da proteína quinase mitógeno ativadas (MAPK), que são alvos de EROs, bem como elementos abaixo da cascata como PI3K (fosfatidilinositol-3' quinase) e ERK (quinase regulada extracelularmente). Fatores de transcrição das cascatas de sinalização acima descritas, como Jun e Fos, bem como AP-1 também podem ser diretamente ativados por EROs (Nelson *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005).

Entretanto, esses elementos não são somente necessários para a regulação das MMPs. A via Ras/Raf/MEK/ERK regula o destino celular “downstream” de receptores tirosina quinases, citocinas e receptores heterotriméricos acoplados a proteína-G. A pequena proteína G Ras está anexada ao folheto interior da membrana plasmática, enquanto Raf, MEK e ERK são proteínas quinases citosólicas. Nos melanócitos, esta via é ativada por fatores como de crescimento de células tronco (SCF – *stem cell factor*), fator de crescimento de fibroblastos (FGF - *fibroblast growth factor*) e fator de crescimento de hepatócito (HGF - *hepatocyte growth factor*), mas individualmente estes fatores de crescimento induzem uma ativação fraca ou apenas transitória de ERK, conduzindo a um efeito mitogênico modesto. (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Assim, a proliferação a ação combinada de vários fatores de crescimento é necessária para estimular uma atividade forte e sustentada de ERK em melanócitos. Este percurso também é um regulador chave de proliferação celular em melanoma, com ERK sendo hiperativado em até 90% dos melanomas humanos. Nos melanomas, ERK pode ser ativado pela produção autócrina de fatores de crescimento ou em raros casos por ativação mutacional dos receptores de fatores de crescimento como o c-Kit (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Alguns desses elementos foram analisados, como visto na Figura 34. Embora somente phosphoERK (ERK fosforilado) pareça possuir uma regulação inibitória quando as células são tratadas com 4-NC, os outros elementos da cascata de ativação MAPK/ERK não apresentaram nenhuma modificação. Assim concluímos que o 4-NC não foi capaz de modular os elementos da via de inibição do promotor de MMP-9, mostrando que a sua atividade das MMPs deve ocorrer no processo de ativação destas enzimas. Isso pode ser afirmado com base nos dados de atividade que mostram que mesmo sem modulação da expressão protéica de MMP-2, há inibição da sua atividade (Figura 34) e há modulação da expressão protéica e atividade de MMP-9. Além disso, a TIMP-2 proteína envolvida na regulação da MMP-2 teve seus níveis elevados na presença do 4-NC.

A atividade das MMPs é regulada por inibidores endógenos como $\alpha 2$ macroglobulina, inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs – *tissue inhibitor of metalloproteinase*), pequenas moléculas com domínios “TIMP-like” e pela glicoproteína de membrana recentemente descrita, RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*). As TIMPS inibem as MMPs de uma forma seletiva, mas reversível, com estequiometria de 1:1 molécula (Chang & Werb, 2001; Simizu *et al.*, 2005; Zambuzzi *et al.*, 2009). Existem quatro tipos de TIMPs identificadas: TIMP-1 que inibe collagenase, estromelina-1 e as formas ativas e inativas de MMP-9 (gelatinase B); TIMP-2 que inibe a secreção de pró-MMP-2 (gelatinase A), ao mesmo tempo em que ativa esta enzima na presença de MT1-MMP (MMP-14); TIMP-3, que ao contrário das três outras formas que são solúveis, está associada com a MEC e inibe a secreção de pró-MMP- 2/-9 e TIMP-4 que inibe pró-MMP-2 (Woodhouse *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 2002; Bernardo & Fridman, 2003; Shiomi & Okada, 2003).

As MMPs são inicialmente expressas em um estado enzimático inativo devido a sua interação com resíduos de cisteína do pró-domínio com o íon de zinco de sítio catalítico (Sternlicht & Werb, 2001; Kessenbrock *et al.*, 2010). A ativação da pro-MMP-2 ocorre na superfície celular pela clivagem inicial realizada por MT1-MMP, em um processo regulado pela TIMP-2. O complexo ternário pró-MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP permite a ativação de MMP-2 por outra TIMP-2 livre e por uma MMP-2 ativa, que remove o pró-peptídeo clivado inicialmente (Ellerbroek & Stack, 1999; Sternlicht & Werb, 2001; Bernardo & Fridman, 2003; Itoh *et al.*, 2008).

Sendo assim, para a total elucidação de como 4-NC age no processo de ativação das MMP-2 e MMP-9 mais ensaios devem ser realizados, com o estudo das TIMPs e outras proteínas envolvidas na ativação destas enzimas.

Concluindo, os estudos com 4-NC vem mostrando que esse composto é extremamente eficiente na morte de melanomas metastáticos, sendo capaz de induzir a morte por apoptose via mitocondrial por acúmulo de EROs. Além disso é capaz de inibir a invasão de melanomas em modelo tridimensional, inibindo a atividade das MMP-2 e -9.

5. CONCLUSÕES

O 4-NC, composto isolado de uma planta brasileira *Pothomorphe umbellata*, mostrou a capacidade de transpassar a resistência de diferentes linhagens de melanoma, detentoras de diferentes mutações em genes de resistência à apoptose. Quanto à citotoxicidade, o 4-NC é capaz de induzir o acúmulo de EROs, indução e clivagem de algumas proteínas da família Bcl-2 (Noxa, Mcl-1, Bid e Bax), alterar o MOMP e induzir a apoptose dependente de caspases. Esse mecanismo é muito similar a de inibidores proteassomais, porém essa afirmação ainda não pode ser realizada. Além disso, o 4-NC é capaz de inibir a invasão de melanomas em modelo 3D de pele artificial, inibindo a atividade das MMP-2 e -9 (Figura 35).

Figura 35 – Esquema do modo de ação do 4-NC. O 4-NC é capaz de induzir o acúmulo de EROs pela inibição da enzima Catalase. O aumento de EROs induz ao aumento de p53, que também é capaz de ativar vias de sinalização de indução de EROs. Com o aumento de p53, há indução/clivagem de proteínas da família Bcl-2 (Noxa, Mcl-1, Bax e Bid) e, conseqüentemente, há alteração do potencial de membrana mitocondrial, que levará a indução de caspases e morte por apoptose. O 4-NC também é capaz de inibir a ativação da MMP-9 diminuindo a invasão dos melanomas em modelo de pele artificial.

Capítulo 2

Desenvolvimento do Projeto:

Ação do extrato de *Pothomorphe umbellata* nos componentes da matriz extracelular no processo de cicatrização da pele: modelos *in vivo* e *in vitro*.

1. RESUMO

Com a ocorrência de uma lesão em uma determinada área da pele inicia-se uma sequência dinâmica de processos biológicos específicos e complexos, denominado cicatrização.

Os eventos de migração e remodelação que ocorrem durante o reparo da pele requerem a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs) e sua regulação por seus inibidores fisiológicos específicos (tissue inhibitors of metaloproteinases, TIMPs). O desequilíbrio de atividade entre MMPs e TIMPs contribui para um atraso no processo de cicatrização, sugerindo o papel funcional dessas proteases no processo normal de reparo da pele.

A espécie *Pothomorphe umbellata* L. Miq., conhecida popularmente como pariparoba, é empregada na medicina popular para o tratamento de diversos males, incluindo o tratamento de queimaduras e feridas comuns. Estudos prévios realizados em nosso laboratório por Ropke e colaboradores, demonstraram a atividade regulatória de MMP-2 e MMP-9 do extrato liofilizado da raiz de *Pothomorphe umbellata*, quando avaliada em ensaios *in vitro*. Além disso, também sugere atividade moduladora sobre os elementos de matriz extracelular da pele.

O objetivo geral deste projeto foi estabelecer o potencial farmacoterapêutico do extrato de *Pothomorphe umbellata* no processo de cicatrização, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Padronizou-se este extrato para sua utilização em cultura celular a fim de determinar as faixas de concentrações citotóxicas em relação aos fibroblastos humanos dérmicos. No modelo *in vivo*, avaliou-se a área de contração de feridas geradas na pele e a atividade de

MMPs utilizando três formulações: gel de carbopol, gel creme e creme. Observamos que o extrato de pariparoba possui ação reguladora, ativando as MMPs 2 e 9 e determinou-se a formulação gel creme como a escolhida para realização dos ensaios subseqüentes.

Os dados obtidos nos levaram à conclusão que nem o extrato de pariparoba nem o seu princípio ativo 4-NC possuem papel sobre a modulação da cicatrização nos modelos estudados.

2. INTRODUÇÃO

2.1.- Deposição e remodelamento da Matriz Extracelular no processo de cicatrização da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, atingindo 16% do peso corporal, e funcionando como uma barreira contra desidratação e infecções. Seus apêndices como pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas também protegem o corpo contra efeitos abrasivos do meio ambiente (Junqueira e Carneiro, 1999; Adolphe *et al.*, 2005). Em mamíferos, é composta pela epiderme que repousa sobre a membrana basal e a separa da derme. (Adolphe *et al.*, 2005).

Após a lesão em uma determinada área da pele, inicia-se uma seqüência dinâmica de processos biológicos específicos e complexos, denominada cicatrização (Clark *et al.*, 1996). Na pele, estes processos envolvem mediadores solúveis, componentes da MEC, células locais (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e células nervosas) e leucócitos de infiltração, que irão atuar nas fases do processo (Gillitzer *et al.*, 2001).

O processo de cicatrização pode ser dividido morfológicamente em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação (Witte *et al.*, 1997; Chang *et al.* 2000; Gillitzer, *et al.* 2001).

Todos os processos envolvidos na cicatrização são regulados por interações célula-matriz e citocinas e/ou fatores de crescimento presentes nas diferentes etapas. Na pele, uma injúria inicia uma série de mudanças nas células como na expressão gênica para o reparo de tecidos incluindo proliferação celular, migração e remodelamento da MEC (Martin, 1997).

Na fase inflamatória, neutrófilos e macrófagos migram para o local da ferida removendo fragmentos e possíveis agentes infecciosos presentes (Chang *et al.*, 2000). A formação do trombo definitivo onde há a proteólise da rede de fibrina também é observada nesta etapa. (Balbino *et al.*, 2005).

A fase proliferativa é caracterizada pela presença de fibroblastos e células endoteliais. Na fase inflamatória, com a presença local de macrófagos derivados de monócitos e a produção e liberação dos mediadores químicos produzidos por eles, a migração e ativação de fibroblastos é intensificada. Os fibroblastos provêm de tecidos próximos, através da interação com a MEC por receptores do tipo integrinas $\alpha 2\beta 1$ (Grinnell *et al.*, 2006). As células endoteliais, oriundas de vias endoteliais próximas ao local da lesão, formam novos capilares pelo processo de angiogênese (Witte *et al.*, 1997).

Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais resistente e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a neovascularização da região (Balbino *et al.*, 2005).

Durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima (Balbino *et al.*, 2005).

Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos. Apesar de seu mecanismo contrátil ainda não ter sido esclarecido, estas células são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula a célula, gerando força de tensão. Os miofibroblastos auxiliam também no processo de contração da ferida e no ressecamento da sua crosta superficial,

que durante a desidratação diminui de tamanho e arrasta o tecido a ela aderida (Balbino *et al.*, 2005).

Em seguida há a fase de maturação, onde a deposição de colágeno na ferida é observada. Alguns consideram esta fase como a mais importante, pois a velocidade, qualidade e quantidade total de deposição da MEC determinam as características da cicatriz (Witte *et al.*, 1997).

A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma cujas fibras de colágeno estão organizadas. É consenso atualmente, que a resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando muitos meses ou às vezes anos e, ainda assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal (Dale *et al.*, 1997; Balbino *et al.*, 2005).

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita, a princípio, de maneira aleatória, tendo como orientação a organização da fibronectina, além de depender da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subseqüentemente digeridas pela collagenase, ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes (Balbino *et al.*, 2005).

Por fim, para o fechamento total da ferida, é necessário que ocorra a contração desta, trazendo as margens da lesão mais próximas entre si, processo que envolve primariamente fibroblastos e a matriz colagênica (Grinnell, 2000; Moulin *et al.*, 2002).

Sendo assim, pesquisas envolvendo fibroblastos cultivados em matrizes colagênicas tridimensionais, que remontam a um ambiente semelhante a um tecido *in vivo*, têm trazido novas oportunidades para o entendimento das interações recíprocas e adaptativas que podem ocorrer entre células e a matriz extracelular circundante (Grinnell *et al.*, 2006).

2.1.2.- Metaloproteinases de Matriz (MMPs) no Processo de Cicatrização

Os eventos de migração e remodelação que ocorrem durante o reparo da pele requerem a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs), e sua regulação por seus inibidores fisiológicos específicos (tissue inhibitors of metaloproteinases, TIMPs) (Neely *et al.*, 1999).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de proteinases zinco-dependentes estruturalmente relacionadas que, de acordo com a especificidade do substrato, foram historicamente subdivididas em collagenases, gelatinases, elastases, estromelisinases (Benaud *et al.*, 1998; Sternlicht & Werb, 2001; Brummer *et al.*, 2002; Egeblad & Werb, 2002). Atualmente, as vinte e cinco MMPs conhecidas são classificadas de acordo com sua estrutura. Existem oito classes estruturais de MMPs: cinco são secretadas e três são MMPs tipo-membrana (MT-MMPs). As MT-MMPs são ligadas covalentemente à membrana celular, enquanto as MMPs secretadas localizam-se na superfície celular por ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV (Chang & Werb, 2001; Sternlicht & Werb, 2001; Egeblad & Werb, 2002; Itoh & Nagase, 2002; Hojilla *et al.*, 2003).

As MMPs possuem um papel principal na remodelação do tecido conjuntivo que ocorre em muitos processos fisiológicos normais, tais como o crescimento e o desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, o crescimento ósseo e a involução

uterina (Benaud *et al.*, 1998; Sternlicht & Werb, 2001; Brummer *et al.*, 2002; Egeblad & Werb, 2002, Wu *et al.*, 2002). Além desses processos, a expressão anormal destas proteinases pode contribuir a uma variedade de processos patológicos caracterizados pela degradação da matriz, incluindo a artrite reumatóide, a aterosclerose e a invasão e metástase em tumores (Wu *et al.*, 2002).

A proteólise no processo de cicatrização aguda é essencial para garantir a migração das células nas feridas, remodelar o tecido de granulação e reformar a arquitetura da derme normal. Entretanto, a expressão excessiva e ativação inapropriada de proteases ocorrem em úlceras crônicas dermais (Fray *et al.*, 2003).

Existem inúmeras evidências mostrando que o desequilíbrio entre as atividades de MMPs e TIMPs contribuem para um atraso no processo de cicatrização, sugerindo um papel funcional dessas proteases no processo de reparo normal da pele (Madlener, 1998).

Cicatrizes hipertróficas e quelóides são anormalidades ocorridas durante a cicatrização de feridas cutâneas agudas pelo acúmulo excessivo de tecido conjuntivo, especialmente colágeno. Essas duas condições de pele fibrótica podem ser causadas por danos mínimos à pele, como acne, varicela, piercings ou por traumas maiores como queimaduras severas. Ambos os tipos de cicatrizes anormais provocam dor, deformidades, e contração da ferida. Esses fatores limitam a distensão e funcionamento dos membros anteriores e posteriores, e até a habilidade de locomoção do paciente. Uma das hipóteses para a formação dessas anormalidades sugere que o acúmulo de colágeno se deve a um desequilíbrio da sua produção / degradação (Neely *et al.*, 1999, Kelly, 2004).

A MMP-1 é produzida por inúmeros tipos celulares envolvidos na cicatrização, entre eles estão os macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e por células epiteliais basais.

Também conhecida por collagenase, essa protease é uma das responsáveis pela migração dos queratinócitos na reepitelização (Wu *et al.*, 2002; Kan *et al.*, 2003, Fujiwara *et al.*, 2005). Estudos feitos em fibroblastos derivados de cicatrizes hipertróficas mostraram uma diminuição na atividade da collagenase MMP-1, a qual é responsável pelo início da degradação do colágeno tipo I, sendo considerada uma possível causa para o acúmulo excessivo de colágeno nessas lesões (Arakawa *et al.*, 1996; Neely *et al.*, 1999).

Entretanto, Fujiwara e colaboradores, em 2005, também demonstraram que um aumento da expressão de MMP-1 e da atividade de MMP-2 em cultura de fibroblastos derivados de quelóides, aumentou a migração dos fibroblastos em matriz colagênica, assim como a produção de colágeno quando comparados a fibroblastos normais (Daniels, 2003; Fujiwara *et al.*, 2005).

Nos estágios iniciais da cicatrização, a atividade da MMP-9 está muito aumentada, sugerindo um possível papel desta metaloproteinase no processo de formação de novos vasos, ou seja, a angiogênese. Essa gelatinase, assim como MMP-2 são produzidas por fibroblastos nos estágios mais tardios do processo cicatrizante, sugerindo um papel na remodelação da matriz extracelular nessa etapa (Gillard *et al.*, 2004).

Recentemente, foi demonstrado que a interação entre fibroblastos e queratinócitos, nos estágios finais do processo cicatrizante, modula os níveis de atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9), que possuem um papel fundamental na migração desses tipos celulares. Essa interação pode ser um dos fatores críticos para uma melhora na qualidade da cicatrização (Xue, 2004; Sawicki, 2005).

Wu e colaboradores, em 2002, produziram camundongos transgênicos que possuíam o gene de MMP-9 alterado, ou seja, mantiveram o promotor de MMP-9, porém com a

seqüência da TIMP-1 humana. Esses camundongos eram viáveis e férteis, exibindo desenvolvimento e comportamento normais. Durante a cicatrização esses camundongos expressavam TIMP-1 em queratinócitos que normalmente expressariam MMP-9. Entretanto, a cicatrização de feridas foi retardada, com uma lenta migração dos queratinócitos, demonstrando a importância da MMP-9 na migração dessas células.

Em feridas crônicas, denominadas de úlceras crônicas dermais, a matriz extracelular é degradada por um ambiente proteolítico que não permite a cicatrização, e provoca a autólise. Fibroblastos isolados de úlceras crônicas dermais apresentam a habilidade de produzir fibronectina, a qual é substrato da MMP-3 (estromelisina-1) e sua atividade tem se mostrado altamente regulada nestas úlceras. Assim, inibidores de MMP-3 poderiam converter o ambiente crônico dermal em ferida aguda, permitindo o processo normal de cicatrização (Fray *et al.*, 2003).

Inúmeros tratamentos estão disponíveis para estas anormalidades, porém existem poucas evidências da eficácia baseada em estudos clínicos controlados, e os resultados, geralmente não são satisfatórios. Novos estudos que possam influenciar diretamente o metabolismo do colágeno irão trazer contribuições de grande valor terapêutico (Hackert *et al.*, 2003).

2.1.3.- Pothomorphe *umbellata* e sua atividade inibidora de MMPs

O Brasil possui uma flora extremamente rica em plantas medicinais, sendo freqüente o uso popular destas para o tratamento de inúmeras doenças. Especificamente a espécie *Pothomorphe umbellata* L. Miq., conhecida popularmente como pariparoba, capeba,

caapeba, caapeba-do-norte, catajé, malvarisco, capeua, aguaxima, caapeba verdadeira e malvaíscio (Panizza, 1998).

A *Pothomorphe umbellata* é empregada na medicina popular para o tratamento de diversos males, como: insuficiência renal, males do fígado, má digestão, bronquite asmática e, externamente, no tratamento de queimaduras e feridas comuns (Moraes, 1983). A Farmacopéia Brasileira, em sua primeira edição, oficializou o uso da pariparoba, *Pothomorphe umbellata* L. Miq, no Brasil, registrando como droga as raízes secas do vegetal (Silva, 1926).

Estudos realizados demonstraram a atividade antioxidante do extrato liofilizado da raiz de *Pothomorphe umbellata*, quando avaliada em ensaios “in vitro”, em parte atribuída à presença do composto fenólico, o 4-nerolidilcatecol (4-NC) (Barros *et al.*, 1996).

Visando uma aplicação do extrato de *P. umbellata* como antioxidante para uso tópico, Ropke e colaboradores, em 1998, iniciaram estudos “in vivo” de avaliação de atividade antioxidante em pele de camundongos sem pêlo. Este estudo demonstrou que a aplicação tópica de um extrato liofilizado de raiz de *Pothomorphe umbellata* foi capaz de causar uma redução de 97% nos indicadores de lipoperoxidação, avaliados pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e emissão de quimiluminescência. Esta atividade antioxidante foi 2,5 vezes maior que a do α -tocoferol, aplicado nas mesmas condições, sugerindo o emprego do extrato de pariparoba em formulações cosméticas, com objetivo de combater os efeitos danosos causados por radicais livres.

A espécie *Pothomorphe umbellata* foi capaz de inibir a atividade gelatinolítica de MMP-9 e MMP-2, proveniente de homogeneizados de pele de camundongos em ensaios “in vitro” e “in vivo”. Nos ensaios “in vitro” o efeito inibitório do extrato de *P.umbellata* foi

muito maior que o do 4-nerolidilcatecol isolado, o que sugere a presença de outras substâncias com atividade inibitória de MMPs no extrato (Ropke *et al.*, 2005a).

Ropke e colaboradores, em 2005, descreveram também os efeitos benéficos da utilização da pariparoba através da aplicação tópica, em pele exposta a UVB. Seus resultados demonstram que o gel contendo *P. umbellata* previne o aumento da espessura epidérmica classicamente observada em grupos controle UVB irradiados. Observou-se também a modulação da espessura das fibrilas elásticas e colagênicas em relação ao controle. Tais alterações mostram que além da capacidade antioxidante da molécula 4NC, presente no extrato de pariparoba, esta também sugere atividade moduladora sobre os elementos de matriz extracelular da pele.

Os resultados do estudo de fotoenvelhecimento podem estar relacionados à inibição da atividade das MMPs pelo extrato de *P. umbellata*, uma vez que a exposição à radiação ultravioleta é capaz de induzir diretamente ou, indiretamente, por geração de espécies reativas de oxigênio, alterações na expressão gênica e protéica de elementos da matriz extracelular (Gilchrest *et al.*, 1998; Seité *et al.*, 2004; Ropke *et al.*, 2005).

2.1.4.- Justificativa

Anormalidades do processo cicatrizante causam deformidades e má funcionalidade de órgãos afetados, sendo que as terapias reparadoras são processos caros, como as cirurgias plásticas e muitas vezes, ineficazes (Chandan *et al.*, 2002). Portanto, terapias alternativas que permitam uma aceleração do processo cicatrizante podem contribuir para contornar graves problemas, trazendo maior conforto ao paciente.

Pothomorphe umbellata, planta da flora brasileira popularmente conhecida pelo seu poder cicatrizante, tem se mostrado uma opção interessante como um novo insumo de fácil obtenção e baixo custo para indústria farmacêutica/cosmética brasileira e internacional.

Conhecendo-se a grande importância da modulação de MMPs e seus inibidores no processo de cicatrização, e sendo o extrato de *P. umbellata* modulador da atividade dessas proteases; propusemos a caracterização da modulação de MMPs pelo extrato de pariparoba no processo cicatrizante.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto foi estabelecer o potencial farmacoterapêutico do extrato de *Pothomorphe umbellata* no processo de cicatrização, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

Modelo *in vitro*

1. Cultivo de fibroblastos humanos normais para determinação da dose efetiva indutora de proliferação onde avaliaremos os efeitos citotóxicos do extrato de *P. umbellata*, bem como a geração de IC 50.
2. Desenvolvimento de ensaios de contração de matriz colagênica pelos fibroblastos, mimetizando *in vitro* a etapa final do processo de cicatrização, para avaliação do extrato de *P. umbellata* quanto otimização do processo de contração (ver Capítulo 1, item 4.3.1.).
3. Analisar a modulação da atividade das MMP-2 e MMP- 9 por ensaios de zimografia, 9 pelo extrato de *P. umbellata* sobre as células derivadas de fibroblastos humanos normais.

Modelo *in vivo*

1. Avaliar a dose mais efetiva para cicatrização da ferida realizada em camundongos sem pêlos.
2. Avaliar a atividade das MMP-2 e MMP-9, por zimografia pelo extrato de *Potomorphe umbellata* em tecidos extraídos de camundongos tratados e não tratados com o extrato.

3. Avaliar as alterações histológicas de fibras elásticas e colágeno em camundongos tratados e não tratados com o extrato de pariparoba, através da análise por microscopia óptica.

4. RESULTADOS

4.1. Modelo *in vitro*

4.1.1. Padronização do extrato de *Pothomorphe umbellata* em meio de cultura DME

Para padronizarmos o extrato estéril de *Pothomorphe umbellata* empregamos a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um sistema de detecção eletroquímica.

Estudos realizados anteriormente demonstraram que a atividade antioxidante do extrato liofilizado da raiz de *Pothomorphe umbellata*, quando avaliada em ensaios *in vitro*, em parte, é atribuída à presença do composto fenólico 4-nerolidilcatecol (4-NC) (Barros *et al.*, 1996). Sendo assim, para possuímos um parâmetro de comparação, realizamos uma curva padrão de 4-NC (Tabela 1) e também o cálculo da regressão linear, obtendo a reta da figura 35, segundo técnica validada em nosso laboratório (Ropke, *et al.* 2003).

Tabela 1 - Curva Padrão de 4-nerolidilcatecol dissolvido em etanol Licrosolv[®]

Concentração	Área do Pico*	DP	CV% inter-dias
0,313 µg/mL	806515	87244	10,8
0,153 µg/mL	395988	40498	10,2
0,077 µg/mL	206969	25234	12,2
0,035 µg/mL	117801	10020	8,5
0,0156 µg/mL	62591	8795	14,1

* média de no mínimo 6 injeções

Figura 36 - Curva de calibração de 4-NC. Pelo cálculo da regressão linear dos dados da tabela 1, foi obtida a equação da reta ($y=2521919x + 12095$, $R^2= 0,9995$).

Após a obtenção da curva (Figura 36), avaliamos três amostras diferentes do extrato seco da raiz de *Pothomorphe umbellata* (PU) e comparamos com os dados obtidos na curva padrão. O extrato foi diluído até a concentração de 2,5 µg/mL em etanol:água 1:1 (3 diluições para cada amostra). A média das áreas do pico de 4-NC foi **458954**, o que comparando com a curva obtida anteriormente, nos dá que a concentração de 4-NC no extrato é **7,09%**.

Para avaliarmos a influência da adição do meio de cultura (DME) ao extrato de *P. Umbellata* submetemos as amostras à análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), assim verificamos a presença do 4-NC e a separação qualitativa dos constituintes do extrato de raiz de *P. umbellata*.

Na CCD (Figura 37) podemos observar a presença do 4-NC nas amostras de extrato EE1 e EE2, onde há a presença do meio de cultura DME, assim como na amostra de extrato

que foi solubilizado somente em etanol Lichrosolv (EN) e no padrão de 4-NC isolado a partir do extrato estabelecido em nosso laboratório.

Figura 37 - CCD das amostras EN - extrato de raiz de *P. umbellata* solubilizado em etanol Lichrosolv; 4-NC - composto isolado a partir do extrato de raiz de *P. umbellata* e EE1 e EE2 - extrato de raiz de *P. umbellata* liofilizado solubilizado em meio de cultura DME + 0,5%SBF. Leitura de comprimento de onda em 365nm.

Partimos, então, para a avaliação da concentração do 4-NC nas amostras do extrato liofilizado e solubilizado em meio de cultura, através da cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (Figura 38A). Podemos perceber que há uma recuperação de **57,83%** de 4-NC, mostrando que há uma interação entre o meio de cultura e o extrato. Como esse é o único composto padronizado e caracterizado para o extrato de *Pothomorphe umbellata* até o presente momento, assumimos que para os próximos ensaios temos uma perda de 40% da atividade do extrato após a sua adição ao meio de cultura. Para a padronização e controle da

purificação do 4-NC também realizamos ensaios de CLAE e ressonância magnética nuclear (RMN) (Figura 38B-D).

Devemos enfatizar que antigamente pouquíssimos trabalhos que utilizam extratos de plantas medicinais na literatura faziam esse controle e padronização dos extratos, quando utilizados em cultura de células. Muitos citam apenas o método de extração e obtenção do extrato sem mencionar nenhum de seus componentes e nenhum método de padronização.

É importante que façamos essa padronização para que possamos saber a influência e interação de outros componentes sobre a ação do extrato em cultura de células, bem como a degradação deste em meio de cultura.

Figura 38 – Cromatogramas por CLAE - UV 282nm. (A) extrato de P.umbellata e (B) 4-NC. Amostras de 250 µg/mL. Espectros de RMN (C) 4-NC referente ao C13 (carbono¹³) e (D) 4-NC referente ao H1 (hidrogênio¹).

4.1.2. Curva de crescimento da cultura de fibroblastos humanos de pele

Para o início dos estudos *in vitro*, foi realizada a caracterização da cultura de fibroblastos e determinação do seu tempo de dobramento, para tanto realizamos a curva de crescimento dessas células, como observado na Figura 39.

A determinação do tempo de dobramento foi feita com base na equação (Peres & Curi, 2005):

Tempo de dobramento (PDT) = $1/r$, sendo:

$$r = 3,32(\log N_h - \log N_i) / (t_2 - t_0)$$

r = taxa de multiplicação celular

N_h = número de células em um determinado tempo (**t_2**)

N_i = número de células inoculadas no tempo zero (**t_0**)

3,32 é uma constante

Figura 39 - Representação da curva de crescimento de fibroblastos humanos de pele em função do tempo.

Utilizando esse cálculo para os fibroblastos, temos que o tempo de dobramento é dado por **4,35 dias ou 4 dias e 8 horas**.

4.1.3. Citotoxicidade do extrato de *Pothomorphe umbellata*

Iniciamos os ensaios de citotoxicidade do extrato de *Pothomorphe umbellata* sobre os fibroblastos humanos de pele com o ensaio clássico de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Figura 40).

Figura 40 – Gráfico de citotoxicidade de *Pothomorphe umbellata* através do ensaio de MTT. Os fibroblastos foram incubados com extrato em DME + 0,5% de SFB em concentrações crescentes (de 1 a 500 µg/mL de extrato).

Nesta figura podemos observar que altas concentrações de extrato estariam promovendo a proliferação celular, enquanto baixas concentrações seriam citotóxicas às células. Porém, esta resposta não era observada ao microscópio óptico como visto na Figura 41. Sendo que células incubadas com altas concentrações do extrato, em sua maioria, se

apresentam altamente granulosas e à medida que a concentração aumenta, há também o aumento do número de células mortas.

Figura 41 – Microscopia óptica onde é possível observar a morfologia de fibroblastos humanos de pele, sem a ação do composto (controle) e quando incubados com 200 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de *P.umbellata*. Observe a granulação quando as células são incubadas com altas concentrações de extrato. Aumento 40x.

Passamos, então, a realizar o ensaio de exclusão de azul de tripan, que nos fornece dados reais de células mortas e vivas, determinando a citotoxicidade do composto (Figura 42). Nesse ensaio, também verificamos a interferência do soro fetal bovino (SFB) sobre a ação do composto, portanto, utilizamos 0,5% de SFB, mimetizando a carência deste e, conseqüentemente a falta de nutrientes (Figura 42A). Também foi utilizada a presença do soro, com meio contendo 10% de SFB, mimetizando um ambiente com a quantidade de nutrientes adequadas (Figura 42B).

Observamos que as faixas de concentrações onde encontramos o IC_{50} , ou seja, concentração do extrato em que há 50% de morte das células, é diferente daquela na ausência (0,5%) e na presença (10%) de SFB. Na ausência de soro o IC_{50} encontrado está na

faixa entre 35 e 40 $\mu\text{g/mL}$, já na presença de soro está entre 200 e 220 $\mu\text{g/mL}$. Logo, há interferência entre a presença de soro e a ação do extrato.

Figura 42 – (A) Citotoxicidade do extrato de *Pothomorphe umbellata* em DME + 0,5% de SFB após 24, 48 e 72 horas de incubação com o composto; (B) Citotoxicidade do extrato de *Pothomorphe umbellata* em DME + 10% de SFB após 24, 48 e 72 horas de incubação com o composto. Sendo a – $p < 0,001$ e b – $p < 0,05$ em relação ao controle.

Como o extrato possui ação citotóxica sobre as células, nos próximos ensaios foram utilizadas concentrações não tóxicas aos fibroblastos, para avaliar o possível efeito sobre a contração do gel de colágeno tipo I. Sendo 30 µg/mL para 0,5% de SFB e 180 µg/mL para 10% de SFB.

4.1.4. Citotoxicidade do composto 4-nerolidilcatecol (4-NC)

Após a análise da citotoxicidade do extrato de *P. umbellata* outros ensaios *in vitro* foram realizados. Porém houve uma enorme variabilidade, devido a solubilidade do extrato, nestes resultados, impossibilitando a análise da maioria destes. Esse fato nos fez repensar a utilização do extrato no modelo *in vitro*. Sendo assim, passamos a utilizar o princípio ativo isolado de *P.umbellata*: 4-nerolidilcatecol (4-NC)

O IC₅₀ verificado foi de 50µM de 4-NC quando os fibroblastos foram tratados com este composto (Figura 43). Sendo assim, as concentrações de uso para os experimentos posteriores estão na faixa de 1 a 30µM, devido à necessidade de utilizar concentrações não citotóxicas.

Figura 43 – Citotoxicidade do 4-nerolidilcatecol (4-NC) após 24 e 48 horas de incubação com o composto. Sendo * – $p < 0,001$ em relação ao controle.

4.1.5. Contração de Gel de Colágeno tipo I

A análise de contração de gel de colágeno tipo I contendo fibroblastos (modelo 3D) é um modelo clássico de fechamento de feridas. Sendo assim, analisamos o efeito do 4-NC sobre a contração dessa matriz (ver Figura 27 do capítulo 1)

Pode-se observar na figura e que o composto 4-NC não foi capaz de inibir ou acelerar o processo de contração da matriz colagênica em fibroblastos nas diferentes concentrações testadas. Portanto, o 4-NC não é um composto efetivo para a contração de gel de colágeno.

4.2. Modelo *in vivo*

4.2.1. Estudo dose-dependente da concentração do extrato de *P. umbellata* e avaliação histopatológica da pele

Foram criadas e tratadas lesões em quatro grupos de animais nas seguintes condições: somente a **lesão** (na ausência do gel), tratados com **gel de carbopol 0,5%** (ausência de extrato), tratados com extrato de raiz contendo **0,1% de 4- NC** incorporado em gel de carbopol 0,5%, extrato de raiz contendo **0,4% de 4- NC** incorporado em gel de carbopol 0,5%. Após 13 dias de tratamento os camundongos foram sacrificados e a área da pele correspondente à lesão foi submetida à preparação histológica e analisada em microscopia óptica como observado na Figura 44.

Figura 44 - Cortes de feridas cutâneas após 13 dias da realização da lesão (coloração hematoxilina-eosina), sendo Lesão (ausência de tratamento), Gel Carbopol (ausência de extrato), Pu 0,1% 4NC (tratados com gel de carbopol contendo extrato de raiz com 0,1% de 4-NC), Pu 0,4% 4NC (tratados com gel de carbopol contendo extrato de raiz com 0,4% de 4-NC). tg- tecido de granulação.

No grupo controle (Lesão) podemos inferir que ocorre uma reepitelização do tecido, sendo que essa nova epiderme possui a espessura muito semelhante à região que não sofreu a lesão e, portanto, não passou pelo processo de cicatrização. Nota-se também uma maior vascularização (angiogênese), porém o tecido de granulação não pôde ser observado nesses animais. O mesmo é visto no grupo tratado com gel 0,4% de 4-NC, que possui uma resposta muito semelhante ao grupo controle, lesão.

Já no grupo tratado apenas com o gel de carbopol e com gel contendo 0,1% de 4-NC podemos observar que o tecido de granulação ainda é bastante denso. Quanto ao epitélio, parece ocorrer um aumento de espessura deste quando comparado à região da pele que

não sofreu lesão. Podemos sugerir que contrariamente aos grupos anteriores, o grupo tratado com o gel de carbopol e o tratado com gel contendo 0,1% de 4-NC parece não possuir essa nova formação de vasos.

Logo, concluímos que a 0,4% de 4-NC parece ocorrer uma melhor recuperação da pele com a reorganização da epiderme e derme, o aumento do número de vasos sanguíneos e a ausência do tecido de granulação, podendo mostrar, portanto, uma etapa mais avançada do processo de cicatrização, quando comparada a outra concentração utilizada de 4-NC e ao Gel de Carbopol. Sendo assim, utilizamos essa concentração para o estudo posterior onde avaliamos a contração das lesões desses camundongos.

4.2.2. Contração das lesões tratadas e não tratadas com extrato de *P.umbellata*

Em um segundo experimento, utilizamos os grupos: **Lesão** (ausência de extrato), **Gel de Carbopol** 0,5%, Extrato de **Folha** contendo 0,4% de 4-NC incorporado em gel de carbopol 0,5% e Extrato de **Raiz** 0,4% de 4-NC incorporado em gel de carbopol 0,5%. Para que assim pudéssemos observar se há alguma diferença entre os géis de folha e raiz no tratamento de feridas cutâneas, bem como a resposta da contração da ferida perante esses extratos.

Depois de realizadas lesões nos diferentes grupos de camundongos (dia 1), essas foram medidas nos dias subseqüentes em tempos determinados, sendo: 1, 4, 6, 8,10 e 13 dias de tratamento. Para analisarmos os dados obtidos, dividimos a área real das feridas, nos diferentes tempos, pela área referente ao dia 1, para que assim pudéssemos verificar a contração da lesão ao longo do tempo, como visto na Figura 45.

Figura 45 - Áreas referentes ao tamanho das lesões observadas nos dias 1,4,6,8,10 e 13 de tratamento dos grupos: **Lesão** (ausência de tratamento), **Gel** (ausência de extrato), **Folha** (tratados com gel de carbopol contendo extrato de folha com 0,4% de 4-NC), **Raiz** (tratados com gel de carbopol contendo extrato de raiz com 0,4% de 4-NC). * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$.

Como podemos observar, o grupo tratado apenas com Gel de carbopol 0,5% sofre uma desaceleração do processo de contração da ferida, ou seja, um tempo maior para o completo fechamento, quando comparado ao grupo Lesão onde não foi realizado nenhum tipo de tratamento. Já para o grupo tratado com extrato de folha vemos que suas áreas de contração ficam muito semelhantes ao grupo Lesão, sem nenhum tratamento, após o oitavo dia de aplicação do gel, ou seja, em uma fase mais tardia do processo de cicatrização.

O extrato de raiz foi o mais efetivo na contração da lesão, principalmente no final do processo de fechamento da ferida, o que pode ser observado no décimo dia, onde é estatisticamente diferente dos demais grupos incluindo o grupo tratado com extrato de folha (Lesão e Raiz ($p<0,01$), Gel e Raiz ($p<0,01$) e também quanto ao grupo Folha e Raiz ($p<0,05$)).

Porém como houve interferência do gel de carbopol no tempo de fechamento da lesão, outras formulações foram testadas para minimizar essa interferência, como será visto no tópico 4.2.4

4.2.3. Atividade das MMP-2 e MMP-9 pelo ensaio de zimografia

Analizamos a atividade das MMPs através da zimografia que constitui um gel de poliacrilamida contendo gelatina que é substrato da gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) e suas demais formas inativas (Figura 46). Assim, as bandas claras que aparecem no gel escuro, refletem a degradação da gelatina pelas MMPs.

Podemos observar que não há diferenças entre os grupos estudados e as atividades das MMPs. Pela quantificação das bandas obtidas (Figura 47), verificamos que somente o grupo Gel (veículo) obteve uma diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$), em relação à forma ativa da MMP-2. Porém isso pode ser devido ao fato de esse grupo apresentar uma demora no processo de cicatrização, ou seja, possuindo uma proteólise acentuada

Figura 46 - Gel de acrilamida demonstrando a atividade das gelatinases (MMPs 2 e 9) e suas formas inativas (pró e intermediárias) com relação aos grupos: controle, lesão, e tratados com gel de carbopol, extrato de raiz e folha. Sendo, MMP-R: padrão de MMPs recombinantes.

Esse aumento de MMP-2 verificado nos camundongos tratados somente com veículo gel de carbopol, pode ser relacionado ao atraso do tempo de fechamento de ferida também observado nesses animais. Sendo assim, novamente o gel de carbopol parece possuir uma interferência na análise do extrato de *Pothomorphe umbellata* no processo de cicatrização. Logo, outras formulações foram testadas a fim de minimizar a interferência do uso do veículo no processo estudado.

Figura 47 – Atividade das Pró MMP-9 e MMP-9 ativa (A) e pró-MMP-2, MMP-2 intermediária e MMP-2 ativa(B) e suas pró-formas. Sendo, C-controle, L-lesão, G-tratado com gel de carbopol, R- tratados com extrato de raiz e F – tratados com extrato de folha. Observe que não houve diferença significativa para maioria dos grupos, somente entre os grupos controle e gel de carbopol ($p < 0,05$).

4.2.4. Escolha de uma nova formulação: Gel creme e Creme

Analisando a Figura 48, podemos observar que a formulação gel creme contendo extrato de *P. umbellata*, embora não sendo estatisticamente significativa, possui uma tendência em acelerar o processo de cicatrização, quando comparada ao controle Lesão e ao seu veículo sem adição de extrato, o que pode ser observado principalmente no oitavo dia.

Quanto à formulação creme contendo extrato de *P. umbellata*, temos um grande desvio padrão nos dias 8, 10 e 12, pois três dos seis camundongos tratados apresentaram a formação excessiva do trombo fibrinoso e, portanto, a observação e mensuração das áreas das lesões nesses dias ficaram prejudicadas. Porém, no último dia, onde pudemos observar a contração da lesão, esta estava completamente fechada, porém possuindo uma maior contração quando comparada aos demais grupos ($p < 0,01$).

Além disso, devemos destacar o fato de durante os primeiros dias de tratamento com a formulação creme, contendo ou não o extrato de *P. umbellata* houve uma descamação na pele desses animais tratados e também uma maior irritação, ocorrendo eritemas que não eram observados nos demais grupos (controle, gel creme e gel creme contendo extrato de *P. umbellata*).

Figura 48 – Áreas referentes ao tamanho das lesões observadas nos dias 1, 4 ,8 ,10 ,12 e 14 de tratamento dos grupos: Lesão (ausência de tratamento), Gel Creme, Creme (ausência de extrato), GC PU– gel creme (tratados com gel creme contendo extrato de folha com 0,4% de 4-NC),Cr PU – creme PU (tratados com creme contendo extrato de raiz com 0,4% de 4-NC). * - $p < 0,01$.

Realizamos novamente o ensaio de zimografia, para avaliarmos a ação das formulações sobre a atividade das MMPs 2 e 9 (Figuras 49 e 50). Sendo **Controle (C)** -parte da pele dos camundongos do grupo lesão onde não foi feita a ferida, **Lesão (L)** – grupo sem tratamento, **Gel Creme (GC)** – grupo tratado com veículo gel creme; Creme (Cr) – grupo tratado com veículo creme; **Gel Creme + extrato de pariparoba (PU GC)** – grupo tratado com gel creme contendo extrato de *P. umbellata* e **Creme + extrato de pariparoba (PU Cr)** – grupo tratado com creme contendo extrato de *P. umbellata*.

Figura 49 - Gel de acrilamida demonstrando a atividade das gelatinases (MMPs 2 e 9) e suas formas inativas com relação aos grupos: Gel Creme – grupo tratado com veículo gel creme; Creme – grupo tratado com veículo creme; Gel Creme + extrato de pariparoba (Gel creme PU) – grupo tratado com gel creme contendo extrato de *P. umbellata* e Creme + extrato de pariparoba (Creme PU) – grupo tratado com creme contendo extrato de *P. umbellata*. Sendo, MMP-R: padrão de MMPs recombinantes.

Figura 50 - Atividade das MMP-9 (A) e MMP-2(B) e suas pró-formas. Observe que não houve diferença significativa para maioria dos grupos, somente entre os grupos controle e gel de carbopol (*a, b, c - $p < 0,05$, ver Tabela 2). C=controle, L=lesão; GC=grupo tratado com gel creme; Cr = grupo tratado com creme. PU GC= grupo tratado com gel creme contendo extrato de *P.umbellata* e PU Cr = grupo tratado com creme contendo extrato de *P.umbellata*.

Podemos observar que para Pró MMP-2 temos um aumento significativo de sua atividade na formulação creme contendo extrato de *P. umbellata* em relação às demais formulações e o controle. Já para a forma intermediária da MMP-2, há um aumento estatisticamente significativo no grupo gel creme tratado com o extrato de pariparoba. E, considerando a forma ativa desta MMP, há um aumento significativo desta, quando comparamos principalmente o grupo controle e o grupo gel creme contendo *P. umbellata*.

Quanto a MMP-9, considerando a sua pró-forma, os grupos tratados com *P. umbellata* tiveram atividade maior quando comparados aos grupos tratados somente com veículo.

Tabela 2 – Relação entre os grupos estatisticamente diferentes quanto à atividade de MMP-2, sendo $p < 0,05$ para todos

<u>Pró MMP-2</u>	<u>MMP-2 intermediária</u>	<u>MMP-2 ativa</u>
(a) *	(b) *	(c) *
C x PUCr	C x PUGC	C x Cr
L x PUCr	L x PUGC	C x PUGC
GC x PUCr	GC x PUGC	Cr x PUCr
Cr x PUCr	Cr x PUGC	PUGC x PUCr

* correspondem às letras presentes na Figura 50 A. **C** = controle, **L** = lesão; **GC** = grupo tratado com gel creme; **Cr** = grupo tratado com creme. **PU GC** = grupo tratado com gel creme contendo extrato de *P.umbellata* e **PU Cr** = grupo tratado com creme contendo extrato de *P.umbellata*

Assim, observamos que os grupos tratados com *Pothomorphe umbellata* possuem uma modulação sobre a atividade dessas MMPs na etapa final do processo de cicatrização, e isso não é atribuído a presença do veículo, como antes verificado com o gel de carbopol.

4.2.5. Avaliação dos efeitos do extrato de *Pothomorphe umbellata* sobre as fibras elásticas e colagênicas

Como próximo passo, procuramos analisar a ação do extrato de pariparoba sobre os principais elementos da matriz extracelular do tecido conjuntivo da pele: colágeno e elastina. Para tanto, foram criadas e tratadas lesões em três grupos de animais nas seguintes condições: somente a **lesão** (na ausência do gel), tratados com **gel creme** (ausência de extrato), tratados com extrato de raiz contendo **0,4% de 4- NC** incorporado em gel creme. Após 13 dias de tratamento os camundongos foram sacrificados e a área da pele correspondente à lesão foi submetida à preparação histológica para a análise de elastina (Resorcina) e colágeno (Picrossírius-hematoxilina), analisada em microscopia óptica como observado nas Figuras 51 e 52, respectivamente.

Figura 51 – Fotomicrografia de corte histológico das lesões realizadas em camundongos sem pêlos. Representação das fibras elásticas (seta -->), observado à microscopia de luz com coloração de Resorcina-Fucsina de Weigert Sendo grupo lesão (pele sem tratamento), gel creme (tratamento com veículo gel creme), PU (tratamento com extrato de PU contendo 0,4% de 4-NC). Aumentos de 4x e 20x.

Figura 52 – Fotomicrografia de corte histológico das lesões realizadas em camundongos sem pêlos. Representação das fibras colagênicas, observado à microscopia de luz (NP) ou microscopia de polarização (P) com coloração de picrosirius. Sendo grupo controle (pele sem lesão), lesão (pele sem tratamento), gel creme (tratamento com veículo gel creme), PU (tratamento com extrato de PU contendo 0,4% de 4-NC). Aumentos de 4x e 20x.

Para a análise morfométrica, onde quantificamos as fibras colagênicas e elásticas, utilizamos o método descrito por Weibel e Gómez (1962), que preconizam a contagem somente dos pontos do retículo que interceptam a estrutura estudada. Sendo assim, 8 imagens de cada um dos 7 animais de cada grupo estudado foi analisada e foram contados 130 pontos que interceptam o L formado na máscara aplicada sobre a imagem. As fibras de colágeno e elastina foram contadas, bem como os outros elementos (como glândulas sebáceas, epiderme, vasos, artefatos da técnica, etc.) como mostrado na Figura 53.

Figura 53 - Representação da análise morfométrica para contagem das fibras colagênicas e elásticas. Foram contados os 130 pontos que se encontravam sobre o vértice do L da máscara sobre a imagem. Aumento de 20.

Após a contagem obtivemos o gráfico da Figura 53, que demonstra a soma dos 130 pontos correspondentes aos elementos de matriz e aos grupos de estudo. Pelo gráfico da Figura 54, podemos verificar que não há diferenças na quantidade de fibras de colágeno e elásticas nos grupos estudados (lesão, gel creme e PU 0,4% de 4-NC).

Figura 54 – Quantificação das fibras elásticas e colagênicas. Nota-se que não há diferença estatística entre os grupos analisados (lesão, gel creme e tratados com PU 0,4% de 4-NC) em relação aos elementos de matriz. (Outros representam elementos como glândulas sebáceas, epiderme, vasos, artefatos da técnica, etc.).

Logo, o extrato de *Pothomorphe umbellata* não foi capaz de induzir nenhuma mudança morfológica ou quantitativa sobre os elementos de matriz extracelular (colágeno e elastina).

DISCUSSÃO

4.3. Modelo *in vitro*

5.1.1. *Pothomorphe umbellata* e fibroblastos humanos

Analisando a citotoxicidade do extrato de *P. umbellata* sobre células humanas de fibroblastos através do ensaio de MTT, verificamos uma contradição dos resultados obtidos com o ensaio colorimétrico e a microscopia óptica.

Pelo fato de o extrato possuir uma ação antioxidante conhecida (Barros *et al.*, 1996) e, portanto, redutora, é capaz de reduzir o MTT a formazan, independentemente da ação mitocondrial das células. Outros autores também relataram a interferência entre a ação de extratos de plantas, com ação antioxidante, e a redução do MTT (Brugisser *et al.*, 2002; Houghton *et al.*, 2005).

Logo, o ensaio de MTT como teste de citotoxicidade para este extrato em questão não reproduz dados reais. Observamos na literatura que muitos trabalhos que discutem a ação citotóxica de antioxidantes em cultura de células utilizam o ensaio de exclusão por azul de tripan (Zapolska-Downar *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Polydoro *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2007). Realizamos o ensaio de contagem por exclusão de azul de tripan para a determinação da citotoxicidade do composto (Figura 42). A interferência do soro fetal bovino sobre a ação do composto também foi observada, portanto, utilizamos 0,5% SFB mimetizando a falta de nutrientes (Figura 42A), e 10% de soro, mimetizando um ambiente com a quantidade de nutrientes adequadas (Figura 42B).

Alguns autores discutem a influência do soro fetal bovino (SFB) sobre a citotoxicidade de compostos. O SFB influencia a citotoxicidade de *tri-n-butyltin* (TBT), um poluente ambiental, em timócitos de ratos. A toxicidade do TBT foi reduzida de forma dose-dependente à medida que a concentração de SFB aumenta (Umebayashi *et al.*, 2004).

Em 2007, Kim e colaboradores demonstraram a ação protetora do SFB sobre células T Jurkat quando expostas à lisofosfatidilcolina (LPC). Considerando uma mesma concentração, a citotoxicidade induzida por LPC em meio com ausência total de soro (0%) é de 80 a 90%, em meio com 0,5% de soro a citotoxicidade é de 70% e na presença de 5% de soro, não há citotoxicidade observada nesta mesma concentração.

Para nossos dados, na presença de soro, as células possuem capacidade de se dividirem, logo há um maior número de células e, portanto, é necessária uma maior concentração para matar 50% destas. Já na ausência de SFB há uma sincronização da cultura de células, induzindo uma parada no ciclo celular, ou seja, não há replicação celular e, assim, o número de células é menor e, conseqüentemente, uma menor concentração do extrato mataria 50% das células. Além disso, a ausência e presença de soro representam estados fisiológicos, como o cerne de um tumor que está em hipóxia e baixo nutrientes.

Muitos podem se perguntar o porquê utilizar uma droga citotóxica em processo de cicatrização, onde é necessária a proliferação celular. Algumas drogas, inclusive quimioterápicos, utilizados devido a sua ação citotóxica em modelos tumorais, têm se mostrado aliados ao processo de cicatrização quando utilizados em concentrações não tóxicas às células. Como exemplo temos o 5-Fluoracil (5-FU), um agente anti-neoplásico amplamente utilizado por atuar como supressor da síntese de DNA e também por alterar a rede de citoesqueleto e de adesão celular. Gordon *et al.*, em 2005 demonstraram o papel do

5-FU em modelo de cicatrização em células endoteliais de córnea, atuando na migração celular e formação de fibras de estresse durante o reparo tecidual.

Também devemos destacar o uso de antioxidantes, que geralmente possuem ações citotóxicas, mas sua utilização vem aumentando em modelos de reparo tecidual. Isso se deve ao fato de oxidantes e antioxidantes possuírem papéis muito importantes nesses modelos (Chandan *et al.*, 2002; Dulak, 2005; Zurada *et al.*, 2006). Em feridas agudas e crônicas, oxidantes são conhecidos por causarem danos celulares e por poderem funcionar como fatores inibitórios da cicatrização. Sendo assim, extratos de plantas, cujos principais compostos possuem características antioxidantes, estão sendo testados na aceleração do processo de cicatrização. Entre as mais freqüentemente estudadas estão o resveratrol, um polifenol presente no vinho tinto e sementes de uva; a epigallocatequina-3 (EGC-3) do chá verde; e a curcumina presente em *Curcuma longa* (Dulak, 2005).

Extrato de folha de *Chromolaena odorata*, conhecida pelo seu potencial antioxidante, possui a capacidade de aumentar a proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos, além de estimular a migração de queratinócitos em ensaios de cicatrização *in vitro* e *in vivo*, e regular positivamente a produção de proteínas da matriz extracelular (Thang *et al.*, 2001).

Ozgen *et al.*, em 2006 demonstraram o efeito cicatrizante de *Onosma argentatum*, planta popular da Turquia, pela proliferação de fibroblastos humanos em modelo *in vitro*. Esta planta também é conhecida por possuir poder antioxidante e por ser citotóxica quando utilizada em altas concentrações em cultura de células.

Sendo assim, *Pothomorphe umbellata* mesmo possuindo efeitos citotóxicos em cultura de células de fibroblastos, poderia em concentrações não tóxicas possuir efeito cicatrizante, devido ao seu potencial antioxidante conhecido.

Contudo, com o seguimento dos experimentos, foi verificada uma baixa reprodutibilidade de resultados. Muitos extratos de plantas contêm compostos lipofílicos como, por exemplo, flavonóides, que apresentam baixa solubilidade nos meios de cultura, que por sua vez são hidrofílicos (Filip *et al.*, 2001). Baseado nestes ensaios da literatura, passamos a verificar a solubilidade do extrato em estudo. Verificamos por microscopia óptica, gotículas lipofílicas, que aumentavam à medida que a concentração do extrato aumentava, mostrando que a solubilidade do extrato não era total e completa, havendo compostos não solúveis presentes.

O fracionamento e a identificação dos demais compostos presentes no extrato de *P.umbellata*, estão em desenvolvimento no projeto de doutorado da aluna Rebeca L. de Almeida (processo FAPESP 06/57628-8).

Poucos trabalhos da literatura que utilizam extratos de plantas empregam extratos padronizados quando utilizados em cultura de células. Muitos, como Schinella e colaboradores (2000), citam apenas o método de extração e obtenção do extrato sem quantificar nenhum de seus componentes. Isso mostra a dificuldade em se trabalhar com extratos de plantas em modelos *in vitro*, visto que a grande maioria das vezes a composição do extrato trabalhado é desconhecida.

A atividade antioxidante de *P. umbellata* vem sendo atribuída ao seu principal composto antioxidante, 4-nerolidilcatecol (4-NC) (Barros *et al.*, 1996). Além disso, Mongelli e colaboradores (1999) demonstraram que o 4-NC presente em extratos metanólicos isolados

de *P. peltata* foi o responsável por efeitos citotóxicos presentes na linhagem de carcinoma humano bucal KB, principalmente por inibir a atividade da topoisomerase I.

Sendo assim, a utilização do 4-NC isolado ao invés do extrato de *P. umbellita* permitiu eliminarmos a variável da mistura de substâncias que não podem ser quantificadas no extrato, justificando o procedimento adotado para a continuidade do projeto com o uso deste composto isoladamente.

5.1.2. 4-nerolidilcatecol: contração de Gel de Colágeno tipo I

O fechamento de feridas severas, onde tecidos viáveis são destruídos por um trauma, envolvem a deposição de um novo tecido conjuntivo. As forças geradas por fibroblastos organizam o tecido conjuntivo e sua matriz ao redor, e esses são também responsáveis pela contração de feridas e das cicatrizes. Evidências apresentadas por modelos *in vitro* sugerem que os fibroblastos geram as forças de contração, e o colágeno controla as forças no fechamento de feridas e cicatrizes (Ehrlich, 1988).

Pesquisas *in vitro* sobre a biologia dos fibroblastos cultivados em matrizes colagênicas tridimensionais (3D) representam novas oportunidades para entendermos como as interações célula- matriz são expressas e integradas em um ambiente que mimetiza o ambiente tecidual. Essas interações são necessárias para a regulação da morfogênese do tecido conjuntivo e dinâmico que caracteriza a homeostase tecidual e o processo de cicatrização (Grinnell *et al.*, 2005).

As células exibem características únicas quando cultivadas em matrizes 3D comparadas as cultivadas em superfícies 2D, como plástico ou vidro. Devido à interação

entre fibroblastos e matriz que podem permitir mudanças não somente na forma das células, mas também no remodelamento e contração da matriz, esse modelo vem sendo extensamente empregado no estudo do processo de cicatrização *in vitro* (Ehrlich, 1988; Nedelec *et al.*, 2000; Grinnell *et al.*, 2005).

Por esses motivos utilizamos o modelo 3D de cultivo de fibroblastos em matriz de colágeno tipo I para mimetizar o processo de cicatrização *in vitro* (Figura 27, capítulo 1). O 4-NC, mesmo possuindo efeitos citotóxicos em cultura de células de fibroblastos, poderia em concentrações não tóxicas possuir efeito cicatrizante, devido ao seu potencial antioxidante conhecido. Porém ao observarmos os resultados, podemos concluir que o composto 4-NC não foi capaz de inibir ou acelerar o processo de contração da matriz colagênica em fibroblastos nas diferentes concentrações testadas.

Concluímos, portanto, com o nosso modelo de estudo *in vitro* que o 4-NC não é um composto efetivo para a contração de gel de colágeno.

4.4. Modelo *in vivo*

5.2.1. Estudo dose-dependente da concentração do extrato de *P. umbellata* e avaliação histopatológica da pele

Atribuí-se às plantas medicinais um papel vital na cura de doenças durante toda a história da humanidade. Por esse motivo elas sempre representaram uma porção substancial do mercado global e cada vez mais estudos para potenciais drogas derivadas de produtos naturais vêm sendo realizados (Mukherjee PK *et al.*, 2003).

Em um estudo inicial utilizamos apenas o extrato de raiz de *P. umbellata* para determinarmos a concentração ideal de 4-nerolidilcatecol (4-NC) presente no gel que foi utilizada nos ensaios subseqüentes.

Para determinarmos esta concentração de 4-NC, utilizamos duas concentrações desse princípio ativo. Iniciamos com 0,1% de 4-NC, pois essa concentração foi a mínima ativa em estudos realizados anteriormente por Röpke (1999) em nosso laboratório. A outra concentração de 4-NC testada foi a de 0,4 % de 4-NC no extrato. Não utilizamos maiores concentrações, pois no mesmo estudo realizado por Röpke, em 1999, foi demonstrado que a 0,4% de 4-NC é dada a máxima atividade deste composto, logo não se justifica a utilização de concentrações maiores de extrato em formulações.

Foram criadas e tratadas lesões em quatro grupos de animais nas seguintes condições: somente a **lesão, gel de carbopol 0,5%** (ausência de extrato), extrato de raiz contendo **0,1% de 4- NC** e **0,4% de 4- NC** incorporado em gel de carbopol 0,5% (Figura 44).

Foi observado que a 0,4% de 4-NC parece ocorrer uma melhor recuperação da pele com a reorganização da epiderme e derme, o aumento do número de vasos sangüíneos e a ausência do tecido de granulação, podendo mostrar, portanto, uma etapa mais avançada do processo de cicatrização, quando comparada a outra concentração utilizada de 4-NC e ao Gel de Carbopol. Sendo assim, utilizamos essa concentração para o estudo posterior onde avaliamos a contração das lesões desses camundongos.

5.2.2. Contração das lesões tratadas e não tratadas com extrato de *P.umbellata*

Em um segundo experimento, utilizamos os grupos: **Lesão**, **Gel de Carbopol 0,5%**, **Folha** contendo 0,4% de 4-NC incorporado em gel de carbopol 0,5% e Extrato de **Raiz** 0,4% de 4-NC incorporado em gel de carbopol 0,5%. Para que assim pudéssemos observar se há alguma diferença entre os géis de folha e raiz no tratamento de feridas cutâneas, bem como a resposta da contração da ferida perante esses extratos (44).

Escolhemos incluir o grupo **Folha**, pois embora a maior parte das pesquisas realizadas até hoje sobre os efeitos benéficos da pariparoba (*Pothomorphe umbellata* L. Miq) tenha sido feita com o extrato da raiz desta espécie; o emprego do extrato de folha contribui para o uso sustentável da espécie e também apresenta potencial farmacoterapêutico (Almeida *et al.*, 2007).

Como podemos observar, o grupo tratado apenas com Gel de carbopol 0,5% possui um tardiamiento no tempo de fechamento, quando comparado ao grupo Lesão onde não foi realizado nenhum tipo de tratamento. Outros estudos envolvendo processo de cicatrização de feridas cutâneas que também utilizaram gel de carbopol como veículo não descreveram esse efeito, quando o veículo é administrado individualmente (Babül *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003).

O extrato de raiz foi o mais efetivo na contração da lesão observado no décimo dia de tratamento, onde é estatisticamente diferente dos demais grupos. Röpke e colaboradores, em 2005, descreveram os efeitos benéficos da utilização da pariparoba através da aplicação tópica, em pele exposta a UVB. Seus resultados demonstram que o gel contendo *P.*

umbellata promove a modulação da espessura das fibrilas elásticas e colagênicas em relação ao controle. Tais alterações mostram que além da capacidade antioxidante da molécula 4NC, presente no extrato de pariparoba, esta também sugere atividade moduladora sobre os elementos de matriz extracelular da pele.

Na fase de maturação do processo de cicatrização é observada a deposição de colágeno na ferida, e também a aproximação das margens da lesão. Alguns autores (Witte *et al.*, 1997, Grinnell, 2000; Moulin, 2002) consideram esta fase como a mais importante, pois a velocidade, qualidade e quantidade total de deposição da MEC determinam as características da cicatriz. Para o fechamento total da ferida, é necessário que ocorra a contração desta, trazendo as margens da lesão mais próximas entre si, processo que envolve primariamente fibroblastos e a matriz colagênica (Grinnell, 2000; Moulin, 2002).

Nesta etapa final do processo de cicatrização que envolve o fechamento da lesão e a maturação da ferida, depende da deposição de colágeno bem como a remodelagem da matriz extracelular (Balbino *et al.*, 2005). Sendo assim, conhecendo os efeitos moduladores da pariparoba sobre a MEC, podemos inferir que a ação do extrato foi melhor observada nas etapas finais do processo de cicatrização, pois essa é a etapa onde há intenso remodelamento de elementos da matriz que determinarão a sua resistência e aparência final.

Porém como houve interferência do gel de carbopol no tempo de fechamento da lesão, outras formulações foram testadas para minimizar essa interferência.

5.2.3. Atividade das MMP-2 e MMP-9 pelo ensaio de zimografia

As metaloproteinases de matriz (MMPs), também chamadas de matrilisinas, possuem um papel-chave no processo de desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, remodelamento tecidual, invasão tumoral e metástase (Chang & Werb, 2001; Sternlicht & Werb, 2001; Egeblad & Werb, 2002; Itoh & Nagase, 2002; Hojilla *et al.*, 2003, Manuel & Kozak, 2006; Jansen *et al.*, 2007).

MMP-2 e MMP-9 são gelatinases que degradam colágeno tipo IV, colágenos intersticiais denaturados (gelatinas), lamininas, elastinas e fibronectinas. Elas são secretadas como zimógenos, que sofrem clivagem e, conseqüentemente, sua ativação (Sternlicht & Werb, 2001; Egeblad & Werb, 2002, Jansen *et al.*, 2007). Essas MMPs, por possuírem um amplo espectro de atividade catalítica, são consideradas com as duas enzimas principais envolvidas no processo de cicatrização e remodelamento tecidual (Manuel *et al.*, 2006).

Verificamos que somente o grupo Gel (veículo) obteve uma diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$), em relação à forma ativa da MMP-2 (Figura 47). Porém isso pode ser devido ao fato de esse grupo apresentar uma demora no processo de cicatrização, ou seja, possuindo uma proteólise acentuada. As MMPs possuem papel proteolítico e o aumento de sua produção já foi descrito em feridas crônicas e úlceras, por exemplo, onde não ocorre o fechamento da lesão ou esse é extremamente demorado (Daniels, 2003; Fujiwara *et al.*, 2005).

Por novamente possuímos a interferência do veículo, gel de carbopol, outras formulações foram testadas a fim de minimizar os efeitos do uso do veículo no processo estudado.

5.2.4. Escolha de uma nova formulação: Gel creme e Creme

Devido à interferência do veículo gel de carbopol no processo de contração das feridas, realizamos os mesmos experimentos anteriores para duas outras formulações: gel de carbopol + creme (gel creme) e creme lanette. Essas duas formulações também foram testadas por Ropke *et al.*, 2003, porém possuindo um menor índice de permeação na pele. Vale lembrar que no modelo estudado por Ropke *et al.*, em 2003, os camundongos eram irradiados e, portanto, a pele não estava exposta como no modelo de cicatrização, onde não há inicialmente a barreira epidérmica.

Foi escolhido o grupo gel creme, pois embora tenha tido uma menor resposta quando comparado ao grupo creme, não provocou descamação nem irritação nos camundongos tratados e nos mostrou uma resposta na modulação das MMPs.

Durante todo o processo de cicatrização ocorrem eventos de remodelamento e, portanto, extensa atividade proteolítica em todas as suas fases (Gutierrez-Fernandez *et al.*, 2007, Jansen *et al.*, 2007). A complexidade da regulação das MMPs, especialmente MMP-2 durante a cicatrização, faz dela uma enzima chave durante este processo. Vêm sendo associados os papéis da MMP-2 principalmente no processo de angiogênese e remodelamento da matriz. Já MMP-9 está associada à reepitelização do tecido que sofreu algum tipo de injúria (Manuel & Kozak, 2006).

Com os resultados obtidos, podemos observar que os grupos tratados com *P. umbellata* apresentam uma modulação sobre a atividade destas enzimas, e aceleração do processo de cicatrização.

Há uma certa controvérsia no papel das MMPs 2 e 9 na literatura. Alguns autores descrevem a inibição destas metaloproteinases como alvo para uma melhora e aceleração no processo de cicatrização. Zhen e colaboradores, em 2006, descreveram o potencial cicatrizante hepático do chá verde, e em especial do seu princípio ativo epigallocatequina 3-galato, justamente por este regular negativamente a expressão gênica e protéica de MMP-2 em modelo de fibrose de células hepáticas de rato. Entretanto, sabe-se que um balanço na regulação destas MMP representa um papel chave em diferentes processos fisiológicos.

Fujiwara *et al.*, em 2005 demonstram em modelo *in vitro* de quelóides humanos que há um aumento da expressão protéica e atividade de MMP-2, relacionado com a maior atividade migratória de queratinócitos.

Outros autores, porém, relacionam o aumento de expressão e atividade das MMPs com a maior rapidez no fechamento de feridas. Xue e colaboradores em 2004, associaram o tratamento de queratinócitos com a proteína C ativada (APC – essencial no processo de homeostase por inibir coagulação e por possuir propriedades anti-inflamatórias) e a maior expressão de MMP-2. Manuel e Kozak, em 2006, demonstraram que a MMP-9 é essencial principalmente nas etapas finais do processo de cicatrização, onde é realmente formada a cicatriz, em camundongos nude.

Foi correlacionado o aumento da expressão protéica de MMP-2 em camundongos normais está aumentada nos dias 7, 21 e 90 após o início da lesão, com uma pequena diminuição ao longo do tempo, porém sendo essencial em todas as etapas (Jansen, 2007).

Mirastschijski e co-autores, em 2002, realizaram um estudo com pacientes voluntários, sendo esses normais, ou seja, sem problemas na cicatrização, outros com úlceras venosas na perna e pacientes com úlceras crônicas dermais em diversas partes do corpo. Os autores estudaram a atividade protéica de MMP-2 e MMP-9 por imunohistoquímica e hibridização *in situ* nas amostras destes pacientes e constataram não haver diferenças entre os três grupos analisados, ou seja, úlceras crônicas podem não ser provocadas pela excessiva atividade destas gelatinases.

Águas termais são conhecidas por seu poder cicatrizante, principalmente em pacientes queimados. Chebassier *et al.*, em 2004, demonstraram que boro e magnésio são componentes presentes em altas concentrações em muitas destas águas termais, e estudaram seus papéis em modelo *in vitro* de queratinócitos humanos e sua relação com as MMPs 2 e 9. Assim, mostraram por western blotting e imunohistoquímica que esses componentes aumentam a expressão de MMP-2 e MMP-9, podendo ser um dos pontos que atribui a atividade cicatrizante às águas termais.

Além disso, o papel das MMPs no processo inflamatório da cicatrização, vem sendo extensamente estudado. Um desbalanço na produção e atividade destas enzimas pode levar ao não fechamento da ferida (Jansen *et al.*, 2007; Gutiérrez Fernandez *et al.*, 2007).

Por fim, alguns trabalhos discutem como se dá a regulação destas MMPs durante as etapas do processo cicatrizante. Ridgway *et al.*, em 2006, demonstraram que a hipóxia em queratinócitos humanos normais eleva a produção de MMP-2 e MMP-9 durante o processo de reepitelização, e esse aumento leva a regulação da proteína integrina alfa v beta-6.

A proteína C ativada, uma serina protease fisiológica, que regula a coagulação sanguínea, também é capaz de ativar MMP-2 e, assim, ter um importante papel na

reepitelização durante a cicatrização (Xue *et al.*, 2004). Recentemente, Wang e colaboradores demonstraram que outra serina protease, a trombina, ativada pelos receptores ativados de proteases (PAR) em fibroblastos humanos dermais, é capaz de aumentar a atividade de pró -MMP-9, através da sinalização por JAK/STAT 3 estando envolvida no remodelamento tecidual (Wang, 2007).

Concluindo, a regulação das metaloproteinases de matriz parece ter um papel essencial durante as várias fases e etapas do processo de cicatrização, sendo de fundamental importância para o remodelamento tecidual adequado (Manuel & Kozak, 2006). Sendo assim, mostramos uma interferência do gel de carbopol no tempo de fechamento da lesão, e outras formulações foram testadas para minimizar essa interferência. A formulação escolhida para os testes posteriores foi a gel creme, pois embora tenha tido uma menor resposta, não provocou descamação nem irritação nos camundongos tratados e nos mostrou uma resposta na modulação das MMPs.

5.2.5. Avaliação dos efeitos do extrato de *Pothomorphe umbellata* sobre as fibras elásticas e colagênicas

A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma cujas fibras de colágeno estão organizadas. É consenso atualmente, que a resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando muitos meses ou às vezes anos e, ainda assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal (Dale *et al.*, 1997; Balbino *et al.*, 2005).

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita, a princípio, de maneira aleatória, tendo como orientação a organização da fibronectina, além de depender da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequenteiramente digeridas pela collagenase, ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes (Balbino *et al.*, 2005).

Ropke e colaboradores, em 2005, descreveram os efeitos benéficos da utilização da pariparoba através da aplicação tópica, em pele exposta a UVB. Seus resultados demonstram que o gel contendo *P. umbellata* previne o aumento da espessura epidérmica classicamente observada em grupos controle UVB irradiados. Observou-se também a modulação da espessura das fibrilas elásticas e colagênicas em relação ao controle. Tais alterações mostram que além da capacidade antioxidante da molécula 4NC, presente no extrato de pariparoba, esta também sugere atividade moduladora sobre os elementos de matriz extracelular da pele.

Concluindo, o extrato de *Pothomorphe umbellata* não foi capaz de induzir nenhuma mudança morfológica ou quantitativa sobre os elementos de matriz extracelular (colágeno e elastina) como proposto pelo projeto inicial. No modelo *in vitro* também não foi capaz de induzir a contração do gel de colágeno tipo I em concentrações não citotóxicas.

Materiais e Métodos

MATERIAIS E MÉTODOS

1. **Obtenção e padronização dos extratos das raízes e de folhas de *P. umbellata***

Os extratos de *P. umbellata* foram preparados a partir das raízes e de folhas obtidas no campus da Universidade de São Paulo, situado na Cidade Universitária e uma amostra foi depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O material foi seco e posteriormente moído. O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação em etanol: água (1:1), segundo processo A da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959), posteriormente concentrado a vácuo e o resíduo aquoso liofilizado. Os extratos foram padronizados quanto à concentração de 4-NC, mediante metodologia validada em nosso laboratório (Ropke *et al.*, 2002), utilizando um padrão de 4-NC previamente isolado (RPI nº 1827, 2006).

2. Modelo *in vitro*

2.1. – Obtenção de cultura primária queratinócitos, melanócitos e fibroblastos obtidos a partir de pele humana

Para obtenção de cultura primária das células da pele (queratinócitos, melanócitos e fibroblastos) foram doados tecidos de pele de prepúcio pela Dra Linda Maximiano, cirurgiã do Hospital Universitário (HU). Para tanto o projeto passou por apreciação e aprovação do Comitê de Ética do HU (Processo no.CEP HU 943/09, vide Anexo 3).

No dia do recebimento da pele de prepúcio há uma série de procedimentos que devem ser tomados. Para visualização do processo ver Figura 55. Primeiramente há a **lavagem**, onde o tecido é passado uma vez em etanol 90% e duas vezes em solução salina (PBS) estéril. Para tanto, invertemos o tubo de centrifugação onde se encontra o tecido por 6x. Logo após, o tecido é colocado em uma placa de Petri com 1 mL da Solução A (22,5mM HEPES, 7,6mM Glicose, 2,25 mM KCl, 100mM NaCl, 0,75 mM Na₂HPO₄; pH7,4). Há, então, a **limpeza** onde se retira do prepúcio, tecido adiposo e vasos sanguíneos presentes e, então são feitos **cortes** em pedaços de aproximadamente 3x3cm, e são adicionados 5mL da Solução A contendo tripsina. Após 16-18h de incubação, ocorre a **separação** da derme e da epiderme com auxílio de pinças.

Figura 55 – Técnica de separação epiderme-derme. Após o recebimento da pele de prepúcio, este passa por uma fase de Lavagem, onde é lavado com etanol 90% e solução salina (PBS) estéril. Logo á o processo de Limpeza, onde são retirados o tecido adiposo e vasos sanguíneos presentes e, então a pele é cortada em pedaços de aproximadamente 3x3mm. Após 16-18hrs de incubação, ocorre a Separação entre epiderme e derme com o auxílio de pinças.

EPIDERME:

Para obtenção das culturas primárias de melanócitos e queratinócitos são realizados os seguintes passos (Figura 56). No segundo dia após o recebimento, a epiderme é colocada em um tubo contendo meio específico para queratinócitos (Epilife - SKU# M-EPICF-500, Cascade Biologics) suplementado com Human Keratinocyte Growth Supplement

(HKGS - SKU# S-001, Cascade Biologics). Essa é centrifugada por 3 minutos a 2000 rpm e, então, replaqueada em placa de petri contendo meio Epilife. Após 24h o meio é substituído. Acompanha-se ao longo dos dias o crescimento das células provenientes da epiderme, ou seja, queratinócitos e melanócitos. Quando a confluência é atingida, inicia-se o processo de separação das células por meio de tripsinização, uma vez que os melanócitos possuem uma aderência à placa e às células muito menor que os queratinócitos. Após 1 ou 2 passagens, as culturas estão “puras”, ou seja, não contaminadas com outras células. No caso dos melanócitos é adicionado o antibiótico Gentamicina por 48h para a seleção completa, uma vez que essas células são resistentes a ação da gentamicina. Os queratinócitos e melanócitos são em parte congelados (D-MEM contendo 10% de SFB e 10% de DMSO) e em parte mantidos em cultura para sua utilização.

Figura 56 – Obtenção da cultura primária de queratinócitos e melanócitos humanos. A epiderme é colocada em um tubo contendo meio específico para queratinócitos e, então, é centrifugada replaqueada em placa de petri contendo meio Epilife®. Acompanha-se ao longo dos dias o crescimento das células provenientes da epiderme, ou seja, queratinócitos e melanócitos. Quando a confluência é atingida, inicia-se o processo de separação das células por meio de tripsinização. Após 1 ou 2 passagens, as culturas estão “puras”, ou seja, não contaminadas com outras células.

DERME:

Para obtenção da cultura primária de fibroblastos são seguidos os seguintes passos (Figura 57). A derme é colocada em solução de collagenase tipo I por 4 a 12 horas em agitação. Após esse período adiciona-se 1mL de Soro Fetal Bovino (SFB), inativando a

enzima, e a derme é centrifugada (3 minutos a 2000 rpm). O tecido é, então, ressuspensão e colocado em placa de petri contendo 10mL de meio D-MEM suplementado com 10% SFB e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina). Após 24h o meio é substituído. Acompanha-se a cultura dos fibroblastos, até a obtenção de uma placa com aproximadamente 90% de confluência (3-4 dias). Os fibroblastos são em parte congelados (D-MEM contendo 10% de SFB e 10% de DMSO) e parte mantidos em cultura para sua utilização.

Figura 57 – Obtenção da cultura primária de fibroblastos humanos. A derme é colocada em solução de collagenase tipo I por 4 a 12 horas em agitação. Após esse período a derme é centrifugada e o tecido é, então, ressuspensão e colocado em placa de petri contendo 10mL de meio D-MEM com 10% SFB. Após 3-4 dias há obtenção de uma placa com aproximadamente 90% de confluência.

2.2. -Cultura de células

Foram utilizadas células de fibroblastos de pele humana, doadas pelo Prof. Dr. Alexander A. L. Jorge, Hospital das Clínicas, USP.

As células de melanoma humano (linhagem SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147) e os melanócitos (FK289) e melanócitos (FM305 e FM307) foram doadas foram doadas pela Profa. Dra. María Soengas do Departamento de Biología Molecular do Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madri, Espanha)

As células foram cultivadas à temperatura de 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os fibroblastos e melanomas foram mantidos em meio D-MEM (Sigma, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina). Os queratinócitos foram mantidos em meio Epilife (SKU# M-EPICF-500, Cascade Biologics) suplementado com Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS - SKU# S-001, Cascade Biologics). Já os melanócitos foram mantidos com o meio 254CF (SKU# M-254CF-500, Cascade Biologics), suplementado com Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS - SKU# S-002-5, Cascade Biologics).

A utilização de cultura de células primárias foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Protocolo CEP nº 424, Anexo 4).

2.3. - Curva de crescimento

Para a realização deste ensaio foram cultivadas, em placas de 24 poços descartáveis, 10⁴ células da cultura celular de fibroblasto por poço. As células foram

mantidas em meio de crescimento DME e coletadas nos dias 1, 3, 5, e 7 de cultivo, por tripsinização. Após a coleta, as células foram fixadas em solução 3,7% de formaldeído-PBSA e contadas em câmara de Neubauer. Com esses dados, foram feitas as curvas de crescimento e calculados seus tempos de dobramento, utilizando o programa Microsoft Excel.

2.4. - Padronização do extrato de *P. umbellata* para utilização em cultura celular

A presença e a concentração de 4-NC foram avaliadas no extrato, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), respectivamente.

O sistema cromatográfico foi composto de bomba Waters Model 510 injector 7161 Rheodyne dotado de loop de 20µL, detector eletroquímico HP 1049^A, constituído de eletrodo de trabalho de placas de carbono-vidro e um eletrodo de referência de estado sólido. O sinal produzido foi transmitido a um integrador SP4600 Termoste Separation Products. A fase móvel utilizada foi metanol:água 90:10(v/v), contendo KCl 2mM e LiClO₄ 20mM, com fluxo 1,0mL/min. Coluna Supelcosil LC-8,3µm, 75x4,6mm (supleco, Bellefonte, PA, USA). O detector eletroquímico foi programado para potencial=0,600V, polaridade=oxidação, modo=amperometria. A padronização foi realizada segundo técnica validada em nosso laboratório (ROPKE, *et al.* 2003).

2.5. - Tratamento das células

Para avaliação da atividade citotóxica do 4-nerolidilcatecol (4-NC) foram utilizadas diferentes concentrações para determinação do IC₅₀ do extrato em 24 e 48 e horas de incubação.

As diluições do 4-NC foram realizadas em meio de cultura para que ficassem nas seguintes concentrações vistas na Tabela 3 (correspondência em $\mu\text{g/mL}$ e μM).

Tabela 3 - Concentrações utilizadas de 4-NC em $\mu\text{g/mL}$ e suas concentrações correspondentes em μM

[] $\mu\text{g/mL}$	[] μM
3 $\mu\text{g/mL}$	10 μM
6 $\mu\text{g/mL}$	20 μM
9 $\mu\text{g/mL}$	30 μM
12 $\mu\text{g/mL}$	40 μM
15 $\mu\text{g/mL}$	50 μM

2.6. - Tratamento das células

Para avaliação da atividade citotóxica do extrato de *P. umbellata* foram utilizadas diferentes concentrações para determinação do IC_{50} do extrato em 24, 48 e 72 horas de incubação.

2.7. - Testes de Citotoxicidade

a - MTT (brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol – 2il) – 2,5 difeniltetrazólio))

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, que é baseado na redução do sal pelo sistema enzimático mitocondrial, através das atividades de desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado

formazan, o qual reflete o normal funcionamento da mitocôndria e conseqüentemente a viabilidade celular. As células foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 horas, em seguida incubadas com diferentes concentrações do extrato durante 12 horas. Após essa etapa, o meio foi removido e as células foram incubadas com uma solução de 5mg/ml de MTT durante 4 horas permitindo a formação do formazan (precipitado) que foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância de cada poço foi lida por um leitor de microplaca em 570 nm (Denizot & Lang, 1986).

b - Exclusão por Azul de Tripan

A viabilidade celular também foi avaliada pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripan (0,4% em tampão fosfato, PBS) onde as células eram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentavam no seu interior a coloração azul. Sendo assim, foram plaqueadas 50.000 células por poço, em placas de 24 poços, e após 6 h o meio foi retirado e, então, foi adicionado meio de cultura acrescido de 0,5% ou 10% de SFB. Após 12-18 h foi adicionado meio com as diferentes concentrações do extrato ou 4-NC. Após essa etapa, as células foram coletadas por tripsinização e, foi adicionado à suspensão de células, o corante azul de tripan (0,4%). Foram contadas 100 células por campo na câmera de Neubauer. Utilizamos o programa Microsoft Excel, para os cálculos das médias e desvio padrões, e posterior confecção dos gráficos.

2.8. - Quantificação de integridade de membrana, fragmentação do DNA e ciclo celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas 200.000 células e após 24h, essas foram tratadas durante 24 e 48 horas com diferentes concentrações de 4-NC obtidas a partir do ensaio de viabilidade. A seguir as células foram coletadas e centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos. O pellet foi ressuspendido em tampão de lise (tampão fosfato de sódio e 0,1% de SDS) contendo iodeto de propídio (50 µg/ml). Após 30 minutos, a fluorescência foi medida pela citometria de fluxo. A fragmentação do DNA foi analisada utilizando um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton & Dickinson) com o canal de fluorescência 2 (FL-2) para iodeto de propídio. As análises foram realizadas usando o software “Cell Quest” (Becton & Dickinson), que analisa todas as células adquiridas (10.000/amostra).

2.9. - Externalização da fosfatidilserina (FS)

A externalização da FS foi realizada por citometria de fluxo como descrito por Lima *et al.* (2007) com pequenas modificações. A análise por citometria de fluxo foi feita após a marcação com o conjugado fluoresceína (FITC)- Anexina V (Anexina V - FITC). As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e então ressuspendidas em 100 µL de tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM, NaCl 2.5 mM CaCl₂) na concentração de 1×10^6 células por mL. Anexina V-FITC (1mg/mL) foi adicionada às células e essas foram incubadas por 20 min. à temperatura ambiente, no escuro. Logo após, foram adicionados 10 µL de solução de IP (100 µg/mL) e 400 µL de tampão de ligação, e as células foram analisadas por citometria de fluxo. Anexina V é uma proteína ligada a fosfolipídios que tem alta afinidade a

FS. IP foi utilizado para distinguir células viáveis de não viáveis. A fluorescência da Anexina V-FITC foi medida no canal FL1 (fluorescência verde 530/30 nm) e IP no canal FL2 (fluorescência vermelho-laranja 585/42 nm).

2.10. - Ensaio de senescência associada a β -galactosidase (pH 6.0)

Foram plaqueadas 100.000 células por poço, em placa de 6 poços, das linhagens de melanomas. Após a adesão celular foi adicionado o 4-NC segundo as concentrações obtidas pelo ensaio de viabilidade seguindo incubação de 24hs. Após o tratamento as células foram lavadas 3x com solução salina (PBS), e então fixadas com glutaraldeído 0,5% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente, em seguida novamente lavadas com PBS + 1mM de $MgCl_2$ e adicionado a solução de X-Gal (1mg/ml – X-Gal; 0,12mM $K_3Fe(CN)_6$; 0,12mM $K_4Fe(CN)_6$; 1mM $MgCl_2$ em PBS, pH 6.0). Incubadas durante 3hs a 37°C, e então lavadas 3x com água deionizada. A observação foi feita em microscópio óptico e as células marcadas com o citoplasma azul foram consideradas senescentes (Gary & Kindell, 2005).

2.11. - Ensaio de invasão em câmaras de Boyden (“transwell”)

Para este ensaio foi utilizado o protocolo descrito por Lochter *et al.* (1997), brevemente descrito a seguir:

Os insertos com poros de 8 μ m (BD - Becton Drive - Franklin Lakes, NJ, USA), acondicionados em placa de 24 poços, foram recobertos com 20 μ L de Matrigel (BD-USA) diluído 1:6 (cerca de 2-3 mg/mL de proteína) e incubados por 30 minutos em estufa de CO₂, a 37°C. Em seguida foram plaqueadas 10⁵ células sobre o matrigel, e 300 μ L de DME com

10% de SFB foram adicionados à câmara inferior. Após 24h foi adicionado o composto nas 2 câmaras do inserto.

O período de invasão utilizado foi de 24 horas. Após este tempo, o meio de cultura da câmara inferior foi aspirado e as células foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBSA, por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi feita coloração com solução 0,5% de azul de toluidina em 2% de Na_2CO_3 , por 20 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado por 3 lavagens com água destilada e, por fim, as células que permaneceram na superfície da câmara de Boyden foram removidas com auxílio de uma haste flexível com algodão.

As células que invadiram estavam na superfície inferior da câmara de Boyden e foram visualizadas em microscópio invertido, utilizando a objetiva com aumento de 20 vezes.

2.12. – Zimografia: Avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9

Foram plaqueadas 50.000 células em placas de 24 poços. As células foram tratadas durante 24 horas com diferentes concentrações de 4-NC obtidas a partir do ensaio de viabilidade. Após esse período o sobrenadante foi retirado, centrifugado (3000 rpm por 5 minutos) e quantificado.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry, 1951), e as amostras contendo 20 µg de proteína foram submetidas à eletroforese (100 V, 1,5 h, sistema Mini-Protean III BioRad), em gel de poliacrilamida 30% contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), copolimerizado com 0,5 % de gelatina.

Ao final da corrida o gel foi cortado em tiras e lavado com Triton 2,5 % para remoção do SDS. O gel foi incubado à 37°C por 18h em um tampão de incubação Tris-HCl 0,05M, 5mM CaCl₂, 5 µM ZnCl₂, pH 8,0. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue por 30 min. à temperatura ambiente e descorados com água contendo 10% de metanol e 10 % de ácido acético. As gelatinases aparecem como regiões não coradas de gelatina, devido à degradação da gelatina pelas MMPs evidenciando sua ativação (Inomata *et al.*, 2003). O gel foi digitalizado (450 d.p.i.) no Densitômetro de Calibração GS-700 BIO-RAD (Bloco 14 FCF) e as intensidades das bandas e pesos moleculares foram calculadas utilizando o programa Molecular Analyzer (versão 1.4).

2.13. – Determinação de Espécies reativas de oxigênio

a. Lucigenina

Foram plaqueadas 10⁶ células de cada tipo celular analisado em placa de 6 poços. Após 24 horas, as células foram coletadas por meio de tripsinização. As células foram centrifugadas (3000 rpm por 5 min. a TA) e após a retirada do meio, lavadas com solução PBS contendo 0,5% de glicose. Foram, então, centrifugadas novamente (3000 rpm por 5 min. a TA) e em seguidas diluídas com PBS+glicose na presença ou ausência do 4-NC, e foi adicionada a lucigenina (concentração final de 0,1mM). Posteriormente as células foram colocadas em placas opacas de cor branca de 96 poços e foi realizada a leitura no luminômetro Berthold 9505 (EG& Instruments GmbH, Munique, Alemanha) a cada 2 minutos e os resultados obtidos foram integrados e posteriormente analisados no Programa Microsoft Excel.

b. DCFH-DA - 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate

Foram plaqueadas 2.10^5 células de cada tipo celular analisado em placa de 6 poços. Após 24 horas, o 4-NC foi adicionado e 30 minutos antes da coleta foi adicionado DCFH-DA ($100\mu\text{M}$). As coletas foram realizadas por tripsinização após 30 min., 2h, 4h, 6h e 12h de incubação com 4-NC e DCFH-DA. Os pellets obtidos foram lavados e ressuspensos em PBS para a leitura em citômetro de fluxo. A fluorescência do DCFH-DA foi medida no canal FL1 (fluorescência verde 530/30 nm) e os resultados obtidos foram integrados e posteriormente analisados no Programa Microsoft Excel.

2.14. – Análise da atividade das enzimas envolvidas no sistema antioxidante celular

As células de melanoma SK-Mel-103 e fibroblastos foram plaqueadas: 8×10^5 células de em placa de 100mm. Após 24 h foi adicionado 4-NC e o tempo de incubação foi de 24 horas, após esse tempo foi realizada a extração protéica (em tampão fosfato contendo 0,5mM de EDTA).

a. Catalase

Este ensaio utiliza como meio reacional tampão triz 1mM pH 8,0. Segundo a equação de Henderson-Hasselbalch:

Como o pKa do triz HCl é de 8,08, temos:

$$8,0 = 8,08 + \log [\text{sal}]/[\text{ácido}]$$

$$[\text{sal}]/[\text{ácido}] = 0,8317 \text{ e } [\text{sal}] + [\text{ácido}] = 0,001$$

$$\text{Portanto, } [\text{sal}] = 0,46\text{mM e } [\text{ácido}] = 0,54\text{mM}$$

Para 250mL, considerando-se a massa molar do triz = 121g/mol e do trizHCl = 158g/mol utilizamos 13,92mg do primeiro e 21,33mg do segundo.

A concentração final dos reagentes é dada: EDTA = 5mM e H₂O₂ = 10mM

Partindo-se de uma solução inicial de 100mM para o EDTA adiciona-se 10μL deste além de 161μL de tampão e 30μL da amostra. Por último coloca-se 1μL de H₂O₂ (solução inicial 6% v/v). A placa foi lida durante 5 minutos (com intervalo de 1 minuto) em 230nm (temperatura de 30°C). Deve-se fazer um branco em que o H₂O₂ é substituído pelo tampão, pois o valor da atividade representa a quantidade de catalase necessária para hidrolisar 1μmol de H₂O₂min.

b. Superóxido Dismutase (SOD)

Este ensaio utiliza como meio reacional tampão fosfato 0,05M pH 7,8. Segundo a equação de Henderson-Hasselbalch:

Como o pKa do H₂PO₄⁻ é de 7,2, temos:

$$7,8 = 7,2 + \log [\text{sal}]/[\text{ácido}]$$

$$[\text{sal}]/[\text{ácido}] = 3,98 \text{ e } [\text{sal}] + [\text{ácido}] = 0,05$$

$$\text{Portanto, } [\text{sal}] = 0,04\text{M e } [\text{ácido}] = 0,01\text{M}$$

Para 250mL, considerando-se a massa molar do KH₂PO₄ = 136,09g/mol e do K₂HPO₄ = 174,18 g/mol utilizamos 0,3602g do primeiro e 1,7418g do segundo.

A concentração final dos reagentes é dada: Citocromo c = 100μM; Xantina = 500μM; EDTA = 1mM, KCN = 200μM, Xantina Oxidase = 0,073U/mL.

Partindo-se de uma solução inicial de xantina e KCN de 1mg/mL, 100mM para o EDTA, e de 2mg/mL para o citocromo c, adicionam-se respectivamente 15μL, 3 μL, 2 μL e 124 μL (além de 20 μL de tampão e 30 μL da amostra). Por último coloca-se 8 μL da xantina oxidase (solução inicial 1,82U/mL, ou 1:20 do estoque). A placa foi lida durante 5 minutos

(com intervalo de 1 minuto) em 550nm (temperatura de 25°C). Deve-se realizar um controle sem amostra, pois o valor da atividade representa a quantidade de SOD necessária inibir 50% da reação da xantina oxidase.

2.13 – Análise protéica por ensaio de Western Blot

Os ensaios de western blot para as proteínas de interesse foram realizados para as amostras não tratadas e tratadas com 4-NC (5, 10 ou 30 μ M) ou controles: doxorrubicina (0,65 μ g/ml; Fisher), Bortezomibe (50nM; Millennium Pharmaceuticals Inc), Etanol 1% (Merk), z-VAD-fmk (20nM; Millennium Pharmaceuticals Inc).

O tempo de incubação com as drogas foi de 24 horas, após esse tempo foi realizada a extração protéica. Para as proteínas fosforiladas utilizamos a extração com o tampão de lise RIPA (Tris 50mM pH7,5, NaCl 150mM, NP-40 1%, EGTA 1mM pH8, SDS 10%, Protease inhibitor cocktail (Roche), Phosphatase Inhibitors (Pierce)). Para as demais proteína utilizamos Laemmli (1,6ml de SDS (10%), 500 μ l de TrisHCl pH6,8, 800 μ l de glicerol, 400 μ l de 2-mercaptoetanol e 4,7ml de água).

Foram utilizados extratos protéicos totais. As placas com 80% de confluência final foram coletadas por raspagem (para a posterior extração com o tampão RIPA, no caso das proteínas fosforiladas e MMP-9) ou por tripsinização (para a posterior extração com o tampão Laemmli, para as demais proteínas). Em seguida, foram adicionados de 150 a 300 μ L de tampão de lise. Após centrifugação por 15 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram mantidos a -80°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

Para separação das proteínas foi feito gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida. Em cada canaleta foram colocados 25 μ g de extrato protéico total + tampão de amostra 4X (Tris-HCl 62,5mM pH6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,1%, DTT 50mM) aquecido à

99°C por 5' (condições desnaturantes) e 7µl de marcador de peso molecular Dual Color (161-0374, BioRad, USA) em cada gel. Para a membrana que seria incubada com anti-MMP-9, as proteínas foram colocadas em condições não-desnaturantes, segundo recomendação do fabricante. A corrida foi feita à 70V / 30min durante o gel de empilhamento e à 100V / 1:30h durante o gel de separação.

Em seguida foi realizada a transferência úmida das amostras de proteína para uma membrana de polivinilidene difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) utilizando o Tampão de Transferência (Tris Base 3,03g, Glicina 14,4g diluído em H₂O pH8.3. Uso colocar 200ml de metanol em solução 1X) à 4°C / 200mA / 1:30h. (2.5.3)

Incubação com anticorpos primários e secundários

Para o bloqueio de as membranas foi utilizada a solução de PBS-T 0,02% (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4, Tween-20 0,02%) com 5% de leite (sem gordura), durante 1 hora à TA. No caso das membranas para detecção de proteínas fosforiladas, o bloqueio foi feito com TBS-T 0,02% (500mM Tris, 60mM KCl, 2.8M NaCl, e 1.0% Tween 20 pH 7.4) com 5% de leite (sem gordura), durante 1 hora à TA.

Após o bloqueio foi realizada a incubação com o anticorpo primário por 12hrs à 4°C, sendo os anticorpos descritos na Tabela 4:

Tabela 4 – Anticorpos utilizados na técnica de Western blotting

Anticorpos (anti)	Diluição	Especificidade	Tamanho proteína (kDa)	Catálogo	Empresa
Actina	1:10000	camundongo	40	A5316	Sigma
Bax	1:1000	coelho	20	2772	Cell Signalling
Bcl-2	1:1000	coelho	28	2876	Cell Signalling
Bcl-xL	1:1000	coelho	26	610211	BD
BID	1:1000	coelho	15,22	2002	Cell Signalling
Caspase 3	1:1000	coelho	35	9662	Cell Signalling
Caspase 9	1:1000	coelho	17, 35, 37, 47	9502	Cell Signalling
cfos	1:1000	coelho	62	4384	Cell Signalling
Citocromo c	1:5000	ovelha	15	C9616	Sigma
cjun	1:1000	coelho	43, 48	9165	Cell Signalling
Mcl-1	1:500	coelho	40, 32	SC-819	Santa Cruz
MMP-2	1:1300	camundongo	66, 72	MAB 3308	Chemicon
MMP-9	1:2000	camundongo	92,82	MAB13415	Chemicon
Noxa	1:1000	camundongo	11	114C307	Calbiochem
p53	1:2500	coelho	53	VP-P955	Vector
ERK	1:1000	coelho	42, 44	9102	Cell Signalling
*Phospho-ERK	1:1000	coelho	42, 44	9106	Cell Signalling
p38 MAPK	1:1000	coelho	43	9217	Cell Signalling
*Phospho-p38	1:1000	coelho	43	9211	Cell Signalling
Tubulina	1:10000	camundongo	50	T6199	Sigma

* Diluídos em 5% de leite em TBS-T 0,02% . Os demais foram diluídos em 5% de leite em PBS-T 0,02% .

Após a incubação com o anticorpo primário, foram realizadas 3 lavagens de 5 min cada com PBS-T/ TBS-T 0,02%, a membrana foi incubada com anticorpo secundário segundo a especificidade do anticorpo diluído 1:1000 em PBS-T 0,02% durante 1 hora à TA, sendo:

- anti-camundongo (115-035-062 goat anti-mouse, Jackson ImmunoResearch Labs)
- anti-coelho (Goat anti-rabbit, Prod# 1858415, Pierce, Rockford, IL, USA).
- anti-ovelha (Rabbit anti-sheep, ab6746, Abcam).

Após incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas 3 vezes, 5 min com PBS-T 0,02%, e em seguida reveladas com kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) ou com o kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate 34075 , Pierce (Rockford, IL, USA) e expostas ao filme (Amersham Hyperfilm ECL).

2.14. Inibição e/ou superexpressão do gene p53 em células de melanoma por lentivírus

Para geração de células de melanoma humano com expressão inibida do gene p53 foram utilizados plasmídeos contendo seqüências short-hairpin RNA (shRNA) para este gene. O vetor lentiviral utilizado foi KH1 e as seqüências foram inseridas no mesmo. O sistema utilizado para empacotamento lentiviral foi o Mission shRNA (Sigma, USA).

Inicialmente, os plasmídeos lentivirais contendo a seqüência do gene de interesse foram transfectados juntamente com os plasmídeos empacotadores nas células HEK 293T, de acordo com instruções do fabricante. Os plasmídeos lentivirais sem a seqüência de interesse ou contendo seqüência aleatória de nucleotídeos (scramble) foram utilizados para a geração dos controles. O empacotamento viral gera as partículas virais inativas que foram

secretadas no meio de cultura das células HEK 293T. A linhagens de melanoma humano foram, então, infectadas com este título viral e os clones transduzidos foram selecionados de acordo com o plasmídeo utilizado, sendo os clones shRNA para p53 selecionados por fluorescência (GFP). A eficiência do silenciamento gênico e protéico foi confirmada por PCR em tempo real e Western blot, respectivamente.

2.15. Determinação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo

Foram plaqueadas 2.10^5 células de cada tipo celular analisado em placa de 6 poços. Após 24 horas, o 4-NC foi adicionado e 30 minutos antes da coleta foi adicionado DiCO6 (3) (3,3' - Dihexyloxacarbocyanine iodide) (20nM). As coletas foram realizadas por tripsinização. Os pellets obtidos foram lavados e ressuspensos em PBS para a leitura em citômetro de fluxo. A fluorescência do DiCO6 (3) foi medida no canal FL1 (fluorescência verde, excitação em 488 nm e emissão em 525 nm.) e os resultados obtidos foram integrados e posteriormente analisados no Programa Microsoft Excel.

2.16. Determinação da atividade das MMP-2 e MMP-9 e expressão de TIMP-2.

Foram plaqueadas 50.000 células em placas de 24 poços. As células foram tratadas durante 24 horas com diferentes concentrações de 4-NC obtidas a partir do ensaio de viabilidade. Após esse período o sobrenadante foi retirado, centrifugado (3000 rpm por 5 minutos) e quantificado.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry, 1951), e as amostras contendo 20 µg de proteína foram incubadas nas placas de atividade para MMP-2 (MMP-2 human, Biotrak activity assay, RPN 2631, GE Healthcare Life Science), MMP-9

(MMP-9 human, Biotrak activity assay, RPN 2634, GE Healthcare Life Science), e expressão de TIMP-2 (TIMP-2 human, Biotrak ELISA assay, RPN 2618, GE Healthcare Life Science). Foram seguidas as instruções do fabricante para a realização do experimento.

3. Modelo *in vivo*

3.1. - Animais

Camundongos fêmeas sem pêlo da linhagem HRS/J provenientes do Biotério de Criação e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, com aproximadamente 10 semanas de idade foram utilizados. A utilização dos animais para experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Protocolo CEEA nº 105, Anexo 5). Os animais foram aclimatados em sala com temperatura e umidade controladas e com ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro e, receberam ração e água *ad libitum*.

3.2. - Preparação das formulações de uso tópico

Foram utilizadas três formulações para a realização dos estudos *in vivo* (Tabela 5)

Tabela 5 - Formulações empregadas nos estudos *in vivo*

	<i>Creme O/A</i>	<i>Gel-creme</i>	<i>Gel</i>
carbômero 940	-	0,30	0,60
Propilienoglicol	10	10	10
trietanolamina	-	0,25	0,50
Vaselina Líquida	6,0	-	-
Cetiol V®	3,0	1,5	-
Lanette ®	5,0	2,5	-
Nipagin®	0,15	0,15	0,25
Nipazol®	0,05	0,05	-
4- nerolidilcatecol	0,10	0,10	0,10

Foram adicionadas às três formulações o extrato de *P. umbellata* (0,1 e 0,4% de 4-NC). Após os estudos de contração e zimografia, foi escolhida a melhor formulação a ser utilizada nos experimentos posteriores.

3.3. - Efeito dose-dependente da aplicação tópica de formulação contendo extrato de *P. umbellata* em camundongos sem pêlo no processo de cicatrização

Foi realizado um estudo dose-dependente extrato de *P. umbellata* nas concentrações de 0,1% e 0,4% de 4-NC, em gel de carbopol, utilizando excisão de parte da pele dorsal de camundongos sem pêlo para avaliar a dose mais efetiva para cicatrização da ferida. (Gupta *et al.*, 2005).

3.4. - Criação e tratamento das feridas

Após anestesia dos animais com xilazina (10 mg/kg, i.p.), e quetamina (100 mg/kg, i.p.) a pele foi lavada com etanol 70%. Um perfurador para biópsia de pele de 0,5 mm de diâmetro foi utilizado para gerar uma ferida de espessura total das camadas dérmicas do dorso do animal sob condições assépticas. Esta área foi selecionada para o estudo de cicatrização já que não pode ser alcançada pelos animais. As feridas foram fotografadas nos dias 1, 4, 6, 8, 10, 12, 13 e 14, considerando-se o primeiro dia como referência (Gupta, *et al.*, 2005).

As formulações em gel de carbopol (0,5%), gel creme e creme com e sem extrato de *P. umbellata* foram aplicadas em cada ferida, duas vezes por dia por 14 dias. As feridas ficaram expostas durante todo o experimento (Gupta *et al.*, 2005).

3.5. - Avaliação histopatológica da pele

Uma parte da pele dorsal foi retirada e imediatamente fixada em formalina tamponada a 4% e posteriormente, incluídos em parafina e submetidos a cortes de 5µm de espessura em micrótomo rotatório.

Os cortes de pele foram corados com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (aumentos 10, 20 e 40x).

3.6. - Parâmetros de cicatrização no estudo dose-dependente de concentração de extrato de *P. umbellata*

O diâmetro das feridas foi medido nos tempos determinados: 1, 4, 6, 8, 10 e 13 utilizando-se software Image Tool 3.00 (Gupta *et al.*, 2005). Foram utilizados 6 animais por grupo.

3.7. - Avaliação sobre a atividade de MMP das frações (*in vitro*) por Zimografia

A pele de camundongos sem pêlo foi separada, lavada com tampão 0,05M Tris-HCl, 0,15M NaCl, pH 7,4 e aquecida a 60 °C por 10s. Uma pequena quantidade (0,1g) de tecido foi homogeneizada em 2 mL de tampão Tris-HCl pH 7,4 contendo 0,2M de NaCl, 5mM CaCl₂ e 0,1% de Triton X-100, por 2 vezes consecutivas de 20 s. O homogeneizado foi submetido à centrifugação 8000g durante 20min, a 4 °C, em centrífuga de mesa refrigerada, Eppendorf 5403. O sobrenadante foi empregado como amostra.

A corrida e posterior análise foi realizada de acordo com o item 2.12.

3.8. - Método de Resorcina-Fucsina de Weigert (segundo Fullmer, 1974)

Desenvolvido em colaboração com o Prof. Dr. Sebastião R Taboga, Centro de Microscopia e Microanálises da UNESP- São José do Rio Preto.

Esta é uma coloração para elastina, que demonstra fibras elásticas, elaunínicas e oxitalânicas conferindo-lhes uma cor púrpura. Para o preparo do corante um grama de fucsina básica e dois gramas de resorcina foram adicionados a 100 mL de água destilada aquecida, fervidos até a dissolução completa. Após, foram adicionados 25 mL de uma solução de cloreto férrico 30% preparada recentemente. A fervura foi continuada por quatro minutos. Após resfriamento e filtragem da solução, o precipitado foi secado em um forno elétrico a 56º. C. O precipitado das laterais e do fundo do recipiente original, assim como do papel filtro foram retirados, dissolvendo-se o total de precipitado em 100 mL de etanol 95% aquecido. Após resfriamento foi adicionado 1 mL de ácido hidrocloreídrico concentrado (HCl).

Os cortes histológicos foram desparafinados e levados até água, tratados com solução aquosa de Oxona a 10% (composto monopersulfato, Du Pont, Wilmington, Delaware, EUA) por 40 minutos. Depois de lavados em água corrente por cinco minutos, foram lavados em uma série de etanol de concentrações de 70 a 95%, e colocados na solução corante por uma hora em temperatura ambiente. Após este tempo na solução corante, foram lavados em água corrente por cinco minutos, a coloração de fundo foi removida por meio de uma solução de álcool etílico 1% (1 mL de HCl concentrado e 99 mL de etanol 70%) por alguns segundos e os cortes observados ao microscópio de luz, com o cuidado de evitar a descoloração das fibras mais finas. Os cortes foram lavados em água corrente e desidratados em álcool, diafanizados e montados.

Cada corte, corado pela Resorcina, foi observado em microscópio óptico (Olympus BX-60), e as imagens capturadas pelo sistema de imagens Image Pro-Plus® (Media Cybernetics, versão 6.0) utilizando objetiva de 4 e 20 vezes, em diversos campos, sendo salvas imagens digitais de maneira que toda a extensão do menisco foi fotografada.

3.9.– Método de Picrossirius-Polarização (segundo Montes, 1996)

Desenvolvido em colaboração com o Prof. Dr. Sebastião R Taboga, Centro de Microscopia e Microanálises da UNESP- São José do Rio Preto.

Os cortes histológicos foram desparafinados, hidratados e corados durante uma hora em uma solução 0,1% de Sirius Red (Sirius Red F 3B 200, Mobay Chemical Co., Union, NJ, EUA) dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Os cortes foram lavados durante cinco minutos em água corrente e contra-corados com hematoxilina fresca durante dois minutos.

O corante Sirius red é uma molécula alongada, de peso molecular 1372 Da, que possui seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazólicos. Demonstrou-se que os grupamentos sulfônicos do corante interagem fortemente com os aminoácidos básicos das moléculas dos diferentes tipos de colágeno, sendo assim, muito apropriado para corar o colágeno em cortes histológicos. Os quatro grupamentos cromofóricos conferem alto índice de extinção ao produto da interação, possibilitando a detecção, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, de 5,76 µg de colágeno / mg de proteína (Junqueira *et al.*, 1979).

A coloração pelo Picrossírius faz com que um grande número de moléculas do Sirius Red (de caráter ácido e alongadas) se oriente paralelamente ao longo do maior eixo das

moléculas de colágeno, ricas em aminoácidos básicos, promovendo o aumento considerável da birrefringência natural das fibrilas e fibras de colágeno, quando observadas sob luz polarizada (Junqueira *et al.*, 1979). O aumento da birrefringência promovido pelo método de Picrossírius-Polarização é, portanto, específico para as estruturas colágenas compostas por agregados de moléculas orientadas. Cada corte foi observado em microscópio óptico (Olympus BX-60), e as imagens capturadas pelo sistema de imagens Image Pro-Plus[®] (Media Cybernetics, versão 6.0) utilizando objetiva de 4 e 20 vezes, em diversos campos, sendo salvas imagens digitais de maneira que toda a extensão do menisco foi fotografada.

4. Modelo de Pele Artificial

4.1. - Preparo do Colágeno tipo I

O colágeno foi obtido na forma de gel hidratado e estéril, proveniente de extração de colágeno tipo I de tendão de cauda de ratos Wistar, segundo Maria & Wada, 1996 (modificado por Corrêa *et al.*, 2006 e Cardeal *et al.*, 2006). Foram extraídos 1,5 g de tendão de caudas de ratos Wistar. As fibras foram então lavadas com álcool 70% e, após a assepsia foram adicionados 100mL de ácido acético 0,5M por 48 horas a 4°C. Centrifuga-se a solução obtida por 3 horas a 2000g. O sobrenadante foi então recolhido e misturado com igual volume de NaCl 20%. A fase aquosa foi drenada e o precipitado foi centrifugado por 3 horas a 2000g. O precipitado é redissolvido em 100mL de ácido acético 0,5M e dialisado por 2 dias, com duas trocas diárias de água contra 10x o volume de gel. O gel obtido é então liofilizado. Para o uso, pesou-se o gel liofilizado o qual foi redissolvido em ácido acético 0,02N para a concentração desejada 2,5 mg/mL.

4.2. - Preparação de equivalente dérmico

O equivalente dérmico é constituído por uma matriz colagênica e fibroblastos, na proporção de 10^5 células de fibroblastos em 0,75ml de matriz/poço em placa de 24 wells (Figura 58). Para preparação dos equivalentes utilizamos:

	Volume parcial	Observações
SFB	1/20	Ressuspender as células em SFB
Tampão de Reconstituição 10x	1/10	2,2% NaHCO ₃ , NaOH 0,05M, HEPES 200mM
meio Ham's F12 10X	1/10	(GibcoBRL, MD,USA)
Colágeno tipo I	8/10	2,5 mg/mL

Após a solidificação foi adicionado meio para *pele* (1ml/poço) composto de 270ml de DME 1x, 90ml de Ham's F12 1x, 40ml de SFB, 5µg/ml de Apo-Transferrin (T-1147, Sigma), 5µg/ml de Insulina (I-1882,Sigma), 0,4µg/ml de Hidrocortisona-21-hemisuccinato (H-4881, Sigma), EGF (Epidermal growth Factor, human, 13247-010,Gibco) e 0,1nM de Toxina Colérica (3012, Sigma). A placa foi mantida à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ até a adição de queratinócitos primários humanos (QPH).

4.3. – Preparação da porção epidérmica da pele

Uma suspensão de 2×10^5 queratinócitos humanos e 10^4 melanócitos e/ou melanoma (em 0,5ml de meio Epilife) foi adicionada a cada poço contendo o equivalente dérmico. Logo após foi adicionado 0,5 ml de meio para *pele* a cada poço e a placa foi colocada a 37 °C e 5% CO₂. Após 24 horas o meio foi substituído por 1 ml de meio para *pele* fresco e a matriz de colágeno de cada poço foi descolada da placa utilizando-se uma espátula (Figura 58). Após

quatro horas cada matriz de colágeno, com a superfície coberta por células da epiderme (com ou sem melanoma), foi transferida para uma grelha de aço colocada em uma placa de Petri de 60 mm (Figura 58). Posteriormente, foram adicionados 5 ml de meio para pele por placa e as mesmas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 15 dias para diferenciação do epitélio ou invasão dos melanomas (Figura 58). A cada 48 horas foi realizada uma troca de meio e doze dias após a transferência à interface ar-líquido, as peles foram tratadas com 4-NC (Sigma) por 72 horas.

Finalmente, após o período de incubação as peles foram lavadas com PBS pH 7.4, destinados à análise histológica, sendo em seguida fixados, incluídos em parafina e feita coloração com hematoxilina/eosina.

após a contração do gel de colágeno, a estrutura é passada para uma grelha de aço formando a interface ar-líquido. Após 2 semanas na interface há a formação da pele artificial. Coloração HE. Aumento 40x.

4.4. – Imunohistoquímica

Após desparafinização e rehidratação, os cortes foram tratados com soluções para recuperação antigênica, sendo esta Tris EDTA pH9, 0 (S3307, DAKO(r)) em banho aquecido com vapor de água e mantido a 97°C durante 30 minutos. As lâminas foram, então, resfriadas a temperatura ambiente por 20 minutos, ainda na solução de recuperação antigênica e lavadas, posteriormente, com água destilada e tampão TBST (tampão salina Tris com Tween 20, 3306, DAKO(r)).

Os anticorpos primários utilizados foram β catenina (Cell Signaling, 9582), E-caderina (Cell Signaling, 3195), Queratina 10 (Abcam, ab14121), Queratina 14 (Abcam, ab7800), Involucrina (Abcam, ab27495), S-100 (Dako, Z0311) diluídos 1:100 em BSA 2%.

A reação imunohistoquímica foi realizada com o kit ARK (Animal Research Kit, K3954–DAKO®). O sistema é formulado para minimizar a reatividade do anticorpo secundário anti-camundongo com as imunoglobulinas endógenas que podem estar presentes nos tecidos.

Os passos descritos a seguir foram utilizados para a reação de imunohistoquímica:

A. Preparação dos reagentes:

I. •Anticorpo primário biotilado.

1. Em tubo de vidro, misturar a solução com o anticorpo primário diluído com o reagente biotilado e deixar incubando por 15 minutos em temperatura ambiente.

2. Adicionar o reagente de bloqueio e deixar incubando por 5 minutos em temperatura ambiente.

II. Preparação da solução de DAB

1. Diluir DAB + cromógeno em substrato tamponado (1:50).
- B. Incubação das lâminas (Após a recuperação antigênica)
 1. Aplicar o reagente de bloqueio da peroxidase nos cortes:
 - incubar por 5 minutos (em câmara úmida)
 - lavar com água
 - deixar em tampão TBST
 2. Aplicar o anticorpo primário biotilado, preparado anteriormente.
 - incubar por 15 minutos (em câmara úmida)
 - lavar com tampão TBST
 3. Aplicar estreptavidina-peroxidase
 - incubar por 15 minutos (em câmara úmida)
 - lavar com tampão TBST
 4. Aplicar a solução DAB + substrato cromógeno
 - incubar por 5 minutos
 - monitorar a coloração no microscópio por 5 a 10 minutos
 - lavar com água

A contra coloração foi feita com hematoxilina de Harrys. As lâminas foram desidratadas e montadas com resina sintética (Entellan® Merck®).

5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente, usando o software Graphpad InStat tm (One-way analysis of variance (ANOVA), com um valor de significância de $p < 0,05$).

Capítulo 4

Referências Bibliográficas

Adolphe C, Wainwright B. Pathways to improving skin regeneration. *Expert Rev Mol Med.* 2005 Sep 23;7:1-14.

Almeida RL, Silva VV, Rivelli DP, Miranda DV, Sawada TCH, Barros SBM, Ropke CD. Padronização e determinação da fotoestabilidade do extrato de folhas de *Pothomorphe umbellata* L. Miq (pariparoba) e avaliação da inibição in vitro de metaloproteinasas 2 e 9 na pele. – *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* vol. 44, n. 1, jan./mar., 2008

Arakawa M, Hatamochi A, Mori Y, Mori K, Ueki H, Moriguchi T. Reduced collagenase gene expression in fibroblasts from hypertrophic scar tissue. *Br J Dermatol.* 1996 May;134(5):863-8.

Arin MJ. The molecular basis of human keratin disorders. *Hum Genet.* 2009 May;125(4):355-73. Epub 2009 Feb 27. Review.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 Aug 28;281(5381):1305-8.

Averill-Bates DA, Ke Q, Tanel A, Roy J, Fortier G, Agostinelli E. Mechanism of cell death induced by spermine and amine oxidase in mouse melanoma cells. *Int J Oncol.* 2008 Jan;32(1):79-88.

Babul A, Gonul B, Dincer S, Erdogan D, Ozogul C. The effect of EGF application in gel form on histamine content of experimentally induced wound in mice. *Amino Acids.* 2004 Dec;27(3-4): 321-6. Epub 2004 Sep 15.

Balbino CA; Pereira L.M.; Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115(Pt 19): 3719-27, 2002.

Barros, SBM, Teixeira, DS., Aznar, AE., Moreira Jr., J.A., Ishii, I, Freitas, PCD. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. *Ciência e Cultura*, 1996., v.48, p.114-116

Barros LF, Barros PS, Röpke CD, Silva VV, Sawada TC, Barros SB, Belfort R Jr., 2007. Dose-dependent in vitro inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by an extract of *Pothomorphe umbellata* after alkali injury. *Braz J Med Biol Res.* 40, 1129-1132.

Benaud C, Dickson RB, Thompson EW. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 50(2): 97-116, 1998.

Bernardo MM & Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem. J.* 374:739-745, 2003.

Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* 70(9-10):537-46, 2002.

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA., 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*.436, 660-665.

Brohem CA, Sawada TC, Massaro RR, Almeida RL, Rivelli DP, Ropke CD, da Silva VV, de Lima TM, Curi R, Barros SB, Maria-Engler SS. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicol In Vitro*. 2009 Feb;23(1):111-9. Epub 2008 Nov 24.

Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med*. 2002 May;68(5):445-8.

Brummer O, Bohmer G, Hollwitz B, Flemming P, Petry KU, Kuhnle H. MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation--an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 84(2):222-7, 2002.

Campbell CT, Prince M, Landry GM, Kha V, Kleiner HE., 2007. Pro-apoptotic effects of 1'-acetoxychavicol acetate in human breast carcinoma cells. *Toxicol Lett*. 28, 151-60.

Campisi, J., 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513–522

Cardeal LBS, Brohem CA, Corrêa TCS, Winnischofer SMB, Nakano F, Boccardo E, Villa LL, Sogayar MC, Maria-Engler SS . Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPVpresence. *Biochemistry and Cell Biology*, 2006.

Chandan R. Trade in health services. *Bull World Health Organ*. 2002;80(2):158-63.

Chang L, Crowston JG, Cordeiro MF, Akbar AN, Khaw PT. The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol*. 2000 Jul-Aug;45(1):49-68.

Chang C & Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *TRENDS in Cell Biology Rev*. Nov;11(11):S37-43, 2001.

Chebassier N, El Houssein O, Viegas I, Dreno B. In vitro induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in keratinocytes by boron and manganese. *Exp Dermatol*. 2004 Aug;13(8):484-90

Chiu TL, Su CC. Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF-kappaBp65 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Int J Mol Med*. 2009 Apr;23(4):469-75.

Clark RA, Ashcroft GS, Spencer MJ, Larjava H, Ferguson MW. Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from α v β 5 to α v β 6 integrins. *Br J Dermatol.* 1996 Jul;135(1):46-51.

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M, 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature.*436, 642.

Corrêa TCS, Brohem CA, Winnischofer SMB, Cardeal LBS, Sasahara RM, Taboga, SR, Sogayar MC, Maria-Engler SS. Downregulation of the RECK- tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. *J Cell Biochem,* 2006.

Cox G, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinases and cancer. *Anticancer Res.* 2001 Nov-Dec;21(6B):4207-19. Review

Dale PD, Sherratt JA, Maini PK. Role of fibroblast migration in collagen fiber formation during fetal and adult dermal wound healing. *Bull Math Biol.* 1997 Nov;59(6):1077-100.

Daniels JT, Geerling G, Alexander RA, Murphy G, Khaw PT, Saarialho-Kere U. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases during wound healing of human corneal tissue. *Exp Eye Res.* 2003 Dec;77(6):653-64.

Das I, Saha T. Effect of garlic on lipid peroxidation and antioxidation enzymes in DMBA-induced skin carcinoma. *Nutrition.* 2009 Apr;25(4):459-71. Epub 2008 Dec 11.

DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L, Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol.* Review 164(4):1131-9, 2004.

de Lima TM, Amarante-Mendes GP, Curi R. Docosahexaenoic acid enhances the toxic effect of imatinib on Bcr-Abl expressing HL-60 cells. *Toxicol In Vitro.* 2007 Dec;21(8):1678-85.

Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, Verhaegen M, Johnson TM, Fullen DR, Pointer JN, Gruber SB, Su LD, Nikiforov MA, Kaufman RJ, Bastian BC, Soengas MS., 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol.* 8, 1053-1063.

Desmarchelier, C; Slowing, K.; Ciccia, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leave methanol extract. *Fitoterapia,* 2000., v.71, p.556-558

Dhar SK, St Clair DK. Nucleophosmin Blocks Mitochondrial Localization of p53 and Apoptosis. *J Biol Chem.* 2009 Jun 12;284(24):16409-18. Epub 2009 Apr 14

Donà M, Dell'Aica I, Pezzato E, Sartor L, Calabrese F, Della Barbera M, Donella-Deana A, Appendino G, Borsarini A, Caniato R, Garbisa S, 2004. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* 64, 6225-6232.

Dong LF, Swettenham E, Eliasson J, Wang XF, Gold M, Medunic Y, Stantic M, Low P, Prochazka L, Witting PK, Turanek J, Akporiaye ET, Ralph SJ, Neuzil J. Vitamin E analogues inhibit angiogenesis by selective induction of apoptosis in proliferating endothelial cells: the role of oxidative stress. *Cancer Res.* 2007 Dec 15;67(24):11906-13.

Dulak J. Nutraceuticals as anti-angiogenic agents: hopes and reality. *J Physiol Pharmacol.* 2005 Mar;56 Suppl 1:51-69

Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Kurbanov BM, Fechner H. Apoptosis pathways and oncolytic adenoviral vectors: promising targets and tools to overcome therapy resistance of malignant melanoma. *Exp Dermatol.* 2008 Jan;17(1):1-11. Review.

Egeblad M & Werb Z. New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nature Reviews/Cancer* 2:161-74, 2002.

Ehrlich HP. Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye.* 1988;2 (Pt 2):149-57. Review.

Ellerbroek SM, Stack MS. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays.* 1999 Nov;21(11):940-9. Review.

Er TK, Tsai SM, Wu SH, Chiang W, Lin HC, Lin SF, Wu SH, Tsai LY, Liu TZ. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. *Clin Biochem.* 2007 Sep;40(13-14):1015-9. Epub 2007 Jun 8.

Fernández Y, Verhaegen M, Miller TP, Rush JL, Steiner P, Oipari AW Jr, Lowe SW, Soengas MS. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res.* 2005 Jul 15;65(14):6294-304.

Fernández Y, Miller TP, Denoyelle C, Esteban JA, Tang WH, Bengston AL, Soengas MS. Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of Bortezomib: impact on tumor cell death. *J Biol Chem.* 2006 Jan 13;281(2):1107-18. Epub 2005 Nov 8.

Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia.* 2001 Nov;72(7):774-8

Fray MJ, Dickinson RP, Huggins JP, Occleston NL. A potent, selective inhibitor of matrix metalloproteinase-3 for the topical treatment of chronic dermal ulcers. *J Med Chem.* 2003 Jul 31;46(16):3514-25.

Fujisawa S, Atsumi T, Kadoma Y, Sakagami H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology.* 2002 Aug 1;177(1):39-54. Review.

Fujiwara M, Muragaki Y, Ooshima A. Keloid-derived fibroblasts show increased secretion of factors involved in collagen turnover and depend on matrix metalloproteinase for migration. *Br J Dermatol.* 2005 Aug;153 (2):295-300.

Ganguli-Indra G, Wasylyk C, Liang X, Millon R, Leid M, Wasylyk B, Abecassis J, Indra AK. CTIP2 expression in human head and neck squamous cell carcinoma is linked to poorly differentiated tumor status. PLoS One. 2009;4(4):e5367. Epub 2009 Apr 28.

Gilchrest, B.A., Yarr, M. Ageing versus photoageing: postulated mechanisms and effectors. J. Invest. Dermatol. Symp, 1998.. Proc., Malden, v.3, p.47-51

Gillard JA, Reed MW, Buttle D, Cross SS, Brown NJ. Matrix metalloproteinase activity and immunohistochemical profile of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 during human dermal wound healing. Wound Repair Regen. 2004 May-Jun;12(3):295-304.

Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. J Leukoc Biol. 2001 Apr;69(4):513-21.

Gordon SR, Climie M, Hitt AL. 5-Fluorouracil interferes with actin organization, stress fiber formation and cell migration in corneal endothelial cells during wound repair along the natural basement membrane. Cell Motil Cytoskeleton. 2005 Dec;62(4):244-58.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. Nature. 2007 Feb 22;445(7130):851-7. Review.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12. Review.

Greinert R. Skin cancer: new markers for better prevention. Pathobiology. 2009;76(2):64-81. Epub 2009 Apr 9. Review

Grinnell F. Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. Trends Cell Biol. 2000 Sep; 10 (9):362-5.

Grinnell F, Rocha LB, Iucu C, Rhee S, Jiang H. Nested collagen matrices: a new model to study migration of human fibroblast populations in three dimensions. Exp Cell Res. 2006 Jan 1;312(1):86-94. Epub 2005 Oct 27.

Gutierrez-Fernandez A, Inada M, Balbin M, Fueyo A, Pitiot AS, Astudillo A, Hirose K, Hirata M, Shapiro SD, Noel A, Werb Z, Krane SM, Lopez-Otin C, Puente XS. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). FASEB J. 2007 Mar 28;

Hackert I, Aschoff R, Sebastian G. The treatment of keloids. Hautarzt. 2003 Oct;54(10):1003-15.

Haapajarvi, T., Pitkanen, K., and Laiho, M. Human melanoma cell line UV responses show independency of p53 function. Cell Growth Differ., 10: 163–171, 1999.

Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. J Mol Histol. 2004 Mar;35(3):309-18. Review.

Harakeh S, Abu-El-Ardat K, Diab-Assaf M, Niedzwiecki A, El-Sabban M, Rath M. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and cell cycle arrest in HTLV-1-positive and -negative leukemia cells. *Med Oncol.* 2008;25(1):30-9. Epub 2007 Aug 14.

Hersey P, Zhang XD. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2001 Nov;1(2):142-50. Review.

Hitomi K. Transglutaminases in skin epidermis. *Eur J Dermatol.* 2005 Sep-Oct;15(5):313-9. Review.

Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer.* Review 89(10):1817-21, 2003.

Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *J Ethnopharmacol.* 2005 Aug 22;100(1-2):100-7.

Hussein MR. Extracutaneous malignant melanomas. *Cancer Invest.* 2008 Jun;26(5):516-34. Review.

Hwang JH, Lee BM. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J Toxicol Environ Health A.* 2007 Mar 1;70(5):393-407.

Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:551-79. Review.

Itoh Y. & Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem,* 38(21-36), 2002.

Itoh Y, Ito N, Nagase H, Seiki M. The second dimer interface of MT1-MMP, the transmembrane domain, is essential for ProMMP-2 activation on the cell surface. *J Biol Chem.* 2008 May 9;283(19):13053-62. Epub 2008 Mar 12.

Jansen PL, Rosch R, Jansen M, Binnebosel M, Junge K, Alfonso-Jaume A, Klinge U, Lovett DH, Mertens PR. Regulation of MMP-2 gene transcription in dermal wounds. *J Invest Dermatol.* 2007 Jul;127(7):1762-7. Epub 2007 Mar 8

Jun, D.J., Kim, J., Jung, S.Y., Song, R., Noh, J.H., Park, Y.S., Ryu, S.H., Kim, J.H., Kong, Y.Y., Chung, J.M., Kim, K.T., 2007. Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 28,37350–37358.

Junqueira, L.C.U. & Carneiro, J. *Histologia básica* 9a. Edição. Ed. Guanabara koogan, 1999, 512p.

Kan C; Abe M, Yamanaka M, Ishikawa O. Hypoxia-induced increase of matrix metalloproteinase-1 synthesis is not restored by reoxygenation in a three-dimensional culture of human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2003 Jun;32 (1):75-82.

Kang JH, Han IH, Sung MK, Yoo H, Kim YG, Kim JS, Kawada T, Yu R. 2007 Soybean saponin inhibits tumor cell metastasis by modulating expressions of MMP-2, MMP-9 and TIMP- 2. *Cancer Lett.* Epub ahead of print.

Kaur M, Mandair R, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. *Nutr Cancer.* 2008;60 Suppl 1:2-11.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:471-4. Review.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):52-67. Review

Kim YL, Im YJ, Ha NC, Im DS Albumin inhibits cytotoxic activity of lysophosphatidylcholine by direct binding. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007 Feb;83(1-2):130-8. Epub 2006 Nov 22.

Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. A Ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56(1): 77-84., 1989.

Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farrè S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med.* 2004 Feb-Apr;25(1-2):191-8. Review.

Kreizenbeck GM, Berger AJ, Subtil A, Rimm DL, Gould Rothberg BE. Prognostic significance of cadherin-based adhesion molecules in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Apr;17(4):949-58.

Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008 Mar;44(3):205-21. Review

La Porta CA. Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr Med Chem.* 2007;14(4):387-91. Review.

Lee JC, Kim J, Jang YS. Ethanol-eluted extract of *Rhus verniciflua* stokes inhibits cell growth and induces apoptosis in human lymphoma cells. *J Biochem Mol Biol.* 2003 Jul 31;36(4):337-43.

Lee DH, Rhee JG, Lee YJ. Reactive oxygen species up-regulate p53 and Puma; a possible mechanism for apoptosis during combined treatment with TRAIL and wogonin. *Br J Pharmacol.* 2009 May 8.

Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF- κ B, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol.* 2002 Jun;8(3):431-5

Li J, Zuo L, Shen T, Xu CM, Zhang ZN. Induction of apoptosis by sodium selenite in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells: involvement of oxidative stress and mitochondria. *J Trace Elem Med Biol.* 2003;17(1):19-26.

Liu Y, Suwa F, Wang X, Takemura A, Fang YR, Li Y, Zhao Y, Jin Y. Reconstruction of a tissue-engineered skin containing melanocytes. *Cell Biol Int.* 2007 Sep;31(9):985-90. Epub 2007 Mar 20.

Liu S, Ren S, Howell P, Fodstad O, Riker AI. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Oct;21(5):545-58. Epub 2007 Jun 28.

Lorigan P, Eisen T, Hauschild A. Systemic therapy for metastatic malignant melanoma--from deeply disappointing to bright future? *Exp Dermatol.* 2008 May;17(5):383-94.

Madlener M. Differential expression of matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors in acute murine skin wounds. *Arch Dermatol Res.* 1998 Jul;290 Suppl:S24-9.

Manna S, Banerjee S, Mukherjee S, Das S, Panda CK. Epigallocatechin gallate induced apoptosis in Sarcoma180 cells in vivo: mediated by p53 pathway and inhibition in U1B, U4-U6 UsnRNAs expression. *Apoptosis.* 2006 Dec;11(12):2267-76.

Manuel JA, Gawronska-Kozak B. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biol.* 2006 Oct;25(8):505-14. Epub 2006 Aug 16

Masui T, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Ito D, Kami K, Mori T, Wada M, Noda M, Imamura M. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin Can Res* 9:1779-1784, 2003.

Masui T, Doi R, Koshiba T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Ito D, Kami K, Mori T, Wada M, Noda M, Imamura M. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin Cancer Res.* 2003 May;9(5):1779-84.

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):75-81.

Martin MJ, Carling D, Marais R. Taking the stress out of melanoma. *Cancer Cell.* 2009 Mar 3;15(3):163-4. Review.

McConkey DJ, Choi W, Marquis L, Martin F, Williams MB, Shah J, Svatek R, Das A, Adam L, Kamat A, Siefker-Radtke A, Dinney C. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009 Dec;28(3-4):335-44. Review.

Meier F, Nesbit M, Hsu MY, Martin B, Van Belle P, Elder DE, Schaumburg-Lever G, Garbe C, Walz TM, Donatien P, Crombleholme TM, Herlyn M. Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF. *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):193-200.

Meyskens FL Jr, McNulty SE, Buckmeier JA, Tohidian NB, Spillane TJ, Kahlon RS, Gonzalez RI. Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radic Biol Med.* 2001 Sep 15;31(6):799-808.

Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T, Karlsmark T, AGren MS, Saarialho-Kere U. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Hum Pathol.* 2002 Mar;33(3):355-64.

Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jun;129(6):705-33. Epub 2008 May 7. Review.

Mongelli, E.; Romano, A; Desmarchelier, C.; Coussio, K. & Ciccia, G. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. *Planta Med.*, v.65, p.376-8, 1999.

Moraes, M.S. Caracterização farmacognostica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. São Paulo, 1983. 112p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

Moulin V, Plamondon M. Differential expression of collagen integrin receptor on fetal vs. adult skin fibroblasts: implication in wound contraction during healing. *Br J Dermatol.* 2002 Nov;147(5):886-92.

Mousavi-Shafaei P, Ziaee AA, Zangemeister-Wittke U. Increased cytotoxicity of cisplatin in SK-MEL 28 melanoma cells upon down-regulation of melanoma inhibitor of apoptosis protein. *Iran Biomed J.* 2009 Jan;13(1):27-34

Mukherjee PK, Mukherjee K, Rajesh Kumar M, Pal M, Saha BP. Evaluation of wound healing activity of some herbal formulations. *Phytother Res.* 2003 Mar;17(3):265-8.

Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathology International* 52: 255-264, 2002.

Nakazato T, Ito K, Ikeda Y, Kizaki M. Green tea component, catechin, induces apoptosis of human malignant B cells via production of reactive oxygen species. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):6040-9.

Narita M, Lowe SW., 2005. Senescence comes of age. *Nat Med.* 11, 920-922.

Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin.* 2000 May;16(2):289-302.

Neely AN, Clendening CE, Gardner J, Greenhalgh DG, Warden GD. Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Repair Regen.* 1999 May-Jun;7(3):166-71.

Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med.* 2004 Sep 15;37(6):768-84. Review.

Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood GS. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer.* 2005 Apr 20;114(4):513-21.

Nishikawa M, Hyoudou K, Kobayashi Y, Umeyama Y, Takakura Y, Hashida M. Inhibition of metastatic tumor growth by targeted delivery of antioxidant enzymes. *J Control Release.* 2005 Dec 5;109(1-3):101-7. Epub 2005 Oct 26. Review.

Noda M, Selinger Z, Scolnick EM, Bassin RH. Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Sep;80(18):5602-6

Noda M, Kitayama H, Matsuzaki T, Sugimoto Y, Okayama H, Bassin R H, Ikawa Y. Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated Ras genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(1): 162-6, 1989.

Noda M. Mechanisms of reversion. *Faseb J.* 7(10): 834-40, 1993.

Noda M, Oh J, Takahashi R, Kondo S, Kitayama H, Takahashi C. RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Cancer Metastasis Rev* 22(2-3): 167-75, 2003.

Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T et al. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053–1058.

Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol.* 2008 May;35(5):433-44. Review.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2004 Aug;4(8):592-603.

Ozgen U, Ikbali M, Hacimuftuoglu A, Houghton PJ, Gocer F, Dogan H, Coskun M. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots. *J Ethnopharmacol.* 2006 Mar 8;104(1-2):100-3. Epub 2005 Oct 1.

Pani G, Koch OR, Galeotti T. The p53-p66shc-Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) network: a mitochondrial intrigue to generate reactive oxygen species. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009a May;41(5):1002-5. Epub 2008 Oct 18. Review

Pani G, Giannoni E, Galeotti T, Chiarugi P. Redox-based escape mechanism from death: the cancer lesson. *Antioxid Redox Signal.* 2009b Nov;11(11):2791-806. Review.

Panizza, S. Plantas que curam: cheiro de mato. 15.ed. São Paulo: Ibrasa, 1998. p.159-160.

Pena JA, Losi-Sasaki JL, Gooch JL. Loss of calcineurin Aalpha alters keratinocyte survival and differentiation. *J Invest Dermatol.* 2010 Jan;130(1):135-40. Epub .

Pérez-Galán P, Roué G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D. The proteasome inhibitor Bortezomibe induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood.* 2006 Jan 1;107(1):257-64. Epub 2005 Sep 15.

Ploner C, Kofler R, Villunger A. Noxa: at the tip of the balance between life and death. *Oncogene.* 2008 Dec;27 Suppl 1:S84-92. Review.

Polydoro M, de Souza KC, Andrades ME, Da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, Dal-Pizzol F, Schapoval EE, Bassani VL, Moreira JC. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of Achyrocline satureioides extracts. *Life Sci.* 2004 Apr 23;74(23):2815-26.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008 Dec;17(12):1063-72. Review.

Pupa S M, Menard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol.* 192(3): 259-67, 2002.

Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis.* 2005 May;26(5):958-67. Epub 2005 Feb 10.

Qin J, Chen HG, Yan Q, Deng M, Liu J, Doerge S, Ma W, Dong Z, Li DW. Protein phosphatase-2A is a target of epigallocatechin-3-gallate and modulates p53-Bak apoptotic pathway. *Cancer Res.* 2008 Jun 1;68(11):4150-62. Erratum in: *Cancer Res.* 2008 Aug 15;68(16):6859.

Ramot Y, Paus R, Tiede S, Zlotogorski A. Endocrine controls of keratin expression. *Bioessays.* 2009 Apr;31(4):389-99. Review.

Ribeiro MC, de Avila DS, Schneider CY, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS, Rubin MA, Lehmann M, Krieglstein J, Mello CF. alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res.* 2005 Aug-Sep;66(1-3):185-94.

Ridgway PF, Ziprin P, Peck DH, Darzi AW. Hypoxia increases reepithelialization via an alphavbeta6-dependent pathway. *Wound Repair Regen.* 2005 Mar-Apr;13(2):158-64.

Rieber M, Rieber MS. Tumor suppression without differentiation or apoptosis by antisense cyclin D1 gene transfer in K1735 melanoma involves induction of p53, p21WAF1 and superoxide dismutases. *Cell Death Differ.* 1999 Dec;6(12):1209-15.

Ropke CD, Kaneko TM, Rodrigues RM, da Silva VV, Barros S, Sawada TC, Kato MJ, Barros SB. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *Int J Pharm.* 2002 Dec 5;249(1-2):109-16

Ropke CD, Kaneko TM, Rodrigues RM, da Silva VV, Barros S, Sawada TC, Kato MJ, Barros SB. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *Int J Pharm.* 2002 Dec 5;249(1-2):109-16

Ropke CD, Meirelles RR, da Silva VV, Sawada TC, Barros SB Pothomorphe umbellata extract prevents alpha-tocopherol depletion after UV-irradiation. *Photochem Photobiol.* 2003 Nov;78(5):436-9

Ropke CD, da Silva VV, Kera CZ, Miranda DV, de Almeida RL, Sawada TC, Barros SB. In vitro and In vivo Inhibition of Skin Matrix Metalloproteinases by Pothomorphe umbellata Root Extract. *Photochem Photobiol.* 2005a Jun 1.

Ropke CD, Sawada TC, da Silva VV, Michalany NS, de Moraes Barros SB. Photoprotective effect of Pothomorphe umbellata root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Clin Exp Dermatol.* 2005 May;30(3):272-6.

Ropke CD, da Silva VV, Kera CZ, Miranda DV, de Almeida RL, Sawada TC, Barros SB. In vitro and in vivo inhibition of skin matrix metalloproteinases by Pothomorphe umbellata root extract. *Photochem Photobiol.* 2006 Mar-Apr;82(2):439-42.

Roy MK, Nakahara K, Na TV, Trakoontivakorn G, Takenaka M, Isobe S, Tsushida T Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic extract of *Oroxylum indicum* inhibits proliferation of a cancer cell line in vitro via induction of apoptosis. *Pharmazie.* 2007 Feb;62(2):149-53

Santocono M, Zurria M, Berrettini M, Fedeli D, Falcioni G. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. *J Photochem Photobiol B.* 2006 Dec 1;85(3):205-15. Epub 2006 Sep 8.

Sarkisian CJ, Keister BA, Stairs DB, Boxer RB, Moody SE, Chodosh LA., 2007. Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 9, 493-505.

Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget EE, Ghahary A. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol Cell Biochem.* 2005 Jan;269(1-2):209-16.

Schinella GR, Troiani G, Dávila V, de Buschiazzi PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Mar 16;269(2):357-60.

Seite S, Colige A, Deroanne C, Lambert C, Piquemal-Vivenot P, Montastier C, Fourtanier A, Lapiere C, Nusgens B Changes in matrix gene and protein expressions after single or repeated exposure to one minimal erythral dose of solar-simulated radiation in human skin in vivo. **Photochem Photobiol.** 2004 .v.79, p.265-71.

Shiomi T & Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer and Metastasis Rev* 22: 145- 52, 2003.

Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993 Jul 15;215(2):213-9. Review

Silva, RAD. *Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil.* São Paulo: Nacional, 1926. p.649.

Simizu S, Takagi S, Tamura Y, Osada H. RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7455-61.

Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2006 Sep-Oct;42(8-9):242-7.

Smith SH, Goldschmidt MH, McManus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol.* 2002 Nov;39(6):651-78. Review.

Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 2003 May 19;22(20):3138-51. Review.

Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, Green DR. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science.* 2005 Oct 7;310(5745):66-7.

Sternlicht MD & Werb Z. How matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516, 2001.

Su Y, Amiri KI, Horton LW, Yu Y, Ayers GD, Koehler E, Kelley MC, Puzanov I, Richmond A, Sosman JA. A phase I trial of Bortezomibe with temozolomide in patients with advanced melanoma: toxicities, antitumor effects, and modulation of therapeutic targets. *Clin Cancer Res.* 2010 Jan 1;16(1):348-57. Epub 2009 Dec 22.

Sun B, Zhang S, Zhang D, Gu Y, Zhang W, Zhao X., 2007. The influence of different microenvironments on melanoma invasiveness and microcirculation patterns: an animal experiment study in the mouse model. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133, 979-985.

Takahashi C, Akiyama N, Matsuzaki T, Takai S, Kitayama H, Noda M. Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-Ras oncogene. *Oncogene*, 12(10): 2137-46, 1996.

Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitauro Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix

metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(22): 13221-6, 1998.

Thang PT, Patrick S, Teik LS, Yung CS. Anti-oxidant effects of the extracts from the leaves of *Chromolaena odorata* on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes against hydrogen peroxide and hypoxanthine-xanthine oxidase induced damage. *Burns*. 2001 Jun;27(4):319-27.

Umebayashi C, Oyama Y, Chikahisa-Muramastu L, Nakao H, Nishizaki Y, Nakata M, Soeda F, Takahama K. Tri-n-butyltin-induced cytotoxicity on rat thymocytes in presence and absence of serum. *Toxicol In vitro*. 2004 Feb;18(1):55-61

Valadares MC, Rezende KR, Pereira ER, Sousa MC, Gonçalves B, de Assis JC, Kato MJ, 2007. Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Food Chem Toxicol*. 45, 1975-1978.

Van Dyke K, Patel S, Vallyathan V. Lucigenin chemiluminescence assay as an adjunctive tool for assessment of various stages of inflammation: a study of quiescent inflammatory cells. *J Biosci*. 2003 Feb;28(1):115-9

Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci*. 1997 Oct;22(10):388-93

Xue M, Thompson P, Kelso I, Jackson C. Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res*. 2004 Sep 10;299(1):119-27

Yamada J, Yoshimura S, Yamakawa H, Sawada M, Nakagawa M, Hara S, Kaku Y, Iwama T, Naganawa T, Banno Y, Nakashima S, Sakai N. Cell permeable ROS scavengers, Tiron and Tempol, rescue PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Res*. 2003 Jan;45(1):1-8.

Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med*. 2007 Oct 1;43(7):995-1022. Epub 2007 Jul 10. Review

Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997 Jun;77(3):509-28.

Woodhouse E, Chuaqui RF, Liotta LA. General Mechanisms of Metastasis. *CANCER Supplement* 80(8): 1529-37, 1997.

Wu N, Opalenik S, Liu J, Jansen ED, Giro MG, Davidson JM. Real-time visualization of MMP-13 promoter activity in transgenic mice. *Matrix Biol*. 2002 Mar;21(2):149-61.

Wu X, Li H, Kang L, Li L, Wang W, Shan B. Activated matrix metalloproteinase-2--a potential marker of prognosis for epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2002 Jan;84(1):126-34.

Zambuzzi WF, Yano CL, Cavagis AD, Peppelenbosch MP, Granjeiro JM, Ferreira CV. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. *Mol Cell Biochem.* 2009 Feb;322(1-2):143-50. Epub 2008 Nov 7.

Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Naruszewicz M, Siennicka A, Krasnodebska B, Koldziej B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sci.* 2002 Nov 1;71(24):2897-08.

Zhen MC, Huang XH, Wang Q, Sun K, Liu YJ, Li W, Zhang LJ, Cao LQ, Chen XL. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses rat hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 expression and its activation. *Acta Pharmacol Sin.* 2006 Dec;27(12):1600-7.

Zurada JM, Kriegel D, Davis IC. Topical treatments for hypertrophic scars. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Dec;55(6):1024-31.

Anexos

ANEXO 1

Toxicology in Vitro 23 (2009) 111–119

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines

C.A. Brohem^{a,1}, T.C.H. Sawada^{a,1}, R.R. Massaro^a, R.L. Almeida^a, D.P. Rivelli^a, C.D. Ropke^a, V.V. da Silva^a, T.M. de Lima^b, R. Curi^b, S.B.M. Barros^a, S.S. Maria-Engler^{a,*}

^a Department of Clinical Chemistry and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil

^b Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008

Accepted 13 November 2008

Available online 24 November 2008

Keywords:

4-Nerolidylcatechol

Pothomorphe umbellata

Melanoma

Invasion

Cytotoxicity

Apoptosis

MMPs

ABSTRACT

Pothomorphe umbellata, a native Brazilian plant, is popularly known to be effective in the treatment of skin lesions. This benefit is attributed to 4-nerolidylcatechol (4-NC), a compound extracted from *P. umbellata*. Since melanomas show prominent resistance to apoptosis and exhibit extreme chemoresistance to multiple forms of therapy, novel compounds addressing induction of cell death are worth investigating. Here, we evaluated effects on cell cycle progression and possible cytotoxic activity of 4-NC in melanoma cell lines as well as human dermal fibroblasts. Inhibitory effects on cell invasion and MMP activity were also investigated. 4-NC showed cytotoxic activity for all melanoma cell lines tested ($IC_{50} = 20\text{--}40\text{ }\mu\text{M}$, 24 h for tumoral cell lines; $IC_{50} = 50\text{ }\mu\text{M}$ for fibroblast cell line) associated with its capacity to induce apoptosis. Furthermore, this is the first time that 4-NC is described as an inhibitor of cell invasiveness, due mainly to a G1 cell cycle arrest and inhibition of MMP-2 activity in melanoma cell lines.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A significant number of novel therapies now released for clinical use are derived from or inspired by natural products. This has been one of the major cornerstones of pharmaceutical drug development (Newman et al., 2003; Balunas and Kinghorn, 2005; Tan et al., 2006; Gordaliza, 2007). The abundant species diversity found in Native Brazilian flora and fauna enable these plants to be a rich source of potentially active therapeutic agents. While these natural products may become essential tools in drug development, many of them still remain to be characterized by chemical-pharmacological studies.

Pothomorphe umbellata (L.) Miq. (Piperaceae) [syn. *Heckeria umbellata* (L.) Kunth., *Piper umbellata* (L.), *Piper hilarianum* Stend.], a plant native to the Brazilian Atlantic Forest has been widely used in Brazilian folk medicine for the treatment of a variety of ailments, most notably skin lesions (Amorim et al., 1988; Hammer and Johns, 1993; de Ferreira-da-Cruz et al., 2000). The root extract of *Pothomorphe umbellata* (*P. umbellata*) has been shown to exert potent antioxidant activity on the skin by delaying the onset as well as reducing the effects of UVB-induced skin photoaging (Ropke

et al., 2002, 2003, 2005). This antioxidant activity of *P. umbellata* has now been attributed to its main compound, 4-nerolidylcatechol (4-NC) (Barros et al., 1996; Desmarchelier et al., 1997; Ropke et al., 2002).

Ropke et al. (2006) have now demonstrated that the crude hydroethanolic root extract of *P. umbellata* also inhibits skin matrix metalloproteinases (MMPs), MMP-2 and MMP-9 *in vitro*. This was further demonstrated *in vivo* in a photoaging experimental model, whereby *P. umbellata* extract modulated extracellular matrix alterations following UVB exposure by inhibiting constitutive MMP-9 activity. The *in vitro* inhibitory pattern of MMP activities induced by 4-NC resembled that of *P. umbellata* extract observed *in vivo*. The authors postulated that the *in vivo* inhibition was a direct result of 4-NC being able to permeate the skin. Another study has described the *P. umbellata* extract-dependent inhibition of corneal MMP-2 and MMP-9, suggesting that this plant may be a candidate for the therapy of alkali-burned corneas (Barros et al., 2007).

MMPs have long been associated with cancer invasion and metastasis. They play a key role in basement-membrane penetration via extracellular matrix (ECM) degradation and intracellular signaling. In particular, MMP-2 and MMP-9 are overexpressed in several types of human cancer such as breast, lung, hepatocarcinoma and notably melanoma (Fassina et al., 2000; Hornebeck et al., 2002; Hofmann et al., 2005; Overall and Kleinfeld, 2006). Cutaneous melanomas are also notorious for their tendency to metastasize. Essential steps in this process are the degradation of basement membranes and remodeling of the extracellular matrix (ECM) by proteolytic enzymes such as the MMPs (Hofmann et al., 2005).

* Corresponding author. Departamento de Análises Clínicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580 Bloco 17, São Paulo – SP CEP 05508-900, Brazil. Tel.: +55 11 3091 3631; fax: +55 11 3813 2197.

E-mail address: silvya@usp.br (S.S. Maria-Engler).

¹ Both authors equally contributed to this work.

ANEXO 2

Controles positivos da técnica de imunohistoquímica. Amostra de pele humana doada pelo Dr Gilles Landman. Sendo, **A** – Queratina 10, **B** – queratina 14, **C** – S100, **D**- involucrina, **E**- β -catenina, **F** – E-caderina. Aumento 40x.

ANEXO 3

São Paulo, 5 de fevereiro de 2010.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Dra. Silvy Stuchi Maria Engler

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos” - **Pesquisador(a) Responsável:** Dra. Silvy Stuchi Maria Engler - **Co-Investigador(es):** Camila Eduardo Marinho, Carla Abdo Brohem, Manoela Tiago dos Santos - **Registro CEP-HU/USP:** 943/09 – **SISNEP CAAE:** 0062.0.198.000-09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 5 de fevereiro de 2010, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, inciso IX.2, letra “c”.

O primeiro relatório está previsto para 5 de fevereiro de 2011.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

ANEXO 4

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 66/2007

São Paulo, 29 de maio de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 28 de maio de 2007, **APROVOU** o projeto "Pesquisa sistemática de plantas medicinais: Potencial farmacoterapêutico de *Pothomorphe umbellata*" (Protocolo CEP nº 424) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP

ANEXO 5

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA nº 36/2006

São Paulo, 12 de junho de 2006.

Ilmo(a) Sr(a).
Silvia Berlanga de Moraes Barros
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 12 de junho do corrente, **APROVOU** o projeto "Pesquisa sistemática de plantas medicinais: Potencial farmacoterapêutico de Pothomorphe umbellata" (Protocolo CEEA nº 105), apresentado por Vossa Senhoria.

Sendo o que nos cumpre, reiteramos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
Vice-Presidente da CEEA

RECK-Mediated Inhibition of Glioma Migration and Invasion

Tatiana C. Silveira Corrêa,¹ Renato Ramos Massaro,¹ Carla Abdo Brohem,¹ Sebastião Roberto Taboga,² Marcelo Lazzaron Lamers,³ Marinilce Fagundes Santos,³ and Silvy Stuchi Maria-Engler^{1*}

¹Department of Clinical Chemistry & Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Department of Biology, IBILCE—University State of São Paulo, São José do Rio Preto, SP, Brazil

³Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

RECK is an anti-tumoral gene whose activity has been associated with its inhibitory effects regulating MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. RECK level decreases as glioblastoma progresses, varying from less invasive grade II gliomas to very invasive human glioblastoma multiforme (GBM). Since RECK expression and glioma invasiveness show an inverse correlation, the aim of the present study is to investigate whether RECK expression would inhibit glioma invasive behavior. We conducted this study to explore forced RECK expression in the highly invasive T98G human GBM cell line. Expression levels as well as protein levels of RECK, MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP were assessed by qPCR and immunoblotting in T98G/RECK+ cells. The invasion and migration capacity of RECK+ cells was inhibited in transwell and wound assays. Dramatic cytoskeleton modifications were observed in the T98G/RECK+ cells, when compared to control cells, such as the abundance of stress fibers (contractile actin–myosin II bundles) and alteration of lamellipodia. T98G/RECK+ cells also displayed phosphorylated focal adhesion kinase (P-FAK) in mature focal adhesions associated with stress fibers; whereas P-FAK in control cells was mostly associated with immature focal complexes. Interestingly, the RECK protein was predominantly localized at the leading edge of migrating cells, associated with membrane ruffles. Unexpectedly, introduced expression of RECK effectively inhibited the invasive process through rearrangement of actin filaments, promoting a decrease in migratory ability. This work has associated RECK tumor-suppressing activity with the inhibition of motility and invasion in this GBM model, which are two glioma characteristics responsible for the inefficiency of current available treatments. *J. Cell. Biochem.* 110: 52–61, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: GLIOBLASTOMA; RECK GENE; CYTOSKELETON; INVASION; MIGRATION; MMP

Glioma is the most common primary brain tumor in adults and among them, glioblastoma multiforme (GBM), the more aggressive type, shows the higher incidence while the prognosis remains dismal. Gliomas display high vascularization, aggressive growth, and invasion into surrounding brain tissue, often remaining refractory to therapy [Lassman and Holland, 2007]. Because gliomas rapidly grow and invade the surrounding brain parenchyma, it is often impossible to achieve complete surgical resection without causing severe neurologic damage [Iwamaru et al., 2007]. While individual glioma cells migrate into the surrounding brain

parenchyma, other cancers metastatic to this site do not intermingle with host cells and grow as circumscribed destructive masses. Invasiveness is probably the greatest barrier to glioma treatment, since its diffuse infiltration is also the basis of surgical treatment failure.

The process of tumor cell invasion into the stromal tissue is closely related to interactions between the tumor cells and the extracellular matrix (ECM). Altered expression and modification of ECM proteins in tumor cells play a significant role in their invasion into surrounding normal tissue [Honma et al., 2007]. The matrix

Tatiana C. Silveira Corrêa and Renato Ramos Massaro contributed equally to this work.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: FAPESP; Grant numbers: 06/50915-1, 05/51194-3; Grant sponsor: CNPq; Grant sponsor: CAPES; Grant sponsor: PRP-USP.

The Present address of Marcelo Lazzaron Lamers: Department of Morphological Sciences, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul.

*Correspondence to: Prof. Silvy Stuchi Maria-Engler, PhD, 580 Lineu Prestes Ave, 17 Bldg 22 Room, São Paulo 05508-900, SP, Brazil. E-mail: silvy@usp.br

Received 15 September 2009; Accepted 25 November 2009 • DOI 10.1002/jcb.22472 • © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Published online 1 February 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

ANEXO 7

Carla Abdo Brohem

possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (2005). Atualmente é aluna de pós graduação da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Biologia Geral, com ênfase em Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: Pothomorphe umbellata, cicatrização, mmps, matriz extracelular

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 15/02/2010

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/0516643973524744>

Dados Pessoais

Nome Carla Abdo Brohem

Nascimento 22/05/1984 - Sao Paulo/SP - Brasil

CPF 32879821843

Formação Acadêmica/Titulação

2006 Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Ação do extrato de Pothomorphe umbellata nos componentes da matriz extracelular no processo de cicatrização da pele: modelos in vivo e in vitro
Orientador: Silvy Stuchi Maria-Engler
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2002 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Imunolocalização da proteína RECK e atividades de MMPs no processo invasivo em tumores cérvico-uterinos
Orientador: Silvy Stuchi Maria Engler
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Formação complementar

2008 Estágio como parte da formação no doutoramento.
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid - Espanha, CNIO, Espanha

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2006 - Atual Vínculo: Aluna , Enquadramento funcional: Pesquisadora , Carga horária: 8, Regime: Parcial

2004 - Atual Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Aluno, Regime: Integral

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Silveira Corrêa, Tatiana C., Massaro, Renato Ramos, BROHEM, C. A., Taboga, Sebastião Roberto, Lamers, Marcelo Lazzaron, Santos, Marinilce Fagundes, Maria-Engler, Silvy Stuchi RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. Journal of Cellular Biochemistry (Print). , p.n/a - n/a, 2010.
2. BROHEM, C, SAWADA, T, MASSARO, R R, ALMEIDA, R, RIVELLI, D, ROPKE, C, DASILVA, V, DELIMA, T, CURI, R, BARROS, S, BROHEM, C. A. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. Toxicology in Vitro. , v.23, p.111 - 119, 2009.
3. CARDEAL, L. B. S., BROHEM, C. A., CORREA, T. C. S., WINNISCHOFER, S. M. B., NAKANO, F., BOCCARDO, E., VILLA, L. L., SOGAYAR, M. C., MARIA-ENGLER, S. S. . HIGHER EXPRESSION AND ACTIVITY OF METALLOPROTEINASES IN HUMAN CERVICAL CARCINOMA CELL LINES IS ASSOCIATED WITH HPV PRESENCE. . HIGHER EXPRESSION AND ACTIVITY OF METALLOPROTEINASES IN HUMAN CERVICAL CARCINOMA CELL LINES IS ASSOCIATED WITH HPV PRESENCE. , 2006.
4. CORREA, T. C. S., BROHEM, C. A., WINNISCHOFER, S. M. B., CARDEAL, L. B. S., SASAHARA, R.M., TABOGA, S.R., SOGAYAR, M. C., MARIA-ENGLER, S. S. Downregulation of the RECK- tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. Journal of Cellular Biochemistry. , 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BROHEM, C. A., PAES, R. D., ALMEIDA, R. L., RIVELLI, D. P., OKADA, S. S., CAMPA, A., SOENGAS, M. S., MARIA-ENGLER, S. S., BARROS, S. B. M. Dual behaviour of 4-nerolidylcatechol: pro and antioxidant activities In: Free Radicals and Antioxidants in Chile, 2009, Santiago. **Free Radicals and Antioxidants in Chile.** , 2009.
2. CORREA, T. C. S., MASSARO, R R, BROHEM, C. A., SOGAYAR, M. C., TABOGA, S.R., LAMERS, M., SANTOS, M., MARIA-ENGLER, S. S. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion In: Beatson International Cancer Conference, 2009, Glasgow. **RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion.** , 2009. p.110 -
3. BROHEM, C. A., PAES, R. D., BARROS, S. B. M., MARIA-ENGLER, S. S.

- Role of the microenvironment in the treatment of melanoma cells with doxorubicin In: X Simpósio Brasileiro de Matriz extracelular and V International Symposium on Extracellular Matrix, 2009, Búzios.
- X Simpósio Brasileiro de Matriz extracelular and V International Symposium on Extracellular Matrix.** , 2009.
4. MASSARO, R R, BROHEM, C. A., ALMEIDA, R. L., RIVELLI, D. P., BARROS, S. B. M., MARIA-ENGLER, S. S.
4-nerolidilcatecol, um indutor de autofagia, induz morte celular e inibe invasao de linhagens de glioma humano In: FeSBE, 2009, Águas de Lindóia.
XXIV Reuniao Anual da FeSBE. , 2009.
 5. CORREA, T. C. S., MASSARO, R. R., BROHEM, C. A., SOGAYAR, M. C., TABOGA, S.R., MARIA-ENGLER, S. S.
Inhibition of cell invasion in an MMP-independent manner in the T98G human glioblastoma cell line overexpressing the reck gene. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, Sao Paulo.
XIV Congresso SBBC. , 2008. p.99 - 99
 6. BROHEM, C. A., SAWADA, T.C.H., MASSARO, R. R., ALMEIDA, R. L., RIVELLI, D. P., ROPKE, C. D., SILVA, V. V., DELIMA, T, CURI, R
Potencial effect of 4-nerolydilcatechol in inhibition of melanoma cell death and invasiveness In: XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, 2008, Sao Paulo.
XIV Congresso SBBC. , 2008. p.99 - 99
 7. BROHEM, C. A., ROPKE, C. D., ALMEIDA, R. L., RIVELLI, D. P., MASSARO, R. R., SAWADA, T.C.H., SILVA, V. V., BARROS, S. B. M., MARIA-ENGLER, S. S.
Ação do extrato de Pothomorphe umbellata nos componentes da matriz extracelular no processo de cicatrização da pele In: Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2007, São Paulo.
Cosmetic and Toiletries. São Paulo: Tecnopress, 2007. v.19. p.84 - 85
 8. BROHEM, C. A., SAWADA, T.C.H., MASSARO, R. R., ALMEIDA, R. L., RIVELLI, D. P., BARROS, S. B. M., ROPKE, C. D., MARIA-ENGLER, S. S.
Ação do extrato de Pothomorphe umbellata sobre fibroblastos humanos dérmicos e na modulação de atividade MMP-2 e MMP-9 em modelo de cicatrização cutânea In: Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2007, Sao Paulo.
Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP. , 2007.
 9. Barros, L.F.M., ROPKE, C. D., SILVA, V. V., SAWADA, T.C.H., BROHEM, C. A., BARROS, S. B. M., BELFORT Jr, R
The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis and metalloproteinases activities in the rat cornea. In: ARVO's 2007 Annual Meeting, 2007
Investigative Ophthalmology and Visual Science. , 2007.
 10. SAWADA, T.C.H., ROPKE, C. D., BROHEM, C. A., RIVELLI, D. P., ALMEIDA, R. L., MIRANDA, D. V., SILVA, V. V., BARROS, S. B. M., MARIA-ENGLER, S. S.
Citotoxicity of Pothomorphe umbellata root extract and 4-neorlidylcatechol on human melanoma cells (SK-MEL-28). In: 3rd International Conference on Stess in Skin Medicine and Biology, 2006, Adros.
3rd International Conference on Stess in Skin Medicine and Biology. , 2006. p.98 - 98
 11. BROHEM, C. A., CARDEAL, L. B. S., TABOGA, S.R., MARIA-ENGLER, S. S.
Processo Invasor do Câncer Cervical Uterino: análise das Metaloproetinas-2,-9,-14, TIMP-2 e do gene supressor de tumor RECK In: XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2006, São Paulo.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. , 2006. v.42.

12. CARDEAL, L. B. S., BROHEM, C. A., CORREA, T. C. S., SOGAYAR, M. C., MARIA-ENGLER, S. S.
Higher Expression and Activity of Metalloproteinases are Associated to HPV Presence in Human Cervical Carcinomas In: X Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2005, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo. , 2005. v.41. p.58 - 58
13. ★ CARDEAL, L. B. S., BROHEM, C. A., CORREA, T. C. S., WINNISCHOFER, S. M. B., BOCCARDO, E., VILLA, L. L., SOGAYAR, M. C., MARIA-ENGLER, S. S.
Higher Expression and Activity of Metalloproteinases in Association with HPV Presence in Human Cervical Carcinomas Cell Lines In: IV São Paulo Research Conference Cancer today from Molecular Biology to treatment, 2005, São Paulo.
Applied Cancer Reserch Supplement. São Paulo : Antonio Prudente Foundation A.C. Camargo Cancer Hospital Treatment and Research Center. , 2005. v.2. p.60 - 60
14. MASSARO, R. R., BROHEM, C. A., CORREA, T. C. S., CARDEAL, L. B. S., MARIA-ENGLER, S. S.
Imunolocalização de RECK e atividade de MMP-2 e MMP-9 nas linhagens de glioma humano A172 e T98G durante o processo invasivo In: 13º Simpósio Internacional de iniciação científica da USP, 2005, Ribeirão Preto.
13º Simpósio Internacional de iniciação científica da USP. , 2005.
15. CARDEAL, L. B. S., BROHEM, C. A., CORREA, T. C. S., SOGAYAR, M. C., MARIA-ENGLER, S. S.
RECK GENE EXPRESSION AND MMPS ACTIVITIES IN HUMAN CERVICAL CANCER. In: Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2005, Águas de Lindóia.
: Federação de Sociedades de Biologia Experimental. , 2005. v.20. p.124 - 124
16. ★ CORREA, T. C. S., WINNISCHOFER, S. M. B., FIGUEIRA, R. C. S., CARDEAL, L. B. S., BROHEM, C. A., SASAHARA, R.M., TABOGA, S.R., SOGAYAR, M. C., MARIA-ENGLER, S. S.
The Invasiveness Process in Glioma Cell Lines is Modulated by the RECK Gene Depending on ECM Components. In: Gordon Research Conference on Fibronectin, Integrins and Related Molecules, 2005, Ventura - Califórnia, EUA.
Gordon Research Conference on Fibronectin, Integrins and Related Molecules. , 2005.
17. CORREA, T. C. S., WINNISCHOFER, S. M. B., FIGUEIRA, R. C. S., CARDEAL, L. B. S., BROHEM, C. A., SOGAYAR, M. C., MARIA-ENGLER, S. S.
"RECK gene expression is downregulated by extracellular matrix elements in glioma cell invasiveness" In: : IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2004, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2004. v.40. p.23 - 23
18. ★ CORREA, T. C. S., WINNISCHOFER, S. M. B., FIGUEIRA, R. C. S., CARDEAL, L. B. S., BROHEM, C. A., SOGAYAR, M. C., MARIA-ENGLER, S. S.
RECK Gene Expression is Downregulated by Extracellular Matrix Elements in Glioma Cell Invasiveness Process. In: 3º International Symposium on Extracellular Matrix/ 8º Brazilian Symposium on Extracellular Matrix, 2004, Angra dos Reis - RJ.
RECK Gene Expression is Downregulated by Extracellular Matrix Elements in Glioma Cell Invasiveness Process.. , 2004. p.134 - 134

Produção Técnica

Trabalhos técnicos

1. BROHEM, C. A.
Instituto do Milênio INOFAR: Inovação e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, 2006

Demais produções técnicas

1. BROHEM, C. A., MARIA-ENGLER, S. S.
Curso de pós Graduação: "Tópicos em Cultura de Células", 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 08/06/2010 às 16:19:31.